

УДК 612.461.175

ИССЛЕДОВАНИЕ ИНФРАКРАСНЫХ СПЕКТРОВ ПОГЛОЩЕНИЯ В ОБРАЗЦЕ ВЫСУШЕННОЙ КАПЛИ МОЧИ

Прахин Е.И., Проворов А.С., Реушев М.Ю., Бороздун С.В., Сизых А.Г.,
Кекин Ю.В., Капсаргин Ф.П.

Представлены результаты исследований инфракрасных спектров поглощения в образцах высушенной капли мочи. Применение метода ИК – спектроскопии для исследования образцов мочи в виде высушенной капли позволяет повысить диагностическую значимость молекулярного анализа. Полученные результаты могут быть использованы при разработке новых методов ранней диагностики различных заболеваний

Спектроскопические методы исследования биожидкостей играют значительную роль при изучении различных заболеваний. Для определения элементного состава биожидкостей наиболее распространены методы эмиссионной и атомной абсорбционной спектроскопии [1]. При изучении комплексных соединений в достаточно сложно организованной биожидкости элементный анализ играет лишь вспомогательную роль для определения весовых долей элементов. Качественное определение комплексных соединений позволяют выполнять методы флуоресцентной спектроскопии, спектроскопии комбинационного рассеяния (КР), различные виды хроматографии и абсорбционная инфракрасная (ИК) спектроскопия [1, 2]. Среди приведенных методов значительный интерес представляет абсорбционная ИК - спектроскопия, позволяющая выявить по характерным полосам поглощения функциональные молекулярные группы и определить качественные характеристики биожидкости в целом.

При различных заболеваниях, одним из наиболее распространенных методов клинического обследования является анализ мочи. Благодаря селективности определения различных молекулярных групп методами ИК – спектроскопии, становится возможным повысить информативность анализа мочи.

Известно, что для проведения качественного спектрального анализа значительную роль играет способ приготовления исследуемых образцов. В связи с тем, что моча в своем составе содержит значительное количество воды проведение измерений ИК – спектров связано со значительными трудностями, обусловленными поглощением водой. В ряде работ был представлен метод приготовления образцов мочи способом “высохшей капли” по системе ЛИТОС [3]. Этот способ позволяет получить пространственную фрагментацию различных комплексов мочи, вследствие

градиентного процесса ее самоорганизации при высыхании.

Пространственная фрагментация органических комплексов приводит к появлению существенных отличий в их составе между краевой и центральной зоной. При анализе образцов приготовленных данным способом в основном использовались методы кристаллографического описания и определялись химические элементы с помощью рентгеноспектрального микроанализа и фазового анализа.

На наш взгляд, метод приготовления образцов мочи способом “высохшей капли” пригоден для проведения ИК - спектроскопического анализа ее биохимических комплексов. Во-первых, данный способ приготовления образцов позволяет исключить не связанную с биокомплексами мочи воду, что снижает общий уровень поглощения ИК - излучения в исследуемом образце. И во-вторых, появляется возможность пространственно локализовать проведение спектрального анализа капли мочи вследствие ее фрагментации при высыхании

Целью настоящей работы явилось применение метода ИК – спектроскопии для исследования образцов мочи приготовленных способом “высохшей капли”.

Исследование проводилось на образцах мочи четверых больных с различной патологией.

1. Больной - 44 г., диагноз: мочекаменная болезнь, рентген-негативный камень левого мочеточника. Общий анализ мочи от 24.04.03 г. – белка нет, удельный вес 1016, эпителий плоский –единичный в поле зрения, лейкоциты-1-2 в поле зрения, эритроциты неизмененные-2-4 в поле зрения, слизь +++.

2. Больной - 32 г., диагноз: рецидивирующая паховая грыжа слева. Гидроцеле слева. Общий анализ мочи от 24.04.03 г. - белок 53 мг/л, удельный вес 1024, эпителий плоский-1-2 в поле зрения, эритроциты-1-3 в поле зрения, слизь+, бактерии+.

3. Больной - 44 г., диагноз: мочекаменная болезнь, камни мочеточников. Хронический пиелонефрит. Анализ мочи от 24.04.03 г. - белок-392 мг/л, удельный вес 1014, щелочная реакция, эпителий плоский 1-3 в поле зрения, лейкоциты-0-1-2 в поле зрения, эритроциты - значительное количество, оксалаты +, трипельфосфаты +, бактерии ++, слизь +.

4. Больной- 76 лет, диагноз: острый геморрагический цистит. Киста левой почки. Макрогемагурия. Анализ мочи от 24.04.03 г. - белок 225 мг/л, удельный вес 1024, лейкоциты- 15-17 в поле зрения, эритроциты - большое количество,

цилиндры гиалиновые 0-1 в поле зрения, оксалаты +, бактерии ++.

Исследуемые образцы утренней порции мочи объемом 5 мкл наносились на плоское зеркало с Al -покрытием при помощи мерной пипетки. При этом капли на поверхности зеркала принимали форму близкую к сферической. Капли сушились в сушильном шкафу при комнатной температуре + 25 C⁰ на горизонтальной поверхности при отсутствии сторонних конвективных потоков воздуха в течение 10 часов. Изображения высохших образцов капель мочи взятых от разных пациентов приведены на рисунке 1 (a, b, c, d).

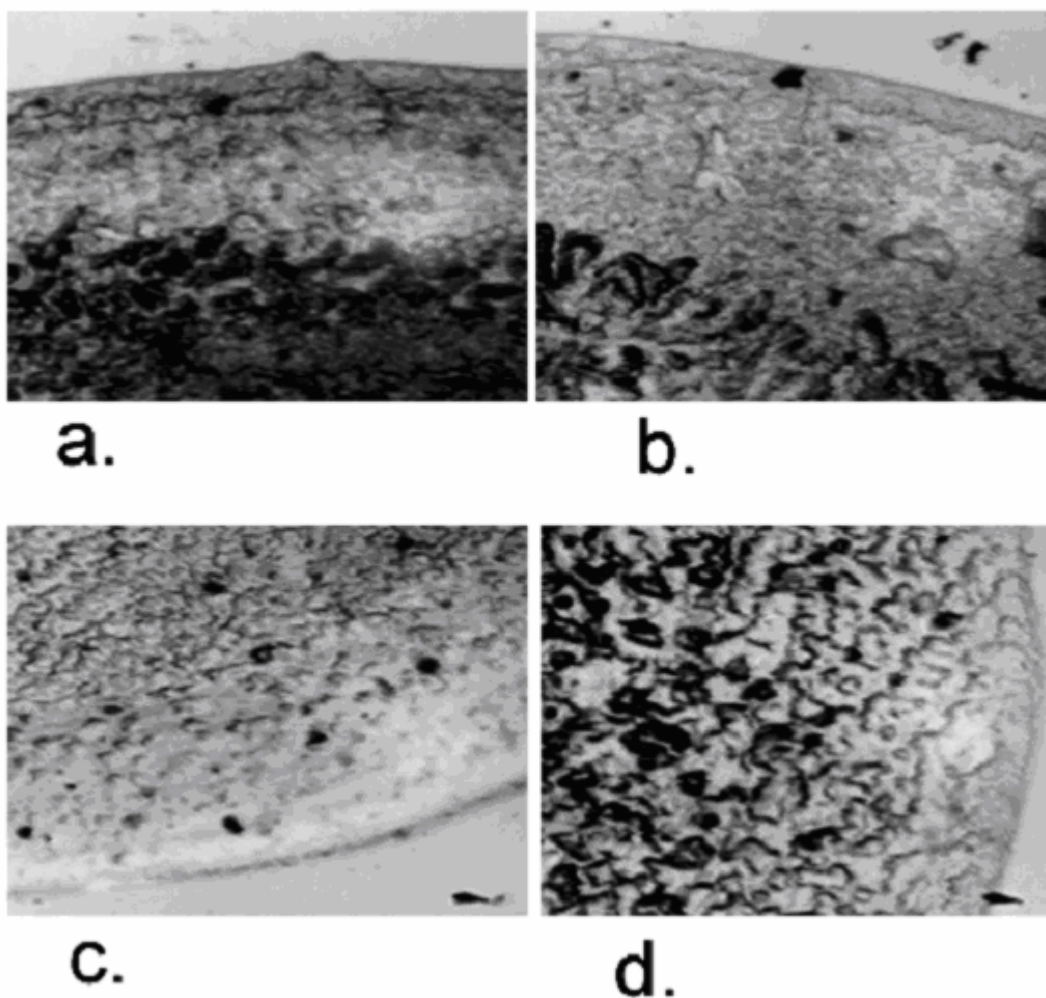


Рис. 1. Образцы высушенной капли мочи.
a. Больной - 1; b. Больной - 2; c.- Больной - 4; d. Больной - 3.

Изображения получены путем регистрации образцов краевой зоны высохшей капли при помощи Веб-камеры “AverCam” с разрешением 800 x 600 точек на дюйм, присоединенной к стандартному микроскопу “БИОЛАМ”. Как можно увидеть из рисунков образцы капель при высыхании приобретают градиентную структуру характерную для завершившегося процесса самоорганизации биожидкостей хорошо описанной у

ряда авторов [3]. Отчетливо различались аморфные краевые белковые зоны и центральные зоны, насыщенные солями, отличающиеся размерами кристаллов и их концентрацией на поверхности.

Измерения спектров поглощения образцов проводились в двух пространственно разделенных точках вблизи краевой белковой зоны и в центре высохшей капли. ИК-спектры были получены на ИК - микроскопе модели “InspectIR

Plus“ фирмы "SpectraTECH" (США), на базе ИК - спектрофотометра с Фурье преобразованием, модель "Imprast 400" фирмы "Nicolet" (США). Анализ производился в диапазоне волновых чисел $4000-650 \text{ см}^{-1}$ с разрешением 1.928 см^{-1} . Конструктивные возможности спектрометра позво-

ляли осуществлять измерения спектров исследуемых образцов с пространственным разрешением порядка 0.6 мм . Изображение измеренных спектров поглощения представлены на рисунках 2 (а, b) и 3 (а, b).

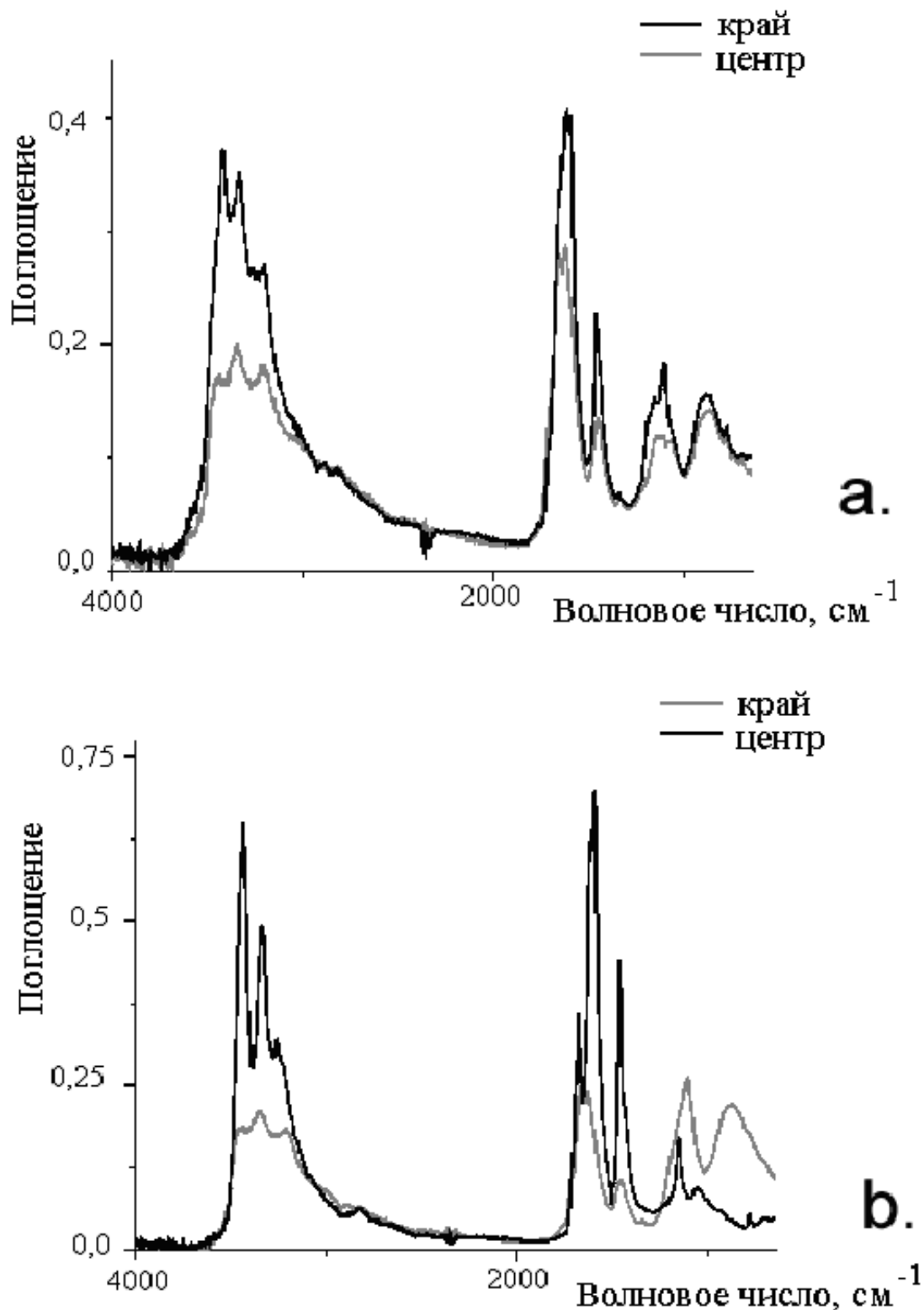


Рис. 2. Изображения ИК - спектров поглощения в образцах мочи больных.
 а. Больной – 1; b. Больной – 2.

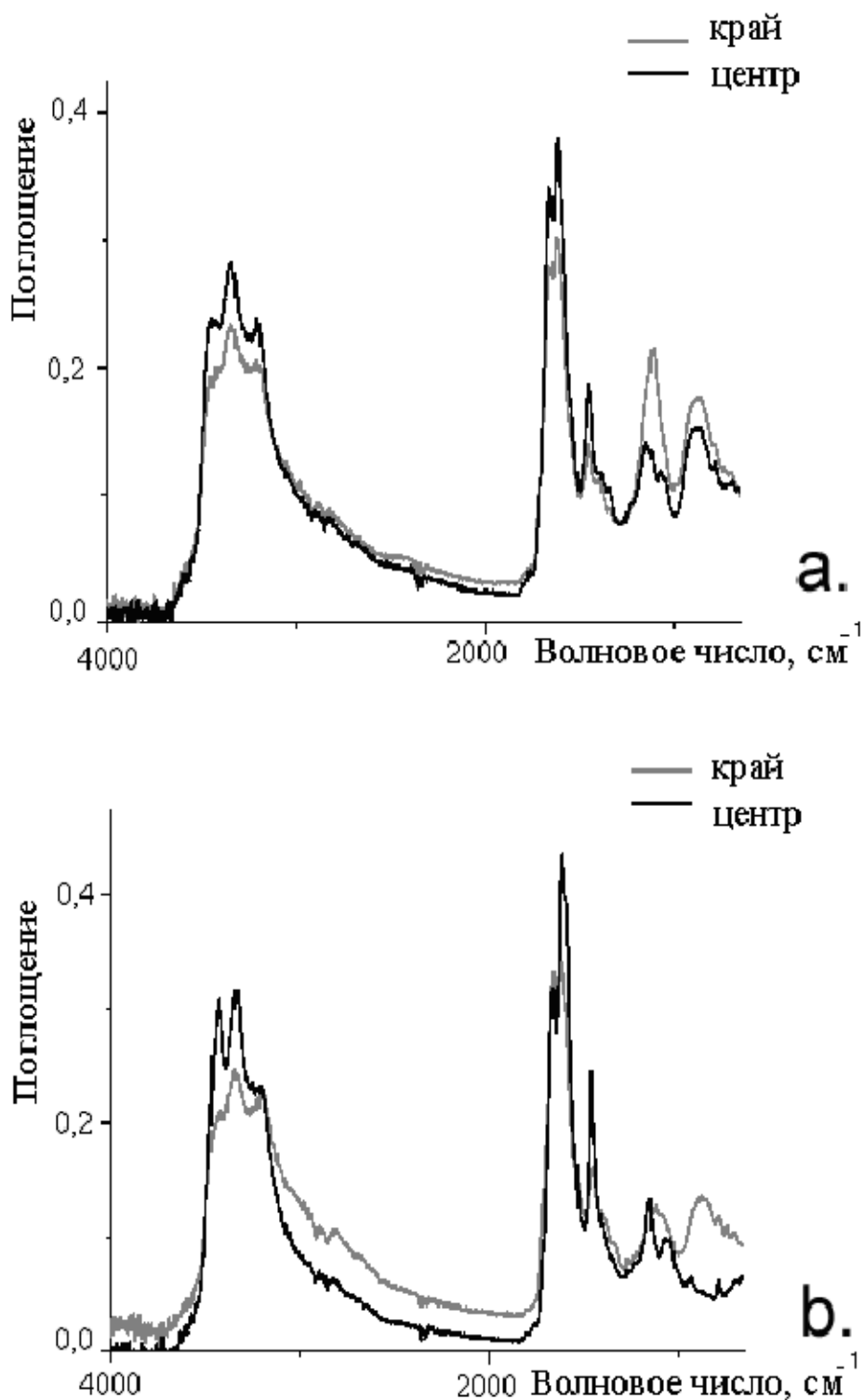


Рис. 3. Изображения спектров поглощения в образцах больных.
Больной - 4; б. Больной -3.

Предварительная расшифровка спектров позволила определить наличие колебательных полос характерных для функциональных групп молекулярных соединений, присутствующих в моче. Наиболее интенсивно проявляются валентные и деформационные колебания мочевины $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ и её производных. Отмечено смещение положения максимумов в спектрах поглощения

мочевины полученных на образцах мочи разных больных. Величина сдвига составляет $10\text{--}20\text{ см}^{-1}$, что может иметь значение для выявления и дифференциации компонентов в смеси. Сравнительный анализ образцов показал на существенное отличие спектров поглощения измеренных вблизи краевой зоны и в центре высушенной капли. В краевой зоне спектры поглощения мо-

чевины в диапазоне частот от 3500 см^{-1} до 3200 см^{-1} перекрываются широкими полосами поглощения высокомолекулярных белковых компонентов мочи, изучение которых может дать дополнительную информацию о биохимических сдвигах при различных заболеваниях. В центральной зоне образцов спектр мочевины более контрастен и позволяет обнаружить характерные полосы с максимумами в области 3440 см^{-1} , 3345 см^{-1} , 3261 см^{-1} , 1680 см^{-1} , 1605 см^{-1} , 1464 см^{-1} , 1155 см^{-1} , 1056 см^{-1} и 557 см^{-1} . Особый интерес представляет возможность определения методом ИК - спектроскопии наличия в образцах мочи больных соединений пенициллиновой группы. Расшифровка спектров поглощения в образцах мочи больных, получавших антибактериальную терапию, позволила уверенно регистрировать соединения пенициллиновой группы в области от 1000 см^{-1} до 800 см^{-1} . Исследование присутствия пенициллина в моче позволит в дальнейшем проводить анализ эффективности действия антибактериальных препаратов при различных воспалительных процессах.

По результатам работы можно сделать вывод о том, что применение метода ИК – спектроскопии для исследования образцов мочи в виде высушенной капли позволяет существенно детализировать результаты биохимического анализа мочи. Полученные результаты позволяют повысить диагностическую значимость молекулярного анализа с целью выявления нарушений механизмов гомеостаза, что очень важно при разработке новых методов ранней диагностики и лечения различных заболеваний.

Литература

1. Л. Беллами.// Инфракрасные спектры сложных молекул. М.: ИЛ, 1963.
2. А. Гордон, Р. Форд. Спутник химика. Физико-химические свойства. Методики, библиография. М.: "Мир", 1976.
3. Кристаллографические методы исследования в медицине. Под ред. академика РАМН, профессора В.Н. Шаболина. Сб. научн. Трудов 1 Всероссийской научно- практической конференции, М.: МОНИКИ, 1997

Research of infrared spectra of absorption in a sample of the dried up drop urina

Prakhin Ye.I., Provorov A.S., Reushev M.Yu., Borozdun S.V., Sizykh A.G., Kekin Yu.V., Kapsargin F.P.

The results of researches of infrared spectra of absorption in samples of the dried up drop of urina are presented. Application of a method IR - spectroscopy for research of urina samples as the dried up drop allows increasing the diagnostic importance of the molecular analysis. The received results can be used by development of new methods of early diagnostics of various diseases