

03;12

О существовании регулярных структур в жидкой сыворотке (плазме) крови человека и фазовых переходах в процессе ее высыхания

© Т.А. Яхно, О.А. Седова, А.Г. Санин, А.С. Пелюшенко

Институт прикладной физики РАН,
603950 Нижний Новгород, Россия
e-mail: tanya@awp.nnov.ru

(Поступило в Редакцию 3 сентября 2002 г.)

Представлены экспериментальные данные о существовании трехмерных регулярных жидкокристаллических белковых структур размером от сотых до десятых долей миллиметра, выявляемых в цельной сыворотке и плазме крови людей при различных заболеваниях. В процессе высыхания капли сыворотки происходят расплавление части этих структур с образованием геля и переход оставшейся части в фазу твердотельного кристалла. Форма образованных кристаллов повторяет форму молекул иммуноглобулина М, превышая их по размеру в тысячу раз. Повышенное количество геля, образующегося при высыхании капли сыворотки (плазмы) больных людей, приводит к нарушению симметрии в процессе формообразования неравновесных белковых пленок. Высказано предположение, что механизм терапевтического действия низкоинтенсивных факторов физической природы реализуется через изменение фазового состояния белка в жидких биологических средах.

Введение

Фазовое состояние жидких биологических сред играет жизненно важную роль в обеспечении функций организма [1]. Открытие Е.Г. Рапис феномена самоорганизации белка при высушивании его в неравновесных условиях [2,3] положило начало интенсивному изучению особенностей структуризации биологических жидкостей с целью медицинской диагностики при их естественном высыхании в виде капли [4]. Процесс самоорганизации плазмы или сыворотки крови чрезвычайно интересен и весьма сложен. Здесь тесно переплетаются события, являющиеся предметом исследования биофизики, физической и коллоидной химии, химической физики, иммунологии, кристаллографии. В предыдущей работе [5] мы отметили ряд различий в динамических параметрах структуризации высыхающих капель сыворотки крови у здоровых и больных (вирусным гепатитом В и ожоговой болезнью) людей. Они заключались в увеличении времени высыхания, снижении средней скорости движения фронта структуризации, снижении дисперсии скорости фронта, повышенном гелеобразовании у больных по сравнению с практически здоровыми донорами. После облучения сыворотки больных людей *in vitro* низкоинтенсивным красным или синим светом в дозе 100 J/m^2 динамические параметры высыхающих капель приближались к данным доноров, масса образующегося геля уменьшалась.

В настоящей работе мы приводим результаты более детального исследования фазового состояния жидкой сыворотки (плазмы) крови, которые позволили с новых позиций взглянуть на сценарий фазовых переходов и сформулировать гипотезу для вероятного объяснения некоторых явлений.

Материалы и методы

В работе использовали сыворотку и плазму практически здоровых доноров (30 человек), больных вирусным гепатитом В и С в стадии обострения (18 человек),¹ больных ожоговой болезнью (30 человек),² женщин после нормальных и преждевременных родов (2-й и 3-й триместр беременности) — 40 человек,³ сыворотку больного болезнью Вальденстрема и больного парапротеинемическим гемобластозом, у которого практически отсутствовал IgM.⁴ У части больных вирусным гепатитом исследовали слюну. Плазму крови доноров, больных и женщин после родов исследовали до и после процедуры замораживание–оттаивание в условиях бытового холодильника (-18°C).

Исследуемые жидкости наносили на чистые обезжиренные предметные стекла двумя способами: в виде капель по $5 \mu\text{l}$ (по 6–8 капель каждой пробы на стекло) и в виде большого объема жидкости (0.5 ml). Высушивали образцы при комнатной температуре в течение суток. Таким образом, жидкости высыхали при разных термодинамических условиях, обусловленных их объемом и формой. Часть экспериментального материала в виде капель на стекле высушивали под микроскопом „МБС-10“ с телевизионной камерой, сопряженной с компьютером, регистрируя процесс фазовых переходов. Высушенные капли исследовали под микроскопом „Люам-ИЗ“

¹ Материал предоставлен городским гепатологическим центром Нижнего Новгорода.

² Материал предоставлен Федеральным ожоговым центром НИИТО Нижнего Новгорода.

³ Материал предоставлен специализированными лечебными учреждениями Нижнего Новгорода.

⁴ Материал предоставлен Нижегородским НИИ эпидемиологии и микробиологии.

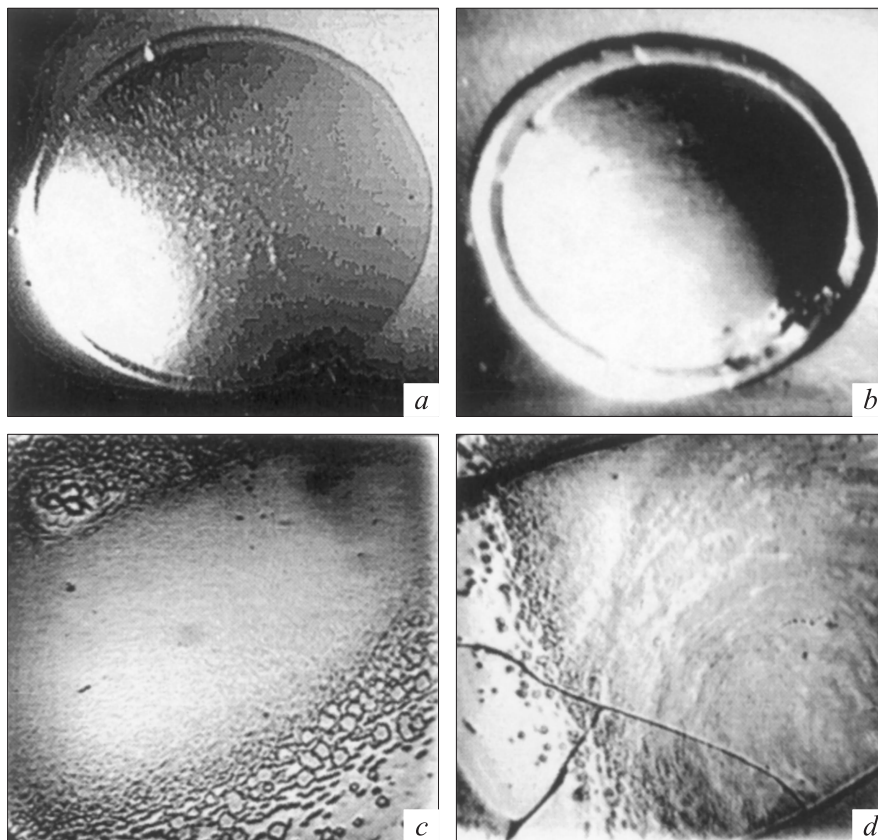


Рис. 1. Морфологическая картина фазовых состояний в высыхающих каплях сыворотки крови больных: *a* — больного хроническим гепатитом В и хроническим гепатитом С в стадии обострения (ув.×12); *b* — больного вирусным гепатитом В, острой желтушной формой средней тяжести (ув.×12); *c* — больного ожоговой болезнью (ув.×140); *d* — больного вирусным гепатитом В, острой желтушной формой (ув.×140).

в обычном световом режиме и с использованием поляризационных фильтров.

Результаты и их обсуждение

Поверхность жидкой капли сыворотки крови больных вирусным гепатитом и ожоговой болезнью под микроскопом часто выглядела „шероховатой“ из-за присутствия в ней мелких светорассеивающих структур (рис. 1, *a*). Это явление никогда не наблюдалось у практически здоровых людей (доноров). В некоторых случаях неоднородности, присутствовавшие в сыворотке, достигали огромных размеров, выступая на поверхность жидкости, что позволяло зарегистрировать их форму, представляющую собой регулярную трехмерную кластерную структуру (рис. 1, *b*). В процессе высыхания капель часть данных структур расплавлялась, превращаясь в гель, другая же часть переходила в фазу твердотельного кристалла (рис. 1, *c, d*). В результате обильного образования нерегулярного геля нарушались процессы самоорганизации и построения „правильных“ центрально-симметричных фигур высохших капель, свойственных донорам [4,5]. В плазме женщин в ранний послерод-

довый период нерасплавленные и частично расплавленные кристаллы, как правило, образовывали концентрическую окружность в переходной зоне капли. При тяжелой гестозе, сопровождавшемся преждевременными родами, эта зона значительно расширилась и кристаллы были крупнее (рис. 2, *a, b*). Данные структуры обладали слабой зеленоватой флуоресценцией в поляризованном свете (рис. 2, *c, d*). При более медленном высыхании в большом открытом объеме жидкости их структура лучше сохранялась, можно было отметить явное сходство формы большинства кристаллов с формой молекулы иммуноглобулина М (IgM, рис. 3) [6] при разнице в размерах в 1000 раз. Структуры такой же формы можно было встретить и в высохших каплях слюны (в краевой зоне) ряда больных вирусным гепатитом. IgM представляет класс филогенетически наиболее древних иммуноглобулинов [7]. Повышение его концентрации происходит прежде всего при первом появлении антигена в организме. Молекула IgM является пентамером с массой около 950 000. Данный белок имеет константу седиментации 7S и содержится в сыворотке крови здоровых людей в концентрации 0.05–0.19 g/dl. Известен ряд заблуждений, связанных с гиперпродукцией IgM (первич-

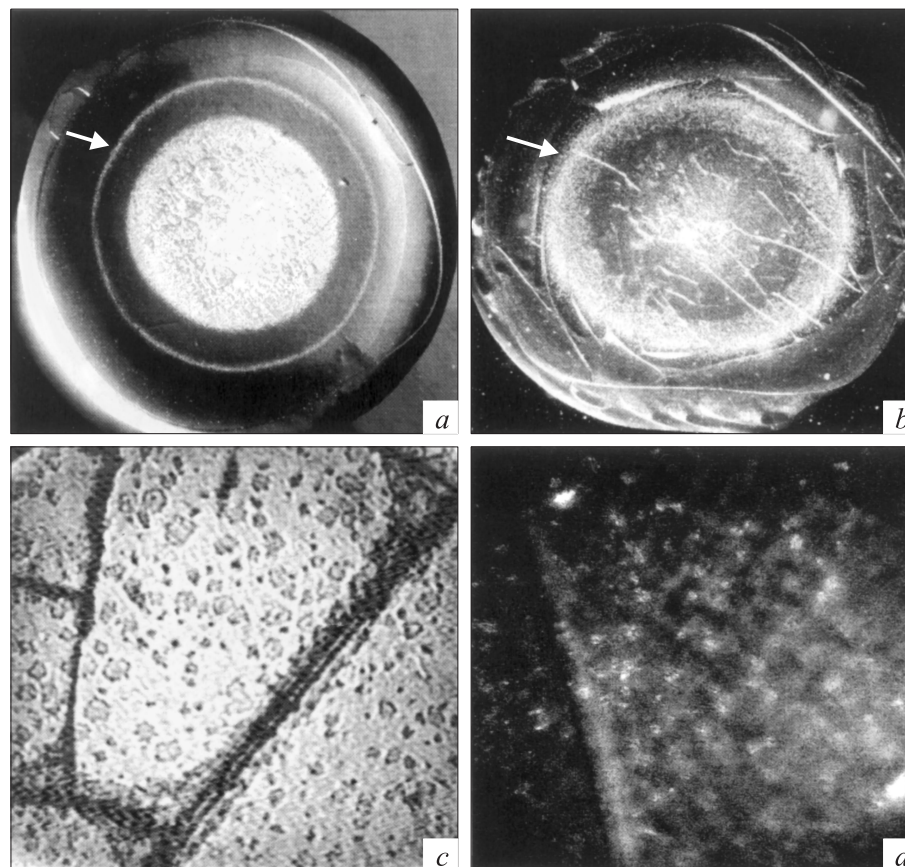


Рис. 2. Высохшие капли плазмы крови женщин в ранний послеродовой период. Стрелками отмечены зоны расположения белковых кристаллов. *a* — роды в срок (40 недель) (ув.×17); *b* — преждевременные роды (34 недели) (ув.×17); *c* — кристаллы белка в высохшей плазме женщины после преждевременных родов при обычном освещении (ув.×600); *d* — кристаллы белка в высохшей плазме женщины после преждевременных родов в поляризованном свете при том же увеличении.

ной⁵ или вторичной⁶). В частности, он является манифестным белком острой фазы вирусного гепатита В [8]. В доступной нам литературе мы не нашли описания регулярных макроструктур в жидкой фазе сыворотки (плазмы) крови. Исследование жидкокристаллических текстур биожидкостей обычно проводится при высушивании их между предметным и покровным стеклами в условиях, близких к равновесным [9,4].

Как первичные, так и вторичные гипериммуноглобулинемии М сопровождаются осложнениями, вызванными отложением аморфных белковых масс в просветах сосудов. Принято считать, что это скопления циркулирующих иммунных комплексов [10,11]. Однако кристаллизация иммунных комплексов представляется нам маловероятной. Связывание антигена со специальными областями антител осуществляется с помощью ионных, ван-дер-ваальсовых, водородных и гидрофобных взаимодействий [12]. Оптимальная реализация этих связей возможна только при физиологических значениях pH ,

⁵ Например, болезнь Вальденстрема, при которой вырабатывается только генетически измененный IgM.

⁶ Рак, аллергии, инфекционные и аутоиммунные заболевания, гепатиты, циррозы печени и др.

ионной силы, концентрации солей. При изменении этих условий происходит диссоциация образовавшихся комплексов. Поэтому нам представляется более вероятным, что жидкокристаллические структуры образованы только молекулами IgM. Прямая проверка этого предположения, например, с помощью флуоресцирующих диагностических иммуноглобулинов довольно затруднительна и требует разработки новых методических подходов. Косвенным подтверждением нашего предположения может служить исследование сыворотки крови больного болезнью Вальденстрема, при которой единственным вырабатываемым иммуноглобулином является функционально неполноценный IgM. Еще в жидком состоянии сыворотка в пробирке разделялась на две прозрачные фазы: менее плотную верхнюю и более плотную нижнюю. При высыхании обеих фракций интересующие нас кристаллы мы нашли только в нижней, а также в цельной сыворотке после ее тщательного перемешивания (рис. 3, *a*). В сыворотке крови больного парапротеинемическим гемобластозом, содержащей единственный иммуноглобулин IgG, эти кристаллы отсутствовали.

Таким образом, вероятное мезофазное состояние IgM в жидкой сыворотке, по-видимому, свидетельствует о его

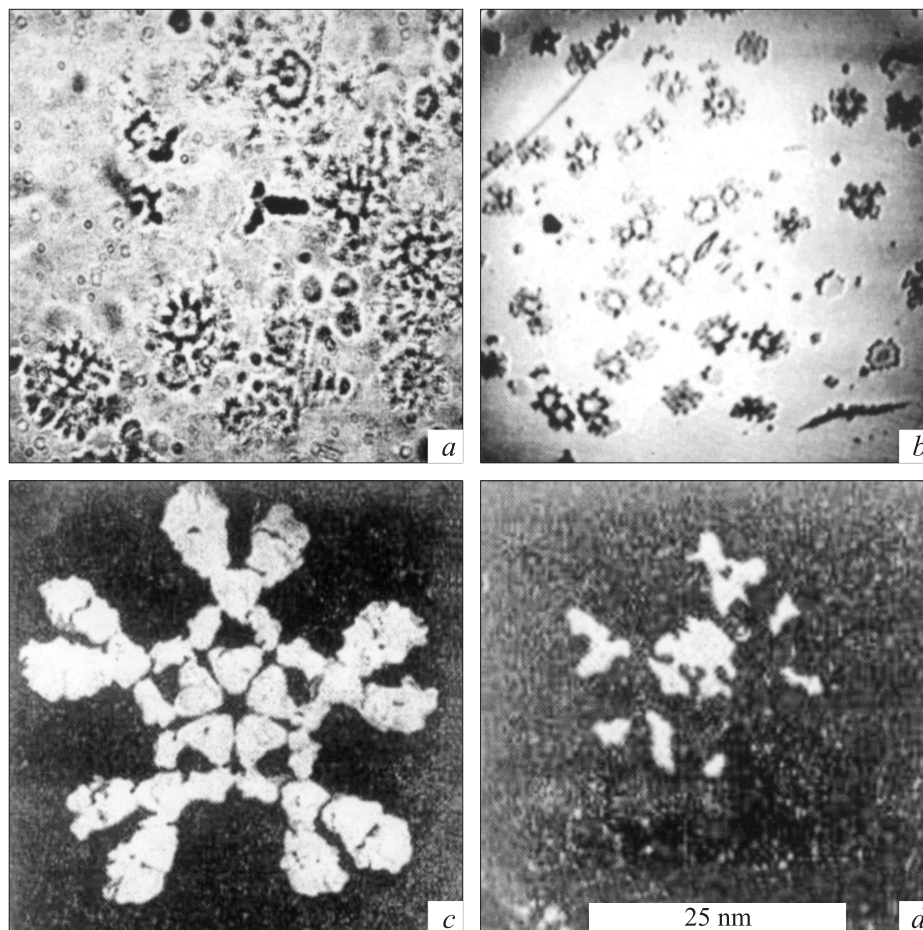


Рис. 3. Кристаллы белка в высохшей сыворотке крови (0.5 ml) и молекула IgM: *a* — больной болезнью Вальденстрема (ув.×600); *b* — больной вирусным гепатитом В и хроническим гепатитом С (ув.×600); *c* — макет молекулы IgM (из работы [6]); *d* — молекула IgM под электронным микроскопом (из работы [6]).

иммунологически неактивной форме, поскольку функция антител реализуется на молекулярном уровне. Это обстоятельство также может являться звеном в цепи патогенеза синдрома эндогенной интоксикации [13-15].

В работе [16] представлены данные микрокалориметрического исследования, свидетельствующего о независимой тепловой денатурации альбумина и γ -глобулинов в составе цельной сыворотки крови доноров. Энтальпия денатурации γ -глобулинов более чем вдвое превышала энтальпию денатурации альбумина. Те же авторы выявили зависимость параметров тепловой денатурации белков от физиологического состояния организма обследуемых [17]. Это не противоречит представлению о мезофазном состоянии γ -глобулинов, требующем большего количества энергии для расплавления молекул в составе жидкого кристалла, и согласуется с нашими представлениями о существовании нескольких переходов между разными фазовыми состояниями в многокомпонентной жидкой среде при воздействии денатурирующего агента (повышения температуры, дегидратации и др.).

Процедура замораживания-оттаивания жидкой плазмы или сыворотки крови больных и женщин в ранний

послеродовый период приводила к увеличению площади капли на стекле в среднем на 24%. Таким же эффектом сопровождалось воздействие на сыворотку крови больных *in vitro* вихревым магнитным полем [4], волнами миллиметрового диапазона (КВЧ), светом He-Ne лазера (собственные неопубликованные данные). Эти факты говорят об однотипном изменении физических свойств биожидкости независимо от природы воздействующего агента, что может быть связано с изменением жидкокристаллической фазы белков: расплавлением макроструктур, возвращающим антителам их функциональную активность, и повышением их клиренса (вывода из сосудистого русла). На высокой чувствительности жидких кристаллов к термическим воздействиям и внешним электрическим полям основано также их применение в технике [18]. Возможность реализации терапевтических физиопроцедур через жидкокристаллические белковые макроструктуры, наблюдаемые в плазме больных людей, позволяет объяснить пороговый характер воздействия облучения He-Ne лазером, а также отсутствие эффекта от облучения после выздоровления пациентов [19].

Таким образом, возможно, присутствие в сыворотке (плазме) крови больных людей 3-мерных регулярных жидкокристаллических структур связано с гиперпродукцией IgM в условиях эндогенной интоксикации, т.е. присутствия в крови токсических метаболитов, способных изменить фазовое состояние глобулярных белков. Это влечет за собой сбой каскада защитно-приспособительных реакций организма. В таком случае применение детоксикационных мероприятий, в том числе физиотерапевтических воздействий, может влиять на состояние больных через изменение фазового состояния биожидкостей.

Проблема фазового состояния белка при физиологических и патологических процессах представляет собой перспективную область исследования как для фундаментальной науки, так и для практической медицины. По-видимому, здесь в ближайшие годы можно ожидать новые результаты, которые позволят расширить существующие знания в области „жидкокристаллического патогенеза“ и разработать новые подходы к проведению патогенетической терапии заболеваний, сопровождающихся этим феноменом.

Авторы выражают глубокую признательность сотрудникам исследовательских и лечебных учреждений Нижнего Новгорода, предоставившим материал для работы: профессорам Г.Я. Левину, О.В. Корочкиной, Н.А. Егоровой, главным врачам М.М. Шептун, Т.А. Кочетковой и Н.С. Антоновой. Нашу искреннюю благодарность адресуем также заведующему лабораторией автоволновых процессов Института прикладной физики РАН В.Г. Яхно и заведующему лабораторией иммунохимии Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии В.В. Немову за обсуждение экспериментальных данных и ценные замечания по содержанию работы.

Работа выполнена при частичной поддержке грантов РФФИ (№ 01-01-00388 и 02-04-49342).

Список литературы

- [1] *Rapis E.G.* // ЖТФ. 2002. Т. 72. Вып. 4. С. 139–142.
- [2] *Rapis E.G., Gasanova G.Yu.* // Zh. Tech. Fis. April 1991. P. 406–412.
- [3] *Rapis E.G.* // Pis'ma Zh. Tekh. Fiz. 1995. May 12. P. 321–324.
- [4] *Шабалин В.Н., Шатохина С.Н.* Морфология биологических жидкостей человека. М., 2001. 300 с.
- [5] *Яхно Т.А., Яхно В.Г., Левин Г.Я.* и др. // Материалы 4-й Междунар. конф. по математическому моделированию. М.: МГТУ „Станкин“, ИММ РАН, 2000. Т. 2. С. 265–275.
- [6] *Глинн Л., Стюард М.* Структура и функции антител. М.: Мир, 1983. С. 176.
- [7] *Кузник Б.И., Васильев Н.В., Цыбиков Н.Н.* Иммуногенез, гемостаз и неспецифическая резистентность организма. М.: Медицина, 1989. 320 с.
- [8] *Амосов А.Д.* Гепатит В. Кольцово: Вектор Брест, 1998. 81 с.
- [9] *Милиц Р.И., Скопинов С.А., Яковлева С.В.* и др. // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 1989. № 6. С. 35–37.
- [10] *Notarangelo L.D., Duse M., Wgario A.G.* // Immunodef. Rev. 1992. N 3. P. 101–122.
- [11] *Levy J., Espanol-Boren T., Thomas C.* et al. // J. Pesiat. 1997. Vol. 131. P. 47–54.
- [12] *Хаитов Р.М., Игнатъев Г.А., Сидорович И.Г.* Иммунология. М.: Медицина, 2000. 430 с.
- [13] *Макарова Н.П., Коничева И.Н.* // Анестезиология и реаниматология. 1995. № 6. С. 4–6.
- [14] *Долгушин И.И., Эберт Л.Я., Лифшиц Р.И.* Иммунология травмы. Свердловск, 1989. 269 с.
- [15] *Ерюхин И.А., Шашков Б.В., Лебедев В.Ф.* и др. Эндотоксикоз при тяжелой механической травме. Детоксикационная терапия при травматической болезни и острых хирургических заболеваниях. Л., 1989. С. 9–16.
- [16] *Хачидзе Д.Г., Монаселидзе Д.Р.* // Биофизика. 2000. Т. 45. Вып. 2. С. 325–328.
- [17] *Хачидзе Д.Г., Монаселидзе Д.Р.* // Биофизика. 2000. Т. 45. Вып. 2. С. 320–324.
- [18] *Жаркова Г.М., Сонин А.С.* Жидкокристаллические композиты / Под ред. В.П. Шибяева. Новосибирск: Наука, 1994.
- [19] *Yakhno T.* // Proc. Intern. Workshop on Nonlinear Dynamics and Structures in Biology and Medicine: Optical and Laser Technologies. Saratov (Russia), 1996. Vol. 3053. P. 172–182.