Таблиця 1. **Зміни питомого об'єму органел в остеобластах метафізів стегнової кістки щурів в умовах зняття опорного навантаження**

Органели	Контроль	Експеримент
Гранулярна ендоплазматична сітка	0,333±0,017	0,312±0,016*
Комплекс Гольджі	0,230±0,014	0,180±0,009*
Лізосомоподібні тільця	0,015±0,001	0,025±0,002*
Інші структури	0,412±0,021	0,483±0,024*

*-відмінності достовірні у порівнянні з контролем, p□0,05

Мітохондрії мають більшу, ніж в остеобластах контрольної групи, електронну щільність матриксу. Як одна з можливих причин такого стану мітохондрій в посмугованих м'язових волокнах, розглядається акумуляція високоенергетичного фосфату при гравітаційному розвантаженні [6]. В інших експериментах відмічено також зниження потенціалу мітохондріальних мембран, зниження рівня антиапоптозного протеїну bcl-2, а також akt-протеїну. Ці зміни свідчать, що мікрогравітація порушує функції мітохондрій, тим самим індукуючи апоптоз остеобластів.

Зони мінералізації поблизу остеобластів у щурів експериментальної групи менш виражені, ніж у контролі. На кісткових поверхнях частіше зустрічаються апоптозні остеобласти.

У порівнянні з контролем помітно, що в клітинах відбувається просторова дезорганізація органел, перш за все каналів ГЕС. Вочевидь, це пов'язано з деструкцією частини цитоскелету (мікротрубочок та мікрофіламентів). Деструкція цитоскелету in vitro в умовах модельованої мікрогравітації відмічена також, в дослідах Mevers [11]. Було показано, що в умовах невагомості збирання елементів цитоскелету змінюється, а утворення мікротрубочок in vitro визначається направленістю вектора гравітації [8,10].

Ультраструктурний стан остеобластів в губчастій кістці метафізів стегнової кістки щурів свідчить про зниження інтенсивності біосинтезу і секреції компонентів органічного матриксу. Судячи з відсутності остеобластів різних функціональних станах, немає й асинхронності протікання процесів специфічних біосинтез, а саме розходження в клітинах біосинтезу колагенових білків і глікозаміногліканів, що характерно для зон активного остеогенезу в контролі. Аналогічні результати були отримані при вивченні впливу мікрогравітації на остеогенез в метафізах щурів, які знаходились на борту біосупутника "Біон-9" і "Біон-11" [2].

Висновки: електронно-мікроскопічні дослідження остеобластів в метафізах стегнової кістки щурів показали, що в умовах зняття опорного навантаження з задніх кінцівок популяція остеобластів стає більш однорідною, в ній переважають функціонально неактивні форми. В ядрах клітин посилюється гетерохроматизація, в цитоплазмі змінюється типова архітектоніка органел, питомий об'єм гранулярної ендоплазматичної сітки і комплексу Гольджі зменшується, збільшується питомий об'єм лізосомоподібних тілець, що вказує на зниження в клітинах біосинтетичних процесів і посилення внутрішньоклітинного аутолізу при зниженні функціонального навантаження.

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. – М.: Медицина, 1990. – 384 с. 2. Дурнова Г.Н., Капланский А.С., Морей-Холтон Э.Р., Воробьева К.И. Исследования большеберцовых костей крыс, экспонированных на "Спейслэб-2": гистоморфометрический анализ // Авиакосм. и экол. мед. – 1996. – Т.30, №1. – С.21-26. 3. Дурнова Г.Н., Корольков В.И., Кротов В.П. Гистоморфометрия подвздошных костей обезьян после антиортостатической гипокинезии и "сухой" иммерсии // Авиакосмич. и экол. мед. – 2004. – Т.38, №5. – С. 33-37. 4. Оганов В.С., Бакулин А.В., Новиков В.Е., Мурашко Л.М., Кабицкая О.Е, Моргун В.В., Воронин Л.И., Шнайдер В., Шейклфорд Л., ЛеБланк А. Реакции костной системы человека в космическом полете. Феноменология // Авиакосмическая и экологическая медицина. – 2005. – Т.39, № 6. – С.3-9. 5. Родионова Н.В., Оганов В.С. Клеточные механизмы моделирования костной ткани при гипокинезии и микрогравитации // Материалы XIII конференция по космической биологии и космической медицине, Ленинград, 12-15 авг. 1991 г. – М.: ИМБП МЗ СССР, 1991. – С. 105-106. 6. Родіонова Н.В. Цитологічні механізми перебудов у кістках при гіпокінезії та мікрогравітації. – К.: Державне науково-виробниче підприємство "Видавництво "Наукова думка" НАН України", 2006. – 238 с. 7. Хвостова С.А., Свешников К.А. Взаимосвязь между механизмом адаптивных и минеральной плотностью костей скелета у больных остеопорозом и с переломами // Современные проблемы науки и образования. – 2008. – №3. – С. 34-38. 8. Hughes-Fulford M, Rodenacker K, Jütting U. Reduction of anabolic signals and alteration of osteoblast nuclear morphology in microgravity // Journal of cellular biochemistry. – 2006. – Vol. 99, №2. – P. 435-449. 9. Morey-Holton E.R., Wronsky T.J. Animal model for simulating weightlessness // The Physiologist. – 1981. – V.24, N6. – P. 45-48. 10. Mosley R. Osteoporosis and bone functional adaptation: Mechanobiological regulation of bone architecture in growing and adult bone, a review // J. of Rehabil. Res. and Develop. – 2000. – V.37, N2. – P. 1858-1866. 11.Mevers V.E., Zavzafoon M.D., Ouglas J.T., McDonald J.M. Rho A and Cytoskeletal Disruption Mediate Reduced Osteoblastogenessis and Enhanced Adipogenesis of Human Mesenchymal Stem Cells in Modeled Microgravity // J. Bone and Miner. Res. – 2005. – Vol. 20, N10. – P. 1858-1866. 12. Zerath E., Holy X. Effects of BMP-2 on osteoblastic cell and on skeletal growth and bone formation in unloaded rats // Growth Hormone and IGF Res. – 1998. – N8. – P.141-149.

Надійшла до редколегії 13.10.09

УДК 612.82/.83; 612.821

Н. Філімонова, канд. фіз.-мат. наук,
М. Макарчук, д-р біол. наук, Т. Кравець, канд. фіз.-мат. наук

КЛАСТЕРІЗАЦІЯ ДИНАМІКИ ЕКГ ЛЮДИНИ ЗА НЕЙРОННОЮ МЕРЕЖЕЮ КОХОНЕНА ТА ВЕЙВЛЕТ-АНАЛІЗОМ НА ОСНОВІ ФУНКЦІЙ КРАВЧУКА

Розроблено метод вейвлет-аналізу на основі функцій Кравчука, який дозволяє дослідити тонкі структури ЕКГ та з високою точністю представити локальні особливості сигналів у часі. Використання функцій Кравчука та методу гіперкомплексних систем забезпечує інваріантність виділення інформативних ознак сигналу. Кластерізація динаміки ЧСС людини за нейронною мережею Кохонена та вейвлет-аналізом на основі функцій Кравчука виявила зміну стану обстежуваного при зміні типу та складності когнітивного навантаження впродовж обстеження.

The method of wavelet analysis based on Krawtchouk functions is developed. This method allows to investigate thin structures of EKG and to present the local features in time with high accuracy. Employment of Krawtchouk functions and a method of hypercomplex systems ensure invariance of extraction of informative features of a signal. The clusterization of dynamics of cardiac rhythm of the person with Kohonen neural network and wavelet analysis based on Krawtchouk functions have revealed change of a state of investigated at change of type and complexity of cognitive loads at inspection.

Вступ. Дослідження тонкої структури електрофізіологічних сигналів дозволяє більш глибоко зрозуміти причинні механізми, які викликають певні процеси. Особливо слід виділити задачі аналізу ЕКГ. Метод ста-

© Філімонова Н., Макарчук М., Кравець Т., 2010

ндартної ЕКГ та проведення проб з навантаженням досягли на даний момент певної границі своїх діагностичних можливостей. В зв'язку з цим великий інтерес викликають нові методи реєстрації ЕКГ високої роздільності та обробки ЕКГ, які дозволяють виділити та проаналізувати високочастотні низькоамплітудні компоненти ЕКГ-сигналу, які несуть додаткову інформацію про розповсюдження збудження по волокнах міокарда.

Існують декілька підходів до аналізу тонкої структури ЕКГ. Одним з найбільш розповсюдженим є спектральний аналіз ЕКГ, яке реалізується перетворенням Фур'є сигналу. Основним недоліком перетворення Фур'є є те, що частотні компоненти не можуть бути локалізовані у часі, що не дозволяє досліджувати динаміку змін частотних параметрів сигналу. При збільшенні вікна обробки сигналу покращується роздільність за частотою, але погіршується за часом, і навпаки. Це пов'язано з тим, що віконна функція фіксована впродовж всього перетворення. Проблема роздільності пов'язана з принципом Гейзенберга, який вказує, що неможливо визначити для певного моменту часу які спектральні компоненти присутні в сигналі.

Для вирішення всіх цих проблем було розроблено метод вейвлет – перетворення нестаціонарних сигналів. Поняття вейвлет (wavelet – коротка, або маленька хвиля) було введено в 1984 р. А. Гроссманом (A. Grossman) та Дж. Морлетом (J. Morlet) в зв'язку з необхідністю аналізу сейсмічних та акустичних сигналів, які є нестаціонарними за своєю природою [1]. Основна область застосування вейвлет – перетворення – аналіз та обробка сигналів, які нестаціонарні за часом на неоднорідні у просторі, коли результати аналізу повинні містити не тільки загальну частотну характеристику, але і інформацію по певні локальні координати, на яких проявляють себе ті або інші групи частотних складових. В цьому випадку нестаціонарний сигнал аналізується шляхом розкладу за певними базисними функціями (відмінними від гармонічних), які отримані з деякого прототипу шляхом стиснення та зсуву. Функція прототип називається материнським вейвлетом. Перевагою вейвлет – перетворення є математична коректність процедури. Вейвлетом є будь-яка функція, яка задовольняє двом умовам: 1.Середнє значення (інтеграл по всій прямій) дорівнює нулю. 2. Функція швидко спадає при $t \to \infty$. На даний час вейвлет-аналіз широко використовується при аналізі таких нестаціонарних сигналів, як ЕКГ [2]. Найчастіше при цьому використовують вейвлети Морлета, Добеши, Хаара, "мексиканська шляпа" та похідні гауссіана (функції Ерміта).

Об'єкт та методи досліджень. Метою роботи було продемонструвати можливості вейвлет-аналізу на основі функцій Кравчука дослідження динамічних змін електрокардіограми (ЕКГ) обстежуваного впродовж виконання ним тестового завдання та класифікації стану людини у динаміці на основі визначених узагальнених спектральних коефіцієнтів та методу кластерізації за нейронною мережею Кохонена.

Тестування асоціативної пам'яті проводилось за наступною схемою: на екрані монітора обстежуваному пред'являлись 15 пар слів, які він повинен був запам'ятати за 40 с. Через 1 хв. після того, як слова згаснуть, у верхньому прямокутнику послідовно з'являлись перші слова пар. Завдання обстежуваного – не більше, ніж за 60с знайти номер слова, що відповідає парі, набрати цей номер на клавіатурі і натиснути клавішу "ENTER". Тест асоціативної пам'яті складався з наступних субтестів: асоціації за схожістю; асоціації за контрастом; асоціації за суміжністю за часом; асоціації за суміжністю за простором та створення асоціативних пар (нелогічні асоціації) [3].

Крім того, у обстежуваного реєстрували ЕКГ до початку обстеження та під час проведення тестування. Для реєстрації та налізу ЕКГ використовували 12-канальний електрокардіограф "Полі-Спектр-12" (ООО "Нейрософт", Росія, ЕС-сертифікат № RQ060612-V від 02.03.2006 р.).

Для вейвлет-аналізу ЕКГ ми використовували в якості материнського вейвлету функції Кравчука. Вейвлети на основі похідних гауссіана фактично використовують функції Ерміта. Однак, обчислення коефіцієнтів розкладу сигналу за цими функціями потребує виконання великої кількості трудомістких операцій чисельного інтегрування. Крім того, при комп'ютерній реалізації відповідних алгоритмів дискретизація базисних функцій призводить до порушення їх ортогональності, що в свою чергу, призводить до істотних помилок при аналізі сигналу та його відновленні за узагальненим спектром. Тому в алгоритмі виділення інформативних ознак дискретного сигналу було запропоновано використовувати функції Кравчука, оскільки їх використання в комп'ютерному спектральному аналізі сигналів є вільним від недоліків функцій неперервного аргументу, бо вони з самого початку будуються на скінченій кількості точок як повна ортонормована система функцій дискретного аргументу. На відміну від інших вейвлетів запропонований метод дозволяє вирішити проблему фіксування початкової точки аналізу, оскільки є інваріантним відносно зсуву. Інваріантність досягається завдяки використанню в алгоритмі виділення істотних ознак сигналу методу гіперкомплексних систем (операторів узагальненого зсуву) [4-7].

За результатами вейвлет-аналізу дослідники намагаються розробити певну класифікацію станів людини. Перший етап будь-якої класифікації – це кластерізація результатів. В [2] для оцінки схожісті між точками результатів вейвлет-аналізу на основі материнського вейвлету Морлета QRS – комплексу одного обстежуваного в різні проміжки часу було застосовано процедуру кластерізації за методом побудови ієрархічного дерева класифікації в пакеті прикладних програм STATISTICA. Однак, цей метод має серйозні недоліки. По-перше, не завжди можна побудувати розділюючи поверхні, а по-друге, для цього методу не існує чітких критеріїв якості моделі. Тому, останнім часом все частіше кластерізацію здійснюють на нейронних мережах [8].

Для кластерізації результатів вейвлет – аналізу на основі функцій Кравчука було використано мережу Кохонена [9-10]. Нейрона мережа з навчанням без керування є мережею Кохонена або самостворювальною картою ознак. Зазначимо, що при керованому навчанні спостереження, що складають навчальні дані, разом з вхідними даними містять також і вихідні значення, і мережа повинна відновити відображення, яке переводить перші у другі. У випадку некерованого навчання навчальні дані містять лише значення вхідних змінних і мережа Кохонена вчиться розуміти саму структуру даних. Результати вейвлет-аналізу визначають певний стан серцево-судинної системи в динаміці. Таким чином, мережа Кохонена виконує розвідувальний аналіз даних, а саме – розпізнає кластери у станах і встановлює близькість відповідних станів. Якщо в станах розпізнано класи, то їх можна позначити, після чого в подальшому мережа зможе розв'язувати і задачі класифікації. Мережа Кохонена може виявляти нові стани. Якщо мережа зустрічається зі спостереженням, несхожим на жо-

ден із відомих зразків, то вона не може класифікувати такий набір і тим самим встановить його новизну. Мережа Кохонена має всього два шари: вхідний та вихідний, що складається з радіальних елементів (вихідний шар називається шаром топологічної карти). Елементи топологічної карти розташовуються в деякому просторі, як правило, двовимірному. Навчається мережа методом послідовних наближень. Починаючи з випадковим чином вибраного початкового розташування центрів, алгоритм поступово поліпшує його так, щоб відловлювати кластерізацію навчальних даних. В результаті мережа організується таким чином, що елементи, які відповідають центрам, розташованим близько один від одного в просторі входів, будуть розташовані близько один від одного і на топологічній карті.

Основний алгоритм навчання мережі складається з декількох послідовних епох, на кожній з яких слід опрацювати кожен із навчальних прикладів та виконати визначений набір операцій:

1) вибрати вигравший нейрон (тобто той, який розташований ближче всього до вхідного прикладу);

2) скоректувати вигравший нейрон так, щоб він став більш схожим на цей вхідний приклад (взявши зважену суму попереднього центру нейрона та навчального приклада).

При обчисленні зваженої суми використовується поступово спадний коефіцієнт швидкості (норми) навчання, для того щоб на кожній новій епосі корекція ставала все більш тонкою. Мірою близькості між кластерним елементом і вхідним прикладом є квадрат евклідової відстані між ними $\left(d^2\right)$, що обчислюється за формулою $d_j^2 = \sum_{i=1}^{n}\left(w_{ij} - x_i\right)^2$, де $\left(w_{ij}\right)$ – координати j-го елемента, $\left(x_i\right)$ – координати вхідного прикладу, n – значення розмірності. Координати кластерного елемента оновлюються за формулою: $w_{ij}\left(m+1\right) = w_{ij}\left(m\right) + \eta\left(m\right)\left(x_i - w_{ij}\left(m\right)\right)$, де m – номер епохи, η – норма навчання.

Властивість топологічного впорядкування досягається в алгоритмі за допомогою використання поняття околу, тобто декілька нейронів, які оточують вигравший нейрон. Подібно до швидкості навчання, розмір околу зменшується з часом, так що на останніх етапах окіл стає нульовим (містить лише сам вигравший нейрон). При цьому в алгоритмі Кохонена коректування застосовується не тільки до вигравшого нейрона, але й до всіх нейронів із його поточного околу.

Після того, як мережа навчена розпізнавати структуру даних, її можна використовувати як засіб візуалізації при аналізі даних. Для кожного нейрона можна підрахувати, скільки раз він вигравав при опрацюванні навчальних прикладів, чи поділяється карта на окремі кластери. Якщо опрацювати окремі спостереження, то по зміні топологічної карти можна спробувати з'ясувати чи мають зміст введені кластери. Після того, як кластери виявлено, нейрони карти помічаються змістовними мітками. Коли топологічна карта побудована, на вхід мережі можна подавати нові спостереження. Якщо вигравший при цьому нейрон був раніше помічений ім'ям класу, то мережа виконує класифікацію. У противному випадку вважається, що мережа не прийняла ніякого рішення.

Результати та їх обговорення. Для демонстрації методу було обрано окрему гілку вейвлет-аналізу, а саме – послідовний аналіз ЧСС вікном у 8 точок, оскільки найбільшу проблему при спектральному аналізи викликають саме вузькі високочастотні компоненти, які зазвичай вважають артефактами, але які можуть мати діагностичну цінність при дослідженні потенціалів повільної активації в міокарді. А саме, до послідовності ЧСС, яку отримано під час тестування асоціативної пам'яті обстежуваного (19 років, жіночої статі) довжиною в 1424 точки була застосована покрокова процедура вейвлет – аналізу вікном у 8 точок на основі функцій Кравчука, причому в кожному вікні виділялись інваріантні інформативні ознаки сигналу. Таким чином, було отримано множину з 1246 інформативних ознак послідовності R-R – інтервалів, яка характеризувала стан серцево-судинної системи обстежуваного в динаміці, а саме: по 7 узагальнених спектральних коефіцієнта в 178 вікнах (рис.1.а).

З метою оцінки повторювальності стану обстежуваного до повного набору інформаційних компонент вейвлет – аналізу було застосовано кластерний аналіз за мережею Кохонена (STATISTICA 8.0 (StatSoft, USA, 1984-2007)). Кожен стан визначався 7 інваріантними інформативними ознаками. В моделі для початкового аналізу було обрано наступне співвідношення: 20% випадково отриманих з наданих даних складали навчальну (тестову) множину, а 80% – тренувальну. Якість моделі визначається кількістю пропонованих елементів, які мають найменші активації, тобто найбільш близькі до відповідних центрів класів. При кластерізації результатів вейвлет – аналізу ЧСС за мережею Кохонена було встановлено, що саме для 8 кластерів активність нейронів є найменшою (153 елементи мали активність 0,1; 15 – 0,2; 5 – 0,3; 1 – 0,4; 4 – 0,5). Найбільш рідкими (особливими) були стани 6 кластеру (1 елемент), 7 кластеру (2 елементи) та 8 кластеру (2 елементи). Таким чином, практично всі стани розбились на 5 кластерів. Розподіл результатів вейвлет – аналізу по кластерам для 5 субтестів асоціативної пам'яті виявив специфічність станів для кожного з субтестів. Так, для 1 субтесту до 1 кластеру належать 47,73% інваріантних інформативних ознак ЧСС, до 2 – 20,45%, до 3 – 18,18%, до 4 – 9,09%, до 5 – 4,55%, до 6-8 – 0,00%. Для 2 субтесту до 1 кластеру належать 34,29% інваріантних інформативних ознак ЧСС, до 2 – 17,14%, до 3 – 22,86%, до 4 – 14,29%, до 5 – 8,57%, до 6 – 2,86%, до 7-8 – 0,00%. Для 3 субтесту до 1 кластеру належать 37,04% інваріантних інформативних ознак ЧСС, до 2 – 25,93%, до 3 – 14,81%, до 4 – 11,11%, до 5 – 7,41%, до 6-7 – 0,00%, до 8 – 3,70%. Для 4 субтесту до 1 кластеру належать 40,00% інваріантних інформативних ознак ЧСС, до 2 – 30,00%, до 3 – 5,00%, до 4 – 15,00%, до 5 – 5,00%, до 6 – 0,00%, до 7 – 5,00%, до 8 – 0,00%. Для 5 субтесту до 1 кластеру належать 25,00% інваріантних інформативних ознак ЧСС, до 2 – 13,46%, до 3 – 30,77%, до 4 – 13,46%, до 5 – 13,46%, до 6 – 0,00%, до 7 – 1,92%, до 8 – 1,92%. Для першого субтесту значуще більший відсоток інваріантних інформативних ознак ЧСС належить до 1 кластеру, в той час, як для 3 та 4 субтестів характерним є схожий розподіл інваріантних інформативних ознак ЧСС практично по всім кластерам. Другий субтест займає проміжне місце між 1 та 3-4 субтестами за відсотковим розподілом результатів між кластерами. П'ятий субтест відрізняється значуще меншим відсотком приналежності результатів 1 кластеру, та більшим – 3 кластеру.

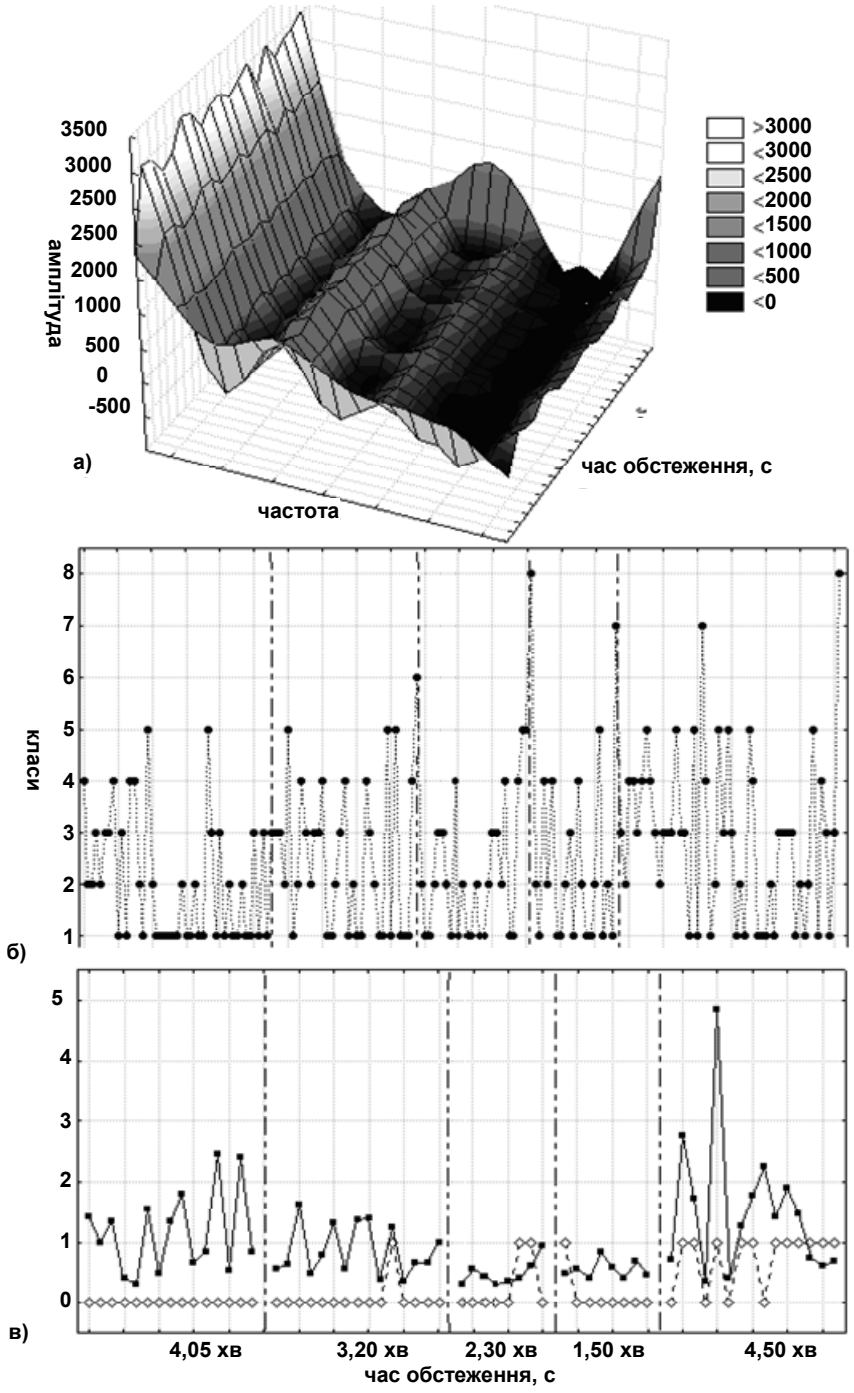

Рис.1. Динаміка стану обстежуваного: а) – за результатами вейвлет-аналізу R-R інтервалів, б) – за нейронною мережею Кохонена, в) – за часом реакції та функцією помилок при виконанні тестових завдань

Таким чином, вейвлет-аналіз виявив схожість в реакцях серцево-судинної системи при тестуванні асоціативної пам'яті за суміжністю за часом та за суміжністю за простором. Найбільш стабільним був стан при тестуванні асоціативної пам'яті за схожістю, що свідчить про можливо найменшу складність завдання. Найбільш складним виявився 5 субтест, який полягав в створенні асоціативних пар. При цьому ЧСС мала найбільший розмах по кластерам (станам). Зазначимо також, що спостерігаємі частоти належності інформативних ознак саме 1-му кластеру були значущо меншими, ніж очікувані, а в 1 субтесті ці частоти були значущо більшими. Тобто, можна припустити, що до 1 кластеру належать інформаційні ознаки, які є характерними для стабільної (безпомилкової) роботи при не дуже складному когнітивному навантаженні.

Перші припущення, які ми робили при виборі кількості кластерів в моделі полягали в тому, що кожен з субтестів можливо характеризується якимось своїм особливим станом, який проявиться в приналежності інформаційних ознак певному кластеру. Однак, результати кластерізації виявили автоколивальні процеси в стані серцево-судинної системи. Для більшої наочності ми представили результати кластерізації у вигляді графіку, де по осі у відкладені номери кластерів (які, взагалі кажучи, є умовними), а по осі х – час обстеження, тобто динаміку стану по кластерам (Рис.1.б). На Рис.1 представлено сумісні графіки результатів вейвлет-аналізу ЧСС, розподілу цих

результатів по кластерам, часу відповіді в тестових завданнях та наявності/відсутності помилки при відповіді. Можна зробити припущення, що складність когнітивного навантаження проявляється в розкиді автоколивальних процесів, які представлені в динаміці ЧСС по певним фіксованим станам, які можуть не проявлятись при не дуже складних тестових завданнях.

Висновки. Вейвлет на основі функцій Кравчука є дискретним ортогональним вейвлетом, який дозволяє дослідити тонкі структури ЕКГ та з високою точністю представити локальні особливості сигналів у часі. Використання функцій Кравчука та методу гіперкомплексних систем при вейвлет – аналізі забезпечує інваріантність виділення інформативних ознак сигналу. Кластерізація динаміки ЧСС людини за нейронною мережею Кохонена та вейвлет-аналізом на основі функцій Кравчука виявила зміну стану обстежуваного при зміні типу та складності когнітивного навантаження впродовж обстеження.

1. Блаттер К. Вейвлет-анализ. Основы теории. Серия: "Мир математики". – М: Изд-во ТЕХНОСФЕРА РИЦ, 2004 г. – 280 с. 2. Бойцов С.А. Анализ сигнал-усредненной ЭКГ (по данным вейвлет-преобразования) у здоровых и больных ИБС / С.А. Бойцов и др. // Вестник аритмологии. № 23. 2001. – с. 32 – 36. 3. Філімонова Н., Макарчук М., Мірошник Т., Качуріна К. Взаємозв'язки між показниками асоціативної і оперативної пам'яті у жінок та чоловіків // Вісник Київського університету. Серія Біологія. – 2008. – Вип.54. – С. (у друці). 4. Krawtchouk M. Sur une generalisation des polynomes d'Hermite // C.R. Acad. Sci., Paris. – 1929, v. 189. – P.620 – 622. 5. Vainerman L.I. and Filimonova N.B. Signal processing and polynomials of discrete argument // Systems and Networks: Mathematical Theory and Applications. – Berlin: Akademie Verlag, 1994, Vol.II. – P. 889-890. 6. Vainerman L. and Filimonova N. Hyperspectral imagery with the application of Krawtchouk polynomials // Algorithms for Multispectral and Hyperspectral Imagery. A.Evan Iverson, Editor, Proc. SPIE. – 1994, V.2231 – P.148-155. 7. Забара С.С., Філімонова Н.Б., Зеленський К.Х. Метод виділення інваріантних ознак сигналів // Доповіді Національної академії наук України. – 2009. – №3. – С. 55-59. 8 Übeyli E.D. Wavelet/mixture of experts network structure for EEG signals classification // Systems with Applications: An International Journal. – V. 34, Issue 3 (April 2008). – P. 1954-1962 . 9. Каллан Р. Основные концепции нейронных сетей. – М.: Издательский дом "Вильямс", 2001. – 287 с. 10. Нейронные сети. STATISTICA Neural Networks. – М.: Горячая линия. – Телеком, 2000. – 182 с.

Надійшла до редколегії 28.10.09

УДК 579.222:577.217.32

Ю. Кондратюк, асп., М. Бабарик, студ.,
Л. Сидорик, канд. біол. наук, О. Корнелюк, д-р біол. наук

ОПТИМІЗАЦІЯ ПРОЦЕСУ БІОСИНТЕЗУ КАТАЛІТИЧНОГО МОДУЛЯ ТИРОЗИЛ-ТРНК СИНТЕТАЗИ ССАВЦІВ ТА ЙОГО ДОСЛІДЖЕННЯ ІМУНОХІМІЧНИМИ МЕТОДАМИ

Проведено оптимізацію умов бактеріальної експресії N-кінцевого каталітичного модуля тирозил-тРНК синтетази. Досліджено вплив концентрації індуктора синтезу цільового білка на його кінцевий вихід, а також встановлено оптимальний час культивування бактеріальної культури до та після додавання індуктора. Запропоновано оптимальну схему культивування культури E. coli BL21(DE3)pLysE для досягнення високого рівня виходу рекомбінантного білка. Методом імуноблотингу виявлено імунологічний перехрест між двома формами тирозил-тРНК синтетази – повнорозмірною та її каталітичним модулем.

The optimization of the conditions of bacterial expression of N-terminal catalytic module of tyrosyl-tRNA synthetase was conducted. The influence of the concentration of inductor synthesis of target protein at its final output and the best time of cultivation bacterial culture before and after adding inductor was investigated. The optimal conditions for cultivation culture E. coli BL21 (DE3) pLysE to achieve a high level expression of recombinant protein was proposed. As it has been shown by immunoblotting the polyclonal antibodies against tyrosyl-tRNA synthetase reacted both with the native enzyme and with its catalytic form.

Вступ. Аміноацил-тРНК синтетази (АРСази) є ключовими ферментами дорибосомного етапу біосинтезу білків, які каталізують реакцію приєднання певної амінокислоти до відповідної тРНК. Крім своєї основної функції, АРСази можуть виконувати неканонічні функції, які безпосередньо не пов'язані з біосинтезом білка [2].

Тирозил-тРНК синтетаза (TyrRS, КФ 6.1.1.1) ссавців є найбільш вивченою АРСазою ссавців, і складається з каталітичного та некаталітичного доменів, яким властиві деякі неканонічні функції. Так ізольований N-кінцевий каталітичний модуль (39K TyrRS), що відповідає вкороченій формі фермету ("мінімальна" TyrRS), має повну ферментативну активність в експериментах *in vitro* і в той же час може функціонувати як цитокін (подібний до інтерлейкіну-8) та стимулювати ангіогенез. COOH-кінцевий модульTyrRS теж має подвійну функцію: бере участь у взаємодії з тРНК як фактор, що підсилює специфічність зв'язування тРНК з синтетазою, та після протеолітичного розщеплення функціонує як цитокін (подібний до цитокіну EMAP II), що стимулює хемотаксичну активність моноцитів, підсилює прокоагуляційну активність ендотеліальних клітин [1, 3, 8, 9].

Вивчення процесу біосинтезу еукаріотичних білків в прокаріотичних клітинах приваблювало значну увагу дослідників [4]. Значною мірою це зумовлено потребою оптимізації процесів біотехнологічного виробництва, розробкою та створенням медичних препаратів нового покоління на основі цих білків [11, 13], яким може являтись і досліджуваний нами, а з огляду на те, що окремі модулі та мутантні форми тирозил-тРНК синтетази мають унікальні властивості, тому оптимальні умови експресії необхідно підбирати індивідуально для кожного модифікованого білка.

Імунохімічні методи дослідження значно розширюють можливості вивчення як традиційних, так і неканонічних функцій клітинних компонентів. Вони дають можливість вивчати структуру та функції білків на молекулярному та клітинному рівнях, тому зараз при вивченні структурно-функціональної організації ферментів, у тому числі і АРСаз, широкого застосування набули імунохімічні методи з використанням як полі-, так і моноклональних антитіл [6, 7].

В даній роботі нами проведено дослідження впливу умов культивування на вихід каталітичного модуля повнорозмірної TyrRS, з метою отримання даного білка у великих кількостях, здійснено його афінну очистку та проведено імунохімічне дослідження за допомогою поліклональних антитіл до повнорозмірної тирозил-тРНК синтетази для виявлення імунологічного перехресту між двома формами тирозил-тРНК синтетази – повнорозмірною та її каталітичним модулем.

Об'єкт та методи досліджень. В роботі використаний штам-продуцент рекомбінантного білка, одержаний на основі реципієнта *Escherichia coli BL21(DE3)pLysE.*

© Кондратюк Ю., Бабарик М., Сидорик Л., Корнелюк О., 2010