

При миграции комплексов «ФС – САЧ» из плазмы крови в интерстициум опухоли может происходить разрушение комплексов вследствие снижения сродства ФС к САЧ в кислой среде. Десорбированные молекулы ФС могут связываться с опухолевыми клетками и клетками стромы, поскольку, как было показано нами ранее, в кислой среде липофильность Хл  $e_6$  существенно возрастает [15]. Кроме того, молекулы ФС могут также связываться с липопротеинами низкой плотности и накапливаться в опухолевых клетках, имеющих повышенное число рецепторов к данному классу липопротеинов, посредством рецепторно-опосредованного эндоцитоза [16].

#### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Пшенкина Н. Н. Структура альбумина и транспорт лекарств // Мед. академ. журн. 2011. Т. 11, № 3. С. 3–15.
2. Klotz I. M. Physicochemical aspects of drug-protein interactions: a general perspective // Ann. NY Acad. Sci. 1973. Vol. 226. P. 18–35.
3. Andrade S. M., Costa S. M. B. Spectroscopic studies on the interaction of a water soluble porphyrin and two drug carrier proteins // Biophys. J. 2002. Vol. 82 (3). P. 1607–1619.
4. Aveline B. M., Hasan T., Redmond R. W. The effects of aggregation, protein binding and cellular incorporation of the photochemical properties of BPD-MA // J. Photochem. Photobiol. B : Biol. 1995. Vol. 30. P. 161–169.
5. Kubat P., Lang K., Anzenbacher P.-Jr. Modulation of porphyrin binding to serum albumin by pH // Biochim. Biophys. Acta. 2004. Vol. 1670. P. 40–48.
6. Oravcova J., Bohs B., Lindner W. Drug-protein binding studies. New trends in analytical and experimental methodology // J. Chromatogr. B. 1996. Vol. 667. P. 1–28.
7. Zeman L. J., Zydney A. L. Microfiltration and Ultrafiltration: Principles and Applications. New York, 1996.
8. Зорин В. П., Хлудеев И. И., Зорина Т. Е. Распределение порфириновых сенсibilizаторов между белковыми и клеточными элементами крови // Биофизика. 2000. Т. 45, вып. 2. С. 313–319.
9. The atomic structure of human methemalbumin at 1.9 Å / M. Wardell [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002. Vol. 291. P. 813–819.
10. Regulation of photosensitizing activity of chlorin e6 derivatives in biosystems / S. N. Cherenkevich [et al.] // Proc. SPIE : 5<sup>th</sup> Intern. Conf. on Laser Applications in Life Sciences (Minsk, Belarus, 28 June – 2 July, 1994). 1995. Vol. 2370. P. 30–34.
11. The effect of porphyrin structure on binding to human serum albumin by fluorescence spectroscopy / O. Rinco [et al.] // J. Photochem. Photobiol. A. 2009. Vol. 208, iss. 2/3. P. 91–96.
12. Crystal structural analysis of human serum albumin complexed with hemin and fatty acid / P. A. Zunszain [et al.] // BMC Structural Biology. 2003. Vol. 3, art. 6.
13. The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin / M. Fasano [et al.] // IUBMB Life. 2005. Vol. 57 (12). P. 787–796.
14. Vaupel P., Kelleher D. K., Thews O. Microtopology of local perfusion, oxygenation, metabolic and energetic status, and interstitial pH in malignant tumors: techniques and characterization // Experimental Oncology. 2000. Vol. 22. P. 15–25.
15. Хлудеев И. И., Зорин В. П. Исследование связывания хлориновых фотосенсibilizаторов с липопротеинами сыворотки крови методом тушения флуоресценции // Вестн. БГУ. Сер. 1, Физика. Математика. Информатика. 2013. № 3. С. 55–60.
16. Chung N. S., Wasan K. M. Potential role of the lowdensity lipoprotein receptor family as mediators of cellular drug uptake // Adv. Drug Deliv. Rev. 2004. Vol. 56. P. 1315–1334.

Поступила в редакцию 12.12.2014.

**Иван Иванович Хлудеев** – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории биофизики и биотехнологии кафедры биофизики физического факультета БГУ.

**Владимир Петрович Зорин** – кандидат биологических наук, доцент, заведующий научно-исследовательской лабораторией биофизики и биотехнологии кафедры биофизики физического факультета БГУ.

УДК 533.9.082.5; 621.373.826; 621.793.79

Ж. И. БУЛОЙЧИК, А. Н. ВЕРЕМЧУК, Т. А. РУССКО, Г. Т. МАСЛОВА, А. С. МАВРИЧЕВ

### МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ И СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ОБРАЗЦОВ ВЫСОХШИХ КАПЕЛЬ КРОВИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

Исследован процесс структурирования высыхающей капли крови больных с онкологической патологией. Изучена динамика морфологических изменений в процессе высыхания капли. Выявлены структурные различия высохшей капли крови больных и здоровых людей. Показано образование нерегулярных структур (конкреции, трещины) у онкологических больных и отсутствие радиального расположения трещин, которое характерно для здоровых людей. Оценено распределение кальция на поверхности и в слоях высохшей капли крови методом лазерной атомно-эмиссионной спектроскопии. Отмечена возможность использования полученных результатов для диагностики на доклинической стадии.

**Ключевые слова:** биологические жидкости; капля крови; морфология капли; лазерная атомно-эмиссионная спектроскопия; двойные лазерные импульсы; локальный послойный анализ; кальций.

The structuring process of drying blood drops of the patients with oncological pathology has been studied. The dynamics of morphological changes in the process of drop drying has been examined. The structural differences in the dried blood drops of the patients and healthy people have been revealed. It has been shown that the dried blood drops of oncological patients exhibit the

formation of irregular structures (concretions, cracks) and no radial arrangement of the cracks characteristic for healthy people. The calcium content on the surface and in depth of the dried blood drops has been estimated by the laser atomic-emission spectrometry method. The possibility to use the obtained results for the preclinical diagnostics has been demonstrated.

**Key words:** biological fluids; blood drop; morphology; laser atomic-emission spectrometry; double laser pulses; local layer-by-layer analysis; calcium.

В последнее время все большее применение в медицинской диагностике находят методы исследования структур, образованных при кристаллизации солей в биологических жидкостях (БЖ) (кровь, плазма крови, спинномозговая жидкость, слюна). Явление дегидратационной самоорганизации БЖ было обнаружено Е. Г. Рапис около 30 лет назад [1–3], что позволило использовать внешний вид фации (высушенная капля БЖ) в диагностических целях.

В настоящее время на практике для диагностики используется метод клиновидной дегидратации БЖ, разработанный С. Н. Шатохиной и В. Н. Шабалиным [4]. Показано, что кристаллы солей выпадают в виде зерен, образуют дендриты, а биологический компонент жидкости создает сложную лепестковую структуру. Этот метод обладает неоспоримыми достоинствами для диагностики различных заболеваний человека на доклинической стадии. Хотя процесс распознавания характера структурирования биологических жидкостей проходит качественно, количественные изучения почти не проводятся.

В работах [5, 6] отмечается ряд проблем в практическом применении морфологии твердой фазы БЖ. За исключением отдельных запатентованных способов диагностики заболеваний по особенностям структуризации БЖ, большая часть исследований находится на стадии феноменологического описания. Недостаточно обоснованы механизмы дегидратационной самоорганизации БЖ и анализ обменных процессов, обуславливающих особенности механизма формирования структуры твердой фазы БЖ.

В связи с этим очевидно, что исследования структуризации твердой фазы БЖ перспективны для диагностического использования в самых разнообразных областях медицины. Для выбора интегральных критериев оценки пространственного распределения неорганических солей в фации важно понимание основных закономерностей развития пространственно-временных событий в высыхающих и высохших каплях, что может способствовать реальной оценке состояния организма и созданию новых инструментальных методов диагностики.

При высыхании капли БЖ протекает множество разнообразных процессов различной природы от нано- до макроуровня. Метод диагностики на основе дегидратации капли крови состоит в том, что при ее высыхании в случае нормы возникают регулярные и однородные структуры (радиальное растрескивание). При малейшей патологии происходят нарушения структуры белков, начинаются процессы их агрегации, сопровождающиеся возникновением аномальных и нерегулярных структур (конкреции, трещины). Микронарушения структуры белков на молекулярном уровне отражаются и на макроуровне. Если в норме всего 2 % белков имеют нарушения в третичной или четвертичной структуре, то при патологии к изменению в структуре имеют отношение до 50 % белков [7].

В настоящей работе изучена динамика структурирования высыхающей капли крови здорового человека и больных с онкологической патологией. Каплю объемом 10 мкл наносили на очищенную пластинку оргстекла. Процесс сушки проводили в открытой системе при температуре 20–22 °С.

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.

Диагностику капли проводили с 45-й мин, когда примерно начинается процесс структурирования, изменения в структуре фиксировали каждые 5 мин до полного высыхания капли.

На рис. 1 приведены последовательные с 50-й (1) по 95-ю мин (10) временные изменения структуры высыхающих капель крови пациента А с предварительным диагнозом «стенозирующий рак нижней трети желудка».

С 50-й по 65-ю мин (см. рис. 1, фрагменты 1–5) доля альбумина, выносимого на периферию капли с первых минут высыхания и быстро отвердевающего в виде белкового валика, составляет ~70 %. В это время в центре капли пока еще присутствует жидкая часть, которая сжимается по мере высыхания капли. Хотя в ней продолжается конвекционное перемешивание, оно постепенно ослабевает по мере загустевания жидкой фазы.

С 70-й по 85-ю мин (см. рис. 1, фрагменты 6–9) фиксируется переходная фаза, возникающая в прилегающей к белковому валику узкой краевой зоне жидкой части капли. В проходящем свете эта фаза определяется как алое пятно в центре капли. Продвижение фронта затвердевания к центру сопровождается уменьшением размера алого пятна и его потемнением. Последнее связано с возникновением центров выпадения белков по мере дегидратации капли и их распространением к центру капли.

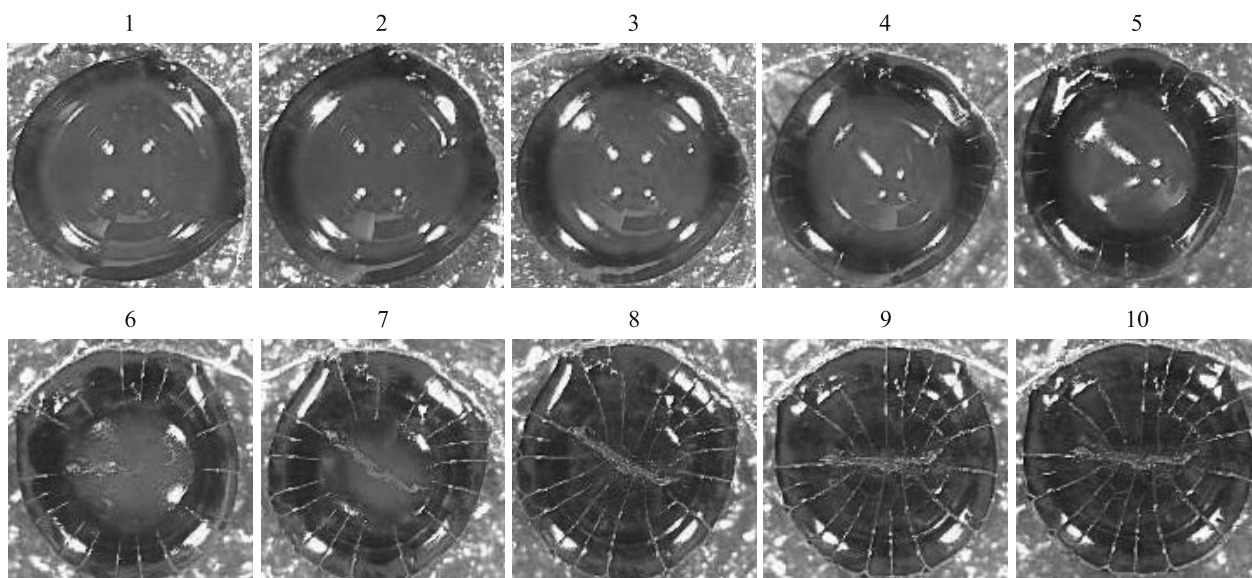


Рис. 1. Динамика структурных изменений высыхающей капли крови

С 65-й до 95-й мин происходит образование поперечных трещин и ячеек. Если ячейки не образуются, то фронт распространяется к центру капли по секторам, давая радиальное расположение трещин. Этот процесс является скачкообразным. На конце растущей трещины из-за загустевания по мере высыхания капли постепенно возрастает напряжение. Величина скачка определяется тем количеством геля, который загустел в направлении роста трещины. Для здорового человека характерен последовательный равномерный процесс, что обуславливает скачок через всю тонкую ровную загустевшую поверхность с образованием радиальных трещин [8–10].

Рост трещин продолжается до тех пор, пока они не упираются друг в друга, разрывая гель (см. рис. 1, фрагменты 5–10).

На рис. 2 представлены снимки высохших капель крови пациентов: *а* – предварительный диагноз «стенозирующий рак нижней трети желудка»; *б* – рак желудка, 4-я стадия; *в* – рак желудка; *г* – рак тела желудка; *д* – предполагаемый рак тела желудка; *е* – потенциально здоровый человек

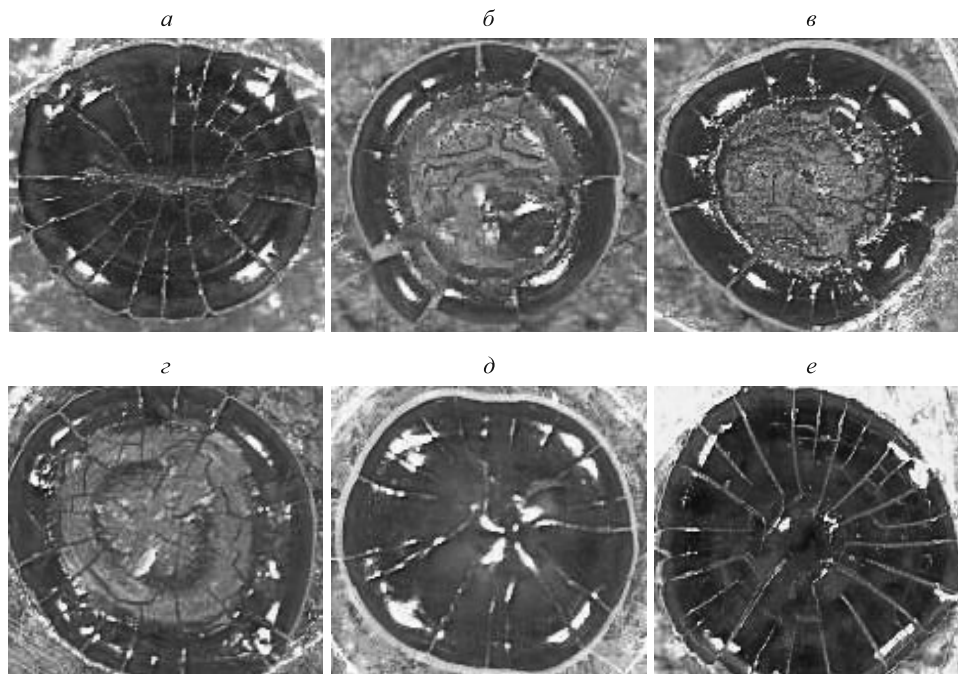


Рис. 2. Снимки высохших капель крови пациентов: *а* – предварительный диагноз «стенозирующий рак нижней трети желудка»; *б* – рак желудка, 4-я стадия; *в* – рак желудка; *г* – рак тела желудка; *д* – предполагаемый рак тела желудка; *е* – потенциально здоровый человек



Анализ морфоструктуры высохших капель крови онкологических больных  $b - z$  с диагнозом при поступлении «рак желудка» показывает, что капли при окончательном высыхании имеют схожую морфоструктуру: белковый валик и центральную часть с наличием многочисленных псевдотрещин и темных локальных блоков.

Динамика и структуризация высыхающих капель крови пациентов  $a$  и  $d$  носят иной характер. В высохших каплях отчетливо видно появление радиальных трещин с ростом к центральной зоне. При этом процесс структуризации носит довольно упорядоченный характер, как у практически здорового человека  $e$ .

На основании полученных данных можно было допустить вероятность отсутствия онкологической патологии у пациентов  $a$  и  $d$ . Действительно, наши предположения подтвердились. Так, окончательный диагноз больного  $a$  – «нейрогенный мочевого пузыря» (стриктура нижней трети правого мочеточника); больного  $d$  – «ангиопапиллома кожи межъягодичной складки» (единичные стромальные элементы на фоне крови), что не имеет отношения к онкологии.

Таким образом, в исследованных образцах высыхающих капель крови онкологических больных  $b - z$  отмечаются резко выраженные нарушения структурного построения морфологической картины крови. Трещины, темные сгущения (белковые скопления) локально разбросаны по капле как характерные признаки, свидетельствующие о нарушении системной регуляции процесса структуризации и гармонического взаимодействия элементов крови и структуры. Хаотическое растрескивание капель при различных заболеваниях, по-видимому, связано с нарушением процессов комплексообразования, влияющих на гомогенность полимерной пленки и вызывающих изменения в структуре.

Наряду с анализом морфоструктуры высыхающей на твердой подложке капли крови представлялось интересным исследовать пространственное распределение Са как у потенциально здоровых лиц, так и у онкологических больных. Этот элемент выбран нами потому, что, во-первых, он является одним из жизненно необходимых элементов (ЖНЭ) человека и, во-вторых, преимущественно его ионы связаны с белками [7].

В работе анализируется пространственное распределение ионов кальция по диаметру высохшей при комнатной температуре на твердой поверхности (органическое стекло – ПММА) капли (10 мкл) крови.

Локальное пространственное распределение кальция в высохших каплях крови экспериментально изучено методом лазерной атомно-эмиссионной многоканальной спектрометрии (ЛЭМС). Исследования проводили с использованием лазерного многоканального атомно-эмиссионного спектрометра LSS-1. Лазерное излучение фокусируется на образец с помощью ахроматического конденсора с фокусным расстоянием 100 мм. Размер пятна фокусировки – примерно 50 мкм. Все эксперименты выполняли в воздушной среде при нормальном атмосферном давлении. Анализировали суммарные результаты действия 5 последовательных сдвоенных лазерных импульсов (СЛИ). Энергия лазерного излучения составляла 34 мДж (первый и второй импульсы соответственно), временной интервал между сдвоенными импульсами – 8 мкс. Абляция осуществлялась через 0,6 мм. Размер точки повреждения составлял примерно  $0,1 \div 0,15$  мм. По диаметру пробы анализ проводили в 8 точках поверхности. Диаметр высохшей капли – около 6 мм.

Оценивали интенсивность линии СаII (393,239 нм) в спектрах высушенных капель крови в зависимости от положения точки на поверхности капли и в слое. Распределение кальция исследовано во всех образцах. В качестве иллюстрации приведены результаты оценки пространственного распределения кальция в высушенных образцах крови пациентов  $z$ ,  $d$  и здорового человека  $e$ .

На рис. 3 представлена интенсивность линии СаII в спектрах высушенных капель крови по двум перпендикулярным диаметрам. Расположение их старались выбрать так, чтобы захватить точки фации, где наблюдались аномалии в структуре (дефекты) (рис. 3,  $a$ : ряд 1 – вертикальный (в), ряд 2 – горизонтальный (г); на рис. 3,  $b$ , в столбце справа – номер точки). Приведены средние значения трех параллельных измерений как по поверхности, так и по слоям.

Отсутствие системного распределения кальция как по поверхности высохшей капли, так и по слоям подчеркивает хаотичный разброс дефектов в высохшей капле при наличии патологии. В то же время у пациента  $z$  с диагнозом «рак желудка» наблюдается более значительный разброс величин интенсивности. Выявлены пики на краевых зонах, при этом интенсивность одного из них очень велика – примерно 10 000 отн. ед. В каплях крови пациента  $d$  с неподтвердившимся онкологическим диагнозом отмечается достаточно равномерная интенсивность кальция практически по всей поверхности капли.

Найдены также отличия в распределении кальция по слоям. В высохшей капле крови пациента  $d$  практически в каждом из слоев обнаруживается несколько повышенное по сравнению со здоровым человеком содержание кальция с максимальным пиком 2000 отн. ед. В высохшей капле крови онкологического больного  $z$  присутствуют довольно резкие всплески повышения концентрации кальция – до  $3000 \div 4000$  отн. ед.

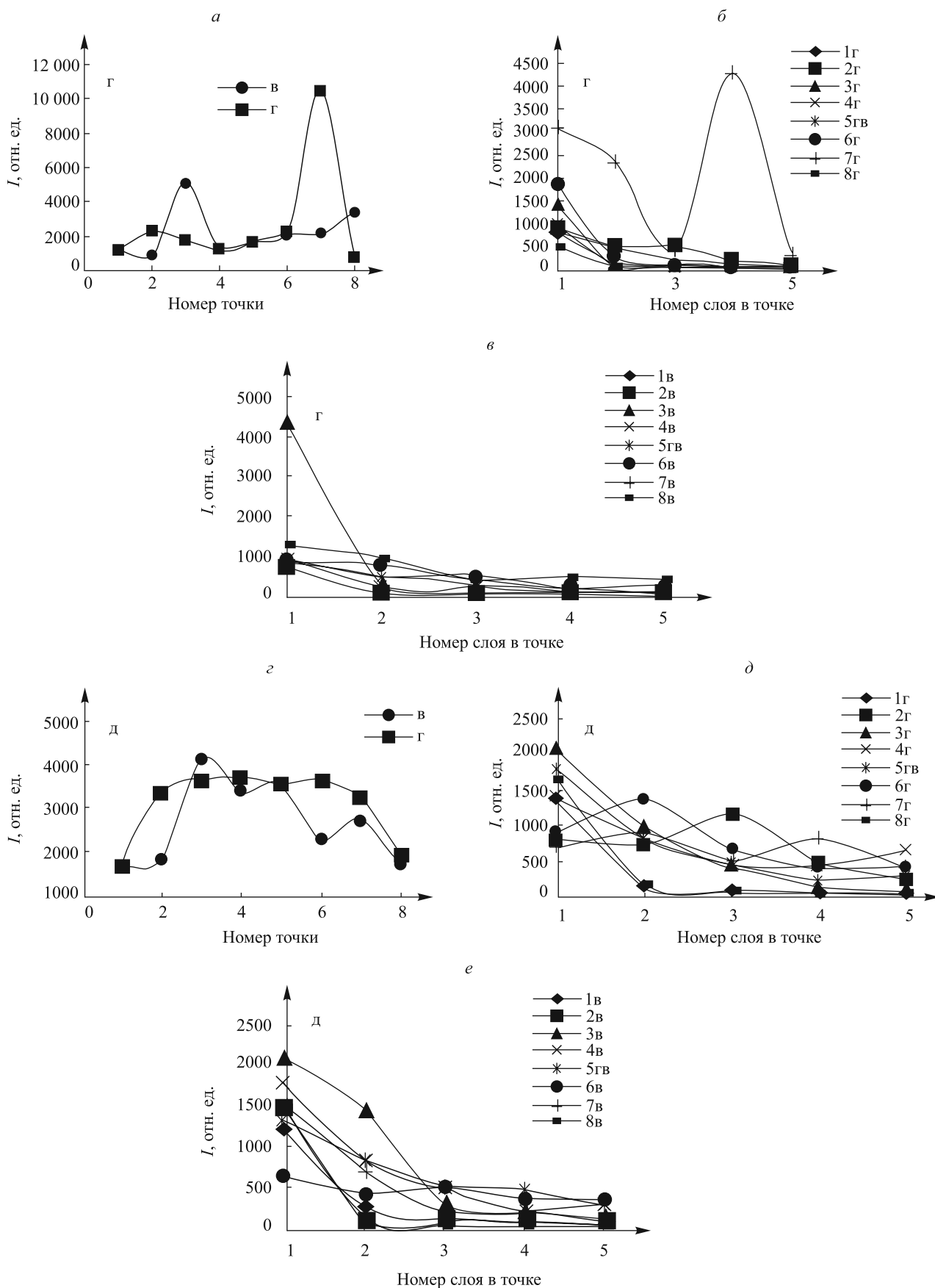


Рис. 3. Интенсивность линии Са в атомно-эмиссионных спектрах высушенных капель крови: а, г – в отдельных точках поверхности капли; б, д – послыная в точках поверхности по горизонтали; в, е – послыная в точках поверхности по вертикали (окончание см. на с. 29)

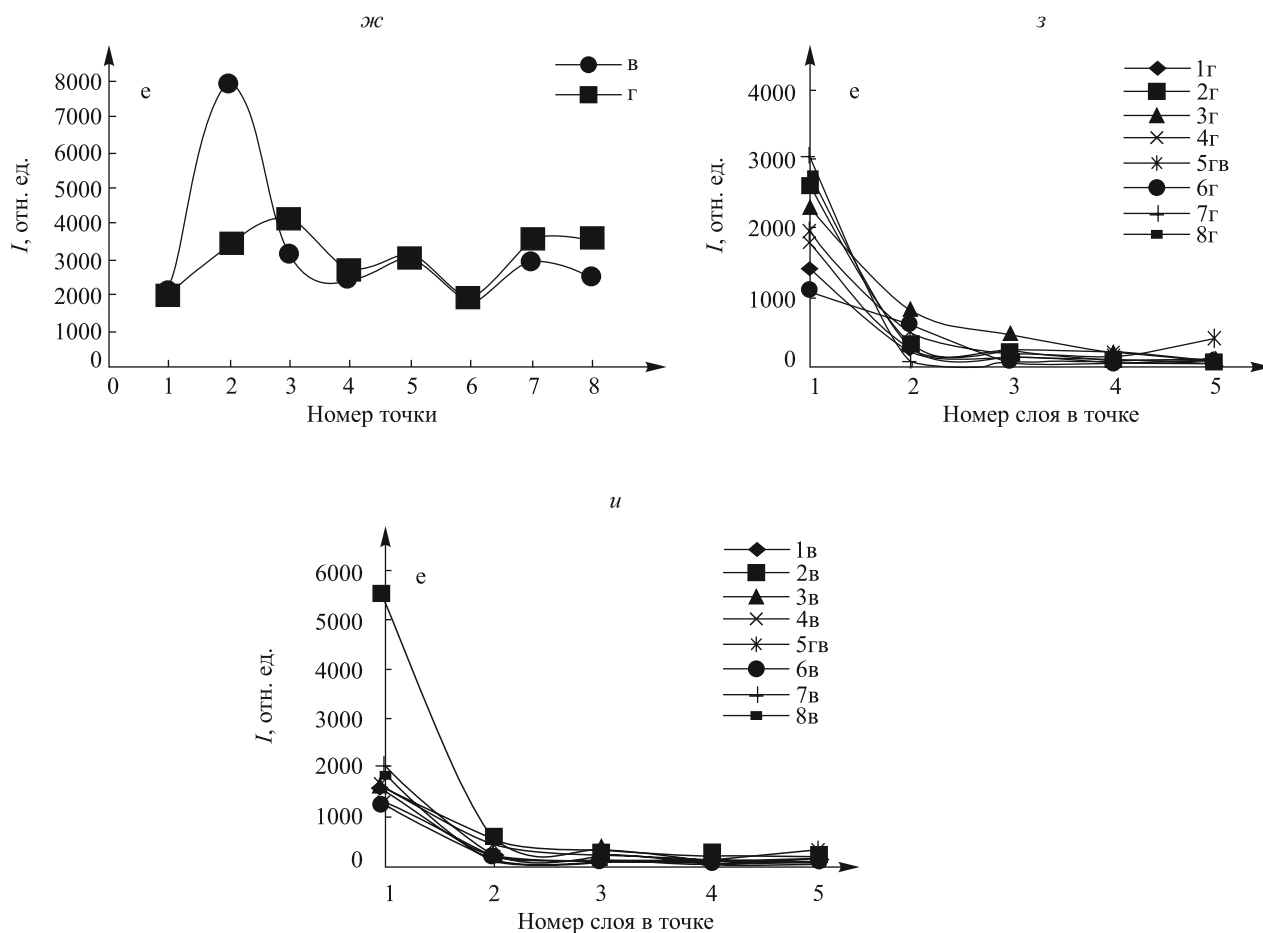


Рис. 3. Окончание (начало см. на с. 28): *ж* – в отдельных точках поверхности капли; *з* – послойная в точках поверхности по горизонтали; *и* – послойная в точках поверхности по вертикали

Локальное распределение кальция в высохшей капле цельной крови потенциально здорового человека *е* хорошо согласуется со структурными данными, приведенными в работах [6, 7]. Как видно из рис. 3, у здорового человека основное содержание кальция приходится на край капли, где расположен белковый валик, и, соответственно, максимальный пик концентрации как на поверхности, так и в слое отмечен только в одной краевой точке. Пик составляет примерно 6000 отн. ед., интенсивность других многочисленных пиков на поверхности и в слоях относительно равномерна. Это является дополнительным доказательством влияния патологического состояния организма на процесс структурирования высохшей капли крови.

Хотя для систематизации результатов требуется набор статистических данных, однако полученные показатели демонстрируют различия в распределении интенсивности как на поверхности, так и в слоях высохшей капли в зависимости от диагноза.

Такие исследования с использованием метода ЛАЭМС для анализа высохшей капли БЖ могут быть перспективны для полуколичественной оценки распределения эссенциальных элементов по диаметру капли и, возможно, помогут поиску маркеров заболеваний. Результаты таких оценок могли бы служить основой при проведении предварительных диагностических исследований, поскольку на начальных стадиях развития болезни общее содержание макроэлементов в БЖ пациентов, как правило, лежит в пределах нормы.

Таким образом, данные морфоструктурного анализа высохшей капли крови, определяющие различия образующихся структур в процессе высыхания капли БЖ, оценка пространственного распределения жизненно необходимых элементов в высохшей капле дают возможность выявления серьезных заболеваний на доклинической стадии. Учитывая относительную простоту выполнения анализа, не требующего больших временных затрат и дорогостоящего оборудования, возможно предварительное формирование групп риска больных для дальнейшей диагностики с подключением более специфических и сложных медицинских методов.

1. Раниц Е. Г. Использование метода поляризационной микроскопии для исследования хрусталика // Вестн. офтальмологии. 1976. № 2. С. 128–130.
2. Раниц Е. Г. Микрорентгенооптический способ исследования стекловидного тела человека и животных в норме и при гемофтальме // Вестн. офтальмологии. 1976. № 5. С. 62–67.
3. Раниц Е. Г. Образование упорядоченной структуры при высыхании пленки белка // Письма в ЖТФ. 1988. Т. 14 (17). С. 1560–1564.
4. Шабалин В. Н., Шатохина С. Н. Морфология биологических жидкостей человека. М., 2001.
5. Максимов С. А. Морфология твердой фазы биологических жидкостей как метод диагностики в медицине // Бюл. сиб. медицины. 2007. № 4. С. 80–85.
6. Тарасевич Ю. Ю. Механизмы и модели дегидратационной самоорганизации биологических жидкостей // УФН. 2004. Т. 174 (7). С. 779–790.
7. Влияние режима испарения на пространственное перераспределение компонентов в испаряющейся капле жидкости на твердой горизонтальной подложке / Ю. Ю. Тарасевич [и др.] // ЖТФ. 2010. Т. 89 (5). С. 45–50.
8. Гольбрайх Е., Раниц Е. Г., Моисеев С. С. О формировании узора трещины в свободно высыхающей пленке водного раствора белка // ЖТФ. 2003. Т. 73 (10). С. 118–122.
9. Кизель В. А. Физические причины десимметрии гелевых систем. М., 1985.
10. Краевой С. А., Колтовой Н. А. Диагностика по капле крови. Кристаллизация биожидкостей : в 4 кн. М., 2013. Кн. 1 : Открытая капля. С. 67–71.

Поступила в редакцию 21.01.2015.

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

**Алина Николаевна Веремчук** – студентка 5-го курса биологического факультета БГУ.

**Татьяна Александровна Русско** – студентка 5-го курса биологического факультета БГУ.

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

**Анатолий Сергеевич Мавричев** – доктор медицинских наук, заместитель директора по лечебной работе Республиканского научно-практического центра онкологии и медицинской радиологии имени Н. И. Александрова.

УДК 621.793

*В. В. УГЛОВ, А. Ю. РОВБУТЬ, С. В. ЗЛОЦКИЙ, И. А. СОЛОДУХИН*

### ТЕРМИЧЕСКАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ НАНОКРИСТАЛЛИЧЕСКИХ ПЛЕНОК НА ОСНОВЕ СИСТЕМЫ «TiZrAlN», ИМПЛАНТИРОВАННЫХ ИОНАМИ ГЕЛИЯ

Изучено влияние облучения гелием (He) на термическую стабильность нанокристаллических пленок на основе многокомпонентных систем «TiZrN» и «TiZrAlN». TiZrN- и TiZrAlN-пленки были сформированы методом реактивного магнетронного распыления. Рентгеноструктурные исследования свидетельствуют, что пленки TiZrN и TiZrAlN являются однофазными (на основе кубических c-(Ti,Zr)N и c-(Ti,Zr,Al)N твердых растворов) и нанокристаллическими (размер зерен – 30 и 20 нм соответственно). Установлено, что облучение ионами He и термическое воздействие до 800 °C не приводят к изменениям структурно-фазового состояния пленок TiZrAlN. Предварительное облучение и отжиг при температуре до 1000 °C обуславливают усиление процессов перераспределения металлических компонентов в пленках TiZrAlN, вызывающих спинодальный распад твердого раствора c-(Ti,Zr,Al)N и образование двух твердых растворов c-(Ti,Al)N и c-(Zr,Al)N.

**Ключевые слова:** нитриды переходных металлов; наноструктурированные пленки; термическая стабильность; облучение ионами He; радиационная стабильность.

The influence of He irradiation on the thermal stability of TiZrN and TiZrAlN multicomponent nanocrystalline films was studied in this paper. TiZrN and TiZrAlN-films were prepared by reactive magnetron sputtering. As shown by XRD studies, the TiZrN and TiZrAlN-films were single-phase systems (based on cubic c-(Ti,Zr)N and cubic c-(Ti,Zr,Al)N solid solutions) with the nanocrystalline structure with the grain size 30 and 20 nm, respectively. Irradiation with He ions and thermal influence up to 800 °C do not affect the structure and phase composition of the TiZrAlN-film. Preirradiation of the TiZrAlN-film with He ions activates spinodal decomposition of the c-(Ti,Zr,Al)N solid solution after thermal annealing at 1000 °C due to redistribution of the components of a solid solution within the grains.

**Key words:** transition metal nitrides; nanostructured films; thermal stability; helium ion irradiation; radiation stability.

В настоящее время развитие ядерной энергетики обуславливает необходимость поиска новых материалов. Влияние He на свойства конструкционных материалов ядерных и термоядерных реакторов определило особую проблему физики радиационных повреждений и радиационного материаловедения. Так, для реакторов новых поколений требуются материалы, обладающие высокой теплопроводностью и термической стабильностью, радиационно стойкие к облучению ионами гелия [1]. Одним из вариантов таких материалов являются нитриды переходных металлов (ПМ), получаемые различными способами физического осаждения [2, 3]. Все больший интерес привлекают многокомпонентные покрытия на базе системы «ПМ – Al – N», которые обладают высокими механическими свойствами и термической стойкостью в случае формирования кубических фаз твердых растворов c-(ПМ,Al)N [4].