

# ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ МАКРОЭЛЕМЕНТОВ В ВЫСУШЕННЫХ КАПЛЯХ АЛЬБУМИНОВ И БЕЛКОВ МЕТОДАМИ ЛАЗЕРНОЙ АТОМНО-ЭМИССИОННОЙ МНОГОКАНАЛЬНОЙ СПЕКТРОМЕТРИИ

Н.Х. Чинь<sup>1</sup>, А.Л. Танин<sup>2</sup>, И.Д. Пашковская<sup>2</sup>, Ж.И. Булойчик<sup>1</sup>,  
Н.И. Нечипуренко<sup>2</sup>, А.П. Зажогин<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Белорусский государственный университет,  
пр. Независимости, 4, 220030, Минск, Беларусь, тел. 2095348, e-mail: [zajogin\\_an@mail.ru](mailto:zajogin_an@mail.ru)

<sup>2</sup>РНПЦ неврологии и нейрохирургии,  
ул. Ф. Скорины, 24, 220114, Минск, Беларусь

Методом лазерной атомно-эмиссионной многоканальной спектроскопии на примере локального анализа интенсивности линий Al, Ca, Mg и Zn в спектрах образцов высушенных капель яичного альбумина показана возможность оценки пространственного распределения элементов по диаметру капли. Найдено, что при увеличении концентрации элементов с большим коэффициентом диффузии (Ca) диффузия противодействует выносу их на край испаряющейся капли, в то же время вытесняя соли других элементов (Al, Fe, Zn) на периферию капли. Настоящее исследование показало, что возбуждение сдвоенными лазерными импульсами анализируемой поверхности высохшей капли белка позволяют количественно оценить распределения эссенциальных элементов по радиусу капли. Такие исследования являются весьма перспективным направлением и могут быть со временем использованы для поиска маркеров заболеваний и разработки методик выявления наличия патологических процессов на предклинической стадии болезни, что даст возможность искать причину существующего дисбаланса элементов, целенаправленно подбирать препараты или активные добавки, корректировать лечение.

## Введение

В последние десятилетия все большее приращение в медицинской диагностике находят методы исследования структур, образованных при кристаллизации солей в биологических жидкостях (плазма крови, спинномозговая жидкость, слюна и т.д.). На практике для диагностики используется метод клиновидной дегидратации биологических жидкостей, разработанный Шатохиной С.Н. и Шабалиным В.Н. [1].

На основании анализа наблюдаемых структур можно выявить патологические процессы, протекающие в организме человека. Как правило, у здорового человека наблюдается симметричный радиальный характер растрескивания образца. У человека с патологическим процессом растрескивание имеет хаотический характер; при этом могут наблюдаться различные структуры в виде бляшек, спиральных трещин, языков Арнольда, ковров Серпинского и многие другие. Не смотря на явные преимущества (исключительную простоту, позволяющую использовать метод для скрининговых обследований), метод имеет существенный недостаток – он основывается на визуальном сравнении структур, что затрудняет формализацию получаемых результатов. Поскольку механизмы самоорганизации не вполне ясны, нет возможности построить диагностику на основе анализа изменений количественных характеристик свойств биологических жидкостей (например, вязкости, поверхностного натяжения, распределения макроэлементов и т.д.). В отличие от качественных методов медицинской диагностики, основанных на эффекте дегидратационной самоорганизации и применяющихся в настоящее время, методы, опирающиеся на четкие представления о физических процессах и изменениях физико-химических свойств биологических

жидкостей, позволяют использовать в диагностике количественные характеристики.

Основным недостатком классического метода анализа является то, что процесс распознавания характера структурирования биологических жидкостей происходит качественно, а не количественно, и в большой мере зависит от опыта и навыка прочтения изображения фации у врача-исследователя. В связи с этим для выбора интегральных критериев оценки состояния организма и создания новых инструментальных методов оценки пространственного распределения неорганических солей в фации важно понимание основных закономерностей развития пространственно-временных событий в высыхающих и высохших каплях.

При высыхании капли биологической жидкости протекает множество разнообразных процессов различной природы от нано- до макроуровня. В частности, происходит перераспределение компонентов: белок накапливается преимущественно по краям капли, в то время как соль распределена по диаметру капли более или менее равномерно [2, 3]. Кристаллы солей выпадают в виде зерен, а также образуют дендриты, а биологическая компонента жидкости создает сложную лепестковую структуру. Этот метод обладает неоспоримыми достоинствами для диагностики различных заболеваний человека на доклинической стадии.

Механизмы переноса коллоидных частиц в высыхающих каплях в настоящее время достаточно хорошо изучены как теоретически, так и экспериментально [4]. Однако влияние диффузии на перемещение внутри капли молекул малого размера (соли) изучено еще недостаточно. В настоящей работе анализируется влияние количества добавленного кальция и алюминия на перераспределение ряда элементов при высыхании капли яичного альбумина.

### Основная часть

Для разработки перспективных методов оценки локального пространственного распределения макро- и микроэлементов в каплях экспериментально исследованы образцы высушенных растворов яичного альбумина с добавкой некоторых солей металлов с помощью лазерного излучения. Для проведения исследований использовался лазерный многоканальный атомно-эмиссионный спектрометр LSS-1. Спектрометр включает в себя в качестве источника возбуждения плазмы двухимпульсный неодимовый лазер с регулируемой энергией и интервалом между импульсами (модель LS2131 DM). Лазер обладает широкими возможностями как для регулировки энергии импульсов (от 10 до 80 мДж), так и временного интервала между импульсами (от 0 до 100 мкс). Лазер может работать с частотой повторения импульсов до 10 Гц и максимальной энергией излучения каждого из сдвоенных импульсов до 80 мДж на длине волны 1064 нм. Длительность импульсов  $\approx 15$  нс. Временной сдвиг между сдвоенными импульсами может изменяться с шагом 1 мкс. Лазерное излучение фокусируется на образец с помощью ахроматического конденсора с фокусным расстоянием 100 мм. Размер пятна фокусировки примерно 50 мкм. Свечение плазмы собиралось с помощью аналогичного конденсора на переднюю поверхность двух кварцевых волокон диаметром 200 мкм и направлялось на входную щель двух спектрометров типа SDH-1. Регистрация спектра проводилась с помощью ПЗС-линейки TCD 1304 AP (3648 пикселей). Запуск системы регистрации спектра осуществлялась синхронно с приходом второго импульса. Все эксперименты проводились в атмосфере воздуха при нормальном атмосферном давлении.

Динамика развития процессов абляции и поверхностного плазмообразования исследовалась методом атомно-эмиссионной многоканальной спектроскопии при воздействии сдвоенных лазерных импульсов на поверхность образцов альбумина с растворами хлорида кальция различной концентрации в атмосфере воздуха при энергии импульсов излучения 58 и 42 мДж (первый и второй импульсы соответственно) и временном интервале между сдвоенными импульсами 8 мкс.

Неразбавленный белок куриного яйца содержит 88% воды, 1% углеводов, 0,5% минеральных веществ, остальное приходится на собственный белок. Таким образом, неразбавленный белок куриного яйца представляет собой примерно 10%-ный раствор белка. Многие белки растворяются в воде, что обусловлено наличием на поверхности белковой молекулы свободных гидрофильных групп. Растворимость белка в воде зависит от структуры белка, реакции среды, присутствия электролитов. В кислой среде лучше растворяются белки, обладающие кислыми свойствами, а в щелочной – белки, обладающие основными свойствами. Яичный белок представляет собой смесь нескольких белков. Примерно 70% яичного белка составляет альбумин, который легко отделяется от глобулинов. При десятикратном разведении яичного белка дистиллированной

водой глобулины выпадают в осадок, а альбумин остается в растворе. В результате количество альбумина в растворе получается примерно равным 0,5 %. Такой раствор в дальнейшем и использовался в работе.

Капля 0,5 % раствора альбумина с добавленным определенным количеством хлорида кальция, одного из основных элементов белков, наносилась на полиэтиленовую подложку с помощью микропипетки. Объем капли составлял 10 мкл. Процесс сушки проходил при температуре 20-25 °С и относительной влажности воздуха 60-65 % в течение примерно 20-24 часов. Диаметр капель на поверхности полиэтиленовой подложки 5-7 мм. Средняя толщина примерно 0,7 мм. Использование предметного стекла в лазерном атомно-эмиссионном методе исключается из-за наличия в самом стекле большинства исследуемых элементов.

На рис. 1 представлена зависимость интенсивности линий кальция, магния, алюминия и цинка в спектрах высушенных капель альбумина при добавке хлорида кальция с концентрацией 0,1% Ca. По диаметру капли проводился анализ в 10 точках. На рисунке представлены суммарные результаты по 4 каплям.

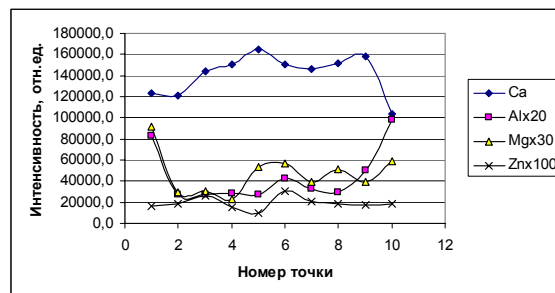


Рис 1. Интенсивность линий Ca II (393,239 нм), Mg II (279,396 нм), Al I (396,153 нм), Zn I (334,502 нм) при добавке в 0,5 % раствор альбумина 1% хлорида кальция.

Кальций в основном распределен по центру капли, а по краям уменьшается. Концентрация алюминия увеличивается преимущественно в тех областях, где концентрация кальция меньше, причем это распределение резко выражено. Так, интенсивность линии алюминия по краям примерно в 3-4 раза выше, чем по центру. Аналогичные изменения наблюдаются и для магния.

Биологические или физиологические функции алюминия изучены недостаточно. Полагают, что ионы алюминия могут конкурировать с некоторыми эссенциальными элементами, в том числе магнием, кальцием и железом. При этом они не только влияют на многие внутриклеточные процессы, но и оказывают токсическое действие на клеточную оболочку.

В связи с тем, что наибольшее влияние изменение количества кальция оказывает на распределение алюминия, то для оценки действия большого количества алюминия на распределения элементов нами проведено исследование при добавке в 0,5% альбумина 1% раствора  $AlCl_3$ . На

рис. 2 приведены распределения элементов по диаметру капли при добавке хлорида алюминия.

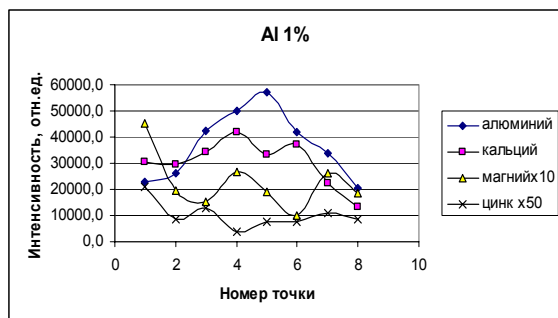


Рис. 2. Интенсивность линий Ca II (393,239 нм), Mg II (279,396 нм), Al I (396,153 нм), Zn I (334,502 нм) при добавке в 0,5 % раствор альбумина 1% хлорида алюминия.

Из приведенных на рис. 2 результатов видно, что большое количество добавленной соли алюминия слабее влияет на перераспределение кальция по диаметру, обратное увеличению кальция (см. рис. 1).

## Закключение

Проведенные нами исследования позволяют сделать вывод о том, что при увеличении концентрации веществ с большим коэффициентом диффузии ( $\text{CaCl}_2$ ) диффузия противодействует выносу их на край испаряющейся капли, и, в то же время, вытесняя другие соли на периферию капли. Настоящее исследование с использованием метода лазерного искрового спектрального анализа показало, что возбуждение сдвоенными лазерными импульсами анализируемой поверхности высохшей капли белка является перспективным направлением для полуквантитативной оценки распределения эссенциальных элементов по радиусу и может быть со временем использовано для поиска маркеров заболеваний.

Работа выполнялась при частичной поддержке ГПНИ «Конвергенция» 3.3.02.3

## Список литературы

1. Шабалин В.Н., Шатохина С.Н. Морфология биологических жидкостей человека. - Хризостом, 2001. - 304 с.
2. Тарасевич Ю.Ю., Аюпова А.К. // ЖТФ. – 2003. - Т. 73. - 5. – С. 13.
3. Тарасевич Ю.Ю., Исакова О.Л., Кондухов В.В., Савицкая А.В. // ЖТФ. - 2010. - Т. 89. – 5. - С. 45.
4. Deegan R.D. // Phys. Rev. E. – 2000. - V. 61. - С. 475.

## INVESTIGATION INTO SPATIAL DISTRIBUTION OF MACROELEMENTS IN DRIED DROPS OF ALBUMINS AND PROTEINS BY THE METHODS OF ATOMIC-EMISSION MULTICHANNEL SPECTROMETRY

Trinh Ngoc Hoang<sup>1)</sup>, Tanin A.L.<sup>2)</sup>, Pashkovskaya I.D.<sup>2)</sup>, Bulovich J.I.<sup>1)</sup>,  
Nechipurenko N.I.<sup>2)</sup>, Zajogin A.P.<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Belarusian State University, 220030 Minsk, 4 Nezalezhnasti Ave.  
Phone: 209 53 48; e-mail: [zajogin\\_an@mail.ru](mailto:zajogin_an@mail.ru)

<sup>2)</sup>Republican Research-Practical Center of Neurology and Neurosurgery,  
220114, Minsk, 24 Fr. Skaryna St.

Based on local analysis of the line intensities of Al, Ca, Mg, and Zn in spectra for the samples of dried drops of egg albumin, the possibility for estimation of the spatial elemental distribution by the drop diameter was demonstrated using the atomic-emission multichannel spectrometry method. It was found that with an increase in the concentration of the elements with a high diffusion coefficient (Ca) diffusion counteracts their carry-over to the boundary of evaporating drops, simultaneously displacing the salts of other elements (Al, Fe, Zn) to the drop periphery. This work shows that excitation of the analyzed surface of a dried protein drop by double laser pulses enables a semi-quantitative estimation of the distribution of essential elements by the drop radius. Such investigations look very promising in search for markers of various diseases and in the development of methods revealing the pathological processes at the preclinical stage, making it possible to look for the causes of the elemental imbalance, to realize a targeted selection of preparations and active additives, to correct the treatment course.