

Н.Х. Чинь¹, А.Л. Танин², И.Д. Пашковская², Ж.И. Булойчик¹,
Н.И. Нечипуренко²

¹Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь
²РНПЦ неврологии и нейрохирургии, Минск, Беларусь

**РАЗРАБОТКА МЕТОДИК АНАЛИЗА РАСПРЕДЕЛЕНИЯ
МАКРОЭЛЕМЕНТОВ ПО ПОВЕРХНОСТИ
ВЫСОХШИХ КАПЕЛЬ БЕЛКА
МЕТОДОМ ЛАЗЕРНОЙ ИСКРОВОЙ СПЕКТРОМЕТРИИ**

Процессы, протекающие при высыхании капли биологической жидкости на твердой смачиваемой подложке при комнатных условиях, привлекают пристальное внимание исследователей уже несколько десятков лет [1]. Интерес к этим объектам вызван, прежде всего, тем, что в последние годы в медицинской диагностике нашел применение метод клиновидной дегидратации [2]. Метод позволяет на основании анализа структур, образовавшихся при высыхании капли биологической жидкости (плазма крови, спинномозговая жидкость, слюна и т. д.), выявлять широкий набор различных заболеваний. Этот метод обладает неоспоримыми достоинствами для диагностики различных заболеваний человека на доклинической стадии.

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

Механизмы переноса коллоидных частиц в высыхающих каплях в настоящее время достаточно хорошо изучены как теоретически, так и экспериментально [3]. 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 соли распределены по диаметру капли более или менее равномерно [2, 4, 5].

Однако до сих пор нет полной ясности относительно химического состава периферической и центральной части высушенных капель.

В настоящей работе с целью разработки методик оценки пространственного распределения элементов в фациях нами проанализировано влияние количества добавленного кальция, как основного макроэлемента биологических жидкостей на перераспределение ряда элементов (Mg, Zn, Al) при высыхании капли яичного альбумина.

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. Экспериментально исследованы образцы высушенных растворов яичного альбумина с добавкой некоторых солей металлов с помощью лазерного излучения.

Методики исследования и пробоподготовки

Динамика развития процессов абляции и приповерхностного образования плазмы исследовалась методом атомно-эмиссионной многоканальной спектрометрии при воздействии сдвоенных лазерных импульсов на поверхность высушенных образцов альбумина с добавленными растворами хлоридов кальция различной концентрации (0,1 и 1 % Ca) в атмосфере воздуха при энергиях импульсов 20–60 мДж и между импульсными интервалами 0–15 мкс. На основании проведенных исследований были определены наиболее оптимальные параметры воздействия: энергии импульсов излучения 58 и 42 мДж (первый и второй импульсы, соответственно), временной интервал между сдвоенными импульсами 8 мкс.

В качестве объекта исследования выбран яичный белок. Неразбавленный белок куриного яйца представляет собой 10 %-ный раствор белка, так как он содержит: 88 % воды, 1 % углеводов, 0,5 % минеральные вещества, остальное – собственный белок. При этом 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 концентрация альбумина в растворе составляет \sim 0,5 % [6]. Такой раствор в дальнейшем и использовался в работе.

Каплю 0,5 % раствора альбумина с добавленным определенным количеством хлорида кальция 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 20–24 часов. Диаметр капель на поверхности полиэтиленовой подложки 5–7 мм. Средняя толщина ~ 0,7 мм. Использование предметного стекла, широко используемого в микроскопии в качестве подложки [3], в лазерном атомно-эмиссионном методе исключается из-за наличия в самом стекле большинства исследуемых элементов.

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

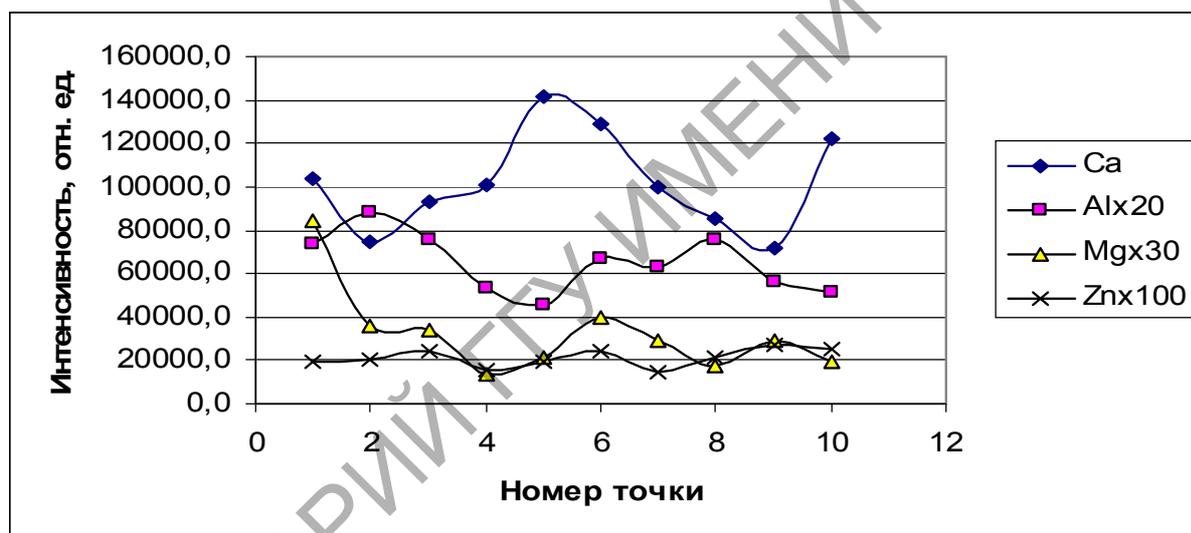


Рисунок 1 – Интенсивность линий Ca II (393,239 нм), Mg II (279,396 нм), Al I (396,153 нм), Zn I (334,502 нм), концентрация кальция – 0,1 %

Как видно из приведенного графика кальций в основном распределен по центру капли и краям, а остальные элементы и особенно алюминий преимущественно в тех областях, где концентрация кальция меньше.

При увеличении на порядок добавленного кальция распределение элементов по поверхности существенно изменяется (рисунок 2).

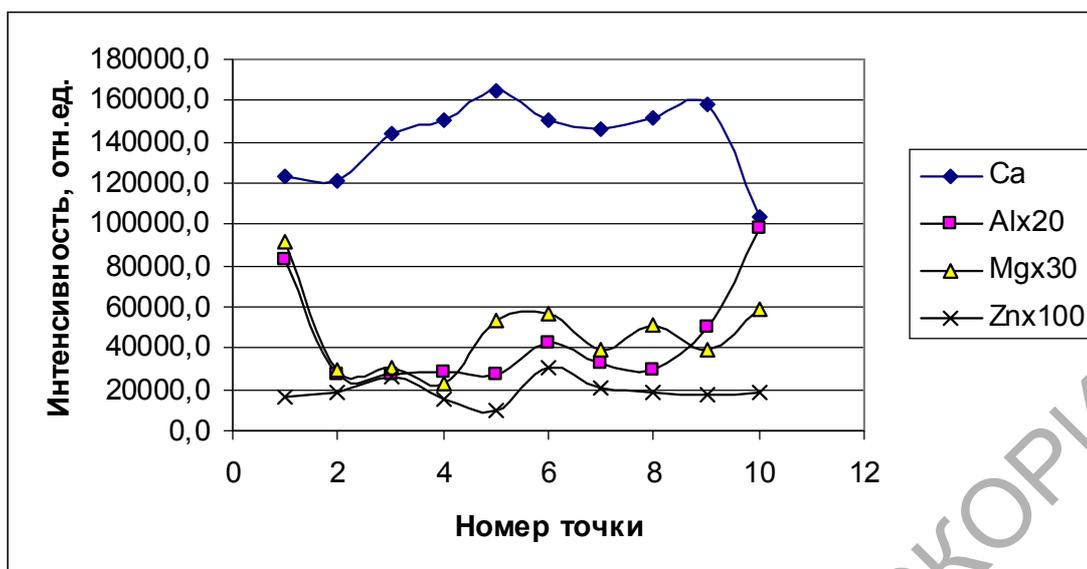


Рисунок 2 – Интенсивность линий Ca II (393,239 нм), Mg II (279,396 нм), Al I (396,153 нм), Zn I (334,502 нм), концентрация кальция – 1 %

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: интенсивность линии алюминия по краям примерно в 3–4 раза выше, чем по центру. Аналогичные изменения наблюдаются и для магния.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что при увеличении концентрации веществ с большим коэффициентом диффузии (CaCl_2), диффузия противодействует выносу их на край испаряющейся капли, в то же время, вытесняя другие соли на периферию капли.

Настоящее исследование с использованием метода лазерного искрового спектрального анализа показало, что возбуждение двойными лазерными импульсами анализируемой поверхности высохшей капли белка дает возможность дать полуколичественную оценку распределения эссенциальных элементов по радиусу. Разработка в перспективе может быть использовано для поиска маркеров при диагностике заболеваний человека.

Работа выполнялась при частичной поддержке ГПНИ «Конвергенция» 3.3.02.3.

Литература

1. Тарасевич, Ю.Ю. Качественный анализ закономерностей высыхания капли многокомпонентного раствора на твердой подложке / Ю.Ю. Тарасевич, Д.М. Православнова // ЖТФ. – 2007. – Т. 77. – Вып. 2.

– С. 17–21.

2. Шабалин, В.Н. Морфология биологических жидкостей человека / В.Н.Шабалин, С.Н. Шатохина. – Хризостом, 2001. – 304 с.

3. Deegan, R.D. Pattern formation in drying drops / R.D. Deegan // Phys. Rev.E. – 2000. – Vol. 61. – С. 475.

4. Тарасевич, Ю.Ю. Влияние диффузии на разделение компонентов биологической жидкости при клиновидной дегидратации / Ю.Ю. Тарасевич, А.К. Аюпова // ЖТФ. – 2003. – Т. 73. – Вып. 5. – С. 13.

5. Влияние режима испарения на пространственное перераспределение компонентов в испаряющейся капле жидкости на твердой горизонтальной подложке / Ю.Ю. Тарасевич, О.Л. Исакова, В.В. Кондухов, А.В. Савицкая // ЖТФ. – 2010. – Т. 89. – Вып. 5. – С. 45.

6. Биохимия белков. Методические указания к лабораторным занятиям по биологической химии для студентов II курса медицинского факультета. – Петрозаводск, 1999. – 31 с.