

ДИАГНОСТИКА ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА ПО ВЫСОХШЕЙ КАПЛЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ

Ж. И. БУЛОЙЧИК¹⁾, Г. Т. МАСЛОВА¹⁾, Н. И. НЕЧИПУРЕНКО²⁾, И. Д. ПАШКОВСКАЯ²⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь

²⁾Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии,
ул. Ф. Скорины, 24, 220114, г. Минск, Республика Беларусь

Исследована морфология высохших капель образцов крови, плазмы крови и спинномозговой жидкости больной с онкопатологией. Выявлены структурные особенности высохших капель. Получены количественные результаты пространственного распределения кальция по поверхности высохших капель этих биологических жидкостей, а также в слоях путем использования метода лазерной атомно-эмиссионной спектроскопии. Показано, что данный метод дает возможность количественно оценить изменения в белковых центрах и является оперативным высокочувствительным инструментом в диагностике заболеваний. Полученные экспериментальные данные могут служить основой для дальнейшей разработки методологии ранней диагностики нарушения уровня функциональных резервов организма и выработки системы реабилитационных мероприятий.

Ключевые слова: биологическая жидкость; морфология капли; лазерная атомно-эмиссионная спектроскопия; двоянные лазерные импульсы; пространственное распределение; послойный анализ; кальций.

DIAGNOSTICATION OF HUMAN PATHOLOGIES BY DRIED DROPS OF BIOLOGICAL FLUIDS

J. I. BULOICHIK^a, G. T. MASLOVA^a, N. I. NECHIPURENKO^b, I. D. PASHKOVSKAYA^b

^aBelarusian State University, Nezavisimosti avenue, 4, 220030, Minsk, Republic of Belarus

^bRepublican Research-Practical Center of Neurology and Neurosurgery,
F. Skoriny street, 24, 220114, Minsk, Republic of Belarus

The morphology of a dried drop of blood, blood plasma, and cerebrospinal fluid from a patient with oncopathology has been studied. The structural features of dried drops have been revealed. The quantitative results for the spatial distribution of calcium on the surface of the dried drop of a biological fluid and within the layers have been obtained using the laser atomic-emission spectroscopy method. It has been shown that this method enables one to estimate quantitatively the changes at the albuminous centers and may be an efficient highly-sensitive instrument in diagnostication of various diseases. The obtained experimental data form the basis for further development of the early diagnostication technique for disturbances in functional reserves of human organisms with an adequate system of rehabilitation measures.

Key words: biological fluid; drop morphology; laser atomic-emission spectrometry; double laser pulses; layer-by-layer analysis; calcium.

Образец цитирования:

Булойчик Ж. И., Маслова Г. Т., Нечипуренко Н. И., Пашковская И. Д. Диагностика патологии человека по высохшей капле биологической жидкости // Вестн. БГУ. Сер. 1, Физика. Математика. Информатика. 2016. № 2. С. 32–40.

For citation:

Buloichik J. I., Maslova G. T., Nechipurenko N. I., Pashkovskaya I. D. Diagnostication of human pathologies by dried drops of biological fluids. *Vestnik BGU. Ser. 1, Fiz. Mat. Inform.* 2016. No. 2. P. 32–40 (in Russ.).

Авторы:

Жанна Игнатьевна Булойчик – кандидат химических наук; старший научный сотрудник кафедры физической оптики физического факультета.

Галина Трофимовна Маслова – кандидат биологических наук; доцент кафедры физиологии человека и животных биологического факультета.

Наталья Ивановна Нечипуренко – доктор медицинских наук, профессор; заведующий лабораторией клинической патофизиологии нервной системы.

Ирина Дмитриевна Пашковская – кандидат биологических наук; старший научный сотрудник.

Authors:

Janne Buloichik, PhD (chemistry); senior researcher at the department of physical optics, faculty of physics.

zajogin_an@mail.ru

Galina Maslova, PhD (biology); associate professor at the department of human and animal physiology, faculty of biology.

Nataliya Nechipurenko, doctor of science (medical sciences), full professor; head of the laboratory of clinical pathophysiology of nervous system.

prof_nin@mail.ru

Irina Pashkovskaya, PhD (biology); senior researcher.

До настоящего времени выявление связи между патологическими процессами, протекающими в организме человека, и изменением физических и физико-химических свойств биологических жидкостей (БЖ), вызванным этими процессами, остается фундаментальной научной проблемой, на решение которой направлены серьезные исследования многих ученых.

Сделаны значительные шаги в использовании методик анализа высыхающей капли БЖ в диагностических целях. Метод клиновидной дегидратации нашел широкое применение в экспресс-диагностике и позволяет на основании анализа структур высохшей капли БЖ выявлять различные патологии [1].

Процессы самоорганизации в естественных и модельных БЖ изучались многими авторами [2, 3]. Современное состояние исследований и обобщенная картина процессов, протекающих при дегидратационной самоорганизации БЖ, приведены в работе [4].

Подробно изучены динамические параметры фазовых переходов в высыхающих каплях БЖ методом регистрации акустомеханического импеданса, который позволяет уловить возникновение новой фазы в высыхающей капле жидкости путем измерения изменения ее электрической проводимости. Показано, что степень повреждения белка влияет на кинетические параметры кристаллизации соли в белково-солевых растворах и отражает физико-химические особенности структуризации высыхающей капли [5].

Известна взаимосвязь фазовых переходов солей и физических свойств геля, зависящих от концентрации и качества макромолекул, а также от концентрации низкомолекулярных органических компонентов раствора. Эти процессы обратимы, и во многих случаях возможно вернуть физические свойства БЖ с помощью терапевтических процедур [6].

Поскольку при патологических процессах происходит изменение фазового состояния белка, выявлены достаточно четкие зависимости типа *вид наблюдаемых структур – патологический процесс*. И хотя в последнее время появилось множество работ, показывающих, что развитие самых разнообразных патологических процессов в организме сопровождается изменением распределения коллоидных частиц и солей БЖ, что сказывается на изменении морфоструктур высохших капель, до сих пор практически отсутствуют количественные оценки образующихся структур. Сегодня нет модели, которая бы одновременно учитывала оба фактора.

Цель настоящей работы – изучение процесса структурирования высыхающей капли БЖ, а также полуколичественная оценка пространственного распределения некоторых эссенциальных элементов (ЭЭ) как по поверхности высохшей капли, так и по слоям.

Ранее нами разработаны методики количественного определения ЭЭ в каплях БЖ, высохших на пористой и твердой поверхности, способом лазерной атомно-эмиссионной спектроскопии (ЛАЭМС). Найден эмпирический коэффициент, равный 3, связывающий интенсивности линий анализируемых элементов в высохших каплях, позволяющий хорошо корректировать результаты количественных определений [7–9].

Применение осадочной хроматографии обусловило значительное повышение чувствительности при определении содержания тяжелых металлов (цинк, алюминий, железо) в биообразцах методом ЛАЭМС [7].

Комплексное изучение динамики структурирования высыхающей капли БЖ и пространственного распределения кальция, магния и алюминия по поверхности высохшей капли БЖ позволило в ряде случаев уточнить диагноз онкологических больных для своевременной корректировки лечения [9, 10].

В настоящей работе приведены результаты исследования структур высохших на твердой поверхности капель крови, плазмы крови и спинномозговой жидкости (СМЖ) (ликвора) пациентки с диагнозом «фиброзная мастопатия молочной железы». Изучены динамика структурирования высыхающих капель и морфология высохшей капли.

Методика эксперимента

Каплю БЖ объемом 10 мкл наносили на обезжиренную пластинку оргстекла, высушивали при комнатной температуре в течение 90–100 мин. Динамику структурирования изучали с 35–40-й мин, делая снимки через каждые 5 мин до полного высыхания капли. Процесс сушки проводили в открытой системе при температуре 20–22 °С. Диаметр высохшей капли равен примерно 6 мм.

Для получения снимков высохших капель крови использовали оптический микроскоп Webbers, совмещенный с цифровой камерой (отраженный свет), и микроскоп Биолам со светодиодной подсветкой (на пропускание) и веб-камерой. Оба микроскопа имеют видеонасадки, работающие с компьютером по USB-2 порту.

Для полуколичественной оценки локального пространственного распределения кальция по поверхности и слоям высохшей капли в работе использовали лазерный многоканальный атомно-эмиссионный спектрометр LSS-1. Лазерное излучение фокусируется на образец с помощью ахроматического

конденсора с фокусным расстоянием 100 мм. Размер пятна фокусировки – примерно 50 мкм. Все эксперименты проводили в атмосфере воздуха при нормальном атмосферном давлении. Анализировали суммарные результаты действия 5 последовательных сдвоенных лазерных импульсов (СЛИ). Энергия лазерного излучения составляла 34 мДж (1-й и 2-й импульсы соответственно), временной интервал между сдвоенными импульсами – 8 мкс. Абляция осуществлялась через 0,6 мм. Размер точки повреждения – примерно 0,10–0,15 мм. По диаметру пробы анализ проводили в 8 точках поверхности.

Результаты эксперимента и их обсуждение

Снимки высохших на твердой поверхности после 90 мин сушки капель образцов крови и плазмы крови пациентки до и после операции, а также снимок образца СМЖ (до операции) приведены на рис. 1.

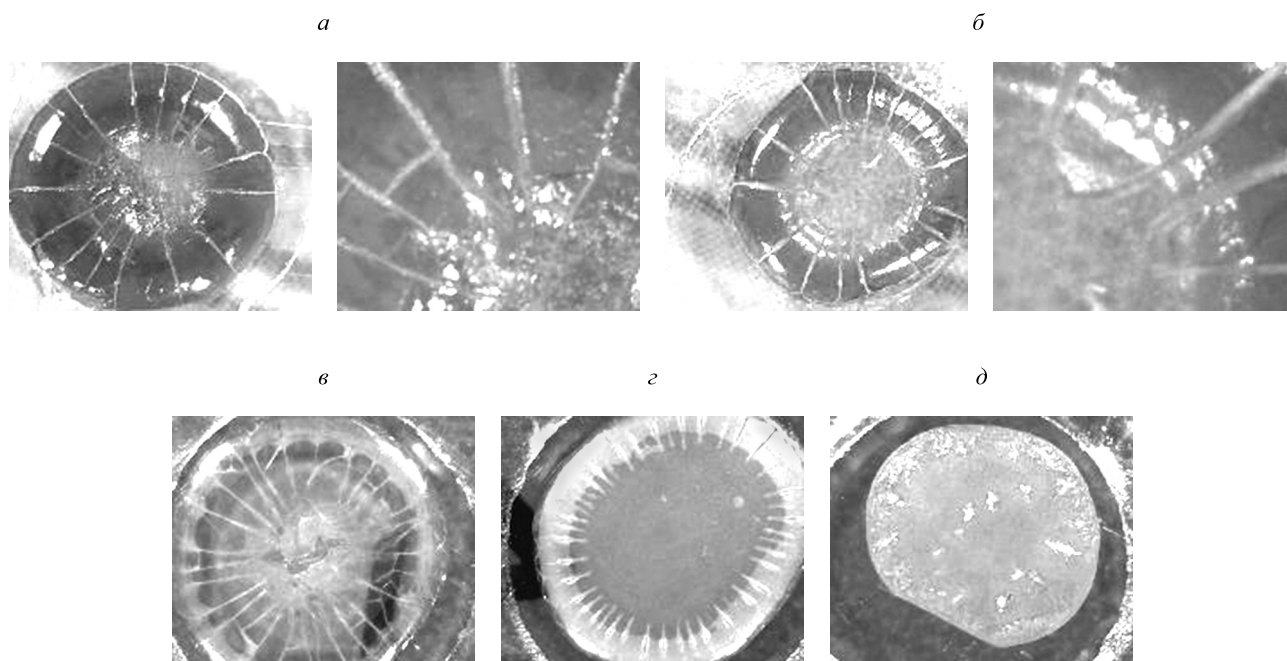


Рис. 1. Снимки высохших капель образцов крови (*а* – до операции, *б* – после операции); образцов плазмы крови (*в* – до операции, *з* – после операции); образца ликвора (*д*)

На увеличенных в 3 раза снимках фрагментов высохших капель крови пациентки до и после операции видны различия. В высохшей капле крови пациентки до операции (см. рис. 1, *а*) заметно присутствие конгломератов в центре капли, которые исчезают после операции (см. рис. 1, *б*). Во всех анализируемых высохших каплях крови видно наличие белкового валика с радиальным растрескиванием. Заметно, что после проведения операции радиальное растрескивание капли становится более упорядоченным, характерным для здорового человека.

Такая упорядоченность и четкое радиальное растрескивание после операции особенно наглядно видны в высохшей капле плазмы крови (см. рис. 1, *з*). Картина изменений морфологии в этом случае гораздо выразительнее. Вероятно, более значительные изменения структуры капли после операции связаны с физиологическим составом плазмы, в которой отсутствуют форменные элементы.

Что касается СМЖ, то в структуре ее высохшей капли (см. рис. 1, *д*) не проявляются трещины, видны только отдельные локальные сгустки. Это хорошо согласуется с молекулярным составом СМЖ, в которой почти 99 % приходится на воду.

Известно, что все случайные колебания в составе крови в здоровом организме быстро выравниваются. При патологических процессах, наоборот, отмечаются более или менее резкие сдвиги в химическом составе крови. Поэтому наряду с визуальной оценкой морфологии капли более корректную информацию о физиологических процессах может дать количественная оценка пространственного распределения ЭЭ в высохшей капле.

Связь между изменением морфологии капли и локальным пространственным распределением кальция по поверхности и слоям высохшей капли оценивали, используя метод ЛАЭМС для количественного определения элемента. Кальций выбран для анализа, поскольку он – один из самых необходимых

элементов в организме. Более того, известно, что кальций является наиболее активным коацерватом в белковой среде и легко образует связи с amino- и карбоксильными группами белковых молекул.

Результаты количественного определения кальция Ca II (393,366 нм) по двум перпендикулярным диаметрам на поверхности высохшей капли и по слоям приведены на рис. 2. Представлены данные интенсивности послыстного содержания (I) (5 слоев) в каждой анализируемой точке и суммарное распределение элемента по диаметрам.

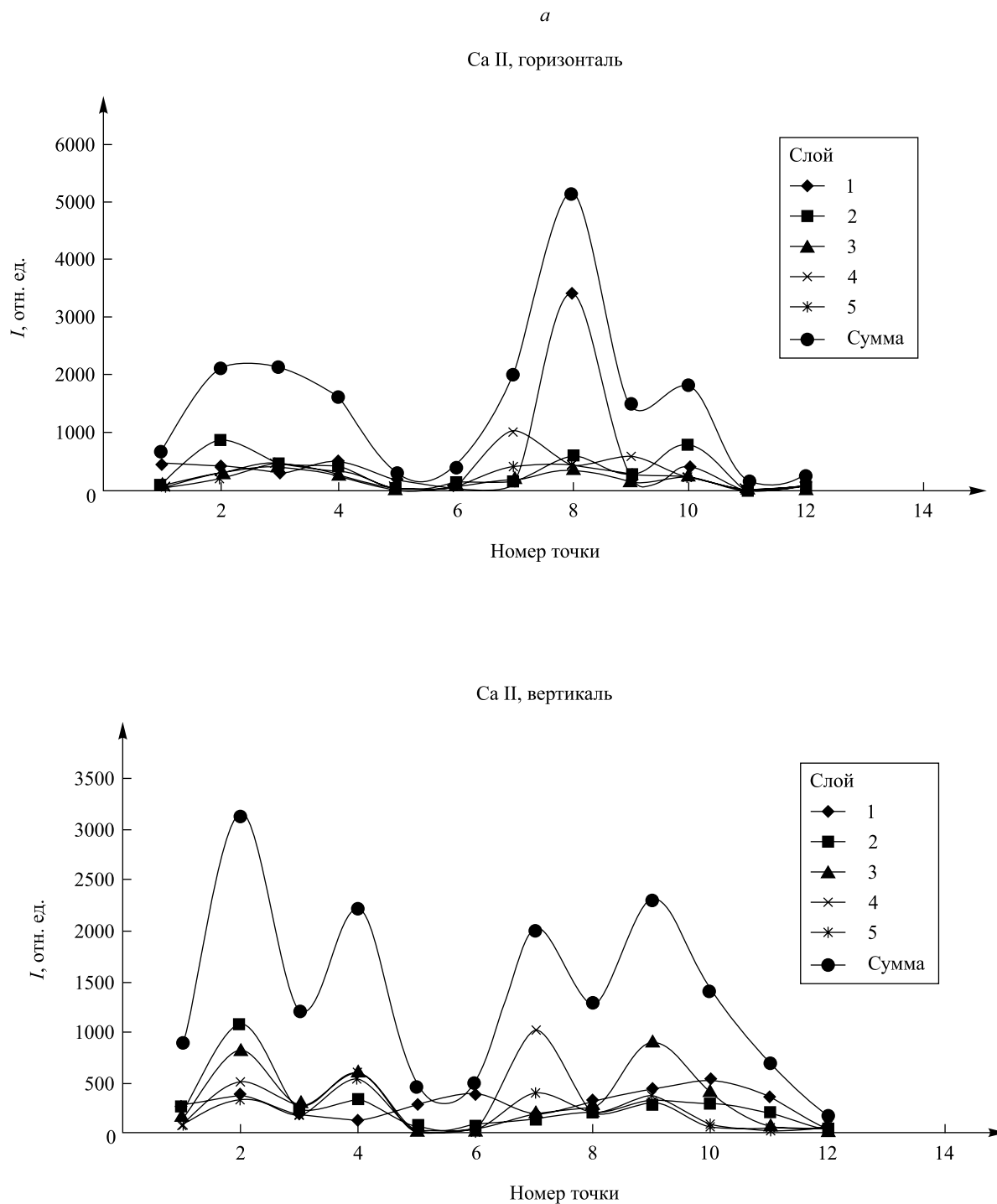
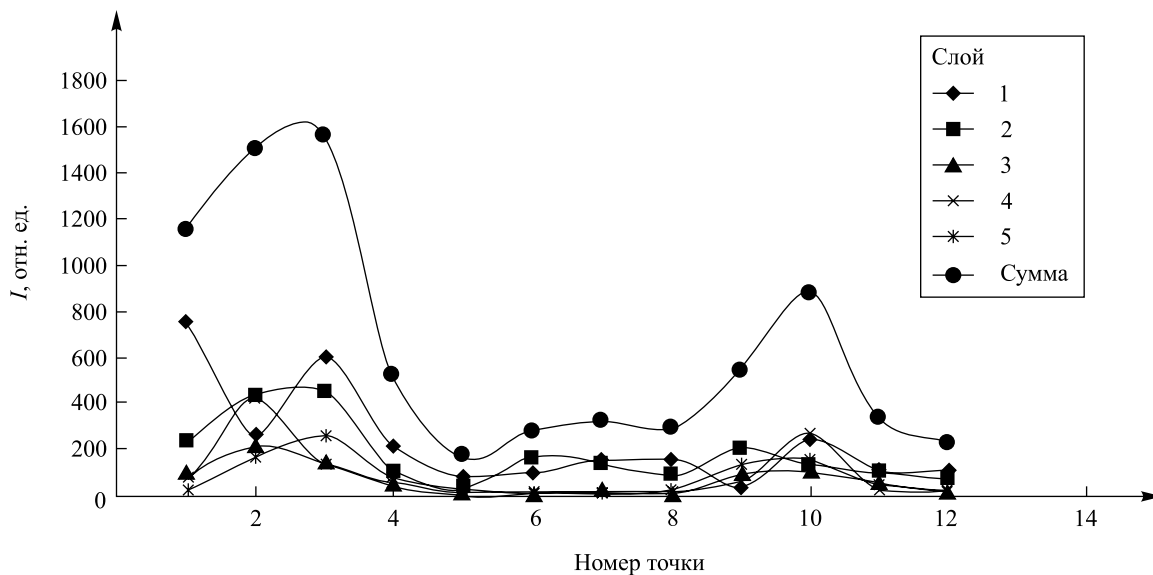


Рис. 2. Интенсивность линии Ca II в атомно-эмиссионных спектрах высохших капель образцов крови: *a* – до операции (окончание см. на с. 36)

б

Ca II, горизонталь



Ca II, вертикаль

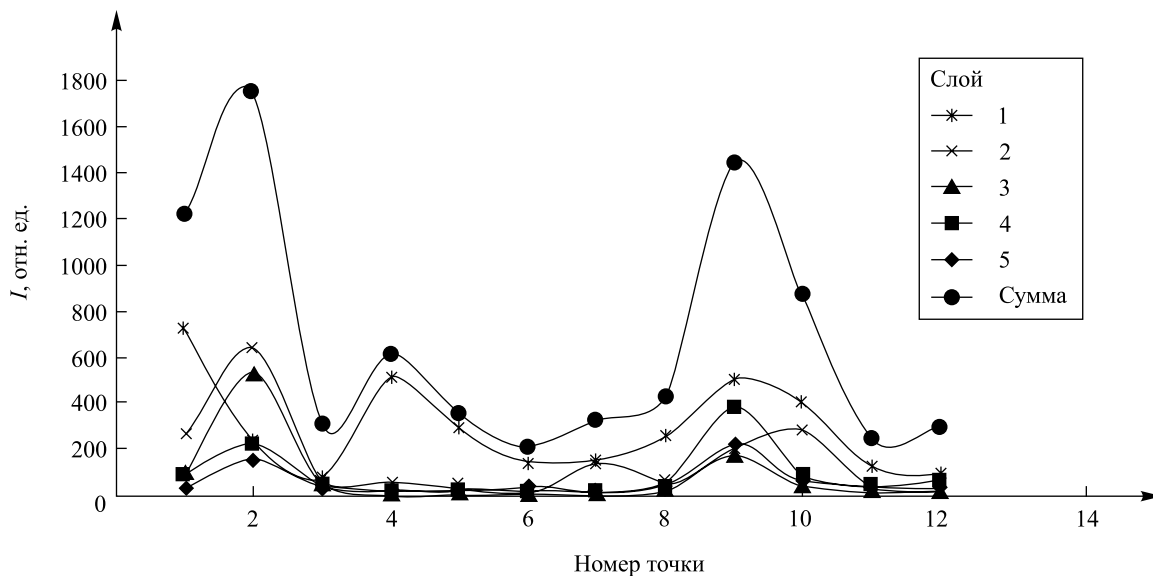


Рис. 2. Окончание (начало см. на с. 35): б – после операции

В высохшей капле крови пациентки до операции наблюдается неравномерное распределение кальция с большими скачками концентраций по всей поверхности капли. Значительный разброс заметно нивелируется после операции, происходит существенное выравнивание концентраций с явным превалированием его содержания по краям капли, где расположен белковый валик, что напоминает распределение кальция в высохшей капле БЖ здорового человека.

Не менее показательны результаты пространственного распределения кальция в высохшей капле плазмы крови. Интенсивности послыоного содержания и пространственного распределения кальция в высохшей капле плазмы крови до и после операции приведены на рис. 3.

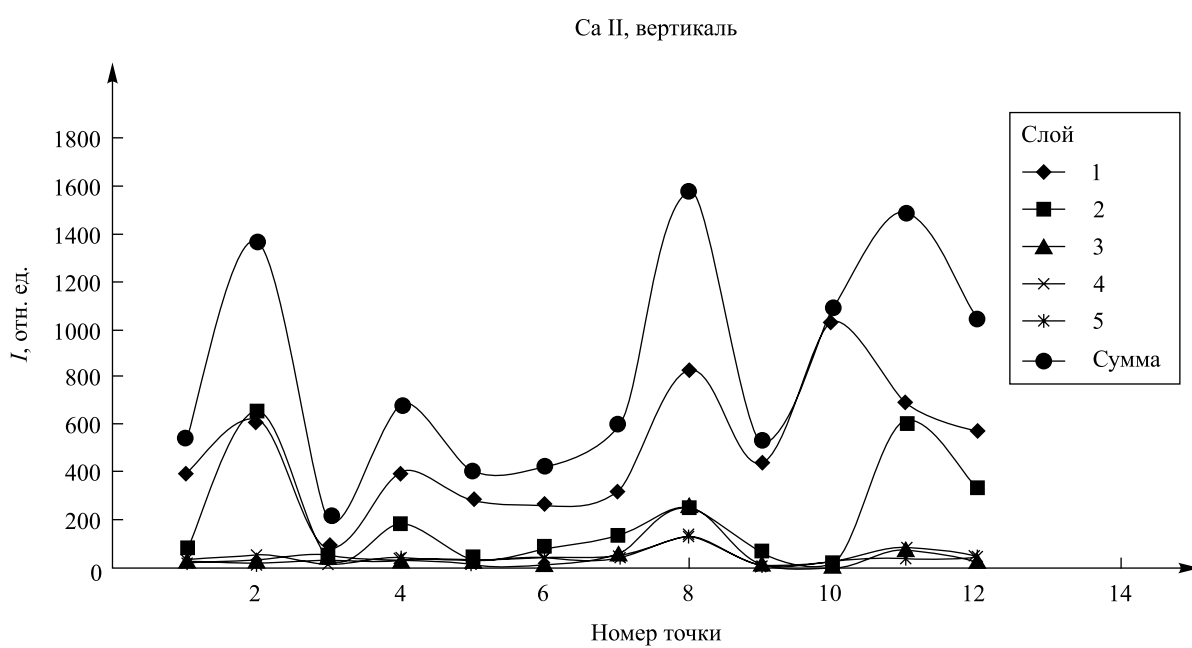
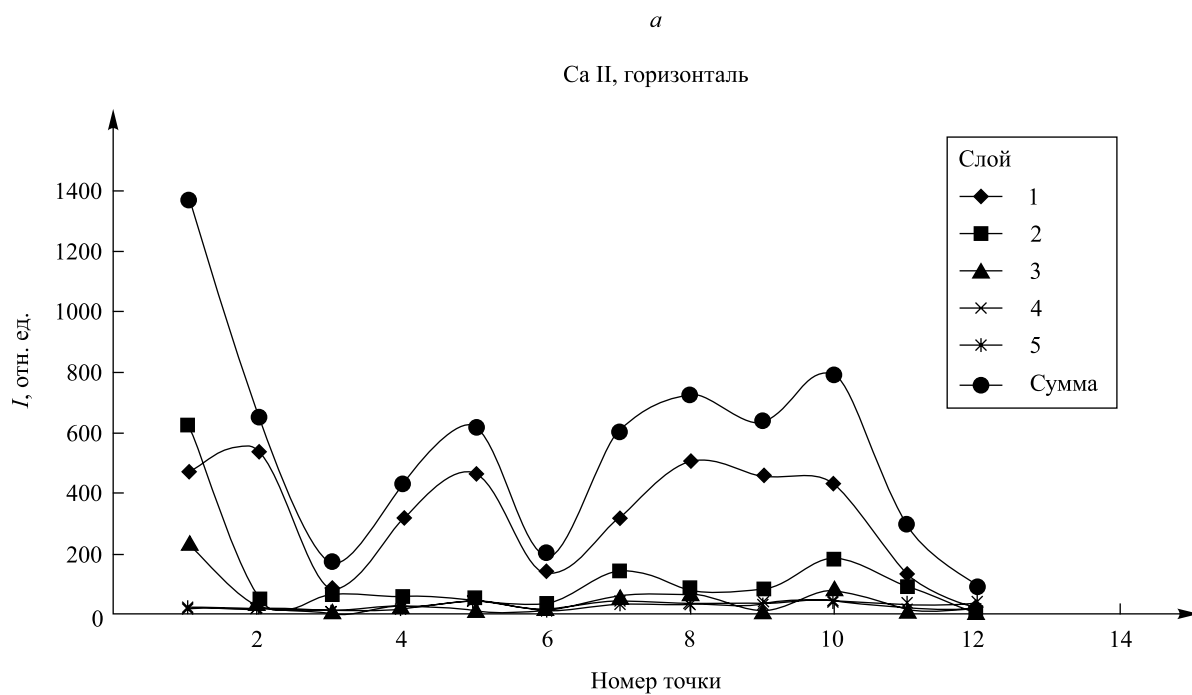
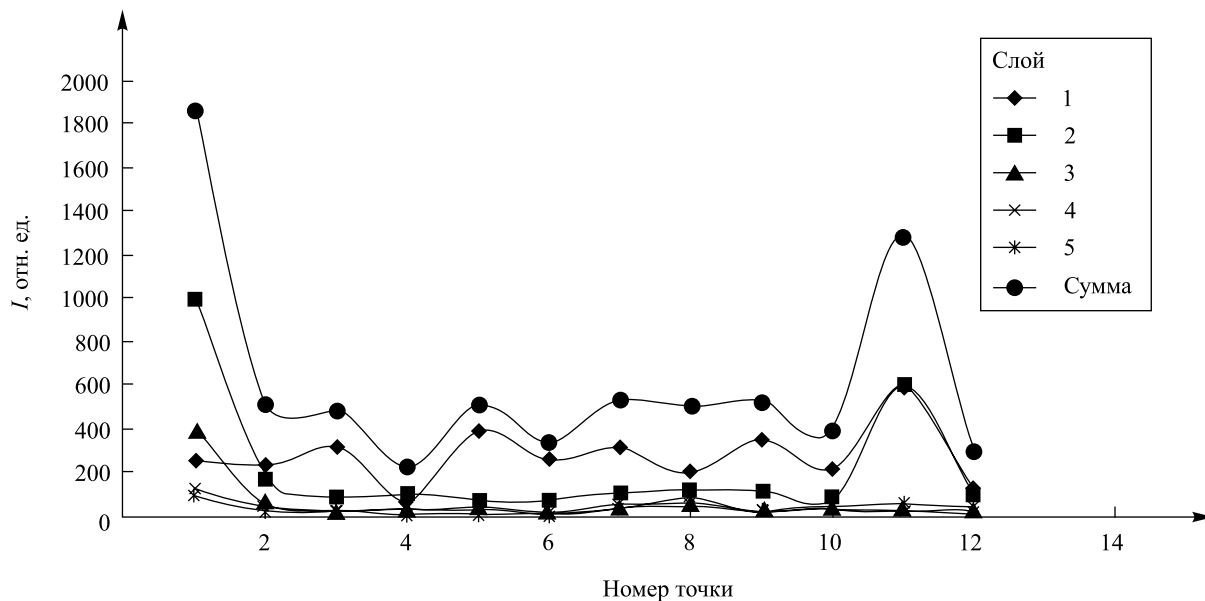


Рис. 3. Интенсивность линии Ca II в атомно-эмиссионных спектрах высохших капель образцов плазмы крови: *a* – до операции (окончание см. на с. 38)

б

Са II, горизонталь



Са II, вертикаль

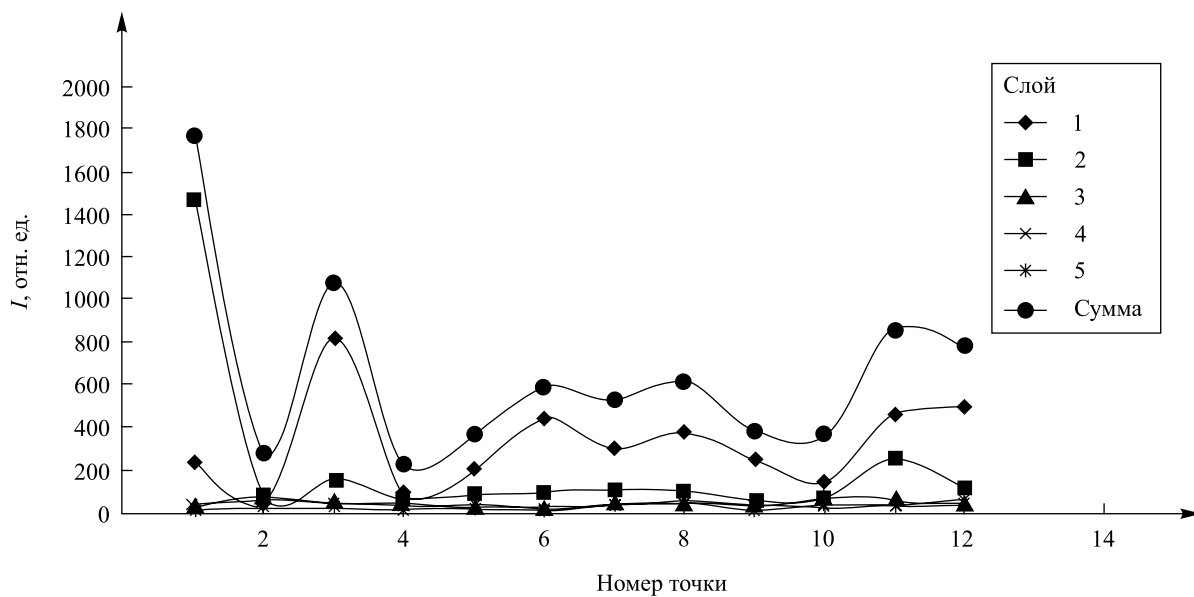


Рис. 3. Окончание (начало см. на с. 37): б – после операции

После проведения хирургической операции в высохшей капле плазмы крови пациентки, как и в крови, происходит выравнивание концентрации кальция по всей поверхности капли с максимальным его содержанием в краевой зоне.

Нами также изучено пространственное распределение кальция в высохшей капле СМЖ до операции. Результаты исследования представлены на рис. 4.

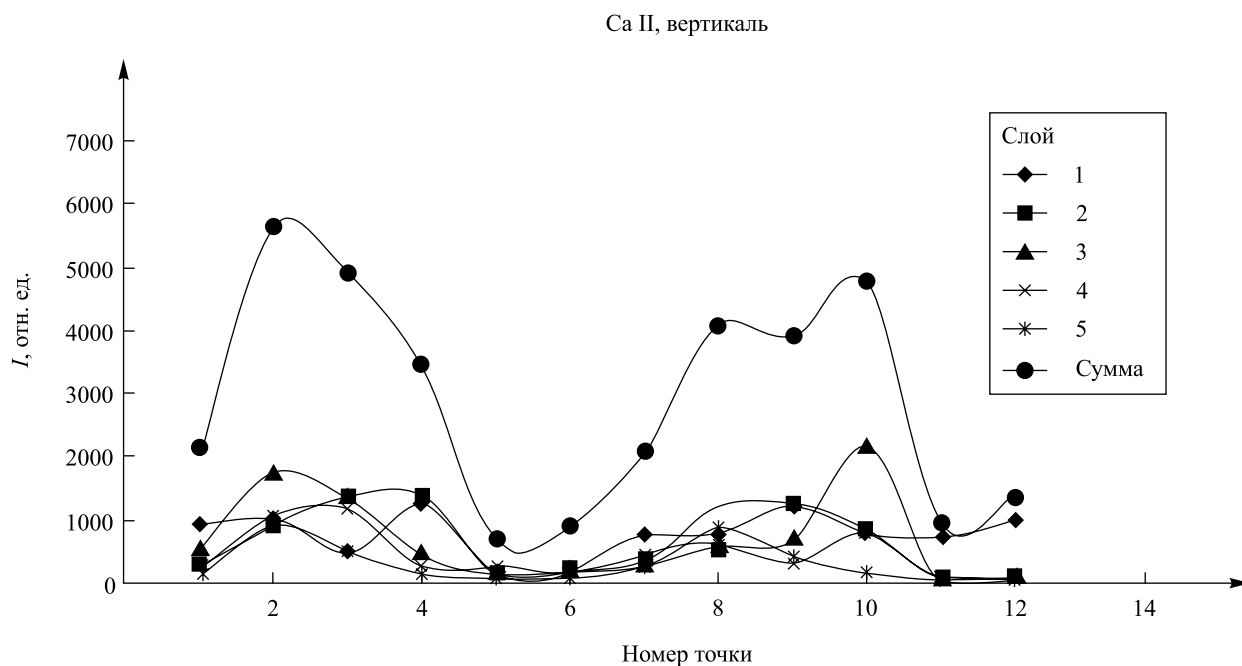
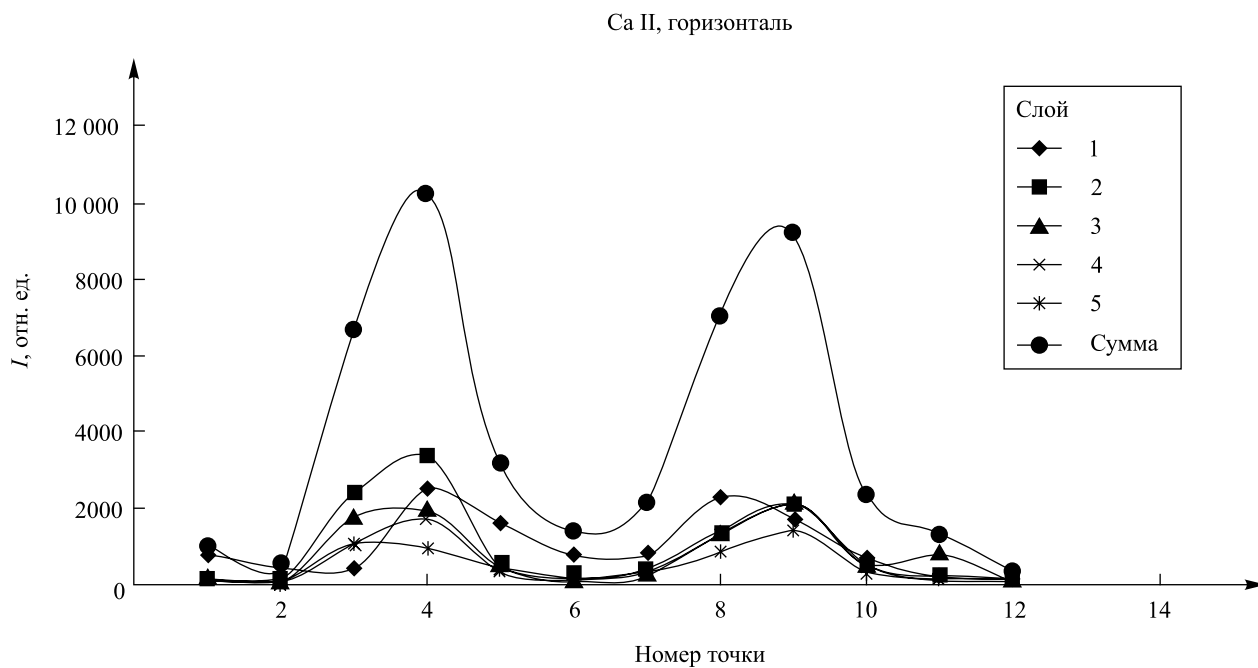


Рис. 4. Интенсивность линии Ca II в атомно-эмиссионных спектрах высохших капель образцов СМЖ (до операции)

Высокая интенсивность линии кальция наблюдается на всей площади высохшей капли, за исключением ее края и провала в центре. Ввиду того что СМЖ содержит очень мало белка, край валика оказывается практически без кальция, вероятнее всего, из-за быстрого испарения воды. Вследствие дегидратации в подвижной среде при наличии активных капиллярных течений белок образует коацерваты, легко захватывая катионы кальция, что приводит к их быстрому выносу из центра капли.

Итак, следует отметить общую тенденцию в изменении локального пространственного распределения кальция по поверхности высохшей капли всех исследованных БЖ. До лечения наблюдается большой разброс интенсивности линий кальция при пространственном определении его в анализируемых БЖ. После проведения лечения происходит выравнивание концентрации кальция по всей поверхности высохшей капли с заметным увеличением его содержания в краевой зоне белкового валика.

Таким образом, количественная оценка пространственного распределения кальция в высохшей капле крови или плазмы крови с использованием метода ЛАЭМС является высокочувствительным, оперативным и достоверным индикатором физиологического состояния организма, что может широко использоваться в медицине как при постановке предварительного клинического диагноза, так и для корректировки лечения.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК (REFERENCES)

1. Шабалин В. Н., Шатохина С. Н. Морфология биологических жидкостей человека. М., 2001.
2. Гольбрайх Е., Рapis Е. Г., Моисеев С. С. О формировании узора трещины в свободно высохшей пленке водного раствора белка // ЖТФ. 2003. Т. 73, вып. 10. С. 17–23 [Holbreich E., Rapis E. G., Moiseev S. S. On the formation of the crack pattern in freely drying film of an aqueous solution of albumin. *Zhurnal Tekhnicheskoi Fiz. = Tech. Phys.* 2003. Vol. 73, issue 10. P. 17–23 (in Russ.)].
3. Тарасевич Ю. Ю. Качественный анализ закономерностей высыхания капли многокомпонентного раствора на твердой подложке // ЖТФ. 2007. Т. 77, вып. 2. С. 17–22 [Tarasevich Y. Y. Qualitative analysis of the regularities in drying of the drop of a multicomponent solution on the solid substrate. *Zhurnal Tekhnicheskoi Fiz. = Tech. Phys.* 2007. Vol. 77, issue 2. P. 17–22 (in Russ.)].
4. Тарасевич Ю. Ю. Механизмы и модели дегидратационной самоорганизации биологических жидкостей // УФН. 2004. Т. 174, № 7. С. 779–790 [Tarasevich Y. Y. Mechanisms and models for the dehydration self-organization of biological fluids. *Phys. Usp. = Adv. Phys. Sci.* 2004. Vol. 174, No. 7. P. 779–790 (in Russ.)].
5. Яхно Т. А., Яхно В. Г., Санин А. Г., Санина О. А., Пелюшенко А. С. Белок и соль: пространственно-временные события в высохшей капле // ЖТФ. 2004. Т. 74, вып. 8. С. 100–108 [Yakhno T. A., Yakhno V. G., Sanin A. G., Sanina O. A., Pelyushenko A. S. Albumin and salt: space-time events in the drying drop. *Zhurnal Tekhnicheskoi Fiz. = Tech. Phys.* 2004. Vol. 74, issue 8. P. 100–108 (in Russ.)].
6. Яхно Т. А., Седова О. А., Санин А. Г., Пелюшенко А. С. О существовании регулярных структур в жидкой сыворотке (плазме) крови человека и фазовых переходах в процессе ее высыхания // ЖТФ. 2003. Т. 73, вып. 4. С. 23–27 [Yakhno T. A., Sedova O. A., Sanin A. G., Pelyushenko A. S. About the existence of the regular structures in a liquid human-blood serum (plasma) and the phase transitions in the process of its drying. *Zhurnal Tekhnicheskoi Fiz. = Tech. Phys.* 2003. Vol. 73, issue 4. P. 23–27 (in Russ.)].
7. Патапович М. П., Хоанг Чинь Нгок, Пашиковская И. Д., Ань Лэ Тхи Ким, Булойчик Ж. И., Зажогин А. П. Разработка методик повышения чувствительности определения содержания эссенциальных тяжелых металлов в биологических образцах методом лазерной атомно-эмиссионной спектроскопии // Вестн. БГУ. Сер. 1, Физика. Математика. Информатика. 2013. № 2. С. 19–23 [Patapovich M. P., Hoang Trinh Ngok, Pashkovskaya I. D., Anh Le Thi Kim, Buloichik J. I., Zajogin A. P. Development of the methods to improve detection sensitivity for the content of essential heavy metals in biological samples by laser atomic-emission spectrometry. *Vestnik BGU. Ser. 1, Fiz. Mat. Inform.* 2013. No. 2. P. 19–23 (in Russ.)].
8. Хоанг Чинь Нгок, Фам Уиен Тхи, Ань Лэ Тхи Ким, Трущенко М. Н., Булойчик Ж. И. Количественное определение содержания Ca, Mg и Al в биологических жидкостях методом лазерной атомно-эмиссионной многоканальной спектроскопии // Вестн. БГУ. Сер. 1, Физика. Математика. Информатика. 2014. № 1. С. 31–36 [Hoang Trinh Ngok, Pham Uyen Thi, Anh Le Thi Kim, Trushchenko M. N., Buloichik J. I. Quantitative estimation of Ca, Mg, and Al content in biological fluids using the laser atomic-emission spectrometry method. *Vestnik BGU. Ser. 1, Fiz. Mat. Inform.* 2014. No. 1. P. 31–36 (in Russ.)].
9. Булойчик Ж. И., Веремчук А. Н., Русско Т. А., Маслова Г. Т., Мавричев А. С. Морфологическое и спектрометрическое изучение образцов высохших капель крови онкологических больных // Вестн. БГУ. Сер. 1, Физика. Математика. Информатика. 2015. № 2. С. 24–30 [Buloichik J. I., Veremchuk A. N., Russko T. A., Maslova G. T., Mavrichev A. S. Morphological and spectrometric studies of the dried blood-drop samples of oncological patients. *Vestnik BGU. Ser. 1, Fiz. Mat. Inform.* 2015. No. 2. P. 24–30 (in Russ.)].
10. Маслова Г. Т., Веремчук А. Н., Русско Т. А., Мавричев А. С., Зажогин А. П., Булойчик Ж. И. Спектрометрический анализ в диагностике онкологических больных // Сб. науч. тр. V конгр. физиков Беларуси (Минск, 27–30 окт. 2015 г.). Минск, 2015. С. 153–154 [Maslova G. T., Veremchuk A. N., Russko T. A., Mavrichev A. S., Zajogin A. P., Buloichik J. I. Spectrometric analysis in diagnostics of oncological patients. *Sb. nauch. tr. 5th Kongr. fiz. Belarusi* (Minsk, 27–30 Oct. 2015). Minsk, 2015. P. 153–154 (in Russ.)].

Статья поступила в редколлегию 11.01.2016.
Received by editorial board 11.01.2016.