

УДК 577.32

ИЗМЕНЕНИЕ ОПТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ ПРИ НАРУШЕНИЯХ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ

А. В. Бойко, В. Б. Кошелев, Г. П. Петрова, Ю. М. Петрусевиц,
О. Е. Фадюкова, Д. И. Тен

(кафедра молекулярной физики; кафедра низких температур)

E-mail: petrova@phys.msu.su

Методом статического и динамического рассеяния света исследованы молекулярные параметры водных растворов сыворотки крови крыс при нарушениях мозгового кровообращения. Из сравнения полученных данных с контрольными значениями обнаружено уменьшение эффективных масс рассеивающих частиц и их гидродинамических радиусов при развитии сосудистой патологии. Это дает основание считать, что метод светорассеяния является достаточно чувствительным для анализа и мониторинга сосудистых заболеваний.

Введение

Развитие патологических процессов в организме сопровождается изменениями ряда молекулярных параметров белков, входящих в состав сыворотки крови.

В настоящей работе изучалось изменение молекулярных параметров белков в водных растворах сыворотки крови животных (крыс) при искусственно вызванной патологии с целью разработки новых физических методов диагностики нарушений мозгового кровообращения. Исследования проводились с помощью методов статического и динамического рассеяния света. В качестве патологии у животных была искусственно вызвана ишемия мозга и геморрагический инсульт.

Ишемия головного мозга возникает вследствие снижения мозгового кровотока и ограничения поступления в нервную ткань кислорода и глюкозы и является наиболее распространенной причиной нарушений функций мозга. Составляя около 2% общей массы тела человека, головной мозг потребляет 20–25% поступающего в организм кислорода и до 70% свободной глюкозы. Для исследования механизмов развития ишемии мозга разработаны различные экспериментальные модели для исследования данной патологии в опытах на животных. В этой работе была использована модель гипоксии, возникающей при перевязке сонной артерии. Геморрагический инсульт у специальной линии крыс (Крушинского–Молодкиной) вызывался сильным акустическим воздействием на животных.

Методы исследования

Особенности рассеяния света в растворах сыворотки крови определяются физическими параметрами растворенных молекул, прежде всего альбумина и глобулина.

Для исследования межмолекулярного взаимодействия, подвижности и поляризационных свойств

растворов макромолекул, включая водные растворы белков, очень эффективными являются методы статического и динамического рассеяния света.

Согласно теории Дебая [1], для разбавленных растворов макромолекул имеет место соотношение

$$\frac{cH}{R_{90}} = \frac{1}{M} + 2Bc + \dots, \quad (1)$$

которое позволяет измеряемую в эксперименте величину R_{90} — рэлеевский коэффициент или мутность, представить в виде вириального разложения по малым концентрациям. Постоянная H определяется параметрами оптической установки и инкрементом показателя преломления исследуемого раствора. Метод дает возможность прямого определения молекулярной массы M , для чего необходимо измерить R_{90} при нескольких концентрациях и экстраполировать полученную зависимость к концентрации $c = 0$. Второй вириальный коэффициент B характеризует степень отклонения поведения раствора от идеального и служит мерой межмолекулярного взаимодействия в растворе.

Для растворов заряженных макромолекул — какими являются белки — очень существенным оказывается влияние поверхностного заряда молекулы на ее поведение в растворе, в частности, на параметр межмолекулярного взаимодействия.

Динамические параметры макромолекул могут быть изучены с помощью метода корреляционной спектроскопии. В этом методе исследуется корреляционная функция флуктуаций интенсивности рассеянного света, обусловленных броуновским движением частиц раствора. При этом могут быть определены коэффициенты трансляционной диффузии частиц и их гидродинамические радиусы.

В работе [2] было показано, что концентрационные зависимости коэффициента трансляционной диффузии и параметра рассеяния определяются одним и тем же вириальным коэффициентом. Так связь между коэффициентом D_t , массой молекулы M

и характеристической вязкостью белкового раствора η определяется уравнением

$$D_t = D_0 \{1 + (2BM - [\eta])c\}, \quad D_0 = \frac{kT}{6\pi\eta_0 R}, \quad (2)$$

где R — радиус частицы.

В классических формулах (1) и (2) зависимость от зарядового состояния белковой молекулы в явном виде отсутствует [1]. Однако можно предположить, что, как коэффициент B , так и характеристическая вязкость η являются функциями электростатических параметров макромолекул. Это было подтверждено экспериментально в работе [2], где было показано, что коэффициент D_t нелинейно зависит от заряда на поверхности белка (величины pH) и имеет минимум в изоэлектрической точке, подобно параметру B .

Экспериментальные результаты

Сыворотка — жидкая часть крови, отделенная от форменных элементов и фибриногена. В норме сыворотка состоит на 90% из воды, на 9% из белка и на 0.87% из растворенных солей [3, 4]. В табл. 1 представлены основные белковые фракции сыворотки крови и их концентрации.

Таблица 1
Белки сыворотки крови [4]

Основные белковые фракции	Концентрация	
	г/л	%
Альбумины	35–45	56.5–66.8
Глобулины	23–35	33.2–43.5
α_1 -глобулины	3–6	3.0–5.6
α_2 -глобулины	4–9	6.9–10.5
β -глобулины	6.0–11.0	7.3–12.5
γ -глобулины	7.0–15.0	12.9–19.0
Фибриноген	2.0–4.0	0.2–0.4

В нашей работе опыты проводились на животных двух экспериментальных групп: 1-я — контрольная группа, 2-я — опытная группа — крысы, подвергнутые операции по перевязке сонной артерии или акустическому воздействию.

Рассеивающие свойства водных растворов сыворотки крови изучались на оптической установке с He-Ne лазером ($\lambda = 632$ нм) и фотоэлектронной регистрацией рассеянного излучения [5].

Основные параметры, которые исследовались в эксперименте, это интенсивность интегрального рассеяния (под углом 90° к падающему лучу), масса рассеивающих частиц и коэффициент межмолекулярного взаимодействия.

В табл. 2 представлены результаты обследования методом статического рассеяния растворов сыворотки крови животных, у которых вызывалось нарушение мозгового кровообращения путем перевязки сонной артерии. Указаны параметры, полученные на образцах крови, взятой до и после операции. Образцы соответствуют серии *ишемия (экспери-*

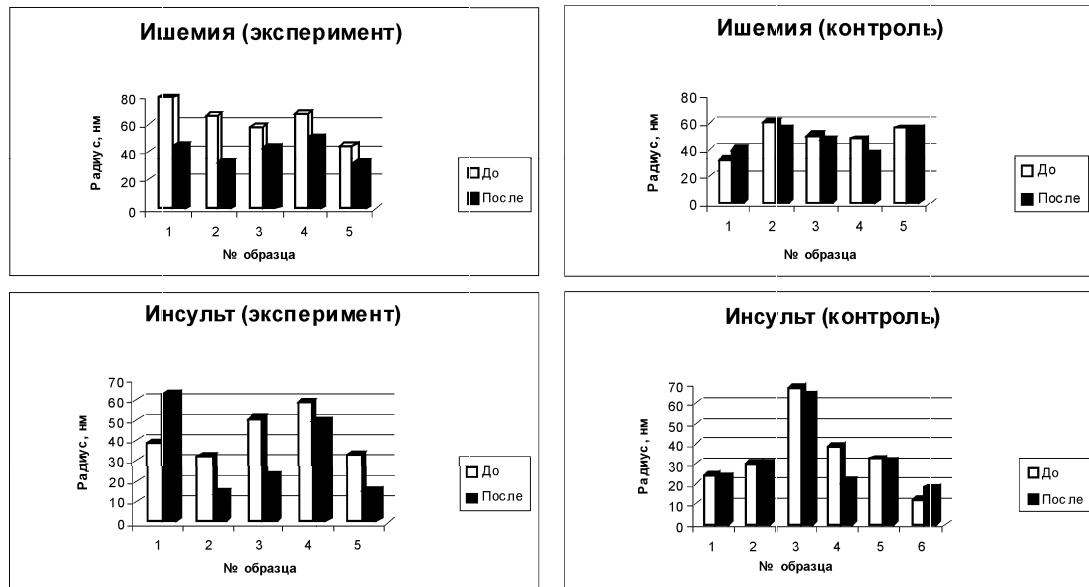
Таблица 2
Экспериментально полученные значения молекулярной массы M , второго вириального коэффициента B и среднего радиуса рассеивающих частиц для образцов сыворотки крови крыс

№ образца	M_{before} , г/моль	M_{after} , г/моль	R_{before} , нм	R_{after} , нм
<i>Ишемия (эксперимент)</i>				
1	115 740	85 000	78.7	44.1
2	28 000	20 200	65.4	32.1
3	21 000	16 600	57.5	42.6
4	78 700	55 000	66.7	50.4
5	83 000	76 000	44.2	31.7
<i>Ишемия (контроль)</i>				
1	74 100	76 000	32.3	40.2
2	29 948	23 347	60.1	56.3
3	70 500	69 100	51.1	47.5
4	35 900	31 500	48.8	37.6
5	20 500	20 000	56.5	55.6
<i>Инсульт (эксперимент)</i>				
1	38 000	41 600	38.7	62.5
2	42 600	39 200	31.7	14.2
3	36 000	15 200	50.5	23.6
4	29 154	24 509	59.3	50.1
5	37 300	32 258	33.4	14.9
<i>Инсульт (контроль)</i>				
1	31 900	28 500	23.9	23.6
2	76 400	77 000	30.2	30.5
3	81 200	76 000	67.8	64.5
4	24 700	23 100	38.7	20.9
5	36 088	39 717	32.6	31.6
6	16 700	17 900	11.8	18.5

мент). Эти результаты сравниваются с данными обследования сыворотки, полученной от животных, которые подвергались так называемой ложной операции (без перевязки сонной артерии). В таблице эти результаты представлены как *ишемия (контроль)*. Как видно из таблицы, в случае развития ишемии головного мозга, эффективная масса рассеивающих частиц уменьшается.

Во второй половине табл. 2 приведены молекулярные параметры растворов сыворотки крови крыс, у которых вызывался геморрагический инсульт (*инсульт (эксперимент)*). В этом случае, так же как для ишемии, наблюдается некоторое уменьшение эффективной массы рассеивающих частиц. Для сравнения были взяты образцы сыворотки крови крыс той же серии (Крушинского–Молодкиной). В таблице эти данные обозначены *инсульт (контроль)*. Как видно из таблицы для контрольных образцов величины эффективной массы рассеивающих частиц имеют более близкие значения.

Динамические параметры — коэффициент диффузии и средний эффективный радиус рассеивающих частиц измерялись с помощью лазерного корреляционного спектрометра [6]. Длина волны света, рассеянного частицами, находящимися в броуновском движении, отличается от длины волны источника возбуждения. ФЭУ, фиксирующий пучки с различными длинами волн, работает при этом



Диаграммы для величин эффективных радиусов

как квадратичный детектор. Выходной фототок представляет собой последовательность импульсов, определяемую флуктуациями результирующей интенсивности. Из получаемой в результате корреляционной функции интенсивности рассеянного света определяется коэффициент диффузии частиц и их гидродинамические радиусы.

Методом динамического рассеяния света с помощью оптического фотонного коррелятора были обследованы 10 образцов сыворотки крови самцов крыс (до и после операции по перевязке сонной артерии), а также 11 образцов сыворотки крови самок животных (до и после развития геморрагического инсульта). Были получены средние значения эффективного радиуса частиц, определяемого по коэффициенту трансляционной диффузии. Эксперимент проводился двойным слепым методом.

Величины эффективных радиусов, измеренных для случая *эксперимент и контроль*, также приведены в табл. 2 и на рисунке. Полученные результаты показывают существенное различие этого параметра для здоровых животных (до операции) и животных, перенесших операцию.

Анализ табл. 2 показывает взаимосвязь рассчитанной массы M рассеивающих частиц, параметра межмолекулярного взаимодействия (коэффициента B) с эффективным радиусом частицы R , зависящим от динамического диффузионного коэффициента. Все перечисленные величины заметно изменяются в случае рассмотренной патологии.

Причины уменьшения эффективных радиусов и масс рассеивающих частиц при сосудистой патологии пока не ясны. Вероятно это связано с неадекватностью используемых классических формул для расчета статических и динамических параметров рассеивающих частиц в случае сильных электростатических взаимодействий. Для более детальных выводов необходимо проведение дополнительных ис-

следований, тем более, что параметры сыворотки крови сильно зависят от индивидуальных особенностей животных.

Выводы

Методом статического и динамического рассеяния света измерены молекулярные параметры сыворотки крови крыс при различной сосудистой патологии. Из сравнения полученных данных с контрольными значениями обнаружено уменьшение эффективных масс рассеивающих частиц и их радиусов при развитии ишемии и геморрагического инсульта.

При этом можно считать, что метод светорассеяния может оказаться весьма чувствительным для анализа и мониторинга сосудистых заболеваний.

Работа проводилась в рамках междисциплинарного научного проекта МГУ «Оптика крови и диагностика сосудистых и онкологических заболеваний» (2001–2002 гг.).

Литература

1. *Debye P.J.* // Appl. Phys. 1946. **15**. P. 338.
2. *Петрова Г.П., Петрусевиц Ю.М.* // Биомед. радиоэлектроника. 2000. № 3. С. 4.
3. *Винчестер А.* Основы современной биологии. М., 1967.
4. *Ермолаев М.В.* Биологическая химия. М., 1983. С. 225–238.
5. *Петрова Г.П., Петрусевиц Ю.М., Тен Д.И.* // Квантовая электроника. 2002. **32**, № 10. С. 1.
6. *Petrova G.P., Petrusevich Yu.M., Ten D.I. et al.* // Proc. Int. Conf. Advanced Laser Technologies ALT-02. 2002. SPIE. **5147**. P. 370.
7. *Гусев Е.И., Скворцова В.И.* Ишемия головного мозга. М., 2001.
8. *Одинак М.М., Михайленко А.А., Иванов Ю.С., Семин Г.Ф.* Сосудистые заболевания головного мозга. СПб., 1998.