

ВЫЧИСЛИТЕЛЬНЫЕ И ИНФОРМАЦИОННО-ИЗМЕРИТЕЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ

УДК 612.117.5 : 535.51

ИССЛЕДОВАНИЕ ТОНКИХ ПЛЁНОК, ПОЛУЧЕННЫХ ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕМ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА, МЕТОДАМИ СПЕКТРАЛЬНОЙ ЭЛЛИПСОМЕТРИИ И ИК-СПЕКТРОСКОПИИ

М. И. Воевода¹, С. Е. Пельтек¹, М. В. Кручинина², С. А. Курилович²,
В. Н. Кручинин³, К. П. Могильников³, С. В. Рыхлицкий³

¹ Учреждение Российской академии наук

*Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН,
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 10*

² Учреждение Российской академии медицинских наук

*Научно-исследовательский институт терапии Сибирского отделения РАМН,
630089, г. Новосибирск, ул. Б. Богаткова, 175/1*

³ Учреждение Российской академии наук

*Институт физики полупроводников им А. В. Ржанова Сибирского отделения РАН,
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 13*

E-mail: vladd50@mail.ru

Методами спектральной эллипсометрии и ИК-спектроскопии проведено исследование тонких плёнок, полученных центрифугированием сыворотки крови здоровых людей и лиц с заболеваниями внутренних органов. Обнаружено, что физические свойства получаемых плёнок зависят от биоорганического состава сыворотки крови, который, в свою очередь, определяется патологическими процессами, протекающими в организме человека. Показано, что спектральная эллипсометрия и ИК-спектроскопия представляют собой подходящие неразрушающие экспресс-методы скрининга, предварительной диагностики крови пациентов с патологией внутренних органов. Полученные эллипсометрические данные о наличии особенностей формирования биоорганических покрытий из сыворотки крови пациентов с диффузной патологией печени, гиперлипидемиями, сахарным диабетом подтверждены выявленными изменениями тонкой структуры ИК-спектров.

Ключевые слова: эллипсометрия, ИК-спектроскопия, центрифугирование, сыворотка крови человека.

Введение. Здоровье населения и качество оказания медицинской помощи в значительной степени зависят от уровня развития фундаментальных медицинских исследований. Особенно важно это в области ранней диагностики распространённых заболеваний внутренних органов, напрямую влияющих на продолжительность и качество жизни человека.

В современной медицине приобретают популярность подходы, позволяющие дать быструю интегральную оценку состояния организма. В качестве объектов комплексной оценки состояния организма удобно использовать составляющие крови: как форменные элементы, так и сыворотку. Это обусловлено тем, что любые патологические процессы приводят к изменению состава, соотношения или к появлению качественно новых компонентов крови [1]. Изменение состава мембран клеток, перераспределение их компонентов сказываются на функции самих клеток, межклеточных взаимодействиях и, в свою очередь, влияют на клеточное окружение, т. е. сыворотку крови [2], в составе которой находятся

белки (в том числе гормоны, ферменты, иммуноглобулины и др.), липиды, углеводы, нуклеиновые кислоты, пигменты, микроэлементы, неорганические компоненты.

Существующие методы биохимических, иммунологических, гематологических исследований в основном направлены на определение отдельных показателей. Они зачастую трудоёмки, требуют сложной пробоподготовки и не всегда доступны из-за необходимости использования дорогостоящих реактивов и специализированного оборудования. Одним из известных в настоящее время оптических методов, позволяющих интегрально оценивать количественные показатели взаимодействия макромолекул, является эллипсометрия [3]. Применение её в биомедицинских исследованиях оправдано тем фактом, что патологические состояния приводят к сдвигам в составе и структуре клеток и тканей, это соответственно вызывает изменения характеристик внеклеточных биологических жидкостей, и в первую очередь сыворотки и плазмы крови, а следовательно, и их оптических параметров. Популярность метода неуклонно растёт благодаря его неразрушающему и невозмущающему характеру воздействия на исследуемый объект, что важно при изучении биологических сред [4, 5]. Хотя эллипсометрия — весьма чувствительный метод, тем не менее часто при исследовании биоорганических объектов её чувствительность оказывается недостаточной из-за малого оптического контраста самих объектов исследования в окружающей их жидкой среде и низких значений концентраций в растворе. Одним из способов изучения биоорганических объектов является их предварительное концентрирование вблизи границ раздела фаз посредством адсорбции, осаждения либо получения тонких плёнок на основе этих объектов [6, 7]. Такой подход позволяет с высокой чувствительностью качественно и количественно описать биоорганические объекты и определить физико-химические параметры, характеризующие особенности их поведения в исходной жидкой фазе.

Наряду с эллипсометрией широко распространена в биоорганических исследованиях в настоящее время ИК-спектроскопия как неразрушающий метод и позволяет получать обширную качественную и количественную информацию не только о наличии тех или иных химических связей в исследуемом материале, но и определять вторичную структуру и конформационные изменения, происходящие в сложных биоорганических молекулах [8, 9].

Цель данной работы состоит в оценке перспективности исследования методами спектральной эллипсометрии и инфракрасной фурье-спектроскопии тонких биоорганических плёнок, полученных путём центрифугирования из сыворотки крови доноров и обследуемых с патологией внутренних органов.

Материалы и методы. *Клинические исследования.* Обследовано 72 человека в возрасте от 19 до 72 лет ($43,1 \pm 3,0$ года), из них 38 женщин и 34 мужчины. Обследуемые были разделены на 4 группы. Первую группу (группа сравнения) составили 11 человек ($41,8 \pm 5,6$ года), у которых по данным биохимических и инструментальных методов исследования не было выявлено клинически манифестирующих хронических заболеваний внутренних органов и оцениваемые биохимические и гематологические показатели крови (см. далее) были в нормальных пределах. Во вторую группу входили 20 пациентов ($49,0 \pm 4,4$ года) с различными типами гиперлипидемий (группа с ГЛП), у 6 обследуемых выявлена ГЛП IА, у 14 — ГЛП IБ типа. В третью группу (35 человек, $53,6 \pm 4,2$ года) вошли пациенты с признаками диффузной патологии печени (ДПП) (с преобладанием по данным биохимии синдромов цитолиза и холестаза). Четвёртая группа представлена 6 пациентами ($51,2 \pm 7,2$ года) с гипергликемией натощак (от 7,2 до 12,4 ммоль/л) и ГЛП IБ типа (группа с сахарными диабетом (СД)) преимущественно.

Все респонденты прошли биохимическое обследование стандартными методиками, включавшее определение печёночных проб (АЛТ, АСТ, ГГТП, ЩФ, общий билирубин, общий белок), липидного профиля (ЛНП, ЛОНП, ОХС, ТГ, ЛПВП), показателей функции почек (креатинин).

Для верификации диагноза пациентам в условиях клиники также проводили клинические, ЭКГ, эхокардиографические исследования, УЗИ органов брюшной полости.

Приготовление тонких плёнок из сыворотки крови. Для получения тонких плёнок из жидкой фазы на поверхности твёрдых тел в современных микро- и нанотехнологиях в последние годы широко используется метод центрифугирования. Суть метода состоит в нанесении исходного раствора на поверхность твёрдой пластины в условиях, определяющих образование тонкой равномерной плёнки. При быстром вращении за счёт центробежных сил происходит вязкое растекание раствора по поверхности пластины с одновременным испарением растворителя, что при подходящем сочетании состава, концентраций компонентов раствора, скорости и времени центрифугирования приводит к получению тонкой равномерной плёнки на поверхности пластины. Методика описана в литературе [10–12] и в упрощённом виде может быть представлена как совокупность стадий:

1. Нанесение исходного раствора на предварительно подготовленную поверхность пластины.
2. Центрифугирование пластины с доведением скорости её вращения до требуемой. На этой стадии происходит быстрое удаление избытка раствора с поверхности.
3. Вязкое растекание образующейся в процессе вращения плёнки под действием центробежных сил.
4. Испарение избытка растворителя.

Как количественные (толщина), так и качественные (равномерность нанесения, отсутствие разрывов) свойства плёнки определяются совокупностью внутренних (физические и физико-химические свойства раствора и окружающей среды, концентрация веществ в растворе) и внешних (скорость вращения пластины в центрифуге, температура раствора) параметров.

Создание точной математической модели процесса весьма трудоёмко, так как очевидно, что модель должна включать описание взаимозависимых составляющих процесса: динамики центробежных сил, реологии образующейся плёнки, динамики испарения растворителя. Кроме того, создание точной математической модели осложняется ещё и тем, что в процессе формирования плёнки изменяются физические и физико-химические свойства исходного раствора. Поэтому в настоящее время для математического описания нанесения плёнок успешно используют упрощённую модель, впервые предложенную в работе [12], в рамках которой стадии 3 и 4 рассматриваются как независимые и последовательно протекающие процессы. Результирующее выражение для толщины h твёрдой плёнки в рамках этой модели записывается как

$$h = (1 - x) \left[\left[\frac{3\eta}{2\rho_l^2\omega^2} \right] \frac{pM}{RT} kx \right]^{1/3}, \quad (1)$$

где x — начальная концентрация растворителя; η и ρ_l — вязкость и плотность жидкости; p и M — давление пара и молекулярный вес чистого растворителя; R — универсальная газовая постоянная; T — температура; k — коэффициент массопереноса: $k = cD(\omega/\nu)^{1/2}$, при этом c — константа, D — коэффициент диффузии растворителя в воздухе, ν — кинематическая вязкость окружающего газа, ω — скорость раскрутки пластины. Из формулы (1) видно, что результирующая толщина плёнки зависит как от физико-химических свойств исходного раствора, так и от внешних факторов: температуры раствора T и скорости раскрутки пластины ω (h пропорциональна $\omega^{-1/2}$).

В данной работе для получения тонких плёнок образцы свежей сыворотки крови (~0,1 мл) наносились на центральную часть предварительно обработанных в перекисно-аммиачном травителе кремниевых пластин Si(111) КДБ-10 диаметром 76 мм при комнатной температуре. Скорость вращения составляла 2500 оборот./мин, время вращения 10 с.

Перед проведением эллипсометрических измерений плёнки в течение двух часов сушились при комнатной температуре на воздухе. Внешние параметры (скорость вращения пластин и температура раствора) формирования плёнок в наших экспериментах, а также первоначальная обработка поверхности для всех пластин оставались постоянными, поэтому наблюдаемые различия в характеристиках получаемых плёнок зависели от параметров сыворотки крови (биоорганический состав сыворотки, концентрация компонентов, взаимодействие их между собой и с молекулами растворителя), которые влияли на вязкость сыворотки и определяли реологию образующейся в процессе центрифугирования плёнки.

Для оценки качества получаемых плёнок в предлагаемом исследовании использовался условный показатель градации (ПГ) степени равномерности распределения толщины покрытия по пластине, наличия, количества и глубины разрывов плёнки. В соответствии с этим равномерные плёнки разной толщины без разрывов имели градацию 0, плёнки с единичными радиальными разрывами (не более 1–5 на пластину) — градацию 1, плёнки с умеренным количеством неглубоких разрывов (6–10 на пластину) — градацию 2, плёнки со значительным количеством глубоких разрывов (более 10 на пластину) — градацию 3 и наконец с грубыми нарушениями распределения плёнки по пластине или при наличии на пластине лишь фрагментов плёнки — градацию 4 (рис. 1).

ИК-спектроскопия. Из всей совокупности образцов случайным образом выбрано четыре (по одному образцу из четырёх экспериментальных групп), для которых на инфракрасном фурье-спектрометре Digilab Excalibur 3100 с помощью приставки нарушенного полного внутреннего отражения компании "PIKE Technologies" (США) были записаны ИК-спектры в диапазоне 600–4000 см⁻¹ с разрешением 4 см⁻¹.

Эллипсометрическое исследование плёнок. Эллипсометрические измерения плёнок градаций 0–2 производились в центре пластин или областях, близких к центру, причём для градаций 1, 2 выбирались участки поверхности, свободные от разрывов. Для плёнок градации 3 измерения проводились в нескольких точках в областях, близких к центру пластины, и результаты усреднялись. Для плёнок градации 4 эллипсометрические измерения не проводились.

Спектральные зависимости $\Psi(\lambda)$ и $\Delta(\lambda)$ измерялись с помощью эллипсометрического комплекса ЭЛЛИПС-1771 [13] в диапазоне длин волн $\lambda = 250\text{--}1000$ нм, спектральное разрешение прибора равнялось 2 нм, время записи одного спектра не превышало 20 с, угол падения луча света на образец составлял 70°. Использовалась четырёхзонная методика измерений с последующим усреднением по всем четырём зонам.

Обсчёт экспериментальных результатов и получение дисперсионных зависимостей $N(\lambda) = n(\lambda) + ik(\lambda)$ и значений толщин плёнок проводились решением обратной задачи эллипсометрии в соответствии с основным уравнением эллипсометрии

$$\operatorname{tg} \Psi e^{i\Delta} = R_p/R_s,$$

где R_p , R_s — комплексные коэффициенты отражения света для волн, поляризованных в плоскости падения и перпендикулярно к ней, зависят от оптических постоянных и тол-



Рис. 1. Основные градации плёнок

щин слоёв. Использовалась модель однослойной отражающей системы: подложка (кремний) — плёнка (биоорганические соединения) — среда (воздух). Подгонка спектральных зависимостей поляризационных углов во всём диапазоне длин волн для m точек спектра осуществлялась путём минимизации функции ошибки:

$$\sigma^2 = \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m [(\Delta_{\text{exp}} - \Delta_{\text{calc}})^2 + (\Psi_{\text{exp}} - \Psi_{\text{calc}})^2]. \quad (2)$$

Поскольку полученные плёнки оказались прозрачными во всём исследуемом оптическом диапазоне ($k = 0$), расчёт дисперсионных зависимостей производился с помощью полиномиальной зависимости Коши:

$$n(\lambda) = a + \frac{b}{\lambda^2} + \frac{c}{\lambda^4}, \quad (3)$$

где λ — длина волны; a, b, c — коэффициенты. При этом предполагалось, что плёнки оптически однородны по толщине.

Методика измерений и оценка воспроизводимости. Экспериментальными характеристиками плёнок, которые оценивались в группах пациентов, в данном исследовании явля-

Таблица 1

Воспроизводимость значений толщины d и показателя преломления n плёнок при проведении эллипсометрических измерений

Обследуемые (группа)	Номер пластины	Данные эллипсометрических измерений			
		d , нм	отклонение, погрешность	n при $\lambda = 632,8$ нм	отклонение, погрешность
19 лет (сравнение)	1	161,04	0,67 0,41 %	1,541	0,0004 0,0259 %
	2	159,92	0,45 0,281 %	1,540	0,0006 0,0389 %
	3	160,15	0,22 0,137 %	1,541	0,0004 0,0259 %
		Среднее значение			
			M = 160,37, $\sigma = 0,5915$		M = 1,5406, $\sigma = 0,000577$
52 года (ДПП)	1	163,74	0,48 0,293 %	1,544	0,0006 0,0389 %
	2	164,19	0,03 0,0183 %	1,545	0,0004 0,0259 %
	3	164,73	0,51 0,309 %	1,545	0,0004 0,0259 %
		Среднее значение			
			M = 164,22, $\sigma = 0,4957$		M = 1,5446, $\sigma = 0,000577$

Примечание. Относительная систематическая погрешность рассчитывалась по формуле $V = (X - U3)/U3 \cdot 100$ %, где V — погрешность измерения (σ), X — среднее значение, $U3$ — установленное значение, M — ошибка среднего значения.

лись: условный ПГ, эффективные значения толщины d и дисперсии показателя преломления $n(\lambda)$. (Для удобства анализа и сравнения эллипсометрических результатов представленной работы с литературными данными значения n из всей дисперсионной зависимости $n(\lambda)$ в таблицах приводятся на длине волны наиболее широко используемого в одноволновых эллипсометрах He—Ne-лазера при $\lambda = 632,8$ нм.)

Для оценки воспроизводимости нанесения плёнок и последующих эллипсометрических измерений в предлагаемой работе использовался «слепой» метод, при этом исследовались по три сыровотки одного обследуемого, затем оценивалась погрешность метода по стандартным формулам (табл. 1).

Статистическая обработка данных выполнена с использованием программы SPSS, версия 10. Достоверность различия показателей оценивали по критериям Стьюдента, Пирсона в случае, когда распределение подчинялось нормальному закону. При отклонении распределения от нормального применялись непараметрические критерии (U -критерий Манна — Уитни, Колмогорова — Смирнова).

Результаты исследования и обсуждение. *Эллипсометрия.* Типичные спектральные зависимости эллипсометрических параметров $\Psi(\lambda)$ и $\Delta(\lambda)$ для полученных биоорганических плёнок представлены на рис. 2. Они имеют вид, характерный для тонких однородных прозрачных плёнок. Дальнейшая обработка таких зависимостей в рамках модели однослойной отражающей системы и хорошая подгонка (низкие значения функции ошибки σ) с использованием полиномиальной дисперсионной модели Коши подтвердили это. Найденные значения $n(\lambda)$ для плёнок образцов 1–4, типичных для всех четырёх групп, показаны на рис. 3, а параметры дисперсионной модели для этих образцов приведены в табл. 2.

Анализ зависимостей экспериментальных характеристик плёнок (ПГ, d , $n(\lambda)$) от биохимических параметров среди всех обследованных ($n = 72$ человека) показал, что эффективная толщина плёнки d прямо и с высокой степенью достоверности коррелировала с уровнями общего холестерина X_c ($r = 0,546$, $p < 0,0001$), триглицеридов ($r = 0,341$, $p < 0,005$), АСТ ($r = 0,266$, $p < 0,031$), общего белка ($r = 0,495$, $p < 0,0001$), мочевой кислоты ($r = 0,316$, $p < 0,018$), а также возрастом обследуемых ($r = 0,492$, $p < 0,020$). Последнее обстоятельство очевидно, поскольку с возрастом чаще встречаются нарушения липидного, пуринового обмена, диффузные заболевания печени, которые могут приводить к подобным биохимическим изменениям (табл. 3).

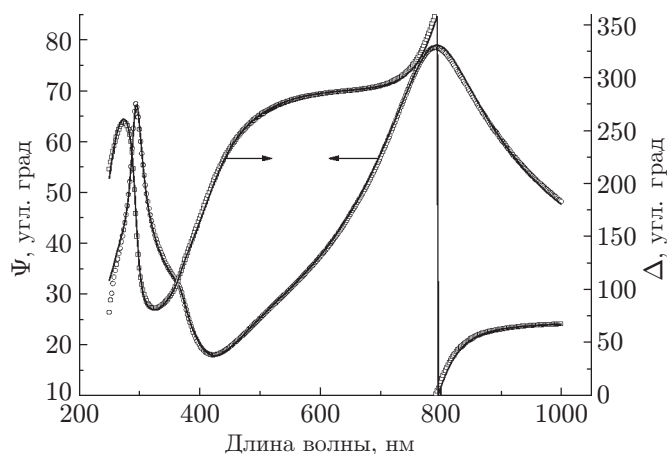


Рис. 2. Типичные спектральные зависимости $\Psi(\lambda)$ и $\Delta(\lambda)$ для образца 1. Светлые точки — экспериментальные результаты, сплошные линии — результат подгонки по дисперсионной модели Коши

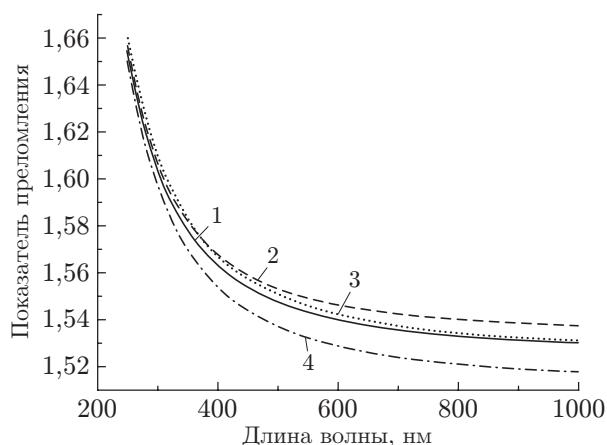


Рис. 3. Дисперсионные зависимости $n(\lambda)$ для образцов 1–4 плёнок всех четырёх групп

Показатель градации, определяющий качество нанесения плёнки, также зависел от липидных параметров: уровней общего холестерина X_c ($r = -0,327$, $p < 0,005$), триглицеридов ($r = -0,245$, $p < 0,042$), т. е. чем выше были их уровни, тем более гладкой, равномерной, без видимых радиальных разрывов оказывалась плёнка. Однако на равномерность плёнки также влиял и уровень глюкозы ($r = -0,245$, $p < 0,050$).

Исходя из этих данных, следовало ожидать, что наиболее толстыми и равномерными окажутся плёнки у пациентов с гиперлипидемией ИБ типа высокой степени атерогенности (повышенные уровни ЛНП, ЛОНП, ОХС, ТГ) и повышенным уровнем глюкозы крови. Это предположение подтвердилось у 89 % обследуемых с данным типом ГЛП.

Показатель преломления плёнки n прямо коррелировал с АЛТ ($r = 0,355$, $p < 0,003$), ГГТП ($r = 0,456$, $p < 0,033$) и обратно — с уровнем общего белка ($r = -0,261$, $p < 0,050$). В данном случае прослеживается зависимость этой макроскопической оптической характеристики плёнки от биохимических показателей, характеризующих синдром цитолиза и холестаза, а также белок-синтетическую функцию печени. Отсюда можно предположить, что значение эффективного показателя преломления будет изменяться наиболее заметно при наличии диффузной патологии печени.

Далее рассмотрим подробно корреляции экспериментальных параметров плёнок с биохимическими показателями для всех четырёх групп обследуемых (табл. 4).

Таблица 2

Значения толщин плёнок и параметры дисперсионной модели для образцов 1–4 в группах обследуемых с ГЛП, ДПП, СД и здоровых

Номер образца (группа)	Результаты эллипсометрических измерений						Показатель градации плёнки (усл. ед.)
	Толщина плёнки d , нм	a	b ($\times 10^{-3}$)	c ($\times 10^{-8}$)	Коэффициент преломления n (632,8 нм)	σ	
1 (сравнение)	179,84	1,525	4,860	2,023	1,538	0,7	0
2 (ГЛП)	154,19	1,533	4,160	2,247	1,545	2,4	2
3 (ДПП)	159,93	1,525	5,751	1,697	1,540	1,4	1
4 (СД)	207,00	1,512	5,488	1,977	1,527	1,1	1

Таблица 3

**Корреляции экспериментальных характеристик плёнок
с биохимическими параметрами
для совокупности измеренных образцов во всех группах**

Характеристики плёнки	Возраст	ОХС, мг/дл	ТГ, мг/дл	Общий белок, г/л	Глюкоза, ммоль/л	АЛТ, ед/л	АСТ, ед/л	ГГТП, ед/л	Мочевая кислота, мкмоль/л
Толщина, нм	0,492 0,020 <i>n</i> = 22	0,5460 0,0001 <i>n</i> = 68	0,341 0,005 <i>n</i> = 66	0,4950 0,0001 <i>n</i> = 57	—	—	0,266 0,031 <i>n</i> = 66	—	0,316 0,018 <i>n</i> = 56
Показатель преломления ($\lambda = 632,8$ нм)	—	—	—	-0,261 0,050 <i>n</i> = 57	—	0,355 0,003 <i>n</i> = 66	—	0,456 0,033 <i>n</i> = 22	—
Показатель градации, усл. ед.	—	-0,327 0,005 <i>n</i> = 71	-0,245 0,042 <i>n</i> = 69	—	-0,245 0,050 <i>n</i> = 64	—	—	—	—

Примечание. Корреляции установлены непараметрическими методами (Спирмен).

Группа сравнения продемонстрировала плёнки наименьшей толщины, достоверно отличаясь от таковых в других группах (в нанометрах): $154,30 \pm 4,89$ (против $172,03 \pm 2,46$ при ГЛП, $p < 0,002$; против $167,85 \pm 3,33$ при ДПП, $p < 0,017$; против $170,73 \pm 9,43$ при СД, $p < 0,05$). В группе сравнения плёнки оказались менее равномерными, с обилием радиальных разрывов, преобладали градации 2–4. При этом достоверность различий по равномерности плёнок отмечена в группе ГЛП ($p < 0,013$).

Значения показателя преломления в контрольной группе оказались достоверно выше по сравнению с таковыми в группе с СД ($1,550 \pm 0,0039$ против $1,538 \pm 0,0027$, $p < 0,034$). Та же тенденция прослеживалась в группе с ГЛП, хотя степени достоверности не достигала ($1,550 \pm 0,0039$ против $1,548 \pm 0,010$, $p < 0,09$).

Таким образом, у обследуемых пациентов с нормальными биохимическими показателями выявлены тонкие неравномерные плёнки с высокими значениями показателя преломления.

Группа обследуемых с ГЛП (20 человек) оказалась неоднородной: 5 человек с ГЛП IА типа (повышенный уровень ЛНП, ОХС и нормальный уровень триглицеридов); 15 человек с ГЛП IБ типа (повышенные уровни ЛНП, ЛОНП, ОХС, ТГ). Выявлено, что наиболее толстыми, равномерными и обладающими низкими значениями показателя преломления были плёнки с ГЛП IБ типа по сравнению с плёнками с ГЛП IА типа ($p < 0,05$). Следует отметить как пример плёнку пациентки со следующими показателями липидов: ОХС 449 мг/дл, ТГ 363 мг/дл, ЛПВП 29 мг/дл; толщина плёнки достигала максимального значения (205,7 нм), а показатель преломления — минимального (1,527); равномерность плёнки была максимальной (0).

Таблица 4

**Биохимические показатели и экспериментальные характеристики плёнок
совокупности измерений в группах обследуемых
с ГЛП, ДПП, СД и здоровых ($M \pm m$)**

Группа	Общий холестерин, мг/дл	Триглицериды, мг/дл	Глюкоза крови, ммоль/л	АЛТ, ед/л	АСТ, ед/л	ЩФ, ед/л	Мочевая кислота, мкмоль/л
Сравнение	184,09± ±5,99	102,18± ±10,95	5,18± ±0,144	21,18± ±3,32	22,36± ±1,59	138,57± ±12,90	258,30± ±28,47
ГЛП	266,5± ±8,94 ***	171,45± ±16,38 **	5,54± ±0,261	21,25± ±1,60	29,56± ±2,73	145,71± ±7,23	295,28± ±25,64
ДПП	235,0± ±10,72 **^^	179,87± ±22,33 *^	5,34± ±0,145 ***^^	51,48± ±7,04 ***^^^	49,34± ±3,36 ***^^^	170,17± ±9,65 ~*	310,14± ±17,12 ~*
СД	249,0± ±17,71 **	263,0± ±56,43 **#	9,63± ±0,731 ***^^^ ####	25,16± ±5,14 ###	22,16± ±2,10 ###	183,33± ±36,44	296,33± ±54,81
Группа	Креатинин, мкмоль/л	Общий билирубин, ммоль/л	Общий белок, г/л	Толщина плёнки d , н/м	Показатель преломления n (при $\lambda = 632,8$ нм)	Градации плёнки по однородности, усл. ед.	
Сравнение	69,00± ±4,45	10,78± ±1,46	72,18± ±1,23	154,303± ±4,896	1,550± ±0,00395	1,818± ±0,352	
ГЛП	82,06± ±6,89	15,66± ±2,76	74,93± ±1,31	172,033± ±2,469 ***	1,548± ±0,0023	0,700± ±0,230 **	
ДПП	73,72± ±4,45 ~*	21,62± ±2,50 **~^	76,81± ±1,12 **	167,854± ±3,333 **	1,550± ±0,0022	1,457± ±0,222 ^^	
СД	70,20± ±2,53	10,80± ±1,65 ##	76,75± ±5,57	170,738± ±9,438	1,538± ±0,0028 **~^###	0,833± ±0,542 ***	

Примечания: * — достоверность p отличия от группы сравнения (* — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$, **** — $p < 0,0001$); ^ — группы 2 с ГЛП (^ — $p < 0,05$, ^^ — $p < 0,02$, ^^ — $p < 0,01$, ^^ — $p < 0,001$); # — группы 3 с ДПП (# — $p < 0,05$, ## — $p < 0,02$, ### — $p < 0,01$, #### — $p < 0,001$).

Таким образом, у обследуемых с ГЛП плёнки толстые, с низкими значениями показателя преломления, равномерные (степени градации 0–2). Степень выраженности этих показателей связана с уровнем и соотношением основных липидных показателей — общего холестерина и триглицеридов, т. е. определяется типом ГЛП.

Обследуемые группы с признаками диффузной патологии печени кроме биохимических параметров, составляющих синдромы цитолиза и холестаза (высокие уровни АСТ, билирубина, ЩФ, ГГТП, Fe-сывортки), имели и нарушенный липидный профиль в 67 % случаев. Поэтому по толщине плёнки группа достоверно отличалась лишь от контрольной ($167,85 \pm 3,33$ против $154,30 \pm 4,89$ в контроле, $p < 0,019$). Следует отметить наличие достоверных отличий по степени равномерности в этой группе от группы с ГЛП, т. е. у пациентов с ДПП при отсутствии повышенных уровней липидного профиля или изменении их соотношения плёнки распределялись неравномерно, с большим количеством радиальных разрывов или даже фрагментарно. Что касается показателя преломления, то в целом по группе с ДПП он был достоверно выше лишь по сравнению с группой с СД ($1,550 \pm 0,0022$ против $1,538 \pm 0,0027$ в группе с СД, $p < 0,01$). Но при выделении в группе с ДПП подгруппы обследуемых с высоким уровнем АЛТ и ГГТП значение показателя преломления становилось максимальным ($1,594 \pm 0,0019$).

Таким образом, в группе с ДПП была высокая толщина плёнок, их равномерность зависела от наличия или отсутствия у пациентов нарушений липидного обмена, а значение показателя преломления определялось уровнем ферментов цитолиза (АЛТ) и холестаза (ГГТП).

Группа обследуемых с СД также имела нарушения липидного обмена (высокие уровни ОХС, ТГ, низкие уровни ЛПВП). В целом по группе плёнки оказались достаточно толстыми и равномерными, но достоверные различия по этим показателям получены лишь с группой сравнения. При этом на равномерность распределения плёнки кроме уровней ОХС и ТГ оказывал влияние уровень глюкозы: чем он был выше, тем более равномерной оказывалась плёнка, особенно при высоких уровнях липидов ($p < 0,05$). Коэффициент преломления в группе с СД оказался наименьшим по сравнению с другими группами ($1,538 \pm 0,0027$ против $1,550 \pm 0,0039$ в контроле, $p < 0,034$; $1,538 \pm 0,0027$ против $1,548 \pm 0,0022$ в группе с ГЛП, $p < 0,05$; $1,538 \pm 0,0027$ против $1,550 \pm 0,0022$ в группе с ДПП, $p < 0,01$). Таким образом, в группе с СД плёнки отличались достаточно высокой толщиной, низким показателем преломления, а равномерность распределения плёнки по пластине определялась наряду с уровнем липидных показателей уровнем глюкозы.

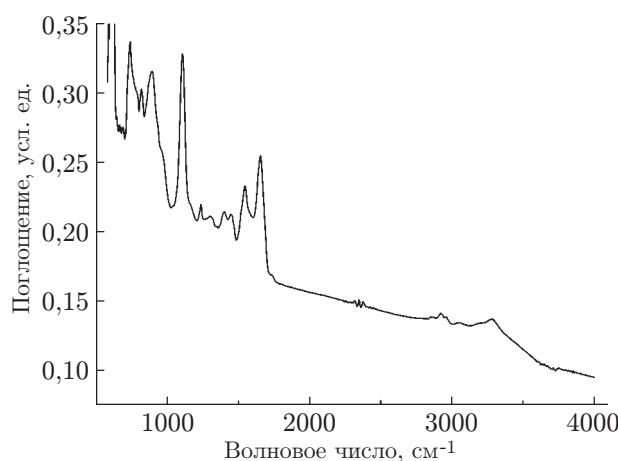


Рис. 4. Общий вид ИК-спектра для образца 2

ИК-спектроскопия. ИК-спектры поглощения для образцов 1–4 имели вид, характерный для белковых молекул (рис. 4). Спектры, записанные в диапазоне $600\text{--}4000\text{ см}^{-1}$, имели множество полос поглощения и условно могли быть разбиты на три спектральных диапазона: $600\text{--}1000$, $1000\text{--}1700$ и $2800\text{--}3400\text{ см}^{-1}$ (рис. 5, *a–c*).

Первый диапазон (см. рис. 5, *a*) содержал полосы 889 и 970 см^{-1} , характерные для валентных колебаний связей C—C , C—O дезоксирибоз и фрагмента PO_4 -молекул нуклеиновых кислот и протеинов [12]. Во втором диапазоне (см. рис. 5, *b*) представлены полосы поглощения: при 1236 см^{-1} — асимметричные валентные колебания PO_2 -группы главным образом нуклеиновых кислот, при 1399 см^{-1} — симметричные валентные колебания групп CH_3 скелетных фрагментов молекул белков, 1450 см^{-1} — деформационные колебания групп CH_3 липидов и белков. Кроме того, во втором диапазоне спектра находятся основные амидные полосы поглощения: амид III — 1280 , 1307 см^{-1} , амид II — 1545 см^{-1} и амид I — 1650 см^{-1} . Такие колебания связаны с поглощением ИК-излучения биоорганическими молекулами, содержащими фрагменты $\text{O}=\text{C—N—H}$, при этом валентные колебания $\text{O}=\text{C}$ дают наибольший вклад в пик поглощения амид I, валентные колебания C—N в совокупности с деформационными колебаниями N—H обуславливают появление полос поглощения амид II и амид III. Эти полосы поглощения очень важны при анализе ИК-спектров биоорганических молекул, так как их энергетическое положение в спектре и интенсивность несут информацию о вторичной структуре белковых молекул, определяемой, в свою очередь, энергией водородной связи. В третьем диапазоне (см. рис. 5, *c*) в основном присутствуют полосы поглощения, связанные с валентными симметричными и асимметричными колебаниями связей групп CH_2 и CH_3 в биоорганических молекулах

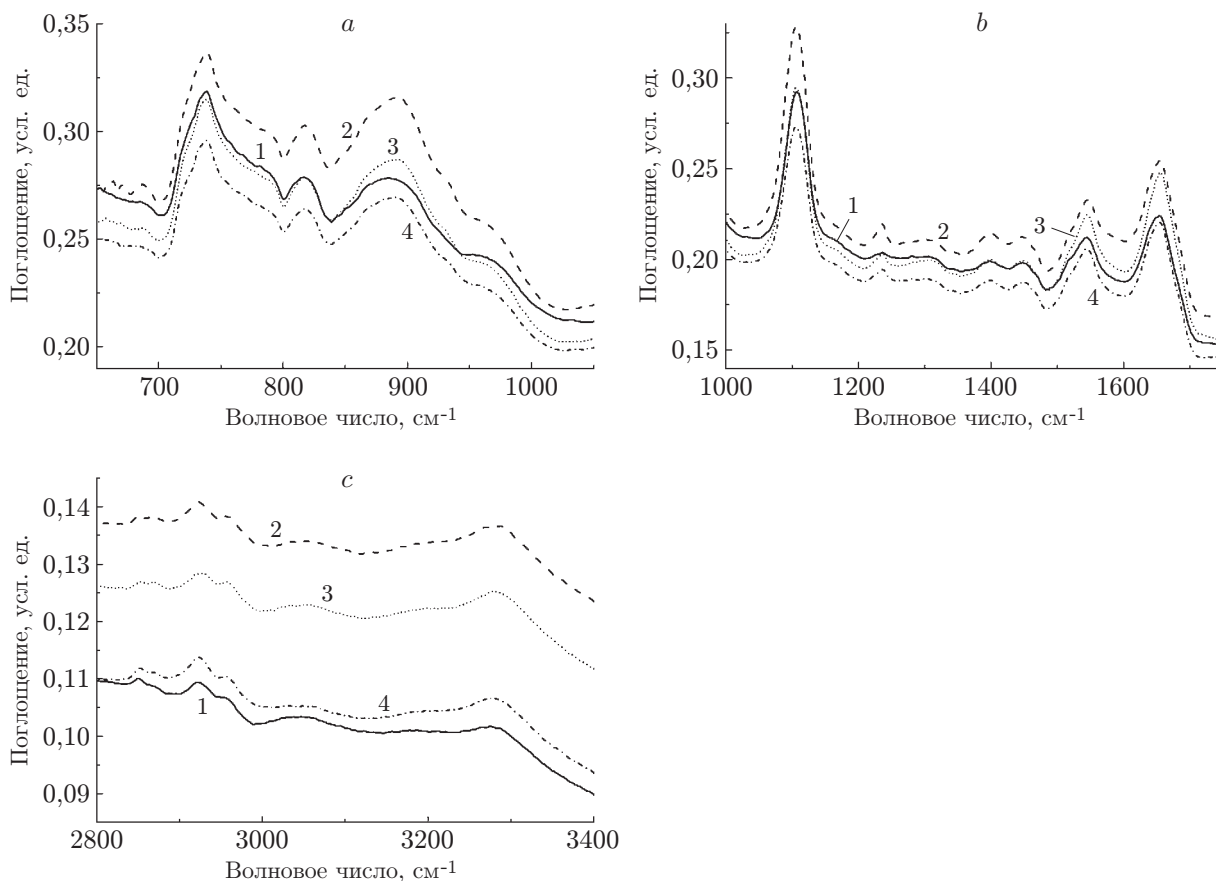


Рис. 5. Фрагменты ИК-спектра для образцов 1–4

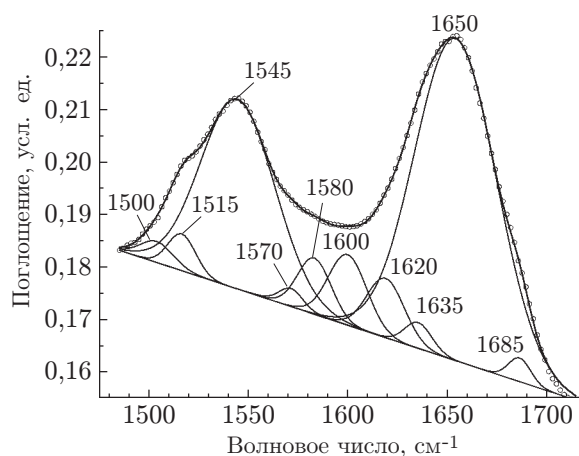


Рис. 6. Полосы поглощения амид I и амид II (исходный спектр — точки и жирная кривая). Разложение на отдельные компоненты (1–10) для образца 1

2851, 2874, 2923, 2959 см^{-1} . Далее располагаются полосы поглощения: 3050 см^{-1} — валентные колебания группы N—H протеинов (амид B), 3190 см^{-1} — валентные симметричные колебания групп N—H и 3289 см^{-1} — валентные симметричные колебания групп O—H.

Полосы поглощения при 1545 см^{-1} (амид II) и 1650 см^{-1} (амид I) имеют сложную форму, вызванную наложением нескольких близкорасположенных в спектре полос поглощения. Это обусловлено тем, что белковые молекулы в сыворотке крови имеют сложный конформационный состав. Стандартная процедура разложения пиков (в предположении, что составляющие суммарный спектр пики имеют вид кривых Гаусса) показывает, что в составе двух полос амид II и амид I присутствует не менее десяти компонентов (рис. 6). Пространственная структура и энергетическое положение некоторых из них хорошо известны и представлены в [13]. Наиболее изучены и описаны компоненты полосы амид I. Так, компонент при 1650 см^{-1} в полосе поглощения амид I связывают с наличием белковых молекул со вторичной структурой в виде спирали (α -helix), тогда как два компонента при 1620 см^{-1} и 1685 см^{-1} связывают с появлением белковых молекул со структурой в виде складчатого листа (β -sheet). Для всех четырёх образцов в спектрах полосы амид I плёнок, изученных в предлагаемой работе, компонент, соответствующий структуре спирали, является доминирующим. Относительно появления остальных компонентов в литературе нет единого мнения.

Корреляционные зависимости интенсивностей полос поглощения, нормированных на толщину плёнки, от биохимических параметров и параметров, полученных на основе эллипсометрических измерений, приведены в табл. 5. Поскольку, как было отмечено выше, интенсивность пиков ИК-спектров отражает информацию не только о химических связях в белковых молекулах, но и их вторичной структуре. Наблюдаемые корреляции площадей пиков с белковыми компонентами сыворотки крови вполне объяснимы. Тесные взаимосвязи пиков с показателями липидного профиля, углеводного и пуринового обмена, очевидно, обусловлены тем, что в сыворотке крови эти соединения находятся в составе соединений с белками (липопротеины) либо их повышенный уровень влияет на конформационное состояние белковых молекул.

Все липопротеины являются бислоем белок-липид, однако в зависимости от липидсвязывающей способности апобелка, от связывания ими полярных или неполярных липидов строение липопротеидов оказывается во многом разным. Тем не менее подобные структуры представляют единую функциональную систему переноса к клеткам жирных кислот, они взаимодействуют на всех этапах переноса, активного и пассивного поглощения клетка-

Таблица 5

**Корреляции площадей пиков ИК-спектров образцов 1–4
с биохимическими параметрами и эллипсометрическими показателями**

Пики, см ⁻¹	ОХС, мг/дл	ТГ, мг/дл	ХС, ЛПВП, мг/дл	Мочевая кислота, мкмоль/л	Глюкоза, ммоль/л	Общий белок, г/л	АЛТ, ед/л	Толщина плёнки, нм	Показа- тель прелом- ления <i>n</i>	Градации плёнки, усл. ед.
736	—	—	—	—	-0,922 0,078	—	—	—	—	—
889	—	-1,0 0,000	—	-1,0 0,000	—	—	—	—	—	—
966	—	—	—	—	-0,929 0,071	—	—	—	—	—
1107	—	-1,0 0,000	—	-1,0 0,000	—	—	—	-1,0 0,000	—	0,902 0,098
1236	-0,909 0,091	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1307	—	—	—	—	-0,94 0,06	—	—	—	—	—
1399	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,948 0,052
1502	—	—	0,937 0,063	—	—	—	—	—	—	—
1517	—	—	-0,914 0,086	—	—	—	—	—	—	—
1581	—	-1,0 0,000	—	-1,0 0,000	—	—	—	—	—	0,917 0,083
1600	—	-0,955 0,045	—	-1,0 0,000	-0,96 0,04	-0,977 0,023	—	-0,998 0,002	0,966 0,034	—
1620	-0,949 0,051	—	—	—	—	—	—	—	—	0,949 0,051
1635	—	-1,0 0,000	—	-1,0 0,000	-0,931 0,069	—	—	-1,0 0,000	—	—
1685	—	—	0,908 0,085	—	—	—	—	—	—	—
2851	—	0,983 0,017	—	—	0,938 0,062	0,997 0,003	—	0,99 0,01	-0,959 0,041	—
2923	—	—	—	—	—	—	-0,931 0,069	—	—	—
2959	—	—	-0,937 0,063	—	—	—	—	—	—	—
3064	—	—	0,925 0,075	—	—	—	—	—	—	—

ми. Следует отметить, что все апобелки являются глобулярными белками. В одной и той же молекуле глобулярного белка могут встречаться разные виды вторичной структуры, а также участки, лишённые какой-либо вторичной структуры. Нарушения липидного и углеводного обменов, диффузная патология печени сопряжены как с нарушением синтеза описываемых компонентов, так и с последующими процессами взаимодействия между ними, приводящими к существенным конформационным перестройкам в молекулах белков. Усиление процессов перекисного окисления, фосфорилирования и образование комплексов с белками (на примере известного гликозилированного гемоглобина при декомпенсации углеводного обмена) приводят к нарушению взаимодействий между группами —NH— и —CO— в молекулах белков, что и выражается в изменениях интенсивностей пиков в ИК-спектрах.

Заключение. Таким образом, процесс нанесения тонких плёнок на поверхность твёрдых подложек с помощью центрифуги эффективен при изучении жидких биоорганических сред. Нанесённое биоорганическое содержимое сыворотки крови в виде тонкой плёнки на твёрдую поверхность может быть исследовано оптическими методами без каких-либо жёстких воздействий и разрушения субстрата.

Спектральная эллипсометрия и ИК-спектроскопия представляют собой эффективные неразрушающие экспресс-методы скрининга, предварительной диагностики крови у пациентов с патологией внутренних органов. Полученные эллипсометрические данные о наличии особенностей формирования биоорганических покрытий из сыворотки крови (толщина плёнки, показатель преломления) у пациентов с диффузной патологией печени, гиперлипидемиями, сахарным диабетом подтверждены выявленными изменениями тонкой структуры ИК-спектров.

Авторы выражают благодарность сотрудникам Научно-образовательного центра НГУ «Молекулярный дизайн и экологически безопасные технологии» Е. В. Болдыревой и Ю. А. Чесалову за запись ИК-спектров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Меньшикова Е. Б., Ланкин В. З., Зенков Н. К. и др.** Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. М.: Слово, 2006. 553 с.
2. **Геннис Р.** Биомембраны: молекулярная структура и функции. М.: Мир, 1997. 624 с.
3. **Современные** проблемы эллипсометрии /Под ред. А. В. Ржанова. Новосибирск: Наука, 1980. 192 с.
4. **Arwin H.** Spectroscopic ellipsometry and biology: recent developments and challenges // *Thin Solid Films*. 1998. **313–314**. P. 764–774.
5. **Howland M. C., Szmodis A. W., Sani B., Parikh A. N.** Characterization of physical properties of supported phospholipid membranes using imaging ellipsometry at optical wavelength // *Biophys. Journ.* 2007. **92**, N 4. P. 1306–1317.
6. **Azzam R. M. A., Rigby P. G., Krueger J. A.** Kinetics of protein adsorption and immunological reactions at a liquid/solid interface by ellipsometry // *Phys. Med. Biol.* 1977. **22**, N 3. P. 422–430.
7. **Arwin H.** Ellipsometry on thin organic layers of biological interest: characterization and applications // *Thin Solid Films*. 2000. **377–378**. P. 48–56.
8. **Movasaghi Z., Rehman S., ur Rehman I.** Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues // *Appl. Spectroscopy Rev.* 2008. **43**, N 2. P. 134–179.

9. **Stuart B.** Infrared spectroscopy: fundamentals and applications. N. Y.: John Wiley & Sons, Ltd., 2004. 224 p.
10. **Attia S. M., Wang J., Wu G. et al.** Review on sol-gel derived coatings: process, techniques and optical applications // Journ. Mater. Sci. Technol. 2002. **18**, N 3. P. 211–218.
11. **Dimitriev Y., Ivanova Y., Iordanova R.** History of sol-gel science and technology (review) // Journ. Univer. Chem. Technol. Metal. 2008. **43**, N 2. P. 181–192.
12. **Vorotilov K., Petrovsky V., Vasiljev V.** Spin coating process of sol-gel silicate films deposition: effect of spin speed and processing temperature // Journ. Sol-Gel Sci. and Technol. 1995. **5**, N 3. P. 173–183.
13. **Рыхлицкий С. В., Спесивцев Е. В., Швец В. А., Прокопьев В. Ю.** Спектральный эллипсометрический комплекс «ЭЛЛИПС-1771 СА» // Приборы и техника эксперимента. 2007. № 2. С. 160–161.

Поступила в редакцию 21 мая 2010 г.
