

ВИКОРИСТАННЯ ЛАЗЕРНОЇ СПЕКТРОФОТОМЕТРІЇ ЯК БІОФІЗИЧНОГО МЕТОДУ ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ЕНДОТЕЛІНУ-1 У ПАЦІЄНТІВ З АРТЕРІАЛЬНОЮ ГІПЕРТЕНЗІЄЮ

К.О. Волошинська^{1,2}, О.В. Гарвасюк¹, С.М. Ковальчук², М.В. Ковальчук²

¹ВДНЗ України «Буковинський державний медичний університет», м. Чернівці, Україна.

²Державна установа «Територіальне медичне об'єднання Міністерства внутрішніх справ України по м. Києву», м. Київ, Україна

Ключові слова: лазерна спектрофотометрія, артеріальна гіпертензія, ендотелін-1, перименопауза.

Буковинський медичний вісник. Т.24, № 1 (93). С. 40-45.

DOI:
10.24061/2413-0737.
XXIV.1.93.2020.6

E-mail: katep@ukr.net,
sashagarvasuk@gmail.com

Актуальність дослідження. Розвиток сучасних технологій вимагає нових підходів до методів діагностики біологічних об'єктів та стимулює їх розвиток в усіх галузях людської діяльності, у тому числі і в медицині.

Мета роботи — провести інфрачервону спектрофотометрію плазми крові для визначення кореляції інтегральних показників інфрачервоного спектроскопічного аналізу в пацієнтів з артеріальною гіпертензією в перименопаузі з наявністю чи відсутністю цукрового діабету до та після проведеного лікування.

Матеріал і методи. Нами застосовано біофізичний метод інфрачервоної спектрофотометрії у 124 пацієнтів з артеріальною гіпертензією в перименопаузі, з чи без супутнього цукрового діабету, з метою визначення кореляції інтегральних показників інфрачервоного спектроскопічного аналізу.

Результати. Вирішено задачу детального визначення спектрометричних коефіцієнтів у діагностично-значимій частотній ділянці досліджуваних зразків. Проаналізовано вміст ендотеліну-1 у спектрах пропускання плазми крові в обраного контингенту хворих.

Висновок. Доведено, що метод інфрачервоної спектрофотометрії плазми крові дозволяє з високою точністю (98,6%) проводити інфрачервоною експрес-аналіз стану пацієнтів до лікування, під час та після призначеного лікування, не застосовуючи дороговартісні та громіздкі методи імуноферментного аналізу.

Ключевые слова: лазерная спектрофотометрия, артериальная гипертензия, эндотелин-1, перименопауза.

Буковинский медицинский вестник. Т.24, № 1 (93). С. 40-45.

ПРИМЕНЕНИЕ ЛАЗЕРНОЙ СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ, КАК БИОФИЗИЧЕСКОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ЭНДОТЕЛИНА-1 У ПАЦИЕНТОВ С АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ

Е.А. Волошинская, А.В. Гарвасюк, С.М. Ковальчук, М.В. Ковальчук

Актуальность исследования. Развитие современных технологий требует новых подходов к методам диагностики биологических объектов и стимулирует их развитие во всех отраслях человеческой деятельности, в том числе и в медицине.

Цель работы — провести лазерную спектрофотометрию плазмы крови для определения корреляции интегральных показателей инфракрасного спектроскопического анализа у пациентов с артериальной гипертензией в перименопаузе с наличием сахарного диабета, или без него, до и после проведенного лечения.

Материал и методы. Нами использовано биофизический метод инфракрасной спектрофотометрии у 124 пациентов с артериальной гипертензией в перименопаузе, с или без сопутствующего сахарного диабета, с целью определения интегральных показателей инфракрасного спектроскопического анализа.

Результаты. Решено задачу детального определения спектрофотометрических коэффициентов в диагностически-значимой частотной области исследуемых образцов. Проанализировано содержание эндотелина-1 в спектрах пропускания плазмы крови у избранного контингента больных.

Вывод. Доказано, что метод инфракрасной спектрофотометрии плазмы крови дает возможность с высокой точностью (98,6%) проводить инфракрасный экспресс-анализ состояния пациентов до и после назначенного лечения, не используя при этом дорогостоящие и громоздкие методы иммуноферментного анализа.

Keywords: laser spectrophotometry, arterial hypertension, endothelin-1, perimenopause.

Bukovinian Medical Herald. V.24, № 1 (93). P. 40-45.

LASER SPECTROPHOTOMETRY AS BIOPHYSICAL METHOD FOR ENDOTHELIN-1 DETERMINING CONTENT IN PATIENTS WITH ARTERIAL HYPERTENSION

K.O. Voloshynska, O.V. Garvasiuk, S.M. Kovalchuk, M.V. Kovalchuk

Relevance of research. The technology development requires new approaches in biological objects diagnostics and stimulates their development in all areas of human activity including medicine.

Objective. We applied laser spectrophotometry of the blood plasma for definition the correlation of spectrophotometry indicators in patients with arterial hypertension in perimenopause with diabetes mellitus or without it.

Material and methods. We used biophysical method of the laser spectroscopy in 124 patients with arterial hypertension in perimenopause with diabetes mellitus or without it for definition the correlation of spectrophotometry indicators.

Results. We have solved the problem of detailed definition of the spectroscopy's coefficients in the significant frequency area of the samples. Endothelin-1 content was analyzed in the selected contingent of patients.

Conclusions. We have proved that method of the laser spectrophotometry of the blood plasma give an opportunity to conduct the monitoring of patients condition with high accuracy (98,6%).

Вступ. На даний час налічується кілька тисяч методів аналізу рідких біологічних середовищ, у ході яких визначається концентрація більше ста речовин [1]. Серед інших важливе місце посідають методи аналізу рідких біологічних середовищ, які базуються на кількісному ультрафіолетовому абсорбційному спектральному аналізі (УФ спектрофотометрії) [2]. До переваг таких методів можна віднести оперативність, порівняно низьку вартість використовуваної апаратури і можливість автоматизації, високу точність і відтворюваність, відсутність необхідності в застосуванні реактивів і т. д. Спектрофотометричний аналіз також широко застосовується для контролю ряду рідких лікарських форм, особливо препаратів рослинного і тваринного походження, склад яких багато в чому близький до складу рідких біосередовищ [3, 4].

Найбільшого поширення в клініко-біохімічних дослідженнях, завдяки своїй універсальності, простоті в застосуванні і невисоким вимогам до використовуваної апаратури, отримали непрямі спектрофотометричні методи, які також часто називають колориметричним [5]. Аналіз за таких методів вимагає додавання в досліджуване середовище специфічного для визначуваного компонента реагенту, який вступає з ним у хімічну реакцію з утворенням сполуки, яка сильно поглинає

світло в ділянці прозорості аналізованого середовища. Якщо середовище, що досліджується, прозоре в видимій ділянці, зорво це спостерігається як забарвлення, і відповідна реакція називається кольоровою. Концентрація аналізованого компонента потім обчислюється за величиною екстинкції, вимірної на довжині хвилі максимуму смуги поглинання продукту кольорової реакції [6, 7]. Часто колориметричні методи реалізуються способами «сухої хімії», з використанням різних аналітичних смужок, що ще більше спрощує процедуру аналізу [8]. Перевагою непрямих спектрофотометричних методів є можливість визначати концентрацію речовин, які не поглинають або слабо поглинають в ультрафіолетовій і видимій ділянках. До недоліків таких методів потрібно віднести необхідність застосування реактивів, інвазивність та обмежені можливості одночасного аналізу по декількох компонентах [9].

Прямі методи базуються на безпосередньому визначенні вмісту аналізованої речовини в пробі за результатами вимірювання екстинкції середовища на одній або декількох довжинах хвиль без використання будь-яких додаткових реагентів у відповідності з основними принципами абсорбційного спектрального аналізу [1, 3].

Перспективним виглядає поляриметричний метод діагностики патологічних змін плазми крові людини,

Оригінальні дослідження

оскільки відомо, що пропорційний вміст основних білків плазми крові (альбумінів та глобулінів) змінюється [8]. Саме тому ми і вирішили використати його в нашому дослідженні.

Мета дослідження. Провести інфрачервону спектрофотометрію плазми крові для визначення кореляції інтегральних показників інфрачервоного спектроскопічного аналізу в пацієнтів з артеріальною гіпертензією в перименопаузі з наявністю чи відсутністю цукрового діабету до та після проведеного лікування.

Матеріал і методи. У дослідження включено 124 пацієнтки жіночої статі, віком від 42 до 59 років, у середньому (50,9±5,3) років. Всі включені в дослідження пацієнти отримували базисну терапію, яка передбачала призначення гіпотензивних засобів: лізиноприл або амлодипін; статинів. Особи I групи із цукровим діабетом додатково отримували метформін. Частина пацієнтів кожної групи (27 осіб I групи та 26 осіб II групи) приймала вищезазначені препарати в поєднанні з L-аргініном.

Як об'єкт дослідження використовували плазму крові, підготовлену для проведення спектрального аналізу. Плазму висушували при кімнатній температурі в напівприкритій чашці Петрі. Сухий залишок вводили у вазелінове масло і отримували суспензію, яку потім піддавали ІЧ — спектроскопії з реєстрацією спектрів поглинання в ділянці 400–4000 см⁻¹. При отриманні спектрограми визначали висоту піків смуг поглинання з максимумами при 1170, 1165, 1150, 1140, 1130, 1100, 1070, 1025 см⁻¹ і обчислювали середнє значення висоти всіх піків — С. Потім визначали відношення кожного попереднього піку до подальшого: 1170/1165, 1165/1150, 1150/1140, 1140/1130, 1130/1100, 1100/1070, 1070/1025. Інформативні показники позначали умовними символами (Z1– Z6). Показник Z1 являє собою найбільше отримане значення, а показник Z2 — найменше. Крім того, введено додатковий показник –Z3, який є різницею Z1 і Z2. Середнє значення всіх показників позначено,

як Z4. Також обчислювали величину Z5 — відношення висоти піка з максимумом при 1165 см⁻¹ по висоті піка з максимумом при 1170 см⁻¹, величину Z6 — відношення висоти піка з максимумом при 1130 см⁻¹ до середнього значення величини висот піків (Z5) і величину Z6 — відношення висоти піка з максимумом при 1100 см⁻¹ до середнього значення величини висот (Z5).

Як експериментальна установка використовувався стандартний вимірювальний комплекс "SPEKORD-75 IR", що дає можливість зареєструвати спектри пропускання досліджуваних зразків. Це робиться автоматично на самописці в діапазоні хвилових чисел 4000–400 см⁻¹, що відповідає довжинам хвиль X= 2.5–25 мкм. Технічні характеристики приладу:

1. Напруга живлення 220 В;
2. Споживана потужність 160 Вт;
3. Діапазон хвилових чисел 4000–400 см⁻¹;
4. Похибка хвилових чисел ±2 см⁻¹;
5. Роздільна здатність: при 4000 см⁻¹–5 см⁻¹; при 3200 см⁻¹ –2 см⁻¹; при 2500 см⁻¹–1 см⁻¹;
6. Похибка відтворення ±2%;
7. Час запису: 2, 4, 11, хв/лист формату А4;
8. Частота модуляції пучків 12.5 Гц.

Коефіцієнти пропускання зразків у відсотках визначаються двопроменевим методом із використанням принципу оптичного диференціювання. Для цього в один із променів монохроматора поміщається еталонний зразок, а в інший — досліджуваний згідно зі схемою (рис. 1). Коли інтенсивності обох компонентів рівні між собою, загальний електричний сигнал на виході термoelementa є постійним. У момент порушення рівності інтенсивностей променів на виході приймача виникає змінний сигнал, який після підсилення, фазочастотного випрямлення і перетворення, керує пером самописця. Величина відхилення пера пропорційна коефіцієнту пропускання досліджуваного зразка відносно еталону для кожної частоти (довжини хвилі) і фіксується

Таблиця 1

Зведені статистичні спектрометричні коефіцієнти вмісту ендотеліну-1 плазми крові хворих на артеріальну гіпертензію до та після лікування

Z _i	Спектрометричний коефіцієнт			
	контроль	1-ша група	2-га група	3-тя група
Z1	0.2± 0,003	0.49± 0,054	0.31± 0,002	0.33 ± 0,04
Z2	0.7± 0,009	0.93± 0,004	0.8± 0,009	0.10 ± 0,03
Z3	0.8± 0,007	0.71± 0,08	0.59± 0,03	0.61± 0,025
Z4	0.95± 0,29	1.06± 0,27	1.14± 0,19	1.02± 0,25

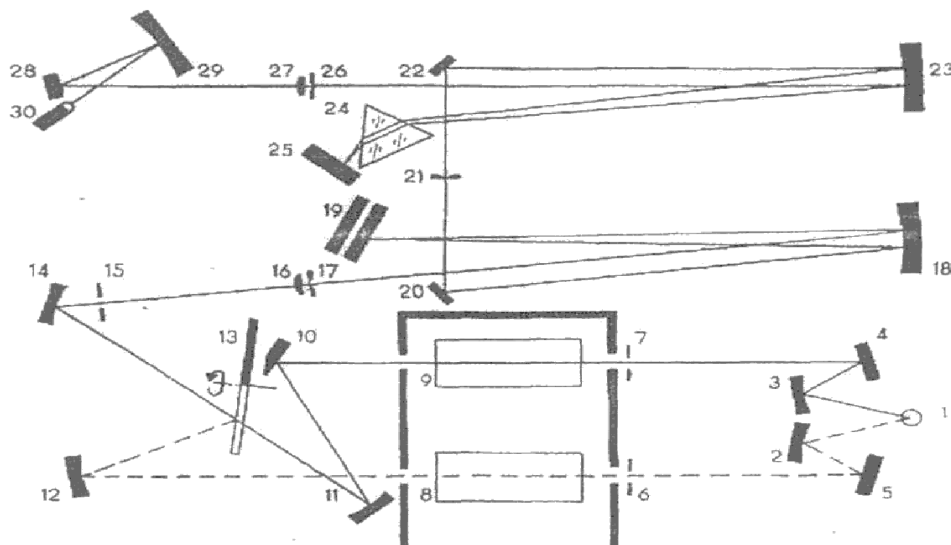


Рис.1. Оптична схема спектрофотометра "SPEKORD - 75 IR"

Позначення: 1 — джерело інфрачервоного випромінювання — глобар; 2–5 — дзеркала, які створюють два промені; 6–7 — вхідні діафрагми; 8 — досліджуваній; 9 — еталонний зразок; 10, 11, 12, 14 — оптична система для зведення двох пучків в один; 13 — модулятор; 17 — вхідна щілина монохроматора; 18–22 — поворотні дзеркала; 23 — об'єктив монохроматора; 24 — дисперсійний елемент; 25 — дзеркало автоколіматора; 26 — вхідна щілина; 27–29 — елементи фокусування випромінювання на радіаційний термоелемент; 30 — дзеркальний модулятор із диском, що обертається (13), по черговою направляє обидва промені після проходження досліджуваного і еталонного зразків на вхідну щілину монохроматора 17.

на діаграмному папері.

Результати дослідження та їх обговорення. Вирішено задачу детального визначення спектрометричних коефіцієнтів у діагностично-значимій частотній ділянці досліджуваних зразків. Аналізувався вміст ендотеліну-1 у спектрах пропускання плазми крові в таких групах хворих:

1-ша група — хворі на артеріальну гіпертензію та цукровий діабет (n=54);

2-га група — хворі на артеріальну гіпертензію без цукрового діабету (n=50);

3-тя група — група контролю (n=20).

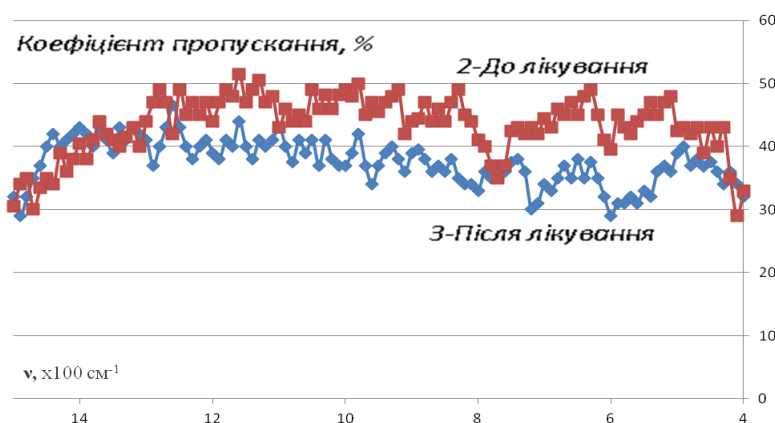


Рис. 2. Зведені ІЧ-спектри пропускання плазми венозної крові пацієнтів 1-ї групи до та після лікування

На першому етапі вимірювання здійснювався запис спектрів у межах кожної підгрупи в ділянці 400–4000 см⁻¹. Спостерігається змінний характер проявів поглинаючої здатності венозної крові в спектральній ділянці 1500–4000 см⁻¹ і монотонний характер спектральної залежності в ділянці 400–1500 см⁻¹.

Виявлена діагностично-актуальна ділянка спектрального інтервалу (400–1500 см⁻¹) у проявах поведінки розрахованих спектральних коефіцієнтів, що дозволило нам перейти до використання методу «спектрального мікроскопа», а саме:

- звужити досліджуваний частотний інтервал від

«широкого» до «вузького», що зменшить як час проведення спектральних вимірювань, так і підвищить детальність подальшого розрахунку спектрометричних коефіцієнтів;

- виділити діагностично-значимі спектральні лінії поглинання ендотеліну-1 у ділянці 400–1500 см⁻¹, встановити відмінні і специфічні значення спектрометричних коефіцієнтів для кожної із підгруп досліджуваних пацієнтів до та після лікування.

Так, опорною частотою для усіх представлених залежностей була вибрана 1500 см⁻¹, а сигнальними (діагностично-значимими) були вибрані наступні: 1150, 955, 720 та 590 см⁻¹. У таблиці 1 вказані коефіцієнти, по-

Оригінальні дослідження

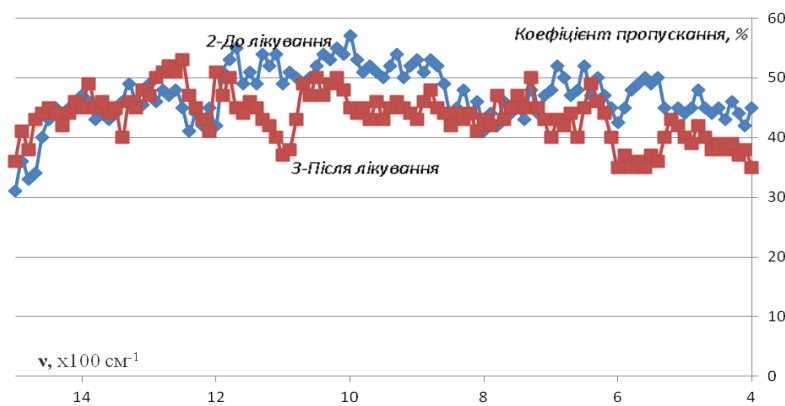


Рис. 3. Зведені ІЧ-спектри пропускання плазми венозної крові пацієнтів 2-ї групи до та після лікування

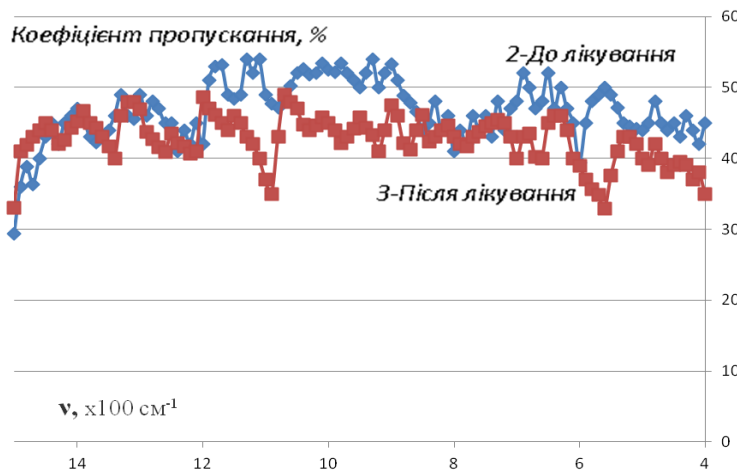


Рис. 4. Зведені ІЧ-спектри пропускання плазми венозної крові пацієнтів 3-ї підгрупи до та після лікування

Висновок

Встановлено спектральний діапазон вмісту ендотеліну-1 у плазмі крові пацієнок з артеріальною гіпертензією в перименопаузі: для ендотеліну-1 спостерігався змінний характер проявів поглинаючої здатності венозної крові в спектральній ділянці 1500–4000 см⁻¹ і монотонний характер спектральної залежності в ділянці 400–1500 см⁻¹. Метод інфрачервоної спектrophотометрії плазми крові дозволяє з високою точністю (98,6%) проводити інфрачервоний експрес-аналіз стану пацієнок до лікування, під час та після призначеного лікування, не застосовуючи дороговартісні та громіздкі методи імуноферментного аналізу.

Список літератури

1. Ushenko AG, Pishak VP, Pishak OV, Arbutov AS. Mueller matrices mapping of biological tissue architectonics. Proc SPIE. 2004 Jun;5477. DOI: 10.1117/12.559803.
2. Peresunko O, Kruk T, Voloshynska K, Gruia I, Gavrila C, Yermolenko S, et al. Spectrometry techniques in diagnostics of

значені Z1 — Z4.

Таким чином, одержані результати показали, що використання методу ІЧ спектроскопії у діапазоні частот 400–4000 см⁻¹ дозволило:

1. Встановити діагностично значимі кількісні параметри ступеня (спектральний коефіцієнт) поглинання плазми крові пацієнтів у різних діапазонах залежно від вмісту тригліцеридів та ендотеліну-1 плазми крові.

2. Підтвердити характер проявів показників вмісту тригліцеридів та ендотеліну-1 плазми крові в досліджуваних групах хворих залежно від стану до та після лікування та встановити кореляцію їх значень із спектральними коефіцієнтами.

3. Виявити діагностично-актуальну ділянку спектрального інтервалу (400–1500 см⁻¹) в проявах поведінки розрахованих спектральних коефіцієнтів, що можна використати як метод «спектрального мікроскопа».

4. Спрогнозувати в майбутньому проведення експрес-аналізу стану пацієнта (процедура скринінгу) протягом його лікування в часі та здійснювати вибір методики лікування.

hereditary breast cancer. ProcSPIE. 2015 Feb;9258. DOI: 10.1117/12.2068184.

3. Ushenko AG. Laser polarization microscopy of biofractals. ProcSPIE. 1998 Aug;3573. DOI: 10.1117/12.324602.
4. Ushenko YuA. Polarized cartography of biofractals. Elektronika. 2004;8-9:313-5. DOI: 10.1109/LFNM.2004.1382477.
5. Ushenko YuA. Polarization phase mapping of biological tissues: II. Skin as a transformer of vector structure of coherent radiation. Proc SPIE. 2004 Jun;5477. doi: 10.1117/12.560024.
6. Ushenko AG. Laser probing of biological tissues and the polarization selection of their images. Optics and Spectroscopy. 2001 Dec;91(6):932-6.
7. Voloshynska K, Ilashchuk T, Yermolenko S. 2015. Spectropolarimetry of blood plasma in optimal molecular targeted therapy Proc. of SPIE 9258 (92580P).
8. Ushenko AG, Burkovets DM, Yermolenko SB, Ushenko YuA, Pishak VP, Pishak OV, et al. Polarized microstructure of laser radiation scattered by optically active biotissues. Proc SPIE. 1999 Nov;3904. DOI: 10.1117/12.370450.
9. Voloshynska K, Ilashchuk T, Yermolenko S. Spectropolarimetry of blood plasma in optimal molecular targeted therapy. Proc of SPIE. 2015 Feb 20;9258. DOI: 10.1117/12.2068189.

Відомості про авторів

Волошинська Катерина Олександрівна — здобувач кафедри пропедевтики внутрішніх хвороб ВДНЗ України «Буковинський державний медичний університет», м. Чернівці, Україна.

Лікар-кардіолог ДУ «Територіальне медичне об'єднання Міністерства внутрішніх справ України по м. Києву», м. Київ, Україна.

Гарвасюк Олександра Василівна — асистент кафедри патологічної анатомії ВДНЗ України «Буковинський державний медичний університет», м. Чернівці, Україна.

Ковальчук Сергій Михайлович — завідувач кардіологічного відділення ДУ «Територіальне медичне об'єднання Міністерства внутрішніх справ України по м. Києву», м. Київ, Україна.

Ковальчук Марія Вікторівна — лікар з ультразвукової діагностики ДУ «Територіальне медичне об'єднання Міністерства внутрішніх справ України по м. Києву», м. Київ, Україна.

Сведения об авторах

Волошинская Екатерина Александровна — соискатель кафедры пропедевтики внутренних болезней ВГУЗ Украина «Буковинский государственный медицинский университет», г. Черновцы, Украина.

Врач-кардиолог ГУ «Территориальное медицинское объединение Министерства внутренних дел Украины по г. Киеву», г. Киев, Украина.

Гарвасюк Александра Васильевна — ассистент кафедры патологической анатомии ВГУЗ Украины «Буковинский государственный медицинский университет», г. Черновцы, Украина.

Ковальчук Сергей Михайлович — заведующий кардиологическим отделением ГУ «Территориальное медицинское объединение Министерства внутренних дел Украины по г. Киеву», г. Киев, Украина.

Ковальчук Мария Викторовна — врач ультразвуковой диагностики ГУ «Территориальное медицинское объединение Министерства внутренних дел Украины по г. Киеву», г. Киев, Украина.

Information about the authors

Voloshynska Kateryna — assistant of the Department of Propaedeutics of Internal Medicine «Bukovinian State Medical University». Cardiologist in SI «Territorial Medical Association of the Internal Affairs Ministry in Kiev», Kiev.

Garvasiuk Olexandra — assistant of the Department of Pathological Anatomy of Higher State Educational Establishment of Ukraine «Bukovinian State Medical University», Chernivtsi, Ukraine.

Kovalchuk Sergiy — the manager of Cardiological Department in SI «Territorial Medical Association of the Internal Affairs Ministry in Kiev», Kiev.

Kovalchuk Maria — doctor of the ultrasound diagnostics in SI «Territorial Medical Association of the Internal Affairs Ministry in Kiev», Kiev.

Надійшла до редакції 19.02.2020

Рецензент — проф. Федів О.І.

© К.О. Волошинська, О.В. Гарвасюк, С.М. Ковальчук, М.В. Ковальчук, 2020