

SALIENT FEATURES OF THE STRUCTURE OF ANTRAL PART OF THE STOMACH AND GASTRO-DUODENAL JUNCTION

V. I. Pivtorak, M. M. Vovk

Abstract. Macromorphological and volumenal characteristics of the gastroduodenal junction were studied with the help of morphometry in fifty male cadavers. The presence of annular pocket in the ampule of the duodenum was found and its morpho-functional parameters were determined.

Key words: stomach, gastro-duodenal junction, structure.

State Medical University n. a. N. I. Pirogov (Vinnitsa).

УДК 612.1:612.46

О. В. Пишак, С. Г. Гуминецкий, В. П. Пишак, П. М. Григоришин ИССЛЕДОВАНИЕ ПОГЛОЩАЮЩИХ И РАССЕИВАЮЩИХ СВОЙСТВ ПЛАЗМЫ КРОВИ И МОЧИ

Буковинская государственная медицинская академия,
Черновицкий государственный университет им. Ю. Федьковича

Ключевые слова: белки плазмы крови, УФ-спектроскопия, альбумин, глобулин, светорассеивание.

Резюме. Исследованы поглощающие и рассеивающие свойства белков плазмы крови и мочи в спектральном диапазоне 190-350 нм. Установлено, что в области аналитической полосы поглощения $\lambda = 280$ нм, поглощение альбуминов и глобулинов, растворенных дистиллированной водой, существенно различны. Показано, что молекулы глобулинов являются светорассеивающими, а растворы альбуминов в исследуемом спектральном интервале — оптически однородны. Отмеченные особенности легли в основу разработки оптического метода отдельного определения концентрации альбуминов и глобулинов в биологических средах.

Введение. Основную часть белков плазмы крови и мочи составляют альбумины и глобулины. Их количество, а также соотношение альбумин/глобулиновый коэффициент, являются важным диагностическим тестом. Причем, при количественном анализе плазмы крови важно установить отклонения значений их концентраций от нормы, а при исследовании мочи — выявление наименьших концентраций (на уровне свободных аминокислот), оценка их количества в суточном диурезе с целью ранней диагностики заболеваний почек и мочевых путей. В медицинской практике эти задачи решаются с помощью электрофоретических, или иммуно-химических методов. В данной работе рассматриваются возможности использования для этих целей оптических методов. При этом учитывается тот факт, что биологические объекты, как правило, являются оптически неоднородными, то есть светорассеивающими.

УЛЬТРАФИОЛЕТОВЫЕ СПЕКТРЫ ПОГЛОЩЕНИЯ БЕЛКОВ

Ультрафиолетовая (УФ) спектроскопия биологических объектов основывается на анализе спектров поглощения аминокислот свободных и связанных с белками в спектральном диапазоне $\lambda = 360$ нм. Известно [8, 9], что все двадцать

аминокислот имеют максимум в спектре поглощения в области длин волн $\lambda = 200 - 210$ нм и только три ароматические (тирозин, триптофан и фенилаланин) еще в области $\lambda = 260 - 280$ нм; для $\lambda > 315$ нм УФ поглощение аминокислотами практически отсутствует. Нами исследовались спектры поглощения как отдельных белков, так и их смеси в биологических средах: плазме крови и моче пациентов.

Исследования проводились на спектрофотометре СФ-46 с усовершенствованным электроннорегистрирующим блоком, что дает возможность получить спектральное разрешение в $1,5 - 2,0$ нм. Выявление и учёт влияния светорассеивания на спектры поглощения, исследовавшихся биосубъектов осуществлялось путём параллельных измерений на СФ-4А с приставкой в виде шарового фотометра [6] с таким же спектральным разрешением. В работе [6] показано, что коэффициент пропускания τ рассеивающего раствора, содержащегося в кювете определенной толщины l , которая во время измерений располагается в центре шарового фотометра, вычисляется с помощью выражения:

$$\tau = \frac{\frac{N_3}{N_2} - \rho}{\frac{N_1}{N_2} - \rho},$$

где ρ — коэффициент отражения плоской стенки заполненной кюветы, N_1 — отсчёт приемника при направлении пучка лучей на кювету с растворителем; N_3 — на такую же кювету с рассеивающим раствором; N_2 — при попадании пучка на внутреннюю поверхность сферы, покрытую диффузно-рассеивающим материалом.

Таким образом, для определения коэффициента пропускания τ исследуемого раствора необходимо знать коэффициент отражения ρ от стенки кюветы. Его можно определить, если в кювету, заполненную растворителем, поместить полностью поглощающий светонепроницаемый экран (например, стеклянную или металлическую пластинку, покрытую высококачественным чёрным бархатом). Измерение ρ для данного типа кювет производится один раз и только периодически проверяется. При замене кювет значение ρ находится заново для каждой длины волны в исследуемом спектральном интервале.

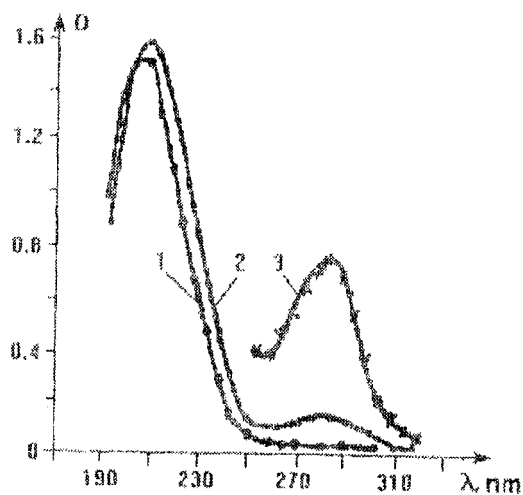


Рис. 1. Спектральная зависимость оптической плотности D для:

- 1 — альбумина, концентрация 12 мг %;
- 2 — γ — глобулина, концентрация 12,5 мг %;
- 3 — γ — глобулина, концентрация 100 мг %.

На рис. 1 представлены некоторые результаты измерений, проведенных на СФ-46, спектров поглощения на примере раствора альбумина (кривая 1) и γ — глобулина (кривые 2 и 3), выделенных из плазмы крови человека. И здесь, и в дальнейшем использовались кварцевые кюветы толщиной $l = 1$ см.

Из рис. 1 следует, что спектры оптической плотности D для альбумина и γ — глобулина в области $\lambda = 280$ нм существенно отличаются: во-первых, для примерно одинаковых концентраций поглощение γ — глобулина выше, чем для альбумина; во-вторых, для γ — глобулина наблюдается максимум в поглощении, обусловленный наличием в нем ароматической аминокислоты триптофана, которая имеет максимум при

$\lambda = 279$ нм [3]; в то же время альбумин, очевидно, ароматических аминокислот не содержит. В качестве растворителя использовалась дистиллированная вода, поэтому растворы альбумина любой концентрации получились оптически однородными, а для глобулинов — светорассеивающими. В результате, в области $\lambda > 315$ нм оптическая плотность \mathcal{D} растворов альбумина практически равна нулю, в то время как для глобулинов она может быть значительной, особенно при больших концентрациях.

На рис. 2 приведены типичные спектры поглощения биологических сред: плазмы крови (кривая 1) и мочи (кривая 2) в норме для здорового человека. Для получения всего спектра плазма крови разводилась до необходимой концентрации физиологическим раствором, а моча — дистиллированной водой. Пробы мочи отбирались из суточного диуреза пациента.

Измерения выполнены на шаровом фотометре с использованием для расчётов формулы (1) $\mathcal{D} = -\lg \tau$. Видно, что спектры поглощения мочи и плазмы крови имеют одинаковый характер: наличие двух максимумов и практическое равенство нулю оптической плотности в области $\lambda > 320$ нм. Однако, есть и существенные отличия: положение обоих максимумов в спектре поглощения мочи сдвинуто по сравнению со спектром поглощения плазмы крови в длинноволновую сторону на 10-12 нм. Это значит, что одни и те же белки и свободные аминокислоты в этих биологических средах связываются в комплексы, отличающиеся между собой как по химическому составу, так и по структуре и прочности связей. Кроме того, выявлено, что разные аминокислоты, вступая в комплексы в биологических средах также по-разному влияют на характер спектра поглощения. Так, известно [5, 10], что основной вклад в величину \mathcal{D} в области длинноволнового максимума поглощения для плазмы крови вносит поглощение находящегося в глобулине триптофана, а для мочи здорового человека, в которой электрофоретическими методами белка не обнаружено, — поглощение свободного тирозина. Поскольку раствор отдельно взятого триптофана в дистиллированной воде имеет максимум поглощения при $\lambda = 279$ нм, а раствор тирозина — при $\lambda = 275$ нм, заключаем, что положение максимума триптофана в плазме крови практически не изменилось, в то время как для тирозина в моче сдвинулось до $\lambda = 290$ нм. Имеются сведения [3, 9], что такой сдвиг может быть вызван повышением щёлочности биологической среды до $\text{pH} > 12$. Однако, в нашем случае этот фактор отпадает, поскольку для мочи большинства исследованных нами пациентов щёлочность была нейтральной, $\text{pH} = 5 - 6$. Сравнивая между собой кривые рис. 1 и рис. 2, заключаем, что коротковолновые максимумы поглощения белков в биологических средах сдвинуты по сравнению с их спектрами поглощения примерно на 25-30 нм, что опять можно объяснить различиями в структуре образующихся комплексов в этих двух случаях.

Измерения спектров поглощения растворов отдельных белков в зависимости от их концентрации C на СФ-46 даёт возможность определить величину экстинкции ϵ белка для любой длины волны так, как для фиксированной λ .

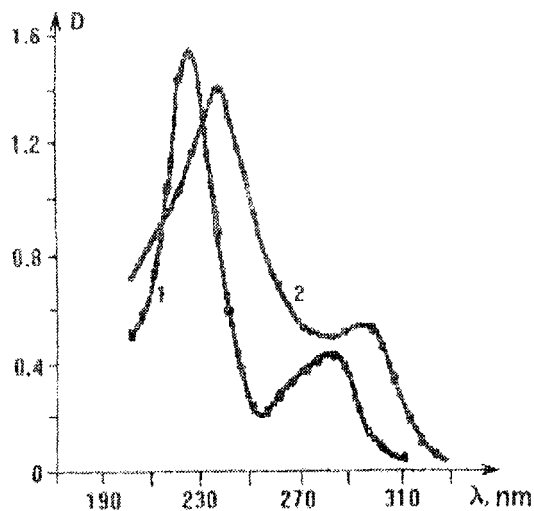


Рис. 2. Спектральные зависимости оптической плотности D для:

- 1 — плазмы крови, концентрация 1:200;
- 2 — мочи, концентрация 1:100, $\text{pH} = 6$.

$$D = \epsilon \cdot C \cdot l = (\alpha + \sigma) Cl, \quad (2)$$

где α и σ — соответственно показатели поглощения и рассеяния частиц исследуемого раствора, а C — количество частиц в единице объёма среды. Концентрация C может быть задана в любых общепринятых единицах. Результаты подобных исследований для некоторых длин волн, соответствующих максимумам в поглощении, и двух белков: фибриногена (1) и альбумина (3) для $\lambda = 280$ нм и альбумина (2) при $\lambda = 200$ нм, приведены на рис. 3.

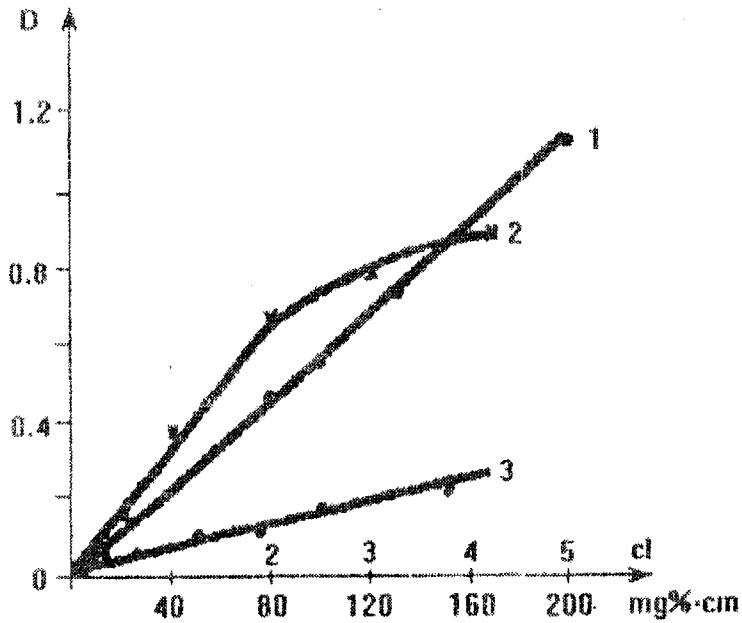


Рис. 3. Зависимость оптической плотности D от концентрации C в растворе белков: 1 — фибриноген; 2 и 3 — альбумин. Верхний масштаб по оси абсцисс относится к $\lambda = 200$ нм, нижний — к $\lambda = 280$ нм.

РАССЕИВАЮЩИЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВ

Как уже отмечалось, все белки плазмы крови и мочи (кроме альбумина) в дистиллированной воде являются светорассеивающими. Рассеяние происходит на макромолекулах белков, которые различны как по форме, так и по размерам, альбумины — наиболее мелкодисперсные. Их молекула состоит из одной полипептидной связи, то есть цепочки, диаметром 4 нм и длиной 14 нм [7]. Совокупность таких молекул с точки зрения взаимодействия с излучением можно моделировать как среду, содержащую хаотически ориентированные цилиндрические частицы. Молекулы глобулинов близки к шарообразной форме с диаметром, возрастающим от α до γ — глобулинов. Например, молекулы фибриногена, который также относят к группе глобулинов и находится между фракциями β — и γ — глобулинов, имеют диаметр $d = 22$ нм. Все эти частицы, взвешенные в базовом веществе, имеют малое значение как действительной части относительного показателя преломления (1,02 — 1,2), так и мнимой части χ (10^{-5} — 10^{-3}), $m = n + i\chi$, то есть относятся к “мягким” [11, 13]. При наличии рассеяния спектр поглощения белка видоизменяется. Это хорошо видно, если сравнить между собой спектр поглощения одного и того же белка, измеренный типичным спектрофотометрическим методом на СФ-46 и с помощью шарового фотометра. Результаты такого сравнения на примере плазминогена приведены на рис. 4, из которого следует, что при наличии рассеяния оптическая плотность по всему спектру существенно выше (кривая 1, концентрация 9,40 мг %), чем при регистрации только доли поглощенного молекулами белка раствора (кривая 2, концентрация 25 мг %), что реализуется на шаровом фотометре.

Согласно формуле (2) тангенс угла наклона прямых даёт или величину экстинкции ϵ для рассеивающего раствора (в нашем случае — это фибриноген), или величину показателя поглощения α для нерассеивающего (альбумин). Они равны: для $\lambda = 280$ нм $\epsilon = 5,60$ (см %) $^{-1}$; $\alpha = 1,65$ (см %) $^{-1}$; для $\lambda = 200$ нм $\alpha = 325$ (см %). Аналогично определяют экстинкции для других светорассеивающих белков: α , β и γ — глобулинов.

Кроме того, видно, что чем меньше поглощение, тем больше разница между кривыми 1 и 2, в особенности в области $\lambda > 320$ нм, что приводит к размыванию полосы поглощения. В области $\lambda > 320$ нм плазминоген практически не поглощает, поэтому регистрируемая здесь на СФ-46 оптическая плотность обусловлена исключительно светорассеянием. Это подтверждается и кривыми рис. 1 для γ — глобулина, которые получены путём измерений на шаровом фотометре, поэтому в области $\lambda > 320$ нм оптическая плотность его практически равна нулю, хотя γ — глобулин также является светорассеивающим белком.

Решение задачи о рассеянии излучения с учётом формы, макроструктуры, размеров, спектральной зависимости показателя поглощения отдельной частицы даёт теория Ми, однако это решение достаточно громоздко [12]. Поэтому на практике используют различные приближения. Так, для “мягких” частиц, к которым относятся макромолекулы белков в растворителе или биологической среде, удовлетворяющих условию $d \ll \lambda$, используется приближение Рэлея-Ганса, согласно которому интенсивность I рассеянного излучения в направлении падающего на кювету излучения I_0 равна:

$$I = I_0 \cdot \frac{ANV^2}{\lambda^k} \cdot \frac{n^2 - n_0^2}{n_0^2}, \quad (3)$$

где A — постоянная; N — количество частиц в рассеивающем объёме; V — объём макромолекулы; n — её показатель преломления; n_0 — показатель преломления окружающей среды; k — показатель степени, величина которого зависит от размера и формы рассеивающих частиц, для чисто рэлеевского рассеяния $k = 4$. Поэтому спектральный ход оптической плотности раствора, обусловленной только рассеиванием, можно представить выражением:

$$\mathcal{D} = \frac{B}{\lambda^k}, \quad (4)$$

где B — постоянная для данного конкретного раствора. Отсюда получаем:

$$\lg \mathcal{D} = \lg B - k \lg \lambda, \quad (5)$$

то есть линейную зависимость между $\lg \mathcal{D}$ и $\lg \lambda$, тангенс угла наклона который определяет величину k .

Нами проведены экспериментальные исследования зависимости (5) для большинства рассеивающих белков плазмы крови в области спектра $\lambda = 320 — 350$ нм. Результаты подобных исследований на примере фибриногена приведены на рис. 5. Для каждой прямой находилось значение “ k ”; они равны: для первой — 2,68; для второй — 2,40; для третьей — 2,8 и для четвёртой — 2,50. Среднее значение “ k ”, равно 2,59. Аналогичные измерения дают: для γ — глобулина $k = 2,17$; для плазмы крови $k = 1,90$; для мочи здорового человека $k = 3,90$. Усреднение проводилось по четырём-пяти концентрациям для каждого биообъекта. Отмечается чёткая закономерность: чем меньше размер макромолекулы, тем ближе величина “ k ” к показателю четыре.

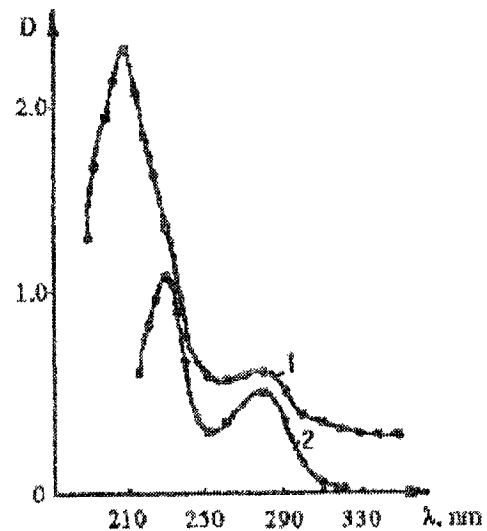


Рис. 4. Спектр поглощения плазминогена, измеренный:

- 1 — по типовой методике;
- 2 — на шаровом фотометре.

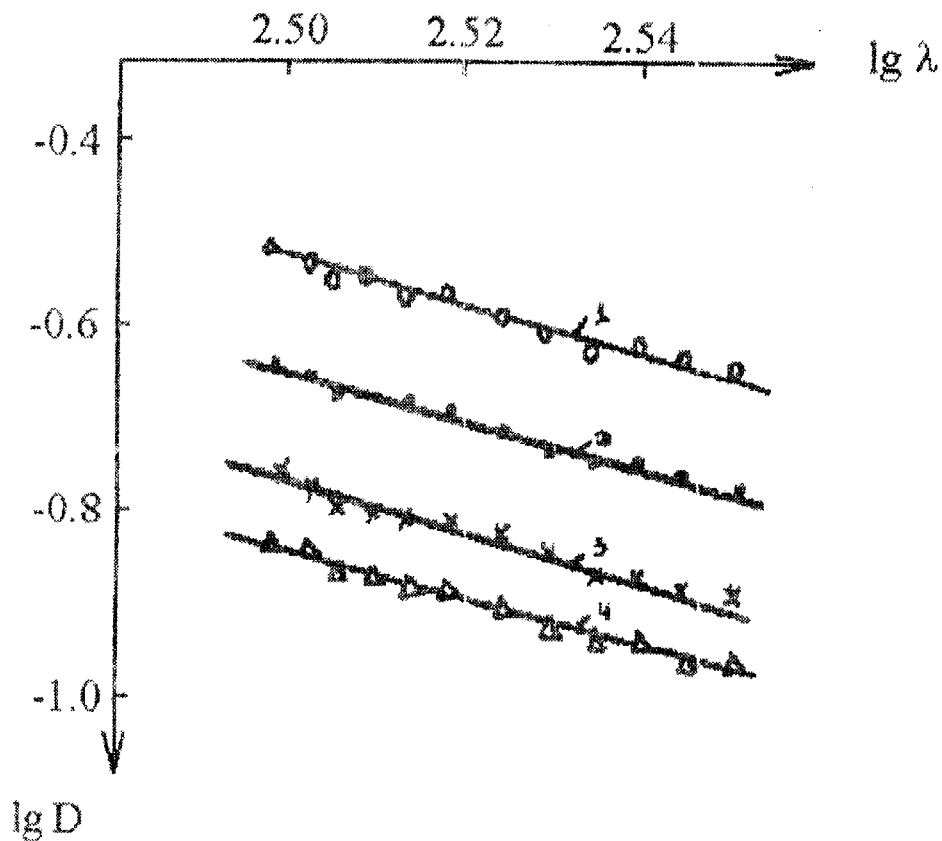


Рис. 5. Зависимость D от $\lg \lambda$ для фибриногена:
 1 — концентрация 200; 2 — 133; 3 — 100; 4 — 80 мг %.

Используя спектральные зависимости оптической плотности в области $\lambda > 320$ нм, полученные на СФ-46 для различных значений концентрации белка в растворе, можно построить функцию $\mathcal{D} = f(Cl)$ для фиксированной длины волны, аналогично приведенным на рис. 3. На рис. 6 представлены такие функции для фибриногена (1) и γ — глобулина (2) при $\lambda = 320$ нм. Поскольку здесь $\alpha = 0$, то согласно формуле (2) тангенс угла наклона этих прямых дает показатель рассеяния для соответствующего белка при $\lambda = 320$ нм. Он равен: для фибриногена $1,50 (\text{см } \%)^{-1}$; для γ — глобулина $0,75 (\text{см } \%)^{-1}$.

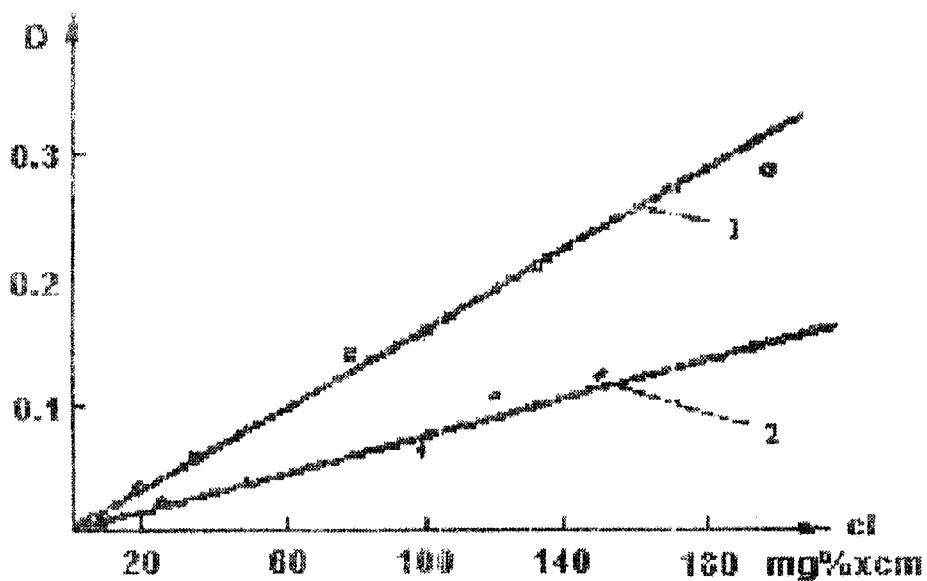


Рис. 6. Зависимость $D = f(Cl)$: для фибриногена (1); для γ — глобулина (2).

ПРИМЕНЕНИЕ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО МЕТОДА АБСОРБЦИОННОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКОВ

Количественный абсорбционный анализ — определение концентрации вещества в растворе, широко применяется в физико-химических исследованиях [1, 2, 4]. В спектрофотометрическом абсорбционном анализе используются спектры поглощения главным образом молекул и их структурных частей. Если в растворе имеется две или более не взаимодействующих между собой компонент, то на аналитическую полосу поглощения одной компоненты, как правило, накладывается поглощение другой компоненты. В этом случае для фиксированной длины волны оптическая плотность \mathcal{D} раствора вычисляется как сумма оптических плотностей отдельно взятых компонент. Именно к такому типу сложных систем относятся биологические среды: плазма крови и моча. В первом приближении их можно рассматривать как двухкомпонентные смеси. Для плазмы крови — это группы альбуминов и глобулинов, которые вносят определяющий вклад в её спектр поглощения; для мочи (при небольших концентрациях белка) — это альбумины и свободная аминокислота — тирозин.

Рассмотрим возможность осуществления метода определения концентрации альбуминов и глобулинов в плазме крови с использованием их спектров поглощения и рассеяния. Метод основывается на следующих положениях, отмеченных в п. 2 и 3:

— на различиях в спектрах поглощения альбуминов и глобулинов в аналитической полосе поглощения $\lambda = 280$ нм; выбираем, именно, этот максимум (а не коротковолновой), поскольку здесь различия в спектрах поглощения наибольшие;

— на том, что оптическая плотность плазмы крови в спектральном интервале $\lambda = 320 — 360$ нм обусловлена, в основном, рассеянием на макромолекулах глобулинов, поскольку здесь белки не поглощают, а альбумин практически не рассеивает.

При этих условиях оптическая плотность записывается:

$$\text{— для } \lambda = 280 \text{ нм} \quad \mathcal{D}_{280} = \alpha_A^{280} C_A l + (\alpha_G^{280} + \sigma_G^{280}) C_G l; \quad (6)$$

$$\text{— для } \lambda = 320 \text{ нм} \quad \mathcal{D}_{320} = \sigma_G^{320} \cdot C_G l, \quad (7)$$

Здесь α_G^{280} ; α_A^{280} ; σ_G^{320} — усредненные молекулярные показатели поглощения и рассеяния соответственно для альбуминов и глобулинов при указанных λ ; C_A — концентрация альбуминов в среде, в C_G — глобулинов. Из системы уравнений (6) и (7) получаем:

$$C_G = \frac{\mathcal{D}_{320}}{\sigma_G^{320} \cdot l}, \quad (8)$$

$$C_A = \frac{\mathcal{D}_{280} - \alpha_G^{280} \cdot \frac{\mathcal{D}_{320}}{\sigma_G^{320}} - \sigma_G^{280} \cdot \frac{\mathcal{D}_{320}}{\sigma_G^{320}}}{\alpha_A^{280} \cdot l}. \quad (9)$$

Согласно формуле (4) находим:

$$\sigma_G^{280} = \left(\frac{320}{280} \right)^k \cdot \sigma_G^{320}, \quad (10)$$

поэтому

$$C_A = \frac{\mathcal{D}_{280} - \alpha_{\Gamma}^{280} \cdot \frac{\mathcal{D}_{320}}{\sigma_{\Gamma}^{320}} - \left(\frac{320}{280}\right)^k \cdot \mathcal{D}_{320}}{\alpha_A^{280} \cdot \ell} \quad (11)$$

Тогда отношение $\frac{C_A}{C_{\Gamma}}$ (альбумин/глобулиновый коэффициент) равно:

$$\frac{C_A}{C_{\Gamma}} = \frac{\frac{\mathcal{D}_{280}}{\mathcal{D}_{320}} \cdot \sigma_{\Gamma}^{320} - \alpha_{\Gamma}^{280} - \left(\frac{320}{280}\right)^k \cdot \sigma_{\Gamma}^{320}}{\alpha_A^{280}}, \quad (12)$$

В формулах (8), (11) и (12) оптические плотности \mathcal{D}_{280} и \mathcal{D}_{320} измеряются на стандартном спектрофотометре, а параметры k , α_A^{280} , $\varepsilon_{\Gamma}^{280}$, σ_{Γ}^{320} определяются путём использования растворов с известной концентрацией, как это описано в п. 2 и 3. Необходимое для расчётов значение α_{Γ}^{280} находится из как $\alpha_{\Gamma}^{280} = \varepsilon_{\Gamma}^{280} - \sigma_{\Gamma}^{280}$, то есть с учётом (10)

$$\alpha_{\Gamma}^{280} = \varepsilon_{\Gamma}^{280} - \left(\frac{320}{280}\right)^k \cdot \sigma_{\Gamma}^{320}, \quad (13)$$

Рассмотрим, например, γ — глобулин. Для него спектроскопические параметры: $\varepsilon_{\Gamma}^{280} = 6,90$ (см %)⁻¹; $\sigma_{\Gamma}^{320} = 0,75$ (см %)⁻¹, $k = 2,17$, $\alpha_{\Gamma}^{280} = 5,90$ (см %)⁻¹.

Таким образом, в принципе возможно осуществить раздельное определение концентраций альбуминов и глобулинов и найти альбумин/глобулиновый коэффициент. При этом важно отметить, что это делается очень быстро, поскольку оптические плотности исследуемой среды для двух длин волн измеряются за несколько секунд, а все другие параметры в формулах (8), (11) и (12) — постоянны для данной среды и определяются заранее по эталонным растворам. Для установления точности метода и его чувствительности (выявляемые минимальные концентрации) необходимо в дальнейшем провести соответствующие лабораторные и клинические испытания.

Заключение. Полученные в работе результаты свидетельствуют о том, что применение оптических методов спектроскопии рассеивающих сред к исследованию параметров и характеристик как отдельных белков, так и их смеси в биологических средах является перспективным направлением. Такие методы в ряде случаев имеют большую экспрессность и чувствительность по сравнению с традиционными электрофоретическими и иммуно-химическими.

Литература. 1. Бабко А. К., Пилипенко В. Т., Пятницкий И. В., Рябушко О. И. Физико-химические методы анализа. М.: Высшая школа, 1968. — 335 с. 2. Бабушкин А. А., Бажулин П. А., Королёв Ф. А. Методы спектрального анализа. М.: Из-во моск. ун-та, 1962. — 487 с. 3. Богач П. Г. Биофизика (практикум). Киев: Высшая школа, 1983. — 150 с. 4. Демченко А. П. Ультрафиолетовая спектрофотометрия и структура белков. Киев: Наук. думка, 1981. — 208 с. 5. Майстер А. Биохимия аминокислот. М.: Изд-во иностр. лит., 1961. — 530 с. 6. Рвачёв В. П., Гуминевский С. Г., Сахновский М. Ю., Смолинский Е. С., Тихоменко Т. И., Добров Е. Н. // Журнал прикладной спектроскопии. 1968. Т. 8, № 5. — 844 с. 7. Фойтуб А. Конформационные переходы в белках крови при различных функциональных состояниях нервной системы. Киев: Наук. думка, 1975. — 191 с. 8. Рубин А. Б. Биофизика. М.: Высшая школа. Кн. 1, 1987. — 319 с. 9. Современные методы биофизических исследований. / Под ред. Рубина А. Б. М.: Высшая школа, 1988. — 359 с. 10. Урология. / Под ред. Лопакина Н. А. М.: Медицина, 1995. — 496 с. 11. Хайрулина А. Я. Распространение света в дисперсной среде. Минск: Наука и техника, 1982. — 275 с. 12. Хюлст Г. Рассеяние света малыми частицами. М.: Изд-во иностр. лит. 1961. — 336 с. 13. Эскин В. Е. Рассеяние света растворами полимеров и свойства макромолекул. Л.: Наука, 1986. — 288 с.

THE ANALYSIS OF ABSORBING AND SCATTERING PROPERTIES OF BLOOD PLASMA AND URINE PROTEINS

O. V. Pishak, V. P. Pishak,
S. G. Guminetsky, P. M. Grigorishin

Abstract. An analysis of the absorbing and scattering properties of blood and urine plasma proteins is presented in spectrum range 190-350 nm. We have established that in the analytical absorption range of $\lambda = 280$ nm, the absorption of albumins and globulins dissolved in distilled water are quite different. It is shown, that globulin molecules are light diffusive but the albumin solutions in the analyzed spectrum interval are optically homogenous. These properties were taken as essential principles of the optic methods of separate determination of the albumin and globulin concentration in biological media.

Key words: plasma proteins, UV-spectroscopia, albumin, globulin, light scattering.

Bukovinian State Medical Academy, Chernivtsi State University (Chernivtsi).
