УДК 167.7+577.112.083.3+612.017.1+616.9+616-056+616-71+616-073.43+616-074/-078

УЛЬТРАЗВУКОВОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОБЪЕКТЫ СЫВОРОТКИ КРОВИ — ПЕРСПЕКТИВНОЕ НАПРАВЛЕНИЕ В КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

© Юрий Алексеевич Митин[1], Владимир Леонидович Пастушенков[2], Алексей Никонорович Дрыгин[3]

[1] Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6

[2] Акционерное Общество «ЛОМО» 194044, Санкт-Петербург, Чугунная ул., 20

[3] Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет 194100, Санкт-Петербург, Литовская ул., 2

Контактная информация: Алексей Никонорович Дрыгин — заведующий научно-исследовательским центром ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России, Санкт-Петербург, доктор медицинских наук, профессор, E-mail: 9112286592@mail.ru

Резюме. В статье представлены данные, характеризующие влияние ультразвукового воздействия на биологические объекты сыворотки крови. Детально рассмотрены биофизические и медицинские аспекты реакции тканей при ультразвуковом воздействии, в том числе процессы диссоциации иммунных комплексов, сопровождающиеся появлением антител и антигенов, ранее находившихся в связанном состоянии и недоступных для выявления лабораторными методами. На примере ВИЧ-инфекции показана перспективность использования ультразвука в лабораторной диагностике.

Ключевые слова: ультразвук, циркулирующие иммунные комплексы, диссоциация, лабораторная диагностика, ВИЧ-инфекция, антитела, антигены.

ULTRASONIC IMPACT UPON BIOLOGICAL OBJECTS OF BLOOD SERUM — A PROMISING APPROACH IN CLINICAL LABORATORY DIAGNOSTICS

© Yuri A. Mitin[1], Vladimir L. Pastushenkov[2], Alexey N. Drygin[3]

[1] Military Medical Academy by S.M. Kirov 194044, St. Petersburg, Academician Lebedev str., 6

[2] LOMO Joint Stock Company 194044, St. Petersburg, Cast-iron str., 20

[3] Saint-Petersburg State Pediatric Medical Universitym194100, Saint-Petersburg, Litovskaya str., 2

Contact Information: Alexey N. Drygin — MD, PhD, Dr Med Sci, St. Petersburg State Pediatric Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Russia, Research Center Head. E-mail: 9112286592@mail.ru

Abstract. Data describing the effects of ultrasound upon biological objects of blood serum is analyzed in the paper. Biophysical as well as medical aspects of tissue reactions caused by ultrasound are considered in fine detail including the immune complexes' dissociation processes accompanied by releasing of antibodies and antigens that used to be present in bound form and have been inaccessible for revelation by means of laboratory tests. The prospects of using ultrasonic techniques in laboratory diagnostics are presented using HIV-infection as an example.

Key words. Ultrasound, circulating immune complexes, dissociation, laboratory diagnostics, HIV-infection, antibodies, antigens

Реакция организма на проникновение патогенов во внутреннюю среду приводит к активации главной защитной системы — иммунной. Эта система реализуется с помощью механизмов врожденного и приобретенного (адаптивного) иммунитета. Иммунные процессы при врожденном иммунитете основаны на специфическом распознавании паттернов патогенности, обладающих свойствами чужеродности. При адаптивном иммунитете происходит распознавание антигенов с

помощью рецепторов лимфоцитов и различных специфических антител. Адаптивный иммунитет имеет преимущество, отсутствующее у врожденного иммунитета — способность защищать организм от агрессии изнутри, т.е. от злокачественных новообразований.

Таким образом, при соединении антигенов со специфическими к ним антителами образуются циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК). Кроме двух основных компонентов ЦИК (антигенов и специфических к ним антител) в состав иммунных комплексов могут включаться молекулы, способные связываться с определенными участками уже связанных с антигеном антител. Это могут быть молекулы белков системы комплемента или антиглобулиновые факторы. Формирование, в процессе взаимодействия различных антигенов, аллергенов с антителами иммунных комплексов, представляет собой важный иммунологический феномен, в значительной степени определяющий течение патологического процесса при различных заболеваниях. Этот процесс, при вирусных инфекциях, например, служит одним из механизмов нейтрализации биологической активности вирусов [1]. В одних случаях это происходит с участием белков системы комплемента, что приводит к необратимым изменениям в структуре вирусных частиц и потере ими инфекционности. В других случаях нейтрализация происходит путем пространственной блокады молекулами антител поверхности вируса. В такой капсуле, состоящей из молекул антител, вирусы сохраняют свою структуру и после диссоциации ЦИК вновь обретают способность инфицировать чувствительные к ним клетки.

Разнообразие факторов, способных влиять на прочность комплексов и индуцировать их диссоциацию (дезинтеграцию) объясняется гетерогенным характером связей, принимающих участие во взаимодействии вирусных антигенов с антителами. Возникающая в естественных условиях диссоциация ЦИК рассматривается как одна из причин формирования так называемой персистирующей инфекционной фракции, способствующей развитию хронических форм вирусных заболеваний.

Взаимодействие вирусных антигенных детерминант со специфическими антителами осуществляется при помощи всех видов связей, характерных для белковых молекул: водородных, ван-дер-ваальсовых дисперсионных сил притяжения, электростатического притяжения, возникающего между положительно и отрицательно заряженными группами, дипольных сил и гидрофобных связей. Эти связи характеризуются незначительной энергией и действуют на минимальном расстоянии. В связи с этим прочность иммунных комплексов зависит от числа таких связей и определяется пространственной комплементарностью эпитопа (активного центра) антигена и активного центра антитела. На прочность таких иммунных комплексов влияет уровень активной диффузии, возрастающий для белковых молекул при температуре 37 °С и выше. К таким же последствиям приводит и изменение pH среды ниже 6,0 или выше 8,5, что, однако, сказывается не только на межмолекулярных связях, но и на изменении конформации биомолекул, снижая, например, возможность иммунного реагирования антител со специфическими антигенами.

Ранняя диагностика инфекционных, онкологических, аутоиммунных, аллергических заболеваний одинаково важна как для здоровья пациента, так и для всего общества. В случае с тяжелыми, смертельно опасными заболеваниями, такими как, например, ВИЧ-инфекция, чем раньше будет установлен диагноз, тем эффективнее будет терапия и раньше может быть остановлено распространение инфекции [2]. Наиболее распространенным сегодня методом для проведения скрининговых исследований по диагностике ВИЧ-инфекции является иммуноферментный анализ (ИФА), позволяющий определять антигены ВИЧ и антитела к ВИЧ. Для подтверждения специфичности полученных результатов исследований используются экспертные методы, в частности иммунный блотинг. В основе реакций ИФА, использующегося для лабораторной диагностики ВИЧ-инфекции, лежит связывание иммобилизированных на микропланшетах вирусных антигенов со свободными антителами, находящимися в сыворотке больных ВИЧ-инфекцией, с последующим выявлением образовавшегося комплекса антиген-антитело с помощью проявляющей системы, в качестве которой используются антивидовые антитела, конъюгированные с ферментной меткой и субстрат, изменяющий цвет раствора при положительной реакции (наличии специфических антител в ВИЧ). Качественная оценка результатов ИФА предполагает наличие двух вариантов ответа: положительного (выявлены антитела к ВИЧ) и отрицательного (не выявлены антитела к ВИЧ). Однако, при лабораторном обследовании пациента на ВИЧ-инфекцию возможно получение ложноотрицательных результатов, т.е. когда инфицирование пациента уже произошло, однако результат исследования на антитела к ВИЧ отрицательный [3]. Это явление может иметь место в период так называемого «серологического окна», возникающего на ранних этапах инфекции, когда инфицирование произошло относительно недавно, уровень антител низкий и образовавшиеся антитела связавшись с антигенами ВИЧ, образуют иммунные комплексы [4]. В составе таких комплексов антитела к ВИЧ становятся недоступными для выявления. Эти же процессы могут наблюдаться и в терминальной стадии ВИЧ-инфекции, когда уровень антител ниже или равен уровню антигенов, что приводит к связыванию всех или подавляющего большинства свободных антител в иммунные комплексы, затрудняя выявление их с помощью ИФА [5]. Есть ли возможность воздействия на ЦИК с целью выделения из их состава антигенов и антител? Такие подходы, основанные на воздействии на ЦИК, существуют. Факторами, влияющими на состояние ЦИК являются, прежде всего, температура и различные химические вещества (кислоты, щелочи). Однако в результате их действия возникают значительные, иногда необратимые, нарушения структуры макромолекул, в результате чего они теряют свою биологическую активность. Наиболее щадящим действием обладает ультразвук. Использование ультразвука (УЗ) в

различных медицинских целях обусловлено его свойствами оказывать направленное воздействие в виде полей или пучков, на биологические объекты. В медицинском ультразвуке, как и в других областях акустики, практический интерес к использованию направленных полей обусловлен, с одной стороны, возможностью их избирательного воздействия на определенный участок биологической ткани или другой среды, например жидкости, а с другой стороны, возможностью принимать отраженный сигнал из области пространства, на которое воздействовал ультразвук. Существовало множество наблюдений, в которых было обнаружено, что воздействие УЗ приводит к различным специфическим изменениям макромолекул в живых клетках и тканях. По-видимому, первым, кто сделал такого рода наблюдения, был Ланжевен, который в 1917 г., при проведении испытаний мощных ультразвуковых излучателей, предназначенных для поиска подводных лодок, обнаружил повреждения у рыб. Ультразвуковое происхождение таких повреждений было подтверждено в последующем работами Вуда и Лумиса [8]. В медицине ультразвук, в основном, используется для диагностических целей, осуществляемых эхографическими комплексами ультразвуковых исследований (УЗИ) или для проведения ультразвуковых терапевтических воздействий (УЗ-терапия). С целью достижения терапевтического эффекта, основанного на переходе ультразвуковой энергии в тепловую, применяются направленные, фокусированные воздействия, обусловленные преобразователями УЗ, создающими акустическое поле заданной формы. По мере глубины ткани, на которую воздействует УЗ, возникает поглощение энергии УЗ и его затухание. С целью усиления воздействия УЗ производят подбор частоты и интенсивности, добиваясь эффекта нелинейного распространения УЗ, при котором происходит перекачка энергии из основной частоты в более высокие гармоники, поглощение на которых существенно возрастает.

При воздействии ультразвука на жидкие биологические среды происходит возникновение важнейшего эффекта — кавитации, определяемой как образование одного или нескольких пузырьков газа (полостей) в объеме жидкости. Различают 2 типа кавитационной активности пузырьков: инерционная и неинерционная. Инерционная кавитация возникает, когда наполненная газом полость в жидкости сначала расширяется , а затем быстро схлопывается до размера значительно меньше начального. В месте схлопывания возникает повышение температуры и давления, а выделяющаяся энергия преобразуется: в частности возникает свечение (сонолюминесценция) и образование химически активных веществ. Неинерционная кавитация характеризуется процессами ускорения движения уже имеющихся пузырьков, искажением их поверхности, ростом размеров и пр. Процессы кавитации, возникающие в жидкой биологической среде под действием ультразвука, приводят к усилению в ней химических процессов, формированию различных радикалов, и, следовательно, к изменению состояния макромолекул, находящихся в данной биологической среде. Возникающие химические и термодинамические явления характеризуются явлениями диссоциации макромолекул с возможностью их последующей рекомбинации, сопровождающейся явлениями хемилюминесценции [6].

В жидкой среде ультразвук может поглощаться. Рассматривая этот процесс в жидких средах организма, можно отметить, что основной вклад в поглощение принадлежит биополимерам. Научными исследованиями было установлено, что в отличии от мономеров, например аминокислот, поглощение ультразвука белковыми молекулами больше чем суммарное поглощение аминокислотами (мономерами) из которых этот белок состоит. Общепринятым является мнение, что при нормальных физиологических значениях pH наиболее существенный вклад в поглощение обусловлен, вероятно, возмущениями гидратных оболочек макромолекул или иммунных комплексов, под действием ультразвука. Результатом такого воздействия может стать разделение макромолекул, т.е. распад иммунного комплекса на его составляющие — антигены и антитела. Появление свободных антитегов и антител, ранее находившихся в связанном состоянии, может быть использовано в диагностических целях. Такие свободные антигены и антитела уже могут быть выявлены методами иммуноанализа (ИФА, иммунный блотинг, иммунохемилюминесцентный анализ).

Недостатком существующих современных подходов лабораторной диагностики инфекционных заболеваний, является то, что объектом исследований являются только свободные антитела или антигены, находящиеся в биологических средах организма (кровь, слюна). Однако, в начальные периоды инфекционных заболеваний такие антитела недоступны для выявления, т.к. они связываются с антигеном, образуя иммунные комплексы [7]. Воздействие на иммунные комплексы, сохраняющее биологическую активность антител и антигенов, может создать новые объекты для диагностических исследований- антитела и антигены из состава иммунных комплексов.

В настоящее время отсутствуют методы выделения антител из иммунных комплексов, технологии и приборы, позволяющие осуществить этот подход. Если в этих целях использовать ультразвуковую дезинтеграцию иммунных комплексов, то возможно выявление антигенов и антител в период «серологического окна». Такой подход, основанный на ультразвуковой дезинтеграции ЦИК, может стать совершенно новым направлением в клинической лабораторной диагностике инфекционных заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бартлетт Дж. Галлант Дж., Фам П. Клинические аспекты ВИЧ-инфекции. М.: Р. Валент; 2012.
2. Мазус А.И., Каминский Г.Д., Зимина В.Н. и др. Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению ВИЧ-инфекции у взрослых. М.; 2014.
3. Покровский В.В. ВИЧ-инфекция и СПИД. Ред. В.В. Покровский. 2-е изд., перераб. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2010.

4. Сапрыгин Д.Б., Иванов А.М. Лабораторная диагностика инфекционных болезней. Справочник. М.; 2016.
5. Финогеев Ю.П., Лобзин Ю.В., Винакмен Ю.А., Захаренко С.М. Клинико-лабораторная диагностика инфекционных болезней. Руководство для врачей. СПб.; 2001.
6. Coleman A.J., Draguioti E., Tiptaf R., Shotri N., Saunders J.E. Acoustic performance and clinical use of a fibreoptic hydrophone. Ultrasound Med. Biol., 1998; 24: 143–151.
7. Douek D.C., Roederer M., Koup R.A. Emerging concepts in the immunopathogenesis of AIDS. Annu. Rev. Med. 2009; 60: 471–84.
8. Wood R.W., Loomis A.L. The physical biological effects of high frequency sound waves of great intensity. Philos mag. 1927; 4(7): 417–436.

REFERENCES

1. Bartlett Dzh. Gallant Dzh., Fam P. Klinicheskie aspekty VICH-infekcii [Clinical aspects of HIV infection]. M.: R. Valent; 2012. (in Russian).
2. Mazus A.I., Kaminskij G.D., Zimina V.N.. i dr. Nacional'nye klinicheskie rekomendacii po diagnostike i lecheniyu VICH-infekcii u vzroslyh [National clinical recommendations about diagnostics and treatment of HIV infection at adults]. M.; 2014. (in Russian).
3. Pokrovskij V.V. VICH-infekciya i SPID [HIV infection and AIDS]. Red. V.V. Pokrovskij. 2-e izd., pererab. i dop. M.: GEOTAR-Media; 2010. (in Russian).
4. Saprygin D.B., Ivanov A.M. Laboratornaya diagnostika infekcionnyh boleznej. [Laboratory diagnosis of infectious diseases]. Spravochnik. M.; 2016. (in Russian).
5. Finogeev YU.P., Lobzin YU.V., Vinakmen YU.A., Zaharenko S.M. Kliniko-laboratornaya diagnostika infekcionnyh boleznej. [Clinical laboratory diagnosis of infectious diseases]. Rukovodstvo dlya vrachej. SPb.; 2001. (in Russian).
6. Coleman A.J., Draguioti E., Tiptaf R., Shotri N., Saunders J.E. Acoustic performance and clinical use of a fibreoptic hydrophone. Ultrasound Med. Biol. 1998; 24: 143–151.
7. Douek D.C., Roederer M., Koup R.A. Emerging concepts in the immunopathogenesis of AIDS. Annu. Rev. Med. 2009; 60: 471–84.
8. Wood R.W., Loomis A.L. The physical biological effects of high frequency sound waves of great intensity. Philos mag. 1927; 4(7): 417–436.