

БИОХИМИЯ

УДК: 543.422.3-74+616.316-008.8

ВОЗМОЖНОСТИ АППАРАТНО-ПРОГРАММНОГО КОМПЛЕКСА «ИКАР» ДЛЯ АНАЛИЗА БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ

Г.М. Зубарева, В.М. Микин, Г.Е. Бордина

Тверская государственная медицинская академия
Кафедра химии и биохимии

На примере ИК-спектрометрии слюны рассматриваются возможности аппаратно–программного комплекса «ИКАР». Установлено, что в девяти широких диапазонах средней области ИК-спектра происходят разнородные колебания коэффициентов пропускания, характеризующие межмолекулярные взаимодействия разнообразных ассоциатов молекул воды с метаболитами биологических систем. Обнаруженные колебания количественно характеризовались дисперсией коэффициентов пропускания. Это дало возможность по девяти значениям данных величин с помощью критериев многомерного анализа (Махалонобиса и Бартлетта), определённых на различных частотах спектра, по сравнению с эталоном, количественно охарактеризовать состояние биологической жидкости, что может быть использовано в диагностических целях.

Ключевые слова: *инфракрасная спектрометрия, аппаратно-программный комплекс, слюна.*

Современная медицина ставит задачи по созданию таких методов диагностики, которые минимизируют травматическое воздействие на пациента при одновременном упрощении процедуры, повышении точности постановки диагноза и направлены на изучение функционального состояния органов и тканей челюстно-лицевой области. Применяя клинико-инструментальные методы, определяя органический и неорганический состав слюны и ротовой жидкости, проводят диагностику заболеваний [1; 2]. Однако такой подход исключает факт одновременного изменения нескольких анализируемых показателей, а также структурных трансформаций водного компонента биологической жидкости. Вместе с тем нарушения метаболических процессов и соответствующие изменения биологической жидкости, как известно, наступают задолго до клинических проявлений заболеваний [3], вначале на молекулярных уровнях, поэтому возникла необходимость создания простых, малозатратных, скрининговых методик, которые бы позволили быстро, более просто уточнить диагноз заболевания и следить за процессом лечения.

Инфракрасная спектрометрия (ИКС) представляет одно из современных и перспективных направлений. Имеются многочисленные

данные о высокой диагностической значимости метода в исследовании ряда заболеваний [4 – 7].

ИКС является универсальным физико-химическим методом, который применяется в исследовании структурных особенностей различных органических и неорганических соединений. Метод основан на явлении поглощения группами атомов исследуемого объекта электромагнитных излучений в инфракрасном диапазоне, что связано с возбуждением молекулярных колебаний. При облучении поглощаются только те кванты, частоты которых соответствуют частотам валентных, деформационных и либрационных колебаний молекул [8; 9], хорошо изученных и приведенных в соответствующих справочниках [10].

ИКС имеет ряд преимуществ перед спектроскопией в видимой и ультрафиолетовой областях, так как позволяет проследить изменение всех основных типов связей в молекулах анализируемых веществ. При использовании ИКС для определения качественного и количественного состава природных смесей не происходит разрушение веществ, что позволяет применять их для последующих исследований [9].

ИК-спектр биологического образца представляет собой суммарный спектр, в котором происходит наложение полос поглощения различных функциональных групп органических веществ, а также воды. Это явление усложняется в виду взаимодействия отдельных видов колебаний указанных групп, при этом происходит искажение формы полос поглощения и смещение их максимумов, наблюдается большое число широких полос поглощения с неясными максимумами [11; 12]. Обычно расшифровка таких ИК-спектров весьма затруднительна, поэтому необходимо разделять биологический образец на более простые компоненты, что дает возможность более точно определить состав [13].

Положительной особенностью метода инфракрасной спектрометрии является то, что полосы поглощения одного и того же вида колебаний атомной группы различных веществ располагаются в определенном диапазоне ИК-спектра (например, $3720 - 3550 \text{ см}^{-1}$ – диапазон валентных колебаний групп $-\text{OH}$; $3050 - 2850 \text{ см}^{-1}$ – групп $-\text{CH}$, $-\text{CH}_2$, $-\text{CH}_3$ органических веществ). Точное положение максимума полосы поглощения атомной группы в пределах этого диапазона указывает на природу вещества (так, максимум 3710 см^{-1} свидетельствует о наличии групп $-\text{OH}$, а максимум 3030 см^{-1} – о присутствии групп $=\text{C}-\text{H}$ ароматических структур) [8; 10]. Однако если исследуемый объект представляет собой сложную биологическую систему, то указанные особенности ИК-спектров не обнаруживаются [11].

В отличие от классического метода инфракрасной спектроскопии, который предполагает предварительное исключение из исследуемого объекта водной составляющей, нами исследовались естественные объекты, содержащие воду. Вода обладает многосторонним характером воздействия и определяет такие факторы, как гидратация полярных групп и наличие гидрофобных эффектов, а также возможность внедрения молекул воды в водородные связи внутри макромолекул и в биомембранах. Это является важным условием для участия подобных структур в регуляции биологических процессов [3; 14]. Вода обладает уникальной структурой, которая определяется различными ассоциатами молекул, связанных друг с другом неупорядоченной сетью водородных связей с часто встречающимися деформированными или разорванными связями. Доказано, что состояние воды имеет существенное значение для функционирования биологических структур [14; 15], и ее изменения, происходящие под влиянием локальных возмущений, могут стать ключом к пониманию ряда биологических закономерностей ввиду особой роли, которую играет вода в живом организме.

Для осуществления анализа водного компонента ротовой жидкости использовали аппаратно-программный комплекс (АПК) «ИКАР» [16 – 18].

Комплекс представляет собой девятиканальный спектроанализатор, сопряженный с персональным компьютером. Спектральная область действия прибора от 3500 до 960 см⁻¹. Положение и число анализируемых ИК-диапазонов выбрано, исходя из особенностей спектров поглощения воды и фундаментальных компонентов крови. Цикл одного измерения не превышает 1 секунды.

АПК, специально разработанный для анализа многокомпонентных смесей, отличается от стандартных спектрофотометров, используемых в инфракрасной спектроскопии, снятием спектра в широкой полосе до 300 см⁻¹.

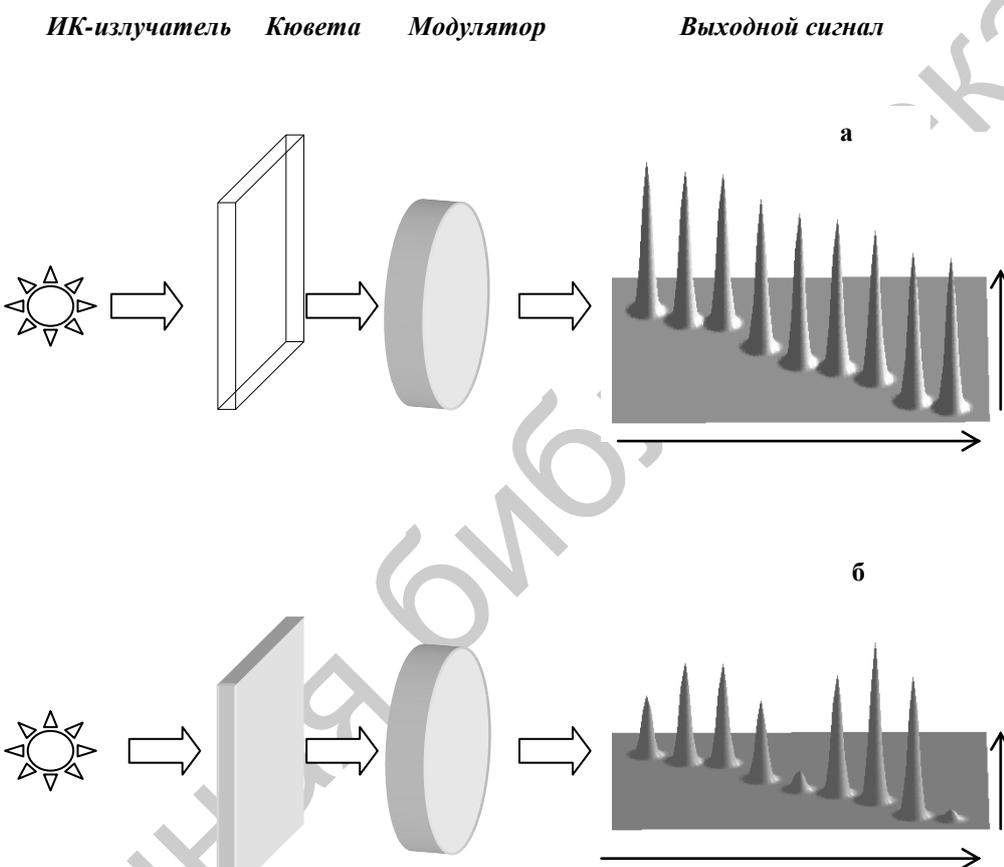
Особенность аппаратной части системы заключается в том, что весь спектр ИК-излучения действует непосредственно на кювету с исследуемой жидкостью. Затем, после прохождения луча через раствор и расположенные за ним последовательно меняющиеся интерференционные фильтры, осуществлялась регистрация степени поглощения в конкретных областях спектра [16 – 18]. Высокие технические характеристики комплекса получены за счет использования эффективных алгоритмов обработки сигнальной информации и технических решений [3; 19].

Одним из новых подходов исследования водных систем является способ многократного регистрирования измеряемых коэффициентов пропускания инфракрасного излучения в короткие временные

интервалы. Это дает возможность охарактеризовать величину их колебания с помощью дисперсии, которая будет отражать суммарный эффект межмолекулярных взаимоотношений и оценивать состояние системы с помощью критериев многомерного анализа (критериев Махаланобиса и Бартлетта).

Следует отметить, что измерение осуществляется в кюветах толщиной исследуемого слоя 20 мкм. Это позволило контролировать колебания коэффициентов пропускания тонкого слоя воды, связанных со специфическими преобразованиями кластеров, характеризующих псевдокристаллическую структуру водных компонентов исследуемых растворов, находящихся в тонких слоях [3; 20].

Таким образом, проводя исследования растворов, биологических жидкостей и воды, нами был обнаружен и запатентован феномен колебания показателей пропускания ИК-излучения проходящего через



Р и с. 1. Схема проведения измерения с помощью АПК «ИКАР» в режиме калибровки (а) и в режиме эксперимента (б)

тонкие слои жидкости [16 – 18]. На основании данного явления

разработана нанотехнология, главной особенностью которой является то, что любая анализируемая жидкость рассматривается как целостная система и оценивается комплексом параметров, что не имеет аналогов в мире.

АПК функционирует следующим образом. Инфракрасное излучение от источника (глобар) проходит через пустую кювету (режим калибровки) и с помощью модулятора (за один цикл) разделяется на девять спектральных зон (рис.1а). В результате такого преобразования формируется группа из девяти показателей. В случае отсутствия жидкости в кювете амплитуда показателей в любой момент времени одинакова и принимается за 100%. Когда в кювете находится жидкость (рис. 1б), показатели в анализируемых диапазонах будут иметь различную амплитуду, определяемую молекулярным спектром жидкости, который, в свою очередь, функционально зависит от связей между атомами молекулы и их вращательно-колебательной характеристики.

Полученные устройством данные и их дисперсии на различных частотах спектра позволяют анализировать быстрые изменения комплекса химических связей веществ исследуемых систем и охарактеризовать на молекулярном уровне особенности состава и структуры водной основы растворов и биологических жидкостей. За один цикл осуществляли около 300 измерений в каждом из 9 диапазонов частот. Анализ полученных данных проводится в вычислительной среде интегрированной системы расчётов MATLAB (лицензия № 1462295). Отмечено, что в каждом интервале длин волн наблюдалось нормальное распределение величин флуктуаций. Это дает возможность количественно охарактеризовать состояние водной основы исследуемых биологических жидкостей с помощью критериев Махаланобиса и Бартлетта [19]. Результаты экспериментов можно визуализировать с помощью пространственных моделей, построенных на основании ковариационных матриц, при расчете которых использовались полученные с АПК данные.

Например; проведем сравнительное исследование ротовой жидкости у пациента с глубоким кариозным поражением 46 зуба, 2-й класс по Блэку, до и после лечения. После статистической обработки данных, полученных с помощью АПК «ИКАР» критерий Бартлетта составил 64,587, ($p < 0.05$). Расстояние Махаланобиса составило 320,9 единиц ($p < 0.05$), что показывает достоверное отличие двух проб.

На рис. 2 отчетливо идентифицируется разница. При этом вместо многочисленных показателей, которые дают представления только о частностях, происходящих в биологической системе процессах, мы получаем два показателя, что позволяет проводить сравнительный анализ. Это может быть использовано в стоматологической практике для исследования состояния ротовой жидкости и слюны с целью

планирования объёма стоматологического вмешательства, оценки эффективности результатов лечения.

С помощью комплекса и уникальных методов обработки данных удалось обнаружить и измерить быстрые обратимые изменения показателей инфракрасного спектра водных растворов, связанных с внутри- и межмолекулярными взаимодействиями всех компонентов биологической жидкости. По характеру колебаний ИК –спектра, многократно регистрируемого в короткие временные интервалы на молекулярном уровне, комплекс позволяет оценить функциональное состояние организма, как в норме, так и при различных заболеваниях.

Список литературы

1. Reich E, Lussi A, Newbrun E. Caries-risk assessment // *Int. Dent J.* 1999; № 49, P. 15–26.
2. Bamzahim M, Shi XQ, Angmar-Manson B. Occlusal caries detection and quantification by DIAGNDdent find Electronic Caries Monitor: in vitro comparison. // *Acta Odontol Scand.* 2002. V. 60. № 360. P. 4.
3. Каргаполов А.В., Зубарева Г.М. Новые подходы к определению целостного состояния биологически активных систем. Тверь, 2006. 184 с.
4. Каргаполов А.В., Захарова Т.В., Зубарева Г.М., Пантелеев В.Д. Способ прогнозирования кариеса зубов: Патент на изобретение № 2177615 от 27.12.2001 г.
5. Каргаполов А.В., Бабочкина О.С., Герасимова М.М. Способ экспресс-диагностики эпилепсии у детей подростков: Патент на изобретение № 2180753 от 20.03. 2002 г.
6. Калинина О.В., Каргаполов А.В., Раскुरатов Ю.В. Способ прогнозирования и диагностики нарушений формирования репродуктивной системы девочек подростков: Патент на изобретение № 2207571 от 27.06.2003 г.
7. Раскुरатов Ю.В., Гармонова Н.А., Зубарева Г.М. Способ прогнозирования гестоза у беременных женщин с ожирением: Патент на изобретение № 2301422 от 17.07.2006 г.
8. Беллами Л. Новые подходы по ИК - спектрам сложных молекул. М.: Мир, 1971. 590 с.
9. Кесслер И. Методы инфракрасной спектроскопии в химическом анализе. М.: Мир, 1964. 328 с.
10. Аношин А.Н., Гостилович Е.А., Клименко В.Г. и др. Колебательные спектры многоатомных молекул. М.: Наука, 1986. 283 с.
11. Верболович В.П. Инфракрасная спектроскопия биологических мембран. Алма-Ата, Наука, 1977. 128 с.
12. Аристархов В.М. Влияние глюкозы на инфракрасный спектр воды. // *Клиническая лаб. диаг.* 1998. №4. С.18–22.
13. Кросс А. Введение в практическую инфракрасную спектроскопию. М.: Иностранная литература, 1961. 326 с.
14. Аксенов С.И. Вода и ее роль в регуляции биологических процессов. Москва-Ижевск: Институт компьютерных исследований, 2004. 212 с.

15. Бурлакова Е.Б. Сверхмалые воздействия химических соединений и физических факторов на биологические системы. // Биофизика. 2004. Т. 49, вып 3. С. 551–564.
16. Каргаполов А.В., Плигин А.М., Зубарева Г.М., Шматов Г.П. Способ исследования биологических жидкостей и устройство для его осуществления: Патент на изобретение № 2137126 от 13.05.1998 г.
17. Каргаполов А.В., Зубарева Г.М. Способ исследования чистоты воды: Патент № 2164685 от 28.12.1999 г.
18. Каргаполов А.В., Зубарева Г.М., Бордина Г.Е. Способ исследования крови: Патент на изобретение № 2148257 от 27.04.2000 г.
19. Кендалл М.Дж., Стьюарт А. Многомерный статистический анализ и временные ряды. М.: «Наука», 1976. 736 с.
20. Фесенко Е.Е. О необычных спектральных свойствах воды в тонком слое. // Биофизика. 1999. Т. 44, вып. 1. С. 5-9.

POTENTIALS OF HARDWARE-SOFTWARE COMPLEX IKAR FOR BIOLOGICAL LIQUID ANALYSIS

G.M. Zubareva, V.M. Mikin, G.E. Bordina

Tver state medical academy
Department of chemistry and biochemistry

In our researches, infrared (IR) spectrometry of the saliva was spent by means of specially developed hardware-software complex [16]. It is established that in nine wide ranges of the IR-spectrum middle range there are diverse fluctuations of transmittance that characterizing intermolecular interactions of various associates of water molecules with metabolites of biological systems. The found fluctuations quantitatively were characterized by dispersion of transmittance. It has given the possibility on nine given values, by means of multidimensional analysis (Mahalanobis distance and Bartlett's criteria) defined on various frequencies of spectrum, in comparison with the standard, quantitatively characterizing state of biological liquid that can be used in the diagnostic purposes.

Keywords: *infrared spectrometry, hardware-software complex, saliva.*

Сведения об авторах:

ЗУБАРЕВА Галина Мефодьевна - профессор, д-р биол. наук, заведующая кафедрой химии и биохимии ТГМА.

БОРДИНА Галина Евгеньевна - доцент, канд. биол. наук, доцент кафедры химии и биохимии ТГМА.

МИКИН Вадим Михайлович - ассистент кафедры химии и биохимии Тверская ГМА.