

ИССЛЕДОВАНИЕ ПАРАМЕТРОВ ГИДРАТАЦИИ И ПОВЕРХНОСТНОГО НАТЯЖЕНИЯ ПЛАЗМЫ КРОВИ БОЛЬНЫХ ОГРАНИЧЕННОЙ СКЛЕРОДЕРМИЕЙ

Э.Н. Солошенко¹, Г.М. Беляев¹, А.К. Кондакова¹,
В.Г. Колесников², Н.В. Хмель², З.М. Шевченко¹, Т.П. Ярмак¹

¹ГУ «Институт дерматологии и венерологии НАМН Украины»

²Институт радиофизики и электроники им. А.Я. Усикова НАН Украины

Резюме. Исследование гидратации и поверхностного натяжения плазмы крови больных ограниченной склеродермией в КВЧ-диапазоне радиоволн ($f = 35,6 \div 37,7$ ГГц) проведено в области дисперсии диэлектрической проницаемости свободной воды. Рассчитан индекс реакции относительно наличия аутоантител к ДНК с помощью иммуноферментной тест-системы «Антитела к ДНК – ИФА». При анализе параметров реальной части комплексной диэлектрической проницаемости (ϵ') показал уменьшение гидратации в образцах плазмы крови с более выраженным индексом реакции ДНК_{нативная} (контроль – H_2O , $\epsilon' H_2O$ при $t = 24^\circ C - 23,2$). Корреляция полученных экспериментальных данных по двум методикам ($r = 0,73$) предполагает возможность адаптации метода КВЧ-диэлектрометрии для диагностики ограниченной склеродермии в клинических условиях.

Ключевые слова: плазма крови, КВЧ-диэлектрометрия, ограниченная склеродермия.

ВВЕДЕНИЕ

Адаптация биофизических подходов, как дополнительных к иммунологическим методам, в исследовании патогенетических механизмов аутоиммунных заболеваний становится все более актуальной. Это связано с эффективностью регистрации электромагнитного сигнала в широком диапазоне частот (α -, β -, γ -дисперсии), и основано на высокочувствительных откликах биосистем на клеточном и субклеточном уровнях вплоть до специфических мембранных структур и

отдельных реакций. Электрические свойства клеток достоверно характеризуют их биологическую полноценность, и находятся в непосредственной связи с целостностью физико-химической структуры клеточной оболочки, ответственной за её поляризационные свойства [3].

Патогенез ограниченной склеродермии (ОСД) достаточно сложен [5]; среди множества гипотез, в основном, предполагают сосудистые, обменные, иммунные нарушения, которые, в первом случае, являются следствием дефекта функций клеточных мем-

бран и накоплением ионов кальция и магния в разных клетках больных ОСД и усиленным синтезом фибробластов [1], в остальных – повышенный уровень коллагеновых белков является источником сильной антигенной стимуляции, при этом активно запускаются механизмы аутореактивности. В патогенезе ОСД, также как и при хронической красной волчанке [2], основная роль принадлежит антителам к ДНК, которые образуют с антигенами иммунные комплексы, что сопровождается изменением интегральной гидратации макромолекул.

Обнаружение антинуклеарных антител в крови пациентов с ОСД с помощью тестов непрямой иммунофлуоресценции и иммуноферментного анализа являются не только диагностическими маркерами, но и помогают определить степень активности болезни и ее прогноз. Определение антител с помощью терагерцовой спектроскопии, в аспекте изучения диэлектрических свойств иммуноглобулинов, актуально ввиду того, что вибрационные моды, характеризующие изменения сети внутримолекулярных водородных связей, ассоциированы с третичной структурой антител и лежат в дальнем инфракрасном или терагерцовом диапазоне частотного спектра [6].

КВЧ-диэлектрометрия является неинвазивной и достаточно чувствительным методом в исследовании связанной воды, которая является одним из основных элементов пространственной организации белковой молекулы, определяющей структуру макромолекулы и отвечающей за её формирование, конформационную подвижность и динамические характеристики [4, 7].

Цель работы - исследование параметров гидратации и поверхностного натяжения плазмы крови больных ограниченной склеродермией с возможной адаптацией метода КВЧ-диэлектрометрии в диагностике аутоиммунных заболеваний.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужила плазма крови 16 больных ОСД. Уро-

вень гидратации плазмы крови определяли с помощью аппаратурно-регистрирующего комплекса, позволяющего на частотах дисперсии диэлектрической проницаемости свободной воды ($f = 10 \div 50$ ГГц) анализировать характер конформационных изменений белковых структур через ориентационную поляризацию молекул воды. Относительное изменение количества свободной (расстояние ~ 5 Å и более от центра гидратации молекулы) и связанной (расстояние менее 5 Å) с белковыми структурами воды определялось по параметру ϵ' с точностью $\Delta = \pm 1$ %; точность измерений по абсолютным значениям составила $\pm 3,5$ %.

Измерение коэффициента поверхностного натяжения плазмы крови (σ) прямо пропорционального медианной частоте ($F_{\text{медианная}}$), проводилось с помощью кюветы, размещенной на пьезо-платформе, и помещенной в раскрыв 8-мм волновода при скрининге («sweep»-режим) звуковых частот ($f = 20 \div 60$ Гц), входящих в область собственных колебаний системы пьезо-платформа – кювета. Температурная коррекция приводилась к $t = 24$ С °.

Частотный анализ проводился с помощью специально разработанного программного обеспечения с помощью быстрого Фурье-преобразования (БФП), при этом объем звукового файла не превышал 0,5 Гб; длительность не более 120 сек. Точность измерений, с учетом погрешности дозатора, не более $\pm 0,05$ Гц.

Определение антител в плазме крови контрольных и опытных образцов осуществлялось с применением иммуноферментной тест-системы «Антитела к ДНК - ИФА». Для оценки выраженности положительной реакции рассчитывали индекс реакции (ИР): оптическую плотность каждого исследуемого образца соотносили к среднему значению оптической плотности отрицательного контроля (антитела к ДНК/отрицательный контроль) Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета статических программ *Microsoft Excel 2003*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выявлена зависимость значения ИР к наличию антител к ДНК_{нативная} плазмы крови от ε' (табл. 1); оказалось что, чем более выражена положительная реакция относительно наличия антител к ДНК_{нативная}, тем выше значение реальной части комплексной диэ-

лектрической проницаемости. Вероятно увеличение количества свободной воды в данной биологической системе сопровождается уменьшением гидратации макромолекул, при этом увеличивается количество свободных водородных связей ДНК за счет образования дополнительных положительно заряженных CH_3 и NH_2 групп.

Таблица 1

Значения индекса реакции , уровня диэлектрической проницаемости и медианной частоты при ограниченной склеродермии

№	Индекс реакции			$F_{\text{медианная}}, \text{ Гц}$	ε'
	Антитела к ДНК _{нативная} / отр.контроль	Антитела к ДНК _{денатур} / отр.контроль	Антитела к ДНК _{формализ} / отр.контроль		
1	2,2	2,5	1,2	37,7	20,3
2	1,5	2,5	1,2	38,2	19,8
3	1,0	1,0	1,1	37,9	19,6
4	1,7	2,8	1,1	37,7	20,1
5	1,6	1,5	1,8	38,5	19,9
6	1,5	2,8	2,2	38,3	19,0
7	1,8	1,8	1,7	37,8	19,7
8	1,3	1,8	1,2	38,1	19,8
9	1,2	1,5	1,0	37,7	19,7
10	1,0	2,1	1,4	37,4	19,7
11	1,1	1,0	1,2	37,54	19,7
12	1,2	1,0	1,1	37,42	19,9
13	3,4	4,0	4,5	37,6	20,2
14	2,0	2,5	2,2	38,5	20,1
15	2,3	3,1	1,4	37,8	19,7
16	1,4	2,4	1,6	37,9	19,4

Измерения ε' в КВЧ-диапазоне ($f=37,7 \text{ ГГц}$) позволило получить качественную оценку изменения интегральной гидратации биологической системы плазмы крови, что может служить, наряду с иммунологическими параметрами, информативным маркером.

На рис. 1 приведен частотный анализ 3-х исследуемых образцов плазмы крови больных ОСД с различным значением ИР для определения медианных частот 1-го мода колебаний.

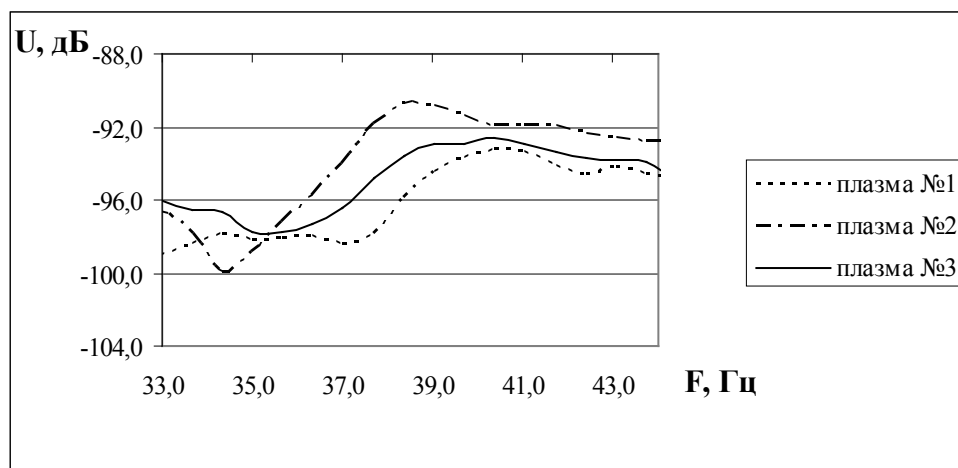


Рисунок 1. Пример частотного анализа 3-х образцов плазмы крови для определения поверхностного натяжения и медианных частот в области 1-го мода колебаний при «sweeper»-режиме: кривая мелким пунктиром – плазма отрицательная (ИР = 1,0); кривая крупным пунктиром – плазма слабоположительная (ИР = 1,5); кривая сплошной линией – плазма положительная (ИР = 3,4)

Частотный анализ плазмы крови (рис. 1) определяет ход электромагнитного отклика (U , дБ), а также поверхностного натяжения исследуемых образцов. На частотах дисперсии диэлектрической проницаемости свободной воды, плазма крови с положительным ИР и слабоположительным ИР характеризуются более высокими значениями электромагнитного отклика и, следовательно, меньшими значениями поверхностного натяжения данной биологической системы.

ВЫВОДЫ

Достаточный уровень корреляции полученных экспериментальных данных по двум методикам (КВЧ-диэлектрметрии и иммуноферментного анализа) позволяет рекомендовать использовать измерение показателей гидратации и поверхностного натяжения плазмы крови для повышения эффективности диагностики и оценки проводимой терапии ОСД.

ЛИТЕРАТУРА

1. Болотная Л. А. Новое в патогенезе и терапии ограниченной склеродермии / Л. А. Болотная, Ф. Б. Шахова., И. М. Сербина // Вестник дерматологии и венерологии. – 2004. – № 2. – С. 31-34.
2. Савенкова В.В. Характеристика імунного статусу хворих на червоний вовчак залежно від стадії захворювання / В.В. Савенкова, Е.М. Солошенко, О.П. Білозоров // Дерматологія та венерологія. – 2013. – №3(61). – С. 77-83.
3. Седунов Б. И. Диэлектрическая проницаемость биологических веществ / Б. И. Седунов, Д. А. Франк-Каме́нецкий // Успехи

REFERENCES

1. Bolotnaya L.A., Shakhova F.B., Serbina I.M. Novoe v patogeneze i terapii ogranichennoj sklerodermii // Vestnik dermatologii i venerologii. – 2004. – № 2. – S. 31-34. (in Russian).
2. Savenkova V.V., Soloshenko E.N., Bilozorov O.P. Kharakterystyka imunogo statusu khvoryh na chervonyj vovchak zalezno vid stadii zakhvoryuvannya // Dermatologiy ta venerologiya. – 2013. – №3(61). – S. 77-83. (in Russian).
3. Sedunov B.I., Frank-Kamenetskiy D.A. Dielektricheskaya pronizaemost biologicheskikh veshchestv // Uspekhi fizicheskikh nauk. – 1963. – T.79. – Vyp. 4. – S. 617-639. (in Russian).

фізических наук. – 1963.- Т.79. – Вип. 4, – С. 617-639.

4. Asami K. Characterization of heterogeneous systems by dielectric spectroscopy // Prog. Polym. Sci.– 2002.– Vol. 27.– P. 1617-1659.

5. Laxer R. Localized scleroderma / R. Laxer, F. Zulian // Curr. Opin. Rheumatol.– 2006.–Vol.18.– P. 606 - 613.

6. Sun Y. Investigating Antibody Interactions with a Polar Liquid Using Terahertz Pulsed Spectroscopy / Y. Sun, Y. Zhang, E. Pickwell-MacPherson // Biophysical Journal.– 2011.– Vol. 100.– P. 225-231.

7. Yardley J. E. On-line, real-time measurements of cellular biomass using dielectric spectroscopy / J.E. Yardley, D.B. Kell, C.L. Davey // Biotechnol. Genet. Eng. Rev.– 2000.– Vol. 17.– P. 3-35.

4. Asami K. Characterization of heterogeneous systems by dielectric spectroscopy // Prog. Polym. Sci.– 2002.– Vol. 27.– P. 1617-1659.

5. Laxer R., Zulian F. Localized scleroderma // Curr. Opin. Rheumatol.– 2006.–Vol.18.– P. 606 - 613.

6. Sun Y., Zhang Y., Pickwell-MacPherson E. Investigating Antibody Interactions with a Polar Liquid Using Terahertz Pulsed Spectroscopy // Biophysical Journal.– 2011.– Vol. 100.– P. 225-231.

7. Yardley J. E., Kell D.B., Davey C.L. On-line, real-time measurements of cellular biomass using dielectric spectroscopy // Biotechnol. Genet. Eng. Rev.– 2000.– Vol. 17.– P. 3-35.

ДОСЛІДЖЕННЯ ПАРАМЕТРІВ ГІДРАТАЦІЇ ТА ПОВЕРХНЕВОГО НАТЯГУ ПЛАЗМИ КРОВІ ХВОРИХ НА ОБМЕЖЕНУ СКЛЕРОДЕРМІЮ

**Солошенко Е.М.¹,
Беляєв Г.М.¹,
Кондакова Г.К.¹,
Колесніков В.Г.²,
Хміль Н.В.²,
Шевченко З.М.¹,
Ярмак Т.П.¹**

¹ДУ «Інститут дерматології та
венерології НАМН України»

²Інститут радіофізики та електроніки
ім. О.Я. Усикова НАН України

Резюме. Дослідження гідратації та поверхневого натягу плазми крові хворих на обмежену склеродермію в НВЧ-діапазоні радіохвиль ($f = 35,6 \div 37,7$ ГГц) проведено в області дисперсії діелектричної проникності вільної води, а також зроблено розрахунки

INVESTIGATION OF HYDRATION PARAMETERS AND SURFACE TENSION OF SERUM AT LOCALIZED SCLERODERMA

**Soloshenko E.N.¹,
Belyaev G.M.¹,
Kondakova A.K.¹,
Kolesnikov V.G.²,
Khmeln N.V.²,
Shevchenko Z.M.¹,
Yarmak T.P.¹**

¹SE «Institute of Dermatology and
Venerology of NAMS of Ukraine»

²O.Ya. Usikov Institute for Radiophysics
and Electronics of NAS of Ukraine

Abstract. The investigation of serum hydration and surface tension concerning localized scleroderma in EHF-range of radiowaves ($f = 35,6 \div 37,7$ GHz) in the field of free water permittivity was carried out. The index reaction concerning presence autoantibodies to DNA by

індексу реакції відносно присутності аутоантитіл до ДНК за допомогою імуноферментної тест-системи «Антитіла до ДНК – ІФА». Аналіз параметру реальної частини комплексної діелектричної проникності (ϵ') показав зменшення гідратації в зразках плазми крові з більш вираженим індексом реакції ДНК_{нативна} (контроль – H_2O , $\epsilon' H_2O$ при $t = 24^\circ C - 23,2$). Кореляція отриманих експериментальних даних за двома методиками ($r = 0,73$) припускає можливість адаптації методу НВЧ-діелектрометрії для діагностики обмеженої склеродермії в клінічних умовах.

means of immuno-enzymatic test systems «Antibodies to DNA - IEA» was also calculated. The analysis of parameters of real part of complex permittivity (ϵ') has shown the decrease of hydration level of serum samples with more marked index reaction DNA_{nature} (the control is H_2O , $\epsilon' H_2O$ at $t = 24^\circ C - 23,2$). The correlation of the received experimental data by two techniques ($r = 0,73$) assumes possibility of adaptation of EHF-dielectrometry for localized scleroderma diagnostics in clinical conditions.

Key words: serum, EHF-dielectrometry, localized scleroderma.

Ключові слова: плазма крові, НВЧ-діелектрометрія, обмежена склеродермія.

Об авторах:

Солошенко Эльвира Николаевна – доктор мед. наук, профессор, зав. лаб. аллергологии ГУ «Институт дерматологии и венерологии НАМН Украины».

Беляев Георгий Митрофанович – доктор мед. наук, врач-консультант поликлиники ГУ «Институт дерматологии и венерологии НАМН Украины».

Кондакова Анна Константиновна – кандидат биол. наук, зам. директора по научной работе ГУ «Институт дерматологи и венерологи НАМН Украины».

Колесников Владимир Григорьевич, – старший научный сотрудник, кандидат физ.-мат. наук, старший научный сотрудник отдела прикладной биофизики Института радиофизики и электроники им. А.Я. Усикова. НАН Украины. kolesnik@ire.kharkov.ua.

Хмель Наталья Владимировна – кандидат биол. наук, научный сотрудник отдела прикладной биофизики Института радиофизики и электроники им А.Я. Усикова НАН Украины.

Шевченко Зоя Михайловна – младший научн. сотрудник лаборатории аллергологии ГУ «Институт дерматологии и венерологии НАМН Украины».

Ярмак Татьяна Павловна – младший научн. сотрудник лаборатории аллергологии ГУ «Институт дерматологии и венерологии НАМН Украины».