

Применение анализатора дисперсных сред для диагностики вируса гепатита С

БГМУ

Кафедра биохимии ГГМУ

Гомельский отдел БелНИГРИ

Научно-практическая разработка и внедрение новых способов ранней диагностики заболеваний, основанных на сочетании новых методов исследования с практически неограниченными возможностями информационно-вычислительных комплексов, оснащенных экспертными системами, является сложной многоплановой задачей. Целесообразность использования для этих целей электрофизических методов исследования показана многолетними исследованиями [2].

Как и в развитии любых других экспериментальных методов, необходимы:

- теория физического явления, лежащего в основе (в данном случае процессов поляризации-деполяризации);
- собственно экспериментальная методика, т.е. совокупность различных тестов и способов обработки и интерпретации экспериментальных данных, учитывающая свойства используемых датчиков;
- технические средства, обеспечивающие проведение эксперимента;
- клинические испытания.

Методика оригинальна (патент РБ №3764), научно-исследовательские и методические работы проводятся группой исследователей в БГМУ, Гомельском мединституте, Белорусско-голландском диагностическом центре, Гомельском отделе БелНИГРИ, Минском производственном объединении вычислительной техники. Научная идея исследования заключась в разработке теоретических и экспериментальных аспектов изучения электретного состояния биологических жидкостей человека, выявлении взаимосвязей основных характеристик биоэлектретных свойств с наличием в крови ВГС [7].

Физическое обоснование и принцип метода электрической деполяризации

Согласно классическому определению «электрет – это часть диэлектрика, обладающий квазипостоянным электрическим зарядом». Термин «квазипостоянный» означает, что постоянные времена, характеризующие разряд электрета, существенно превосходят интервалы времени, в течение которых используется данный электрет [6]. В настоящее время можно считать твердо установленным, что электретный эффект присущ всем диэлектрическим материалам, в том числе сыворотке крови [1].

В абсолютном большинстве литературных источников рассматривают случай получения стабильных электретов путем расплавления, а затем охлаждения в электрическом поле вещества, «молекулы которого обладают собственным дипольным моментом» [4]. При последующем выключении поля поворот молекул в исходное состояние затруднен и они сохраняют преимущественную ориентацию в течение длительного времени. Однако при помещении вещества в электрическое поле в нем не только поворачиваются по полю молекулы с жестким дипольным моментом, но и образуется огромное количество квазидиполей. Эти квазидиполи,

ориентированные уже строго по полю, состоят не из идеальных, воображаемых, положительных и отрицательных зарядов, а представляют собой реальные физические объекты вполне осязаемых размеров. Ионы K^+ , Na^+ , Fe^{3+} , NH_4^+ , $C_3H_5O_2^-$, CH_3COO^- , различные полиионы имеют шаровую, дискообразную или цилиндрическую форму и двигаются не в бесплотной и невесомой субстанции, а в среде, оказывающей вполне ощутимое сопротивление их перемещениям. Расчеты показывают, что вклад этих квазидиполей в результирующее электрическое поле на порядки может превысить классический вклад от ориентации дипольных молекул [9]. Поэтому как создание динамического равновесия во внешнем электрическом поле и связанное с этим перемещение несущих электрический заряд физических объектов будет требовать затрат энергии (внешнего поля), и времени поляризации, так и возврат в равновесное состояние будет происходить в форме релаксационного процесса. Макромолекулы полимеров, в частности, белков, в спокойном состоянии принимают глобулярную или спиральную структуру под влиянием электростатических взаимодействий между частями самой макромолекулы с учетом упругости связей. Вполне очевидно, что в электрическом поле подобные образования примут иную форму, «растянутся по полю», насколько им позволит это пружина-связь. В последние годы появились публикации, в которых отмечается общность структурно-механической и электрической релаксации в растворах полимеров [4]

В таком случае отпадает необходимость какого-либо плавления и замораживания образца изучаемого вещества, и на первое место выходят измерительные возможности используемой аппаратуры по изучению отклика вещества на внешнее электрическое воздействие. Этим и объясняется то, что жидкодисперсные системы (ЖДС) – дисперсные системы с жидкой дисперсионной средой – вплоть до последнего времени не являлись объектом исследований в физике электретов.

В связи с переходом к изучению ЖДС как специфических объектов, отметим, что наиболее последовательно определение электретов даётся в терминах времени релаксации [1]: «вещество называется электретом, если время исчезновения запасенной поляризации гораздо больше характерного времени проведения заряда». Если некоторый конкретный эксперимент занимает время порядка немногих секунд, тогда как время распада поляризации составляет несколько минут, то можно говорить об электретном поведении вещества». Экспериментальное наблюдение тока деполяризации у различных жидкодисперсных систем различной физической природы, определение особенностей их деполяризации даёт все основания классифицировать их, в соответствии с приведенным выше определением, как короткоживущие квазиэлектреты [8].

Жидкодисперсные системы, в т.ч. полимерные гели, различные биологические жидкости, содержат дисперсные компоненты, которые по-разному ведут себя в электрическом поле. Органические и неорганические электролиты, макромолекулы полимеров-стабилизаторов, ферменты и аминокислоты, антигены вирусов по-разному передвигаются под влиянием тока, поворачиваются и вытягиваются по полю. Под влиянием сил электрического поля происходит ориентация по полю дипольных молекул, частиц и макромолекулярных

образований, квазидиполей, перемещение на макрорасстояния физических носителей заряда.

В веществе создается пространственно неоднородное распределение носителей заряда и потенциала, оно переходит из равновесного состояния в неравновесное, возбужденное и запасает некоторое количество электрической энергии. После снятия поляризующего поля вещество релаксирует к первоначальному равновесному состоянию, отдавая накопленную энергию. Так как этот процесс не может произойти мгновенно, он осуществляется в течение некоторого времени разряда. При этом совершается работа против сил внутреннего трения, по изменению пространственного расположения зарядов, их нейтрализации и пр. В течение времени разряда по внешней электрической цепи течет ток деполяризации. Кинетика процесса деполяризации определяется составом и структурой вещества, физической природой носителей заряда. Для получения информации о составе вещества мы изучаем его отклик на внешнее электрическое воздействие [5].

Явление «запоминания» заряда и поляризации, характерное для электретов, найдено к настоящему времени во многих веществах и системах биологического происхождения. Электретный эффект является общим свойством биополимеров-полипептидов, полинуклеотидов и полисахаридов, являющихся важными составляющими биологических жидкостей человека.

Биологические жидкости организма человека, как и другие жидкодисперсные системы со множественными границами раздела, состоят из веществ, которые различным образом ведут себя в электрическом поле. Органические и неорганические электролиты, макромолекулы, ферменты, простые и сложные белки, аминокислоты, неструктурные и структурные белки вирусов по-разному передвигаются под влиянием тока, ориентируются в электрическом поле.

Установлено, что биологические жидкости организма можно рассматривать как короткоживущие квазиэлектреты, способные к запоминанию заряда и поляризации. Они дают индивидуальные, хорошо воспроизводимые и классифицируемые «отклики» на внешнее поляризующее воздействие электрического импульса определенной формы [3].

Любой биологический материал, находящийся в растворе, вносит свой вклад в общую деполяризацию в зависимости от его конформационной организации (степени дисперсности, концентрации, наличия гидратной оболочки), вида взаимодействия в растворе и степени самостоятельности в организации структурных элементов.

Изменение биохимического состава биологических сред организма под влиянием внешних и внутренних отрицательных воздействий, в том числе и при заболеваниях, ведет к изменению электретных свойств и релаксационных механизмов, и, следовательно, результирующей спектральной характеристики [8]. Теория электрофизических явлений в сыворотке крови как дисперсной системы достаточно сложна.

Согласно методике комплексных электрофизических исследований, которую реализует АДС-1, для контроля растворов используют следующие параметры: удельную электрическую проводимость s , изменение её во времени $s(t)$, скорость изменения электропроводности $\frac{ds}{dt}$, зависимость s от амплитуды переменного

тока $c(A)$ и от частоты $c(w)$ эквивалентную (приведенную) электропроводность $l = c/c$ и зависимость ее от концентрации $l(c)$;

ток деполяризации $I(t)$, логарифм тока деполяризации $\ln I(t)$, полный дипольный момент единицы объема

$$P = \int I(t) dt$$

эффективное время релаксации t , фактор деполяризации F (величина, коррелирующая с вязкостью системы, $1/F \sim \eta$), первая производная тока деполяризации $dI(t)/dt$;

тангенс угла диэлектрических потерь $\text{tg} \delta$, зависимость $\text{tg} \delta(w)$ от частоты, $d \text{tg} \delta(w) / dw$.

Все перечисленные электрофизические показатели имеют самостоятельный физический смысл и строгое теоретическое обоснование [10].

В исследуемой сыворотке определяли удельную электрическую проводимость k , изменение её во времени $k(t)$, скорость изменения электропроводности dk/dt , зависимость k от амплитуды переменного тока $k(A)$ и от частоты $k(w)$, эквивалентную (приведенную) электропроводность $l = k/c$ и зависимость ее от концентрации $l(c)$

Кинетика процесса деполяризации жидких сред позволяет контролировать их состав и структуру. Кривая зависимости тока деполяризации от времени имеет характерные признаки, совокупность которых определяется типом исследуемого вещества.

Для плоскопараллельных электродов дипольный момент единицы объёма численно равен поверхностной плотности заряда, возникшего вследствие поляризации [1].

При хорошем контакте электродов с поверхностью (а именно это наблюдается в нашем случае изучения поляризационных процессов в ЖДС) поверхностная плотность поляризационного заряда равна плотности заряда, индуцированного на электродах. Уменьшение вследствие релаксации дипольного момента вещества, находящегося в электрической ячейке, приводит к уменьшению заряда на электродах, и по внешней цепи течёт электрический ток:

$$j(t) = \frac{dP(t)}{dt}, \quad (1)$$

где $j(t)$ -плотность тока, $P(t)$ -полный дипольный момент единицы объёма в момент времени t от начала разряда.

Из формулы (1) имеется следствие, которое позволяет объяснить многие преимущества метода ИТД. Считая, что распад поляризации описывается экспонентой $P(t) = P_0 \exp(-t/\tau)$, что верно в подавляющем большинстве случаев [2], из (1) получаем:

$$I(t) = \frac{dP}{dt} = -\frac{P_0}{\tau} e^{-t/\tau} = I_0 \exp(-t/\tau) \quad (2)$$

Где P_0 -поляризация в начальный момент времени, I_0 и $I(t)$ -начальное и текущее значения тока деполяризации, τ -время релаксации

Отсюда можно получить:

$$\ln I(t) = \ln I_0 - \frac{t}{\tau} \quad (3)$$

Это-уравнение прямой. Обратное значение тангенса угла наклона равно времени релаксации, которое является важнейшей структурной характеристикой ЖДС. Как следует из формулы (1), по току деполяризации можно определить полный поляризационный заряд в момент (t_1) (дипольный момент), если воспользоваться формулой (4)

$$P(t_1) = \int_{t_1}^{\infty} I(t) dt \quad (4)$$

Величина поляризационного заряда и эффективное время релаксации, являясь характеристиками процесса деполяризации, определяются составом и свойствами растворенных белков и электролитов в сыворотке крови и их концентрацией.

Наблюдаемые эффекты и ход кривых деполяризации, как показано специально проведенными экспериментами [6], не связаны с процессами, происходящими на электродах при прохождении тока, а обусловлены присутствием в системе частиц дисперсной фазы. Поляризация-деполяризация ЖДС относится к объемным, а не к поверхностным эффектам электрического поля в веществе.

Различия в процессах деполяризации различных дисперсных систем определяются различиями в свойствах частиц дисперсной фазы, и различиями во внутренних взаимодействиях между ними. Именно это определяет значимость метода ИТД для биомедицинских приложений [3].

Выражения (1)-(4) написаны для идеального случая действия в исследуемой системе одного механизма поляризации. Такой механизм характерен для средних молекул, находящихся в сольватной оболочке. В реальных растворах всегда действует одновременно несколько поляризационных механизмов.

Результирующее электрическое поле полученного короткоживущего квазиэлектрета получается суммированием независимых электрических полей всех поляризационных подсистем. Кинетика возврата каждой из поляризационных подсистем к равновесному состоянию определяется действием главных сил данной подсистемы:

$$P = \sum_{i=1}^n P_{oi} \exp(-t/\tau_i) \quad (5)$$

$$I = \sum_{i=1}^n I_{oi} \exp(-t/\tau_i) \quad (6)$$

Где P_{oi} , I_{oi} , τ_i – величины, определяющие поведение системы на i – том участке. Экспериментально наблюдаемой величиной является ток деполяризации, который описывается выражением (6). Непосредственно преобразовать (6) к виду (3) нельзя, однако накопленный в ходе длительных исследований экспериментальный материал позволяет сделать следующие выводы:

Изменение свойств биологических жидкостей организма человека в процессе стабилизации или при заболеваниях сопровождается формированием новых структурных образований и поляризационных механизмов. Это проявляется в изменении числа характеристических областей и времен релаксации.

Вид кривой деполяризации является индивидуальной характеристикой вещества. Кривая зависимости тока деполяризации от времени имеет характерные признаки, совокупность которых определяется компонентным составом и структурой исследуемой дисперсной системы.

Сыворотка крови имеет на логарифмической кривой деполяризации несколько отчетливо выраженных линейных участков. Это означает, что в общем процессе разряда системы в отдельные интервалы времени преобладающее влияние имеют те или иные структурообразующие механизмы, которые вносят, соответственно, основной вклад в деполяризацию образца.

Экспериментально получаемая зависимость тока деполяризации от времени описывает кинетику развития совокупности быстро и медленно меняющихся процессов. На выделенных интервалах времени разряда один из членов последовательностей (5) и (6), поочередно, значительно превышает по величине остальные, и мы имеем:

$$\cdot \exp(-t/t_i) \gg \rho_{0i} \exp(-t/t_i) \text{ для } t_i < t < t_{i+1}. \quad (7)$$

Соответственно:

$$I \gg I_{01} \exp(-t/t_1); \ln I(t) \gg \ln I_{01} - t/t_1 \text{ для } t_1 < t < t_2,$$

$$I \gg I_{02} \exp(-t/t_2); \ln I(t) \gg \ln I_{02} - t/t_2 \text{ для } t_2 < t < t_3, \quad (8).$$

$$I \gg I_{0k} \exp(-t/t_k); \ln I(t) \gg \ln I_{0k} - t/t_k \text{ для } t_k < t < t_{k+1}.$$

При этом мы пренебрегаем нелинейными эффектами переходных процессов. Полученная система уравнений (8) графически представляется в виде ломаной линии. На каждом из линейных участков доступны определению «локальное» время релаксации, начало и конец интервала.

Полученная система уравнений позволяет графически анализировать ломаную линию. При этом на каждом из линейных участков полученной кривой доступны определению локальное время релаксации, начало и конец интервала деполяризации.

Ток деполяризации, который в течении времени разряда регистрируется микроамперметром становится характеристикой исследуемой сыворотки.

С математической стороны, в результате решения графическим способом системы уравнений тока деполяризации каждой сыворотки крови, результирующие графики характеризуется рядом признаков, которые поддаются классификации (изгибы, прямолинейные участки, углы наклона и т.д.). Каждый из регистрируемых признаков имеет свою частоту и значимость. В программно-аппаратном комплексе АДС-1 метод деполяризации играет роль основного индикатора. Он дает качественную и количественную оценку сыворотки крови и определяет соответствие ее образцу, не содержащему антигенов вируса гепатита С. Те или иные отклонения от нормы, все видоизменения кривой отражают происходящие изменения в структуре сыворотки в соотношениях между собой основных компонентов или белковых комплексов.

Вид кривой деполяризации зависит от степени выраженности воспалительных изменений в сыворотке крови. Характерным признаком является наличие нескольких четко выраженных линейных участков. Это свидетельствует о наличии в системе нескольких релаксационных подсистем или групп гетерогенных белковых молекул.

Различные заболевания вызывают значительные изменения в биохимическом составе крови и в соотношениях между собой основных элементов, которые в той

или иной степени входят в системообразующие поляризационные механизмы. Закономерные изменения наблюдаются также и для зарядной части поляризационной кривой. Заболевания вызывают изменение общего поляризационного заряда в сравнении со здоровыми людьми. Классифицируя наблюдаемые изменения, количественно оценивая регистрируемые отклонения от эталона, используют электретные свойства для диагностики различных патологических состояний.

С точки зрения задач чисто физико-математического описания и формулировки классификационных признаков кровь и сыворотка крови представляют собой более удобные объекты, чем технологические ЖДС. Химический состав, дисперсность, границы раздела у них колеблются в достаточно узких пределах около нормативных показателей; имеются уже определенные стандартными методами допустимые интервалы отклонений при различных заболеваниях, а также по возрасту и полу. Применение АДС-1 к изучению биологических жидкостей человеческого организма создает принципиально новые диагностические возможности.

Важность полученных практических результатов использования нового измерительного средства подчеркивается тем, что Минздравом РБ выдано регистрационное удостоверение (ИМТ № ИМ — 7.1501 от 22.08.2000 г.) на новое изделие медицинской техники – прибор «Анализатор дисперсных систем» АДС-1. С целью исследования распространенности вируса гепатита С среди пациентов с ревматическими заболеваниями проведены традиционные и перспективные методы диагностики HCV-инфекции.

Исследуемая группа включала 76 пациентов, имеющих суставной синдром. Все сыворотки крови пациентов были подвергнуты электретному анализу, представляющему собой поляризацию исследуемой сыворотки в плоскопараллельной кювете с последующим изучением тока разряда образца.

Данным методом предварительно были исследованы сыворотки крови HCV-положительных (больных ХГС) и HCV-отрицательных пациентов (доноров) с целью выявления их деполяризационных различий (рис. 1).

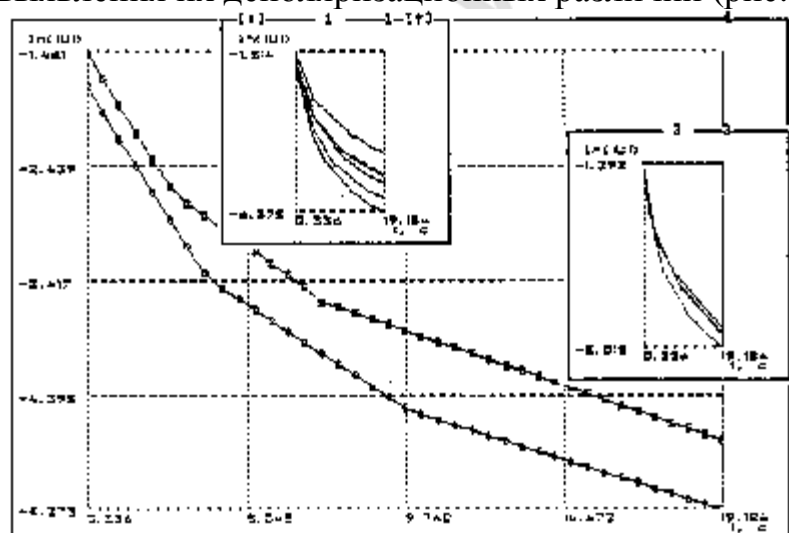


Рис. 1. Усредненные кривые

тока деполяризации при HCV-положительных и HCV-отрицательных пациентов где HCV-положительные – верхняя кривая; HCV-отрицательные – нижняя кривая. Полученные данные внесены в специализированную экспертную систему, реализованную в АДС-1, позволяющую оценить вновь поступающие данные

путем сопоставления с базой данных методом оценки отклонений от среднего, что может использоваться в дифференциальной диагностике заболеваний по релаксационному спектру исследуемых сывороток. Используя способ вычитания сигнала эталона (здоровые / ХГС) из активного сигнала, возможно выделение групп по родственным признакам вида кривых. Индивидуальные параметры (коэффициенты) экспоненциального разложения для больных людей устойчиво выходят за пределы интервала допустимых значений, зарегистрированных для контрольной группы здоровых лиц, а различия в биохимическом составе сывороток крови ведут к изменению релаксационных механизмов, отображаемых кривой тока заряда-разряда в среде электрета.

Полученные результаты показывают, что при применении АДС-1 создаются хорошие возможности для дифференциальной диагностики и систематизации заболеваний по электрофизиологическим свойствам сывороток крови.

Данные тока деполяризации изменяются при различных заболеваниях и всегда отличаются от вида усредненных кривых деполяризации контрольной группы. Различия в поляризационных кривых наблюдаются в зарядной и разрядной частях спектра при различных нозологических формах заболевания. Нами отмечено, что на кинетику деполяризации влияют, помимо нозологической формы заболевания, возраст больных и степень активности заболевания. Сыворотка крови здоровых доноров имеет существенные различия от тока деполяризации сывороток крови при различной ревматологической патологии, причем лидирующую позицию занимают ПСШ и СКВ. Теория электрета анализа позволила объяснить многие эффекты поведения кривой измерения, в том числе зависимость электропроводности от амплитуды тока воздействия. Это объясняется тем, что измерения электропроводности можно выполнить с высокой точностью, позволяющей выделить даже самые малые отклонения графика регистрируемых кривых в зависимости от присутствия антигенов ВГС.

Анализатор работает с банком данных, получаемым и накапливаемым пользователем. Банк данных в виде файлов формируется путем измерения электрофизиологических свойств сывороток, моделирующих те или иные изменения компонентного состава. Моделируя в лабораторных условиях последовательно этапы изменений концентрации электролитов или величину вирусной нагрузки сыворотки крови, комплекс формируют набор эталонных файлов в виде кривых. Предельные кривые, соответствующие определенной концентрации, создают область оптимальных значений.

Недостатком данной процедуры анализа является очевидная субъективность выделения информативных участков на кривых, в зависимости от квалификации исследователя. В АДС-1 реализована стандартизованная автоматическая классификация кривых деполяризации методами лингвистического анализа, позволяющая единообразную оценку измеренных экспериментальных данных. Эта процедура играет роль своеобразной «программной стрелки», направляющей действия исследователя в правильное русло.

Ток деполяризации при РА у НСV-положительных пациентов имеет более высокие значения, чем при реактивном артрите. При обоих заболеваниях ток деполяризации значительно превышает нормальные величины, что, по-видимому, связано с различным белковым составом сывороток крови и преобладанием при

РА крупных молекул иммуноглобулинов, препятствующих быстрой деполяризации сыворотки у больных с иммунной патологией.

Различные заболевания вызывают изменение общего поляризационного заряда в сравнении с контролем. Причем общий прирост при хроническом гепатите С с высокой активностью составляет 20%, при ОА-5 – 7 %, а при СС зарегистрировано уменьшение заряда ниже контроля. Сыворотка крови больных с СКВ имеет уровень поляризационного заряда значительно выше нормы и сопоставима с уровнем прироста потенциала при ХГС с высокой степенью активности. По нашим данным, наличие в среде крупных молекул в большей степени отвечает за кинетику разряда. Так, при исследовании на электретном анализаторе сывороток крови больных РА с HCV-положительной и HCV-отрицательными реакциями мы обнаружили минимальные отличия кривых в средней и нижней частях спектра между собой. Данный факт может свидетельствовать в пользу применения метода электретного анализа для диагностики различных нозологических форм заболеваний, а также для верификации вирусного гепатита С.

Таким образом, в основе работы анализатора лежит принцип наложения электромагнитного возмущения на вещество в замкнутом объеме с последующей регистрацией и изучением отклика среды. Апробированный метод позволяет идентифицировать растворимые антигены вируса гепатита С в сыворотке крови, в группе больных ревматическими заболеваниями и устанавливать дополнительные дифференциально-диагностические различия при ревматических заболеваниях по току деполяризации.

Литература

1. Губкин, А. Н. Электреты. М.: Наука, 1978. 192 с.
2. Драпеза, А. И., Судник, Ю.М., Лобан, В. А и соавт. / Электрофизиологические методы детекции иммунохимических реакций вирус-антитело как основа информационной технологии биочипа для обнаружения и идентификации вирусов // Здравоохранение. 2007. № 11. С. 4-9.
3. Латышева, В. Я., Шаламов, И. В., Грицук, А. И., Платошкин, Э. Н., Ушакова, Л. Ю., Водчиц, С. Н. Использование программно-аппаратного комплекса для анализа биологических жидкостей при различных заболеваниях // Актуальные вопросы медицины и новые технологии медицинского образования: мат. международ. научно-практ. конф. Гомель. 2000. Т. 1. С. 405-408.
4. Маскаренас, С. Биоэлектреты: электреты в биоматериалах и биополимерах // Электреты: сб. М.: Мир, 1983. С.400-431.
5. Платошкин, Э. Н., Шаламов, И. В., Латышева, В. Я., Ушакова, Л. Ю., Водчиц, С. Н. Применение метода исследования электретных свойств сыворотки крови в диагностике сочетанной патологии сердечно-сосудистой и пищеварительной системы. // Транстех: Докл. международ. научно-практ. конф. Гомель, 2002. Ч. 2. С. 267-270.
6. Сесслер, Г. Основы физики электретов // Электреты: сб. М.: Мир, 1984. С. 25 – 105.
7. Сорока, Н. Ф., Губкин, С. В., Капралов, Н. В., Шаламов, И. В. Электрофизическое исследование сыворотки крови больных ревматическими заболеваниями в сочетании с инфицированием вируса гепатита С // Российский гастроэнтерологический журнал. 1998. № 4. С. 20-25.

8. Цветкова, Е. А., Ухарцева, И. Ю., Шаламов, И. В., Гольдаде, В. А. Сементовская, Е. А. Влияние поляризации на электрофизические свойства ферритонаполненных ЖДС // Пластические массы. 2003. № 4. С. 19-21.
9. Шаламов, И. В., Пинчук, Л. С., Ухарцева, И. Ю., Цветкова, Е. А. Электрофизический метод контроля жидкодисперсных систем // Материалы, технологии, инструменты. 2001. Т. 6. № 2. С. 102-106.
10. Шаламов, И. В., Ухарцева, И. Ю., Цветкова, Е. А., Гольдаде, В. А. Исследование электрофизических свойств жидкодисперсных систем методом изотермической деполяризации // Материаловедение. 2003. № 3. С. 28-31.

Репозиторий БГМУ