УДК 533.9.082.5; 621.373.826; 621.793.79

ЧИНЬ НГОК ХОАНГ (ВЬЕТНАМ), И.Д. ПАШКОВСКАЯ, Ж.И. БУЛОЙЧИК, А.П. ЗАЖОГИН

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ Al, Ca, Mg, Zn В ВЫСУШЕННЫХ КАПЛЯХ БЕЛКОВ С ПОМОЩЬЮ ЛАЗЕРНОЙ АТОМНО-ЭМИССИОННОЙ МНОГОКАНАЛЬНОЙ СПЕКТРОМЕТРИИ

Using the atomic-emission multichannel spectrometry method for a local analysis of the Al, Ca, Mg, and Zn line intensities in spectra of the samples of dried egg albumin drops by their diameters, the possibility for estimation of the spatial distribution at different calcium concentrations is demonstrated. It is shown that this method offers much promise in the development of the techniques to reveal the pathological processes at the preclinical stage. This enables analysis of the factors causing the elemental disbalance to select the adequate active additives and preparations, and to correct the treatment procedures. The fact that the correction efficiency may be controlled by the real-time repeated analysis is of great importance.

В последние десятилетия в медицинской диагностике все больше находят применение 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 С.Н. Шатохиной и В.Н. Шабалиным [1]. Кристаллы солей выпадают в виде зерен, образуют дендриты, а биологическая компонента жидкости создает сложную лепестковую структуру, что используется для диагностики различных заболеваний человека на доклинической стадии. При этом процесс распознавания характера структурирования биологических жидкостей происходит качественно, а не количественно и в большой мере зависит от опыта и навыка прочтения изображения фации врачом-исследователем.

Для выбора интегральных критериев оценки состояния организма и создания новых инструментальных методов изучения пространственного распределения неорганических солей в фации важно понимание основных закономерностей развития пространственно-временных событий в высыхающих и высохших каплях.

При высыхании капли биологической жидкости (БЖ) происходит множество разнообразных процессов различной природы от макро- до наноуровня, в частности перераспределение компонентов: белок накапливается преимущественно по краям капли, в то время как соль распределяется по диаметру капли более или менее равномерно [2, 3]. Перспективы использования структуризации твердой фазы БЖ в самых разнообразных областях медицины очевидны [4].

Тем не менее остается ряд проблем в практическом применении морфологии твердой фазы БЖ [4]. Большая часть исследований из-за трудности количественного анализа получаемых паттернов находится на стадии феноменологического описания, хотя особо ценным является не описание типа «вид патологии – наблюдаемые структуры», а анализ обменных процессов, обусловливающих особенности механизмов формирования структуры твердой фазы БЖ. Это затрудняет применение статистических методов анализа. К недостаткам метода можно отнести слабую обоснованность механизмов дегидрационной самоорганизации БЖ. Более того, развитие применения морфологии твердой фазы БЖ в медицине тормозит обилие авторских методик, зачастую не имеющих принципиальных различий, но предлагающих собственные алгоритмы анализа результатов.

Механизмы переноса коллоидных частиц в высыхающих каплях как теоретически, так и экспериментально довольно хорошо изучены в [5]. Однако влияние диффузии на перемещение внутри капли молекул малого размера (например, солей) изучено недостаточно. В настоящей работе делаются попытки полуколичественной оценки распределения ряда элементов при высыхании капли яичного альбумина в зависимости от количества добавленного кальция как основного элемента куриного белка.

Методика исследований и пробоподготовки

Для исследований использовали 0,5 % раствор альбумина. Готовили растворы с добавлением определенных количеств хлористого кальция (0,1 и 1 % кальция).

Неразбавленный белок куриного яйца содержит: 88 % – воды, 1 % – углеводов, 0,5 % – минеральных веществ, остальное – собственный белок. Таким образом, неразбавленный белок куриного яйца представляет собой примерно 10 % раствор белка.

Наличие на поверхности молекулы белка свободных гидрофильных групп способствует их растворению в воде. Степень растворимости зависит от структуры белка, реакции среды, присутствия электролитов. В кислой среде лучше растворяются белки, обладающие кислотными, а в щелочной – основными свойствами.

Яичный белок представляет собой смесь нескольких белков. Примерно 70 % яичного белка составляет альбумин, который легко отделяется от глобулинов. Альбумины хорошо растворяются в дистиллированной воде, а глобулины – только в присутствии электролитов. В слабом солевом растворе растворяются как альбумины, так и глобулины. При десятикратном разведении яичного белка дистиллированной водой глобулины выпадают в осадок, а альбумин остается в растворе, в результате его количество в растворе получается равным примерно 0,5 %.

Содержание макро- и микроэлементов в курином яйце приведено в таблице.

Среднее содержание макро- и микроэлементов в белке и желтке куриного яйца, мг на 100 граммов продукта

Элементы	Белок		Желток, %
	мг	%	
Зола	700	0,7	1,7
Ca	10	0,01	136
Mg	9	0,009	15
K	152	0,152	129
Na	189	0,189	51
Fe	0,15	0,00015	6,7
Cu	0,052	0,000052	0,139
Zn	0,231	0,00023	3,105

Каплю 0,5 % раствора наносили 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 ч. Диаметр капель на поверхности полиэтиленовой подложки 5÷7 мм. Средняя толщина около 0,07 мм. Использование предметного стекла, которое применяется в микроскопическом анализе [1–4], в лазерном атомно-эмиссионном методе исключается из-за наличия в самом стекле большинства исследуемых элементов.

Распределение макро- и микроэлементов в каплях экспериментально исследовано с помощью метода лазерной многоканальной спектрометрии с применением атомно-эмиссионного спектрометра LSS-1. Источником возбуждения плазмы в спектрометре является двухимпульсный лазер на АИГ+Nd^{3+} с регулируемыми энергией и интервалом между импульсами (модель LS2131 DM). Лазер обладает широкими возможностями для регулировки как 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 ≈ 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 около 50 мкм. Все эксперименты проводились в атмосфере воздуха при нормальном атмосферном давлении.

Динамику развития процессов абляции и приповерхностного плазмообразования оценивали при воздействии сдвоенных лазерных импульсов на поверхность образцов альбумина в атмосфере воздуха. Энергии импульсов излучения составляли 58 и 42 мДж (первого и второго импульса соответственно), временной интервал между сдвоенными импульсами – 8 мкс. Исследовали распределение ряда элементов (Al, Mg и Zn) при добавлении кальция различной концентрации. По диаметру капли от края до края проводился анализ в 10 точках. На рисунках представлены суммарные результаты по 4 каплям. Интенсивности линий элементов соответствуют их естественному содержанию в исследуемых растворах. Особое внимание уделяется распределению алюминия, так как в последнее время все больший интерес представляют исследования роли алюминия в организме человека. Полагают, что ионы алюминия могут конкурировать с некоторыми эссенциальными элементами, в том числе магнием, кальцием и железом [5–7]. При этом они не только влияют на многие внутриклеточные процессы, но и оказывают токсичное действие на клеточную оболочку [8–11]. В целом имеющиеся данные не позволяют сделать однозначный вывод об этиологической роли алюминия в развитии различных болезней центральной нервной системы, тем не менее этот металл, по-видимому, способен усиливать окислительные и воспалительные реакции, приводящие к повреждению ткани, и способствовать прогрессированию нейродегенеративных изменений [12].

На рис. 1 *а* представлена зависимость интенсивности I линий кальция, магния, алюминия и цинка в спектрах высушенных капель альбумина с добавкой хлорида кальция (в концентрации C = 0,1 %).

Очевидна определенная закономерность между интенсивностью линий магния, алюминия и цинка и количеством добавленного кальция, который в основном распределен по центру капли и краям, ос-

тальные элементы, особенно алюминий, – преимущественно в тех областях, где концентрация кальция меньше.

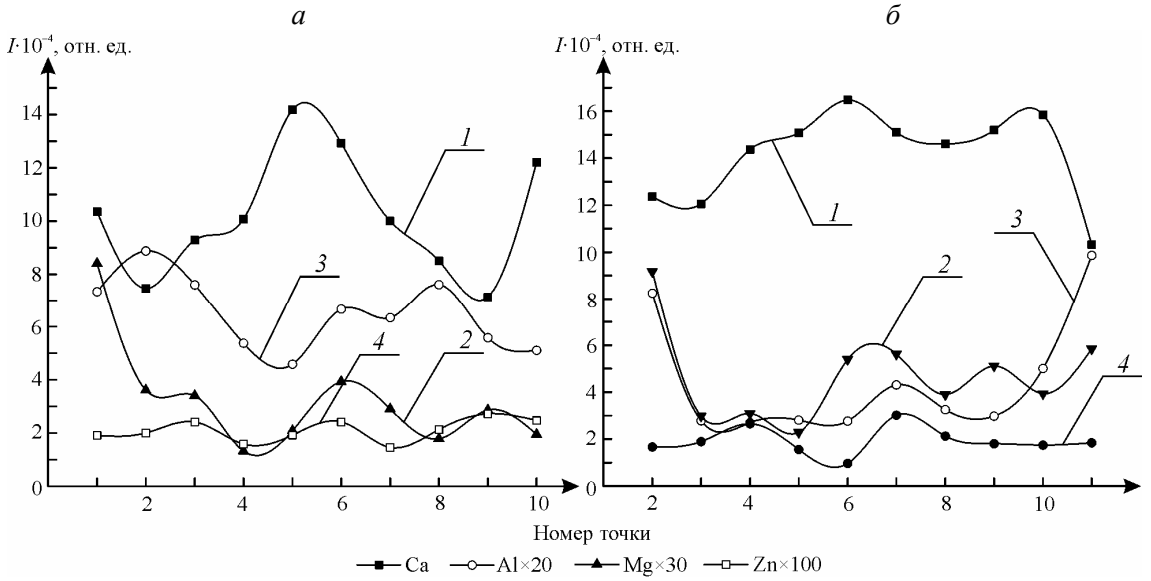

Рис. 1. Интенсивность линий Ca II (393,239 нм) – *1*, Mg II (279,396 нм) – *2*, Al I (396,153 нм) – *3*, Zn I (334,502 нм) – *4* в спектрах образцов (0,5 % раствор альбумина) при содержании Ca 0,1 % – *а* и 1 % – *б*

При увеличении на порядок добавленного кальция от 0,1 до 1 % распределение элементов по поверхности высушенной капли существенно изменяется (рис. 1 *б*).

Кальций в основном находится в центре капли, к краям его концентрация уменьшается. Концентрация алюминия, наоборот, увеличивается преимущественно в тех областях, где содержание кальция меньше. При этом перераспределение резко выражено: интенсивность линии алюминия по краям примерно в 3–4 раза выше, чем по центру. Аналогичные изменения наблюдаются и для магния.

На рис. 2 приведены градуировочный график и уравнение для определения концентрации кальция по наиболее интенсивной в спектре ионной линии Ca II (λ = 393,367 нм). Для построения градуировочного графика были взяты средние значения интенсивности линии в спектрах образцов с указанными концентрациями кальция.

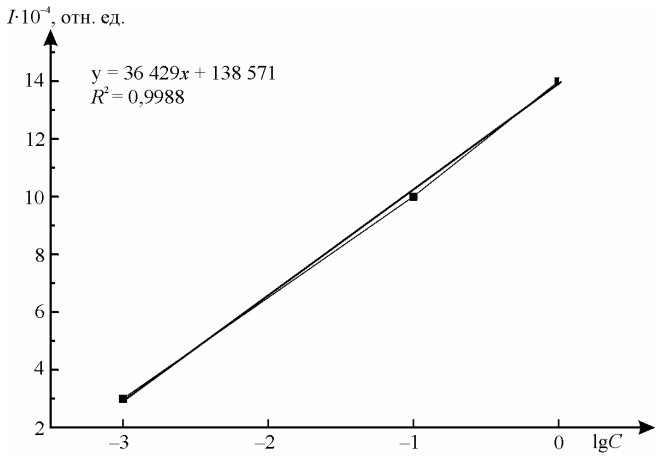

Рис. 2. Градуировочный график для определения концентрации кальция в высушенных каплях растворов альбумина

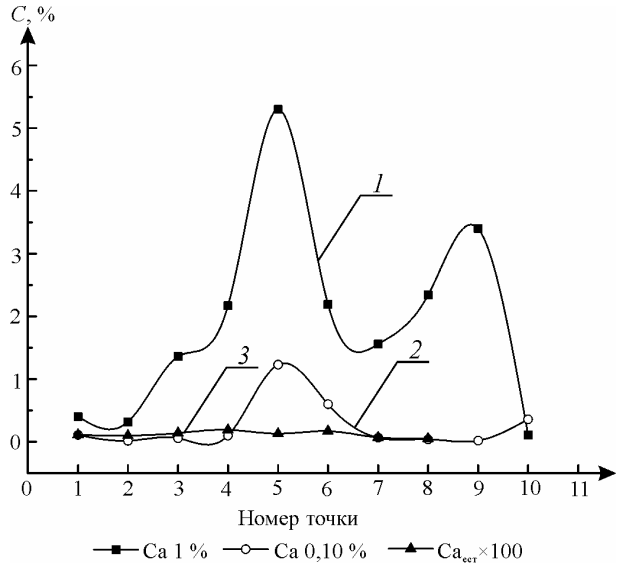

Рис. 3. Концентрация кальция в различных точках в образцах высушенных капель растворов альбумина

С использованием полученного уравнения рассчитаны значения концентраций кальция в различных точках капель, приведенные на рис. 3. Поскольку концентрация кальция в исходном растворе (0,001 %) мала по сравнению с добавками, то на рис. 3 значения интенсивности линий кальция для естественной концентрации умножены на 100.

Проведенные нами исследования позволяют сделать следующий вывод: при увеличении концентрации веществ с большим коэффициентом диффузии ($CaCl_2$) диффузия противодействует выносу этих веществ на край испаряющейся капли, вытесняя другие соли на периферию капли.

* * *

Настоящее исследование с использованием метода лазерного локального искрового спектрального анализа показало, что возбуждение сдвоенными лазерными импульсами анализируемой поверхности высохшей капли белка является перспективным направлением для полуколичественной оценки распределения эссенциальных и других элементов (в частности Al) по радиусу и может быть со временем использовано для поиска маркеров заболеваний.

Поскольку большая часть биологических жидкостей (плазма крови, спинномозговая жидкость, слюна и т. д.) также представляют собой растворы различных белков, применение указанного метода для анализа биологических объектов в сухом виде может дать дополнительные возможности прикладного использования лазерной спектрометрии. Метод также позволяет минерализовать пробу первым импульсом, а вторым импульсом непосредственно провести атомно-эмиссионный спектральный анализ потенциального объекта. Достоинством описанного метода является то, что эффективность проведенной коррекции может контролироваться повторными анализами в реальном времени.

Работа выполнялась при частичной поддержке ГПНИ «Конвергенция» (шифр 3.3.02.3 и 3.3.02.2).

1. Шабалин В.Н., Шатохина С.Н. Морфология биологических жидкостей человека. М., 2001.
2. Тарасевич Ю.Ю., Аюпова А.К. // ЖТФ. 2003. Т. 73. Вып. 5. С. 13.
3. Тарасевич Ю.Ю., Исакова О.Л., Кондухов В.В., Савицкая А.В. // Там же. 2010. Т. 89. Вып. 5. С. 45.
4. Максимов С.А. // Бюл. сиб. медицины. 2007. № 4. С. 80.
5. Berlyne G., Ben-Ari J., Pest D. // Lancet. 1970. Vol. 2. P. 494.
6. Lione A. // Pharmacol Ther. 1985. Vol. 29. P. 255.
7. Cannata-Andia J. // Semin Dial. 2001. Vol. 14. P. 5.
8. Berthon G. // Coord Ghem Rev. 2002. Vol. 228. P. 319.
9. Maton P. // Drugs. 1999. Vol. 57. № 6. P. 855.
10. Ittel T.H., Gladziwa U., Muck W., SIeberth H.G. // Eur J. Clin Invest. 1991. Vol. 21. P. 96.
11. Coburn J., Mischel M., Goodman W., Salusky I. // Am. J. Kidney Dis. 1991. Vol. 17. № 6. P. 708.
12. Campbell A. // Nephrol Dial Transplant. 2002. Vol. 17. № 2. P. 170.

Поступила в редакцию 09.12.11.

Чинь Нгок Хоанг – аспирант кафедры лазерной физики и спектроскопии. Научный руководитель – А.П. Зажогин.

Ирина Дмитриевна Пашковская – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник РНПЦ неврологии и нейрохирургии.

Жанна Игнатьевна Булойчик – кандидат химических наук, старший научный сотрудник кафедры физической оптики.

Анатолий Павлович Зажогин – доктор физико-математических наук, профессор кафедры лазерной физики и спектроскопии.