

Морфоструктурный анализ и лазерная атомно-эмиссионная спектрометрия фаций капель плазмы крови в диагностике у пациентов с дисциркуляторной энцефалопатией

Т. А. Прокопенко¹⁾, И. Д. Пашковская¹⁾, Н. И. Нечипуренко¹⁾, А. П. Зажогин²⁾

¹⁾ *Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии, Минск, Беларусь, e-mail: irenapass@mail.ru*

²⁾ *Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь e-mail: zajogin_an@mail.ru*

В работе рассмотрены вопросы разработки методик морфологического анализа и полуколичественной оценки локального пространственного распределения кальция и белков в фациях капель плазмы крови человека методом лазерной атомно-эмиссионной многоканальной спектрометрии. Показано, что метод лазерной атомно-эмиссионной спектрометрии дает возможность полуколичественно оценить изменения в белковых центрах и может являться оперативным высокочувствительным инструментом в диагностике течения заболеваний.

Ключевые слова: плазма крови; биологическая жидкость; морфология капли; лазерная атомно-эмиссионная спектрометрия; пространственное распределение кальция и белков; послойный анализ.

Morphostructural analysis and laser atomic emission spectrometry of blood plasma droplet facies in diagnostics of patients with cerebrovascular insufficiency

T. A. Prokopenko¹⁾, I. D. Pashkovskaya¹⁾, N. I. Nechipurenko¹⁾, A. P. Zajogin²⁾

¹⁾ *Republican Research-Practical Center of Neurology and Neurosurgery, Minsk, Belarus e-mail: irenapass@mail.ru*

²⁾ *Belarusian State University, Minsk, Belarus e-mail: zajogin_an@mail.ru*

This paper examines the development of methods for morphological analysis and semiquantitative assessment of the local spatial distribution of calcium and proteins in human blood plasma droplet facies using laser atomic emission spectrometry. It is demonstrated that laser atomic emission spectrometry enables semiquantitative assessment of changes in protein centers and can serve as a rapid, highly sensitive tool for disease diagnostics.

Keywords: blood plasma; biological fluid; droplet morphology; laser atomic emission spectrometry; spatial distribution of calcium and proteins; layer-by-layer analysis.

Введение

Дисциркуляторная энцефалопатия (ДЭ), отнесенная к хроническим нарушениям мозгового кровообращения – прогрессирующее хроническое диффузное или мультифокальное нарушение мозгового кровообращения, проявляющееся неврологическими синдромами и когнитивными нарушениями, которое относится к числу наиболее распространенных сосудистых заболеваний, нередко начинаясь в

трудоспособном возрасте. Наиболее частыми причинами сосудистой энцефалопатии являются атеросклероз артерий и артериальная гипертензия [1].

Дисциркуляторную энцефалопатию подразделяют на 3 стадии в зависимости от выраженности клинических симптомов. Первая стадия ДЭ характеризуется субъективными и вегетативными расстройствами, но иногда определяются незначительно выраженные неврологические синдромы. Как правило, пациенты с 1-й стадией являются трудоспособными и при лечении своевременной терапии может наступить некоторый регресс неврологической симптоматики.

У пациентов с ДЭ 2-й стадии усугубляются когнитивные нарушения, становятся более выраженными неврологические синдромы, нередко теряется трудоспособность. При проведении компьютерной томографии или магнитно-резонансной томографии исследования, а также при ультразвуковом доплерографическом обследовании брахиоцефальных и внутричерепных артерий и сосудов на этой стадии, как правило, определяются органические изменения в головном мозге. В клинической картине 2-й или 3-й стадии ДЭ часто у одного пациента определяется одновременно несколько синдромов: псевдобульбарный и когнитивный, амиостатический и атактический, вестибуло-атактический и синкопальный. Наиболее часто с другими синдромами сочетается когнитивный. При 3-й стадии заболевания диагностируются выраженные когнитивные изменения, органическая неврологическая симптоматика, тазовые нарушения [2].

Нарушение энергетического метаболизма, сопряженного с образованием АФК, приводит к изменению трансмембранных ионных потоков, накоплению внутриклеточного кальция и развитию глутамат-кальциевой эксайтотоксичности. Усиление свободнорадикальных процессов и развитие окислительного стресса являются одними из важнейших патогенетических звеньев поражений центральной нервной системы.

Одним из методов коррекции нарушений, возникающих при ишемии головного мозга может быть лазерная гемотерапия в сочетании с лекарственными средствами, в частности внутривенное лазерное облучение крови (ВЛОК) в красной области спектра или надвенное лазерное облучение крови (НЛОК) в инфракрасной спектральной области, обладающие антиоксидантными, иммуномодулирующими, противовоспалительными свойствами. Адаптогенное действие низкоинтенсивного лазерного излучения реализуется на клеточном, тканевом, системном уровнях [2, 3]. Результатом действия лазерной гемотерапии, является ответ системы регулирования гомеостаза на развитие патологических процессов в отдельных органах и тканях, поэтому изучение действия различных длин волн низкоинтенсивного лазерного излучения при цереброваскулярных заболеваниях актуально.

В последнее время в медицинской диагностике становятся более актуальными методы исследования структур, образующихся при кристаллизации солей в биожидкостях. На практике для диагностики используется метод клиновидной дегидратации биожидкостей, разработанный Шабалиным В. Н. и Шатохиной С. Н. [4]. Кристаллы солей выпадают в виде зерен, образуют дендриты, а биологическая компонента жидкости создает сложную лепестковую структуру. Этот метод обладает неоспоримыми достоинствами для диагностики различных заболеваний человека на доклинической стадии.

Целью данной работы является изучение возможности проведения методами лазерной атомно-эмиссионной многоканальной спектрометрии со сдвоенными лазерными импульсами высохших капель плазмы крови мониторинга и оценки динамики изменения концентрации белков и кальция в образцах плазмы крови пациентов с ДЭ до лечения и после.

Результаты и обсуждение

Каплю БЖ объемом 10 мкл наносили на обезжиренную пластинку оргстекла, высушивали при комнатной температуре в течение 90 – 100 минут. Процесс сушки проводили в открытой системе при комнатной температуре 20 – 22 °С. Диаметр высохшей капли равен примерно 6 мм. Толщина примерно 0,07 мм.

Для получения снимков высохших капель крови использовали микроскоп Биолам со светодиодной подсветкой (на пропускание) и веб-камерой.

Для полуколичественной оценки локального пространственного распределения кальция и белков 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 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 примерно $0,10 \div 0,15$ мм. По диаметру пробы анализ проводили в 12 точках поверхности.

Морфология центральной части высохшей через 90 минут капли плазмы крови для ряда пациентов приведена на рис. 1.

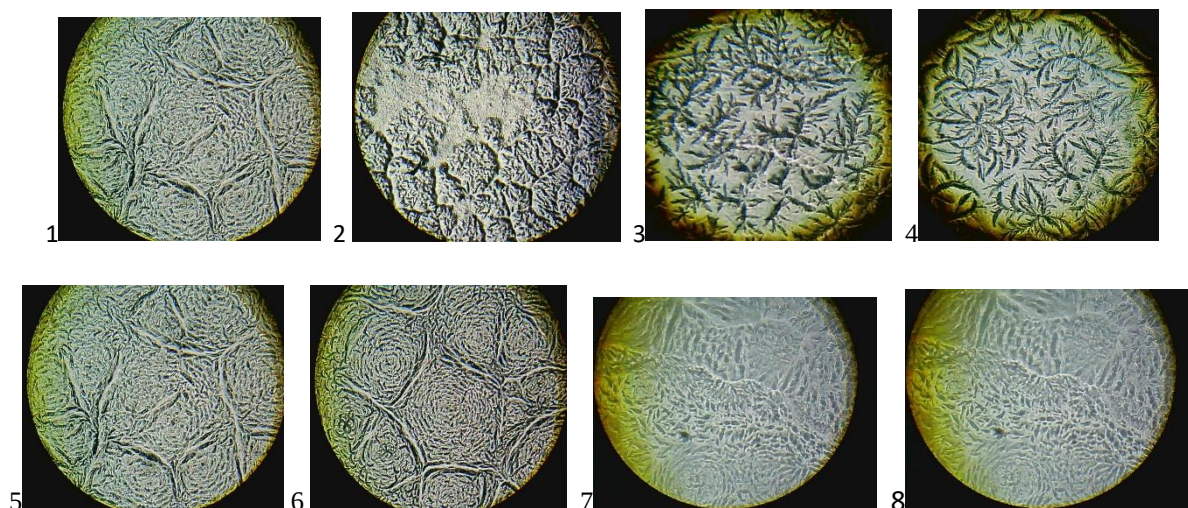


Рис. 1. Снимки фаций плазмы пациентов до и после лечения (увеличение 130)

Качественный сравнительный анализ структуры поверхности образцов цельной крови показал, что у пациентов с ЦВЗ имеются отличия от здоровых лиц. У группы пациентов с ДЭ преобладает наличие трехлучевых (признак застойных явлений в организме, в том числе в тканях головного мозга), штриховых (признак ДЭ) и широких (маркер склеротических изменений) трещин.

Однородная, равномерная зона мелких завитков характерна для центра фации доноров. При патологии отклонения, обусловленные нарушением стандартных соотношений «белок-соль», вызывают нерегулируемые конформационные изменения, связанные с уникальностью альбумина (наличие амино- и карбоксильных групп в его молекуле – полиамфолитность). Наблюдаем совершенно очевидное существенное отличие структуры фации пациентов от донора.

Структура фаций плазмы пациентов с ЦВЗ характеризуется потерей симметрии расположения основных элементов фации (трещин, конкреций, отдельностей). Даже у пациентов с одинаковым заболеванием не наблюдается схожей морфологической структуры дегидратирующей капли, что может быть результатом действия различных этиологических факторов при формировании патологии.

Для установления взаимосвязи полученных морфологических картин высохших капель с динамикой протекания патологического процесса нами проведено аналитическое определение локального пространственного распределения кальция и белков в высохших каплях по поверхности и слоям высохшей капли. Акцент сделан на определение кальция, поскольку он «спектроскопически доступен», является одним из самых необходимых элементов в организме, наиболее активным кофактором в белковой среде, легко образует связи с амино- и карбоксильными группами белковых молекул, что определяет картину структурирования БЖ. Для анализа белков использованы молекулярные полосы циана CN (388,3 нм), Циан образуется при лазерной абляции белков, которые содержат аминокислоты. Молекулярный спектр циана имеет достаточное число полос, низкий потенциал ионизации – 3,2 эВ в ультрафиолетовой и видимой области спектра, что позволяет получить высокую чувствительность,

Результаты полуколичественного определения пространственного распределения кальция и белков в высохших каплях плазмы крови пациентов до и после облучения приведены на рис. 2, а. Приведены суммарные интенсивности линии кальция Ca II (393,366 нм) и циана по двум перпендикулярным диаметрам (горизонталь и вертикаль) на поверхности высохшей капли. Анализ графиков показывает, что значения концентраций белков для большинства пациентов близко к среднему значению. Существенное отличие уровня кальция, при значении уровня белков близком к среднему наблюдается у 2 и 3 пациентов, имеющего диагноз – ДЭ 3 ст.

Оптимальный уровень свободного Ca^{2+} внутри клетки составляет 100–200 нМ, однако возможны значительные колебания этого уровня в цитозоле, но лишь в течение непродолжительного времени. Одним из механизмов, регулирующим кальциевую перегрузку клеток является возможность захвата больших количеств Ca^{2+} митохондриями и депонирования его в виде нерастворимой фосфорнокислой соли – гидроксиапатита. Так как процесс этот сопряжен с энергозатратами, то происходит уменьшение или прекращение синтеза АТФ, необходимого для удаления Ca^{2+} из цитоплазмы.

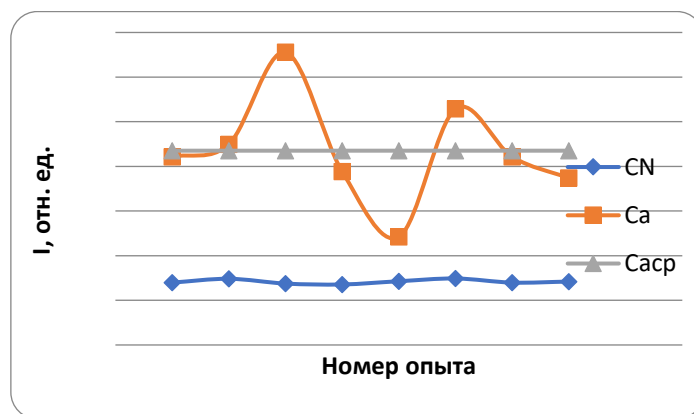


Рис. 2. Интенсивность линий Ca и циана CN в эмиссионных спектрах высохших капель плазмы крови: 1, 3, 5 7 –до лечения; 2, 4, 6, 8 –после лечения

Полученные данные показывают, что у больных с ДЭ в процессе высыхания капель плазмы происходит хаотичное образование центров коагуляции, наблюдается разброс концентрации кальция как по поверхности, так и слоям. Налицо изменение связывающей способности альбумина при патологии. Это приводит к аномальной коагуляции белка и увеличению концентрации кальция по центру фации и в более глубоких слоях, что не характерно для здорового человека. После проведения 8–10 сеансов облучения крови НЛОК и ВЛОК пациентов 2 и 3 (рис. 2–4 и рис. 6) наблюдаются определенные улучшения свойств белков плазмы крови –распределение кальция приближается к средней величине.

Заключение

Таким образом, анализ распределения кальция и белков в плазме крови у пациентов с аневризмой головного мозга позволил выявить особенности форм альбумина в крови, что влечет за собой нарушения протекания многих биохимических и физиологических реакций при гипоксическом повреждении головного мозга. Установлено достаточно значимое снижение уровня кальция и здорового альбумина у ряда пациентов.

Библиографические ссылки

1. Семакс в профилактике прогрессирования и развития обострений у больных с дисциркуляторной энцефалопатией / Е. И. Гусев [и др.] // Журн. неврологии и психиатрии им. Корсакова. 2005. № 2. С. 35–39.
2. Левин О. С. Штудльман Д. Р. Неврология. Справочник практического врача, 10-е издание.– Москва «МЕДпресс-информ», 2016. С. 406-416.
3. Нечипуренко Н. И. Роль кислородзависимых процессов в патогенезе хронической ишемии головного мозга // Неврология и нейрохирургия. Восточная Европа. 2012. № 3.С. 150–159.
4. Шабалин В. Н., Шатохина С. Н. Морфология биологических жидкостей человека. – М. : Хризостом, 2001. 304 с.