



Диагностика по капле крови. Кристаллизация биожидкостей.

Авторы:

Краевой Сергей Александрович

Колтовой Николай Алексеевич

Москва

2013

Сведения об авторах:



Краевой Сергей Александрович, д.м.н., генеральный директор ОАО «РТ-Биотехпром». Окончил Военно-медицинскую Академию им. С.М. Кирова.

Дополнительное образование:

повышение квалификации - МВА. «Каскадное обучение системе менеджмента качества и лидерства. Уровень «Руководитель качества».

Российская Академия Государственной службы при Президенте Российской Федерации «Социально-экономическая политика государства и пути ее реализации в здравоохранении».

Российская Академия путей сообщения ФГБ ОУ ВПО МИИТ «Охрана труда на предприятиях железнодорожного транспорта»

Дипломатическая академия Министерства Иностранных Дел Российской Федерации «Деловой протокол и этикет».

Институт усовершенствования врачей ФГУ «Национальный медикохирургический центр им. Н.И. Пирогова Минздравсоцразвития России «Организация здравоохранения и общественное здоровье».

Академия бизнеса «Эрнст энд янг» «Финансы для нефинансовых менеджеров».

«Корпоративный университет ОАО «РЖД» программа «Корпоративный лидер» (для категории «А»).

«НМХЦ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России программа «Организация здравоохранения и общественное здоровье»



Колтовой Николай Алексеевич (Москва) - окончил МФТИ с отличием, кандидат физико-математических наук. Много лет проработал в представительстве фирмы Zeiss в Москве, председатель “Image Processing Club”, Специализация - оптика, микроскопия, системы анализа изображений, исследование биожидкостей, спектральные методы исследования в медицине, спектральные методы ранней диагностики рака.

Аннотация.

Рассматривается перспективный метод диагностики заболеваний на основе кристаллизации капли сыворотки крови. Метод является простым, не требует дорогостоящего оборудования, оперативным, дешевым, безреагентным. Метод позволяет оценить общее состояние организма, нарушение работы отдельных подсистем организма, проводить мониторинг состояния организма, проводить скрининговые обследования, выявлять заболевания на ранней стадии. Метод позволяет выявлять раковые заболевания на ранней стадии. На основе обследования большого числа пациентов удалось выделить набор диагностических признаков для диагностики различных заболеваний. Путем проведения большого количества экспериментов удалось выявить и описать динамику процессов, происходящих в высыхающей капле сыворотки крови. Понимание происходящих процессов позволило выявлять структурные и функциональные нарушения состояния крови. Книга предназначена для врачей, которые хотят использовать новые эффективные методы диагностики, и для специалистов, которые занимаются нанотехнологиями для разработки процессов самосборки.

Книга состоит из четырех частей (книг).

В первой книге рассматривается кристаллизация капли сыворотки крови методом открытой капли (угловая дегидратация).

Во второй книге рассматривается кристаллизация капли сыворотки крови методом закрытой капли (краевая дегидратация).

В третьей книге рассматриваются специальные методы микроскопии для изучения прозрачных объектов, таких как высохшая капля сыворотки крови.

В четвертой книге приводится обзор литературы по тематике кристаллизации биожидкостей и применению метода кристаллизации биожидкостей для диагностики в медицине. Литература сгруппирована по городам и центрам, в которых проводятся исследования.

Книга 1. Метод открытой капли (угловая дегидратация).

Оглавление.

Введение.

1. Физические методы диагностики заболеваний.
2. Компоненты сыворотки крови.
3. Кристаллографические методы.
4. История применения кристаллографических методов исследования.

Книга 1. Открытая капля (угловая дегидратация) сыворотки крови.

Глава 1. Выбор оптимальных условий дегидратации.

- 1.1 Управляемая дегидратация.
- 1.2 Управление формой капли.
 - 1.2.1 Зависимость формы капли от объема капли.
 - 1.2.1.1 Постоянный состав сыворотки.
 - 1.2.1.2 Переменный состав сыворотки.
 - 1.2.2 Формирование различных структур в зависимости от объема капли.
 - 1.2.3 Выбор материала , на котором проводится дегидратация.
 - 1.2.4 Управление площадью капли .
- 1.3 Управление температурой.
 - 1.3.1 Испарение капли при нормальной температуре.
 - 1.3.1.1 Динамика испарения.
 - 1.3.1.2 Зависимость формы капли от времени.
 - 1.3.1.3 Время испарения.
 - 1.3.1.4 Масса сухого остатка.
 - 1.3.2 Испарение капли при повышенной температуре.
 - 1.3.3 Испарение капли при пониженной температуре.
- 1.4 Управление влажностью.
- 1.5 Управление обдуванием.
- 1.6 Управление составом капли.
- 1.7 Различные методы высушивания.

Глава 2. Процессы, происходящие при дегидратации методом открытой капли.

Первый этап - испарение несвязанной воды.

- 2.0 от 0 до 1 мин. Начальный этап.
 - 2.0.1 Растекание капли .
 - 2.0.2 Образование внешнего прозрачного кольца.
 - 2.0.3 Процесс взаимодействия капли со стеклом.
 - 2.0.4 Процессы на поверхности капли.
 - 2.0.5 Седиментационные процессы.
- 2.1 от 1 до 70 мин. Конвекционные потоки.
- 2.2 от 1 до 70 мин. Черви.

Второй этап - гелеобразование.

- 2.3 от 20 до 70 мин. Формирование морщин.
- 2.4 от 20 до 70 мин. Гелеобразование.
 - 2.4.1 Свободная и связанная вода.
 - 2.4.2 Образование белкового валика.

- 2.5 от 60 до 70 мин. Движение фронта загустевания.
 - 2.5.1 Структура фронта загустевания.
 - 2.5.2 Светящееся кольцо.
 - 2.5.3 Образование ступенек на поверхности капли.
- 2.6 от 60 до 80 мин. Движение фронта радиальных трещин (трещины типа 1).
 - 2.6.1 Зарождение аркообразных трещин.
 - 2.6.2 Радиальные трещины.
 - 2.6.3 Количественные методы оценки структуры радиальных трещин.
- 2.7 от 65 до 90 мин. Движение фронта выпадения белков.
- 2.8 от 65 до 80 мин. Образование псевдотрещин в центральной зоне.
- 2.9 от 65 до 80 мин. Кристаллизация соли.
 - 2.9.1 Кристаллизация соли на поверхности в центральной зоне.
 - 2.9.2 Кристаллизация соли на поверхности в средней зоне.
- 2.10 от 60 до 80 мин. Формирование ячеек.
 - 1- Типы ячеек.
 - 2- Динамика усыхания и деформации ячеек.
 - 3- Выпадение осадка по краю ячеек.
 - 4- Ядро ячеек.
 - 5- Образование языковых структур в ячейках.
 - 6- Образование листьев.
 - 7- Образование трещин в ячейках.

Третий этап - затвердевание.

- 2.11 от 80 мин до 7 дней. Усыхание капли.
- 2.12 от 3 до 7 дней. Кристаллизация липидов.
- 2.13 от 3 до 7 дней. Внешняя кристаллизация.
- 2.14 от 7 дней до бесконечности. Перекристаллизация.

Глава 3. Структура высохшей капли.

- 3.1 Зоны.
- 3.2 Структуры различного уровня.
- 3.3. Типы трещин.
- 3.4 Напряжения в высохшей капле.
- 3.5 Методы определения состава капли.
- 3.6 Тестовые растворы.

Глава 4. Динамические характеристики сыворотки крови.

- 4.1 Устойчивость структуры сыворотки крови.
- 4.2 Воздействия, нарушающие структуру сыворотки крови.
 - 4.2.1 Воздействие высокой температурой (нагревание).
 - 4.2.2 Воздействие ультрафиолетовым излучением.
 - 4.2.3 Воздействие радиацией, гамма и рентгеновским излучением.
- 4.3 Воздействия, нормализующие структуру сыворотки крови.
- 4.4 Воздействие лазером на кровь.
- 4.5 Капля сыворотки как детектор.
- 4.6 Вода - как детектор воздействия.
- 4.7 Изменение свойств сыворотки при хранении.

Глава 5. Диагностика заболеваний по структуре высохшей капли сыворотки крови.

- 5.1 Преимущества диагностики методом кристаллизации капли сыворотки крови.
- 5.2 Разработка методов диагностики.
- 5.3 Что такое - заболевание?

- 5.4 Что такое норма.
- 5.5 Изучение динамики состояния пациента.
- 5.6 Установление взаимосвязи: от биохимии - к структуре капли.
- 5.7 Установление взаимосвязи: от диагноза - к структуре капли.
- 5.8 Установление взаимосвязи: от структуры капли - к диагнозу.
- 5.9 Диагностические маркеры.
- 5.10 Примеры диагностики различных заболеваний.

Глава 6. Тезиографический метод исследования капли сыворотки крови.

- 6.1 История применения тезиографического метода.
- 6.2 Методы оценки кристаллограммы.

Глава 7. Диагностика по капле цельной крови. Тест Боленга.

Глава 8. Сравнение различных методов диагностики.

- 8.1 Сравнение диагностики методом дегидратации с биохимическим методом.
- 8.2 Сравнение различных методов кристаллизации капли сыворотки крови.
- 8.3 Дополнительные изображения.

Введение.

Изучение процессов, происходящих при кристаллизации сыворотки крови, позволяет понять проявление на макроуровне процессы молекулярных взаимодействий. При кристаллизации сложноструктурированных сред возникают процессы самоорганизации и возникновения упорядоченных структур. Понимание процессов, происходящих на молекулярном уровне (самосборка) позволяет решать две очень важные задачи: ранняя диагностика заболеваний, и управляемый синтез наноструктур с заданными свойствами. Изучение процессов, происходящих при испарении капли сыворотки крови позволяет понять взаимосвязь следующих понятий: (структуры высохшей капли) - (состав, свойства и структура сыворотки) - (заболевания).

Суть метода диагностики на основе дегидратации капли сыворотки крови состоит в том, что в норме сыворотка имеет однородную структуру, и при дегидратации возникают регулярные и однородные структуры (радиальное растрескивание). При малейшем нарушении структуры белков начинаются процессы агрегации молекул белков, которые существенным образом изменяют вид структур, возникают аномальные и нерегулярные структуры. Основным физическим механизмом, отвечающим за формирование структур в капле, является уменьшение объема сыворотки при гелеобразовании (высыхании). При уменьшении объема в геле возникают напряжения, которые вызывают различного вида растрескивания и разрывов в структуре геля. А эти процессы уже проявляются на макроуровне. Таким образом, микро нарушения белков на молекулярном уровне вызывают нарушение структур на макроуровне. Если в

норме всего 2% белков имеют нарушения в структуре (третичной или четвертичной), то при патологии до 50% белков имеют нарушения в структуре.

1. Физические методы диагностики заболеваний.

В последнее время широкое распространение получили биохимические методы диагностики заболеваний на основе анализа сыворотки крови пациента. Биохимические методы диагностики имеют много преимуществ:

- наличие большого количества методик диагностики, утвержденных министерством здравоохранения,
- многолетний опыт применения биохимических методов диагностики, -врачи обучены интерпретации данных биохимических анализаторов, -наличие в лабораториях биохимических анализаторов,

-возможность быстро проводить большое количество анализов с помощью универсальных автоматизированных биохимических анализаторов, -высокая точность анализов.

Недостатки биохимических методов диагностики: -стоимость биохимических анализаторов достаточно высокая из-за наличия специальных расходных материалов, -маленькая лаборатория не в состоянии иметь мощный биохимический анализатор, -мощный биохимический анализатор обычно эффективен при большой загрузке, при малом количестве анализов он не эффективен, -при большом количестве измеряемых параметров необходим забор большого количества крови, -необходим постоянный контроль и калибровка анализаторов для обеспечения высокой точности, -основной недостаток - необходимость постоянной покупки дорогостоящих расходных материалов и реактивов для диагностики.

Дополнением к биохимическим методам диагностики служат физические методы диагностики - это методы измерения физических параметров сыворотки крови. Для физических методов диагностики не нужны реактивы. Это прямые методы измерения, а не косвенные, как в биохимических анализаторах. Одним из физических методов диагностики является диагностика на основе анализа структуры высушенной капли сыворотки крови. Задача диагностики по структуре дегидратированной капли сыворотки крови состоит из нескольких подзадач: - Выяснение структуры капли в норме. -Выяснение взаимосвязи структуры капли с состоянием организма (заболеванием). -Выяснение взаимосвязи структуры капли с данными биохимических анализов.

2. Компоненты сыворотки крови.

Кровь состоит из жидкой части (плазмы) и взвешенных в ней форменных элементов крови (эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов). На долю форменных элементов приходится 40 - 45%, на долю плазмы - 55 - 60% от объема крови. Это соотношение называется гематокритным соотношением, или гематокритным числом.

Таблица 1-1. Сравнительные характеристики крови, плазмы и воды.

Характеристика	Единицы измерения	Кровь	Сыворотка	Вода
Плотность	г/см ³	1,050-1,060	1,025-1,034	1,000
Вязкость	Усл. ед.	5	1,2-1,7	1
Показатель преломления	-	-	1,348-1,351	1,3332
Температура замерзания	градусы	-	0,56-0,58	0
Угол смачивания	градусы	18	14	12
Коэф. поверхностного натяжения	Н/м		0,056	0,0725

Если налить в пробирку немного крови, то через 15 минут она превратится в пастообразную массу - сгусток. Затем сгусток сжимается и отделяется от желтоватой прозрачной жидкости - сыворотки крови. Сыворотка отличается от плазмы тем, что в ней отсутствует фибриноген, белок плазмы, который в процессе коагуляции (свертывания) превращается в фибрин. Плазма крови - это раствор, в котором 90%-вода, 7%-белки, 2%-органические небелковые соединения, 1% - неорганические соли. Концентрация хлорида натрия в сыворотке составляет 0,9% (9 г на 1 литр) - это одна из физиологических констант. Плотность такого раствора составляет 1,005 г/см³. Состав белков - 60% - альбумин, 40% - глобулины. Если упорядочить основные компоненты плазмы, то получаем: вода - 900 г/л,

альбумин - 60г/л, глобулины - 38 г/л, NaCl - 9г/л, фибриноген - 3г/л, трансферрин -3г/л,

Сыворотка крови является неоднородной сложно-структурированной жидкостью, гетерогенным коллоидно-полимерным раствором. Молекулярные компоненты сыворотки крови эффективно исследуются биохимическими методами. Но для исследования надмолекулярных структур в интервале размеров от 100 нм до 2000 нм в настоящее время мало эффективных методов исследования. Свойства сыворотки не однородны по объему. Имеются большие колебания концентрации различных веществ и структурных компонент (белков и солей) как в пространстве, так и во времени. Как следствие - большие колебания физических свойств - плотности, оптической плотности, вязкости.

1- Молекулярные компоненты - основные компоненты сыворотки крови. - Низкомолекулярные компоненты (вода - размер молекулы - 0,28 нм, и ионы). -Молекулы средней массы-МСМ (средние молекулы-СМ) - по молекулярной массе занимают промежуточное положение между аминокислотами и белками сыворотки, масса от 500 до 5000 дальтон. Молекулы средней массы представляют собой олигопептиды, белковые токсины. Содержание молекул средней массы является важным диагностическим признаком при эндогенной интоксикации организма.

- Высокомолекулярные компоненты - белки. Глобулярные белки: -альбумин - масса 69.000 дальтон, размер молекулы - 3,6 нм, -глобулин - масса 330.000 дальтон, Фибриллярные белки: фибриноген, молекулярный вес 350.000 дальтон, размер молекулы 22 нм. В плазме крови содержится более 30 белков с молекулярной массой от 44.000 до 1.300.000 дальтон. 10% белков составляют 90% массы белков. Распределение белков по массе можно определить с помощью электрофореза на бумаге или в агаровом геле.

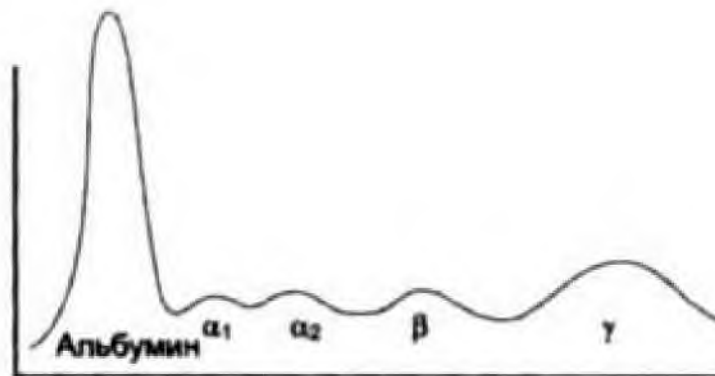


Рис. 1-1. Электрофореграмма белков сыворотки крови: альбумин, α1-глобулины, α2-глобулины, бета-глобулины, гамма-глобулины.

Альбумины - более полярные молекулы, чем глобулины,
Альбумины более легко связываются с молекулами воды и имеют относительно большую гидратную оболочку, чем глобулины.
Альбумины высаливаются в последнюю очередь.

2- Надмолекулярные компоненты.

Кроме молекулярных компонент присутствуют надмолекулярные структуры. Например, молекулы белков окружены гидратными оболочками. Гидратные оболочки представляют собой единое целое с молекулами. Гидратная оболочка ЛПНП-6000 молекул, триглицериды - 39 молекул, ионы Na и Cl - 6 молекул воды. Надмолекулярными структурами так же являются кластеры молекул воды.

Молекулы альбумина присутствуют в плазме в основном в виде соединений с различными веществами. Молекулы альбумина выполняют в крови транспортную функцию, они имеют на своей поверхности центры связывания, к которым присоединяются различные молекулы, лиганды. Молекулы альбумина присутствуют в сыворотке не только в виде мономеров, но и в виде димеров.

3- Липопротеины.

Более высокий уровень строения представляют липопротеины. Это целые комплексы, имеющие сферическую форму, и состоящие из оболочки и ядра. -ЛПВП - липопротеины высокой плотности - 5-12 нм. Основной белок - АпоА- масса 435.000 дальтон.

-ЛПНП - липопротеины низкой плотности - 18-25 нм. Основной белок АпоВ - масса 3.200.000 дальтон.

-ЛПОНП - липопротеины очень низкой плотности - 30-80 нм.

- Хиломикроны - это самые большие из липопротеинов, имеют размеры от 75 до 1200 нм. Хиломикроны синтезируются клетками кишечника в процессе всасывания экзогенных липидов, и секретируются в лимфатические сосуды. Из них они попадают в кровь. Благодаря большому размеру хиломикроны вызывают сильное светорассеивание, поэтому плазма крови после приёма пищи всегда выглядит опалесцирующей или даже мутной в зависимости от уровня потреблённых с пищей жиров. Хиломикроны появляются в крови через один час после приема пищи. Максимальное количество хиломикрон в крови наблюдается через 6 часов после приема пищи. При 12 часовом голодании хиломикроны в крови отсутствуют.

4- Микросферы с клеточной мембраной.

-Микровезикулы - 100-1000 нм. Микровезикулы представляют собой частицы сферической формы. Они образуются путем отпочковывания от клеток части мембран с некоторым содержимым. Строение микровезикулы - бислойная мембрана (часть клеточной мембраны) и содержимое. Микровезикулы создаются различными клетками крови - тромбоцитами, эритроцитами, лейкоцитами. Иногда микровезикулы называют экзосомы, в противоположность эндосомам - пузырькам формирующимся внутри клетки.

-Апоптотические тельца. Погибшие клетки при апоптозе распадаются на небольшие, фрагменты, окруженные мембраной, которые обозначаются как апоптотические тельца. Апоптотические тельца распознаются и поглощаются (фагоцитируются) другими клетками благодаря молекулам фосфатидилсерина. В живой клетке фосфатидилсерин располагается на внутренней стороне мембраны. В процессе апоптоза фосфатидилсерин перемещается на внешнюю поверхность мембраны.

5- Клеточный дебрис - неструктурированные частицы от разрушенных клеток - размер от 100 до 2000 нм.

6- Микроорганизмы. В плазме так же присутствуют микроорганизмы. В 1925 году, при микроскопии крови в темном поле немецкий зоолог Эндерлейн (Enderlein Gunther) (1872-1968) обнаружил биологические объекты, которые с течением времени изменяли свою морфологическую структуру, то есть эволюционировали в короткие сроки. По его версии в крови существуют биоценозные сообщества четырех основных форм:

- 1- белковые коллоидные структуры,
- 2- микроорганизмы водорослевого типа,
- 3- грибковые формы,
- 4- палочковидные бактерии.

Вирусы - это мельчайшие живые организмы с размером от 20 до 300 нм. Бактерии - одноклеточные микроорганизмы с размером от 500 до 5000 нм.

Микроорганизмы можно наблюдать в свежераскапанной капле в режиме темного поля при увеличении 40х и выше. В сыворотке можно наблюдать множество светящихся частиц. Частицы разных веществ совершают хаотическое, броуновское движение. Микроорганизмы совершают направленное движение, которое часто не совпадает с направлением общего потока движения остальных частиц.

7- Нонопупырьки. Нанопупырьки образуются в результате температурных флуктуаций плотности из растворенных в сыворотке газов - кислорода и углекислого газа. Пупырьки имеют размер от 20 до 200 нм. Пупырьки являются термодинамически метастабильными в результате адсорбции ионов на их поверхности. Граница воды и газовой фазы пупырьков заряжена отрицательно. Пупырьки снаружи окружены облаком противоионов. Снаружи на пупырек действует внешнее давление и поверхностное натяжение. Изнутри на пупырек действует кулоновское отталкивание адсорбированных ионов и движение молекул газа.

8- Сгустки. Еще один тип образований - сгустки. Сгустки бывают микроскопические, размером несколько микрон, и макроскопические, размером несколько миллиметров. Неоднородности сыворотки становятся хорошо

11 видимыми, если перелить сыворотку в кювету с прямоугольными стенками. Становятся видным течение компонент с различной оптической плотностью.

Распределение частиц по размерам в сыворотке крови можно регистрировать с помощью метода ЛКС - лазерной корреляционной спектроскопии. Суть метода состоит в регистрации спектра колебаний интенсивности рассеянного света, вызванной броуновским движением частиц. Чем больше частицы - тем меньше частота флуктуаций. Данным методом регистрируется не физический радиус частиц, а так называемый гидродинамический радиус частиц. Например, если

у частицы имеется гидратная оболочка, то регистрируется радиус частицы с гидратной оболочкой - гидродинамический радиус. Гидродинамический радиус молекулы гораздо больше размера молекулы.

Гидродинамический радиус альбумина-5-7 нм, иммуноглобулин IgG - 5-6 нм, иммуноглобулин IgM - 15-18 нм, глобулины и ЛПВП - 7-10 нм, фибриноген - 40-80 нм.

Можно выделить следующие характерные размеры: 0-10 нм - низкомолекулярные мономерные белки и продукты их гидролиза 11-30 нм - глобулярные белки и низкомолекулярные липопротеиновые комплексы

31-70нм - более высокомолекулярные гликолипопротеиновые комплексы, рибонуклеопротеидные и дезоксирибонуклеопротеидные частицы а также самые низкомолекулярные иммунные комплексы

71-150 нм - иммунные комплексы среднего размера более 150 нм - высокомолекулярные комплексы, возникающие при аллергии и аутоиммунной сенсibilизации организма.

Таблица 1-2. Состав сыворотки крови.

Компонент	Название	Мол Вес г/моль	Размер нм	содержан ие г/л	Содержание ммоль/л
Вода	Water	18,02	0,30	900-910 г/л	
Белок общий	Protein Total			64-83 г/л	
Альбумины	Albumin	69.000	3,6	56-66 г/л	
Г лобулины	Globulin	150.000	5-50	33-43 г/л	
Фибриноген	Fibrinogen	350.000	22	1,8-4,2 г/л	
Г емоглобин	Haemoglobin	64.500	5,5		
Трансферрин	Transferrin	80.000		2-3 г/л	
Общие липиды	Lipids Total		0,5	3,5-8,0 г/л	4,6-10,4
Общие фосфолипиды	Phospholipids Total		0,5	1,5-3,8 г/л	1,95-4,9
Общий холестерин	Cholesterol total	386,67	0,5	1,2-2,5 г/л	3,11-6,48
Свобод. холестерин	Cholesterol	386,67	0,5	0,4-0,9 г/л	1,04-2,33
Эфиры холестерина	Cholesterol Ester		0,5	0,4-0,7 г/л	2,33-3,49
Холестерин ЛИВИ	HDL Cholesterol	386,67	5-12	0,4-0,6 г/л	1,04-1,55
Холестерин ЛИНИ	LDL Cholesterol	386,67	18-25	1,0-1,6 г/л	2,59-4,11
Холестерин ЛИОНИ	VLDL Cholesterol	386,67	30-80		0,26-1,04
Триглицериды	Triacylglycerol Triglycerides	875,00		1-2 г/л	0,44-1,69

Глюкоза	Glucose	180,16	0,42	0,7-1,15 г/л	3,90-6,40
Мочевина	Urea	60,06	0,20	150-432 мг/л	2,5-7,2
Мочевая кислота	Uric Acid	168,11		58-76 мг/л	0,14-0,42
Общий билирубин	Bilirubin Total	584,68		3-10 мг/л	0,005 0,021
Прямой билирубин (связанный)	Bilirubin Direct	584,68		1-3 мг/л	0-0,007
Непрямой билирубин (свобод.)	Bilirubin	584,68		2-7 мг/л	0,0034 0,0166
Креатинин	Creatinine	113,12		5,9-13 мг/л	0,053-0,115
Хлорид натрия (NaCl)	Sodium chloride	58,44	0,30	9 г/л	135-145
Натрий (Na+)	Natrium	22,99	0,11	3,1-3,3 г/л	135-145
Калий (K+)	Kalium	39,09	0,23	136-203 мг/л	3,5-5,2
Кальций общий	Calcium total	40,08	0,19	90-105 мг/л	2,15-2,57
Кальций ионизированный (свободный)(Ca+)	Calcium	40,08	0,19	45-56 мг/л	1,15-1,32
Хлор (Cl-)	Chlorum	35,45	0,19	3,4-3,9 г/л	98-112

Пояснения к таблице. Модем называется количество вещества, масса которого, выраженная в граммах, численно равняется его молекулярной массе. Молекулярная масса - это сумма масс атомов, входящих в состав данной молекулы, выражается в атомных единицах массы (а.е.м.). 1 а.е.м. иногда называют Далтон. Количество молекул в одном моле любого вещества постоянно и равно числу Авогадро = 6×10^{23} степени. (мг/л)/мол масса=моль/л. Весьма распространенной единицей концентрации в клинической биохимии являлся миллиграмм-процент (мг%) - количество вещества в миллиграммах, содержащееся в 100 мл биологической жидкости. Для пересчета этой величины в единицы СИ используется следующая формула: ммоль/л = мг% 10 / молекулярная масса вещества.

3. Кристаллографические методы.

Кристаллографические методы состоят в изучении структуры и формы кристаллов, образующихся при кристаллизации биожидкостей. Существует два основных метода кристаллизации:

- 1- кристаллизация самой биожидкости без добавления реагентов,
- 2- кристаллизация кристаллообразующего вещества, которое добавлено в биожидкость.

Разными авторами методы кристаллизации назывались различными терминами:

- 1- кристаллизация самого вещества (дегидратация):
 - метод выветренных налетов (Ловиц Т.Е., 1794 г.),
 - метод открытой капли (Рапис Е. 1976 г.),
 - метод закрытой капли (Савина Л.В. 1992)
 - метод клиновидной дегидратации (Шабалин В.Н., Шатохина С.Н. 1992 г.), -метод дегидратации биожидкостей,
 - свободный кристаллогенез (Мартусевич А.К., 2007 г.),

-плазмограмма (Кутушов М.В. 2005), -метод кристаллизация из раствора (метод испарения растворителя) (изотермическая кристаллизация),
 -метод микрокристаллоскопического анализа, -микрокристаллоскопия, микрокристаллография, -арборизация - кристаллизация нативных биологических жидкостей.

2- кристаллизация вещества с добавленным реактивом (тезиография): - метод микрохимического анализа (Ловиц Т.Е., 1794 г.),
 -чувствительная кристаллизация (sensitive crystallization processes) (Pfaffer, 1936г.),
 -кристаллизация хлорида меди (copper chloride crystallization),
 -тезиография (Кузьмин М.П., 1969 г.) -инициированный кристаллогенез (Мартусевич А.К., 2007 г.).
 -HCA (Herbal Crystallization Analysis),
 -SCA (Saliva Crystallization Analysis).

Метод микрокристаллоскопического анализа или микрокристаллоскопия - это метод качественного анализа, основанный на реакциях образования характерных кристаллических осадков в маленьких каплях раствора. Микрокристаллический анализ является одним из методов микрохимического анализа.

Биокристалломика - биологическая наука, изучающая структуру, свойства и функциональное значение биогенных кристаллов. (Мартусевич А.К.).

Методы кристаллизации из раствора:

- 1- создание пересыщенных растворов за счет зависимости растворимости от температуры - охлаждение горячих растворов (изогидрическая кристаллизация),
- 2- охлаждение раствора до температуры ниже 0 градусов - вымораживание,
- 3- создание пересыщенных растворов за счет удаления растворителя - выпаривание (изотермическая кристаллизация), вакуумная сушка, лиофилизация,
- 4- добавление веществ, уменьшающих растворимость - высаливание,
- 5- выпадение нерастворимых кристаллов, образующихся в результате химической реакции.

Можно выделить два основных метода исследования дегидратации капли сыворотки крови:

-Открытая капля (угловая дегидратация, дегидратация на открытой поверхности, кристаллизация в открытой ячейке). Одной из разновидностей метода открытой капли является вакуумная дегидратация.

-Закрытая капля (краевая дегидратация, дегидратация на закрытой поверхности, кристаллизация в закрытой ячейке) - дегидратация под покровным стеклом (оптическая ячейка, сэндвич-ячейка).

Таблица 1-3. Различные варианты кристаллизации капли:

	Открытая капля	Закрытая капля
Дегидратация	ДО	ДЗ
Тезиография	ТО	ТЗ

14

Можно выделить следующие направления исследований на стыке медицины и кристаллографии:

- изучение структуры высушенной капли биожидкостей для ранней диагностики различных заболеваний - медики,
- изучение процессов, происходящих при дегидратации капли - физики, - кристаллизация для изучения состава вещества - химики,
- кристаллические и жидкокристаллические структуры в живых организмах - биологи,
- биоминерализация - биохимики.

Метод кристаллизации биожидкостей применим для любых биожидкостей: Кровь - сыворотка крови, цельная кровь (тест Боленга), эритроцитарный гемолитат,

Мочеполовая система - моча,
 Рот - слюна (ротовая жидкость), отделяемое патологического зубодесневого кармана, отделяемое лакун небных миндалин, мокрота (трахеобронхиальный секрет), десневая жидкость,
 Глаз - слеза (слезная жидкость), слизистый секрет конъюнктивы, жидкость передней камеры глаза, стекловидное тело,
 Нос - назальный секрет (сопли), биологическая жидкость носовых полипов, Суставы - синовиальная жидкость,
 Головной мозг - спинномозговая жидкость (цереброспинальная жидкость, ликвор)
 Легкое - бронхоальвеолярный лаваж, экспират (конденсат выдыхаемого воздуха), плевральная и асцитическая жидкость,
 Репродуктивная система - цервикальная слизь, околоплодные воды, влагалищная жидкость,
 Печень - желчь,
 Предстательная железа - секрет предстательной железы, простатический сок,
 Поджелудочная железа - панкреатический сок,
 Желудок - желудочный сок, слизь желудка,
 Кишечник - копрофильтрат,
 Брюшная полость - перитонеальная жидкость,
 Потовые железы - пот,
 Раны - раневое отделяемое.

Биожидкости животных: сыворотка крови кошек, рыб, верблюдов, животных, стекловидное тело животных, моча кошек,
 Различные вещества: кофе, мед, препарат АСД-2 (антисептик-стимулятор Дорогова).

Смежные области, используемые при изучении процессов кристаллизации капли сыворотки крови:

- 0- клиническая лабораторная диагностика - изучение свойств крови,
 - 1- биохимия - состав сыворотки крови,
 - 2- биофизика - изучение физических свойств биожидкостей,
 - 3- коллоидная химия - состояние раствора капли, мицеллярные растворы, золь - гель переходы, образование студней, загустение, затвердевание,
 - 4- теория растворов - трехкомпонентные фазовые диаграммы растворов, растворы высокомолекулярных веществ, расслоение растворов,
 - 5- кристаллография - процессы кристаллизации в капле, кристаллизация в геле,
- 15
- 6- кристаллохимия-зависимость формы кристаллов от состава веществ,
 - 7- поляризационная микроскопия - изучение оптических свойств кристаллов,
 - 8- методы спектрального анализа - изучение состава дегидратированной капли,
 - 9- жидкие кристаллы - фазовые переходы при испарении воды,
 - 10- смачивание - форма капли при раскапывании на стекле,
 - 11- поверхностное натяжение - форма капли,
 - 12- испарение - процессы испарения воды с поверхности капли,
 - 13- реология - изучение изменения вязкости в процессе дегидратации,
 - 14- высыхание тонких пленок - процессы затвердевания,
 - 15- конвекционные потоки, ячейки Бенара,
 - 16- вода - структура и свойства воды, гидратные оболочки молекул,
 - 17- белки - процессы агрегации и высаливания белков,
 - 18- компьютерные системы анализа изображений - количественная оценка структурных элементов высушенной капли,
 - 19- синергетика - процессы самоорганизации в капле,

- 20- циклические химические реакции, кольца Лизеганга,
- 21- колебательные процессы в химических реакциях, реакция Белоусова-Жаботинского,
- 21- нанотехнология-создание наноразмерных структур с заданными свойствами,
- 22- гемосканирование - диагностика по капле живой крови,
- 23- полимеры - разрушение полимеров.

В настоящее время изучением процессов, происходящих при испарении капель различных жидкостей занимаются в различных научных центрах: -Франция - University Claude Bernard Lyon
-США - Harvard University, Cambridge, Massachusetts, University of California, University of Chicago.

4. История применения кристаллографических методов исследования.

1877 - Максвелл исследовал процессы испарения капель в газообразной среде. В статье «Диффузия», написанной в 1877 году Максвелл рассмотрел случай испарения сферической кали.

1923 - Яхонтов Н.Н. Кристаллография и органолиды. Журнал Природа, 1923, №712, стр. 17-38.

Яхонтов Н.Н. рассматривал вопросы кристаллизации биожидкостей.

1926 - Hcesslin H., Das Sputum, 2. Auflage, Berlin, 1926. - кристаллизация секретов слизистых оболочек.

1932 - Hedges - описал и сфотографировал картины высохших капель белков сыворотки крови и желатина.

1942 - Bolen H.L. - использовал кристаллизацию капли цельной крови для диагностики раковых заболеваний (HLB blood test - тест Болен).

Bolen H.L. The Blood Pattern as a Clue to the Diagnosis of Malignant Disease. J. Lab.&Clin. Med., 27:1522-1536. 1942

1945 - Paranicolau - кристаллизация слизи цервикального канала при высушивании на воздухе.

16

1946-Лепешинская Ольга Борисовна, Москва, Институт Экспериментальной Биологии, Статья «Явления кристаллизации в живой материи», Наука и жизнь, 1946, №7, стр. 7-11.

1962 - Ступко А.И., Кульбашник .Н. - кристаллизация слизи цервикального канала.

1973 - Ашхабад, НИИ Глазных болезней

Рапис Елизавета Гдальевна (1927-2012), доктор медицинских наук, профессор Тель-Авивского Университета в лаборатории прикладной физики, с 1950 по 1990 г. проживала в СССР.

1973 - статья о высушивании жидкой части стекловидного тела глаза.

[Рапис Е. Кристаллография в офтальмологии. Всесоюзный съезд офтальмологов. Тезисы доклада, Киев, 1973, с.53-57.]

1988 г.- опубликована статья об образовании структур при высыхании белка, 210 печатных работ, проведено исследование 8.000 образцов.

2002 - книга «Белок и жизнь».

1976 - Леус П.А. Клинико-экспериментальное исследование патологии патогенетической консервативной терапии и профилактики кариеса зубов. Диссертация доктора медицинских наук. Рассматривалась кристаллизация слюны для диагностики кариеса.

1981 - Екатеринбург, УПИ, Лаборатория биофизики.
Минц Рафаил Исакович - работа по жидким кристаллам в организме.

1984 - Ермаков Н., Киев, описал высыхающую каплю яичного белка.
Статья - Ермаков Н. След капли. Наука и жизнь, 1984, №9. с.33-34.

1986 - Волынский Марк Семенович
Книга - Необыкновенная жизнь обыкновенной капли. Наука и прогресс, Знание. М., 1986, 142 с.

1987 - Москва, МОНИКИ
(Калинин А.П., Мороз Л.А., Макеев С.А. О кристаллографическом исследовании сыворотки крови при некоторых эндокринных заболеваниях. Советская медицина, 1987, №7, с.36-39.) Кристаллография сыворотки крови без добавления кристаллообразующего вещества.

1987 - Пермь - Краснодар, КубГМУ.
Савина Лидия Васильевна опубликовала работу по вакуумной ксерогелеграфии для изучения сыворотки крови.
1992 - защита докторской диссертации «Кристаллографические структуры сыворотки крови в клинике внутренних болезней».

1989 - Екатеринбург, УГМА, Кафедра хирургических болезней.
Лисиенко Валентина Михайловна и Р.И. Минц положили начало новому научному направлению, в основу которого легла идея возможности использования биофизических методов в диагностике, прогнозировании и контроле за эффективностью лечения различных заболеваний с помощью оценки структурирования жидких кристаллов в биологических жидкостях организма.

17

1992 - Москва,
Шабалин Владимир Николаевич - директор Российского НИИ Геронтологии
Шатохина Светлана Николаевна - д.м.н., руководитель клинико-диагностической лаборатории МОНИКИ.
1992 г. опубликовали работу по кристаллическим структурам крови в норме и при патологии. Они исследовали более 10.000 образцов.
1995 - диссертация доктора медицинских наук Шатохиной С.Н.
«Диагностическое значение кристаллических структур биологических жидкостей в клинике внутренних болезней»
1997 - 1-я Всероссийская научно-практическая конференция «Кристаллографические методы исследования в медицине». 1997.
2001 - книга - Морфология биологических жидкостей человека.

1993 - Екатеринбург - УГМИ
Веселова Вера Симоновна - диссертация к.м.н. «Кристаллогенные свойства липидной фракции сыворотки крови у больных ишемической болезнью сердца и их особенности в зависимости от клиники и лечения».

1995 - Япония - Токио

Масау Эмото (Masaru Emoto) изучает структуру кристаллов воды при различных воздействиях.

2001 - Астрахань, АГУ

Тарасевич Юрий Юрьевич - моделирование роста кристаллов в высыхающей капле

2001 - Астрахань, НИИ по изучению лепры.

Аюпова Адиля Камильевна - диссертация к.м.н. «Системная организация сыворотки крови при лепре».

2001 - Н. Новгород, ИПФ РАН

Яхно Татьяна Анатольевна - статья о моделировании процессов в высыхающей капле.

2001- 2-я Всероссийская научно-практическая конференция «Морфология биологических жидкостей в диагностике и контроле эффективности лечения». Москва, 2001.

В конференции приняло участие более 150 человек из различных городов: Москвы, Астрахани, Волгограда, Воронежа, Екатеринбурга, Камышина, Кирова, Кузнецка, Нижнего Новгорода, Пензы, Смоленска, Самары, Саратова, Сарова, Тамбова, Тулы, Ульяновска, Ярославля

2004 - 3-я Всероссийская научно-практическая конференция «Функциональная морфология биологических жидкостей». Москва

2004 - Москва, НПО «Радон»

Ручьева Ольга Александровна диссертация к.ф.м.н. «Исследование кристаллизации биологических молекулярных систем плазмы крови под действием специальной твердотельной подложки в качестве скрининга ионизирующего излучения».

18

2008 - Астрахань, АГМА

Рыжкова Оксана Александровна - диссертации к.м.н. «Клинико-диагностическое значение морфологической картины сыворотки крови у больных туберкулезом легких».

2008 - Саратов, СГМУ

Сергеева Юлия Васильевна - диссертация к.м.н. «Оптимизация диагностики острого коронарного синдрома с помощью маркеров функциональной морфологии сыворотки крови (клинико-экспериментальное исследование)».

Диссертации по изучению дегидратации различных биожидкостей:

2004- Нижний-Новгород - НГМА - Потехина Юлия Павловна

Значение морфологической картины биологических жидкостей в диагностике и контроле эффективности лечения некоторых распространенных заболеваний лиц пожилого возраста. Диссертация доктора медицинских наук.

2005- Самара - СГМУ - Девяткин Анатолий Анатольевич

Функциональная морфология биологических жидкостей человека в патофизиологии инволютивного катарактогенеза. Диссертация доктора медицинских наук.

2007 - Москва - РУДН - Кафедра общей стоматологии - Разумова Светлана Николаевна.

Диагностические и прогностические критерии стоматологической патологии по морфологической картине ротовой жидкости у пациентов различных возрастных групп. Диссертация доктора медицинских наук.

Глава 1. Выбор оптимальных условий дегидратации.

1.1 Управляемая дегидратация.

Метод дегидратации определяется условиями (параметрами), которые можно изменять (варьировать). Можно управлять следующими параметрами:

- 1- параметры, влияющие на форму капли и на динамику испарения:
 - объем капли,
 - площадь капли,
 - высота капли,
 - поверхностное натяжение,
 - угол смачивания (гидрофобность поверхности, материал поверхности, на которой производится дегидратация)
- 2- параметры, влияющие на скорость испарения:
 - условия испарения: -температура, -влажность, -скорость обдувания.
 - состав сыворотки крови:
 - концентрация и состояние белков,
 - концентрация липидов.

Капля плазмы не является однородным раствором белков и веществ, и свойства плазмы в различных точках отличаются. Различия в свойствах в разных точках в истинных растворах связаны с флуктуациями плотности веществ вызванных движением молекул. В плазме крови все обстоит гораздо сложнее. Глобулярные молекулы белков и других веществ, находящихся в плазме крови, являются молекулами, окруженными гидратными оболочками. Молекулы белков и других веществ объединяются в кластеры, комплексы большого размера. Размер и структура этих комплексов не фиксирована, а очень динамично изменяется. Локальные свойства плазмы в различных областях определяются размером и структурой этих комплексов.

Большую роль для формирования структур капли имеет перемешивание, структура конвекционных потоков. Чем сильнее перемешивание - тем лучше разделение компонент. Перемешивание обеспечивает перенос и разделение компонент сыворотки. Следующие условия кристаллизации не являются оптимальными:

-если капля тонкая, то она быстро высыхает, и не происходит перемешивания, - если капля толстая и большая по площади, то перемешивание осуществляется только внутри локальных зон конвекции, и белок не выносится на периферию капли.

При оптимальных условиях зоны конвекции имеют радиальную структуру, и перемешивание осуществляется от краев к центру.

Основным параметром, определяющим структуру капли, является скорость испарения. Управлять скоростью испарения можно путем изменения температуры, влажности, скоростью обдувания. При замедлении испарения происходит упрощение структуры капли. Напряжения, возникающие в геле, при медленном испарении, успевают релаксировать. Таким образом, получаем, что при повышенной влажности будет образовываться меньше трещин, и структура капли упростится.

Не существует единой универсальной методики выполнения операции дегидратации на все случаи жизни. В зависимости от того, какие компоненты

20 структуры капли необходимо выявить, необходимо модифицировать процедуру дегидратации.

Основная задача состоит в том, чтобы выбрать параметры, при которых информативность высохшей капли была максимальна. Под информативностью можно понимать количество различных структур в высохшей капле.

Вторая задача состоит в достижении максимальной оперативности диагностики. Сократить время постановки диагноза от нескольких часов до нескольких минут. Необходимо выбрать параметры так, чтобы максимальная информативность достигалась за минимальное время, минимизировать время испарения.

Один из вариантов методики испарения состоит не в выборе одного какого-то режима испарения, а комбинированный (программный) режим испарения. Например, первый этап испарения свободной воды (наиболее длительный) можно проводить быстро. Для этого устанавливается высокая температура, низкая влажность, и обдувание теплым воздухом. Второй этап испарения (формирование геля), можно проводить медленно. Для этого устанавливается пониженная температура, повышенная влажность, и нет обдувания. В результате применения такой методики сокращается время и увеличивается информативность.

Таблица 1-4. Управление временем испарения.

Уменьшение времени испарения	Управляемый параметр	Увеличение времени испарения
увеличить	температура	уменьшить
уменьшить	влажность	увеличить
увеличить	обдувание	уменьшить

1.2 Управление формой капли.

Форма капли определяется различными параметрами:

V- объем капли, h- высота капли, S- площадь основания капли, r- радиус капли, α- краевой угол, p- поверхностное натяжение.

Эти параметры связаны формулами $V=c \cdot h \cdot S$, где c- некоторая константа, $S=R \cdot R$.

1.2.1 Зависимость формы капли от объема капли.

1.2.1.1 Постоянный состав сыворотки.

Будем раскапывать капли одной и той же сыворотки (постоянство состава) на один и тот же тип поверхности (предметное стекло одной и той же марки) (постоянство поверхности раскапывания). При растекании капли по стеклу капля принимает определенную форму. При малом объеме капли капля принимает сферическую форму. При большом объеме капли капля принимает форму лужицы с плоской поверхностью. При дальнейшем увеличении объема для описания капли больше подходит термин - тонкий слой сыворотки (пленка сыворотки). Объем, при котором форма капли переходит от сферической к плоской верхней поверхности, называется критическим объемом. Соответствующие радиус, площадь и высота капли так же называются критическими. Критическая высота определяется коэффициентом поверхностного натяжения. При раскапывании сыворотки крови на поверхность стекла критический объем равен 100 мкл, критический радиус равен 6 мм, критическая высота равна 1 мм.

Для изучения формы капли проводятся следующие эксперименты: -зависимость радиуса капли от объема капли. Радиус капли возрастает вначале пропорционально корню кубическому от объема капли, а потом пропорционально корню квадратному от объема капли -зависимость высоты капли от объема капли. При малых объемах капли высота капли пропорциональна объему капли. Как только высота капли достигает критического значения, она остается постоянной и не зависит от объема капли.

При раскапывании капли на стекло форма контактной поверхности со стеклом очень

часто отличается от круга. Это связано с двумя причинами: -чистота поверхности стекла. Если поверхности стекла касались пальцами, то на поверхности остаются жировые следы, которые ухудшают смачивание и искажают форму капли.

-неоднородность капли. Состав капли не является однородным. Это влияет на процесс растекания капли по поверхности.

В связи с этим более точно измерять площадь капли на цифровом изображении капли. А радиус капли определять как радиус эквивалентного круга, имеющего такую же площадь.

Таблица 1-5. Зависимость высоты капли от объема капли:

Объем капли, мкл	2,5	5	10	20	30	60	100	150	200	250
Диаметр, мм	3	4	5	7	8	10	13	20	22	24
Высота, мм до начала дегидратации	0,15	0,2	0,3	0,6	0,75	0,90	1,0	1,0	1,0	1,0
Высота бугра, мм после дегидратации	0,037	0,04	0,05	0,06	0,08	0,09	0,1	0,1	0,1	0,1
Высота центральной части после дегидратации, мм				0,03						

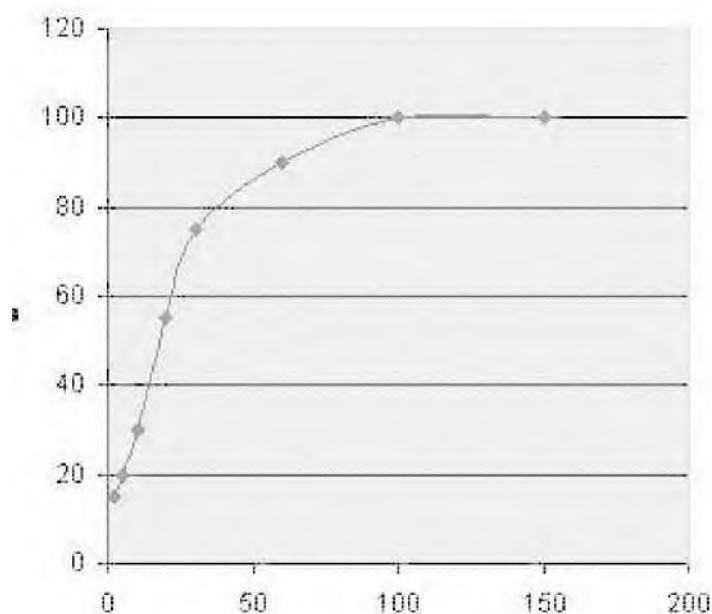


Рис. 1-2. Зависимость высоты капли (100=1 мм) от объема капли (в миллилитрах)

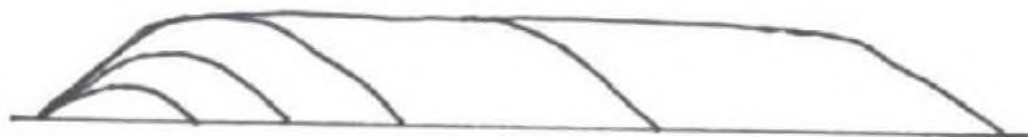


Рис 1-3. Изменение формы капли при увеличении объема капли.

После высыхания капли ее оставшаяся высота составляет одну десятую часть от исходной высоты капли, например, 1мм перейдет в 0,1 мм. Это объясняется тем, что вода составляет 90% массы капли.

1.2.1.2 Переменный состав сыворотки.

При изменении состава сыворотки происходит изменение поверхностного натяжения. Поверхностное натяжение зависит от концентрации липидов и иммуноглобулинов, которые ведут себя как поверхностно-активные вещества. Альбумин так же снижает величину поверхностного натяжения. Можно упорядочить

различные компоненты по степени снижения поверхностного натяжения следующим образом: вода - альбумин - иммуноглобулины - липиды.

Если зафиксировать объем капли и тип поверхности, на которой производится раскапывание, то в зависимости от величины поверхностного натяжения будет изменяться площадь капли.

Величина краевого угла пропорциональна величине поверхностного натяжения.

При увеличении концентрации липидов поверхностное натяжение и краевой угол уменьшаются.

При уменьшении поверхностного натяжения и краевого угла площадь капли увеличивается.

Следовательно, получаем, что при увеличении концентрации липидов площадь капли увеличивается. Таким образом, получаем, что значение площади капли определяется концентрацией липидов, и является важным диагностическим параметром. Для диагностики область значений площади капли разбивается на три диапазона:

- если площадь капли S меньше чем S_1 ($S < S_1$) ($S_1 = 5 \text{ мм}^2$), то диагностируется пониженное содержание липидов,
- если площадь капли находится в диапазоне между S_1 и S_2 ($S_1 < S < S_2$) ($S_2 = 9 \text{ мм}^2$), то диагностируется норма,
- если площадь капли больше S_2 ($S_2 < S$), то диагностируется повышенное содержание липидов.

Адсорбционный слой на поверхности раздела раствор-воздух является областью повышенной концентрации белков. Чем больше молекулярная масса - тем сильнее молекулы концентрируются на границе раздела. При этом высокомолекулярные компоненты (иммуноглобулины) вытесняют более низкомолекулярные молекулы альбумина с поверхности.

Если раскапывать много капель одной и той же сыворотки, то площадь капель будет распределена по нормальному закону. Разброс значений составляет 3%. Непостоянство площади капель обусловлено небольшим различием в составе капель, неоднородностью поверхности, на которую происходит раскапывание, небольшие изменения объема капли, наносимой дозатором.

Если раскапывать капли различной сыворотки (фиксированы объем капли и тип поверхности), то площадь капель так же будет распределена по нормальному закону. Однако разброс значений площади станет гораздо больше - 10%. Этот разброс значении прежде всего определяется составом капли (концентрация липидов.)

1.2.2 Формирование различных структур в зависимости от объема капли.

Сыворотка крови является коллоидным раствором, имеющим сложный состав. При испарении воды происходит кристаллизация многокомпонентного коллоидного раствора. Основная задача состоит в том, чтобы подобрать метод кристаллизации, который бы позволил получить максимальное количество информации о составе и свойствах исходной сыворотки крови. Особенность решаемой задачи состоит в том, что для кристаллизации имеется небольшой объем жидкости, ориентировочно 1 миллилитр. В связи с этим рассматривается задача кристаллизации одной капли биожидкости.

Для изучения структуры капли необходимо выработать оптимальный метод дегидратации. Оптимальным методом дегидратации является такой метод, при

котором происходит максимальное структурирование капли. Оптимальные условия кристаллизации должны удовлетворять следующим условиям: -максимальное разделение компонент биожидкости, -образование краевого валика максимальной высоты, -максимальное выделение солей в центральной зоне, -максимальную структурированность трещин, -наличие единой зоны конвекционных потоков.

Таблица 1-6. Формирование различных структур в зависимости от объема капли.

Объем капли, мкл	5	10	15	20	25	30	35	50	100	150
Диаметр капли, мм	4	5	6	7	8	9	10	11	13	20
Ширина белкового валика, мм	0,25	0,5	0,5	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
Белковый валик	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
Трещины	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ячейки	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Соли в центре	+	+	+	+				-	-	-
Белок осадок	-	-		+	+	+	+	+	+	+
Языковые структуры	-	-		0				+	+	+
Кольцевые трещины в ячейках	-	-	-	-				0	+	+
Морщины	-	-		0				+	+	+

0-Белковый валик образуется при любом объеме капли.

1- Трещины имеют четкую структуру при объеме капли более 15 мкл.

2- Ячейки имеют четкую структуру при объеме капли более 20 мкл.

3- Соли проявляются в центральной части капли тем лучше, чем меньше объем капли.

4- Языковые структуры проявляются тем лучше, чем больше объем капли.

5- Черви проявляются при объеме капли более 10 мкл.

Таким образом, получается, что нет единого наилучшего объема раскапываемой капли. Наиболее оптимальным объемом для выявления различных структур является объем 20 или 25 мкл. Самым оптимальным методом является раскапывание нескольких капель разного объема:

-2,5 мкл - для выявления солей,

-25 мкл - для выявления структуры трещин и ячеек,

-50 мкл - для выявления языковых структур.

Если объем капли меньше 5 мкл, то капля затвердевает в виде прозрачного кольца. Из структур образуется только краевой валик.

Для выявления различных структур капли оптимальные условия различны. Не существует условий кристаллизации, при которых одинаково хорошо проявляются все структуры капли. Но можно подобрать условия, при которых проявляется максимальное количество структур. Наиболее оптимальным значением объема капли для максимального проявления различных структур является объем 20 мкл.

Разумеется, что данные параметры являются усредненными по многим наблюдениям. Появление отдельных структур зависит от количества различных компонент в сыворотке. В зависимости от концентрации различных компонент различные структуры проявляются при различных значениях объема капли. На самом деле наиболее информативным параметром является минимальный объем капли, при котором появляется заданная структура.

Принципиальное изменение условий перемешивания происходит, когда объем капли превышает критический объем. В этом случае форма капли становится сферической, а плоской.

Основные структуры капли определяются наличием белка. Формирование структур белка определяется двумя основными параметрами: количество белка в

капле, и площадь основания капли. Количество воды не определяет структуры, так как вода все равно испарится, много ее в капле или мало. Однако можно исследовать структуры капли не в пространстве параметров количество белка и площадь, а в пространстве параметров концентрация белка и объем капли. Количество белка в капле пропорционально концентрации белка, а площадь капли пропорциональна объему капли.

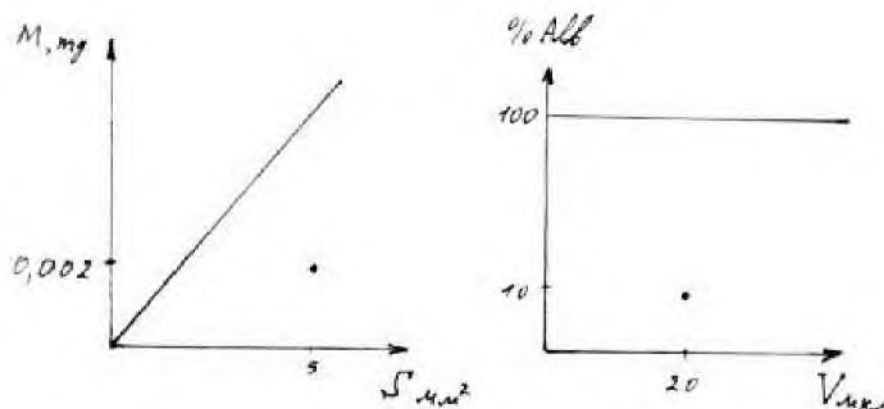


Рис 1-4. Реализуемые соотношения параметров дегидратируемой капли - объем и процентное содержание альбумина.

1.2.3 Выбор материала, на котором проводится дегидратация.

Тестировались различные материалы для использования в качестве подложки для проведения дегидратации капли. Материал подложки определяет два параметра:

-В зависимости то смачиваемости сывороткой материала подложки (гидрофобности подложки) изменяется краевой угол капли, и следовательно, изменяется форма капли. Если материал гидрофильный, то поверхность хорошо смачивается водой, краевой угол маленький, и капля имеет маленькую высоту и большой радиус. Если материал гидрофобный, то поверхность плохо смачивается водой, и капля имеет большую высоту и малый радиус.

-В зависимости от силы взаимодействия молекул сыворотки с поверхностью материала подложки изменяется сцепление высохшей капли с подложкой.

Раскапывание можно проводить на различную поверхность:

-Стекло. Обычно дегидратацию проводят на стеклянной подложке. Сыворотка хорошо растекается по поверхности стекла, и имеет сильное сцепление со стеклом.

-Металлическая фольга. При раскапывании капли на металлическую поверхность (алюминиевая фольга) капли после высыхания отскакивают вследствие слабого сцепления высохшей сыворотки с металлом.

-Целлофан. При раскапывании капли на целлофановую пленку происходит сильная деформация пленки. Это вызвано относительно сильным сцеплением сыворотки с целлофаном и гибкостью целлофана.

Краевые углы для смачиваемости водой различных веществ (в градусах):

кварц - 0, малахит - 17, стекло - 20, графит - 55, тальк - 69, парафин - 106, фторопласт - 108.

Таблица 1-7. Зависимость поверхностного натяжение воды на границе с воздухом (мН/М) от температуры (в градусах).

Темпер.	0	5	10	15	20	25	30	40	50	60	70	80
Натяж.	74,64	74,92	74,22	73,49	72,75	71,97	71,18	69,6	67,9	66,2	64,4	62,6

При обработке стеклянной поверхности различными веществами можно увеличить гидрофобность (краевой угол).

Таблица 1-8. Значение краевого угла для воды и цитратной крови.

Обработка	Вода.	Кровь
Обычное стекло	12	18
100%(CH ₃) ₂ SiCl ₂ + 0% CH ₃ SiCl ₃	86	78
20%(CH ₃) ₂ SiCl ₂ + 80%CH ₃ SiCl ₃	97	84
40%(CH ₃) ₂ SiCl ₂ + 60%CH ₃ SiCl ₃	83	92
60%(CH ₃) ₂ SiCl ₂ + 40%CH ₃ SiCl ₃	103	90
80%(CH ₃) ₂ SiCl ₂ + 30%CH ₃ SiCl ₃	97	100
0%(CH ₃) ₂ SiCl ₂ + 100%CH ₃ SiCl ₃	91	87
Парафиновая поверхность	104	102

Величина краевого угла имеет большое значение на формирование структур капли. Угол смачивания определяет ширину застойной зоны, в которой нет конвекции, и в которой идет осаждение белков. Если высота капли меньше некоторой критической величины (примерно 1 мм), то не формируется структура кольцевых трещин в ячейках альбумина. Если величина угла смачивания более 80 градусов, то отсутствует застойная зона, и вся капля формируется при одинаковых условиях и образуется один толстый слой альбумина. Если величина угла смачивания от 20 до 80 градусов, то присутствует застойная зона, и возникают кольцевые структуры. Если величина угла смачивания менее 20 градусов, то вся капля формируется практически при одинаковых условиях, и образуется тонкий слой альбумина. Таким образом, можно сделать вывод, что существует некоторое оптимальное значение угла смачивания (примерно 45 градусов) при котором формирование структуры капли будет наиболее информативным.

Материал подложки влияет не только на смачиваемость и на величину краевого угла. Большое значение имеет взаимодействие поверхности материала с молекулами белка для образования различных структур в поверхностном слое между материалом подложки и сывороткой. Оказывается, если предметное стекло, на которое наносится сыворотка, предварительно обработать раствором лецитина, то количество образуемых структур методом закрытой капли увеличится в два раза по сравнению с обезжиренным предметным стеклом.

1.2.4 Управление площадью капли.

Один из способов управления площадью капли - выбор материала, на который производится раскапывание. На хорошо смачиваемом материале (гидрофильном) площадь капли будет большой. На плохо смачиваемом материале (гидрофобном) площадь капли будет маленькой. Если материал фиксирован (стандартное предметное стекло), то существует другой способ управления площадью капли.

-Увеличение площади капли (уменьшение высоты). Капля наносится на стекло, и размазывается до достижения необходимой площади. При увеличении площади капли (при неизменном объеме) происходит уменьшение высоты капли. Ширина белковой зоны остается постоянной, а высота белкового валика уменьшается. При малой высоте капли (большой площади) происходит нарушение конвекционных течений и нарушаются нормальные условия для перемешивания и формирования структур капли.

-Уменьшение площади капли (увеличение высоты). Уменьшение площади достигается нанесением капли на стекло, на котором заранее нарисованы круги необходимой площади. Круги рисуются специальным гидрофобным карандашом, который создает валик, через который раскапываемая капля не растекается. При увеличении высоты (уменьшении площади) происходит уменьшение центральной зоны, так как ширина белкового валика остается постоянной и растет его высота. При некоторой высоте капли происходит смыкание белкового валика в центре и пропадает центральная зона.

При изменениях площади капли (при постоянном объеме капли) будет изменяться угол смачивания.

В пространстве двух параметров V, S (объем и площадь) имеется некоторая область реализуемых значений. Можно маленький объем сыворотки размазать по большой площади, но нельзя большой объем жидкости нанести на маленькую площадь. Для каждого значения площади объем может принимать значения от нуля до некоторого максимального значения, пропорционального площади, $V_{\max} = c \cdot S$.

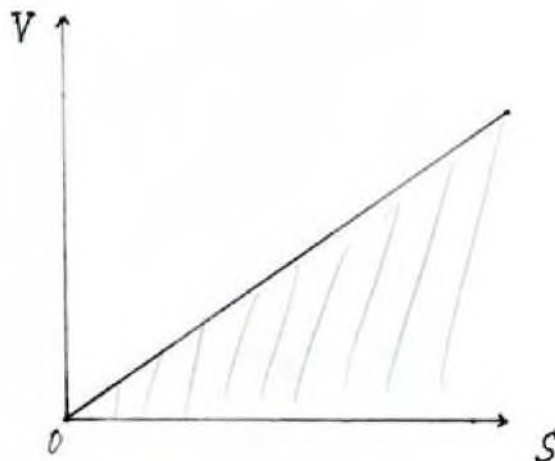


Рис 1-5. Область реализуемых значений для площади и объема капли.

1- Случай малой площади капли, площадь капли порядка 25 мм²:

- если высота мала - образуется прозрачная капля без трещин,
- если высота большая - образуется капля белка.

2- Случай средней площади капля, площади капли порядка 100 мм²:

Таблица 1-9. Различные варианты формы капли.

Форма капли	Малый угол	Средний угол	Большой угол
Большая высота	B3A1 -не реализуется	B3A2 -есть ромашка -есть кольцевые тр. - нет соли	B3A3 -нет ромашки -есть кольцевые тр. -капля альбумина
Средняя высота	B2A1 -нет ромашки -нет кольцевых тр.	B2A2 -есть ромашка, -есть кольцевые тр.	B2A3 -нет ромашки -есть кольцевые тр. -капля альбумина
Маленькая высота	B1A1 -нет ромашки -нет кольцевых тр. - прозрачная капля	B1A2 -нет ромашки -нет кольцевых тр.	B1A3 -нет ромашки -нет кольцевых тр. -капля альбумина

При раскапывании обычным способом мы имеем варианты B2A2 или B2A1.

Описание различных вариантов:

B1 A1-ничего не формируется, прозрачная капля без трещин.

B2A1 - если имеется боле сильное смачивание. Формирование трещин не упорядочено, нет ромашки.

B3A1-не реализуется.

B1 A2-тонкий слой альбумина с малым количеством трещин. Нет кольцевых трещин в ячейках.

B2A2 - если поверхность стекла правильно подготовлена. Формируются трещины в виде ромашки. Формируется центральная солевая зона.

B3A2-имеется кольцевая структура, не прорисовывается центральная зона солей.

B1 A3-получается маленькая капля альбумина без трещин.

В2А3-получается средняя капля альбумина. В3А3-получается толстая капля альбумина с кольцевыми трещинами

3- Случай большой площади капли, порядка 300 мм²:
-если высота мала - образуется прозрачная капля с произвольной сетью трещин, -
если высота большая - образуется ячейки альбумина с кольцевыми трещинами.

Различные режимы управляемой дегидратации:

- 1- Если необходимо создать каплю со структурой ромашки, необходимо обеспечить большой угол между каплей и поверхностью стекла (предварительная обработка стекла).
- 2- Если необходимо создать каплю без трещин, и без выпадения белков - необходимо обеспечить малый угол между каплей и стеклом (размазанная капля).
- 3- Если необходимо создать каплю с большим числом трещин - дегидратация производится быстро, при повышенной температуре и пониженной влажности.
- 4- Если необходимо создать каплю без трещин - дегидратация производится медленно, при пониженной температуре и повышенной влажности.
- 5- Если необходимо более точную структуру краевой зоны - дегидратация производится в вогнутом часовом стеклышке.

В зависимости от соотношения высоты и площади капли изменяется режим дегидратации. Если зафиксировать объем капли и увеличивать площадь (метод размазанной капли), то при увеличении площади структуры проявляются слабее. Если фиксировать объем капли и уменьшать площадь (наносить каплю в кольцо все более меньшего размера до некоторого критического) то будет увеличиваться толщина осевшего слоя альбумина, и будет увеличиваться растрескиваемость. Другой вариант исследования - фиксирована площадь капли, капля раскапывается в кольцо. Если объем капли маленький, и она не заполняет все кольцо - каплю размазывают. При увеличении объема до некоторого критического объема капли кольцо будет ограничивать растекание и площадь будет оставаться постоянной.

Можно ввести в рассмотрение параметр A равный отношению высоты капли к диаметру капли.

При $0 < A < 0,1$ - режим размазанной капли.

При $A = 0,1$ - собственная форма капли, обычный режим.

При $0,1 < A < 0,3$ - капля в круге, обычная форма высохшей капли.

При $0,3 < A < 0,4$ - капля в круге, толстая капля, проявляется только белок.

При $0,4 < A < 0,5$ - капля в круге, толстая капля, в центре высохшей капли бугор из белка.

При $A = 0,5$ - капля имеет вид полусферы, угол смачивания - 90 градусов.

Два основных параметра, которыми можно управлять - это объем капли и площадь капли. Площадь капли задается следующим образом. Если требуемая площадь больше стандартной, то капля размазывается до требуемой площади (размазанная капля). Если требуемая площадь меньше стандартной, то капля наносится в кольцо, нанесенное на предметное стекло (ограниченная капля).

При фиксированном объеме капли по мере уменьшения площади можно выделить следующие случаи: -размазанная капля:

1- $S_1 < S$ - тонкая прозрачная пленка,

2- $S_2 < S < S_1$ - тонкая пленка с трещинами

3- $S_3 < S < S_2$ - структуры с ячейками

4- $S = S_3$ - стандартный структуры -ограниченная капля:

5- $S_4 < S < S_3$ - структуры с ячейками

- 6- $S_5 < S < S_4$ - гора белка в центре
- 7- $S < S_5$ - не реализуется из-за растекания капли.

-Тонкая капля (размазанная капля).

Метод состоит в том, что на предметное стекло наносится капля объемом 50 мкл. Диаметр капли на стекле составляет 10 мм. Капля размазывается наконечником дозатора до диаметра 20 мм. Таким образом, создается тонкая капля с малым углом смачивания. Имитируется сильно смачиваемая поверхность. На сильно смачиваемой поверхности тонкая капля создается без размазывания. В случае тонкой капли режим испарения капли существенно изменяется. Капля постепенно стягивается к центру в форме сегмента сферы, оставляя на поверхности стекла тонкую пленку альбумина. При высыхании тонкая пленка альбумина покрывается мелкими трещинами, а центральная часть капли высыхает в обычном режиме.

При дегидратации большой размазанной капли образуется три области:

- 1- внешняя, тонкая, прозрачная, плоская, без трещин или с тонкими трещинами - это зона испарения слабо связанной воды с малой концентрацией белков.
- 2- средняя, более толстая, прозрачная желтоватая, с трещинами, небольшое увеличение высоты (небольшой валик) - это зона испарения плазмы с высокой концентрацией белков,
- 3- внутренняя, чуть меньшей толщины, мутная, с трещинами, с кристаллами соли - это зона испарения плазмы с высокой концентрацией солей.

-Капля с отростком.

Модификация метода размазанная капля - метод капля с отростком. Капается обычная капля, а затем с помощью наконечника дозатора производится отведение части капли на небольшое расстояние. Капля принимает форму круга с отростком. В этом отростке происходят процессы испарения, резко отличающиеся от процессов в основной капле. Таким образом, на одной капле мы производим сразу два режима дегидратации. В отростке образуется тонкая прозрачная пленка без трещин очень маленькой высоты. Можно предположить, что это слабо связанная вода с низкой концентрацией белков. При высыхании отросток получается прозрачным, с низкой высотой и без трещин.

Если величина отростка достаточно большая, то он ведет себя как отдельная капля. В центре отростка выпадают соли, а вокруг - прозрачное кольцо.

-Толстая капля (ограниченная капля).

Метод состоит в том, что на предметном стекле наносится круг диаметром 10 мм с помощью гидрофобного карандаша. Обычно такой диаметр имеет капля объемом 30 мкл. Но так как гидрофобная граница не дает капле растекаться, то в эту область можно накапать гораздо больший объем сыворотки крови - до 60 мкл. При этом высота капли составит 2 мм. При высыхании такой капли на всей поверхности образуют толстые ячейки из альбумина желтого цвета и концентрическим растрескиванием. Если толщина капли больше некоторого порога, то в центре капля образуется бугор из высохшего альбумина.

-Большая капля.

Если налить много сыворотки крови (более 500 мкл) на большое стекло (или в чашку Петри, при условии, что капля не касается краев), то получается большая

капля (лужа). Капля имеет постоянную высоту, не зависящую от объема. На краю капли не образуется валика, как на малых каплях. Однако белковая структура по краю имеется, и ширина белковой зоны постоянна и не зависит от объема капли. Ширина белковой зоны определяется только высотой капли (примерно 2 мм), и

составляет примерно 3 мм.

1.3 Управление температурой.

1.3.1 Испарение капли при нормальной температуре.

1.3.1.1 Динамика испарения.

Динамика испарения характеризуется зависимостью массы капли от времени. Другим параметром, характеризующим динамику испарения, является скорость испарения. Функция зависимости скорости испарения от времени является первой производной от функции зависимости массы капли от времени. Время, через которое масса капли перестанет изменяться, называется временем испарения.

Для изучения динамики процесса испарения измеряется зависимость массы капли от времени. На основе этой зависимости строится зависимость скорости испарения от времени. Для измерения зависимости массы капли от времени стекло с нанесенной каплей помещают на прецизионные весы, и регистрируют показания весов через определенный промежуток времени. Приведем результаты одного из экспериментов (масса капли в миллиграммах, с интервалом времени - 5 минут): 602, 571, 538, 501, 473, 449, 418, 389, 355, 323, 291, 259, 229, 200, 171, 144, 119, 101, 88, 78, 72, 69, 67, 67.

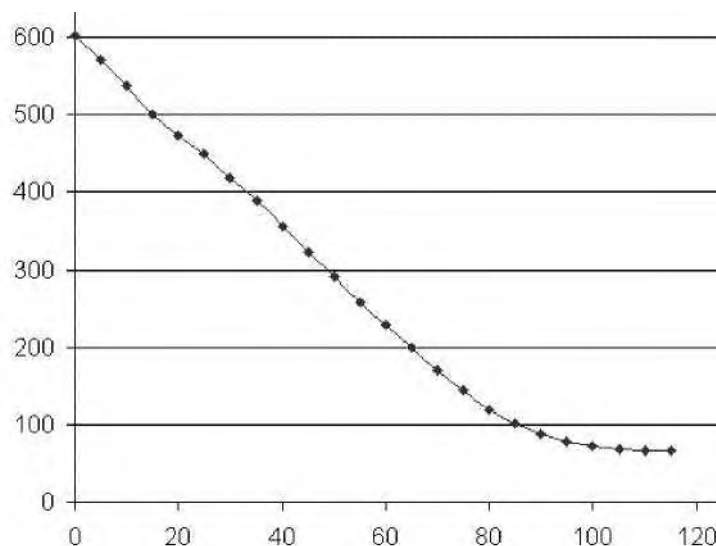


Рис. 1-6. Зависимость массы капли от времени.

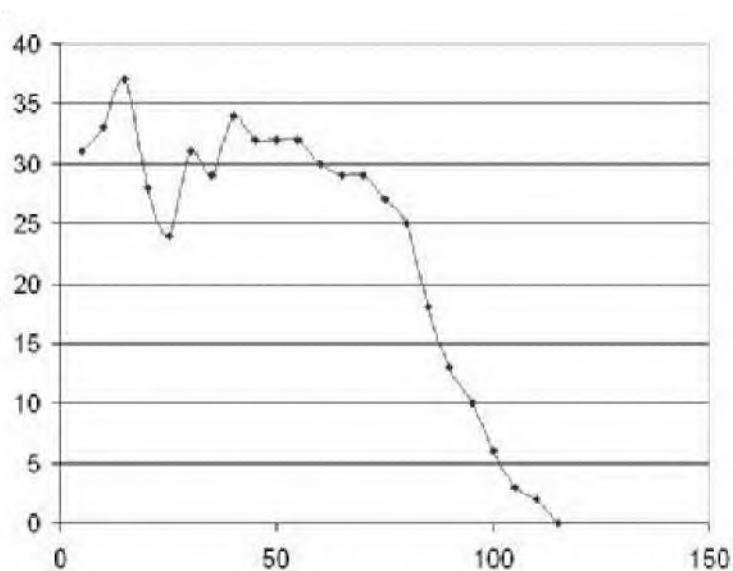


Рис. 1-7. Зависимость скорости испарения от времени (эксперимент).

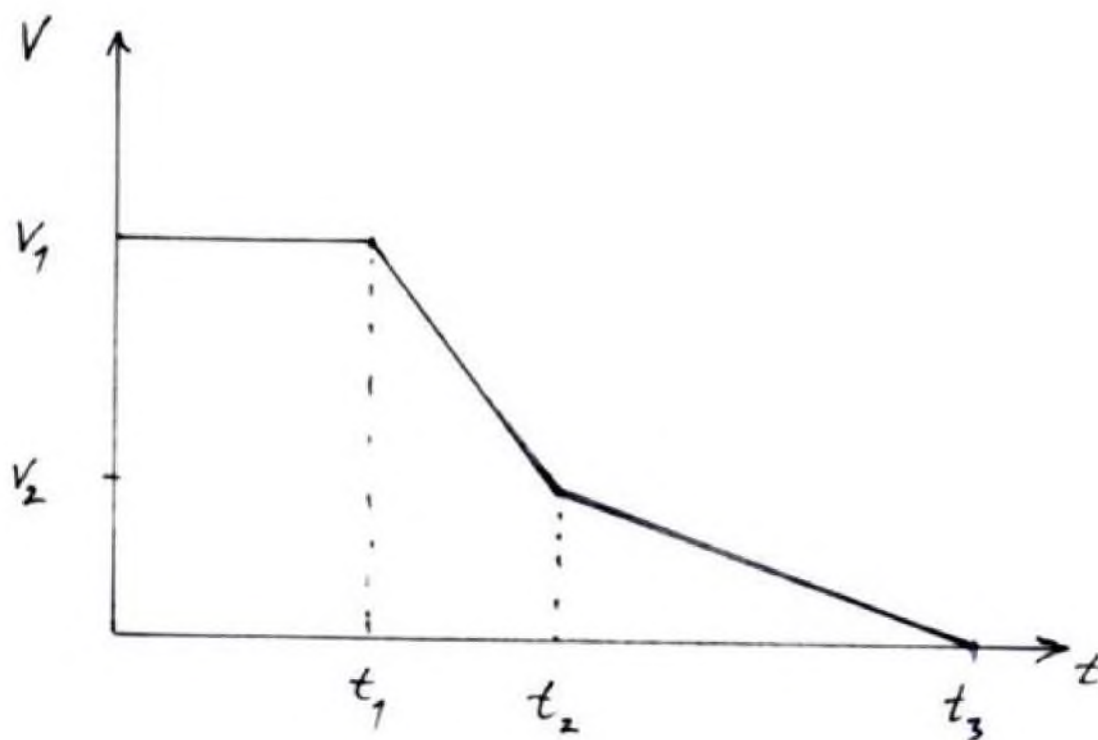


Рис. 1-8. Зависимость скорости испарения от времени (теория). T1 - время начала уменьшения площади жидкой фазы. T2 - время полного испарения жидкой фазы. T3 - время полного испарения. V1 - скорость испарения свободной воды. V2 - скорость испарения связанной воды.

Динамика испарения состоит из нескольких этапов.

1- Первый этап испарения. Происходит испарение свободной воды со всей поверхности капли. Скорость испарения высокая и постоянная. Капля сохраняет форму сферической поверхности. Происходит уменьшение высоты капли и уменьшение краевого угла. Происходит повышение плотности белка в краевой

зоне капли. Ориентировочно через 60 минут концентрация белков в краевой зоне достигает критического значения.

Если рассмотреть заполнение пространства шарами (глобулярными молекулами), то плотность шаров составит 0,740 от общего объема. Объем

величиной 0,26 останется заполненным жидкостью. Таким образом, получаем, что в критический момент в краевой зоне испарится вся связанная вода и останется 0,26 объема свободной ваты.

2- (время T1) Второй этап испарения. В краевой зоне начинает происходить затвердевание белка. На поверхности капли образуется загустевшая пленка в виде гибкой корочки. Жидкая фаза сыворотки начинает стягиваться к центру. Площадь испарения уменьшается. Скорость испарения уменьшается пропорционально площади испарения. Ориентировочно через 10 минут испаряется вся жидкая фаза.

3- (время T2) Жидкой фазы больше нет, происходит испарение связанной воды. Продолжительность - ориентировочно 10 минут. Скорость испарения постепенно уменьшается, так как образуется твердая внешняя оболочка капли, препятствующая испарению.

4- (время T3) Прекращается испарение. Масса капли больше не изменяется. Число вылетевших молекул воды сравнялось с числом вернувшихся молекул воды.

График зависимости скорости испарения от времени представляет собой ступенчатую функцию с тремя ступеньками - скорость испарения свободной воды (из жидкой фазы), скорость испарения связанной воды (из фазы геля), отсутствие испарения.

Таблица. 1-10. Зависимость времени начала (T1) и конца (T2) гелеобразования и времени испарения (T3) от объема капли (в мкл) в минутах.

T	Объем капли (мкл)	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
T1	Начало гелеобр. (мин)	30	40	50	60	65	70	75	80	85	90	100	110
T2	Конец гелеобр. (мин)	40	50	60	70	75	80	85	90	95	100	110	120
T3	Время испарения	50	60	70	80	85	90	95	100	105	110	120	130

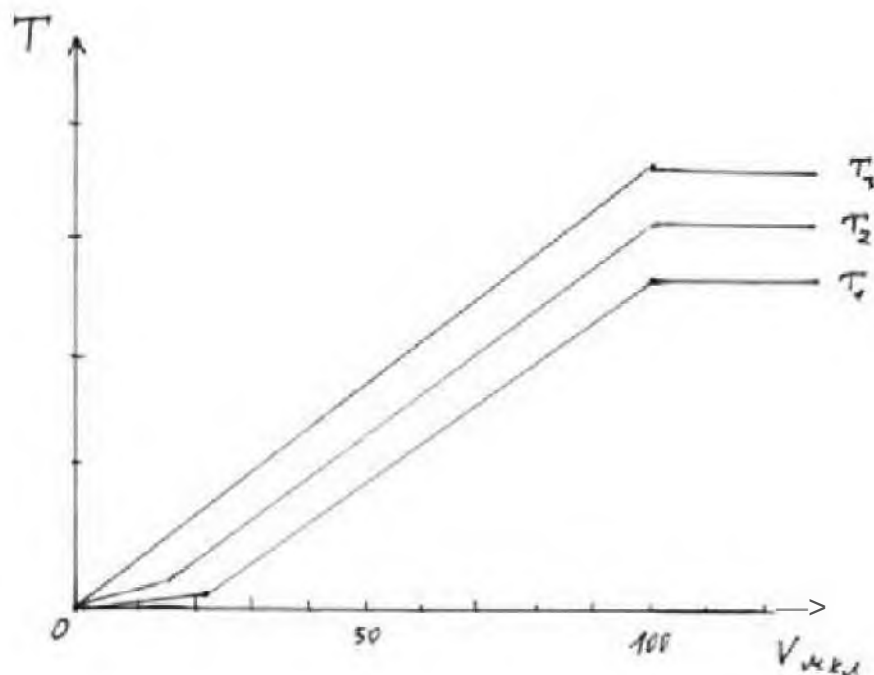


Рис. 1-9. Зависимость времени начала гелеобразования (T_1) конца гелеобразования (T_2) и времени испарения от объема капли. Объем 100 мкл - это критический объем капли, больше которого высота капли не изменяется.

Анализ полученной таблицы показывает, что при увеличении объема капли увеличивается только продолжительность первого (подготовительного) этапа дегидратации - первичное испарение воды и достижение концентрации белка, необходимой для гелеобразования. Продолжительность двух завершающих этапов (гелеобразование и затвердевание) имеет практически постоянную продолжительность - 10 минут.

1.3.1.2. Зависимость формы капли от времени.

Зависимость формы капли от времени определяется прежде всего составом капли.



Рис. 1-10. Изменение формы капли от времени для чистой воды, нет залипания границы.



Рис. 1-11. Изменение формы капли от времени для вязкой жидкости (раствор сахара).



Рис. 1-12. Изменение формы капли от времени для раствора белка при отсутствии перемешивания. Имеется залипание границы (пиннинг).

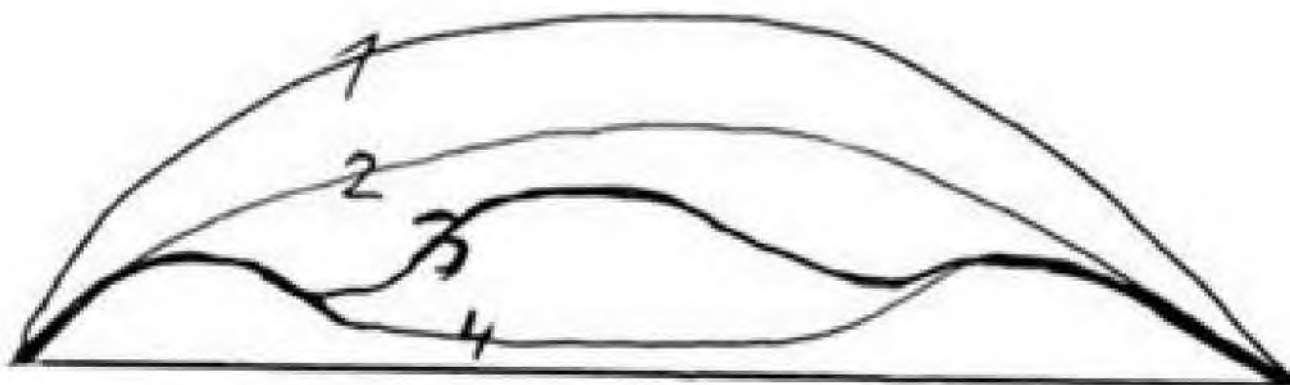


Рис. 1-13. Изменение формы капли от времени для сыворотки крови при наличии перемешивания.

- 1- 0 минут - начало испарения,
- 2- 60 минут - критическая точка, начинается сжатие жидкой фазы,
- 3- 65 минут - сжатие жидкой фазы,
- 4- 70 минут - прекратилось изменение формы капли.

1.3.1.3 Время испарения.

На время испарения влияют два основных фактора - условия испарения (температура и влажность) и состав сыворотки. Если условия испарения поддерживаются постоянными, то изменения времени испарения определяются изменениями состава сыворотки. На время испарения влияют следующие компоненты сыворотки:

- белки (концентрация и состояние). При увеличении концентрации белков время испарения уменьшается (уменьшается количество свободной воды).
- липиды (поверхностно-активные вещества). При увеличении концентрации липидов они образует на поверхности капли более плотную пленку, и время

испарения воды увеличивается.

Время испарения (время полного высыхания жидкой фазы) является важным диагностическим признаком при диагностике различных заболеваний. Увеличение времени испарения (уменьшение скорости испарения) свидетельствует о нарушении процесса агрегации белков, т.е. о нарушении структуры белков.

На динамику испарения влияют различные факторы. Например, наличие на поверхности капли пленки поверхностно-активных веществ, имеющихся в сыворотке (липидов). Получается, что испарение осуществляется через пленку. В связи с этим скорость испарения воды будет существенно меньше по сравнению со скоростью испарения с поверхности капли чистой воды. Скорость испарения уменьшается примерно в полтора раза. При испарении капли чистой воды поверхность капли очень подвижна. При малейшем движении воздуха над каплей происходит перемещение поверхностной пленки с расположенными на ней пылинками и частицами.

Некоторое несовпадение зависимости времени испарения от объема капли, приведенные в таблицах 7 и 8 объясняется тем, что эксперименты проводились в разных условиях (различные температура и влажность окружающей среды). При фиксированных параметрах (объем капли, температур и влажность) и при раскапывании одной и той же сыворотки (постоянный состав) результаты измерения времени испарения для большого числа капель будут распределены по нормальному закону. Временем испарения следует считать среднее значение по большому числу экспериментов. Вариации времени испарения вызваны следующими причинами:

- различный объем капель, наносимых дозатором,
- различная площадь капель, вызванная различием в свойствах поверхности в различных местах,
- небольшое различие в составе сыворотки капель, так как сыворотка не однородна.

1.3.1.4 Масса сухого остатка.

При регистрации динамики испарения капли очень важным является отношение массы исходной капли к массе высушенной капли. В литературе приводятся данные, что вода составляет 90% сыворотки крови. На основе этого можно предположить, что отношение массы исходной капли к высохшей капли составит 10. Экспериментально получено, что обычно это отношение равняется 9. Величина этого отношения хорошо согласуется с количеством белка в сыворотке крови.

1.3.2 Испарение капли при повышенной температуре.

Дегидратацию можно проводить при нормальной, повышенной или пониженной температуре. Обычно дегидратацию проводят при комнатной температуре.

1. Раскапывание на нагретую поверхность. Предполагается, что температура воздуха, стекла и капли совпадают. Эта методика является общепринятой. Дегидратацию при повышенной температуре можно проводить различными способами:

36

- раскапывание на стекло при комнатной температуре, а затем помещают стекло с каплей на нагретый термостатируемый столик.
- стекло заранее находится на термостатируемом столике, и раскапывание осуществляется на горячее стекло,
- обдувание теплым воздухом.

Температура, при которой происходит дегидратация, является вторым очень важным параметром. Необходимо иметь в виду, что:

- 100 градусов - закипает вода,

-60 градусов - при этой температуре происходит денатурация белка (альбумины денатурируют при температуре 67 градусов, глобулины денатурируют при температуре 69-75 градусов).

-36,6 градусов - температура человеческого тела, это нормальная температура для крови, и это нормальная температура для дегидратации капли.

-21 градус - обычная комнатная температура, при которой обычно проводит дегидратацию капли сыворотки.

-0 градусов - вода кристаллизуется.

Таким образом, получаем, что рабочий диапазон температур для дегидратации составляет от 21 до 60 градусов. При повышении температуры время дегидратации уменьшается. При температуре выше 100 градусов капля испаряется мгновенно.

При увеличении объема капли время испарения растёт. При увеличении объема капли время испарения будет возрастать до тех пор, пока высота капли не достигнет максимального (критического) значения (100 мкл). При дальнейшем увеличении объема капли время испарения изменяться не будет.

Таблица 1-11. Зависимость времени испарения капли (в минутах) от объема капли и от температуры (при обычной влажности):

Объем капли (мкл)	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
Радиус капли (мм)	4	4,5	5	6	7	8	8,5	9	9,5	10	10,5	11
25 градусов	60	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280
30 градусов	18	20	24	31	40	45	50	55	60	65	70	75
35 градусов	15	18	20	25	30	31	32	34	36	38	40	42
40 градусов	10	14	17	19	21	23	24	25	26	27	30	33
45 градусов	7	10	12	14	16	17	18	19	21	22	23	24
50 градусов	6	8	9	10	13	14	15	17	18	19	21	21
60 градусов	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
70 градусов	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
80 градусов	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

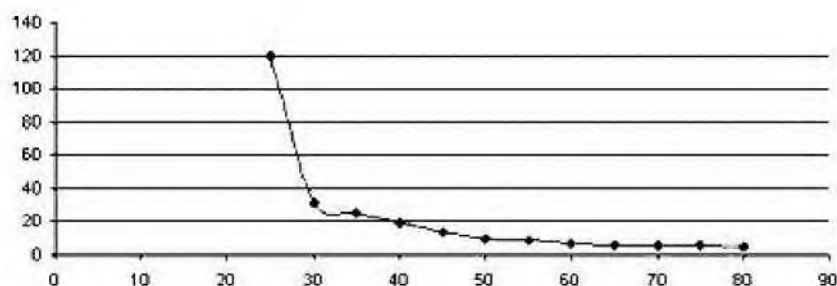


Рис. 1-14. Зависимость времени испарения (в минутах) от температуры (в градусах) для капли объемом 20 мкл.

На основе приведенного графика можно сделать вывод, что для ускорения процесса испарения воды (для более оперативного получения результатов анализа для диагностики заболеваний) удобно проводить испарение при температуре 36 градусов. При более высокой температуре будет происходить нарушение структуры белка, а при более низких температурах резко возрастет время испарения.

На самом деле для структурообразования капли важна не сама температура дегидратации, а скорость испарения. В зависимости от соотношения двух скоростей - скорости испарения и скорости гелеобразования будет существенно меняться структура капли. Скорость гелеобразования является неуправляемым параметром, и зависит от концентрации компонент сыворотки крови. Значит необходимо управлять скоростью испарения. Управляя скоростью испарения мы тем самым управляем структурой трещинообразования.

Скорость испарения определяется следующими параметрами: -температура, чем выше температура, тем выше скорость испарения, -влажность (давление пара над поверхностью), чем выше влажность, тем меньше скорость испарения, -скорость потока воздуха над поверхностью (есть или нет обдувание). При обдувании капли время испарения сократится, так как скорость испарения пропорциональна скорости движения воздуха над поверхностью капли. Каплю специально обдувают теплым воздухом.

-Для увеличения скорости испарения (уменьшения времени испарения) необходима пониженная влажность (проводить дегидратацию в эксикаторе) и наличие обдувания.

-Для уменьшения скорости испарения (увеличения времени испарения) необходима повышенная влажность и отсутствие обдувания. Путем сильного повышения влажности можно добиться того, что испарение станет очень медленным, и время испарения можно сделать сколь угодно большим.

При слабом повышении температуры ускорятся испарение и ускоряются все процессы кристаллизации. Общая структура капли не изменяется.

При температуре 32 градусов особенностей не возникает.

При температуре 36 градусов иногда для капель объемом 30 мкл происходит образование бугра в центре капли из белка.

При температуре 40 градусов бугор в центре для малых капель (объемом 0,5 или 1,0 или 2,5 мкл) не образуется. Если объем капли более 5 мкл - то в центре образуется бугор. При объеме капли более 30 мкл общая структура капли сохраняется (радиальные трещины, по краям - ячейки), но в центре появляется бугор из белков. При дегидратации под крышкой (повышенная влажность) при температуре 40 градусов белок собирается в центре, если объем капли больше 40 мкл.

При температуре 50 градусов за 10 минут в капле формируются три зоны: - Внешнее плоское кольцо, много трещин в виде ромашки, оседает белок. -Среднее более высокое кольцо, трещин меньше, белка нет. -В середине капли - бугор застывшего альбумина темно-желтого цвета.

При дегидратации при температуре выше 70 градусов в результате дегидратации получается очень тонкая капля с радиальными трещинами, а в центре огромная капля - высохший альбуминовый пузырек. При этом вся капля быстро собирается в центре (кроме тонкой пленки), и затем шарообразная капля в центре начинает затвердевать.

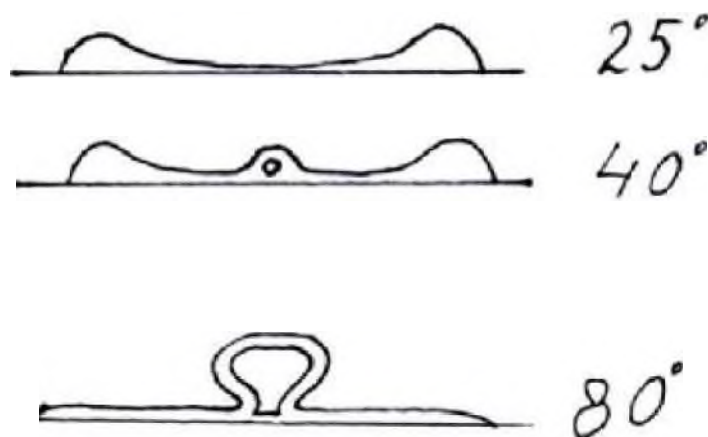


Рис. 1-15. Зависимость формы высохшей капли от температуры испарения.

Таким образом, в пространстве параметров V,T (объем, температура) существует некоторая область, соответствующая оптимальной дегидратации (V - от 10 до 40 мкл, T -от 22 до 40 градусов).

Рассмотрим причину образования бугра в центре капли. При испарении при нормальной температуре воздух, растворенный в сыворотке, постепенно выходит через поверхность капли. При высокой температуре на поверхности капли быстро образуется загустевшая корочка толщиной 0,1 мм. Воздух, выделяющийся из сыворотки, собирается в виде пузырька под этой корочкой. Так как вся капля еще не затвердела, пузырек воздуха растет и поднимает за собой верхнюю корочку как пленку. Высохшая капля представляет собой тонкий слой растрескавшегося альбумина, а в центре большая затвердевшая сферическая капля - воздух внутри альбуминовой корки.

При повышенной температуре сцепление высохшей капли со стеклом очень слабое, и капли легко отслаиваются от стекла.

Таблица 1-12. Зависимость давления паров воды от температуры:

Температура, град	0	10	20	30	40	60	80	100
Давление, мм рт ст	4,58	9,2	17,5	31,8	55,3	149,4	355	760

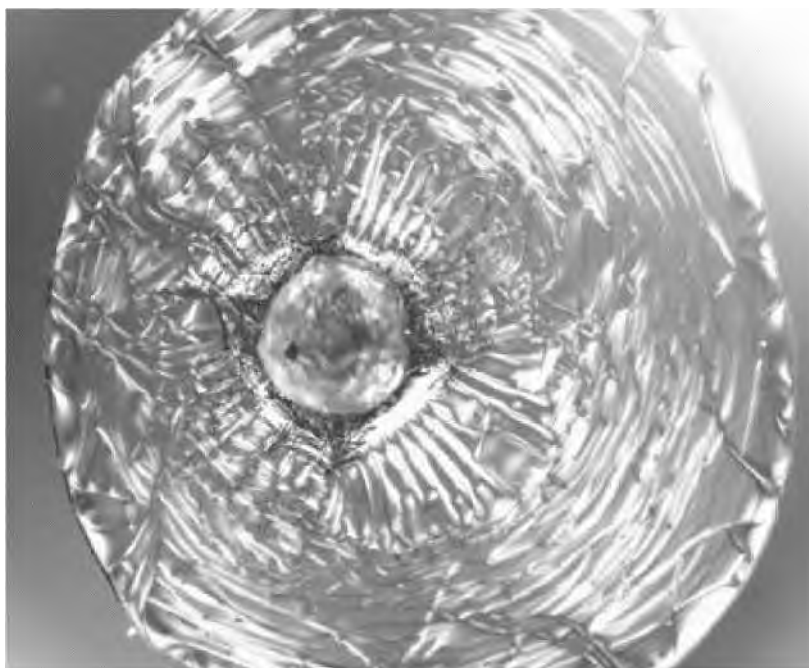


Рис. 1-16. Дегидратация капли при температуре 60 градусов. В центре капли - большой бугор альбумина. Поле зрения 8 мм.

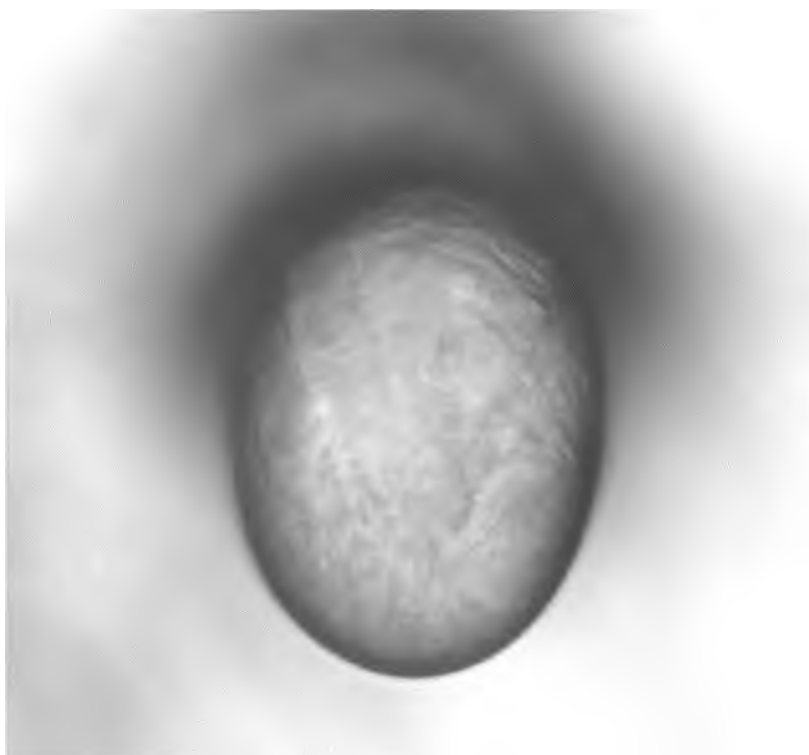


Рис. 1-17. Бугор альбумина в центре капли, высушенной при температуре 60 градусов. Поле зрения 3 мм.



Рис. 1-18. Срез бугра в центре капли сыворотки, высохшей при температуре 80 градусов. Видно строение тонкостенного пузырька. Поле зрения 3 мм.

1.3.3 Испарение капли при пониженной температуре.

Дегидратацию при пониженной температуре можно проводить различными способами:

- раскапывание на стекло при комнатной температуре. Затем помещают стекло с каплей на охлажденный термостатируемый столик.
- Стекло заранее находится на термостатируемом столике, и раскапывание осуществляется на охлажденное стекло.
- испарение в холодильнике, при этом температура составляет от 3 до 8 градусов, - испарение на охлаждаемом термостолке или на элементе Пельтье в режиме охлаждения. В этом случае можно управлять температурой.

При пониженной температуре существенными являются следующие процессы: уменьшается скорость испарения воды из капли, и уменьшается скорость диффузии веществ в капле. Капля высыхает медленнее, и структура капли изменяется. При пониженной температуре улучшаются условия для кристаллизации соли, в центральной зоне капли много крупных одиночных кристаллов соли. При пониженной температуре ухудшаются условия агрегации белка. Белок слабо выражен на периферии капли. Хорошо видны ядра в ячейках.

Замораживание капли. Если охладить каплю сыворотки крови на предметном стекле до температуры меньше 0 градусов, то в начальный момент капля не меняется. Происходит переохлаждение жидкости. При достаточно сильном переохлаждении наступает вторая фаза процесса - возникает центр кристаллизации, и из этого центра за 2 секунды распространяется во все стороны фронт кристаллизации воды. Капля становится мутной, молочного цвета, как капля молока. При кристаллизации воды образуются мелкие кристаллы чистой воды, и различные вещества между ними. Известно, что при кристаллизации морской воды образуется лед из пресной воды. Лед не содержит солей. При образовании морского льда между ледяными кристаллами, состоящими из чистой воды, задерживаются мелкие капельки морской воды (рассол), обуславливающие его солёность. С течением времени рассол стекает вниз, и солёный морской лед опресняется, и в нём появляются пузырьки воздуха, создающие его пористость.

Установлено, что при замерзании воды на границе между льдом и водой возникает разность электрических потенциалов, достигающая десятков вольт.

С проблемой кристаллизации биожидкостей связана проблема криоконсервирования клеток, крови, плазмы крови. Важно понять процессы, происходящие при кристаллизации воды, которая составляет основную массу биожидкостей. Важно понять, какие свойства биожидкостей сохраняются при замораживании, а какие свойства теряются при замораживании.

Проведение дегидратации до и после замораживания позволяет выявить степень нарушения структурных свойств плазмы крови в процессе замораживания. Это позволяет выбрать оптимальные методы замораживания, которые в минимальной степени влияют на изменение свойств плазмы крови.

Японский исследователь Масару Эмото выяснил, что на форму кристаллов воды (снежинок) при замораживании влияет состояние воды.

1.4 Управление влажностью.

Скорость испарения зависит от влажности. Чем больше влажность - тем меньше скорость испарения. Нормальной влажностью при температуре 20 градусов считается относительная влажность воздуха от 40% до 60%. При такой влажности время испарения капли объемом 20 мкл составляет 60 минут. Если проводить испарение в эксикаторе, в котором влажность близка к нулю, время испарения сократится. Если накрыть стекло с каплей чашкой Петри, то влажность под чашкой Петри увеличится, и время испарения увеличится. При увеличении влажности - время испарения будет увеличиваться. При 100% влажности испарение не будет происходить, время испарения равно бесконечности, капля никогда не испарится.

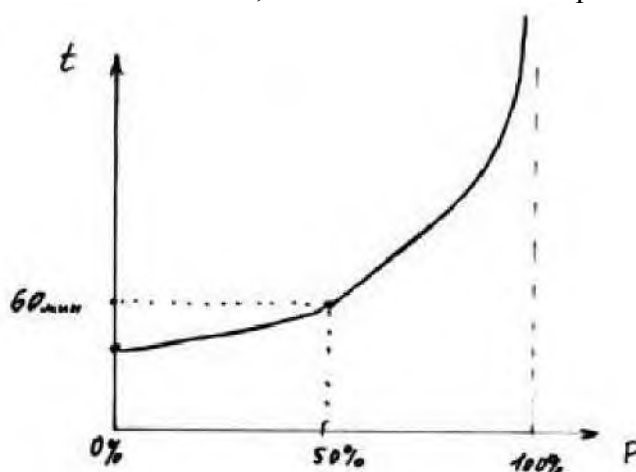


Рис. 1-19. Зависимость времени испарения капли от относительной влажности воздуха.

Таблица. 1-13. Абсолютная влажность воздуха (г/м³) в зависимости от температуры.

Температура, градусы	-30	-20	10	0	10	20	30	40	50	60	70	80
Абсолютная влажность	0,29	0,81	2,1	4,8	9,4	17,3	30,4	51,1	83,0	130	198	293

1.5 Управление обдуванием.

При обдувании скорость испарения возрастает, а время испарения уменьшается. Можно предположить, что обдувание эквивалентно 0% влажности, так как обдувание удаляет все молекулы воды, вылетевшие с поверхности капли.

Возможны два варианта обдувания - обдувание воздухом с комнатной

температурой, и обдувание теплым воздухом. Обдувание теплым воздухом может привести к нарушению конвекционных потоков, так как изменится распределение температур между нижней и верхней поверхностью капли.

Для обдувания очень удобно использовать обычный фен для сушки волос. У фена существует два режима обдувания - с включенным и с выключенным нагревателем. При включенном нагревателе имеется возможность регулировки температуры обдуваемого воздуха.

1.6 Управление составом капли.

Составом капли можно управлять.

1. Разведение водой (H_2O). Например, при разведении сыворотки крови водой в два раза, в два раза уменьшается процентное содержание всех компонент сыворотки. Если после разведения раскапывать тот же объем сыворотки, то получается, что на той же площади капли (площадь капли зависит от объема и не зависит от состава) будет содержаться в два раза меньше компонент. Структура высохшей капли существенно изменится. Интересным является следующий вопрос - при какой минимальной концентрации белка начинает происходить залипание границы и образование белкового валика? Известно, что при концентрации белка от 9% и выше белковый валик образуется. При разведении сыворотки в 10.000 раз (концентрация белка 0,001%) образуется тонкий валик белка по краю капли. Валик из белка образуется при любой степени разведения. Белок всегда собирается на краю капли в виде валика. Ширина и высота валика пропорциональны количеству белка.

При слабом разведении немного увеличивается центральная область, и лучше проявляется структура солей. При дальнейшем разведении сыворотки вначале пропадают структуры в центральной зоне. Соли формируют структуры в узкой полоске между белковым валиком и пустой центральной зоной. Радиальные трещины образуются только с краю капли и не доходят до центра капли. Затем пропадают ячейки в краевой зоне. Затем пропадают все трещины в краевой зоне. Белковый валик становится однородным и гладким. Следом за ним располагается тонкое кольцо структур соли. При очень сильном разведении структуры соли пропадают. Белковый валик становится очень тонким. В белковом валике появляются морщины около различных частиц, попавших в высыхающую сыворотку.

Разведение сыворотки эквивалентно моделированию пониженного содержания белков в крови.

2. Концентрирование. Концентрацию компонент в сыворотке можно увеличить, если перед раскапыванием выпарить некоторое количество воды. Если выпарить половину объема сыворотки, то концентрация компонент возрастет в два раза. Однако стоит учитывать, что нельзя проводить выпаривание при высокой температуре, так как произойдет разрушение компонент и изменение структуры сыворотки.

Концентрирование сыворотки эквивалентно моделированию повышенного содержания белков в крови.

Разведение и концентрирование изменяют физические свойства сыворотки.

-Изменение удельного веса (плотности). При разведении сыворотки водой плотность линейно уменьшается от плотности сыворотки 1,025 г/см³ до плотности воды - 1,0 г/см³. При выпаривании плотность сыворотки возрастает.

-Изменение вязкости. При разведении сыворотки водой вязкость уменьшается от вязкости сыворотки (1,2 условных единиц) до вязкости воды (1,0 условных единиц). При дегидратации вязкость сыворотки возрастает.

3. Добавление соли (NaCl). При добавлении соли существенно изменится соотношение белков и соли. Структура капли так же изменится. Метод добавления соли в каплю сыворотки называется методом тизиографии, и используется как самостоятельный метод.

1.7 Различные методы высушивания.

Вакуумная сушка. Савиной Л.В. изучалась вакуумная сушка капель сыворотки крови. Капли высушивались в вакуумной камере при давлении 0,1 мм рт. ст. и при температуре 22 градуса. Время высушивания - 1 час.

Сублимационная сушка. Сублимационная сушка осуществляется в специальных сублимационных камерах. Препарат вначале замораживается, а затем осуществляется сублимационная возгонка воды в вакуум. Вода из твердого состояния сразу переходит в парообразное состояние. При сублимационной сушке сохраняются химические и биологические свойства препаратов, но структурные свойства сыворотки пропадают.

Перевернутая капля. Если каплю поместить на стекло, а затем стекло перевернуть, то капля окажется с нижней поверхности стекла. При наблюдении сверху в этом случае так же наблюдаются течения. По верхней поверхности течение направлено от центра к краю. По нижней поверхности капли течение направлено от края капли к центру. Испарение воды осуществляется с нижней поверхности капли, значит, нижняя поверхность капли холоднее, чем верхняя поверхность. Объяснить течения с помощью Рэлееской модели конвекционной неустойчивости не получается. Течения можно объяснить помощью модели Марангони за счет поверхностного натяжения. Возникшие течения вызывают неоднородность температуры на поверхности капли. Это приводит к неоднородности поверхностного натяжения на поверхности капли. Жидкость на поверхности движется от более горячих областей к более холодным, так как поверхностное натяжение уменьшается с повышением температуры.

Глава 2. Процессы, происходящие при дегидратации методом открытой капли.

Метод исследования сыворотки крови путем высушивания на предметном стекле называется метод открытой капли, метод угловой дегидратации, метод клиновидной дегидратации. Сыворотка крови объемом 10-20 мкл наносится на предварительно подготовленную поверхность предметного стекла. Имеются

различные варианты подготовки поверхности стекла: обезжиривание, протирание фильтровальной бумагой или тканью. Дегидратация производится при комнатной температуре 20-25 градусов. Диаметр капли составляет 5-7 мм, высота капли - ориентировочно 1 мм. Угол смачивания капли - 25-30 градусов. Дегидратация продолжается 18-24 часа.

Савина Л.В.- Сыворотку крови объемом 10-20 мкл наносят на предметное стекло. Предварительно поверхность стекла промывается, просушивается и протирается замшей или фильтровальной бумагой. Высушивание производится в электрическом суховоздушном шкафу при температуре +37 градусов в течении 34 часов до полного удаления влаги

Шатохина С.Н.- Сыворотку объемом 10-20 мкл наносят на обезжиренное предметное стекло. Высушивание производят при температуре 20-25 градусов и относительной влажности 65-70% в термостатированном шкафу. Продолжительность высыхания - 18-24 часа.

Метод исследования биожидкостей путем дегидратации в принципе аналогичен другим методам, используем для анализа жидкостей: электрофорез, седиментация (центрифугирование), хроматография. Общим в этих методах является создание условий, при которых молекулы или частицы с разными свойствами локализуются в различных местах в пространстве. Это пространственные методы разделения. При дегидратации капли создаются градиентные условия от края к центру, которые вызывают пространственное разделение компонент сыворотки с различными свойствами. Поэтому пространственное разделение имеет концентрическую структуру.

Одним из основных параметров, в соответствии с которым происходит разделение компонент, является размер (масса) компонент сыворотки. По мере увеличения размеров можно выделить следующие компоненты - молекулы воды (0,26 нм), ионы Na и Cl (0,3 нм), молекулы средней массы (токсины), молекулы альбумина (3,6 нм), нагруженные молекулы альбумина (молекулы альбумина с токсинами), молекулы глобулинов, молекулы фибрина (22 нм), ЛПВП (12 нм), ЛПНП (25 нм), хиломикроны (до 1000 нм), агрегаты в виде остатков разрушенных клеток (до 1000 нм), эритроциты (10.000 нм). Необходимо иметь в виду, что эффективные размеры компонент в сыворотке крови гораздо больше реальных, так как все компоненты окружены гидратными оболочками.

Рассмотрим процессы, которые происходят при высыхании капли:

T0-0 мин - начало испарения. Момент нанесения капли сыворотки крови на стекло, жидкая фаза, постепенное испарение воды, черви на дне, возникновение конвекционных потоков, формирование морщин и бляшек в геле,

T1-60 мин - начало движения границы жидкой фазы (фронта загустения геля) к центру, жидкая фаза начала уменьшаться в размерах, начало гелеобразования в краевой зоне, жидкая фаза находится в виде капли в центральной части, черви существуют все время в жидкой фазе,

T2-63 мин - начало образования трещин, начало затвердевания в краевой зоне, движение фронта затвердевания геля к центру капли, начало выпадения

45 агрегатов вдоль радиальных трещин, начинается образование поперечных трещин, образование ячеек,

T3-68 мин - начало осаждения белка в краевой зоне вдоль трещин,

T4-70 мин - полное испарение жидкой фазы,

T5-80 мин - завершение образования радиальных трещин, радиальные трещины сходятся в центре, начало образования псевдотрещин,

T5- (75-85 мин) - выделение солей в центральной зоне, движение фронта кристаллизации соли от центра к краю. Соли могут начать выпадать как до, так и после схождения радиальных трещин.

Постепенное образование ядер в ячейках, движение фронты выпадения белков от края к центру, выпадение солей на верхней и нижней поверхностях ячеек, образование кольцевых трещин в ячейках, сжатие ячеек и расширение радиальных трещин.

-Завершается образование трещин.

-Завершается выпадение солей.

-Завершается осаждение белков.

Т6-90 мин - завершение процессов дегидратации, масса капли больше не уменьшается.

Первый этап - испарение несвязанной воды.

2.0 от 0 до 1 мин. Начальный этап.

На этапе раскапывания, когда капля образовалась на конце дозатора и летит на стекло, на поверхности капли образуется слой поверхностно-активных веществ (липидов). Когда капля опустилась на поверхность стекла, начинаются два процесса: растекание капли по поверхности стекла и взаимодействие капли со стеклом.

2.0.1 Растекание капли.

Важным является сам процесс растекания капли по поверхности стекла. Капля сыворотки крови является неоднородной сложно-структурированной вязкой жидкостью. Отдельные слои и сгустки не растекаются, а сохраняются при дегидратации и проявляются в высохшей капле. Само растекание происходит в виде отдельных струй и течений внутри капли. Капля при растекании принимает форму круга.

Растекание капли происходит в два этапа:

1- й этап, продолжается от 0 до 1 сек, диаметр капли увеличивается от 0 до 5 мм, растекание происходит быстро.

2- й этап, продолжается от 1 сек до 2 мин, диаметр капли увеличивается от 5 мм до 6 мм, растекание происходит медленно. При растекании диаметр капли увеличивается до тех пор, пока не установится равновесие сил растекания и сил поверхностного натяжения, пока не установится необходимый критический угол. При нанесении капли на стекло начальная площадь капли маленькая, а краевой угол - большой. При растекании площадь капли увеличивается, а краевой угол - уменьшается.

Угол смачивания капли сыворотки крови на стекле равен 14 градусам, для воды угол смачивания на стекле равен 30 градусам. Величина угла смачивания не является постоянной, и зависит от многих параметров (чистота поверхности стекла, состав сыворотки, температура). На поверхности стекла имеются не скомпенсированные заряды, это оказывает сильное влияние на процесс

смачивания. Поверхность стекла водой смачивается, поскольку в стекле содержится достаточно много атомов кислорода, и вода легко образует водородные связи с атомами кислорода.

Сразу после нанесения капли на поверхность стекла рядом с каплей на стекле образуется много мелких капелек. Эти капельки образовались в результате конденсации пара, который находится вокруг капли.

2.0.2 Образование прозрачного краевого кольца.

Коллоидный раствор.

При дегидратации капли коллоидного раствора в краевой зоне капли образуется тонкое прозрачное кольцо. Краевое кольцо не содержит коллоидных частиц. При дегидратации сыворотки прозрачное кольцо образуется сразу после растекания капли. Ширина кольца около 0,2 мм. Краевой угол для кольца меньше, чем у сыворотки. Таким образом, получается, что при переходе от прозрачного кольца к белковому валику имеется прогиб на поверхности капли. Краевое кольцо отделяется от остальной капли четкой границей выпадения осадка белков.

Аркообразные трещины.

Именно на границе между прозрачным кольцом и основной массой сыворотки происходит образование аркообразных трещин, которые при росте разворачиваются и в виде радиальных трещин распространяются к центру.

Гребешковые трещины.

В краевом кольце, как правило, трещины отсутствуют. Иногда краевое кольцо пересекают трещины, перпендикулярные к краю капли. Характерными для краевого кольца являются гребешковые трещины. Гребешковые (краевые, лесенка) - это группа коротких наклонных трещин, расположенных на самом краю капли. Особенность образования гребешковых трещин состоит в том, что они образуются в кольце застывшей сыворотки, у которой переменная толщина (в виде клина по направлению к краю капли), и переменная твердость (максимальна твердость на поверхности капли). В связи с этим гребешковые трещины имеют следующие характерные особенности:

- они образуются только в тонком прозрачном краевом кольце,
- они образуют группу из нескольких параллельных трещин с постепенно уменьшающейся длиной,
- они растут по направлению от центра капли к краю капли, -они растут под углом 45 градусов к внешней границе капли, -они являются не вертикальными, а наклонными,
- они не прямые, а загнутые. Направление загиба - в сторону от ближайшей радиальной трещины,
- они являются утончающимися, вначале они толстые, а ближе к краю утончаются.

Наличие гребешковых трещин является диагностическим признаком.



Рис. 1-20. Гребешковые трещины в зоне краевого кольца.

Растянутая капля .

Можно провести интересный эксперимент. Капля сыворотки наносится на стекло. Затем, с помощью наконечника дозатора от капли отводится некоторое количество сыворотки на расстояние нескольких миллиметров. Получается круглая капля с небольшим языком. Изучение процессов, происходящие в языке, позволяет более глубоко понять процессы, происходящие в капле. В косом свете видны концентрические границы, образующиеся при высыхании капли.

-на поверхности языка четко видны полосы, последовательные этапы при загустевании сыворотки. Видно, что смещение границы загустевания происходит скачками.

-видна четкая граница перехода между языком и основной каплей. На основной капле уже не видно скачков загустевания.

-если язык достаточно тонкий, то он является однородным, без трещин.

-если толщина языка больше некоторого порогового значения, то на его поверхности образуются небольшие кристаллы соли.

Если на стекло нанести каплю крови (плазма с эритроцитами), то в краевой зоне сразу происходит гемолиз эритроцитов. Мембрана эритроцитов разрушается, и эритроциты сливаются в сплошную массу. Одна из возможных причин гемолиза - эритроциты разрушаются в чистой воде.

2.0.3 Процесс взаимодействия капли со стеклом.

На дне капли образуется контактный слой, который обеспечивает сцепление капли со стеклом. Можно изучать процесс формирования капли путем удаления жидкой фазы капли.

1- Если каплю сразу слить со стекла, то на поверхности стекла остается тонкая пленка жидкости, которая в течении несколько минут высыхает, и остается тонкая однородная прозрачная твердая пленка. Если на стекло капнуть каплю чистой воды, то она стекает без следа.

2- Если удалить воду через 5 минут после раскапывания, то на стекле останется небольшой краевой валик белка. Этот валик можно исследовать отдельно.

3- Если удалить воду через 10 минут после раскапывания, то валик белка останется больше, и на дне капля будет тонкий слой, сцепленный со стеклом. После высыхания эта пленка растрескивается в виде ромашки без образования других структур.

4- Если каплю сыворотки слить после начала образования трещин, то в центральной части капли будет гладкая поверхность.

Наличие пленки на поверхности высыхающей капли. Если имеется хилезная сыворотка крови, в которой много мелких капелек жира, то эти капельки всплывают, и встраиваются в верхнюю липидную пленку. Капельки всплывают, так как плотность жира меньше, чем плотность воды.

Температура нижней части капли сравнивается с температурой предметного стекла и начинается испарение. Испарение происходит с верхней поверхности капли. Испарение происходит через монослой липидов. Поэтому испарение происходит в полтора раза медленнее, чем с поверхности чистой воды. Диаметр капли не изменяется (явление пиннинга), так как контактный слой капли со стеклом формируется сразу после раскапывания и фиксирует положение и размер капли.

2.0.4 Процессы на поверхности капли.

Состав и свойства поверхности испаряющейся капли существенно отличаются от свойств основной массы капли.

- на поверхности капли повышенная концентрация липидов, которые являются поверхностно-активными веществами,
- на поверхности капли повышенная концентрация белков, так как с поверхности происходит испарение. Вода испаряется, а выравнивание концентрации белков из-за диффузии затруднено, так как вязкость капли возрастает,
- загустевание капли происходит с поверхности, а под поверхностью сохраняется гелеобразное состояние сыворотки,
- конвекционные течения происходят во внутренней поверхности капли. Поверхность капли остается неподвижной. Это можно наблюдать по неподвижным частичкам пыли, находящимся на поверхности капли.
- поверхность капли не является ровной. В центре ячеек Бернара, где конвекционные течения выходят наружу, находится углубление. По краям ячеек, где встречаются течения соседних ячеек и течения уходят вниз, находится возвышение.
- температура на поверхности капли не является постоянной по всей поверхности. В местах выхода конвекционных потоков снизу - температура повышена. В местах опускания конвекционных потоков вниз - температура понижена.

Адсорбционный слой на поверхности раздела раствор-воздух является областью повышенной концентрации белков. Чем больше молекулярная масса - тем сильнее молекулы концентрируются на границе раздела. При этом высокомолекулярные компоненты (иммуноглобулины) вытесняют более низкомолекулярные молекулы альбумина с поверхности.

Можно провести следующий эксперимент. На поверхность капли наносится несколько кристаллов перманганата калия (марганцовки). Наблюдаются следующие явления:

1- Часть кристаллов остается лежать в неизменном виде на поверхности капли. Значит, за счет сил поверхностного натяжения и наличия пленки кристалл удерживается на поверхности без соприкосновения с каплей.

49

2- Образуется круглая область бурого цвета с четкой границей. Значит, на поверхности образовалась отдельная маленькая окрашенная капля, не смешивающаяся с основной каплей.

3- кристалл на поверхности, а под ним бурое пятно с размытыми краями. Значит, кристалл частично проник в основную каплю, и там происходит растворение и диффузия марганцовки.

4- Бурое пятно с размытыми краями. Значит, кристалл полностью провалился в каплю, и там растворяется.

5- От темных бурых пятен в радиальном направлении расходятся светлые бурые полосы. Значит, имеются течения, которые разносят растворенные кристаллы.

2.0.5 Седиментационные процессы.

Каплю сыворотки крови можно рассматривать как многокомпонентный полидисперсный коллоидный раствор. Для коллоидных растворов имеет место явление седиментации. Большие частицы, которые более тяжелые и у которых диффузия медленная - оседают быстро. Маленькие частицы, которые более легкие и у которых диффузия быстрая - оседают медленно. Скорость оседания частиц пропорциональна квадрату диаметра частицы. Частицы диаметром 10 мкм оседают за 6 сек, частицы диаметром 1 мкм оседают за 10 мин. Устанавливается седиментационное равновесие. При равновесии изменение концентрации с высотой тем больше - чем больше частицы. Например, для частиц гуммигута размером 230 мкм убывание концентрации с высотой в два раза происходит на высоте 30 мкм. Таким образом получаем, что в верхней части капли располагаются мелкие коллоидные частицы, а в нижней части капли - крупные частицы. Мелкие частицы выносятся на край капли течением. Таким образом, получается, что в центральной части капли больше крупных частиц, а в краевой части капли больше мелких частиц. Происходит разделение частиц по размерам.

2.1 от 1 до 60 мин. Конвекционные потоки.

В процессах испарения чистой воды и растворов высокомолекулярных соединений имеются несколько принципиальных различий:

1- При испарении капли чистой воды краевой угол не меняется, а площадь контакта с подложкой сокращается, капля стягивается. При испарении растворов площадь контакта с подложкой не изменяется (явление пиннинга), а краевой угол уменьшается.

2- При испарении растворов высокомолекулярных соединений верхняя и нижняя поверхность капли неподвижна,

3- Испарение растворов высокомолекулярных соединений осуществляется через пленку ПАВ, и происходит более медленно.

4- При испарении сыворотки на поверхности формируется приповерхностный слой с повышенной концентрацией растворенных веществ.

Таблица 1-14. Сравнения процессов испарения капли воды и капли сыворотки крови.

№	Параметр	Вода	Сыворотка крови
1	Площадь капли	уменьшается	постоянна (пиннинг)
2	Краевой угол	постоянный	уменьшается
3	Вязкость	постоянна	возрастает
4	Наличие ПАВ	нет	есть

50

Рассмотрим некоторые выявленные закономерности.

Радиальное течение. Внешняя граница капли неподвижна (явление пиннинга) а испарение с внешнего края происходит. Для восполнения потери испарившейся воды возникает течение, направленное от центра к краю капли.

Перепад температур. За счет испарения воды верхняя поверхность капли немного охлаждается, и со дна поднимаются вверх более теплые слои капли. Измерения с помощью пирометра показывают, что если температура подложки (стекла) составляет 28,1 градуса, то температура на поверхности капли составляет 24,8 градуса. При этом самая низкая температура на поверхности расположена в

центре капли. Ближе к краю температура повышается, и на краю совпадает с температурой подложки. Значит, перепад температур составляет 3,3 градуса при толщине капли 0,5 мм.

Распределение температуры на верхней поверхности капли. Если с помощью тепловизора зарегистрировать распределение температуры на верхней поверхности капли, то картина будет соответствовать распределению восходящих и нисходящих потоков жидкости (ячеек Бенара). В тех местах, в которых потоки холодной сыворотки поднимаются со дна на поверхность, температура капли на поверхности будет ниже. Для возникновения конвекционных течений обычно требуется перепад температур: снизу - более нагретые слои, сверху - более холодные слои. Так как обычно при нагревании жидкости расширяются и их плотность уменьшается.

Диффузия. Перемешивание в капле осуществляется с помощью двух процессов - диффузия и конвекционное течение. Процессы диффузии являются достаточно медленными по сравнению с процессами испарения. Поэтому в основном перераспределение жидкости осуществляется не за счет диффузии, а за счет конвекции.

Трейсеры. Потоки в капле легко наблюдать, если в сыворотку крови добавить немного эритроцитов. Диаметр эритроцита - 8 мкм. Эритроциты выступают в роли трейсеров (трейсер - частица, по траектории движения которой судят о направлении потока жидкости). Траектория движения эритроцитов хорошо видна под микроскопом.

Градиент температуры. Первые 10 секунд после нанесения капли заметных изменений не происходит. В это время осуществляется формирование градиента температур в капле - прогрев нижних слоев капли до температуры предметного стекла и охлаждение верхнего слоя капли за счет испарения. При малом значении градиента температуры (параметр Рэлея) перенос тепла осуществляется за счет теплопроводности, и потоков в жидкости не возникает.

Когда величина градиента достигает некоторого критического значения, начинают формироваться восходящие потоки. Распределение восходящих потоков в начальной фазе распределено по поверхности случайным образом. Точки возникновения восходящих потоков определяются различными неоднородностями: неоднородность поверхности стекла (микрорельеф), неоднородность температуры на поверхности стекла, неоднородность плотности и теплоемкости капли у поверхности, неоднородность нагрева капли в прилегающем к поверхности стекла слое. Например, выступающее вверх возвышение на поверхности стекла вызовет создание восходящего потока. Постепенно движение жидкости переходит от хаотического к установившемуся стационарному течению в виде ячеек. Происходит перераспределение микропотоков. Некоторые микропотоки усиливаются, а некоторые микропотоки ослабевают. Таким образом, происходит формирование макропотоков - процесс

51 перемешивания самоорганизуется в структуру отдельных вихрей и получается структура из конвекционных ячеек - ячеек Бенара.

Построим модель, описывающую процесс возникновения ячеек. Перейдем для простоты от двумерного случая к одномерному случаю. Между двумя вертикальными пластинами находится слой жидкости высотой H , который подогревается снизу. Динамика восходящих потоков определяется следующими правилами:

1- Правило возникновения восходящих потоков. В каждый дискретный момент времени возникает один восходящий поток. (Вначале возникают потоки на больших неоднородностях, а затем на более мелких). Восходящие потоки возникают в случайных местах, на свободном пространстве - расстоянии не ближе чем h_i до ближайшего восходящего потока h_i . Новому возникшему потоку присваивается величина d .

2- Правило роста восходящих потоков. С каждым дискретным интервалом времени величина всех восходящих потоков увеличивается на постоянную величину d . При достижении некоторой пороговой величины H рост потока прекращается.

3- Правило перераспределения потоков. Когда количество восходящих потоков мало, и они расположены далеко друг от друга (расстояние между потоками больше высоты жидкости H), то потоки растут независимо друг от друга. Если два потока h_i и h_j оказались расположенными на расстоянии меньшем чем $h_i + h_j$, то потоки раздвигаются на расстояние $h_i + h_j$ (отталкивание потоков). Если два потока максимальной высоты H оказались на расстоянии в интервале от $2H$ до $3H$, то они сдвигаются на одну позицию друг к другу (притягивание потоков). Если малый поток оказался между двумя большими потоками i и j , и расстояние от него до больших потоков меньше h_i и h_j , то отодвигаться ему некуда, и он пропадает, перераспределяется между двумя большими потоками.

Через несколько итераций окажется, что вся одномерная область разбилась на отрезки равной величины, пропорциональные толщине слоя H . Сформировались устойчивые течения в прямоугольнике. Аналогичная модель работает для двумерного случая. В двумерном случае плоскость разобьется на шестиугольные ячейки равной величины, если слой жидкости однородный.

Форма и размер ячейки Бенара определяется следующими параметрами: толщина слоя жидкости, величина градиента температур, вязкость жидкости. Структура конвекционных потоков в виде ячеек наблюдается в ограниченной области пространства этих параметров. В 1900 году в классической работе Бенара (Benard H. *Rev. generale sci. pures et appl.* 11. 1261-1309. 1900.) описывается возникновение ячеек в тонком слое (толщиной 0,5 мм) жидкого жира кашалота (спермацет - кашалотовый воск) на подогреваемом снизу металлическом горизонтальном листе. В 1888 году James Thomson наблюдал конвекционные структуры в сосуде с мыльной водой. В работе Иваницкого описываются конвекционные ячейки в воде. (Иваницкий Г.Р., Деев А.А., Хижняк Е.П. Биологическое значение тепловых узоров на поверхности воды. Сборник «Проблемы регуляции в биологических системах. Биофизические аспекты», М. РХД, 2007, с.292-328.)

Зависимость размера ячейки от толщины. Можно предположить, что наиболее устойчивым является случай, когда диаметр ячейки равен половине высоты ячейки (толщине слоя). В этом случае профиль одного витка течения представляет собой квадрат. В экспериментах Бенара ширина ячейки равнялась утроенной толщине слоя жидкости. Принципиальным является малая толщина слоя жидкости. Это можно объяснить тем, что при малой толщине слоя сохраняется ламинарность восходящих потоков. При большой толщине слоя

52

ламинарность восходящих потоков нарушается, поток становится турбулентным, и ячейки не возникают. Если диаметр маленький, а высота ячейки большая, то возникает вертикальная неустойчивость и ячейка распадается. Если диаметр ячейки большой, а высота маленькая, то возникает горизонтальная неустойчивость, и ячейка распадается. Чем больше площадь (объем) капли, тем больше ячеек образуется. Если рассматривать слой жидкости переменной толщины в виде клина, то по мере уменьшения толщины слоя размер ячеек уменьшается до некоторого предела, а затем ячейки пропадают. При возрастании толщины слоя ячейки вначале увеличиваются, затем их размер остается постоянным. При дальнейшем увеличении толщины ячейки пропадают.

Зависимость размера ячеек от градиента температур. При малом значении градиента температуры ячейки не возникают, и перешивание осуществляется за счет диффузии. При некотором фиксированном значении градиента температур возникают ячейки. Ячейки Бенара наблюдаются в довольно широком интервале

градиентов температур. Чем сильнее градиент температур между нижней и верхней поверхностью - тем больше размер ячеек. При градиенте больше некоторого порогового значения ячейки исчезают, и в жидкости устанавливается турбулентная конвекция.

Зависимость размера ячеек от вязкости. Конвекционные ячейки имеют пространственный характер в форме призм. Бывает два типа ячеек Бенара. В ячейке I-типа в центре поток движется вверх, а по краям поток движется вниз. В ячейке G-типа потоки движутся в обратном направлении, в центре поток движется вниз, а по краям поток движется вверх. При малой вязкости жидкости (с ростом температуры) жидкость поднимается вверх в центре ячейки и опускается по краям ячейки (I-тип). При высокой вязкости жидкость опускается в центре ячейки и поднимается по краям (G-тип).

При высыхании капли сыворотки крови в центральной части капли возникают автономные замкнутые конвекционные ячейки (от 2 до 4), в центре которых идут восходящие потоки, а по краям - нисходящие потоки. В краевой зоне капли расположено ориентировочно 15 открытых ячеек. В открытых ячейках край капли играет роль центра ячейки, и потоки на краю направлены сверху - вниз. В открытых ячейках идут потоки по поверхности капли от центра к краю, а по дну капли - от края к центру.

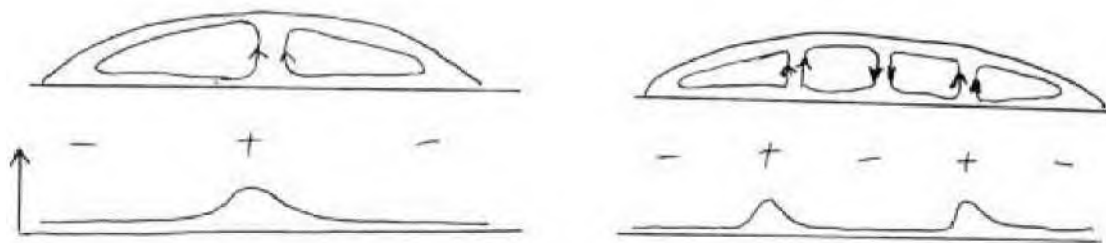


Рис. 1-21. Тороидальное и ячейистое течение. Плюс означает направление течения вверх, минус означает направление течения вниз. В нижней части представлен график распределения эритроцитов, осевших на дне чашки.

Так как структура сыворотки сильно неоднородна, то однородных ячеек не возникает. Возникают ячейки различной формы, определяемой локальными изменениями плотности сыворотки. Для визуализации ячеек необходимо добавить в каплю эритроциты. После застывания капли можно видеть застывшую картину ячеек. Дело в том, что эритроциты постепенно опускаются на дно капли. Течениями жидкости эритроциты перемещаются в те места, где находятся восходящие потоки. Одновременно они вымываются из тех мест, где находятся

нисходящие потоки. Таким образом, картина сгущений эритроцитов на дне капли соответствует положению восходящих конвекционных потоков.

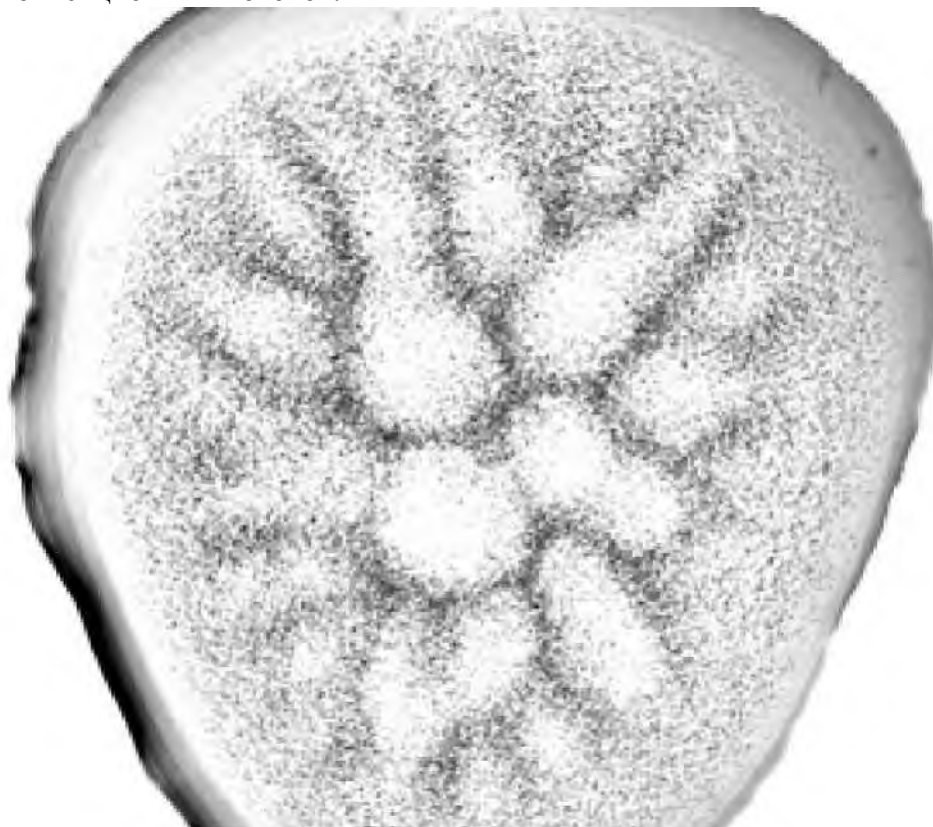


Рис. 1-22. Картина конвекционных ячеек в высыхающей капле сыворотки крови с эритроцитами. Поле зрения 8 мм.

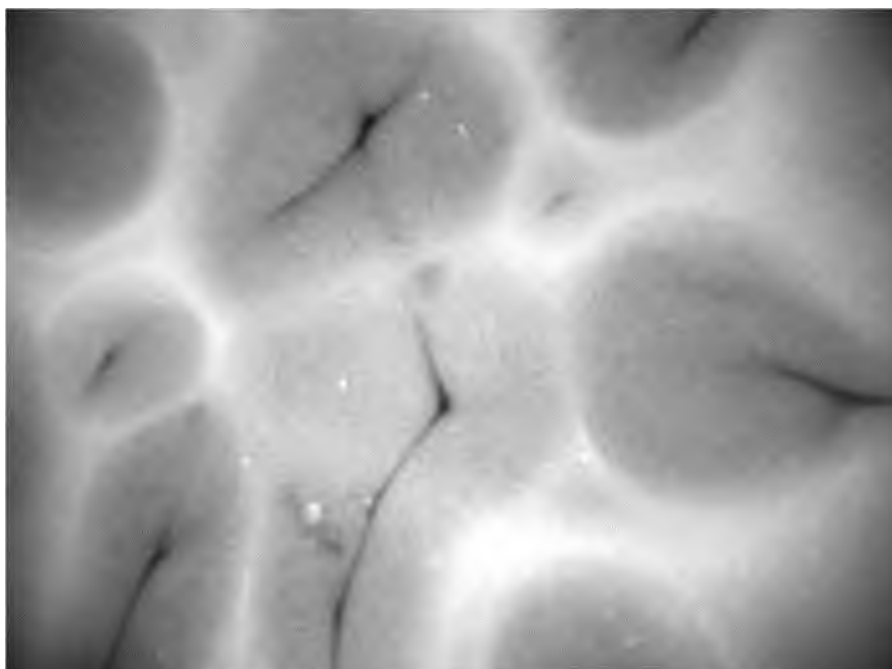


Рис. 1-23. Структура потоков в конвекционных ячейках. Поле зрения 2 мм.

Необходимо отметить, что конвекционные ячейки локализованы в центральном слое капли. Нижний слой капли неподвижен, в нем находятся высокомолекулярные соединения, сцепленные с поверхностью предметного стекла. Верхний слой капли так же неподвижен, он представляет собой мономолекулярный слой поверхностно-активных веществ (липидов).

Отметим, что течения, возникающие в центральной части капли аналогичны течениям, возникающим в тонких пленках жидкости.

Общая структура ячеек имеет следующий вид - в центре имеется несколько

замкнутых ячеек, а по краям расположены открытые ячейки. Структура ячеек в высыхающей капле не остается постоянной, а изменяется со временем. Это объясняется тем, что испарение капли не является стационарным процессом - постоянно за счет испарения воды увеличивается вязкость капли, уменьшается скорость течения, уменьшается высота капли. Это вызывает изменение размеров, формы и положения ячеек.

С началом загустения по краям (движение фронта загустения) зона конвекции постепенно сужается к центру. Ориентировочно через 30 минут движение жидкости прекращается.

Профиль скоростей течений. В левой части капли верхний приповерхностный слой движется влево, а нижний придонный слой движется вправо. Скорость движения жидкости составляет 0,01 мм/сек. Самый нижний слой, который контактирует с предметным стеклом, остается неподвижным, в этом слое находятся частицы, прилипшие к стеклу. Неподвижен так же и самый верхний слой - тонкая пленка, образованная поверхностно-активными веществами (липидами).

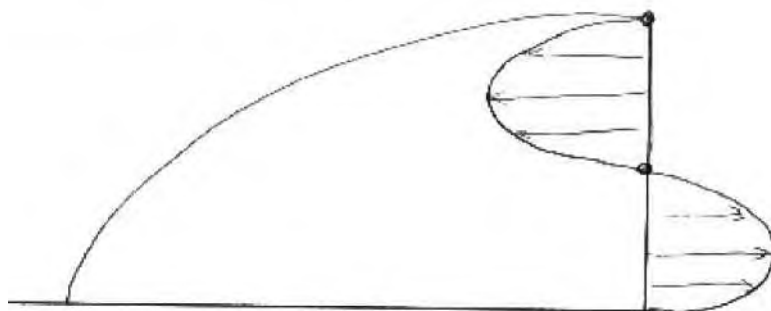


Рис. 1-24. Профиль скоростей течения в высыхающей капле.

Для капли сверху так же существуют некоторые факты, которые трудно объяснить.

Например, течения в ячейках возникают быстро и так же быстро прекращаются. Если бы течения были вызваны только градиентом температур, то они бы возникали медленно и медленно прекращались.

Одной из таких причин может быть неоднородность состава, и как следствие, неоднородность плотности сыворотки крови. Например, если переливать сыворотку из одной пробирки в другую, то невооруженным глазом видны течение, вызванные неоднородностью оптических свойств. Значит, имеется неоднородность плотности.

В этом случае более тяжелые локальные компоненты начинают опускаться вниз, а более легкие - подниматься вверх. Возникают течения.

Структурные компоненты. Каплю сыворотки можно представить как среду с неоднородной плотностью. Неоднородность плотности среды вызвана не флуктуациями, а неоднородностью состава. Предположительно, колебания плотности в различных областях сыворотки составляют до 10%. Размер неоднородностей составляет до 1 мм. Неоднородности связаны со структурообразованием в среде. В сыворотке имеются высокомолекулярные соединения, имеющие структуру полимеров - молекулы белка фибрина. Эти

молекулы могут образовывать структуры типа трехмерной сетки, в которой как в каркасе удерживаются другие молекулы. В такой структуре процессы диффузии затруднены. Такая структура при перемещении жидкости ведет себя как целая часть. Плотность такой структуры может быть выше плотности окружающей среды, и при нанесении капли на стекло такая структуры будет оседать на дно как целый компонент, как тяжелое облако. При этом она будет увлекать за собой окружающую

среду. Возникнет течение вниз.

Облака повышенной плотности. При нанесении капли на стекло в верхнем слое капли в виде облаков существуют области с повышенной плотностью. Однако, большое облако не может опуститься вниз как целое, так как будет большое сопротивление воды. В связи с этим начнет формироваться нисходящий поток (течение). Как один из вариантов, в центральной, наиболее тяжелой части облака, начнется узкое течение вниз, раздвинувшее окружающую жидкость. Через это узкое место вниз устремится все облако, как через узкий канал. Возникнет сильный поток вниз через узкий канал. Как видно из наблюдений, диаметр этого канала составляет примерно 0,1 мм.

Облака пониженной плотности. При прогревании капли с низу у дна образуются облака с пониженной плотностью. Облако с пониженной плотностью начинает подниматься вверх. В верхней части капли более плотный слой жидкости старается опуститься вниз. Возникают два противоположных течения. Выявляется наиболее слабое место, где восходящий поток самый слабый, и в этом месте возникает канал, по которому верхний плотный слой жидкости устремляется вниз. Как видно из наблюдений, диаметр этого канала составляет примерно 0,1 мм. Этим можно объяснить тот факт, что восходящие потоки двигаются широким фронтом, а нисходящие потоки двигаются узкими точечными или линейными каналами.

Возникает два типа каналов - точечные каналы (0-мерные), и каналы в виде изломанных линий (одномерные). По бокам каналов вытесняемая снизу жидкость поднимается вверх. Возникает структура ячеек. При наблюдении с трейсерами видна следующая картина:

- светлые точки (нисходящие 0-мерные потоки), окруженные темными областями (восходящие потоки)

- светлые линии (нисходящие одномерные потоки), на которые нанизаны темные кольца (восходящие потоки). Нисходящие линии как бы разбиваются на отдельные участки восходящими потоками, а не образуют единый восходящий поток по бокам вдоль нисходящего потока.

Данное явление можно смоделировать, если на жидкость с малой плотностью налить тонкий слой подкрашенной жидкости с высокой плотностью, и посмотреть, как она будет прорываться вниз.

Представление структуры потоков в виде графа. Восходящие и нисходящие потоки бывают двух типов - точечные (0-мерные) и линейные (1- мерные). Структуру нисходящих потоков можно представить в виде планарного графа, вершины графа - это точечные потоки, а ребра - это линейные потоки. На самом деле это взвешенный граф. Для каждой точки графа (вершины и точки на ребре) существует величина потока в этой точке. Это непрерывная функция, на ребрах эта функция является унимодальной, с максимальными значениями в вершинах ребра, и минимальным значением в центре ребра.

Структура восходящих потоков так же можно представить в виде аналогичного графа. Основное свойство структуры потоков: графы восходящих и нисходящих потоков являются двойственными. Граф А называется двойственным к планарному графу В, если вершины графа А соответствуют граням графа В, и

56 две вершины графа А соединены ребром тогда и только тогда, когда соответствующие грани графа В имеют хотя бы одно общее ребро.

Так как капля имеет неоднородный состав, то структура графа не регулярна. Рассмотрим структуру графов для ячеек Бенара. В ячейке I-типа в центре поток движется вверх, а по краям поток движется вниз. Нисходящий поток имеет структуру графа в виде регулярных шестигранных ячеек. Восходящий поток имеет структуру графа в виде изолированных вершин, находящихся в центрах ячеек.

В ячейке G-типа в центре поток движется вниз, а по краям поток движется вверх. Восходящий поток имеет структуру графа в виде регулярных шестигранных

ячеек. Нисходящий поток имеет структуру графа в виде изолированных вершин, находящихся в центрах ячеек.

2.2 от 1 до 60 мин. Черви.

Черви можно рассматривать как границы восходящих потоков. Границы ячеек Бенара в высыхающей капле можно наблюдать при косом освещении в виде так называемых червей. Черви - это границы раздела потоков плазмы с разной оптической плотностью. Через одну минуту после раскапывания на дне появляются червеобразные структуры. Черви зарождаются одновременно по всему дну капли. Черви извиваются и продвигаются к краю. Видны в проходящем свете при косом методе освещения. Черви существуют все время в жидкой фазе капли. При движении фронта загустевания от края к центру черви двигаются от центра к фронту загустевания. Не доходя небольшого расстояния до фронта, черви пропадают.

Основные характеристики червей: -черви не имеют пространственного рельефа, а только оптическая неоднородность,
-черви появляются сразу после раскапывания,
-черви существуют до тех пор, пока в центральной части капли существует жидкая фаза,
-максимальная контрастность червей в самом начале, потом ослабевает, - зарождаются черви в центральной части капли,
-двигаются черви от центра к краю капли, -черви наблюдаются в виде извилистых линии, они являются границами областей, -если потрясти стекло, то черви пропадают, но через несколько секунд появляются снова,
- если качать предметное стекло, то черви будут качаться вместе с каплей, значит, черви не сильно связаны с поверхностью стекла,
-если в каплю поместить конец иглы, коснуться дна капли и подвигать иглу, то на дне капли возникнет след от движения иглы в виде червя.

Причиной перемещения червей (ячеек) к краю является изменение конвекционных потоков в капле, возникновение новых конвекционных ячеек в центре, изменение формы и размеров ячеек вследствие уменьшения толщины капли.



Рис. 1-25. Черви в центральной жидкой части капли. Боковое освещение. Поле зрения 8 мм.

Черви - это выход восходящих потоков на поверхность. На изображении червей видно, что каждый червь является как бы хребтом на некоторой возвышенности вокруг него. Между червями имеется понижение. Рельеф поверхности соответствует форме конвекционных ячеек. Движение червей соответствует движению ячеек.

Верхняя поверхность капли имеет рельеф, соответствующий структуре ячеек конвекционного течения. О области восходящих потоков имеется возвышение (черви), а в области нисходящих потоков имеются углубления.

Второй этап - гелеобразование.

2.3 от 20 до 70 мин. Формирование морщин.

На начальном этапе дегидратации происходит формирование морщин. Морщины формируются в краевой и переходной зоне. Морщины являются результатом расслоения исходной однородной сыворотки на две фазы (две компоненты). Наблюдаемая структура морщин - это структура распределения оптической плотности, оптический рельеф, а не рельеф поверхности (рельеф дна). При расслоении неоднородного раствора белка образуются две фазы - с пониженной и повышенной оптической плотностью. Оптическая плотность пропорциональна концентрации белка. Чем выше концентрация белка - тем выше оптическая плотность.

Существует рефрактометрический способ определения концентрации белка. При этом методе используют таблицу показателей преломления сыворотки крови при разной концентрации белка (таблица Рейса).

Таблица. 1-15. Таблица зависимости показателя преломления сыворотки от концентрации белка (таблица Рейса).

Показатель преломления	Белок %
------------------------	---------

1,3370	0,60
1,3377	1,01
1,3394	2,0
1,34275	3,94
1,34463	5,03
1,34650	6,12
1,34798	6,98
1,34984	8,06
1,35319	9,99
1,35388	10,41
1,3549	11,01

Для воды показатель преломления равен 1,33320. Как видно из таблицы, значения показателя преломления очень сильно зависят от концентрации. Сильно зависят в том смысле, что показатели преломления для разных концентраций различаются в третьем знаке. Однако известно, что при наблюдении в микроскоп двух объектов с разным показателем преломления, граница между объектами видна, если показатели преломления различаются в пятом знаке! Значит можно наблюдать различие в показателе преломления при изменении концентрации белка в третьем знаке.

Агрегация белков начинается в краевой зоне. В проходящем свете морщины не видны. Морщины хорошо наблюдаются при косом освещении. В образовании морщин принимают участие высокомолекулярные белки (фибрилярные - фибрин) и глобулярные, которые подверглись денатурации и была разрушена их третичная и четвертичная структуры. В этом случае молекулы имеют вытянутую форму, и образуют морщины в виде жгутов и усов.

Морщины бывают следующих типов:

- 1- бляшки - круговые образования,
- 2- дуги - дугообразные морщины в виде расходящихся от круглых бляшек загнутых дуг
- 3- жгуты - морщины в виде жгутов, с поперечными полосами или без них. Поперечная исчерченность жгутов связана со сжатием структуры геля, из которого состоит жгут. Темные и светлые полосы - это чередование полос с повышенной и пониженной оптической плотностью. Когда жгут достаточно толстый, он выходит на поверхность. В этом случае на поверхности капли (поверхности жгута) возникают поперечные трещины, которые соответствуют расположению более слабосвязанных (разреженных) полос жгута.



Рис. 1-26. Морщины в краевой зоне капли. Боковое освещение. Поле зрения 2 мм.

Если сыворотка крови является однородной, то морщины не образуются. Причина образования морщин - неоднородность концентрации белка. Например, более гидрофобные белки при одних и тех же условиях отдают меньше воды, и гель усыхает меньше. Если в некотором месте находятся менее гидрофобные белки, то они отдают больше воды, гель усыхает сильнее, образуется морщина (складка).

Было замечено, что при интоксикации появляется большое количество морщин. Это можно объяснить следующим образом. При интоксикации молекулы альбумина перегружены токсинами, имеют на своей поверхности много различных компонент. Это вызывает повышенную агрегацию альбумина и более сильное расслоение раствора на две фазы. Получаем, что количество морщин пропорционально количеству молекул альбумина, перегруженных токсинами.

Структуры, сформированные в результате распада сыворотки на две фазы можно наблюдать двумя способами.

- 1- в режиме светлого поля структуры видны в виде морщин.
- 2- в режиме темного поля структуры видны в виде течений, и в виде чередования светлых и темных областей. Убедиться в том, что данные структуры находятся на поверхности капли можно при наблюдении структур объективами с большим увеличением и малой глубиной резкости. Формирование структур в виде течений происходит в результате реального наличия течений в застывающей капле, которые накладывают структуру на расслаивающуюся сыворотку.



Рис. 1-27. Структуры на поверхности капли. Темнопольное освещение. Поле зрения 3 мм.

Характеристики двух фаз.

Первая фаза проявляется в виде однородных темных областей без мелких точек. Краевое прозрачное кольцо является второй фазой, она имеет гладкую поверхность без светящихся точек. В этой области происходит формирование ступенек. Эта фаза является нормой, и состоит из мономеров белков. В норме основная масса альбумина является мономерами. При этом краевая зона капли образуется однородной и прозрачной.

Вторая фаза проявляется в виде серых областей, состоящих из множества мелких точек на поверхности капли. Эти точки светятся в режиме темного поля. Эта фаза состоит из агрегированных молекул белка, из димеров, тримеров, полимеров и крупных агрегатов. Крупные агрегаты наблюдаются в виде светящихся точек в режиме темного поля. Чем больше второй фазы - тем сильнее нарушения в структуре белков.

Можно рассмотреть модель образования двух фаз в терминах напряжения и растрескивания. Расслоение (разделение на два типа областей) происходит в результате наличия напряжений в сыворотке. В результате напряжений происходит разрушение однородной структуры затвердевшей сыворотки. Это тоже своего рода псевдотрещины. Образуются два типа областей - исходная сложная структура сыворотки, и разреженная зона, в которой находится чистый раствор молекул альбумина в форме мономеров. Эти области существенно различаются по оптической плотности.

Таким образом, получается, что наблюдать степень нарушения структуры белков можно на макроуровне без использования специальных зондов, электрофореза и тонкой биохимии.

Сам процесс формирования морщин состоит в следующем. Расслоение сыворотки на две фазы происходит еще когда сыворотка находится в жидкой фазе. Но само образование морщин происходит на поверхности фронта фазового перехода жидкость-гель. При движении фронта загустевания перед фронтом находится жидкая фаза, в которой происходят конвекционные течения, и в микроскоп видныдвигающиеся частицы. Позади фронта никакого движения частиц уже нет, и видны образовавшиеся морщины. Перед фронтом морщин не видно, только иногда, когда морщина очень большая и яркая, перед фронтом движется выпуклость от этой морщины.

На основе напряжения и растрескивания можно объяснить форму морщин.

Если в некоторой области имеется плотное сцепление структуры геля с поверхностью предметного стекла. То образуется круглая бляшка. Из-за напряжения вокруг нее образуются радиальные неоднородности (псевдорастрескивание). Если бы пленка сыворотки имела постоянную толщину, то радиальные лучи были бы симметричны. Но так как в краевой зоне сыворотка имеет клиновидную форму, то радиальные неоднородности имеют форму усов.

2.4 от 20 до 70 мин. Гелеобразование.

2.4.1 Свободная и связанная вода.

Вода в сыворотке крови может находиться в различных состояниях:

-Сильно связанная вода - вода, входящая в состав макромолекул, связанная прочными химическими связями. При сушке 48 часов в вакууме белки сохраняют около 1% воды по отношению к их массе.

-Связанная вода - вода, входящая в состав гидратных оболочек молекул, -

Свободная вода - вода, не связанная с молекулами.

Деление воды на свободную и связанную условно. Гидратная оболочка молекул состоит не из одного слоя молекул воды - а из нескольких слоев. Молекула упорядочивает структуру воды на большом расстоянии от молекулы. Более общей характеристикой является распределение молекул воды по степени связи с молекулами белка. Вид этой кривой предсказать затруднительно. Некоторые авторы высказывают мнение, что в сыворотке крови свободной воды нет, и вся вода является связанной.

Величина гидратной оболочки молекулы зависит от структуры молекулы. Например, альбумины более легко связываются с молекулами воды и имеют относительно большую водную оболочку. Один грамм альбумина связывает до 19 мл воды.

Глобулины и фибриноген присоединяют воду хуже, и гидратная оболочка у них меньше (хотя размер молекул больше). Например, гидратная оболочка ЛПНП-6000 молекул, триглицериды - 39 молекул, ионы Na и Cl - 6 молекул воды.

На начальном этапе происходит испарение свободной воды. За счет конвекционного перемешивания новые порции свободной воды поступают к верхней поверхности капли и испаряются. В некоторый момент в краевой зоне заканчивается свободная вода, концентрация белка достигает границы полной сольватации. Вся вода оказывается в сольватных оболочках. После этого начинается испарение слабо связанной воды из сольватных оболочек. Это приводит к разрушению сольватных оболочек белков, агрегации белковых молекул, и как следствие, к началу гелеобразования.

При гелеобразовании, вызванном повышением концентрации белка из-за испарения воды, происходит повышение вязкости сыворотки. На повышение вязкости оказывают влияние два процесса:

-разрушение третичной и четвертичной структуры белка вследствие потери гидратных оболочек. Это приводит к распутыванию глобулярных белков. Глобула преобразуется в полимерную цепь. Это приводит к повышению вязкости.

-агрегация молекул белка. Потеря гидратных оболочек приводит к слипанию, агрегации молекул белка. Образуются крупные кластеры молекул. Это приводит к повышению вязкости.

Основные этапы процесса гелеобразования, этапы формирования структуры

геля.

1- Малая концентрация белка. Белок существует в основном в виде мономеров. Каждая молекула белка окружена гидратной оболочкой. Много свободной воды. По мере испарения воды количество свободной воды уменьшается, концентрация белка возрастает. Количество мономеров белка уменьшается, а количество димеров белка увеличивается.

2- По мере испарения свободной воды наступает момент, когда свободной воды не остается. Вся вода находится в гидратных оболочках. Это момент полной сольватации. При дальнейшем испарении воды происходит разрушение гидратных оболочек белков и агрегация молекул белка. Уменьшается количество мономеров белков, и увеличивается количество димеров, тримеров и полимеров белков. Затем образуются агрегаты - сферические частицы, содержащие сотни и тысячи молекул белка. Эти кластеры являются квазистатическими. Происходят изменения строения кластеров, часть молекул уходит из кластера, и присоединяются новые молекулы.

3- При дальнейшем испарении воды происходит объединение агрегатов в кластеры. Кластер - это соединение агрегатов в виде пространственной сетки. Это уже структура геля.

4- При дальнейшем испарении воды происходит объединение всех кластеров в единую сеть, заполняющую все пространство раствора. Образуется один большой кластер.

5- В дальнейшем происходит испарение воды из промежутков между ячейек сети.

6- Затем происходит сжатие сети и загустевание геля. Сжатие сети вызывается двумя причинами:

-уменьшение объема геля за счет испарения воды.

-уменьшение объема геля за счет сближения молекул (узлов сети) в результате притяжения.

При затвердевании геля происходит постепенное увеличение вязкости геля. Затвердевание не является фазовым переходом.

Формирование внешнего белкового кольца. Если испаряется чистая вода, то форма капли не меняется. Остается постоянным угол смачивания между каплей и поверхностью, и только уменьшается площадь основания и высота. Капля сжимается пропорционально по всем направлениям. При испарении раствора, в котором 10% белков процесс испарения принципиально изменяется. Внешний диаметр фиксируется и не изменяется (пиннинг - залипание контактной линии). Уменьшается краевой угол и высота капли. С краю высыхающей капли имеется внешняя кольцевая зона, процессы в которой принципиально отличаются от процессов, происходящих в основной массе капли: -в этой зоне нет перемешивания, это застойная зона.

-в этой зоне концентрация белков и солей резко возрастает по двум причинам: -с краю капля более тонкая, чем в середине, и при испарении происходит более резкое возрастание концентрации,

-с краю капли поверхность более сильно искривлена, давление насыщенного пара меньше, и испарение происходит более интенсивно.

2.4.2 Образование белкового валика.

При конвекционном перемешивании осуществляется перенос высокомолекулярных молекул белка к краю капли. Происходит образование

краевого белкового валика. Высохшая капля принимает форму бублика - внешнее высокое кольцо белков, и внутреннее тонкое кольцо. Высохшая капля представляет собой прозрачную твердую массу - альбумин, в которую включены различные элементы. Форма высушено капли имеет вид бублика - выпуклый вал в краевой зоне, и плоскую поверхность в центральной зоне. Высота высохшей капли в некоторой точке соответствует количеству альбумина в данной точке на момент затвердевания. Если вспомнить, что при равномерном высыхании капли с краю толщина капли меньше, то концентрация альбумина с краю станет выше, чем в центре. Значит, имеется градиент концентрации альбумина - при движении от центра к краю концентрация альбумина растет. Значит, при дегидратации происходит движение альбумина против градиента концентрации.

Рассмотрим некоторые варианты объяснения причины возникновения краевого валика.

1. Наличие соли. Иногда возникновение валика белков объясняют тем, что соли устремляются в центр, и вытесняют белок к краю. Однако если провести контрольный эксперимент, и высушить каплю чистого альбумина - то валик снова будет. Это означает, что валик образуется не из-за соли.

2. Высаливание белка. При дегидратации капли ее край загустевает в первую очередь, а в центральной части возникают конвекционные потоки. В центральной части раствор альбумина поднимается вверх, затем двигается к краю, и по нижней стороне капли возвращается в центр. Получается, что не все молекулы альбумина, которые двигаются к краю, возвращаются к центру. Предположим, что капля испаряется равномерно. В этом случае в краевой зоне за счет меньшей толщины капли концентрация соли возрастает быстрее. Из-за этого в краевой зоне раньше начинается процесс высаливания белков. При испарении воды в капле вначале испаряется свободная, не связанная вода. Затем начинает испаряться слабо связанная вода. Начинают разрушаться гидратные оболочки молекул. При испарении воды ионы соли Na и Cl удерживают гидратную оболочку прочнее, чем молекулы альбумина. Поэтому начинает разрушаться гидратная оболочка молекул альбумина, приносимых конвекционным потоком. Гидратная оболочка экранировала поверхностные заряды альбумина и препятствовала слипанию молекул альбумина. При разрушении гидратной оболочки начинают взаимодействовать поверхностные заряды, и молекулы альбумина слипаются. В результате явления слипания молекул альбумина и возникает эффект движения молекул альбумина к краю капли. В результате в краевой зоне остается валик из сцепленных молекул альбумина. При слипании молекул альбумина происходит фазовый переход и образуется густой гель, который затем затвердевает в виде внешнего кольца. Соли (ионы Na и Cl) вытесняются в центральную часть капли. Другой причиной перемещения солей к центру является диффузия. Коэффициент диффузии соли превышает коэффициент диффузии белка на два порядка.

3. Конвекционная модель. Если бы капля равномерно испарялась по всей поверхности, и если бы не было перемешивания, то после высыхания капля имела бы такую же форму, как исходная капля, только высота была бы в 10 раз меньше (так как масса белка составляет 10% сыворотки, а 90% - вода). Так как образуется краевой валик, то это означает, что при высыхании происходит перераспределение белка, и часть белка из центральной зоны поступает в краевую зону.



Рис. 1-28. Осаждение альбумина с краю высыхающей капли, образование белкового валика.

Эффект образования белкового валика аналогичен эффекту «кофейных колец». При высыхании капли кофе на поверхности стекла с внешней стороны капли образуется темное кольцо. Эффект кофейных колец возникает при высыхании капель коллоидных растворов. При высыхании коллоидных растворов коллоидные частицы концентрируются на внешнем крае капли. Обычно образование колец объясняют тем, что течения выносят коллоидные частицы к краю. Течение возникает из-за того, что с краю толщина маленькая, и вода испаряется быстро. Поэтому возникает течение воды от центра к краю. Это течение и выносит коллоидные частицы к краю.

Однако в высыхающей капле течение не однонаправленное, а быстрое циркулярное течение: в верхней части капли от центра к краю, а в нижней части капли от края к центру. Возникает вопрос, почему молекулы альбумина остаются на краю, а не возвращаются назад вместе с течением? Одна из причин - высаливание, залипание, молекулы альбумина прилепляются к ранее слипшимся молекулам альбумина. Другая причина - перераспределение коллоидных частиц в потоке. При развороте потока в краевой зоне в обратное направление, коллоидные частицы (они тяжелые) по инерции переходят на более удаленные от центра траектории. В конечном итоге через несколько оборотов оседают на краю в зоне застоя.

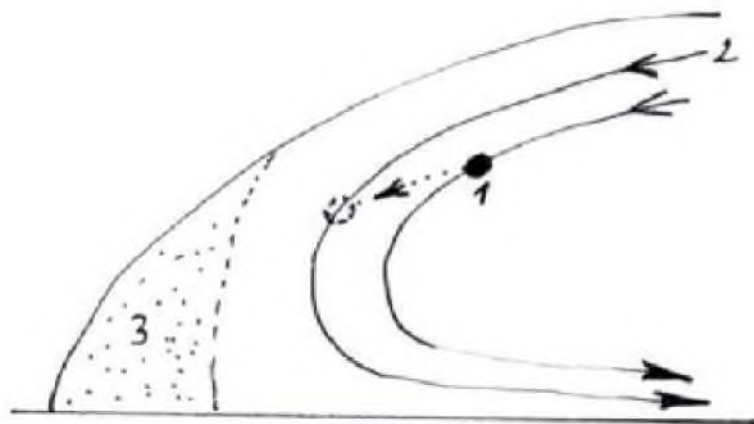


Рис. 1.29. Переход коллоидных частиц в зону застоя. 1-коллоидная частица, 2- линии течения, 3-зона застоя.

2.4.3 Образования широких псевдотрещин.

Широкие псевдотрещины - образуются на раннем этапе, когда гель еще недостаточно густой. Псевдотрещины широкие достаточно широкие, и никакими методами освещения не выявляются. Они по структуре близки основной структуре

геля. Обнаружить эти псевдотрещины можно только за счет того, что они нарушают структуру капли. Если в каплю добавить эритроциты, то они равномерно заполняют все пространство. При образовании широких псевдотрещин происходит разрыв геля, и эти псевдотрещины становятся видны. В фазе геля происходит фрагментация. В однородном геле формируются отдельные блоки.

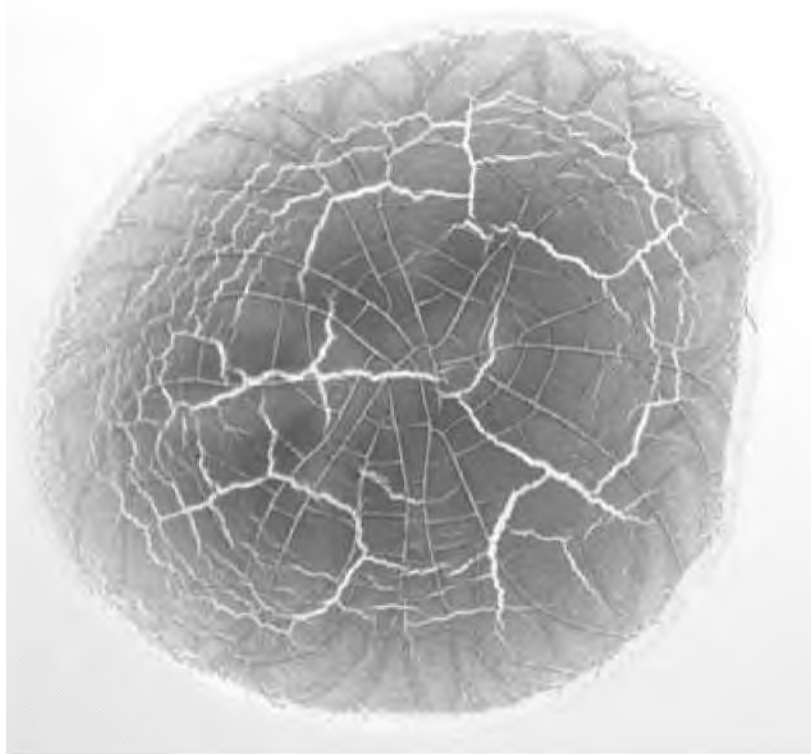


Рис. 1-30. Широкие псевдотрещины, фрагментация геля. Поле зрения 8 мм.

2.5 от 60 до 70 мин. Движение фронта загустевания.

2.5.1 Структура фронта загустевания.

При наблюдении под углом в отраженном свете видно, что капля начинается уменьшаться в размерах, сжимается к центру и при сжатии остается загустевшее кольцо белков снаружи. Капля состоит из следующих компонент, перечисленных в порядке следования от центра к краю:

- Жидкая фаза - находится в центральной части капли. Со временем жидкая часть капли сжимается. В жидкой капле продолжается конвекционное перемешивание, которое постепенно ослабевает в связи с загустеванием жидкой фазы.

- Переходная фаза - находится в узкой краевой зоне жидкой капли. Это фаза видна в проходящем свете как коричневое кольцо, а в режиме темного поля как светящееся кольцо молочного цвета. Можно наблюдать движение фронта затвердевания. Перед фронтом, с самого края испаряющейся капли, к центру двигается темно-коричневое кольцо, если наблюдать в проходящем свете. По

мере продвижения к центру кольцо расширяется, и постепенно становится кругом. Потом круг пропадает.

- Фаза геля - находится между краем жидкой капли и твердой фазы. Фаза геля имеет вид кольца, которое постепенно сужается к центру. Фаза геля - узкая полоска в виде кольца. Кольцо не вертикальное, а наклонное, сужающееся к низу. Этот

фронт можно обнаружить, если через 20 минут после начала высыхания удалить центральную жидкую часть капли с помощью дозатора или фильтровальной бумаги.

-Твердая фаза геля (ксерогель) находится на внешнем крае капли. Границей твердой фазы является граница прозрачности. Твердая фаза постепенно распространяется к центру.

При начале загустевания на верхней поверхности капли образуется корочка в виде гибкой пленки. На этой корочке становятся видны различные течения, которые происходили на поверхности в момент образования пленки.

Можно выделить следующие характерные области, перечисленные в порядке следования от центра к краю капли в процессе дегидратации:

- 1- Жидкая фаза сыворотки.
- 2- Коричневое кольцо (при темнопольном освещении светящееся кольцо) - область агрегации белков.
- 3- Тонкое прозрачное кольцо.
- 4- Граница затвердевания (граница прозрачности), за этой границей видна структура нижней поверхности капли при боковом освещении (видны морщины на дне капли).
- 5- Граница ступенек.
- 6- Граница растущих радиальных трещин.
- 7- Внешняя граница капли.

Необходимо отметить, что структура фронта затвердевания (зависимость состояния сыворотки от радиуса) соответствует динамике затвердевания (зависимость состояния сыворотки от времени). Таким образом, мы можем наблюдать временную развертку процесса затвердевания.

2.5.2 Светящееся кольцо.

В проходящем свете кольцо имеет слабо коричневый цвет. В режиме темнопольного освещения кольцо ярко светится (иногда кольцо имеет голубой цвет). Это говорит о том, что кольцо - это среда с большим количеством мелких частиц. Впереди этого кольца (ближе к центру) находится жидкость. Позади кольца находится гель. И жидкость и гель прозрачны. Светящимся является только узкое кольцо. Это зона агрегирования белка. В жидкой фазе агрегаты белка очень мелкие, поэтому жидкая фаза не светится. В фазе геля все агрегаты слиплись, и образовался прозрачный гель. В переходной зоне происходит фазовый переход - мелкие частицы слипаются в крупные кластеры, а крупные кластеры соединяются в единую сеть. Ближе к центру от кольца с помощью темнопольного освещения можно видеть активное движение светящихся частиц. За кольцом (ближе к краю) никакого движения нет, образовался гель.

Фазовый переход жидкость-гель осуществляется в два этапа.

-На первом этапе происходит агрегация молекул альбумина в макро-кластеры. Вначале увеличивается концентрация димеров (димеры альбумина существуют и в нормальных условиях, но их концентрация мала). Затем происходит увеличение концентрации олигомеров (более двух молекул альбумина, соединенных вместе). Затем происходит образование кластеров альбумина, содержащих сотни и тысячи

молекул альбумина. Затем происходит образование микроацерватов (капельки, с повышенным содержанием альбумина). Образование микроацерватов приводит к возникновению сильного рассеивания в режиме темнопольного освещения. Возникает светящееся кольцо. При движении кольца к центру капли кольцо расширяется. Ширина кольца соответствует величине области сыворотки, в которой значение параметров соответствует определенной величине. При приближении к

центру сыворотка становится более однородной. В центральной части (в области плоского центра) все параметры сыворотки однородны. Поэтому при приближении к центру кольцо расширяется, а при достижении центра кольцо сразу заполняет весь центр.

Одним из вариантов объяснения причин возникновения светящегося кольца является зависимость величины светорассеяния раствора белка от pH. При определенном значении pH светорассеяние белка достигает максимума, а при других значениях pH светорассеяние резко падает. Максимальное значение светорассеяния достигается в изоэлектрической точке, в которой пропадает заряд молекулы белка и молекулы белка начинают агрегировать. Для альбумина изоэлектрическая точка pH равно 4.64. В норме pH крови равен 7,4. В жидкой части капли pH повышается за счет возрастания концентрации соли. Имеется градиент концентрации соли и величины pH от края жидкой части капли к центру капли. Светящееся кольцо соответствует той части капли, в которой pH соответствует максимальному светорассеянию.

Существует второй вариант объяснения светящегося кольца. Светящееся кольцо - это микропузырьки воздуха, которые образовались в момент фазового перехода, а затем схлопнулись. Образование микропузырьков могло происходить из-за выделения тепла при фазовом переходе жидкость-гель.

-На втором этапе макро-кластеры объединяются в единую трехмерную сеть - гель. Гель становится прозрачным.

Фазовый переход происходит при переходе молекулы белка из глобулярного в денатурированное (распутанное) состояние.

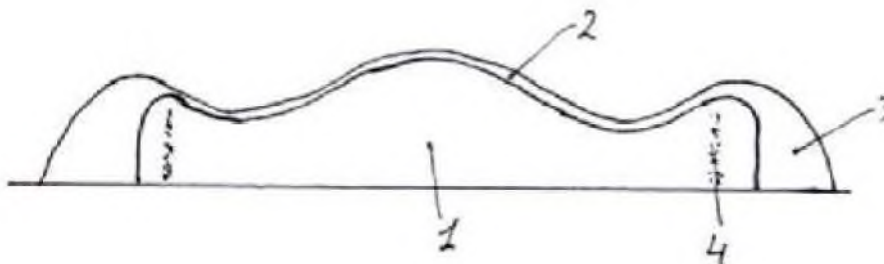


Рис. 1-31. Расположение различных фаз в высыхающей капле сыворотки.

- 1-жидкая фаза,
- 2-тонкая пленка толщиной 0,1 мм,
- 3-фаза геля,
- 4-зона фазового перехода, светящееся кольцо.

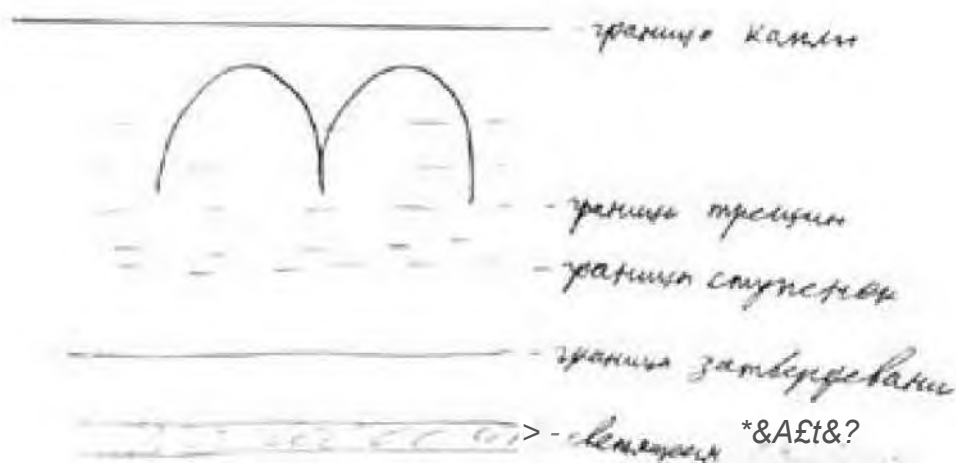


Рис. 1-32. Границы различных фаз в высыхающей капле сыворотки.

Постепенно по мере уменьшения жидкой фазы капли большая часть белков остается на стекле. Таким образом, получаем, что когда от капли осталась небольшая часть в центре, то она состоит из очень концентрированного раствора соли. Если бы в капле не происходило внутренних процессов, связанных с перераспределением белка, то высохший слой белка повторял бы исходную форму капли, уменьшенную по высоте в десять раз. За счет постоянного испарения воды происходит постоянное повышение концентрации, постоянное загустение. При загустении образуются различные кольцевые структуры, связанные со скачкообразным перемещением фронта. Необходимо отметить, что все основные процессы, происходящие в дегидратируемой капле происходят скачкообразно и периодически, а не плавно и непрерывно (процесс движения фронта загустения, процесс роста трещин).

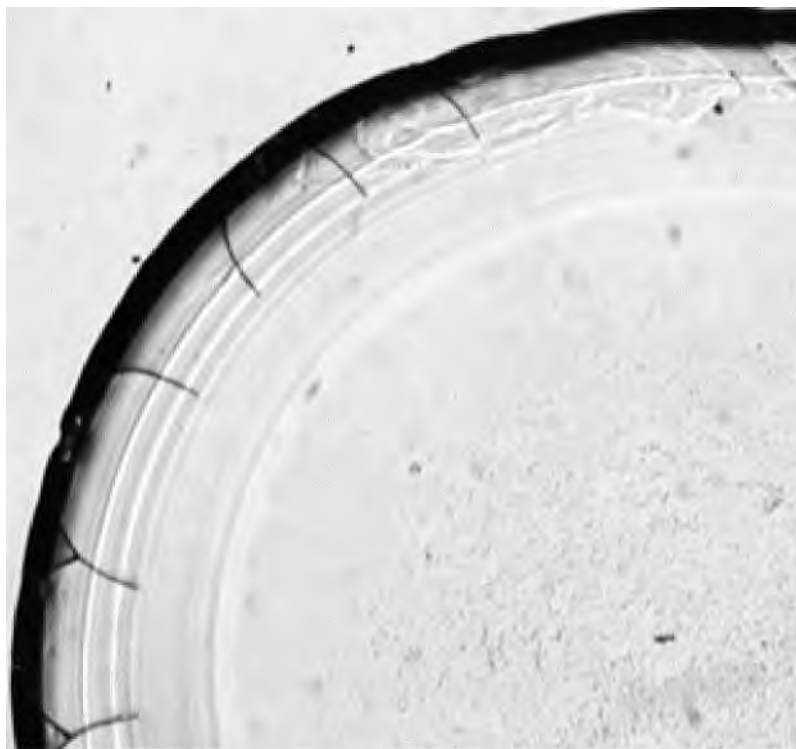


Рис. 1-33. Скачкообразное движение фронта фазового перехода (кольцевые структуры в краевой зоне). Фронт затвердевания проходит по концам трещин. Боковое освещение. Поле зрения 4 мм. 25 минут после начала дегидратации.

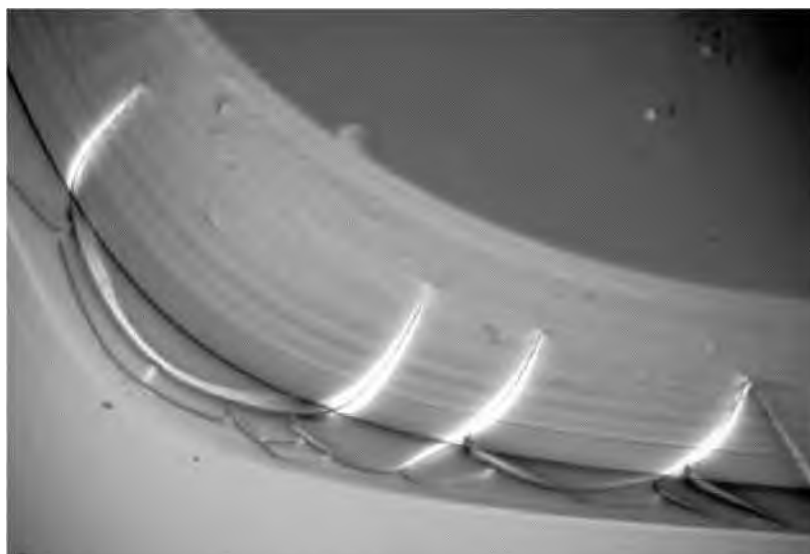
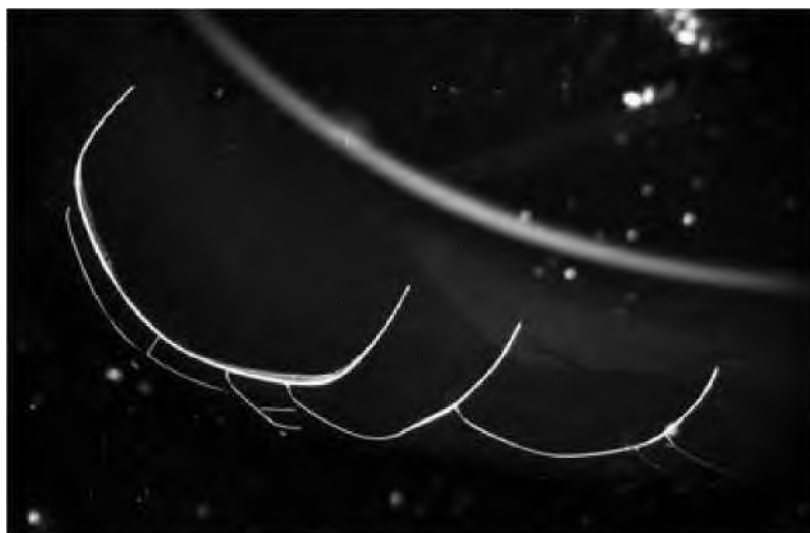
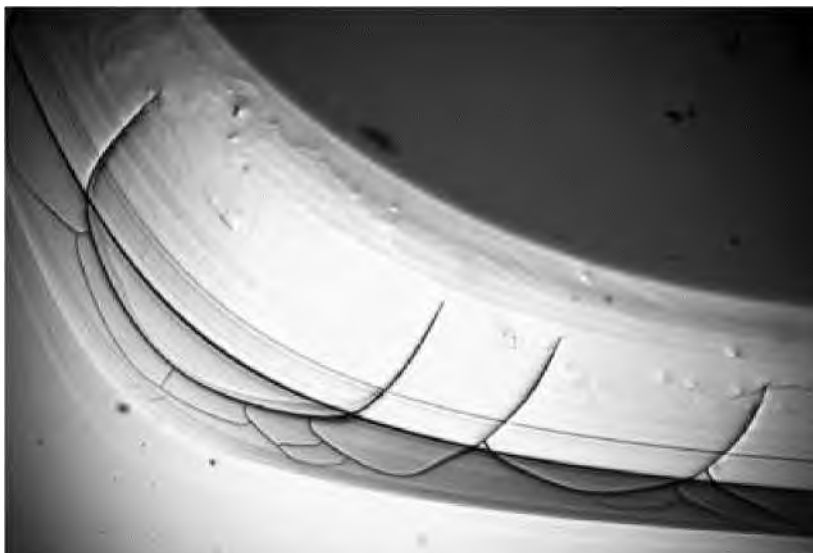


Рис. 1-34. Движение фронта фазового перехода. Поле зрения 2 мм.

- 1- Режим светлопольного освещения. Видна резкая граница фазового перехода.
- 2- Режим темнопольного освещения. В виде белого кольца видна зона агрегирования.
- 3- Поляризационное освещение. В виде ярких полос видны области высокого напряжения вдоль трещин.

2.5.3. Образование ступенек на поверхности капли.

Переход альбумина в твердую фазу начинается на поверхности на внешнем крае капли. Сверху капли начинает образовываться затвердевшая корочка. При этом в центральной части капли находится жидкая фаза. Вслед за фронтом загустения на верхней поверхности капли образуются рельефные ступеньки, параллельные фронту. Эти ступеньки можно наблюдать при большом увеличении на внешней гладкой поверхности капли в виде тонких линий. Эти линии хорошо видны при темнопольном освещении. Расстояние между соседними ступеньками составляет примерно 0,03 мм. На краю капли ступеньки расположены часто. Чем дальше от края - тем больше расстояние между ступеньками. Величина шага пропорциональна скорости испарения жидкой фазы. Чем быстрее испарение - тем больше величина шага.

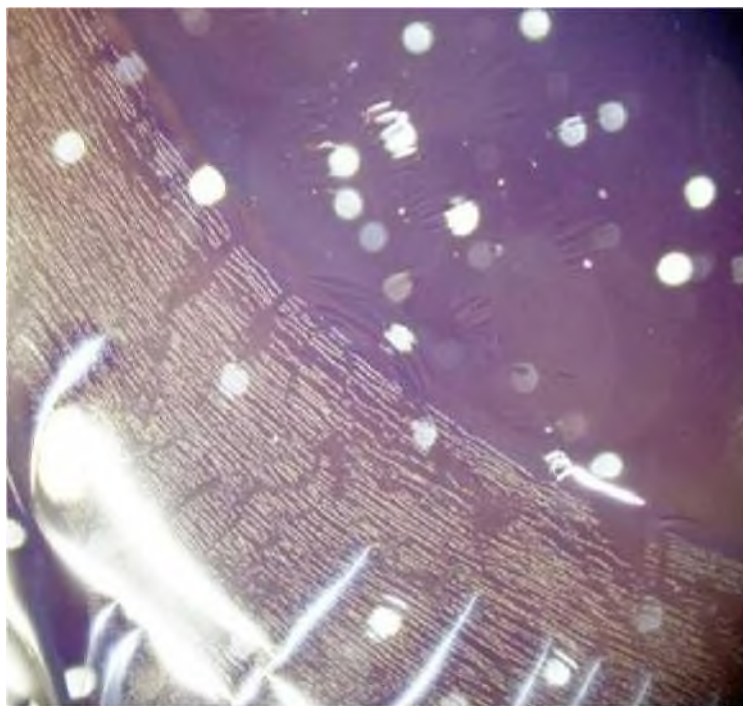


Рис. 1-35. Ступеньки на верхней поверхности капли. Темнопольное освещение. Поле зрения 1,5 мм.

Особенности структуры ступенек: -ступеньки имеют вид слабо изломанных линий,

- ступеньки возникают из маленького отрезка, который растет в одном из направлений,
- ступеньки образуются только в краевой зоне капли, до вершины гребня белкового валика,
- в начале ступеньки расположены часто, ближе к гребню ступеньки расположены редко,

- ступеньки не заполняют всю поверхность равномерно,
- имеются участки поверхности без ступенек, эти участки имеют форму течений,
- рост ступенек - это результат отступления границы жидкой фазы.

Ступеньки являются результатом кристаллизации альбумина. Затвердевание альбумина происходит не в виде аморфного твердого тела без структуры (стеклование), а в виде слоев. В некоторых местах кристаллизации альбумина не происходит, и поверхность является ровной, без ступенек.

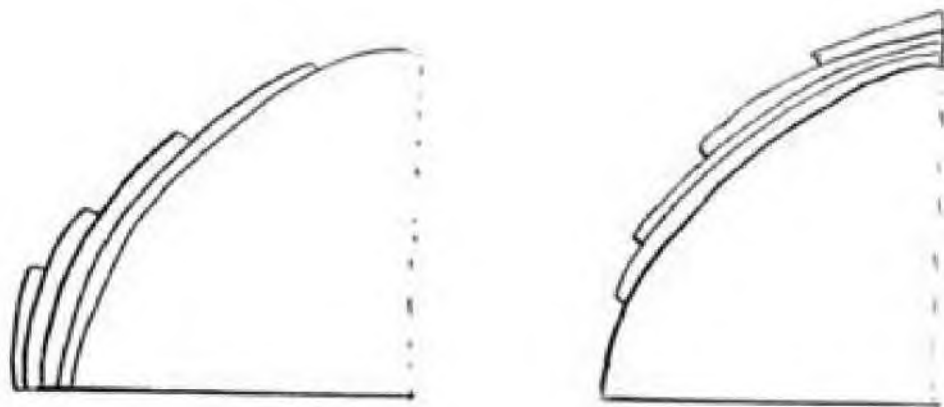


Рис. 1-36. Два варианта структуры ступенек на поверхности капли в краевой зоне.

Можно предположить две модели кристаллизации.

- 1- кристаллизация шарами (глобулами). Кристаллическая структура образуется в результате укладки слоями шаров (глобулярных молекул альбумина).
- 2- кристаллизация диполями. Молекулы альбумина имеют вытянутую форму эллипса. Диполи при слипании образуют плоский слой, который служит основой кристалла.
- 3- кристаллизация слоями, слоистое (пленочное) строение кристалла.

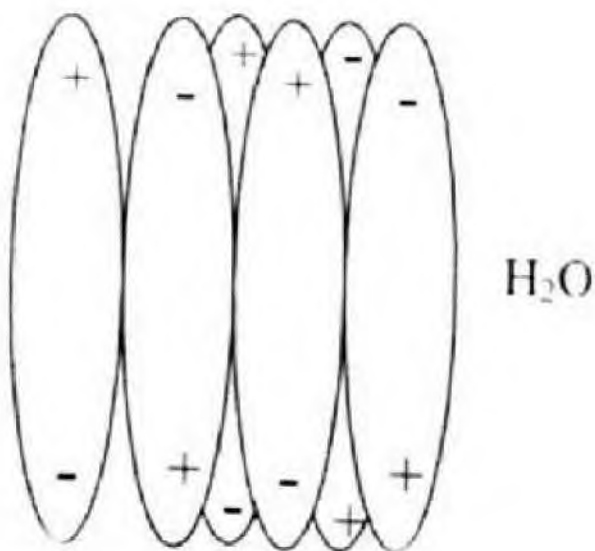


Рис. 1-37. Кластер диполей альбумина, из которых образуется кристаллическая структура.

2.6 от 60 до 80 мин. Движение фронта радиальных трещин (трещины тип 1).

Гель на краю капли начинает загустевать. С краев капли начинают образовываться трещины. В виде ромашки трещины развиваются к центру. Граница трещин - это граница твердой фазы. Через некоторое время начинают образовываться поперечные трещины, которые создают ограниченные ячейки. Основная причина образования трещин - напряжения в дегидратируемом геле. Если капля достаточно тонкая - трещины не образуются. Растрескивание при высыхании связано с уменьшением объема загустевшего геля при дополнительном испарении связанной воды. При уменьшении объема возникают напряжения, которые снимаются путем образования трещин. Образование трещины в веществе происходит при выполнении двух условий:

- 1- среда достигла определенной степени твердости,
- 2- величина приложенной силы (напряжение) превышает некоторое пороговое значение.

В жидкости и в студне растрескивания не происходит, так как в этих средах не возникает напряжения. При прикладывании силы жидкость и студень перемешивается.

Таким образом получается, что граница растущих трещин - это область, в которой твердость геля (хрупкость) достигла определенного критического значения.

При образовании трещины высохшая капля растрескивается по вертикали от верхней поверхности до нижней поверхности, до предметного стекла. Две образовавшиеся границы ячеек расходятся в стороны. При этом возникает четыре угла, по два угла на каждой границе трещины. В этих углах остаются остаточные напряжения, которые можно увидеть в поляризованном свете в виде ярких полос, проходящих вдоль трещин.

2.6.1 Зарождение аркообразных трещин.

Капля начинает затвердевать с внешнего края. На внешнем крае капли образуется тонкое прозрачное кольцо, свойства которого сильно отличаются от свойств основной массы сыворотки. Это кольцо быстро затвердевает. Остальная масса сыворотки в виде геля уменьшается в объеме за счет испарения воды. Так как тонкое внешнее кольцо прикреплено к подложке, то оно не может сдвинуться к центру. Возникает напряжение, которое стремится оторвать внешнее кольцо от загустевающей сыворотки. Когда это напряжение превышает прочность геля происходит отрыв внешнего кольца от геля, возникает кольцевая трещина, которая параллельна внешнему краю капли. Отметим, что зарождение кольцевой трещины происходит только при достаточно быстром затвердевании геля. При медленном затвердевании успевает пройти процесс релаксации и кольцевая трещина не образуется. На пленке геля в виде клиновидной полуплоскости трещины образуются параллельно границе, а не перпендикулярно границе.

Зарождение кольцевой трещин происходит путем образования маленькой трещины на некоторой неоднородности (включение, частицы). Затем трещина начинает скачками увеличиваться в длину в обе стороны. При росте трещины ее направление роста изменяется. Дальнейшее направление роста трещины определяется полем напряжений. Трещина растет по нормали к напряжениям, чтобы максимально снять напряжения. При первичном образовании трещины сбрасываются радиальные напряжения, но остаются тангенциальные напряжения. Эти напряжения вызывают поворот трещин к центру. Так как напряжения в геле направлены по касательной к радиусу капли (разрывающие напряжения из за

сжатия геля), то трещина при росте начинает разворачиваться по направлению к

центру. Трещины загибаются, и в дальнейшем растут перпендикулярной фронту загустения по направлению к центру капли.

2.6.2 Радиальные трещины.

Процесс продвижения трещин к центру является скачкообразным. Несколько минут паузы, затем все трещины удлиняются на 0,1 мм. Всего примерно 20 скачков. На конце растущей трещины постепенно возрастает напряжение. Это можно наблюдать в поляризованном свете как яркий крест с центром в вершине трещины. Яркость креста возрастает. При достижении напряжения определенной величины происходит скачкообразный рост трещины на некоторую величину. Величина скачка определяется тем количеством геля, который загустел в направлении роста трещины. Если впереди была тонкая ровная поверхность, которая одновременно вся загустела, то скачек будет через всю загустевшую поверхность. Рост трещины продолжается до тех пор, пока она не упрется в другую трещину. Если капля тонкая, рост трещины останавливается там, где толщина капли меньше критической толщины, достаточной для создания необходимого напряжения.

По концам растущих трещин проходит граница твердой фазы геля. Через концы растущих к центру трещин проходит фронт затвердевания. Через некоторое время начинают образовываться поперечные трещины, которые создают ограниченные ячейки. Процесс образования поперечных трещин так же идет от края капли к центру. Поперечные трещины возникают в результате усыхания секторов и возрастания радиальных напряжений.

Образование радиальных трещин завершается их смыканием в центре капли. Рост трещин может остановиться, и не будет смыкания. Это происходит в том случае, если в центральной части капли при высыхании останется очень тонкий слой геля, и в нем не создается достаточно напряжения для образования трещины.

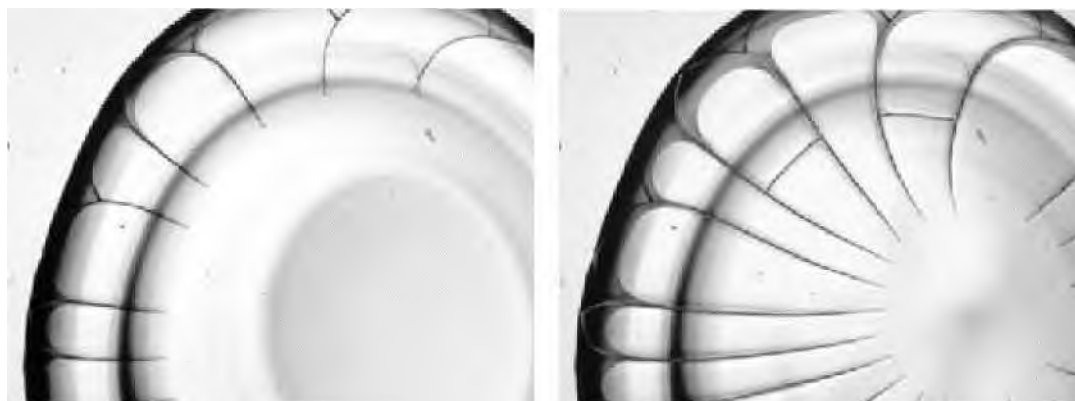




Рис. 1-38. Движение фронта трещин. Поле зрения 4 мм. Снимки сделаны через 20, 30 и 32 мин после начала дегидратации.

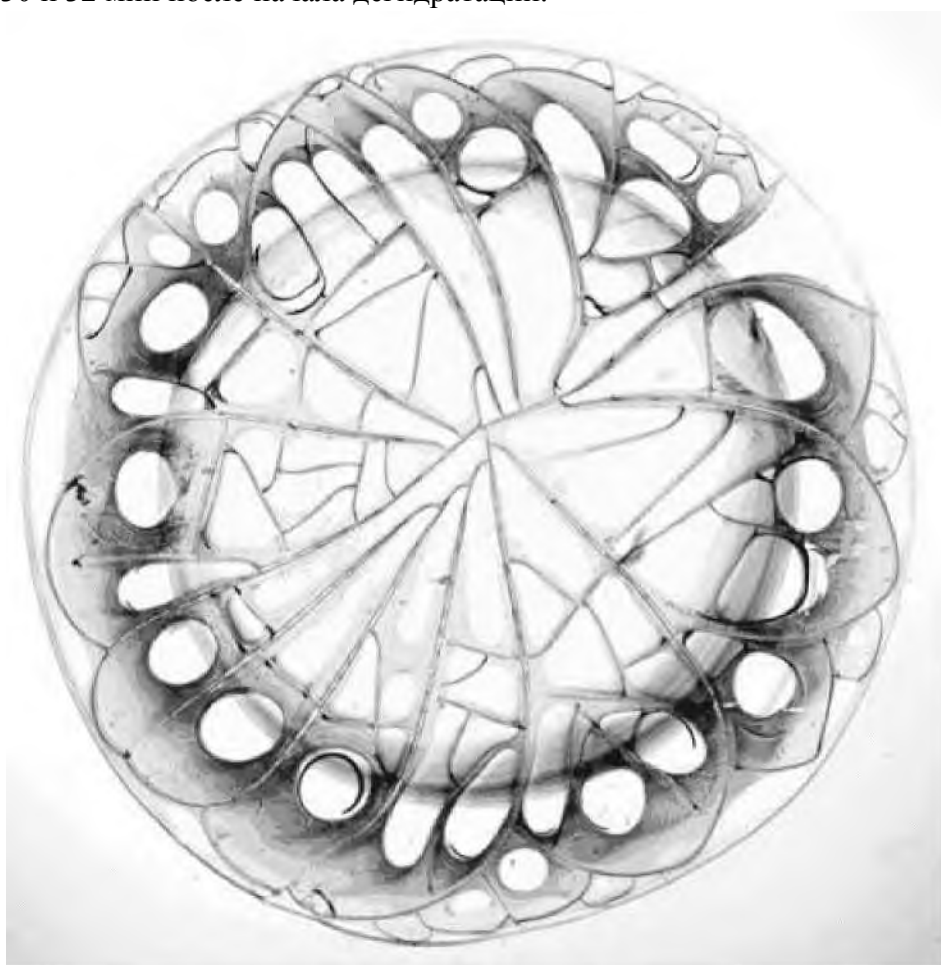


Рис. 1-39. Образование трещин в виде ромашки. Поле зрения 8 мм.

Количество и вид трещин зависит от состава и формы капли, а так же от условий кристаллизации:

1- Трещины радиальные, частые, имеют вид ромашки. Образуются когда капля толстая (большой угол смачивания), если кристаллизация быстрая (высокая температура, низкая влажность).

2- Трещины радиальные, редкие, имеют вид ромашки. Образуются когда капля имеет среднюю толщину.

3- Трещины произвольные, редкие, нет ромашки. Образуются когда капля тонкая (размазанная, малый угол смачивания), если кристаллизация медленная (низкая температура, высокая влажность).

Вид трещин в высыхающей жидкости зависит от соотношения скоростей двух процессов: скорость испарения воды и скорость образования геля. Возможны следующие случаи:

- 1- Скорость испарения больше скорости гелеобразования - образуется ромашка.
- 2- Скорость испарения и скорость гелеобразования сравнимы - образуется произвольная сеть трещин.
- 3- Скорость испарения меньше скорости гелеобразования - образуются концентрические трещины. При большой скорости гелеобразования происходит образование пленки геля на верхней поверхности капли. Вода из внутренней части капли испаряется вверх через верхнюю пленку геля. Объем внутренней части капли уменьшается и верхняя пленка геля проседает вниз. При достижении некоторой плотности верхней пленки геля начинается образование концентрических трещин.

Скорость гелеобразования пропорциональна концентрации соли. Чем больше концентрация соли - тем быстрее происходит гелеобразование.

Скорость испарения определяется в основном температурой и площадью поверхности. Поэтому при проведении дегидратации в стандартных условиях скорость испарения практически постоянна для различных образцов. Таким образом, получаем, что формирование структуры трещин в виде ромашки определяется в основном скоростью процесса гелеобразования. Скорость гелеобразования альбумина определяется количеством молекул альбумина, состояние которых отличается от нормы. Нарушение нормального состояния молекулы альбумина возникает при связывании их с некоторыми лигандами, при нарушении четвертичной или третичной структуры (например, под действием оксидантов). При нарушении состояния молекулы альбумина нарушается гидратная оболочка, и повышается способность молекул альбумина к агрегации. Это приводит к повышению скорости гелеобразования. Таким образом, получаем следующий диагностический критерий - степень отклонения структуры трещин от ромашки пропорциональна количеству молекул альбумина с нарушенной конфигурацией.

2.6.3 Количественные методы оценки структуры радиальных трещин.

1-Степень раскрытия трещин. Со временем трещины расходятся (расширяются) из-за усыхания ячеек. Расстояние между краями трещины увеличивается со временем, а потом расширение прекращается. Величина расхождения зависит от величины ячеек, чем больше ширина ячейки, тем больше величина усыхания ячейки, тем больше в сторону данной ячейки расходится трещина. Величина усыхания пропорциональна количеству воды, находящейся в ячейках в начале растрескивания. Как правило, это вода, находящаяся в гидратных оболочках молекул белка, и в ячейках гелевой структуры.

При высыхании происходит расхождение не только верхних границ ячеек, но и расхождение нижних границ ячеек. Если высушить каплю на тонком покровном стекле, то можно произвести наблюдение нижней поверхности ячейки (перевернув покровное стекло обратной стороной). При этом будет заметен валик, расположенный по центру разошедшейся трещины. С двух сторон от валика расположены края соседних ячеек.

Можно выделить две причины, влияющие на ширину трещин: гидрофильность белков, и размер ячеек (число ячеек).

Гидрофильность белков. Величина усыхания ячейки пропорциональна количеству воды, находящейся в ячейке при ее образовании (при первичном растрескивании). Чем больше исходной воды - тем больше усыхание. Количество оставшейся воды пропорционально количеству белков с сильной гидрофобностью (большой молекулярной массы - глобулины). У белков с сильной гидрофобностью имеется большая сольватная оболочка, и они удерживают больше воды в момент растрескивания геля. Но увеличение ширины трещин происходит на длительном заключительном этапе окончательного обезвоживания ячеек. Получается, что ширина трещин пропорциональна количеству белков с большой молекулярной массой.

Размер ячеек. Расхождение трещины пропорционально линейному размеру ячеек. Чем крупнее ячейки, тем сильнее расхождение трещин. Если ячеек много, то ячейки маленькие, и трещины не широкие. Если ячеек мало (всего несколько больших ячеек), то площадь ячеек большая, и трещины образуются широкие.

2- Суммарная длина (площадь) трещин. Суммарная площадь раскрытия трещин может служить одним из показателей структуры высохшей капли. Измерить суммарную площадь трещин можно следующим образом. На высохшую каплю наносится темное густое вещество, например, мелкодисперсный порошок углерода, гуталин. Избыток вещества стирается. Вещество остается только в трещинах. При регистрации изображения в проходящем свете все трещины будут видны в виде темных полос. При обработке изображения подсчитывается площадь черной компоненты на изображении. Теоретически, суммарная площадь трещин постоянна (если объем капли постоянный), и не зависит от того, что трещин много, но узкие, или мало, но широкие. Суммарная площадь трещин определяется процентным содержанием воды в ячейках в состоянии геля на стадии образования трещин. В общем случае суммарная площадь трещин пропорциональна площади капли.

3- Соотношение радиальных и кольцевых трещин. По типу ориентации крупные трещины можно разбить на два типа - радиальные и кольцевые. Так как трещины имеют переменную ориентацию, то каждую крупную трещину можно разбить на участки двух типов - радиальные и кольцевые.

-Участок трещины называется радиальным, если для каждой точки этого участка угол между касательной к трещине и радиус-вектором, проведенным из центра капли к этой точке, имеет величину от -45 до $+45$ градусов.

-Участок трещины называется кольцевым, если для каждой точки этого участка угол между касательной к трещине и радиус-вектором, проведенным из центра капли к этой точке, имеет величину от $+45$ до $+135$ градусов, или от -45 до -135 градусов.

Таким образом, все трещины можно разбить на два типа - радиальные и кольцевые участки. Можно построить зависимость от расстояния до центра капли количества радиальных и кольцевых участков трещин. При малых значениях радиуса преобладают радиальные трещины, при больших значениях радиуса преобладают кольцевые трещины. Радиус, при котором количество радиальных и кольцевых трещин совпадает называется радиусом изменения ориентации трещин.

Таким образом, можно получить следующие количественные параметры для трещин:

-общая (суммарная) длина всех трещин L_s ,

77

-суммарная длина радиальных L_r и кольцевых L_c участков трещин, $L_r + L_c = L_s$.

Более детальная информация об ориентации трещин получается из распределения трещин по углу ориентации. Трещины разбиваются на короткие отрезки. Строится диаграмма распределения трещин по углам. Угол отсчитывается

между направлением трещины, и направлением радиуса из центра капли к центру данного отрезка трещины. Весь диапазон углов от 0 до 180 градусов разбивается на поддиапазоны по 10 градусов. Если угол находится в некотором поддиапазоне, то соответствующий счетчик увеличивается на единицу.

Признак наличия радиальных трещин (структура ромашки) является признаком нормы. Однако оказывается, что при большом объеме капли практически любая плазма крови имеет вид ромашки. На самом деле имеет большое значение более тонкий признак - при каком объеме капли (при каком радиусе капли - радиусе радиальности) высохшая капля имеет структуру ромашки. Чем меньше радиус радиальности - тем лучше и устойчивее состояние пациента.

4- Расстояние между радиальными трещинами, число лепестков, число радиальных трещин. Еще одним количественным параметром является количество секторов, когда структура трещин имеет вид ромашки. При образовании секторов основную роль играют локальные свойства и процессы, происходящие в высыхающей капле. Таким образом, основной информативный параметр - абсолютное значение ширины сектора в микрометрах. Так как сектор имеет в начале дугообразную форму, а затем сужается к центру, то под шириной сектора понимается максимальная ширина, которая расположена при переходе дугообразной формы в сужающуюся форму. Чем больший радиус имеет исходная капля, тем большее количество секторов будет образовываться. Если разные капли имеют одинаковый радиус, то можно не измерять ширину секторов, а подсчитать общее количество секторов. Средняя ширина сектора обратно пропорциональна количеству секторов:

$N_s = C \cdot R / H_s$ - где N_s - количество секторов, C - некоторая константа, R - радиус капли, H_s - средняя ширина сектора. Количество секторов служит параметром, характеризующим вязкость капли в момент загустения.

Рассмотрим случай высыхания жидкости с границей в виде линии (вода занимает полуплоскость на стекле). При высыхании трещины будут идти в виде ромашки перпендикулярно границе (радиально сходящимися на бесконечности). При увеличении объема капли увеличивается радиус капли, и граница приближается по свойствам к полуплоскости, и трещины становятся все более радиальными. Расстояние между двумя трещинами (шаг растрескивания) определяется скоростью испарения воды, скоростью затвердевания геля, шириной фронта затвердевания - расстоянием между границами твердой и жидкой фазы. Чем больше градиент, чем короче фронт - там меньше расстояние между радиальными трещинами.

5- Количество тройных трещин. Тройные трещины, в которых из одной точки расходятся три трещины, образуют отдельный класс. Причина их образования, как и для других трещин - остаточные напряжения. Но особенность образования тройных трещин состоит в том, что у них имеется центр, который служит начальной точкой трещинообразования. Это может происходить в том случае, что в геле возникает центр кристаллообразования. В этом центре начинается рост кристалла. Растущий кристалл создает дополнительное кольцевое напряжение, которое и вызывает образование расходящихся трещин. Количество лучей (три или более) определяется уже свойствами геля. Чем прочнее

гель - тем больше лучей будет исходить из центра. Обычно тройные трещины образуются на ранних стадиях дегидратации, когда гель не затвердел окончательно. Поэтому обычно образуется три расходящихся трещины.

2.7. от 65 до 90 мин. Движение фронта выпадения белков.

Через некоторое время после того, как у края капли образовались дугообразные трещины, и начали распространяться к центру, возникает фронт выпадения белков. Белки в виде темного осадка начинают выпадать от внутренней части дуговых трещин и фронт распространяется к центру капли в секторах. При образовании поперечных трещин и ячеек, фронт выпадения белков продолжает распространяться от трещин (краев ячеек) к центру ячеек. Если ячеек не образуется, то фронт распространяется по секторам к центру капли. Насыщенность осаждающихся белков не является постоянной. Вначале осадок имеет слабо коричневый цвет, затем осадок темнеет. В некоторых случаях после достижения максимального насыщения осадок опять начинает светлеть. Иногда наблюдаются чередующиеся слои - темные и светлые. Изменение насыщенности цвета осадка можно объяснить изменением скорости движения фронта осаждения и размером выпадающих агрегатов. Чем медленнее движение фронта - тем насыщеннее осадок.

При анализе осадка при большом увеличении видно, что он представляет собой крупные агрегаты, а не кристаллы.

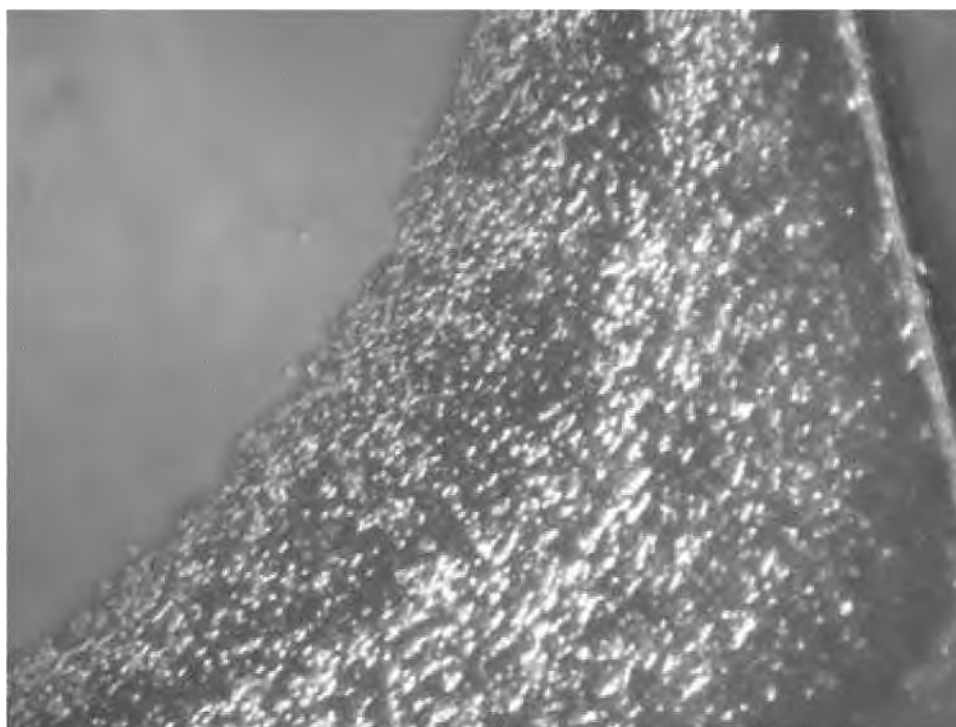


Рис. 1-40. Фронт выпадения осадка в ячейке. Видно изменение насыщенности осадка, с внутренней стороны - темный, с внешней стороны - более светлый. Поле зрения 0,1 мм.

Если ячейки являются крупными, то выпадение белка формируется в виде узкой темной полосы.



Рис. 1-41. Выпадение белкового осадка в виде узкой полосы. Ненормальное выпадение осадка в ячейках. Поле зрения 3 мм.

Иногда наблюдается выпадение осадка синего цвета. Обычно это происходит с внешней стороны белкового осадка.

Иногда наблюдается движение фронта в центре от краев трещин к центру секторов и от центра капли к краю капли. В этом случае цвет осадка является светло серым. Возможно, это выпадение соли в случае отсутствия мелких трещин.

2.8 от 65 до 80 мин. Образование псевдотрещин в центральной зоне.

Можно выделить два типа растрескивания геля - образование трещин и образование псевдотрещин. При достаточно сильных напряжениях, вызванных усадкой геля при испарении воды, происходит растрескивание геля - гель разрывается на две части трещиной от поверхности геля до дна. Если внешняя поверхность ячейки достаточно затвердела, а внутренние напряжения недостаточны сильные, то возникает другой тип растрескивания - образование псевдотрещин (зоны пониженной плотности).

Гель представляет собой трехмерную решетку, образованную молекулами белка. Когда много воды - молекулы белка изолированы гидратными оболочками и не связываются между собой. При испарении воды гидратные оболочки разрушаются, и молекулы белка сближаются на расстояния, достаточные для образования связей, и трехмерной структуры. В ячейках трехмерной решетки геля находятся молекулы воды с соли.

Образование псевдотрещин связано с тем, что под действием напряжений происходит изменение однородной структуры геля. Гель как бы разрывается, но не до конца. В некоторых местах, ослабленных по каким-то причинам, происходит расширение ячеек геля. Гель как бы растягивается в разные стороны от вертикальной плоскости, в направлении сил напряжения. Если бы не было высокомолекулярных компонент в геле, и если бы силы были достаточно сильными, то образовалась бы трещина. А так образуется только частичное уменьшение плотности (растяжение) относительно вертикальной плоскости. Пространство псевдотрещины заполняется

молекулами воды и соли.

Псевдотрещины узкие - образуются после образования обычных трещин. Эти трещины узкие и имеют четкие границы. Псевдотрещины в основном являются внутренними трещинами. Когда псевдотрещина очень большая, она иногда имеет выход на внешнюю поверхность. На верхней поверхности капли над псевдотрещиной имеется небольшое углубление, в котором часто образуется полоска кристаллов соли. Если ячейку с псевдотрещиной перевернуть, то на нижней поверхности ячейки под псевдотрещиной так же иногда видна тонкая полоска кристаллов соли.

Так как псевдотрещина заполнена молекулами воды и соли, то она имеет показатель преломления, не совпадающий с показателем преломления окружающей среды. Псевдотрещина на просвет выглядит яркой линией.

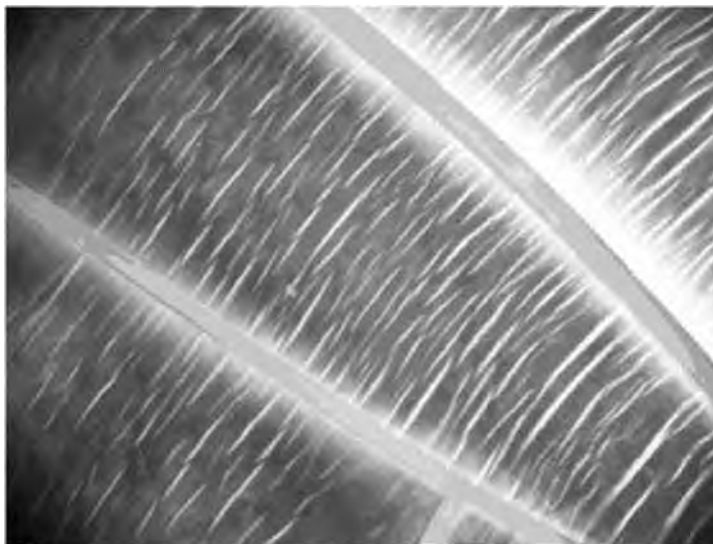


Рис.1-42. Трещины (широкие) и псевдотрещины узкие (узкие и яркие). Поляризованный свет. Поле зрения 1 мм.

- Псевдотрещины на границе ячеек всегда направлены перпендикулярно основным трещинам. Это объясняется тем, что остаточные напряжения в ячейках остались в направлении вдоль границ ячеек.

- У вытянутых радиальных ячеек псевдотрещины всегда направлены перпендикулярно оси ячеек, перпендикулярно боковым трещинам. Это соответствует направлению растяжения.

- Псевдотрещины образуются только в центральной зоне капли, так как там напряжения не достаточно сильные для образования обычных трещин.

- Псевдотрещины образуются на завершающем этапе высыхания капли. Псевдотрещины образуются после образования основных трещин, которые снимают основные напряжения.

- На поверхности капли над псевдотрещинами имеется небольшое углубление.

- При движении тубуса микроскопа сверху вниз псевдотрещины в начале кажутся темными, а затем светлыми. Это говорит о том, что показатель преломления вещества в псевдотрещине меньше, чем в окружающей среде.

- В больших ячейках псевдотрещины имеют вид тройных лучей и розеток. Для больших ячеек нет выделенного направления действия сил напряжения, и поэтому образуются не линейные псевдотрещины, а тройные и искривленные. -Иногда большие псевдотрещины выходят на поверхность и образуют маленькие трещины.

- Внутри ячейки преобладают псевдотрещины, перпендикулярные внешним трещинам. На верхней поверхности ячейки часто встречаются тройные трещины, выходящие из одной точки.

- В центральной части капли псевдотрещины имеют вид дуг и розеток.

- Причина образования псевдотрещин - снятие напряжений в тонком слое в

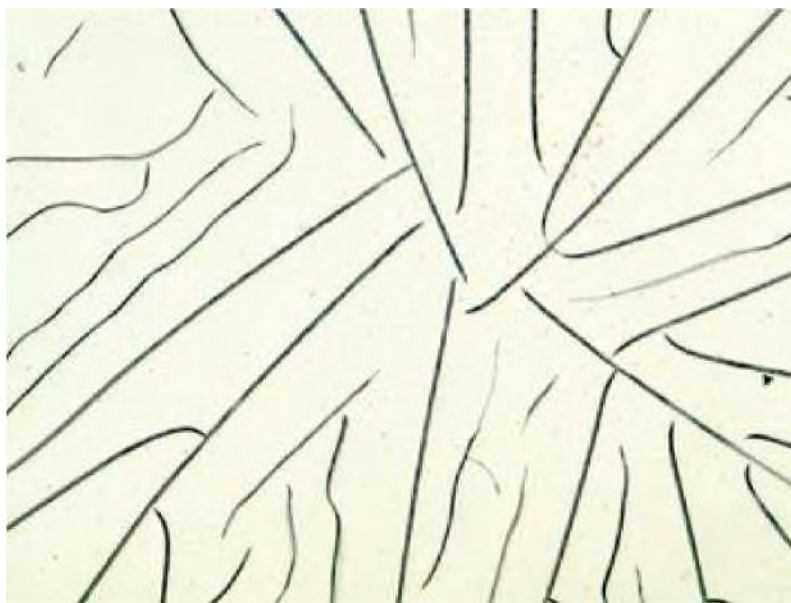
центральной части капли, который быстро затвердевает.

Трещины образуются когда имеются большие напряжения, большая твердость, большие смещения.

Псевдотрещины образуются когда имеются малые напряжения, небольшая твердость и маленькие смещения.

Структура псевдотрещин в центральной части капли.

После того, как радиальные трещины сомкнулись в центральной части капли, начинается образование псевдотрещин. Псевдотрещины начинают расти перпендикулярно радиальным трещинам. Если расстояние между радиальными трещинами небольшое, то псевдотрещины образуют отрезки между радиальными трещинами. Если расстояние между радиальными трещинами большое, то при росте псевдотрещины загибаются и образуют розетки.



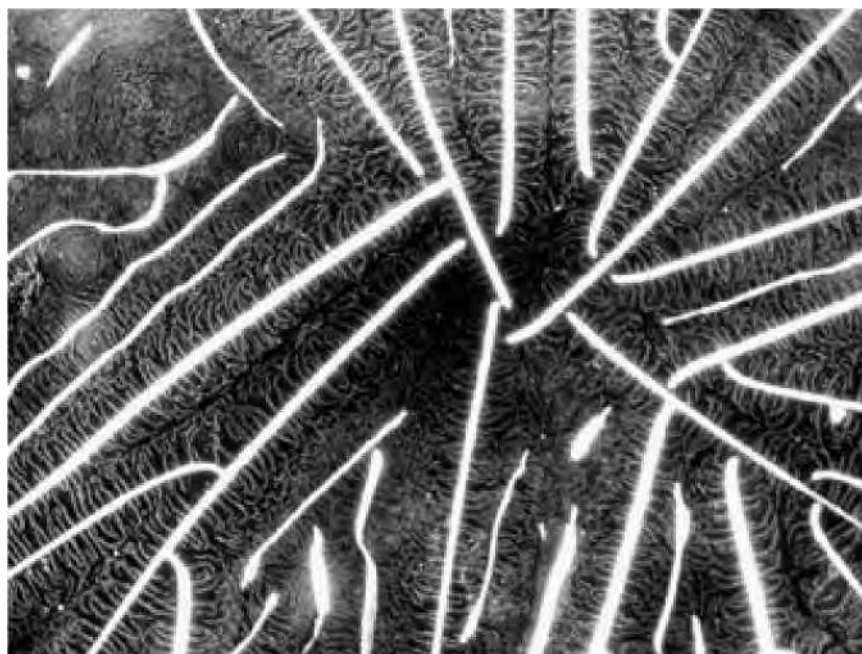


Рис. 1-43. Трещины и узкие псевдотрещины. Светлое поле, темное поле, фазовый контраст. Поле зрения 2 мм.

В областях, где нет трещин, псевдотрещины образуют характерные структуры в виде розочек. Рост такой структуры начинается от какой то неоднородности во все стороны. Розетка состоит из центра, от которого в разных направлениях отходят псевдотрещины (от трех до шести лучей). Псевдотрещины видны в проходящем свете в виде светлых полос. Трещины в проходящем свете видны в виде темных полос. Псевдотрещины расположены по высоте в средней части высохшей капли, и не выходят на верхнюю поверхность. На верхней поверхности имеется лишь небольшое углубление над псевдотрещиной. Над некоторыми псевдотрещинами на поверхности происходит формирование кристаллов соли.

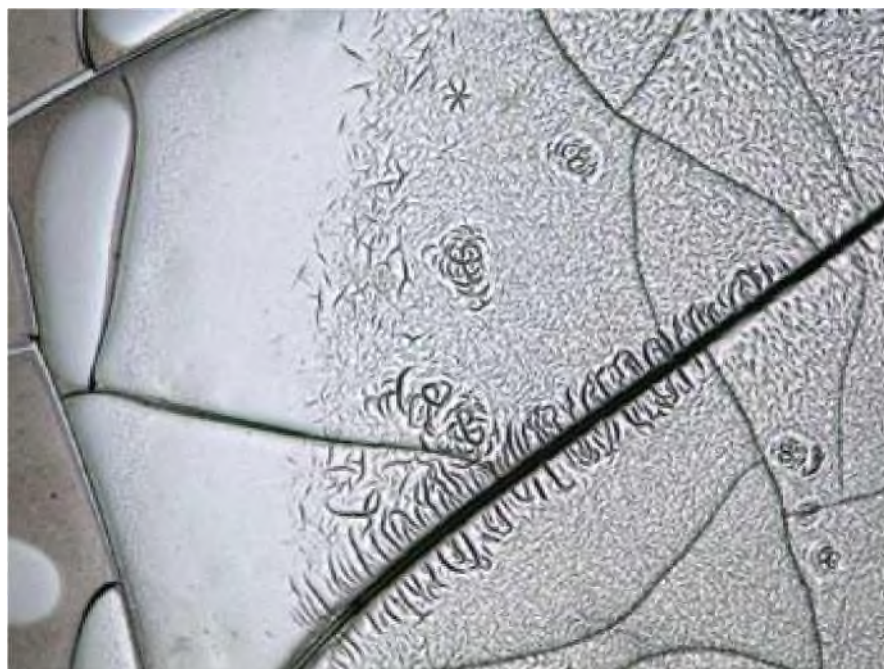


Рис.1-44. Трещины и псевдотрещины в виде розеток. Светлое поле. Поле зрения 2 мм.

На формирование структуры центральной зоны влияют следующие параметры: скорость испарения связанной воды, скорость затвердевания сыворотки, скорость нарастания напряжений, скорость роста трещин, величина градиента вязкости (плотности) при движении фронта затвердевания. Образование розеток начинается на неоднородностях после того, как твердость геля в центральной части достигла определенной величины. Если скорость испарения связанной воды (скорость затвердевания) высокая - то образуется много центров образования розеток, и формируется много маленьких розеток. Если скорость испарения связанной воды не очень высокая, то образуется несколько больших розеток.

Если нет центров кристаллизации, если область однородна, то образуются поле отдельных дугообразных псевдотрещин.

В центральной зоне возможны различные варианты в зависимости от комбинации значений двух признаков:

- типы основных трещин первого порядка (совсем нет трещин, есть радиальные трещины, есть неупорядоченные трещины с различной ориентацией, кольцевые трещины),
- типы псевдотрещин (совсем нет псевдотрещин, псевдотрещины в виде дуг, псевдотрещины в виде розеток).

2.9 от 65 до 80 мин. Кристаллизация соли.

2.9.1 Кристаллизация соли на поверхности в центральной зоне.

Кристаллизация начинается там, где выполняются следующие два условия - имеется локальное повышение концентрации и имеются центры кристаллообразования. В зависимости от различных условий структура кристаллического осадка соли в центральной части может быть различной. Эта структура определяется следующими параметрами:

1-высота пленки сыворотки в центральной части капли,

- 2- количеством соли, имеющейся в центральной части капли. Это количество зависит от исходного количества соли в капле (оно всегда практически постоянно), и от скорости гелеобразования (при большой скорости гелеобразования соль не успевает диффундировать в центральную область и остается в геле),
- 3- скоростью затвердевания пленки.

В итоге возможны следующие типы кристаллизации соли в центральной части капли:

- 1- отсутствие кристаллов соли, прозрачная центральная область. Это происходит при быстром гелеобразовании, когда соль не успевает диффундировать в центральную часть. Кристаллов соли так же не образуется при малом радиусе капли.
- 2- кристаллизация вдоль прямых псевдотрещин. Это происходит, когда в центральной зоне имеются часто расположенные радиальные трещины.
- 3- кристаллизация вдоль коротких дугообразных псевдотрещин, в виде розочек. Это происходит, когда в центральной области образовались псевдотрещины.
- 4- в центральной области образуется небольшое количество больших ячеек, в которых кристаллы соли образуют радиальную многолучевую дендритную структуру, которая растет от некоторого центра ячейки.
- 5- кристаллизация в виде сплошной тонкой корки кристаллов соли на поверхности. При наблюдении в режиме темного поля на общем темном фоне капли видна светлая пленка на поверхности, состоящая из мелких кристаллов. Так же видна очень яркая область из крупных кристаллов соли, которые локализованы в поверхностном и подповерхностном слое капли.
- 6- кристаллизации в виде сплошной корки (сплошной дендрит) больших кристаллов соли.

При наблюдении на просвет центральная область не прозрачна и выглядит мутной из-за наличия кристаллов. Особенно четко выявляется структура кристаллов соли при наблюдении в режиме темного поля. Морфология и строение корки кристаллов прежде всего определяется строением трещин.

Кристаллизация при наличии в центральной зоне радиальных трещин.

После того как радиальные трещины сомкнулись в центре капли, это означает, что завершился процесс испарения свободной воды и в центре капли расположен затвердевающий гель с повышенной концентрацией соли. В центральной зоне капли образовалась тонкая пленка геля, в которой очень мало альбумина и очень много соли. Так как в этой пленке находится практически вся соль из исходной капли, то концентрация соли очень высокая. Выпадение соли начинается не сразу после испарения жидкой фазы, так как соль находится в геле, а не в растворе. Еще некоторое время происходит испарение связанной воды из геля. Кристаллизация начинается над псевдотрещинами, отходящими перпендикулярно радиальным трещинам, и от различных неоднородностей, расположенных в центральной части капли. Границы трещин и неоднородности являются центрами кристаллизации. Фронт кристаллизации соли очень быстро движется от центра к краю капли. Весь процесс кристаллизации соли происходит за несколько минут. Это объясняется тем, что кристаллизация происходит сразу во всей центральной зоне, которая является тонкой и практически однородной по составу.

Кристаллизация при отсутствии в центральной зоне радиальных трещин.

Если в центральной зоне не образовалось трещин, то центрами кристаллизации являются различные неоднородности. В этом случае кристаллизация распространяется концентрически в разные стороны от этих

центров. Происходит быстрый рост дендритных псевдотрещин. В местах с

повышенной концентрацией соли над псевдотрещинами сразу же происходит образование дендритов соли. Если концентрация соли достаточно высокая, то дендрит соль при росте образует сплошную корку. Но эта корка изначально образовалась при росте дендрита.

Через некоторое время расширяющиеся области смыкаются. В результате вся центральная область оказывается состоящей из ячеек с дендритами псевдотрещин и соли.

2.9.2 Кристаллизация соли на поверхности в переходной зоне.

После быстрой кристаллизации соль в центральной части капли, начинается медленная кристаллизация соли на поверхности переходной зоны. Ближе к центру капли образуется сплошная пленка кристаллов, а дальше от центра капли образуются отдельные кристаллы. В краевой зоне не происходит образования кристаллов на поверхности, так как в этой зоне альбумин быстро затвердел и нет испарения. В переходной зоне соль кристаллизуется из пара, из молекул соли, которые вылетели из геля и обратно осели на поверхность. В связи с этим кристаллы имеют правильное строение. Кристаллизация соли на поверхности происходит на неоднородностях. Можно выделить два типа кристаллизации соли на поверхности.

- кристаллизация на протяженном объекте (кристаллизация на поверхностных микротрещинах и на псевдотрещинах). Образуются изогнутые полосы кристаллов.
- кристаллизация на точечных неоднородностях. Образуются округлые агрегаты в виде розочек.

Структура образования кристаллов соли на поверхности высохшей капли определяется, в основном, структурой псевдотрещин. Псевдотрещины заполнены водой и солью, поэтому они являются центрами кристаллообразования соли на верхней и на нижней поверхности ячеек. Но на нижней поверхности ячеек образуется только очень тонкая полоска соли, а на верхней поверхности образуется широкая полоса кристаллов соли.

Если концентрация соли в некоторой области была высокой, то образуются толстые дендриты соли, или даже целые области (корка), покрытые кристаллами соли.

На поверхности капли в промежуточной и краевой зоне соль кристаллизуется в виде сплошного слоя, в виде отдельных агрегатов, и в виде розочек.



Рис. 40. Кристаллы соли на поверхности капли. Поле зрения 3,5 мм.

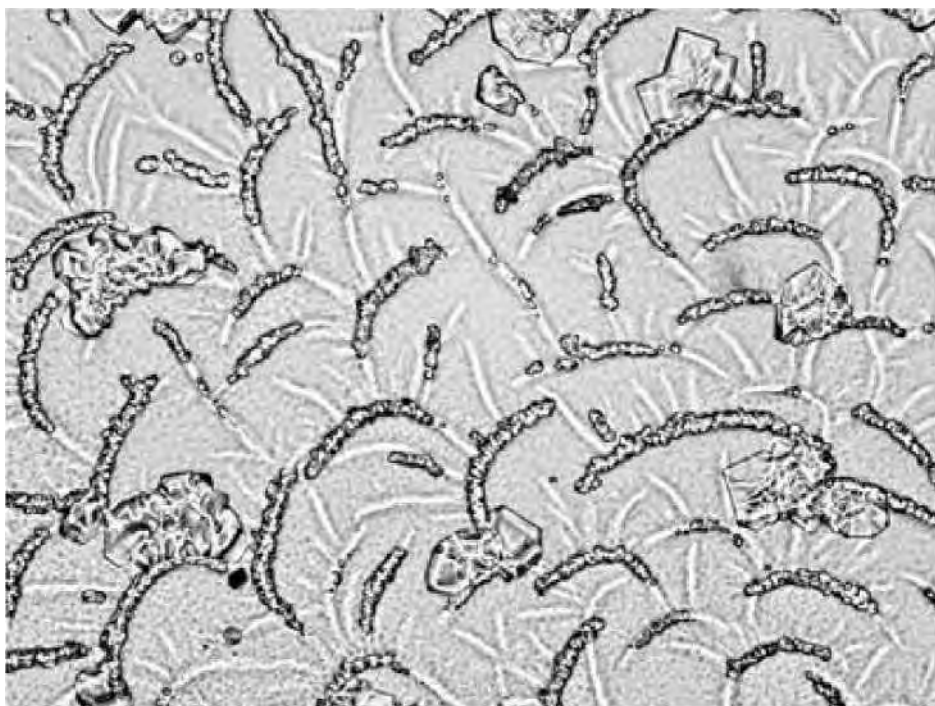


Рис. 1.45. Видно два типа кристаллов соли. Поле зрения 0,3 мм.

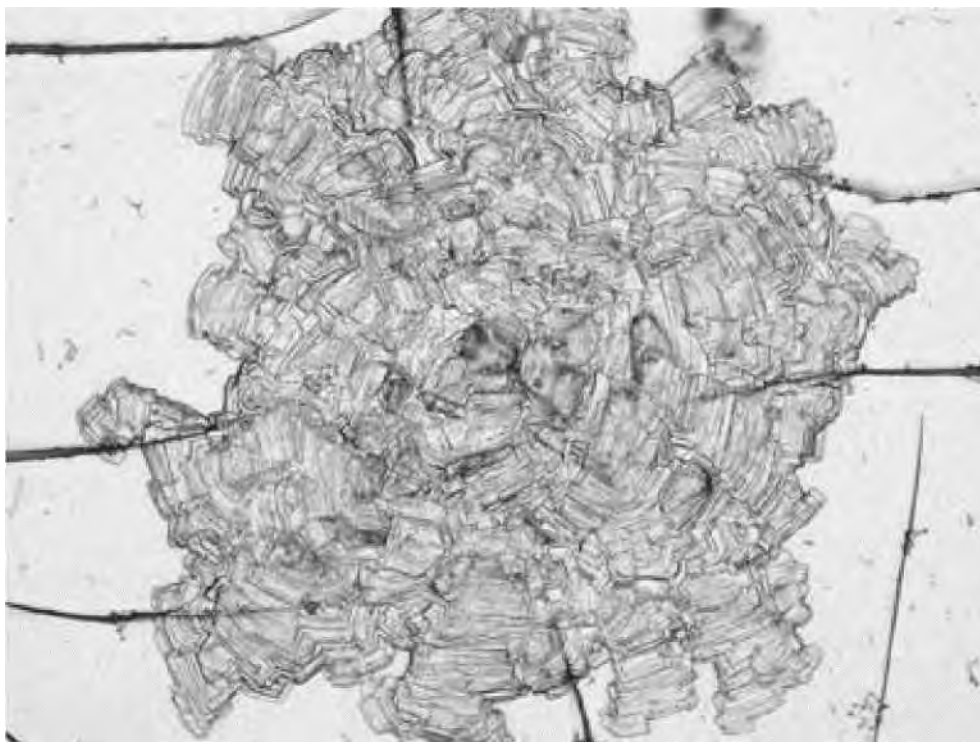


Рис. 1-46. Крупный агрегат кристаллов соли на поверхности. Поле зрения 0,5 мм.

В краевой зоне кристаллов на поверхности ячеек нет. При наблюдении глазом на просвет краевая зона прозрачна. Чем ближе к центру, тем больше появляется одиночных кристаллов на поверхности. На верхней поверхности ячеек в переходной зоне находятся одиночные кристаллы соли. В центральной части высохшей капли на поверхности образуется сплошная область (корка) из кристаллов соли. При наблюдении глазом на просвет центральная область не прозрачна и выглядит мутной из-за наличия кристаллов.

В переходной зоне кристаллы соли образуются на верхней и на нижней поверхности ячеек. Кристаллы группируются вдоль линий, образованных псевдотрещинами. Псевдотрещины являются центрами кристаллизации.

На верхней поверхности псевдотрещины имеют в основном слабо изогнутый вид. Псевдотрещины имеют хаотический вид, короткие дугообразные отрезки, тройное ветвление. В краевой части капли псевдотрещины перпендикулярны основным радиальным трещинам. В широких (больших) ячейках в центральной части псевдотрещины направлены хаотично, или циркулярно вокруг некоторого центра, расположенного в центральной части ячейки.

На нижней поверхности ячейки отсутствует правильная структура микротрещин. На нижней поверхности нет напряжений, она жестко связано с поверхностью стекла.

Кристаллизация соли происходит на верхней поверхности капли. Объяснить образование кристаллов на поверхности можно несколькими причинами.

1- При испарении воды капля усыхает. Вода, насыщенная солью, выдавливается на поверхность. Вода испаряется, а соль выпадает в виде кристаллов.

2- При дегидратации, когда капля начинает загустевать, на ее поверхности еще остается вода в жидкой фазе, насыщенная солью (пленка жидкости). При ее испарении соль кристаллизуется на поверхности капли.

3- Кристаллизация на поверхности происходит из испарившейся воды. В дальнейшем начинается образование отдельных мелких кристаллов.

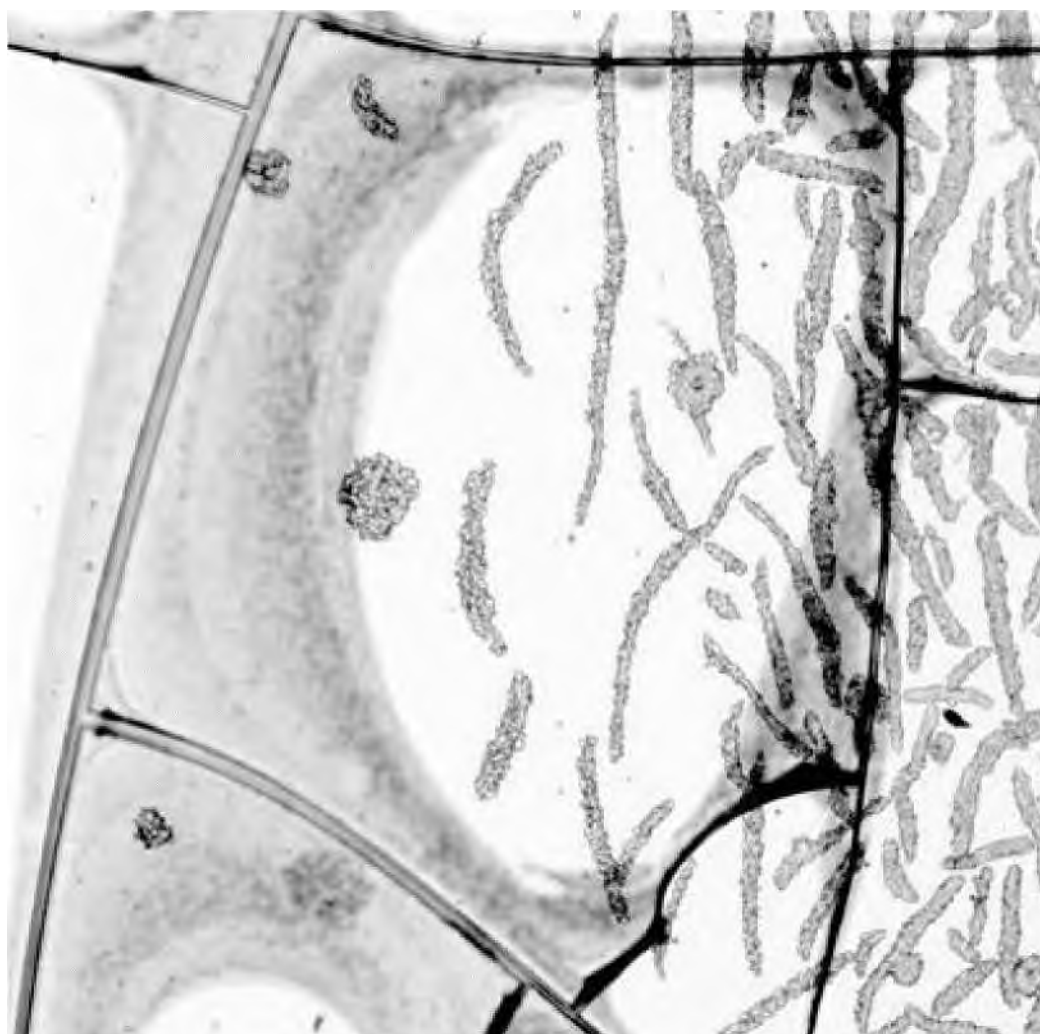


Рис. 1-47. Кристаллы соли на верхней поверхности ячейки и осадок белка на нижней поверхности ячейки. Поле зрения 1,5 мм.

Дальше от центра и ближе к краю капли находится зона одиночных кристаллов - кристаллы соли образуют отдельные островки на поверхности, с крупным кристаллом в центре и с мелкими пластинами вокруг него, часто в виде розочек. Чем дальше от центра, тем меньше одиночных кристаллов на поверхности.

В краевой зоне кристаллов соли нет. На просвет эта область прозрачна. В переходной зоне имеется три типа кристаллов - соль, альбумин, липиды

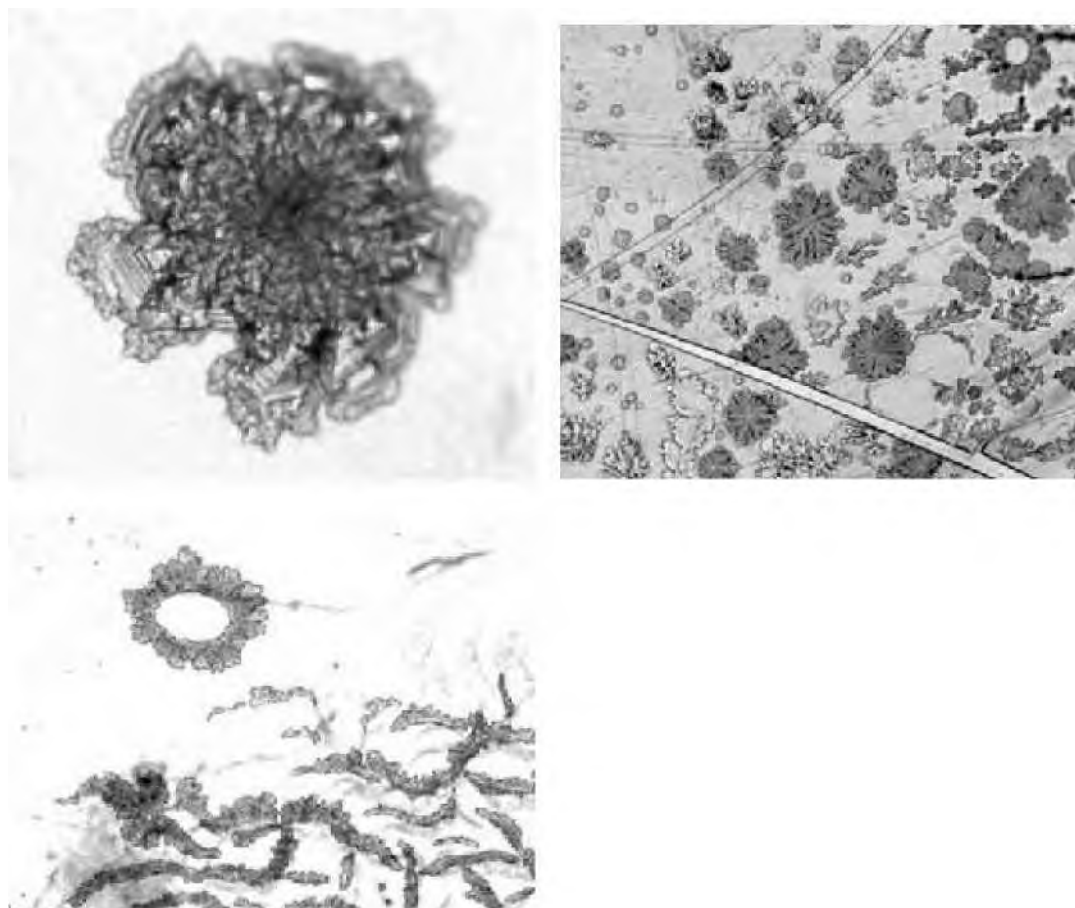


Рис. 1-48. Различные типы кристаллов на поверхности ячеек. 1-агрегат с кристаллическим краем - поле зрения 1 мм, 2-Два типа агрегатов, светлые (соль) и темные (липиды), поле зрения 3м, 3-Веточки и агрегат с дыркой, поле зрения 1мм,

2.10. от 60 до 80 мин. Формирование ячеек.

Вдоль трещин осаждается темно-коричневый осадок - белки. Белки осаждаются на верхней и нижней поверхности высыхающей капли. Ширина осадка растет, и в центре ячеек образуются круглое ядро. Осаждение белков можно объяснить эффектом высаливания. Белки выпадают в осадок при повышении концентрации солей. Высаливание белков осуществляется в следующей последовательности (по мере повышения концентрации соли): вначале выпадает фибриноген, затем глобулины, и в последнюю очередь выпадают альбумины.

1- Типы ячеек.

Ячейка представляет собой прямоугольный фрагмент высохшей капли, ограниченный со всех сторон трещинами. Можно выделить несколько типов ячеек:

- 1- краевые, маленькие, в виде кругового сектора без ядра. Диагностическим признаком в таких ячейках является наличие краевых трещин в виде лесенки.
- 2- краевые, большие, в виде кругового сектора с ядром.
- 3- срединные, в виде квадрата, с ядром.
- 4- внутренние, прямоугольные, вытянутые от центра к краю, с ядром.

В зависимости от толщины высохшей ячейки можно выделить следующие типы ячеек:

- 1- толщина от 0 мм до 0,1 мм - при такой толщине высохшей капли трещины вообще не образуются, и таких ячеек не бывает,
- 2 - безъядерные (толщина от 0,1 мм до 0,3 мм) - ячейки без ядра,
- 3 - частично-ядерные (толщина от 0,3 мм до 0,6 мм) - ячейки с осаждением белка тонким слоем вдоль границы ячейки,

- 4 - ядерные (толщина от 0,3 мм до 0,6 мм) - ячейки с круглым ядром в центре ячейки,
- 5 - ядерные с трещинами (толщина от 0,6 мм до 0,8 мм) - ячейки с ядром и трещинами около ядра,
- 6- белковые (толщина от 0,8 мм и более) - толстые ячейки темно-желтого цвета, в которых концентрические трещины вокруг центральной части,
- 7- ячейки со скрытым ядром - ячейки, в которых видно осаждение белка ровным слоем без видимого ядра в центре. Однако, если от наблюдения в светлом поле перейти к наблюдению в поляризованном свете, то будет видно темное ядро в центре ячейки.

Таким образом, можно предположить, что ядро - это прозрачная компонента, например альбумин. Поляризационными свойствами обладает осадок вокруг центрального ядра. Некоторые высказывают мнение, что центральное круглое ядро - это прилипшая ко дну часть ячейки. При большом увеличении и при наблюдении с обратной стороны, можно увидеть, что это не так. Ячейка остается прикрепленной к стеклу гораздо большей поверхностью, чем центральное кольцо.

2- Динамика усыхания и деформации ячеек.

После того, как в результате образования радиальных и поперечных трещин образовалась ячейка, она начинает жить самостоятельной жизнью. Процесс дегидратации в ней происходит автономно. Таким образом, изучая структуру ячейки после дегидратации, можно судить о составе ячейки.

Испарение воды из ячейки осуществляется с верхней поверхности и через поверхность боковых трещин. Ячейка в начальной стадии имеет консистенцию геля, и никаких конвекционных потоков жидкости в ней нет. Затвердевание ячейки происходит с верхней поверхности и с боков. Образуется внешняя жесткая оболочка и гелеобразная сердцевина. Так как верхняя поверхность ячейки при высыхании сжимается, то края ячейки немного приподнимаются.

Иногда наблюдается как бы двойное изображение языковых структур в ячейке. Этот эффект связан со сдвигом ячейки. При усыхании объем ячейки уменьшается. В широкой трещине между двумя ячейками можно видеть длинный бугорок вдоль средней линии трещины. Это выпадение осадка в месте образования трещины. Разные края соседних ячеек обычно расположены на разных расстояниях от линии образования трещины. Чем больше ячейка - тем сильнее ее сжатие, тем сильнее сдвиг от линии образования трещины. Однако ячейки сжимаются не симметрично. Если рассмотреть четыре границы ячейки, то их сдвиг от начального положения может быть различным. Величина сдвига определяется тем, с какой силой ячейка сцеплена с подложкой. В разных местах сила сцепления различна. Сила сцепления зависит от чистоты поверхности стекла в разных местах и от локального состава капли. Сцепление по краям в местах выпадения белка ослаблено, так как сцепление ячейки со стеклом осуществляется через прослойку выпавших агрегатов, которые имеют рыхлую структуру.

Ячейка сжимается, и сдвигаются белки, выпавшие на дно ячейки. В связи с этим при наблюдении в микроскоп можно наблюдать удвоение рисунка языков.

Виден след белка выпавшего на предметное стекло, а над ним на небольшом удалении виден аналогичный рисунок - след белка, расположенного на нижней поверхности сжавшейся ячейки. Так как видно два отдельных фрагмента, то можно предположить, что сдвиг ячейки происходит путем скольжения двух слоев друг относительно друга. Величина сдвига равняется величине раскрытия щели (величине сдвига границы ячейки от первоначального положения). Ядро ячейки, центральная круглая прозрачная часть, - никогда не сдвигается. Отсюда можно сделать вывод, что в этом месте самое сильное сцепление со стеклом. Так как

сцепление осуществляется между чистым веществом (альбумином) и стеклом. Деформация ячейки происходит в радиальном направлении по направлению к центру ячейки - к ядру. При этом величина смещения ячейки пропорциональна удаленности от ядра. Чем дальше от ядра - тем сильнее смещение. При отслаивании высохшей капли от предметного стекла, на стекле остаются следы от выпавших кристаллов.

Сдвинутые рисунки расположены на разных уровнях. Расстояние от нижнего рисунка до верхнего рисунка примерно такое же как расстояние от верхнего рисунка до верхней поверхности капли (высота капли). Происходит отслоение ячейки.

Если есть сдвиг - значит есть отслоение ячейки.

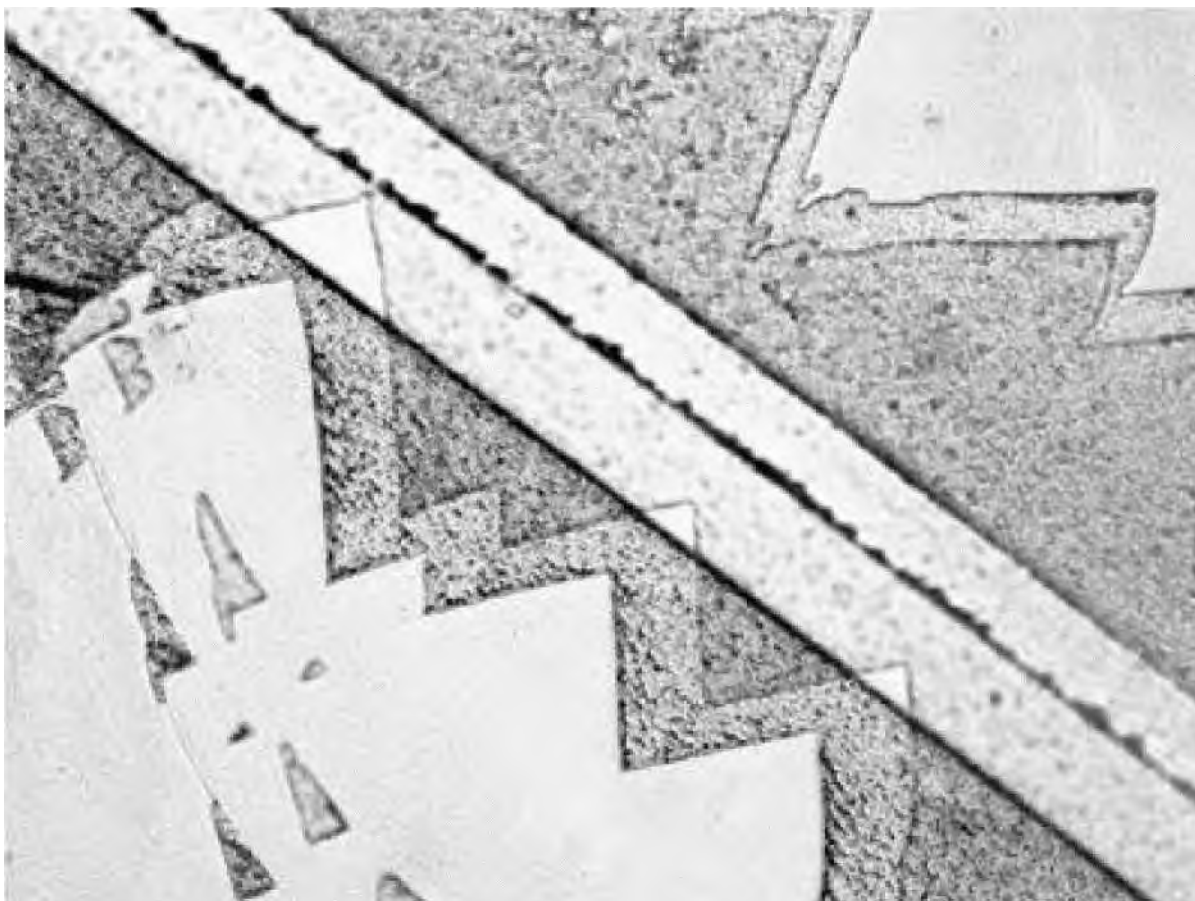


Рис. 1-49. Удвоение рисунка. Виден отпечаток осадка на поверхности стекла и осадок на дне ячейки. Поле зрения 0,7 мм.

3- Выпадение осадка по краю ячеек.

После образования ячейки (после образования радиальных и поперечных трещин) сразу начинается процесс выпадения коричневого осадка. Процесс образования осадка начинается от краев ячейки. Фронт выпадения осадка движется к центру ячейки. На начальном этапе скорость движения фронта большая. Затем скорость движения фронта замедляется. Движение фронта осуществляется скачками. В некоторый момент на границе фронта кристаллизации выпадает узкая полоска белковых агрегатов. Затем некоторое время проходит без изменений. Затем процесс повторяется.

-Иногда зона выпадения агрегатов однотонная, одного бурого цвета.

-Иногда можно выделить две зоны выпадения агрегатов - темную внешнюю и более светлую внутреннюю,

-Иногда темные и светлые полосы чередуются.

-Иногда агрегаты не выпадают, а образуется тонкая прозрачная пленка на дне ячейки с круглым ядром в центре. Эта конфигурация видна только при косом освещении.

-Иногда нет ни агрегатов, ни тонкой пленки, только прозрачная ячейка.

В центре ячейки расположено прозрачное ядро. От ядра к центру капли идет светлая полоса (прозрачная, с малым количеством осадка). От ядра в сторону от центра капли идет темная полоса. Вдоль боковых сторон ячейки - серые полосы. Языковые структуры образуются либо в темной полосе, либо в боковых серых полосах.

В центральной части ячейки образуется круглая зона без кристаллов - ядро ячейки.

Осадок вокруг ядра бывает двух типов - прозрачный и в виде агрегатов. Прозрачный осадок образуется даже при дегидратации капли чистого альбумина. Осадок в виде агрегатов бывает однородным, одного цвета, или неоднородным - светлые и темные полосы вокруг ядра. Если состояние белков в норме, то в центре ячейки имеется прозрачное ядро, а по краю на дне ячейки выпадают в осадок комплексы белок-липид равномерным однородным слоем. Осадок в виде агрегатов бывает двух типов - светло-желтый и темно-коричневый. В скрещенных поляроидах цвет изменяется на темно-коричневый и зеленый соответственно. Темный осадок обладает свойством оптической анизотропии. Можно предположить, что это липопротеины и липиды. Темно-желтый осадок - глобулины.

Выпавшие кристаллы обладают оптической анизотропией. В скрещенных поляроидах проявляется структура темных и светлых секторов. Этот эффект вызывается двумя причинами. Первое - в состав выпадающих кристаллов входят липиды. Второе - кристаллы выпадают постепенно в виде дуг окружности, и образуют концентрические структуры вокруг центра ячейки - структуру сферолита, который дает изображение мальтийского креста.

Если в сыворотки крови находились красные эритроциты, то при движении фронта выпадения осадка к центру ячейки на границе фронта происходит почернение и распад эритроцитов. Это говорит о том, что на этом фронте происходит резкое изменение фазового состояния сыворотки.

В нижней и верхней поверхности ячейки выпадают кристаллы соли в виде отдельных кристаллов или в виде нитей

Если ранее высохшую каплю поместить под микроскоп, то происходит нагревание капли осветителем микроскопа, и возобновляется процесс выпадения агрегатов белка в ячейках. При повышенной температуре выпадение белка усиливается. Получается, что выпадение белка осуществляется уже из твердой фазы.

Если ячейка внутренняя, она имеет вытянутую форму. В таких ячейках возникают продольные и поперечные образования. Это не трещины, а линии напряжения.

При усыхании трещины между ячейками расходятся, и образуется зазор. При усыхании капли края ячеек приподнимаются, так как верхняя поверхность капли усыхает сильнее, чем нижняя. Это вызывает деформацию - более сильное стягивание верхней поверхности ячейки. Усыхание капли аналогично растрескиванию верхнего слоя глины на солончаках. Нижняя поверхность высохшей капли скреплена с предметным стеклом не очень плотно. Об этом можно судить по двум причинам: -если капля долго хранится, то ячейки самопроизвольно отскакивают (в связи с продолжающимся усыханием, сжатием и напряжениями), - если рядом с каплей капнуть спирт, то он затекает под каплю, и можно наблюдать процесс заполнения спиртом пространства под ячейками.

4- Ядро ячеек.

Ядром ячейки называется прозрачная круглая область в центре ячейки. Можно выделить следующие виды ядер: -правильное круглое ядро в центре ячейки, -вытянутое ядро, -имеется тонкий ободок осадка вдоль границы ячейки, -ядро совпадает с ячейкой, нет выпадения осадка в ячейке.

Особенности структуры ядра:

- 1- ядро всегда прозрачно,
- 2- вокруг ядра имеется прозрачный осадок, или осадок в виде агрегатов,
- 3- в ядре нет трещин, а вокруг ядра в толстых ячейках образуются трещины.
- 4- при фазовом методе наблюдения ядро имеет вид выпуклой линзы.
- 5- граница ядра иногда имеет четкий вид, а иногда границы не видно. В этом случае наличие ядра можно обнаружить только при косом освещении.
- 6- границей ядра является осадок, выпавший на дне ячейки. Граница ядра - это круг на дне ячейки.
- 7- сверху, над ядром на верхней поверхности ячейки, могут находиться кристаллы соли.
- 8- средний диаметр ядер в высохшей капле является одним из количественных параметров оценки структуры капли.
- 9- ядро возникает при дегидратации чистого альбумина. В этом случае ядро окружено прозрачной полосой. Коричневого осадка вокруг ядра не образуется.
- 10- при длительном хранении высохшая сыворотка отлетает, по краю ячейки остаются следы кристаллов, а в зоне ядра следов не остается.
- 11- если в сыворотке крови присутствуют эритроциты, то при высыхании они распределяются на краю ячейки, и уходят из ядра ячейки (выталкиваются).
- 12- интерференционные полосы возникают вокруг ядра. Внутри ядра интерференционные полосы не возникают. Значит поверхность над ядром - плоская.

Как и почему образуются ядра?

Ядро представляет собой разреженный гель, разрыв структуры геля, аналог псевдотрещины. Образно говоря, ядро ячейки - это дырка от бублика. После образования ячейки в результате растрескивания геля ячейка начинает затвердевать с боков и с верхней поверхности. В середине ячейка еще жидкая. При дальнейшем испарении воды через боковые и верхнюю поверхность гель еще сильнее затвердевает, и должен сократиться в размере. Однако внешний каркас ячейки жесткий. Тогда происходит разрыв структуры геля в центральной части ячейки. Трехмерный каркас геля альбумина уходит к краю, а в центре ячейки образуется круглая область с пониженной плотностью сетки геля. Эта область

заполняется молекулами воды и соли. Так как ячейка имеет малую высоту, то образовавшаяся область имеет вид линзы. В центре ячейки появляется область в виде линзы, заполненная водой и солью. Концентрация белка в этой области очень маленькая. Это и есть ядро ячейки. Из-за малой концентрации белка в ядре трещины в ядре не образуются. При косом освещении хорошо видно форму этой линзы. Так как в области ядра практически нет ничего кроме воды, то никаких осадков в области ядра не образуется.

Отношение площади ядра к площади ячейки является важным параметром. Чем больше ядро - тем меньше белка в ячейке.

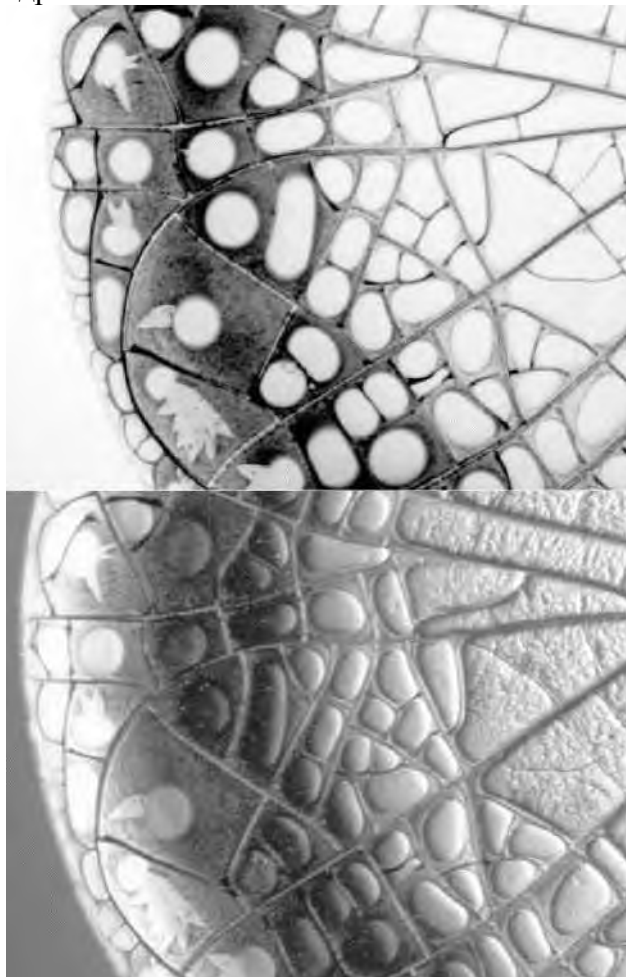


Рис. 1-50. Ядра ячеек при прямом и косом освещении. Поле зрения 4 мм.

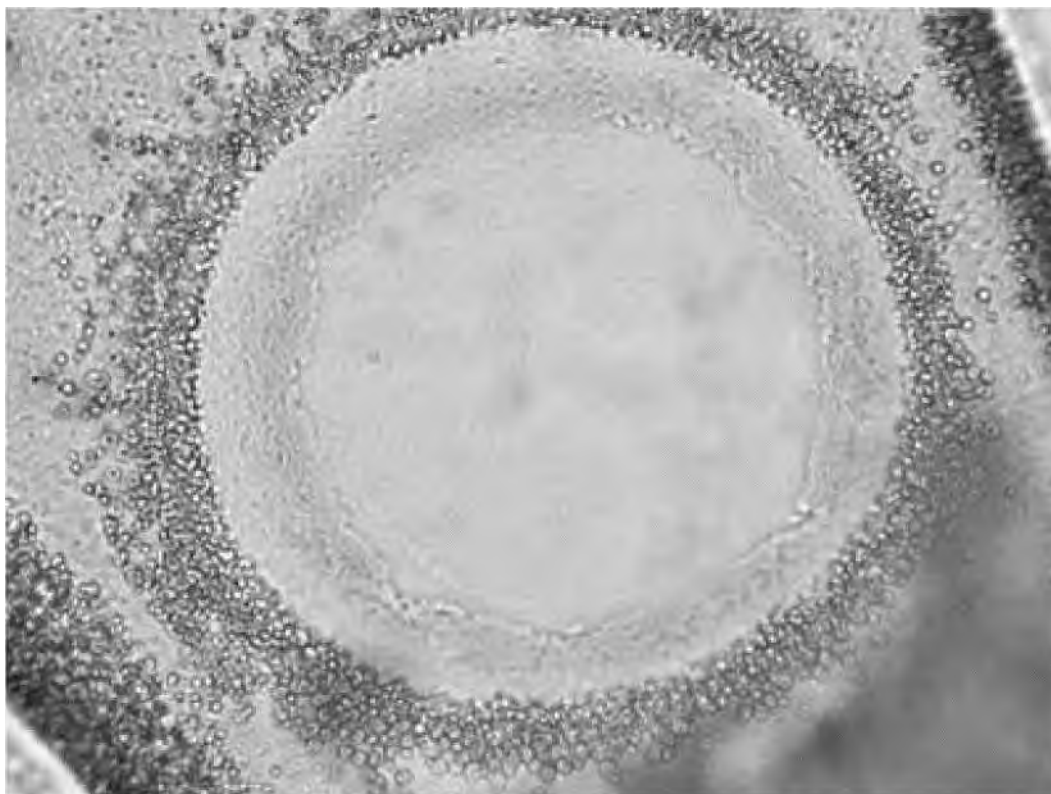


Рис. 1-51. Структура ядра ячейки. Поле зрения 0,2 мм.

При специальном освещении (отраженный свет) над ячейками можно наблюдать интерференционные кольца. Центр интерференционных колец находится в центре ячейки. Интерференционные кольца видны даже тогда, когда ячейка прозрачна и в ней не видно ядра.

Обычно интерференционные кольца возникают из-за изменения длины оптического пути (клин). В случае ячейки длина оптического пути не меняется, толщина ячейки постоянна. Изменяется показатель преломления среды. У ядра ячейки показатель преломления маленький, там мало белков. За пределами ядра показатель преломления возрастает, так как возрастает концентрация белков. Следовательно, возрастает набег фазы и возникают интерференционные кольца.

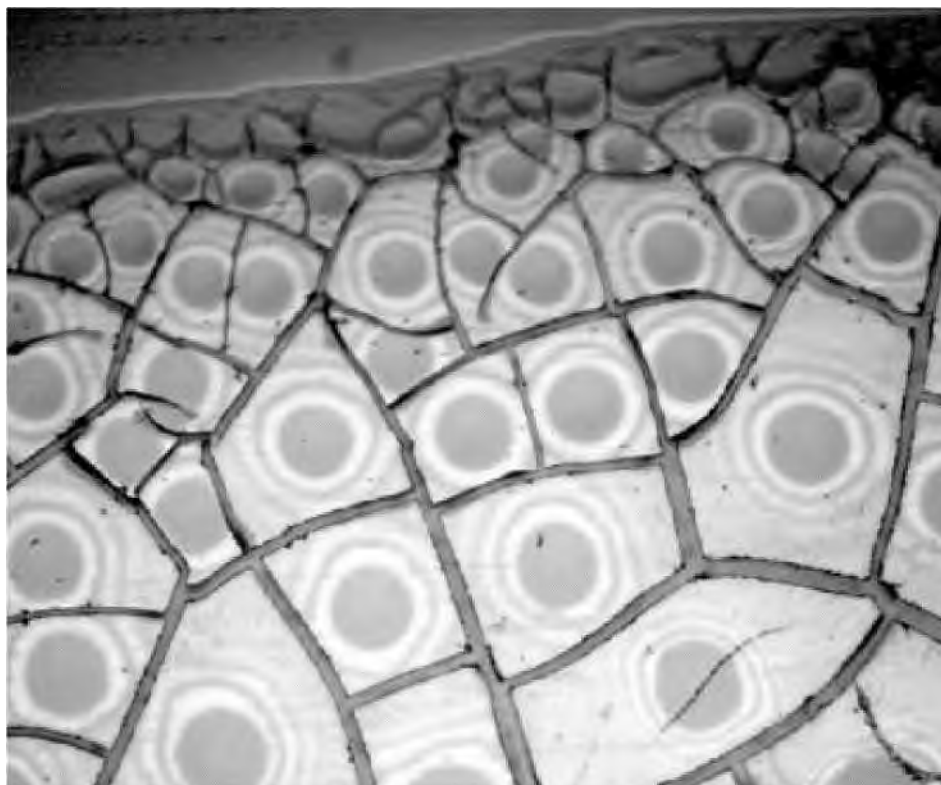


Рис. 1-52. Видны интерференционные кольца в ячейках, хотя ядер в ячейках не видно. Отраженный свет. Поле зрения 2 мм.

5- Образование языковых структур в ячейках.

При отклонении состояния сыворотки крови от нормы возможны различные аномальные виды осаждения агрегатов - языковых структур (полосы и ковры Серпинского, языки Арнольда). Образование языковых структур связано с нарушениями нормального состояния белков в плазме крови. Выпадение темного компонента начинается от внешнего края ячейки и имеется фронт,двигающийся к центру ячейки. Если скорость затвердевания геля высокая, то в геле быстро возникают напряжения. При достижении напряжения некоторого порогового значения происходит разрыв структуры геля. Разрыв всегда возникает в некоторой точке, в которой имеется неоднородность. В точках неоднородности всегда создается повышенное значение напряжения. При продвижении фронта осаждения, осадок образуется только в области, в которой сохранилась структура геля. От точки разрыва формируется расходящаяся область (язык), которая заполнена молекулами воды, соли, и одиночными молекулами белка. Эта область однородна, прозрачна, и никакими оптическими методами не выделяется. Ее видно только из-за того, что у нее по бокам образуется осадок. Фронт выпадения осадка продвигается дискретными скачками. На границе между светлым компонентом (языком) и темным компонентом от точки завершения очередного скачка фронта кристаллизации обычно отходит возникающая дугообразная трещина в сторону темного компонента. Эта трещина снимает возникающие напряжения. Это так называемые языковые трещины. Они образуют группу параллельных дугообразных трещин, расходящихся от края языковой структуры.

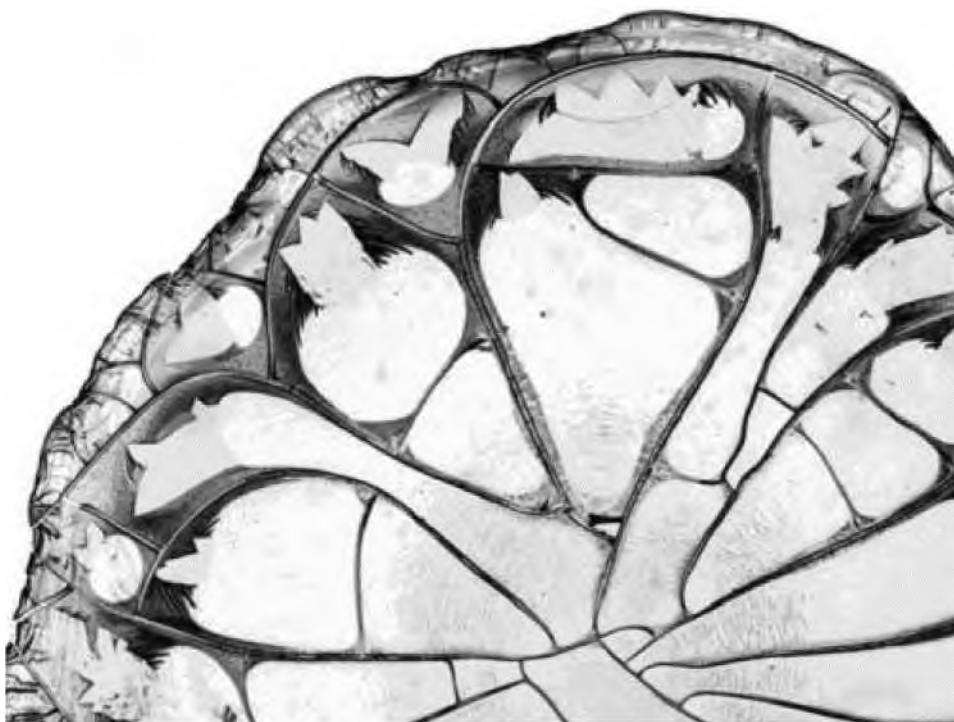


Рис. 1-53. Языковые структуры. Поле зрения 5 мм.

При некоторых условиях вместо сплошного языка происходит образование так называемых ковров Серпинского. Их возникновение можно объяснить следующим образом. Вначале возникает языковая структура. Если концентрация белка достаточно высокая, и гель достаточно вязкий, то перед фронтом движения разрыва геля происходит возрастание концентрации белка. При достижении некоторого критического значения снова происходит формирование трехмерной структуры геля, и язык обрывается. Снова начинается осаждение белка по всему фронту. Но так как условия образования языка сохранились (высокое напряжение и высокая вязкость геля) то происходит возникновение нового разрыва структуры геля и образование нового языка. Таким образом возникает языковая структура в виде ковров Серпинского. Ковры Серпинского имеют структуру фракталов.

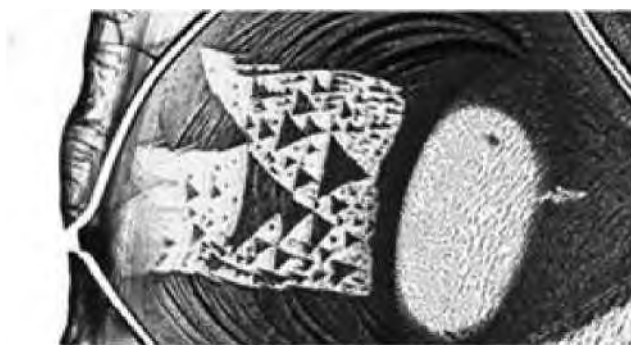


Рис.1-55. Ковр Серпинского в высохшей капле. Поле зрения 3 мм.



Рис. 1-54. Треугольник Серпинского
6- Образование листьев.

Листья образуются в ячейках в виде осадочных структур вдоль радиальных трещин. Образование листьев происходит на начальном этапе дегидратации. Образование листьев связано с начальной фазой выпадения коричневого осадка

(глобулинов). Как правило, листья образуются на самом краю капли у радиальных трещин, не имеющих закругление, и выходящих перпендикулярно к краю капли. В этом случае ячейка получается незавершенной (отсутствует одна из четырех ограничивающих трещин). Это нарушает процесс нормального выпадения осадка, и образуются листья. Если глобулинов достаточное количество, то листья расширяются, и сливаются.



Рис. 1-56. Структура типа «лист» в сформированной капле. Поле зрения 2 мм.

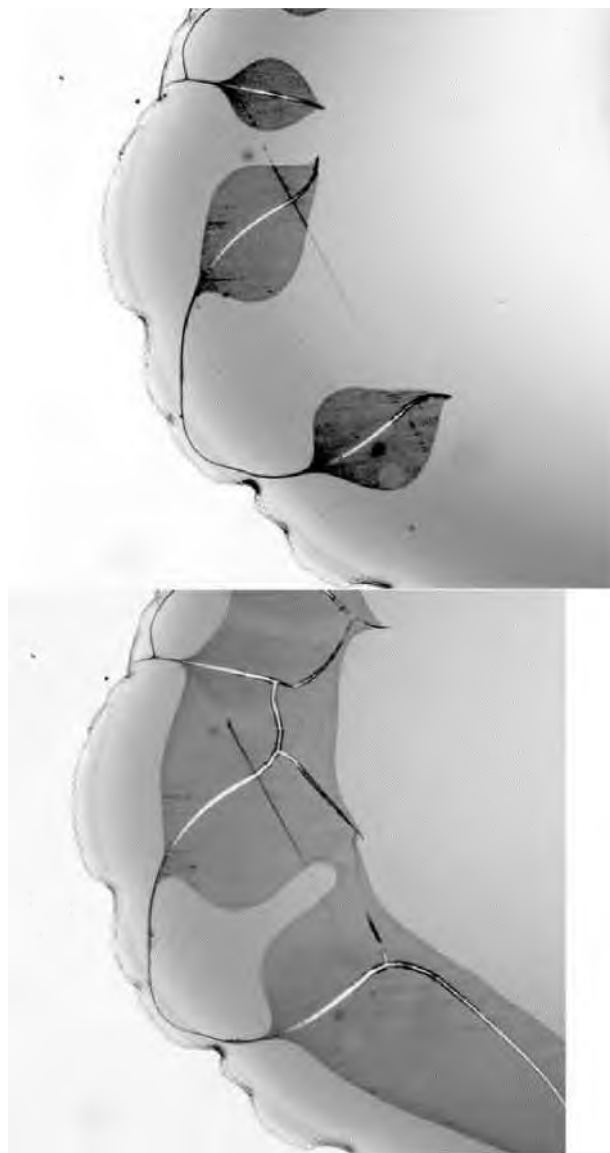


Рис. 1-57. Динамика формирования листьев. Снимки сделаны через 60 и 70 мин после начала дегидратации. Поле зрения 2 мм.

7- Образование трещин в ячейках.

Если толщина ячейки достаточно большая (больше 0,6 мм) то начинается растрескивание альбумина. Появляются дугообразные трещины вокруг ядра ячейки. Если толщина ячейки еще больше (более 0,8 мм) то образуются спиралевидные и сферические трещины вокруг ядра. При испарении воды из ячейки происходит затвердевание с верхнего края ячейки и с боков со стороны трещин. Внутренняя область ячейки более богата водой и более жидкая. При дальнейшем испарении воды внутренняя часть усыхает, и ее объем уменьшается. Так как внешняя часть затвердела и не может сжаться, то происходит отслаивание внутренней части от внешней, и образуется сферическая или кольцевая трещина. Затем внутренняя часть опять усыхает, и возникает следующая трещина, и т.д. Если структура ячейки однородна, то возникают концентрические трещины. Обычно образуется трещина в виде спирали, которая по мере сжатия внутренней части закручивается внутрь ячейки. Существуют трещины, которые закручиваются по часовой стрелке, и существуют трещины, которые закручиваются против часовой стрелки. Выделенного направления нет. Это напоминает винтовую дислокацию при росте кристаллов.

Причиной образования дугообразных трещин так же является уменьшение объема геля при испарении связанной воды. Дугообразные трещины возникают когда ячейка недостаточно толстая. Если бы не было прилипания ячейки к стеклу, то ячейка свернулась бы в виде чашки. Если раскапывать на пластик, то ячейки отскакивают и

сворачиваются в виде чашек. Если нет сворачивания, то в ячейке возникают концентрические напряжения. Эти напряжения и вызывают возникновение дугообразных трещин. Чем толще ячейка - тем более сильное напряжение возникает, и тем большее число трещин образуется. В тонких ячейках, в которых напряжение маленькое, дугообразных трещин не возникает. Количество трещин определяется не только толщиной геля, но и концентрацией белка.

Механизм образования дуговых трещин. При возрастании напряжения трещинообразование начинается в некоторой точке, точке зарождения трещины. Эта точка должна удовлетворять двум условиям: напряжение в этой точке должно быть достаточно большим, а прочность геля в этой точке должно быть достаточно малым. Как правило, такими точками максимального напряжения являются различные неоднородности и включения, имеющиеся в геле. Трещина после возникновения начинает распространяться перпендикулярно градиенту напряжения, т.е. по дуге. Когда трещина совершит один оборот, она вернется не в ту же точку, из которой она возникла, а в более близкую к центру ячейки точку. Это вызвано тем, что за один оборот трещины изменилась картина напряжений. Таким образом, получается закручивающаяся к центру спираль.

Если ячейка имеет не квадратную форму, а вытянутую, то возникают не спирали а отдельные дуги.



Рис. 1-58. Концентрические трещины в ячейке. Поле зрения 0,3 мм.

Завершение первого этапа дегидратации: -Коричневое кольцо смыкается в центре и пропадает.

-Исчезает выпуклая жидкая капля в центре высыхающей капли. -Высохшая капля принимает форму тора.

-Радиальные трещины доходят до центра и смыкаются.

Этот момент служит точкой отсчета во временной шкале, к которой привязываются другие события. Заканчивается испарение свободной воды. В дальнейшем начинает испаряться связанная вода из геля. Продолжается образование поперечных трещин. В дальнейшем все процессы происходят в направлении от

границ трещин и от верхней поверхности капли, так как они являются границей капли с внешней средой. От трещин начинается кристаллизация, так как трещины служат центрами кристаллообразования. Через поверхность трещин происходит дальнейшее испарение воды. Процессы дальнейшего загустения и кристаллизации развиваются от трещин по направлению к центру ячеек. Это процесс особенно хорошо наблюдать на нижней поверхности капли. Для этого можно использовать инвертированный микроскоп, или просто перевернуть стекло с высыхающей каплей нижней поверхностью вверх. Процесс кристаллизации от трещин удобно наблюдать в режиме темного поля.

Третий этап - затвердевание.

2.11 от 80 мин до 7 дней. Усыхание капли.

Начинается усыхание высушенной капли. Через три часа после раскапывания внешний край капли (ячейки с ядрами) затвердевают полностью. При скалывании острым скальпелем отлетают целые пластинки. Средняя и внутренняя часть капли не скалываются, а сдвигаются как пластилин. Значит в этих областях сыворотка еще находится в гелеобразном, а не твердом состоянии. Испаряется оставшаяся связанная вода. Происходит окончательное затвердевание всей капли в средней и центральной зоне. Образовавшиеся ячейки усыхают и сжимаются. Трещины, разделяющие области - расширяются. Результирующая высота сухой капли составляет одну десятую от исходной высоты капли, так как вода составляет 90% капли.

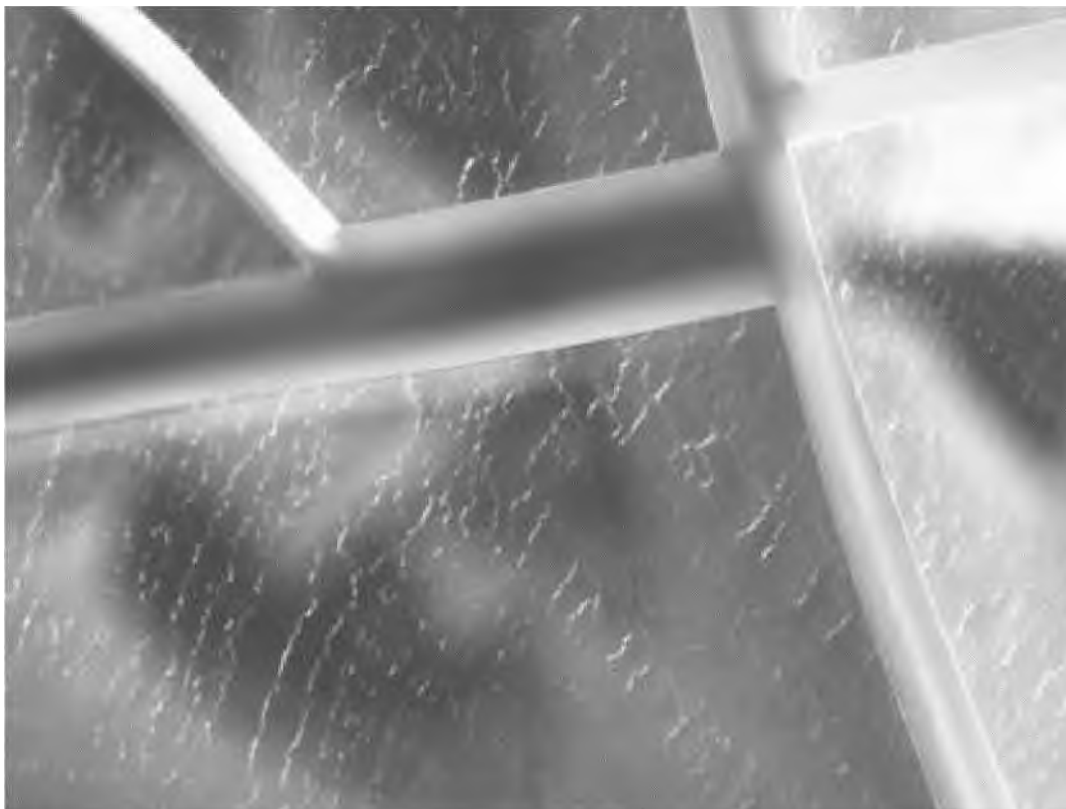


Рис. 1-59. Расхождение трещин при усыхании ячеек. Фокусировка на верхней поверхности ячеек. Боковое освещение. Поле зрения 1 мм.

2.12 от 3 до 7 дней. Кристаллизация липидов.

При перераспределении компонент сыворотки крови на начальном этапе, липиды и липопротеины оказываются сосредоточенными в основном в переходной зоне. Альбумин оттесняет липиды от края, а соли оттесняют липиды от центра. Через несколько дней после начала дегидратации начинается кристаллизация липидов в виде темно коричневого осадка. Кристаллизация липидов происходит на верхней поверхности капли. Это объясняется тем, что еще на стадии жидкой капли и геля липиды собираются на поверхности раздела жидкость-воздух. Так как липиды являются поверхностно-активными веществами, гидрофобными. В тонком слое на верхней поверхности капли имеется повышенная концентрация липидов, и в этой пленке происходит кристаллизация липидов. Липиды кристаллизуются в виде отдельных агрегатов, зерен. Имеется два типа кристаллизации:

- в виде небольших агрегатов, которые в скрещенных поляроидах видны в виде мальтийского креста, а при обычном освещении в виде прозрачных точек.
- в виде больших агрегатов, которые в поляризованном свете ярко светятся, а при обычном освещении имеют вид темных пятен.

В капле можно наблюдать коричневый осадок двух типов - светло коричневый и темно коричневый. Темно коричневый осадок, который в поляризованном свете ярко светится - образован белками (липопротеинами) и липидами. Темный осадок, который в поляризованном свете не светится - образован белками (гамма глобулинами).

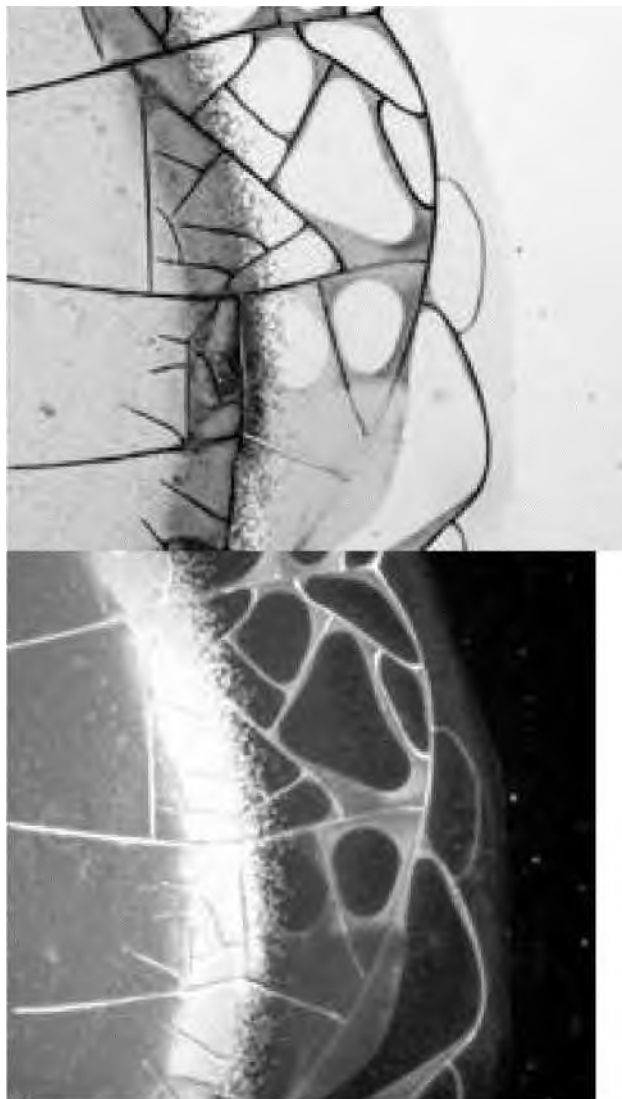


Рис. 1-60. Кольцевая зона липидов в проходящем и в поляризованном свете. Поле зрения 3 мм.

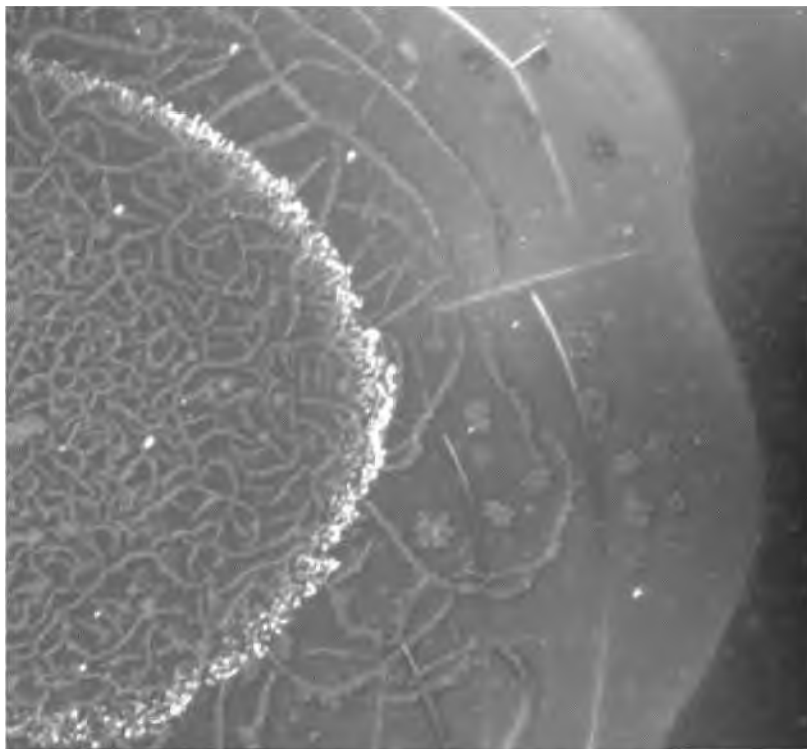


Рис. 1-61. Локализация кристаллов липидов в переходной зоне. Поляризованный свет.
Поле зрения 4 мм.

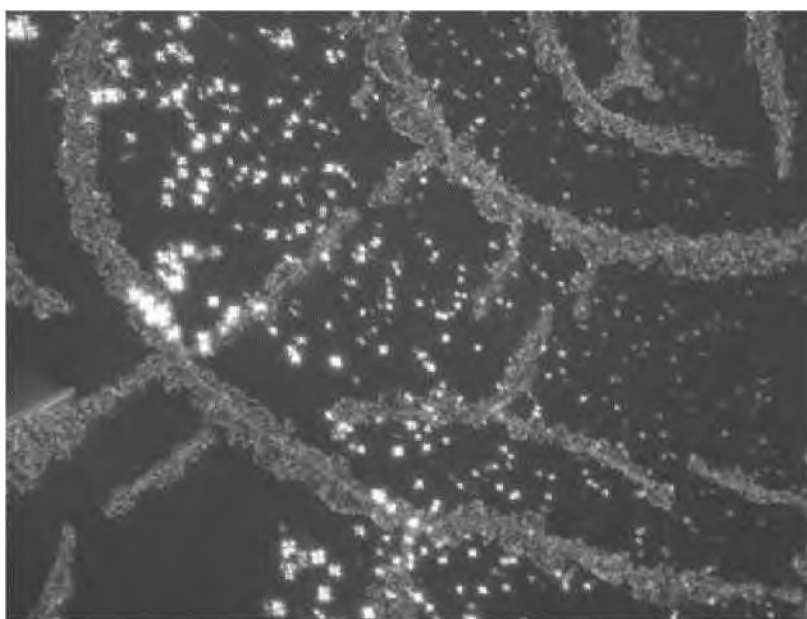


Рис. 1-62. Мелкие кристаллы липидов в поляризованном свете. Поле зрения 1 мм.

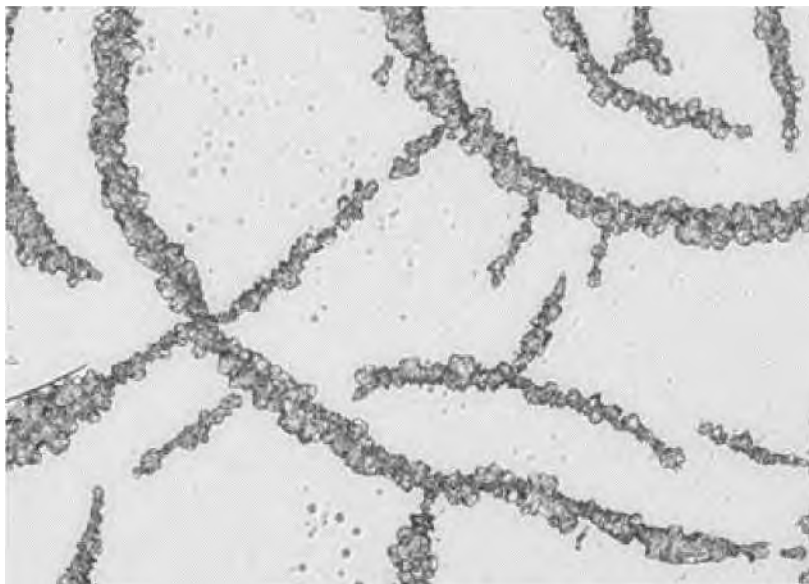


Рис. 1-63. Мелкие кристаллы липидов (точки) при обычном освещении. Кристаллы вдоль трещин - кристаллы соли. Поле зрения 1 мм.

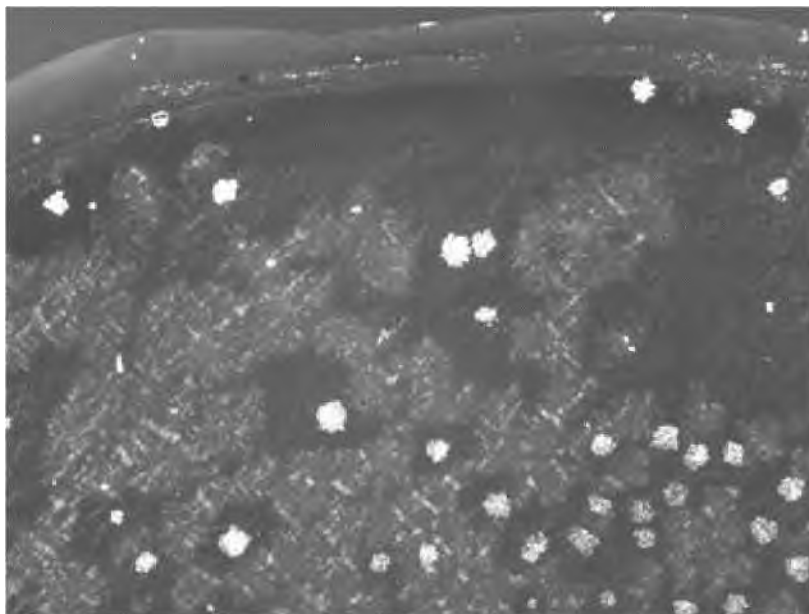


Рис. 1-64. Крупные агрегаты липидов. Поляризованный свет. Поле зрения 2 мм.

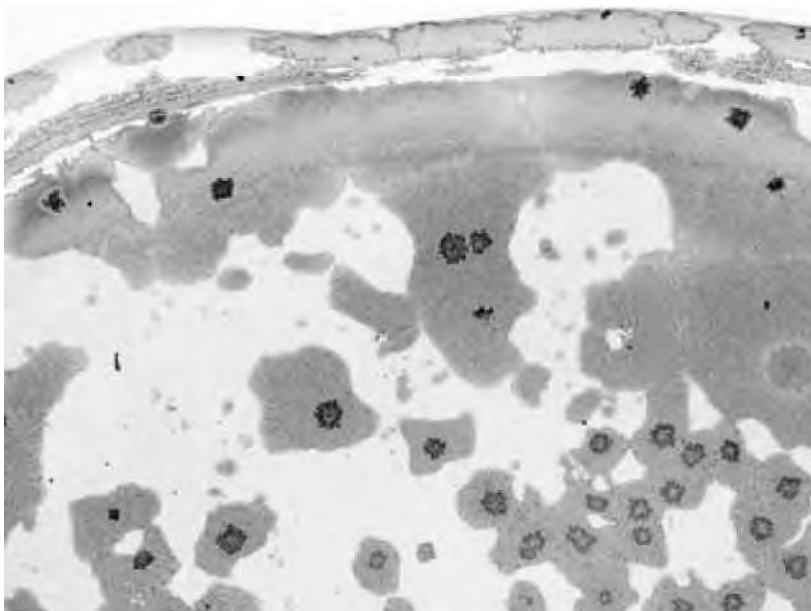


Рис.1-65. Крупные агрегаты липидов. Обычное освещение. Поле зрения 2 мм.

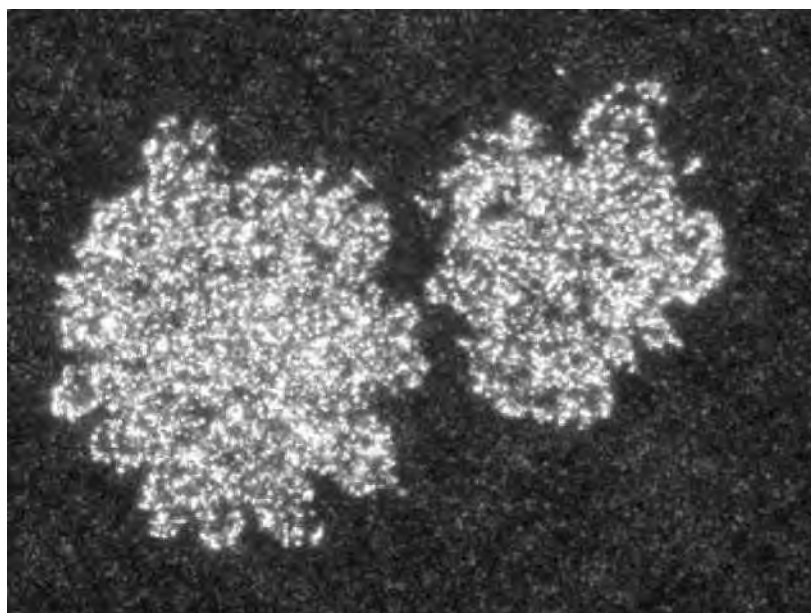


Рис. 1-66. Крупные агрегаты липидов. Поляризованный свет. Поле зрения 0,5 мм.

2.13 от 3 до 7 дней. Внешняя кристаллизация.

Внешней кристаллизацией называется кристаллизация веществ из пара на поверхности стекла вокруг высохшей капли. Встречаются различные типы кристаллов.

1-Точечные кристаллы. Это кристаллы соли.



Рис. 1-67. Кристаллы внешние - точечные. Темное поле. Поле зрения 0,7 мм.

2-Игольчатые кристаллы. Это кристаллы уратов.



Рис. 1-68. Кристаллы внешние - иглы. Темное поле. Поле зрения - 0,7 мм.

3-Нитевидныен кристаллы.



Рис. 1-69. Кристаллы внешние - нитевидные. Темное поле. Поле зрения - 1.5 мм.

2.14 от 7 дней до бесконечности. Перекристаллизация.

В течение недели завершаются все основные процессы, но процессы изменения в капле не прекращаются никогда. Происходит только замедление процессов.

Затвердевание. Через 14 дней после раскапывания не вся капля затвердевает. За две недели затвердевает только краевая зона капли. Центральная зона сохраняет форму геля. Это легко проверить с помощью тонкой иглы. При касании иглой краевой зоны образовавшиеся ячейки отскакивают как твердые пластинки. При проведении иглой по центральной зоне остается след от иглы как в пластилине.

Напряжения, отслаивание. В высохшей капле остаются сильные остаточные напряжения, сжимающие каплю. Под действием этих напряжений ячейки отслаиваются от стеклянной подложки. Если каплю высушить на целлофановой пленке, то пленка под действием напряжений в высохшей капле сморщится. Если высушить каплю на поверхности пластмассы, то после высыхания капля довольно быстро отскочит и скрутится. Это объясняется тем, что сцепление высохшей капли с пластмассой гораздо слабее, чем сцепление капли со стеклом. Если капля сохнет на стекле, то отслаивания произойдет не сразу, так как у сыворотки хорошее сцепление со стеклом. Но с течением времени все равно происходит отслаивание ячеек от стекла.

Перекристаллизация. При быстром высыхании вещества в высохшей сыворотки крови оказываются распределенными в пространственной матрице из альбуминового геля. Затем начинается процесс перекристаллизации, и из геля постепенно начинают образовываться кристаллы отдельных компонент. Так как в геле диффузия гораздо медленнее, чем в растворе, то процессы кристаллизации являются очень длительными. Процесс кристаллизации продолжается и месяц, и год.

Глава 3. Структура высохшей капли.

Определения:

Ячейка - часть высохшей капли, с четырех сторон ограниченная трещинами. Сектор

- часть высохшей капли между двумя соседними радиальными трещинами.

Ядро - центральная часть ячейки в форме круга.

3.1 Зоны.

В сухой капле можно выделить три зоны:

- 1- краевая, внешняя, периферийная (белковая зона),
- 2- переходная, средняя зона (белки, липиды, соли),
- 3- внутренняя, центральная (солевая зона).

Структура высохшей капли имеет два уровня иерархии - структура самой капли, и структура ячеек. Структура самой капли формируется на первом этапе дегидратации. Структура капли имеет строение в виде кольцевых образований и трещин. Эта структура определяется прежде всего перераспределением белка и соли в зависимости от расстояния до центра капли. Структура ячеек определяется на заключительном этапе дегидратации.

Особенно четко структура капли проявляется при раскапывании капли большого объема, например, 100 мкл.

Таблица 1-16. Характеристики различных зон в капле.

Зона	Краевая	Переходная	Центральная
Средний радиус	7 мм	5 мм	4 мм
Состав	1-Альбумин-прозрачный толстый валик 2-Агрегаты белка-осадок на дне капли	1- Альбумин-прозрачная пленка средней толщины 2-Глобулин-осадок на дне капли 3-Соль-отдельные кристаллы на поверхности и на дне	1- Альбумин-прозрачная тонкая пленка 2-Соль-сплошная корка кристаллов на поверхности капли
Форма поверхности	Выпуклый валик	Наклонная	Плоская
Структура поверхности	Гладкая	Шероховатая	Шероховатая
На просвет	Прозрачная	Светлая, мутная	Темная, мутная
Темнопольное освещение	Темная	Светлая,	Яркая светлая
Отражение	Блестящая	Матовая	Матовая
Псевдотрещины	нет	есть	есть
Кристаллы соли	нет	есть	есть
Коричневый осадок	есть	нет	нет

Таблица. 1-17. Наблюдение зон невооруженным глазом

Зона	Боковое освещение	Наблюдение на просвет
Краевая	блестящая	Прозрачная
переходная	-	Темно серая
центральная	матовая	Светло серая

1- Краевая зона. Краевая зона представляет собой выпуклый валик, расположенный на внешнем краю капли. Объем краевой зоны (высота валика и ширина валика) пропорциональна количеству белка, содержащегося в капле. Краевая зона состоит в основном из белка - альбумина. Самый край краевой зоны представляет собой узкую прозрачную полоску. Полоска прозрачна и в проходящем и в отраженном свете, и в режиме томнопольного освещения. Это означает, что полоска однородна и не содержит мелких агрегатов. В этой области очень мало трещин, так как она имеет малую высоту. Ближе к центру начинается область,

содержащая микровключения. Это область светится в отраженном свете и в режиме темнопольного освещения. Чем ближе к центру - тем выше концентрация соли в среде, и поэтому свойства среды изменяются. Краевая зона прозрачна при наблюдении в проходящем свете. При наблюдении в темнопольном режиме вся зона заполнена очень мелкими агрегатами. Иногда на верхней поверхности видны небольшие частицы, скорее всего это мелкие кристаллы соли.

Валик является высохшим гелем белка. За валиком к центру идет ровная площадка высохшего геля с малой концентрацией белка. Если переход валика в горизонтальную поверхность резкий - значит, белок сильно отделился. Если переход валика в горизонтальную поверхность плавный - значит, имеется плавный переход, и нет резкого отделения белка.

Под валиком часто имеет место выпадение коричневого осадка (белка) в ячейках. В режиме темнопольного наблюдения этот осадок виден в виде ярких белых точек на темном фоне. Это говорит о том, что белок выпал в виде агрегатов, которые сильно рассеивают свет. Таким образом, получаем, что характеристикой состояния белка являются следующие параметры: размер валика, величина коричневого осадка в светлопольном режиме наблюдения, величина яркой белой полосы в темнопольном режиме наблюдения.

2- Переходная зона. В переходной зоне при движении от края к центру уменьшается концентрация белка, и увеличивается концентрация соли. Поверхность плоская, шероховатая. Кристаллы соли расположены на верхней поверхности высохшей капли, и имеют вид агрегатов из плоских кристаллов.

Можно выделить несколько зон кристаллов соли:

- нет кристаллов в краевой зоне,
- появляются изолированные кристаллы в переходной зоне, -появляются агрегаты кристаллов в виде линий вдоль трещин в переходной зоне, -появляется сплошная корка кристаллов соли в центральной зоне.

Между краевой и центральной зоной иногда образуется кольцо. В проходящем свете кольцо выглядит коричневым с четкими внутренним и внешним краями. В темнопольном режиме кольцо ярко светится, так как состоит из большого числа мелких агрегатов, которые хорошо рассеивают свет.

3- Центральная зона. Центральная зона представляет собой сплошное поле кристаллов соли сверху над тонкой пленкой белка. Внешняя поверхность зоны - плоская, шероховатая поверхность кристаллов соли. Форма области - круглая с ломаной границей. Форма границы определяется неравномерным распределением соли при кристаллизации. На просвет центральная зона имеет темный вид, не прозрачна. На отражение центральная зона имеет яркий светлый вид, так как боковые поверхности кристаллов соли хорошо отражают свет.

Образование кристаллов соли на верхней поверхности капли начинается с центра кристаллизации, в качестве которой может быть пылинка. Затем рост осуществляется с двух сторон - сверху из пара испаряющегося раствора и снизу

за счет присоединения атомов Na и Cl из находящегося снизу пересыщенного раствора соли.

Можно определить следующие характерные морфометрические параметры капли:

R1- исходный радиус капли,
R2- радиус, при котором высота белкового валика максимальна ($h(r)=\max$, первая производная функции $h(r)=0$),
R3- радиус, при котором валик переходит в плато (первая производная функции $h(r)$ минимальна) - радиус центральной зоны,
R4- радиус изменения ориентации трещин R-трещин, при котором концентрические трещины переходят в радиальные,
R5- радиус, при котором появляются кристаллы соли на поверхности, R6- радиус, при котором кристаллы соли образуют сплошной покров, R7- внутренний радиус темного кольца выпавших белков.

Двойная фация. Иногда наблюдается структура высохшей капли как бы состоящая из двух зон - двойная фация. На просвет эта структура видна слабо. Особо четко эта структура наблюдается при косом освещении. Это связано с тем, что двойная фация - это структура рельефа, а не содержимого высохшей капли. Краевой участок имеет небольшую высоту, а затем образуется обычный валик из белка.

Определение количества белка в сыворотке крови. Чем больше белка в сыворотке крови - тем шире краевая зона. Таким образом, на основе измерения ширины краевой зоны можно определять количество белка. При понижении количества белка краевая зона уменьшается, а при повышении количества белка краевая зона увеличивается. Содержание белка определяется как отношение ширины краевой зоны к диаметру капли с некоторым постоянным коэффициентом пропорциональности. Значение коэффициента пропорциональности зависит от типа высушиваемой биожидкости и от методики дегидратации.

3.2 Структуры различного уровня.

При дегидратации капли возникают различные структуры. Можно ввести понятие - уровень структуры. Чем меньше уровень структуры - тем на более раннем этапе образовалась структура. Структуры высоких уровней при своем образовании нарушают структуру более низких уровней. Трещины более высокого уровня упираются в трещины более низкого уровня.

Образовавшиеся в высохшей капле структуры имеют следующие уровни:

- 1- й уровень - краевой валик, морщины, осадок в виде течений на дне капли,
- 2- й уровень - концентрические следы движения фронты жидкой фазы на верхней поверхности капли,
- 3- й уровень - дуговые краевые и радиальные трещины,
- 4- й уровень - поперечные трещины,
- 5- й уровень - ячейки,
- 6- й уровень - темный осадок и языковые структуры в ячейках,
- 7- й уровень - псевдотрещины,
- 8- й уровень - кристаллы соли.

Локализация структур:

Верхняя поверхность капли: кристаллы соли, кристаллы липидов,

псевдотрещины,

Нижняя поверхность капли: морщины, темный осадок в ячейках.

3.3 Типы трещин.

Большинство структурных элементов высохшей капли - это трещины. Можно сказать, что структура капли - это структура трещин. Не трещинами являются только некоторые элементы, например: осадок белка, языковые структуры, морщины и кристаллы соли на поверхности капли. Все остальное - это трещины.

Условия образования трещин. Основной причиной образования трещин является уменьшение объема геля при испарении воды. При уменьшении объема геля в геле возникают напряжения. Основными параметрами, определяющими структуру трещин, являются скорость нарастания напряжения, и скорость релаксации напряжения.

Скорость нарастания напряжения определяется скоростью испарения (сколько воды испаряется в единицу времени), и коэффициентом сжатия. Коэффициент сжатия определяет, на сколько уменьшится объем геля при испарении фиксированного объема воды. Если коэффициент сжатия равен нулю (не происходит изменения объема геля при испарении воды), то напряжений не возникает, и трещины не образуются. Если коэффициент сжатия большой, то уже при небольшом испарении воды возникают напряжения и трещины.

Скорость релаксации зависит от состояния среды. Если среда жидкая, то скорость релаксации высокая, и напряжения не образуются. Если среда твердая, то скорость релаксации равна нулю, релаксации не происходит, напряжение возрастает до критического напряжения, при котором происходит разрыв (разрушение) среды. При загустевании сыворотки скорость релаксации убывает до нуля (время релаксации напряжений возрастает до бесконечности). Скорость релаксации прежде всего определяется динамической вязкостью среды и граничными условиями. В загустевающей сыворотке напряжения возникают вследствие сжатия (усыхания) сыворотки. Если бы сыворотка была в изолированном пространстве, то она просто уменьшилась в объеме без образования трещин. Образование трещин происходит вследствие того, что сыворотка находится прикрепленной к поверхности стекла и не может сжиматься. В связи с этим возникают напряжения и растрескивание.

На начальном этапе высыхания сыворотки сыворотка является жидкой. Скорость релаксации напряжений - высокая, и больше скорости нарастания напряжений. При этом трещины не образуются. Самое интересное начинается, когда сыворотка загустевает, скорость релаксации напряжений уменьшается, а скорость нарастания напряжений растет. В некоторый момент напряжения в сыворотке не успевают релаксировать, и начинается рост напряжений в сыворотке.

Процесс разрушения среды при росте напряжений в среде определяется свойствами среды. Прежде всего отметим, что в среде возникают напряжения, стремящиеся сжать среду. Но это не внешнее сжатие, а усадка, сжатие самой среды. Рассмотрим три случая.

1- Среда жидкая или вязкая. Нет растрескивания, так как высокая скорость релаксации.

2- Среда твердая. Нет релаксации. При достижении критического значения напряжение происходит образование трещины, разрушение среды.

3- Самый интересный случай - среда гелеобразная, структурированная, например, раствор высокомолекулярных соединений. При достижении некоторого критического значения происходит образование псевдотрещин. Разрушается структура геля, но не происходит разрушения среды. Образуется трещина без

раскрытия, заполненная растворителем, стенки которой стянуты волокнами структуры сети.

Рассмотрим различные режимы образования трещин в зависимости от скорости гелеобразования и скорости высыхания (время гелеобразования и время высыхания). При проведении стандартной методики дегидратации время высыхания для разных образцов сыворотки одинаковое. А время гелеобразования зависит от состава и состояния сыворотки. Возможны три случая:

1- время гелеобразования гораздо больше времени высыхания (скорость гелеобразования маленькая) - это стандартный случай. При высыхании центральная часть капли остается жидкой, и образуются радиальные трещины.

2- время гелеобразования сравнимо с временем высыхания. В этом случае на поверхности капли образуется корочка геля. Растрескивание хаотическое.

3- время гелеобразования гораздо меньше времени высыхания (скорость гелеобразования высокая). Капля практически сразу переходит в фазу геля. Растрескивание происходит концентрическими трещинами.

Можно выделить следующие варианты растрескивания в центральной области:

- 1- Радиальные трещины, разбивают центральную область на сектора,
- 2- Прямолинейные трещины через все поле с произвольной ориентацией, разбивают центральную область на многоугольники с прямолинейными границами,
- 3- Сеть тонких трещин, которые являются продолжением основных трещин, и разбивают центральную область на многоугольники с изогнутыми границами,
- 4- Жгутовые трещины, и дугообразные псевдотрещины между ними,
- 5- Нет крупных трещин, только мелкие дугообразные псевдотрещины.

Образование трещин в центральной области определяется прежде всего толщиной белковой пленки, которая образовалась в центральной части капли.

1- Пленка очень тонкая. В этом случае трещин не образуется, так как не возникает сильных напряжений. Очень тонкая пленка образуется, если объем капли меньше 3 мкл.

2- Токая пленка. В этом случае образуются отдельные многолучевые трещины.

3- Толстая пленка. Возможны два варианта. Если соли мало, то образуются прямые трещины (радиальные или произвольной ориентации). Если соли много, то образуются загнутые (жгутовые) трещины.

Можно выделить несколько типов трещин в зависимости от условий образования.

1- Трещины типа 1 - это глобальные трещины, пересекающие всю каплю, и образовавшиеся на ранней стадии. Условия образования - образуются в толстом слое сжимающегося геля с фиксированным дном.

Они состоят из следующих групп трещин:

-аркообразные - расположены в краевой зоне,

114

-радиальные - расположены в промежуточной и центральной зоне. Являются продолжением дугообразных трещин и проходят до центра капли, формируют сектора в структуре капли.

-поперечные - образуются между радиальными трещинами. Формируют границы ячеек.

-косые- длинные трещины, которые образуются когда нет радиальных трещин (при

патологии),

2- Трещины типа 2 - дуговые, кольцевые, концентрические, спиральные - образуются в краевой зоне белкового валика, в ячейках, при растрескивании белка. Условия образования - образуются в толстом кубике геля с затвердевшими боковыми сторонами.

Для образования кольцевых трещин необходимо, чтобы толщина ячейки была больше некоторой критической величины. Дуги бывают незамкнутыми, замкнутыми (кольцевыми), спиралевидными. По мере увеличения толщины слоя белка (толщины ячейки): когда белок тонкий - нет трещин, потом образуются дуговые трещины, кольцевые, спиральные. Если толщина белка очень большая, то образуются сферические трещины, в виде вложенных сфер.

Разновидностью трещин типа 2 являются языковые трещины. Они образуются в ячейках в виде параллельных дуговых трещин при образовании языков. Языковые трещины это дуговые трещины, которые отходят от языков.

Концентрические трещины образуют шаровую отдельность, очень характерную для лав, изливающихся в море. При этом происходит быстрое охлаждение и быстрое затвердевание.

3- Трещины типа 3 - штриховые трещины - короткие трещины, которые возникают в углах ячеек, и образованы путем растрескивания краев основных трещин типа 1. Как правило, это наклонные трещины, видны не в виде линий, а в виде треугольников.

4- Трещины типа 4 - гребешковые трещины, трещины в виде лесенки. Они расположены в тонкой кольцевой зоне на самом краю капли. Образуются на самом раннем этапе. Условия образования - образуются в клиновидном слое застывшего геля.

Трещины в центральной области капли.

5- Трещины типа 5 - дендритные трещины, расположены в центральной области капли. Условия образования - образуются в тонком слое геля. Образуют разветвленный дендрит, растущий из некоторого центра.

6- Трещины типа 6 - жгутовые трещины, расположены в центральной области капли. Обычно образуют области в виде колец. Иногда являются изогнутым продолжением основных радиальных трещин. Это основные структурообразующие трещины в центральной зоне в случае, если в центральной зоне нет радиальных трещин.

Разновидность жгутовых трещин - трещины в виде рыбьей чешуи. Это большие концентрические трещины, с центром в центре капли, которые состоят из отдельных дуг. Эти трещины появляются при нарушении липидного обмена.

7- Трещины типа 7 - многолучевые трещины. Это тонкие короткие трещины в центральной зоне, часто из одной вершины выходит три трещины, или две

трещины под углом, Эти трещины появляются при эндогенной интоксикации, вызванной почечной недостаточностью.

Трехлучевые трещины образуются в центральной области при произвольном растрескивании.

8- Псевдотрещины узкие - закругленные, дугообразные узкие псевдотрещины, расположенные в центральной области капли. Условия образования - образуются в

геле, насыщенном высокомолекулярными соединениями. В области без радиальных трещин образуют розочки. Образуются под прямым углом к радиальным трещинам.

9- Псевдотрещины широкие - широкие структуры разуплотнения геля. Обычно не видны. Для визуализации необходимо внесение в сыворотку некоторого наполнителя, например, эритроцитов.

Локализация трещин:

- Гребешковые трещины - краевое кольцо,
- Дугообразные трещины - краевая зона капли,
- Радиальные трещины - промежуточная зона капли, -Псевдотрещины, розетки - центральная зона капли.

Таблица. 1-18. Типы трещин.

Тип	Название	Локализация	Образование
1	Г лобальные	Вся капля	3
2	Круговые	Ячейки	4
3	Гребешковые	Самый край капли	2
4	Псевдотрещины узкие	Центральная область	5
5	Дендритные	Центральная область	5
6	Жгутовые	Центральная область	5
7	Псевдотрещины широкие	Вся капля	1

Трещины можно разбить на два типа - первичные и вторичные. Первичные трещины образуются на начальном этапе дегидратации, и определяют структуру ячеек. Это, как правило, длинные и широкие трещины. Вторичные трещины образуются на более позднем этапе дегидратации. Они, как правило, более короткие и узкие. Часто они разбивают структуры ячеек, образованных на более ранних этапах дегидратации.

Если в сыворотке остался фибрин (не докрутили или не отстояли сыворотку крови) то растрескивания не происходит, волокна фибрина сцепляют гель и не дают растрескиваться.

Причины образования трещин:

- трещины образуются при дегидратации, при сжатии геля,
- трещины образуются при хранении - при хранении продолжается процесс дегидратации,
- трещины образуются при перепадах температуры - при перепадах температуры образуются мелкие трещины в краевой зоне. Например, если препарат внести зимой с улицы в комнату. Трещины образуются в результате неоднородностей в строении ячеек. У ячеек более жесткая поверхность и более мягкая середина.

3.4 Напряжения в высохшей капле.

При высыхании капли в ней возникают напряжения. Величина напряжения пропорциональна скорости испарения и толщине геля. Часть напряжений снимается за счет образования трещин, а часть остается. Напряженное состояние прозрачного твердого тела наблюдают с помощью поляризационного метода. В скрещенных поляроидах все поле наблюдения становится темным, а в местах напряжения наблюдаются светлые области, свечение. Интенсивность свечения пропорциональна величине напряжения. В высохшей капле основная часть напряжений сосредоточена в краевой белковой области. В этой области наиболее толстый слой альбумина, и

поэтому наиболее сильные напряжения. В основном напряжения расположены вдоль края ячеек (светлые полосы вдоль трещин). Иногда ярко светится целая ячейка. Это говорит о том, что ячейка имеет сильные напряжения и она еще не растрескалась.

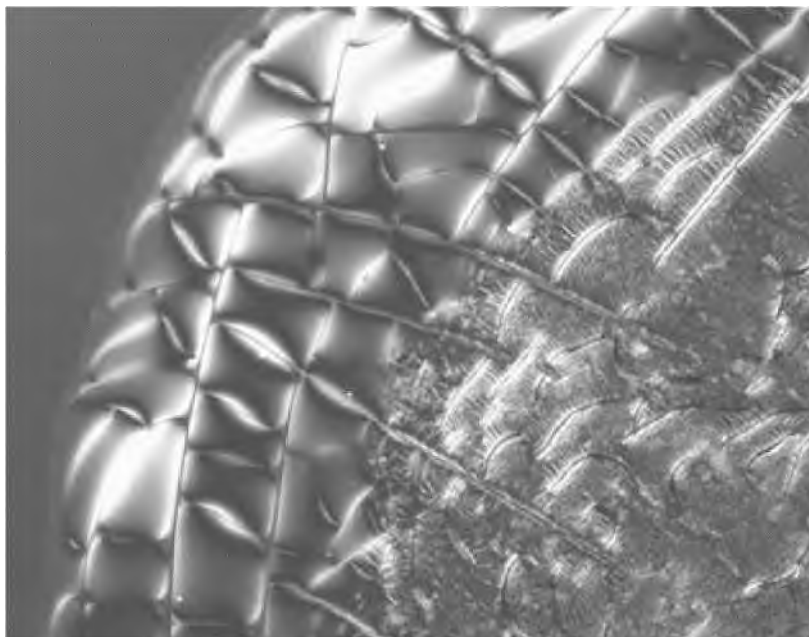


Рис. 1-70. Напряжения вдоль трещин в высушенной капле. Поляризованный свет. Поле зрения 3 мм.

3.5 Методы определения состава капли .

1- С помощью метода лазерной атомно-эмиссионной спектроскопии проводилось исследование распределения различных элементов по радиусу капли. Для этой цели в исходную каплю добавлялись некоторые соли, а затем регистрировалось распределение этих солей по радиусу. Соли с большим коэффициентом диффузии (соли CaCl) концентрируются в центральной зоне капли. Соли с малым коэффициентом диффузии (соли AlCl , MgCl) концентрируются в краевой зоне капли.

2- С помощью рентгеноспектрального микроанализа изучалось распределение различных элементов по радиусу высушенной капли мочи. Было получено, что концентрация Na в центре выше, чем на краю капли (в центре капли больше солей). Фосфора и серы больше на краю капли (за счет фосфора и серы, входящих в структуру белков).

3- С помощью ИК спектроскопии. В краевой зоне зарегистрированы сильные полосы поглощения, характерные для белков.

4- С помощью поляризационной микроскопии можно определять вещества, обладающие свойством оптической анизотропии. В переходной зоне в поляризованном свете видны ярко светящиеся агрегаты, образованные липидами.

5- С помощью флуоресцентной микроскопии. Разные компоненты сыворотки обладают разной флуоресценцией. В краевой зоне капли видна яркая флуоресценция белков.

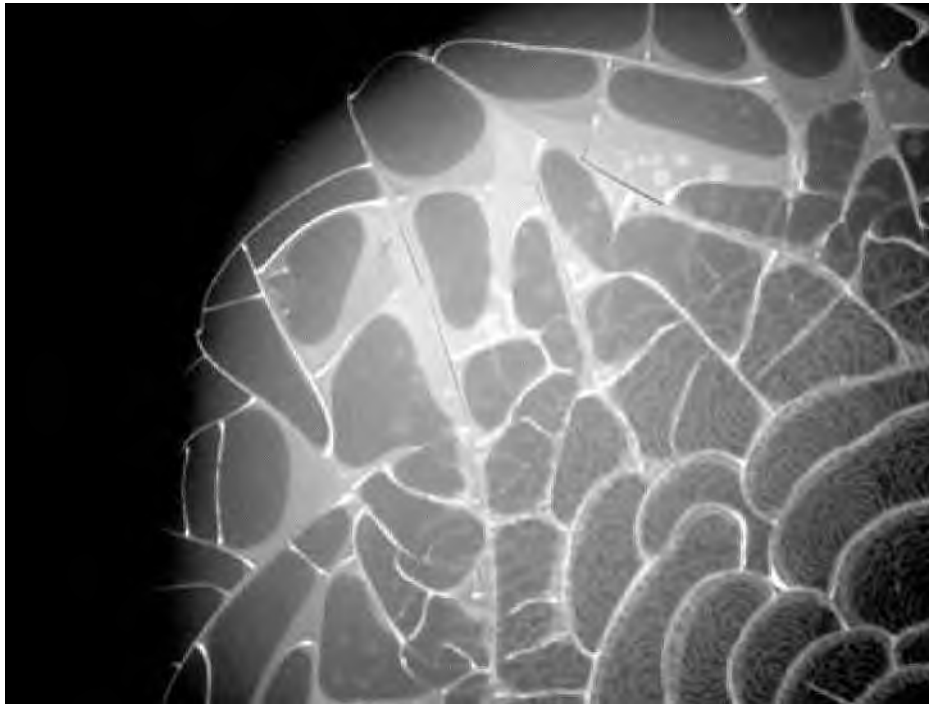
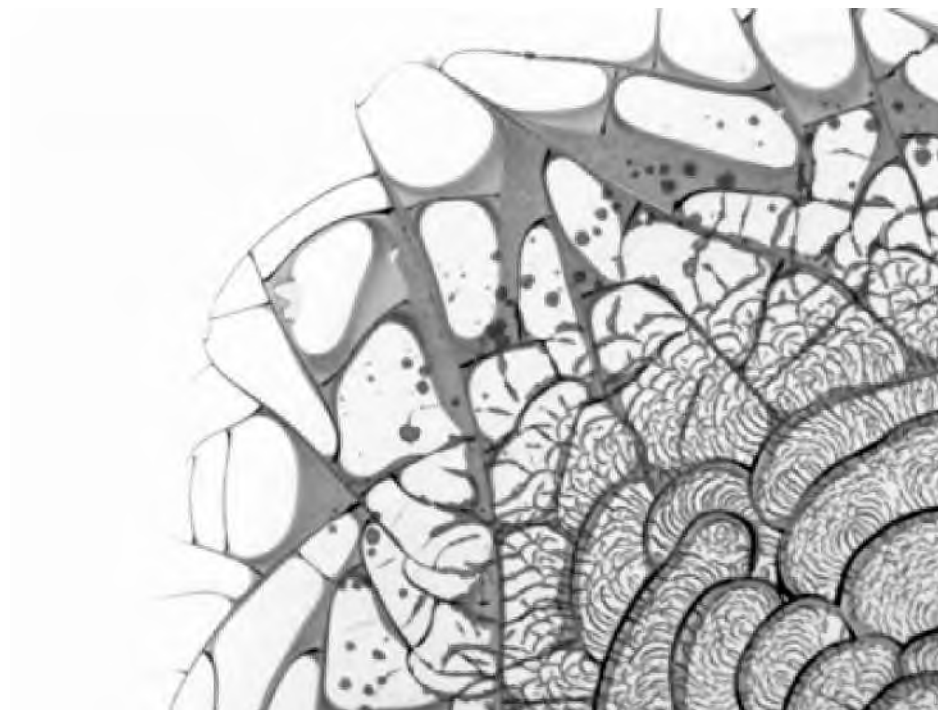


Рис. 1-71. Капля в режиме светлого поля и в режиме флуоресценции. Поле зрения 4 мм.



6- С помощью окрашивания. Добавим в сыворотку крови краситель , который окрашивает какой-то компонент сыворотки крови. Сыворотка крови окрасится равномерно, так как все компоненты в исходной сыворотке распределены

равномерно. Высушим каплю окрашенной сыворотки крови. Окажется, что в некоторых местах высушенной капли окраска будет сильнее, где больше данного компонента, или слабее, где меньше данного компонента.

Таблица 1-19. Окраски различных компонент в капле:

№	Окраска	Что красит	Краевая зона	Переходная зона	Центральная зона
1	Т олуидиновый синий	белок	+		
2	Амидо черный	глобулины		+	+
3	Альциановый голубой	иммуноглобулины			+

На основе применения метода окрашивания получается, что белки в высохшей капле располагаются в следующем порядке от края к центру: -альбумин, -альфа-глобулины - липопроотеины ЛИВИ -бета-глобулины - липопроотеины ЛИНИ -гама-глобулины - иммуноглобулины.

Иолучается, что процесс структурирования белков при дегидратации капли аналогичен процессам высаливания белков нейтральными солями.

7- С помощью растворения.

Если на высохшую каплю капнуть растворитель, который растворяет одни компоненты, и не растворяет другие, то можно выяснить локализацию компонент. Ири использовании различных растворителей наблюдается различный результат, так как растворимость различных компонент в различных растворителях различается. Ири нанесении растворителя удобно использовать каплю, которая при нанесении будет иметь диаметр, равный диаметру сухой капли. Центр капли растворителя должен находиться на краю сухой капли. Две капли наполовину перекрываются. В этом случае удобно сравнивать, что было до нанесения растворителя, и что стало после нанесения растворителя.

Таблица 1-20. Сравнение различных растворителей.

Растворитель	Альбумины	Г лобулины	Липиды	NaCl
Вода	хорошо	-	плохо	Хорошо (375 г/л)
Спирт этиловый	-		+	-
Спирт + вода	+		+	+
Спирт метиловый			+	1,4%
Эфир			хорошо	
Хлороформ			хорошо	
Бензин			хорошо	
Керосин			+	
Ацетон			+	
Глицерин	+		+	немного
NaCl	+	+	-	-

3.6 Тестовые растворы .

Для выяснения роли отдельных компонент (которые входят в состав сыворотки) в формировании структуры капли очень эффективно использовать дегидратацию тестовых растворов. При использовании метода тестовых растворов можно выделить следующие подходы:

1- использовать растворы чистых компонент в воде, и изучать структуру образовавшихся кристаллов. Это хороший способ, но он не отражает всех процессов, происходящих при кристаллизации сыворотки.

2- использовать растворы различных компонент в водном растворе альбумина. В этом случае достигается максимальное подобие тестового раствора к реальной сыворотке. Дело в том, при кристаллизации некоторого компонента из раствора альбумина образуются не отдельно кристаллы чистого вещества, а агрегаты, образованные в процессе совместной кристаллизации вещества и альбумина. Структурными элементами высохшей капли являются различные агрегаты. Агрегаты образуются в процессе высыхания капли. Агрегаты могут быть простыми и сложными. Простые агрегаты - это отдельные вещества, например, кристаллы соли. Сложные агрегаты - это комплексы из различных веществ.

3- использовать сыворотку здорового пациента, с нормальной структурой высохшей капли, и к этой сыворотке добавлять тестируемый компонент (соль, мочевины, и т.д.). После этого регистрировать изменения, которые происходят со структурой капли.

4- использовать сыворотку тех пациентов, у которых по данным биохимических анализов некоторый компонент значительно выше нормы.

Необходимо понимать, что некоторые структуры могут возникнуть из-за недостаточной степени очистки веществ (альбумина). Дело в том, что метод дегидратации очень чувствительный, и малейшее количество примесей влияет на формирование различных структур. Особо отметим, что раствор альбумина для инфузий 10%, который продается в аптеках, не может являться тестовым раствором альбумина. Дело в том, что в растворе для инфузий кроме альбумина содержится хлорид натрия (соль). Состав раствора аналогичен сыворотке. Таким образом, данный раствор является тестовым раствором соли в альбумине.

Для понимания процессов, происходящих в сложном растворе, полезно знать поведение растворов некоторых компонент при высыхании:

- 1- раствор альбумина - образуется гель, затвердевает и растрескивается.
- 2- раствор липидов (жиров) - образуется гель, но не затвердевает,
- 3- раствор глюкозы - образуется гель, но не затвердевает, 3-раствор соли NaCl - высыхает полностью, остаются кристаллы соли.

Принципиально понимание того, какие свойства растворов отвечают за образование различных структур:

- 1- при высыхании капли идеального раствора остаются мелкие кристаллы и агрегаты.
- 2- при высыхании капли коллоидного раствора образуется внешний валик.
- 3- при высыхании капли раствора высокомолекулярных соединений образуется внешний валик и происходит растрескивание.

Свойство образования внешнего валика - свойство коллоидов.

Свойство растрескивания - свойство высокомолекулярных соединений (белков).

В зависимости от концентрации частиц существует фазовый переход жидкость - гель. Фазовый переход геля зависит от формы коллоидных частиц.

- 1- Если частицы сферические (глобулярные полимеры), то существует один фазовый переход между жидким и состоянием и состоянием геля, когда частицы теряют подвижность и слипаются.
- 2- Если частицы имеют форму эллипса, то существует два фазовых перехода. -

Когда плотность частиц превышает 0,72, частицы теряют вращательную степень свободы, и происходит первый фазовый переход.

- Когда плотность частиц превышает 0,79, частицы теряют поступательную степень свободы, и происходит второй фазовый переход.

3- Если частицы имеют форму вытянутых волокон (полимер), то происходят различные фазовые переходы.

Молекула альбумина представляет собой эллипсоид вращения с большой и малой осью 14 нм и 4 нм соответственно.

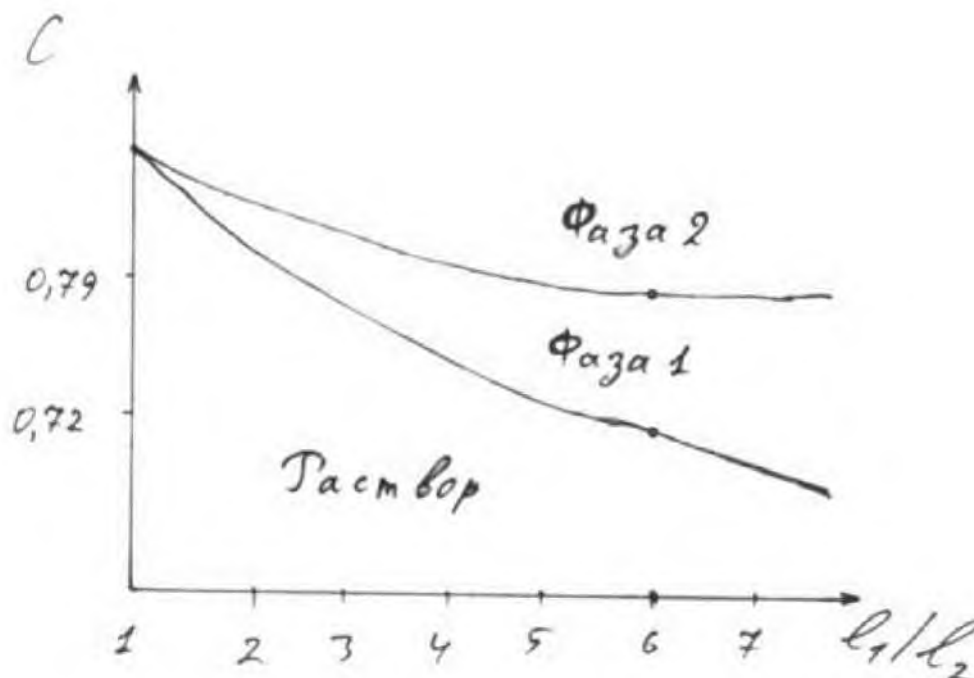


Рис. 1-70. Границы фазовых переходов для эллипсоидальных коллоидных частиц в зависимости от концентрации коллоидных частиц (C) и отношения размеров большой и малой оси эллипса (L_1/L_2).

В термотропных жидких кристаллах фазовый переход происходит при изменении температуры

0. Вода.

При испарении капли воды происходит постепенное уменьшение площади капли. Движение границы капли начинается в том месте, где наиболее слабое сцепление капли с подложкой. На краю капли остается кольцо из частичек, которые были в капле. Движение границы испаряющейся капли происходит рывками. В местах загрязнений на поверхности стекла происходит задержка движения границы. При испарении воды уменьшается краевой угол, и возрастает сила, которая стягивает каплю. Стягивающая сила уравнивается силой сцепления границы капли с поверхностью стекла. Как только сила стягивания

превышает силу сцепления, происходит отрыв границы и скачкообразное перемещение в новое положение. Чем больше величина скачка (чем больше перемещение границы), тем дольше пауза перед следующим скачком. В тех местах, в которых граница капли задерживалась на продолжительное время, происходит образование отложений частичек на границе. В результате получается система вложенных колец из выпавших частичек. На идеально гладком стекле при испарении воды капля сжимается постепенно, непрерывно, с сохранением краевого угла.

1. Альбумин. Для того чтобы понимать процессы, происходящие в сыворотке, необходимо выяснить процессы, происходящие в растворе чистого альбумина. При дегидратации раствора чистого альбумина формируется стандартная структура капли с краевым валиком и растрескиванием в виде ромашки. Значит, на перераспределение альбумина к краю капли соль не влияет.

Структуры, формируемые в капле чистого альбумина:

- краевой валик,
- структура трещин в виде ромашки. Структура ромашки образуется практически всегда (не бывает сыворотки с патологией). Если структура трещин отличается от ромашки, значит что-то не так (сыворотка с примесями, нарушены условия дегидратации).
- дуговые трещины в виде розочек в центральной части капли, -ячейки,
- образование кольцевых трещин в ячейках. В чистом альбумине образуется более тонкая и более закрученная система спиральных трещин в ядре по сравнению с сывороткой. Сыворотка более неоднородна и более вязкая, поэтому спиральные трещины получаются более грубые и короткие.

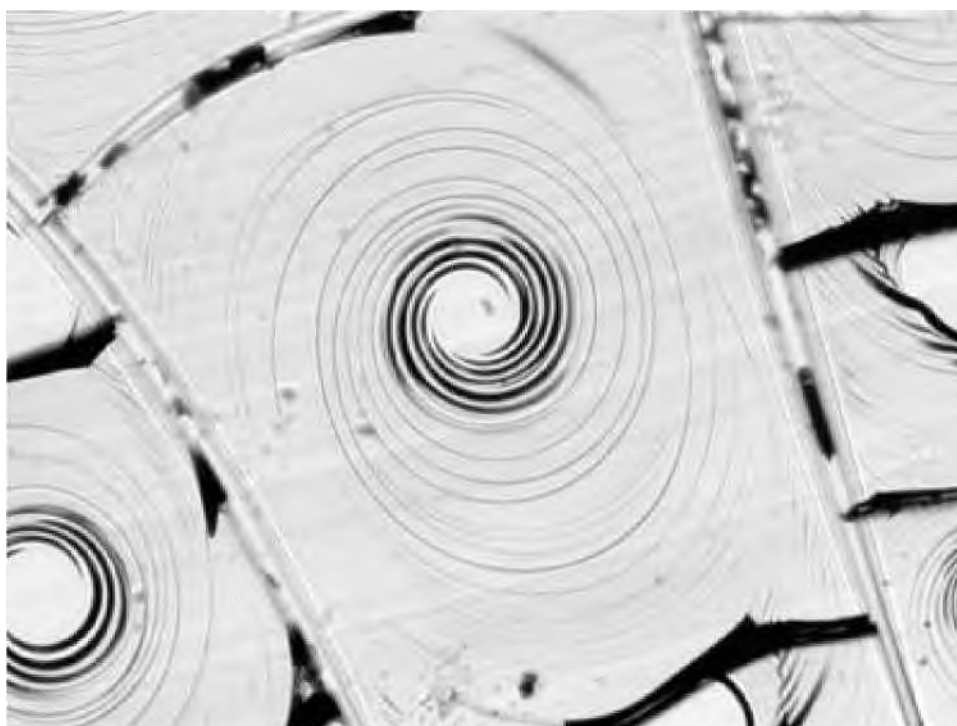


Рис. 1-71. Концентрические трещины в капле чистого альбумина. Поле зрения 1,3 мм.

Отметим, что растворы альбумина, изготовленные разными производителями, будут иметь различную структуру. Это объясняется степенью

чистоты раствора и конформационным состоянием альбумина в растворе. Структура капли альбумина будет так же зависеть от срока и условий хранения альбумина. Таким образом, с помощью дегидратации капли раствора альбумина можно контролировать его пригодность для использования в лечебных целях.

2. Соль (NaCl). При кристаллизации раствора соли по краю капли образуется кольцо из кристаллов соли. Как правило, это несколько крупных кристаллов в виде пирамиды, и много мелких кристаллов. Обычно внешнее кольцо возникает при испарении коллоидных растворов, а раствор соли - это истинный раствор. Факт возникновения кольца для раствора соли можно объяснить следующим образом. При испарении воды концентрация соли повышается. В некоторый момент концентрация достигает критического значения и начинают образовываться мелкие кристаллики

соли. Эти кристаллики имеют размеры, соответствующие размерам коллоидных частиц, и поэтому выносятся течениями на край капли, где и происходит дальнейший рост кристаллов.

На краю и в центральной части вырастает несколько крупных кристаллов соли в виде пирамид. Высота пирамид больше исходной высоты капли. Кристаллы соли хорошо смачиваются раствором. Вокруг кристаллов можно наблюдать возвышение поверхности раствора. За счет поступления новых порций раствора происходит рост кристаллов. В динамике пирамида растет из плоского кристалла, который нарастает слоями сверху.

При кристаллизации раствора соли образуются правильные кристаллы соли в виде кубиков и пирамидок. Если соли в растворе было много, то образуется сплошная корка из мелкокристаллической соли. Если соли в растворе было мало, то образуются отдельные кристаллы соли правильной формы. Если испарение происходило быстро (при высокой температуре), то образуется много мелких кристалликов соли. Если испарение происходило медленно (при низкой температуре), то образуется небольшое количество больших правильных кристаллов соли. Если кристаллизация происходит из высыхающей кали, то большие кристаллы образуются из пара, так как их высота больше высоты капли.

3. Альбумин+соль. Кристаллизация соли в тестовом растворе с альбумином в воде.

-Малая концентрация альбумина. В случае малой концентрации альбумина образуются скелетные кристаллы соли. Образованию правильных кристаллов мешает повышенная вязкость и малая диффузия. Скелетные кристаллы растут в направлении вершин, так как в этом месте существует повышенная концентрация соли за счет большего количества раствора, прилегающего к вершине. К граням кристалла прилегает меньше раствора, и там рост происходит медленнее. Скелетный кристалл соли имеет вид прямоугольного дендрита. Из центра кристаллизации расходятся четыре луча первого порядка под прямым углом. От этих лучей под прямым углом отходят лучи второго порядка.

-Высокая концентрация альбумина. В случае высокой концентрации альбумина вместо скелетного кристалла образуются дендриты. В отличие от скелетного кристалла дендриты имеют не прямые, а изогнутые лучи. Высокая концентрация альбумина препятствует образованию прямых лучей у дендритов.

При дегидратации раствора альбумина и соли появляются кристаллы в центральной зоне. Значит, кристаллы образованы солью. Не возникает коричневого осадка. Значит, коричневый осадок в ячейках скорее всего образован глобулинами. При совместной кристаллизации альбумина и соли образуются округлые агрегаты в центральной зоне. Они образуются тогда, когда не могут

образоваться чистые кристаллы соли в виде дендритов. При большой концентрации белка белковые молекулы оседают на растущем кристалле соли и блокируют его нормальный рост. Если в центральной зоне образовались дендриты, значит там была не очень высокая концентрация белка. Или кристаллы соли образовались на ранней стадии, когда испарилась не вся вода, и относительная концентрация белка была не очень высокой.

При кристаллизации соли в растворе альбумина структура кристаллов зависит от соотношения концентраций соли и альбумина.

-много соли - нет альбумина: правильные кристаллы соли, пирамидки,

-много соли - мало альбумина: правильные дендриты, скелетные кристаллы соли, -

мало соли - много альбумина: изогнутые дендриты, -нет соли - много альбумина:

нет дендритов.

При кристаллизации чистого раствора соль кристаллы образуются на внешнем кольце капли. При этом имеется несколько крупных кристаллов в виде пирамид, которые окружены небольшой сплошной пленкой из мелких кристалликов. Причины образования пирамидок. Пирамидка - это не естественная форма кристаллов соли. Естественная форма кристаллов соли - куб. Вначале образуется правильный зародыш в форме маленького кубика. Затем он растет в плоскости и получается квадратная пластинка. Так как рост осуществляется из пара, то на верхней пластинке вырастает вторая пластинка, и так далее. Получается пирамидка, которая растет и в ширину и в высоту.. Таким образом, форма пирамидки определяется условиями роста, а не кристаллической структурой. Эта форма аналогична так называемой пирамидке Менделеева, который наблюдал образование кристаллов соли в виде пирамидок на поверхности раствора соли. Однако при этом пирамидки росли вершиной вниз и по направлению от вершины к основанию.

Постепенные стадии перехода кристаллизации соли от пирамиды в дендрит при увеличении степени вязкости среды:

- пирамида,
- от углов пирамиды появляются удлинения в виде стрел, с большой высотой, сужающиеся кверху,
- высота пирамиды уменьшается, длина стрел увеличивается,
- в центре уже нет пирамиды, правильный скелетный кристалл с широкими лучами, которые идут строго под прямым углом,
- тонкий дендритный кристалл, в котором очень тонкие лучи постоянной ширины, идут под прямым углом. Это уже принципиальный переход, кристалл становится существенно плоским, пропадает трехмерная структура кристалла, нет роста в высоту.
- тонкий дендритный кристалл с загнутыми ветками.

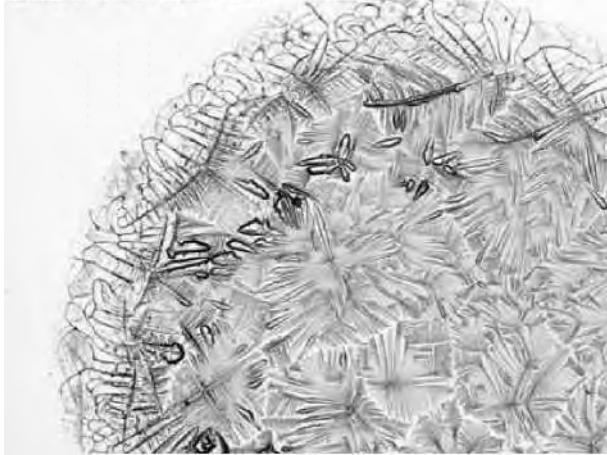


Рис. 1-72. Структура дендритов при разном соотношении концентраций соли и альбумина.

1- Кристаллизация раствора чистой соли. 2,3,4 - повышение концентрации альбумина. Поле зрения 4 мм.

Структура кристалла соли в виде тонкого дендрита имеет некоторые особенности.

- ветви тонкие и имеют постоянную ширину,
- если вязкость (концентрация) альбумина небольшая, ветви прямые,
- если вязкость (концентрация) альбумина высокая, ветви изогнутые,
- обычно существуют ветви первого, второго и третьего порядков,
- ветви образуются на дне капли, и не всегда проступают на внешней поверхности капли в виде хребтов,
- часто ветви первого и второго порядков имеют несимметричное строение, -с одной стороны ветви граница ветви резкая, и много боковых ветвей, - с другой стороны ветви граница ветви размытая, и мало боковых ветвей, -ветви, которые загибаются, имеют фрагментарную структуру, состоят из отдельных звеньев, сдвинутых друг относительно друга,
- иногда вдоль ветви происходит растрескивание,
- в краевой зоне капли раствора соли с альбумином ветви тонкие, длинные, загнутые, без ответвлений, и по ним происходит растрескивание альбумина. Так как трещины иногда пересекают ветви дендрита, значит, образование трещин происходило после образования ветвей дендрита.
- как правило, дендрит имеет центр, из которого под прямым углом расходятся четыре ветви первого порядка,
- дендрит образует некоторую выпуклую пространственную область. Область дендрита имеет следующее строение: в центре, там где проходят ветви первого порядка, находится низина (долина). Дольше к краю дендрита находится возвышение окружающего его альбумина. Таким образом, водораздел территорий дендритов проходит по гребню возвышений альбумина.

4. Белок-липид. Отличительная особенность липидных агрегатов - они обладают оптической анизотропией и видны в виде ярких объектов в поляризованном свете. Пример белок-липидных агрегатов это агрегаты, выпадающие на дно по краям формирующейся ячейки. В поляризованном свете агрегаты липидов светятся.

При дегидратации сыворотки крови, в которой много хиломикрон (так называемая хилезная кровь, которая бывает сразу после еды), то на внешнем крае выпадает очень густой темно-коричневый осадок.

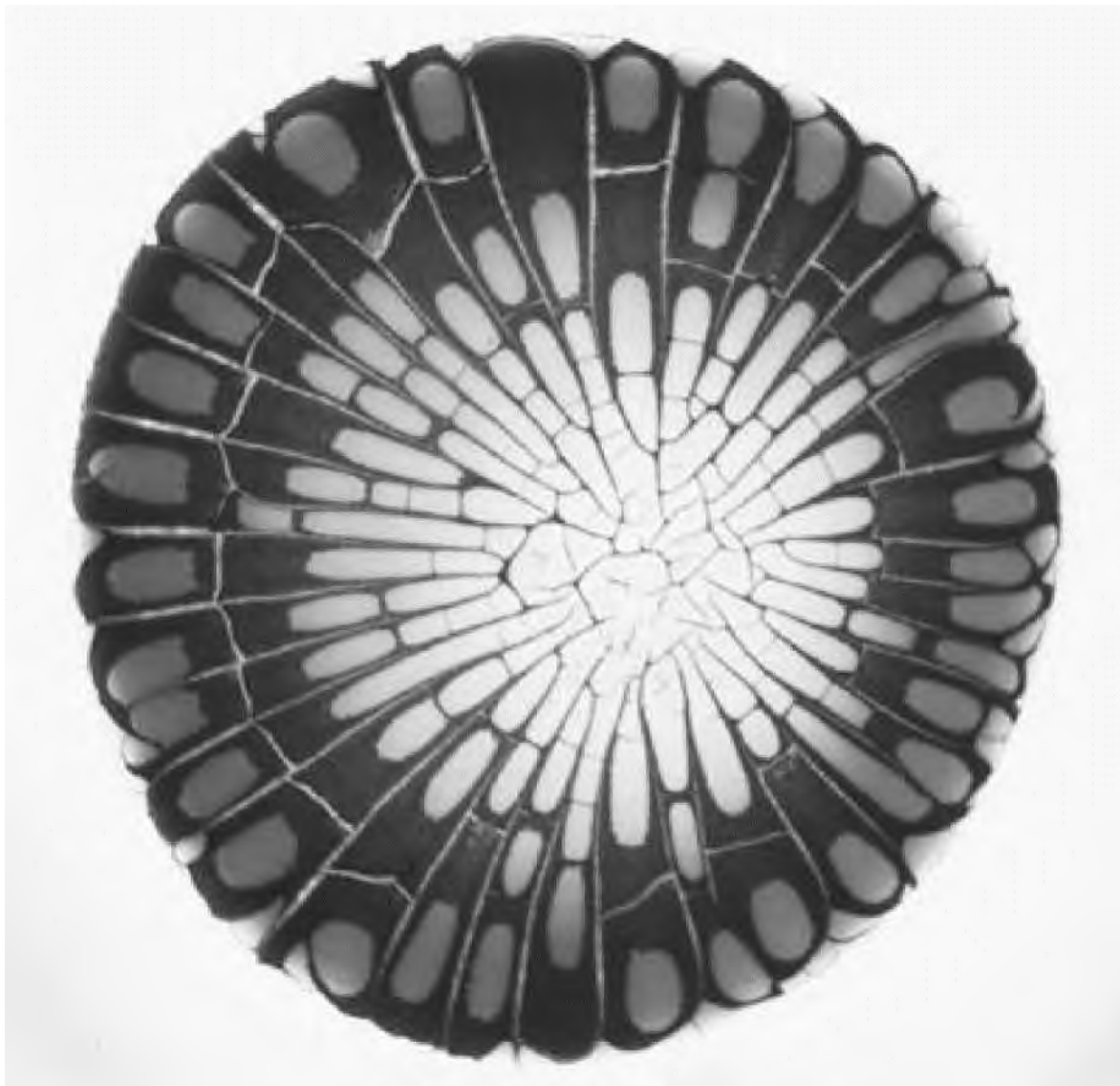


Рис. 1-73. Капля хилезной крови, в которой много хиломикрон (липидов). Поле зрения 8 мм.

5-Белок-Мочевина. Если количество мочевины повышено, и объем капли более 20 мкл, то наблюдается усиленное осаждение белка. Высохшая капля получается очень темной. В краевой зоне выпадает темно-коричневый осадок, а в центральной зоне выпадает темно-синий осадок. Это связано с тем, что мочевина вызывает денатурацию белков. При добавлении мочевины к сыворотке нарушается образование ячеек и выпадение осадка в краевой зоне.

6-Альбумин+глюкоза. При добавлении глюкозы к альбумину резко замедляется процесс испарения воды. Капля долго не затвердевает. Трещины образуются очень медленно.

Глава 4. Динамические характеристики сыворотки крови.

4.1 Устойчивость структуры сыворотки крови.

Устойчивость состояния организма можно определять путем определения устойчивости состояния капли. Проводится дегидратация исходной капли и параллельно дегидратация нескольких капель той же сыворотки крови, подвергнутой внешнему воздействию разной степени.

При изучении устойчивости объекта необходимо определить следующие

понятия:

- 1- Объект изучения.
- 2- Чем воздействовать на объект
- 3- Что понимать под устойчивостью
- 4- Параметры для оценки состояние объекта.

1- Объект изучения - сыворотка крови.

2- Воздействие. В качестве воздействия на сыворотку можно использовать:
-воздействие температурой (нагревание или охлаждение),
-воздействие электромагнитным полем разной частоты и силы, -механическое воздействие (тряска, вибрация), -акустическое воздействие (звук, ультразвук), - воздействие радиацией, -изменением pH (добавление кислот или щелочей).

3- Определение устойчивости. Существуют различные методы для определения устойчивости состояния сыворотки крови.

-Устойчивость сыворотки определяется такой величиной воздействия, при котором начинаются изменения структуры капли. Разумеется, необходимо вводить критерий - степень изменения структуры капли, и определять зависимость степени изменения структуры сыворотки от степени воздействия.

-Другой метод определения устойчивости состоит в регистрации времени, после которого структура сыворотки вернется в исходное состояние после воздействия. Чем короче время восстановления - тем устойчивее сыворотки. В норме восстановление сыворотки происходит в течение 4 часов. При отклонениях от нормы восстановление может составить 72 часа.

-Определяется время восстановления исходного состояния в зависимости от силы воздействия. Разумеется, эта зависимость является существенно нелинейной.

Очень существенным является то, что при ранней стадии заболевания вначале происходит уменьшение устойчивости сыворотки, а лишь затем происходит изменение структуры капли полученной при стандартных условиях. Таким образом, получаем, что устойчивость структур капли является очень чувствительной к отклонению состояния организма от нормы.

4- Параметры для оценки состояния капли. При оценки состояния высохшей капли (степени отклонения от нормы) существенным является выбор параметра, по которому будет производиться это отклонение. В качестве отклонения от нормы можно рассмотреть различные структурные элементы высохшей капли.

-правильность структуры трещин, степень отклонения от ромашки. В этом случае оценивается вязкость геля, которая определяется агрегационными свойствами альбумина.

128

-степень выпадения коричневого осадка. В этом случае оценивается структура гамма глобулинов.

-степень образования дендритов в центральной зоне капли. В этом случае оценивается степень взаимодействия соль-белок.

-наличие липидного кольца в переходной зоне. В этом случае оценивается нарушение структуры липидов.

Механизмы, характеризующие устойчивость состояния сыворотки. При воздействии на сыворотку происходит два основных процесса, приводящих к нарушению нормального состояния сыворотки.

1- Нарушение структуры воды.

2- Нарушение третичной или четвертичной структуры белков. Нарушение структуры белков лучше всего проявляется методом открытой капли.

3- Нарушение структуры липидов (перекисное окисление липидов).

127

Нарушение структуры липидов лучше всего проявляется методом закрытой капли.

Много исследований посвящено влиянию различных воздействий на структуру воды. Однако пока не ясно, как изменение структуры воды влияет на процессы высыхания капли сыворотки и формирование структур. Один из механизмов состоит в том, что различные воздействия вызывают образование в воде свободных радикалов. Свободные радикалы в свою очередь оказывают разрушающее действие на белковые молекулы. Таким образом, получается, что изучая реакцию сыворотки на некоторые воздействия мы можем оценить окислительно-восстановительный потенциал сыворотки, антиоксидантную устойчивость сыворотки (и всего организма).

4.2 Воздействия, нарушающие структуру сыворотки крови.

4.2.1 Воздействие высокой температурой (нагревание).

Рассмотрим температурное воздействие, определяемое двумя параметрами: температура, и время, в течение которого осуществлялось воздействие. В пространстве двух параметров (температура, время воздействия) имеется область устойчивости, в которой структура сыворотки не изменяется. Чем шире эта область - тем устойчивее состояние сыворотки крови. При высоких температурах происходит сильное разрушающее воздействие на макромолекулы, и устойчивость сыворотки уменьшается. При замораживании сыворотки (температура ниже 0 градусов) сыворотка может храниться неограниченно долго. Как показал сравнительный эксперимент сыворотка до и после замораживания имеет одинаковую структуру. При комнатной температуре сыворотка может храниться один месяц без изменения структуры. Разумеется, для получения более точной информации необходимо дополнительное проведение большого количества экспериментов.

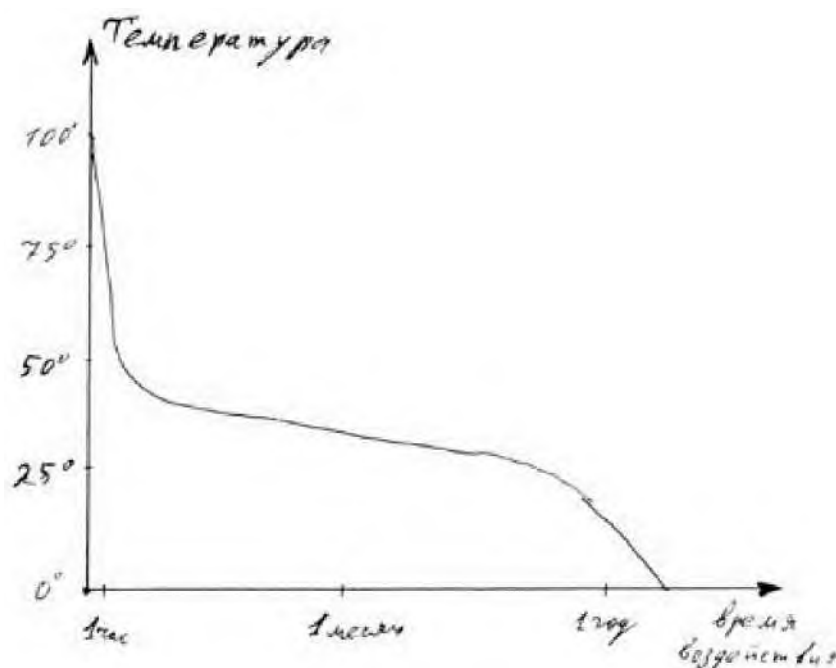


Рис. 1-74. Зона устойчивости сыворотки в переменных время-температура (зона устойчивости расположена ниже графика).

Определить всю границу области устойчивости довольно затруднительно. Для реальной диагностики, например, достаточно определить, происходит ли изменение структуры сыворотки, подвергнутой воздействию определенной температуры в течение определенного времени. Например, выдерживают сыворотку одни сутки при температуре $+5$ градусов. При этом получается так называемая суточная кровь. Сравнение структуры исходной и суточной крови является важным диагностическим параметром. Например, При поражении организма ионизирующим излучением в суточной крови появляются короткие дугообразные трещины в переходной зоне по сравнению с исходной сывороткой.

В зависимости от того, какой является структура исходной сыворотки (норма или патология) и какой является структура суточной сыворотки (норма или патология) всего существует 4 варианта - НН, НП, ПН, ШП. Разберем эти случаи.

1- НН. НП. Для любой нормальной сыворотки в какой то день произойдет ее переход в патологическое состояние. Если исходная сыворотка является нормальной, то более тонким (информативным) является следующий параметр - на какой день структура сыворотки станет патологической: НП, или ННП, или НННП, или ННННП, ... Еще более тонкий признак - зависимость степени патологии от продолжительности хранения, это уже будет монотонно возрастающая функция.

2- ПП. Если структура сыворотка патологическая, то она и будет оставаться патологической.

3- ПН. Редкий случай. Временное отклонение состояния организма от нормального при большой общей устойчивости организма.

4.2.2 Воздействие ультрафиолетовым излучением.

Ультрафиолетовое излучение вызывает следующие процессы - фотоповреждение белков, разрушение структуры белковых молекул и вызывает перекисное окисление липидов. Эти процессу существенным образом сказываются на структуре капли. Изменения структуры белков лучше всего проявляется методом открытой капли. Изменение структуры липидов лучше всего проявляется методом закрытой капли. При облучении крови ультрафиолетом наблюдается снижение общего холестерина и триглицеридов сыворотки крови.

Под действием ультрафиолетового излучения раствора белка, состоящего из мономеров, происходит образование димеров и осколков молекул. При увеличении дозы облучения в растворе появляется больше димеров, а так же появляются три- и полимерные агрегаты молекул белка.

4.2.3 Воздействие радиацией, гамма и рентгеновским излучением.

Энергия фотонов жесткого излучения настолько велика, что фотоны вызывают ионизацию и разрушение молекул. Это приводит к нарушению структуры высушенной капли.

4.3 Воздействия, нормализующие структуру сыворотки крови.

Воздействие электромагнитным полем.

Оказалось, что структура сыворотки очень чувствительна к воздействию слабых и сверхслабых электромагнитных полей. В этом случае сыворотку крови можно использовать как детектор различных слабых воздействий. Под действием электромагнитного поля изменяется структура капли - увеличивается количество радиальных трещин и ячеек.

Характер воздействия электромагнитных волн существенно зависит от характеристик электромагнитного излучения - длина волны, длительность воздействия, мощность. При различных значениях параметров может быть как положительное, так и отрицательное воздействие на сыворотку крови.

Воздействие вихревых магнитных полей.

На каплю воздействовали двумя источниками с частотами 5 и 6 килогерц. После воздействия уменьшалось поверхностное натяжение (увеличивался диаметр капли), возрастало количество радиальных трещин. Для здоровых людей сыворотка возвращалась в нормальное состояние через 4 часа.

-Воздействие электромагнитного излучения крайне высокой частоты (КВЧ) нормализует структуру сыворотки крови.

-Воздействие на сыворотку кислородно-озоновой смесью нормализует структуру капли.

-Воздействие на сыворотку крови сверхслабым акустическим полем (<10 в -12 степени Вт/см²) при несущей частоте 8 МГц с модуляцией музыкальным ритмом православного песнопения нормализует структуру сыворотки крови.

4.4 Воздействие лазером на кровь.

Много работ посвящено изучению влияния лазерного излучения на кровь. Лазерное облучение крови положительным образом сказывается на лечении многих заболеваний. При воздействии лазерного излучения на кровь наблюдается улучшение реологических показателей крови, нормализуется кислородное снабжение тканей, меньше проявляется ишемия в тканях организма, нормализуется уровень холестерина, триглицеридов, сахара, приостанавливается высвобождение различных медиаторов воспаления, повышается общий иммунитет организма. Однако, механизм действия лазерного излучения на кровь еще недостаточно изучен. Механизм воздействия лазерного излучения на кровь

складывается из двух основных компонент - воздействие на клетки крови (эритроциты, лимфоциты, тромбоциты) и воздействие на сыворотку крови. Мы рассмотрим воздействие лазерного излучения на сыворотку крови. Можно выделить несколько механизмов действия лазерного излучения на сыворотку крови.

Фотоактивация. Один из механизмов воздействия лазерного излучения на сыворотку крови - фотоактивация различных процессов. Поглощение энергии в виде фотонов вызывает переход молекул в возбужденное (активное) состояние, и инициирует различные реакции.

При воздействии лазером изменяется вязкость крови (изменение вязкости можно контролировать). Одним из основных эффектов, возникающих при лазерном облучении крови является улучшение реологических свойств крови. Это приводит к улучшению трофического обеспечения и микроциркуляции практически во всех органах и тканях. Уменьшение вязкости сыворотки крови сказывается на изменении структуры высохшей капли. Увеличивается диаметр капли (капля лучше растекается), изменяется структура ромашки, ячеек и осадка.

При воздействии лазером изменяется показатель преломления крови (изменение показателя преломления можно контролировать).

Под действием низкоинтенсивного лазерного излучения в крови происходит структурная релаксация. Структурные превращения наблюдались во всем спектральном диапазоне терапевтических лазеров. В зависимости от длины волны и интенсивности излучения может меняться амплитуда эффекта, характерное время, однако общий характер (пикообразный) этих превращений идентичен. Основным механизмом структурных превращений в биожидкостях под действием лазерного излучения связан с метастабильностью структуры. Лазер инициирует специфический переход в более стабильное структурное состояние. Тепловые источники света также способны приводить к структурной релаксации в биожидкостях, но характер и общая динамика эффекта другая. Так как релаксация в биожидкости представлена процессами гидратации и дегидратации, она инициирует ряд изменений, связанных с растворимостью веществ в биожидкостях организма, коллоидной стабильностью, компартментализацией отдельных молекулярных комплексов и обменом веществ. Физиологически НИЛИ можно рассматривать как стрессирующее оптическое воздействие, первичным актом взаимодействия с организмом которого является специфическая релаксационная реструктуризация надмолекулярных лиотропных образований в биожидкостях.

Экспериментально получают следующие параметры для оптимального воздействия лазерного излучения:

-плотность мощности - от 0,1 до 100 мвт/см² -плотности энергии - от 1,0 до 10 дж/см²

-длины волн - 337, 404, 415, 441, 500, 570, 620, 632, 680, 760, 830, 890, 1064, 1260 нм.

Зависимость воздействия лазером от мощности излучения. -При мощности меньше некоторого порога W_1 изменений не происходит. Имеются некоторые данные, что отклик системы существует и в области сверхслабых мощностей.

-При изменении мощности от W_1 до W_2 происходят колебательные изменения воздействия.

-При изменении мощности от W_2 до W_3 происходит возрастание воздействия. При оптимальной мощности W_3 все структуры переходят в активное состояние. Значение оптимальной мощности W_3 зависит от длины волны лазера.

-При изменении мощности от W_3 до W_4 дальнейших изменений не происходит, так как имеет место насыщение.

-При изменении мощности от W_4 до W_5 происходит ослабление воздействия. -При

мощности более W5 происходит разрушение объекта.

Зависимость воздействия лазером от времени воздействия.

Существует некоторое оптимальное время воздействия. При воздействии больше или меньше оптимального эффективность воздействия уменьшается.

При длительности воздействия 4 сек на кровь наблюдалось увеличение количества связанной воды в крови, а при длительности облучения 30 сек наблюдалось уменьшение количества связанной воды в крови (воздействие лазером 0,89 мкм, 0,7 Вт.).

При облучении липидных растворов изменения возрастают при длительности облучения от одной до девяти минут. При более длительном облучении изменения уменьшаются.

Низкоинтенсивное лазерное излучение нормализует сыворотку крови. Степень изменения структуры сыворотки синусоидально зависит от времени воздействия. Степень изменения носит одинаковый характер для лазеров с различными длинами волн: 632 нм (30 мВт), 660 нм (34 мВт), 880 нм (8 мВт). При облучении красным лазером мощностью 10 мВт модельных растворов выявило 15-минутную периодичность изменения структур. При облучении инфракрасным лазером мощностью 4 мВт модельных растворов выявило 10-минутную периодичность изменения структур.

Зависимость воздействия от длины волны.

Общий характер воздействия при разных длинах волн совпадает. Изменяется только величина воздействия и положение максимумов.

Примеры воздействий лазером.

Исследовали крови после курса лазеротерапии через 5 и 60 минут и 24 часа после воздействия лазером. Через 5 мин изменялась кристаллическая структура сыворотки. Через 60 мин. Структура сыворотки приближалась к исходной структуре. Через 24 часа структура сыворотки возвращалась в исходное состояние. Длительность положительного последствия наблюдалась в течение нескольких дней. Через пять сеансов лазеротерапии структура сыворотки полностью нормализовалась.

При воздействии лазером 0.89 мкм, 0,77 мВт. 20 мин, в крови увеличивалось содержание O₂ и CO₂.

При облучении лазером липидных растворов наблюдались следующие эффекты. Изменения происходили при воздействиях лазерами с различными длинами волн. В зависимости от длины волны и интенсивности лазера меняется только величина изменений, но характер зависимости не изменяется. Зависимость от времени облучения имеет один максимум. Изменения возрастают при длительности облучения от одной до девяти минут. При более длительном облучении изменения уменьшаются. В качестве регистрируемого параметра исследовалась зависимость коэффициента преломления от длительности облучения.

Показатель преломления сыворотки крови уменьшается при увеличении тяжести заболеваний.

При воздействии лазерным излучением изменяется концентрация холестерина за счет распада липопротеинов.

Можно выделить два основных метода воздействия лазером на кровь:

-in vivo - на живом организме, (влок - внутрисосудистое лазерное облучение крови

и чрескожное лазерное облучение крови) -in vitro - вне живого организма, в пробирке.

Необходимо отметить принципиальную разницу этих двух методов. При облучении крови в организме за счет кровотока время воздействия лазера на порцию крови очень кратковременно. В пробирке кровь можно облучать сколь угодно долго.

4.5 Капля сыворотки крови как детектор.

Сыворотка как детектор эффективности используемого метода лечения.

Если исследовать динамику изменения структур сыворотки в процессе лечения, то можно оценить эффективность используемого метода лечения. -если структуры деградируют - состояние больного ухудшается, лечение не эффективно, -если структуры не изменяются -состояние больного не улучшается, лечение мало эффективно, -если структуры нормализуются - состояние больного улучшается, лечение эффективно.

Сыворотка как детектор для выбора оптимального метода лечения пациента.

Эффективность различных (не всех) процедур можно заранее проверить на сыворотке крови. Некоторые воздействия (электромагнитные волны определенной частоты и интенсивности) не разрушают структуру сыворотки крови, а наоборот, нормализуют структуру сыворотки крови. При действии на сыворотку крови можно подобрать оптимальную частоту и интенсивность электромагнитного поля, и только затем переходить к воздействию на самого человека. Эксперименты можно проводить не над человеком, а над его сывороткой крови.

Капля как детектор сохранности крови.

Очень важным является возможность количественного определения степени нарушений, происходящих при хранении крови и плазмы крови для переливания. Кровь для переливания хранится в специальных пакетах, у которых имеются специальные запаянные трубочки с небольшим количеством крови. Таким образом, можно не вскрывать пакет, а использовать всего одну каплю крови из трубочки, и определить степень годности крови к переливанию.

При переливании крови очень важно знать совместимость крови донора и пациента. Совместимость двух образцов крови можно проверить путем смешивания двух капель крови от донора и пациента, и проведя стандартную методику дегидратации. Если высохшая капля имеет нормальную структуру, то кровь совместима. Дело в том, что при переливании крови в организме все равно происходит смешивание крови донора и пациента. Но процессы, происходящие при смешивании двух сложнейших коллоидных растворов - не совсем тривиальная задача.

134

Капля как детектор (датчик) токсичности.

Для определения степени токсичности некоторого раствора (среды) ее смешивают с раствором альбумина и высушивают. Регистрируется степень нарушения стандартной структуры капли чистого альбумина. Чем сильнее степень нарушений - тем токсичней раствор.

Капля как детектор для подбора (совместимости) лекарств для конкретного пациента.

Раствор проверяемого препарата смешивается с сывороткой крови того пациента, которому назначается данный препарат. Если происходят сильные изменения структуры капли, значит, препарат отрицательно действует на структуру

крови.

Один из методов исследования сыворотки крови состоит в переносе ее поля на тестовый объект, и изучение кристаллов тестового объекта. Излучение переносится с помощью специального прибора. В качестве тестового объекта служит горошина молочного сахара. Затем осуществляется кристаллизация тестового объекта в растворе медного купороса. По форме образовавшихся кристаллов диагностируют заболевания крови.

4.6 Вода - как детектор воздействия.

Сыворотка крови состоит на 90% из воды. И если некоторое воздействие оказывает влияние на воду, то это же воздействие будет оказывать влияние и на сыворотку крови. Влияние различных воздействий на воду изучается довольно активно. Рассмотрим влияние воздействий на кристаллизацию воды.

1- Японский исследователь Масау Эмото (Masaru Emoto) с 1995 г. изучает структуру кристаллов воды (снежинок) при различных воздействиях. Структура воды проявлялась в виде различных форм кристаллизации воды (снежинок). Изучалось воздействие музыки на структуру воды. Некоторые типы музыки действовали на структуру отрицательно (разрушалась структура кристаллов), а некоторые типы музыки действовали на структуру воды положительно (снежинки имели правильную форму).

2- Пациенту дают подержать в руке стакан с физиологическим раствором. Затем воду из стакана наносят на предметное стекло и высушивают. Анализируют форму образовавшихся кристаллов воды. Если форма кристаллов отличается от нормы, то диагностируют нарушение нормального состояния пациента.

3- Оценка эффективности действия гомеопатического препарата. Пациенту в одну руку дают стакан с физиологическим раствором, а в другую руку дают стакан с раствором гомеопатического препарата. Нормализации формы кристаллов свидетельствует об эффективности данного препарата для данного пациента.

4.7 Изменение свойств сыворотки при хранении.

При длительном хранении сыворотки крови происходит нарушение структурных свойств сыворотки. Скорость изменения свойств зависит от условий хранения, прежде всего от температуры, при которой хранится сыворотка. При хранении сыворотки при комнатной температуре в течение нескольких недель изменения незначительны. При длительном хранении (несколько месяцев) в сыворотке происходит полимеризация белков, в сыворотке появляются крупные сгустки, состоящие из волокон. Волокна образуются из фибрина, который имеется в сыворотке.

135

-При хранении цельной крови при комнатной температуре через несколько дней происходит гидролиз эритроцитов, гемоглобин выходит в сыворотку, и сыворотка над осевшими эритроцитами становится красной.

-При хранении сыворотки крови без эритроцитов в закрытой пробирке через несколько недель происходит полимеризация, и сыворотка загустевает.

-Можно капнуть сыворотку крови на предметное стекло с лункой и накрыть покровным стеклом. Через несколько дней по краю покровного стекла образуется кольцо высохшего белка. Сыворотка в лунке остается жидкой в течении нескольких месяцев без видимых изменений.

-При длительном хранении в сыворотке появляется большое количество микроорганизмов. Для наблюдения микроорганизмов необходимо: -капнуть сыворотку на предметное стекло и накрыть покровным стеклом, -наблюдение проводить в режиме поляризованного освещения или в режиме темного поля, -

наблюдение проводить при большом увеличении, объектив 60х или 100х. Микроорганизмы видны в виде светящихся точек или протяженных объектов, которые совершают хаотическое или направленное движение. Особо много микроорганизмов находится в фибриновом сгустке, который образуется при длительном хранении.

Если хранить сыворотку крови при комнатной температуре длительное время (1 месяц), то можно раскапать каплю через сутки хранения, через двое суток, и так далее, пока не кончится сыворотка. При этом наблюдается изменения структуры высушенной капли.

При дегидратации методом открытой капли структура капли со временем нормализуется, становится более правильной, более правильная структура трещин в виде ромашки. Например, если в первый день радиальная структура капли наблюдалась при объеме капли более 20 мкл, то через три дня капля имела радиальную структуру уже при объеме 0,5 мкл. Через три дня пропадают языковые структуры, которые были у капли в первый день.

При дегидратации методом закрытой капли первые две недели видимых изменений не происходит. Через две недели пропали сферолиты и появились иглы.

Другой режим хранения - в холодильнике хранить всю пробирку с цельной кровью. Через 7 дней начинается гемолиз эритроцитов, и плазма становится красноватой от вышедшего из эритроцитов гемоглобина. При этом плазма становится более текучей, и сильнее растекается на предметном стекле.

Изменение свойств сыворотки при замораживании.

При замораживании свойства сыворотки изменяются. Можно рассмотреть два вида замораживания -медленное замораживание (поместить сыворотку в морозильник), -быстрое замораживание (поместить пробирку с сывороткой в жидкий азот).

По предварительным данным свойства сыворотки при замораживании меняются незначительно.

Глава 5. Диагностика заболеваний по структуре высохшей капли сыворотки крови.

5.1 Преимущества диагностики методом кристаллизации капли сыворотки крови.

1. Комплексность. Преимуществом кристаллографических методов является целостность, комплексность и интегральность оценки состояния сыворотки крови. Прежде всего, оценивается общее состояние крови (организма). При этом можно оценить степень отклонения состояния от нормы.

2. Функциональность. Метод позволяет оценивать функциональное состояние компонент, а не количественное, как в биохимических методах. Например, количество альбумина может быть в норме, но молекулы альбумина могут иметь нарушенную третичную или четвертичную конфигурацию. В этом случае биохимический анализатор покажет норму, однако альбумин не может выполнять свои функции.

3. Структурность. Метод позволяет оценивать структуру сыворотки крови, а не только ее состав. Дело в том, что структурные изменения в сыворотке проявляются на более ранней стадии заболеваний, чем количественные изменения. Это позволяет выявлять заболевания на более ранней стадии.

4. Универсальность. Метод позволяет проводить диагностику большого числа заболеваний и нарушений, происходящих в организме человека.

5. Устойчивость организма. Метод позволяет оценивать не только текущее состояние организма, но и устойчивость этого состояния.

6. Оперативность. Результаты диагностики можно получить в течении одного часа.

7. Дешевизна. Для диагностики не требуется расходных материалов.

8. Доступность. Диагностику может проводить специалист со средней квалификацией. Для диагностики не требуется наличие дорогостоящего оборудования.

9. Экономичность. Для диагностики различных нарушений достаточно одной капли.

10. Безболезненность. Для пациента можно сделать процедуру диагностики более безболезненной, и брать кровь на диагностику не из вены, а из пальца. Для диагностики достаточно 20 мкл сыворотки крови. В капле крови, взятой из пальца, содержится 50 мкл сыворотки.

11. Устойчивость метода. Структура высохшей капли является довольно устойчивой при изменении условий кристаллизации (объем капли, температура, влажность, способ забора крови).

12. Скрининговые обследования. Большинство обследуемых пациентов являются здоровыми, и имеют стандартное строение высушенной капли сыворотки крови. Однако у некоторых пациентов имеются отклонения в структуре капли от нормы. В связи с тем, что метод кристаллизации является оперативным и дешевым, то данный метод можно применять для скринингового обследования всех пациентов, обратившихся в клинику. Среди всех пациентов выделять группу риска, у которых структура капли отличается от нормы. Пациентов из группы риска необходимо направлять на более детальное обследование.

13. Мониторинг состояния. Кристаллографический метод позволяет проводить мониторинг состояния пациентов как при скрининговых обследованиях так и в процессе лечения.

14. Повторяемость. Стекло с высохшей каплей может храниться очень долго. При необходимости можно в любой момент времени провести повторный анализ структуры капли, провести дополнительное исследование структуры капли, сравнить структуры капли с ранее полученными каплями от данного пациента. Возможность многократного исследования высохшей капли.

15. Перспективность метода. Метод позволяет выявлять трудно диагностируемые заболевания (например, кандидоз).

5.2 Разработка методов диагностики.

Теперь переходим к самому важному разделу - диагностика. Ради этого было необходимо привести все предварительные исследования. Изучение процессов, происходящих при дегидратации капли имеет следующую основную цель - понять, как связан состав капли сыворотки крови со структурой капли, полученной в результате дегидратации.

В данном случае имеется две задачи: прямая и обратная.

1- Прямая задача - зная состав (свойства) капли определить вид высушенной капли. Эта задача решается экспериментально. Проводятся эксперименты по высушиванию капель различного модельного состава, например, раствор чистого альбумина, альбумин и соль, соль, холестерин, мочева кислота и т.д..

2- Обратная задача - по структуре высушенной капли определить ее состав (свойства). Эта задача решается путем сравнения с модельными растворами.

Результат дегидратации, структура высушенной капли, определяется двумя параметрами - составом (свойствами) сыворотки условиями дегидратации.

Как уже описывалось ранее, меняя условия дегидратации, можно более четко выделять отдельные свойства сыворотки, усиливать проявление и выявляемость нужных диагностических признаков. Для диагностики необходимо выбирать наиболее инвариантные свойства высушенной капли. Это такие свойства, которые в минимальной степени зависят от условий дегидратации, и в максимальной степени зависят от состава сыворотки крови.

5.3 Что такое - заболевание?

В медицинской энциклопедии (1928 г.) приводится следующее определение: «Болезнь, понятие, трудно поддающееся определению. Трудность заключается, главным образом в том, что невозможно делить людей на абсолютно здоровых и абсолютно больных. Поэтому обычно даваемое определение как отклонение от нормы, будучи понятным абсолютно, по существу не выдерживает критики. Абсолютной нормы не существует. То, что является нормой в одних условиях, является ненормальным при других условиях. Не все отклонения являются болезнью.»

Иногда дают другое определение: болезнь - это состояние организма, которое наступает при нарушении соответствия между ним и окружающей его внешней средой. Однако и это определение является относительным.

Из медицинской энциклопедии (1991г.): «Болезнь, это состояние организма, характеризующееся повреждением органов и тканей в результате патогенных факторов, развертыванием защитных реакций, направленных на ликвидацию повреждений; обычно сопровождается ограничением приспособляемости организма к условиям окружающей среды и снижением или потерей трудоспособности. Заболевание - это факт возникновения болезни у отдельного человека.»

Можно выделить следующую цепь взаимосвязанных понятий:

- 1- Симптомы,
- 2- Состояние организма (заболевание),
- 3- Состав, свойства, состояние сыворотки крови,
- 4- Биохимические анализы сыворотки крови,
- 5- Структура высушенной капли сыворотки крови.

Врач прежде всего видит симптомы заболевания, которые в некоторой степени характеризуют заболевание. В результате заболевания изменяется состояние и состав сыворотки крови. Эти изменения иногда можно зарегистрировать с помощью биохимических анализов. Структура высушенной капли так же отражает состояние и состав сыворотки крови и связана со значениями биохимических анализов.

Можно дать следующее определение:

заболевание - это длительное пребывание организма в состоянии, отличающееся от нормального состояния более чем не некоторое пороговое значение. -В качестве

длительность отклонения можно ориентировочно принять два дня. -Нормальным состоянием называется среднее значение всех возможных регистрируемых параметров организма (биофизические, биохимические, различные анализы), усредненные за определенный период времени. Проводится мониторинг параметров и определяется допустимый интервал колебаний для каждого параметра.

У человека может быть не одно заболевание, а несколько. Одно и то же заболевание может давать различные осложнения. Таким образом, встает очень важный вопрос - а что же мы диагностируем. Можно, конечно, за основу классификации заболеваний взять МКБ-10. Но это не является лучшим решением. Возникает важный вопрос - что считать заболеванием. Не каждое отклонение в состоянии организма является заболеванием. Можно ввести понятие степень изменения состояния организма (степень отклонения от нормы). Состояние организма - это состояние сложной системы, которое в некотором приближении можно описать некоторой точкой в некотором многомерном пространстве состояний. Организм - динамическая система, и соответствующая точка не находится в покое, а совершает постоянное движение и описывает некоторую траекторию в пространстве состояний. Имеются суточные колебания состояния, сезонные колебания состояния. Если человек поел или понервничал, то его состояние изменится. Но через некоторое время состояние вернется в норму. В пространстве состояний можно выделить некоторую область - область нормы. Если траектория состояния находится в области нормы - то человек здоров. Если траектория состояния выходит за пределы области нормы - человек заболел. Колебания состояний происходят относительно некоторого среднего положения, которое называется нормой. Если состояние организма выходит за пределы данной области (если отклонение от нормального состояния превышает некоторое пороговое значение) - то считаем, что организм вышел из нормального состояния. Можно ввести второе значение порога, более высокое, и считать, что если отклонение превышает это значение, то состояние организма - заболевание (патология). Необходимо отметить, что с возрастом среднее состояние организма (норма) изменяется.

Состояние организма условно можно разделить на физическое состояние (состояние тела) и психическое состояние (состояние души) (спокойное состояние, состояние стресса, состояние паники, состояние страха). В дальнейшем предполагается, что психическое состояние находится в норме и речь идет только о физическом состоянии. На самом деле физическое и психическое

состояния очень тесно связаны. Причиной многих физических проблем могут быть душевные проблемы, и многие проблемы физического состояния можно решать путем управления психическим состоянием.

Некоторые считают, что состояние души может влиять на процессы кристаллизации. Например, кристаллизация воды в виде снежинки зависит от того, как к ней относились.

Состояние организма зависит от вида деятельности: сон, спокойное бодрствующее состояние, физическая нагрузка, занятие спортом, состояние голода. Состояние организма зависит от окружающей среды: в комнате, на морозе при охлаждении организма, в жаре при перегреве организма, в бане. Понятие нормальное состояние подразумевает, что организм находится в бодрствующем спокойном состоянии при нормальной комнатной температуре и влажности. Тонкость состоит в том, что состояние организма не определяется только значениями физиологических параметров. Например, если у человека высокая температура (не нормальное состояние), то можно принять лекарство и сбить температуру. Температура стала нормальной, но это не означает, что стало нормальным состояние организма.

Если имеются отклонения некоторых биохимических параметров (например, повышено содержание глюкозы), и в результате медикаментозного лечения привели содержание глюкозы в норму - это не всегда означает, что мы вылечили больного, привели его состояние в норму.

Нормальное состояние организма изменяется с возрастом. Вопрос - старость, это болезнь или нормальное состояние организма. Интересный момент исследований - как возраст пациентов отражается на состоянии высохшей капли. Конечно, когда пациент пожилой, и все системы организма работают не нормально, структура капли неправильная. Но можно ли выделить какие то признаки, которые коррелированы с возрастом? Имеется предположение, что истинный биологический возраст организма коррелирует с наличием пластинчатых структур в сыворотке крови, образованных холестерином.

Сила воздействия на организм - реакция организма.

Организм постоянно подвергается внешним воздействиям. При разной степени воздействия на организм происходит различная реакция. При очень слабом воздействии состояние организма не изменяется, нет реакции. Реакция организма не зависит линейно от силы воздействия. Иногда наблюдается сильная реакция организма на сверхслабые воздействия. Если сила воздействия превышает некоторое пороговое значение, включаются различные механизмы ответной реакции.

С понятием заболевания связаны следующие понятия:

- 1- причины заболевания,
- 2- проявление заболевания (симптомы),
- 3- диагноз, описание заболевания (что нарушено, неправильно функционирует),
- 4- локализация заболевания, какой орган функционирует не нормально, какая подсистема организма дала сбой, какой обменный процесс нарушен.
- 5- степень заболевания,
- 6- осложнения, вызванные заболеванием,
- 7- лечение заболевания,
- 8- мониторинг состояния, динамика хода лечения

1- Причина. Причина заболевания может быть одна, а может быть несколько. Как правило, заболевание наступает при стечении ряда причин, например - наличие инфекции и ослабленная иммунная система. Необходимо

восстановить всю причинно-следственную цепочку: при каких обстоятельствах возникло заболевание, что послужило причиной, какие изменения в организме произошли, какие процессы запустились, в какой стадии находятся процессы.

2- Симптомы. Симптомы - это субъективные ощущения пациента. Заболевание может протекать скрытно, без явно выраженных симптомов. Например, камни в печени могут не вызывать никаких симптомов, ни их иногда можно выявить ультразвуковыми методами диагностики, и диагностикой по сухой капле. Одно и то же заболевание может проявляться через разные симптомы. Разные заболевания могут приводить к одинаковым симптомам.

3- Диагноз. Полный диагноз - это полное описание состояния всех подсистем организма. Для каждой подсистемы необходимо указать степень отклонения от нормы. Мы все больны, но в разной степени. Нет здоровых пациентов, есть недообследованные пациенты :) Заболеваний может быть несколько, и они могут находиться в разных стадиях. Прежде чем начинать лечение, необходимо получить как можно более точный диагноз. К сожалению, существующие методы диагностики не могут обеспечить 100% достоверность диагноза. Иногда истинную причину смерти удастся выяснить только не секционном столе.

4- Локализация. При заболевании прежде всего выясняется, что заболело, какая подсистема организма функционирует неправильно.

5- Степень. Заболевание - это с одной стороны состояние, а с другой стороны это процесс. Заболевание может находиться в различных состояниях - болезненное состояние, пограничное состояние, болезнь, тяжелая форма заболевания, хроническая форма заболевания.

Стадии заболевания:

- начальная стадия, бессимптомный доклинический период,
- период клинико-анатомических проявлений, -острая стадия,
- завершающая стадия - выздоровление или хроническое заболевание.

Чтобы сказать, что не работает, необходимо по крайней мере знать, что может не работать. Огласите весь список, пожалуйста! :)

Если диагностика производится на основе анализа функционирования отдельных функциональных подсистем организма, то необходимо иметь хотя бы грубую функциональную схему организма. Например, можно выделить следующие группы заболеваний: -расстройства психики, -травмы, -отравления, -заболевания сердечно-сосудистой системы, -заболевания костей и суставов, -нарушение обменных процессов (белки, углеводы, липиды).

Врач может судить о состоянии организма по двум параметрам - симптомы и данные различных анализов. Но одни и те же симптомы могут быть вызваны различными заболеваниями. Большую роль имеет человеческий фактор, процесс интерпретации данных. Опытный врач по одним и тем же симптомам и анализам поставит более правильный диагноз. Заболевание не описывается только симптомами. Если мы устранили симптомы, это не означает, что вылечено заболевание.

В диагностике можно выделить следующие направления:

- 1- определение текущего состояния организма - это обычные методы диагностики.

Необходима разработка диагностических признаков, критериев.

141

- 2- определение динамики состояния организма - в каком направлении происходит изменение состояния. Определение динамики состояния организма определяется путем мониторинга - регулярное определение параметров состояния через определенный интервал времени. Определение динамики изменения состояния является необходимым для предсказания и предупреждения заболеваний. Это так называемая предиктивная (предсказательная) медицина. Как гласит китайская мудрость болезнь необходимо лечить за 3 года до ее возникновения, а не за 3 дня до конца. Нет возможности лечить сразу ото всех заболеваний. Необходимо определять слабые звенья в организме.

Необходима разработка прогностических признаков, критериев. Отбор группы риска при массовом обследовании пациентов.

- 3- определение устойчивости состояния организма. Устойчивость состояния организма характеризуется той степенью воздействия, которое вызывает отклонение от состояния на заданную величину. Разумеется, устойчивость - это не одно число, а набор характеристик, определяющих устойчивость отдельных подсистем организма. Знание устойчивости организма необходимо для принятия решения о необходимой силе воздействия на организм - о методе лечения. Необходимо ли лечить организм или он сам в течение определенного времени вернется в нормальное состояние. Необходимо ли применять сильное медикаментозное лечение, или достаточно просто выспаться.

Можно охарактеризовать устойчивость состояния как время, в течение которого организм вернется в нормальное состояние при некотором фиксированном воздействии (отклонении). Некоторые параметры физиологической устойчивости организма можно измерять. Например, существует динамический тест на

глюкозную нагрузку. Человеку дают усиленную дозу глюкозы, и регистрируют динамику изменения содержания глюкозы в крови. На основе анализа кривой содержания глюкозы можно сделать вывод о том, как быстро глюкоза усваивается и как быстро выводится.

Устойчивость состояния организма можно определять путем определения устойчивости состояния капли. Проводится дегидратация исходной капли и параллельно дегидратация нескольких капель той же сыворотки крови, подвергнутой внешнему воздействию разной степени.

5.4 Что такое норма.

Можно определить степень заболевания как степень отклонения от нормы. Пусть производится мониторинг состояния пациента по некоторому набору параметров. Тогда под нормой можно понимать среднее значение параметров за период, когда пациент не болел. Необходимо учитывать, что каждый из измеряемых параметров не является константой, а имеет периодический характер изменений. Существует различные циклы изменения параметров. Основными циклами изменения параметров являются суточный (изменение параметров в течении суток) и сезонный (в зависимости от времени года). Соответственно норма является не числом, а функцией, зависящей от времени суток и от времени года. Для женщин существует месячная цикличность (кристаллизация слюны). Необходимо так же отметить, что норма является индивидуальным понятием. Значение нормальных значений параметров свое для каждого пациента. Хотя, различия между нормой для разных пациентов обычно являются небольшими.

Важно количество параметров, контролирующих состояние организма. Чем больше число контролируемых параметров - тем более точно определяется состояние организма.

С помощью метода дегидратации капли сыворотки крови можно контролировать около десяти параметров (диаметр капли, правильность растрескивания, ширину белкового валика, наличие морщин, наличие языков, ...). Эти параметры отражают состав и состояние крови, которые в свою очередь отражают состояние организма. Для диагностики состояния организма необходимо определить понятие норма в пространстве этих параметров. При мониторинге состояния пациента производится измерение степени отклонения измеряемых параметров от нормы.

5.5 Изучение динамики состояния пациента.

Значение биохимических показателей являются индивидуальными. Предположим, что в течении нескольких лет какой то биохимический параметр принимал одно значение (с учетом колебаний и точности измерений), а потом при очередном обследовании этот параметр стал принимать другое значение. Это означает, что в организме произошли какие-то изменения. Если раньше он был здоров, то скорее всего заболел, даже если оба значения старое и новое находятся в диапазоне нормальных значений.

При постоянном мониторинге, контроле за состоянием здоровья в особых случаях изменение параметров свидетельствует о изменении состояния организма. Мониторинг можно проводить путем анализа структуры капли. Если при очередном обследовании произошло изменение структуры капли, значит, произошли изменения в организме.

Изменение структуры капли позволяет судить о ходе лечения пациента, насколько его состояние приближается к норме. Можно судить об эффективности препаратов. Если назначили какой-то препарат, а изменений не происходит, то возможно препарат не эффективен для данного пациента.

5.6 Установление взаимосвязи: от биохимии - к структуре капли.

Проводится изготовление препаратов по фиксированной методике, и к каждому препарату прикладываются данные биохимических анализов. Затем полученное множество препаратов разбивается на группы. В первую группу отбираются препараты, у которых все показатели в норме. Это условно здоровые пациенты. Оставшиеся препараты разделяются на группы в соответствии с тем, какой биохимический параметр не соответствует норме. По каждому параметру группа препаратов разбивается на две подгруппы - в одной группе препаратов параметр меньше нормы, в другой группе параметр превышает норму.

Можно выделить следующие биохимические параметры, по которым идет группировка препаратов:

- 1- Общий холестерин,
- 2- липопротеиды низкой плотности,
- 3- липопротеиды высокой плотности,
- 4- триглицериды,
- 5- белок общий,
- 6- глюкоза,
- 7- мочевая кислота,
- 8- мочевины,
- 9- билирубин общий,
- 10- креатинин,

Когда в каждой группе наберется достаточное количество препаратов (более 100), происходит поиск закономерностей. Необходимо выделить такие

143

признаки и структурные элементы в высушенных каплях, которые с одной стороны присутствуют для одних веществ, а с другой стороны отсутствуют для других веществ.

Для решения данной задачи используется следующий метод. Выделяется 20 структурных элементов, описывающих структуру высушенной капли.

В качестве примера можно рассмотреть следующие признаки:

1-для открытой капли: степень выраженности ромашки, количество радиальных трещин, количество не радиальных трещин, наличие трещин в виде лесенок, количество секторов, количество ячеек, наличие морщин, наличие ковров Серпинского, наличие кристаллов соли в центральной части,...

2-для закрытой капли: количество кристаллов виде игл, количество крупных сферолитов, количество мелких сферолитов, количество нитевидных структур, площадь фазы 1, площадь фазы 2, наличие прямоугольных кристаллов,.

Строится таблица, в которой число строк соответствует количеству веществ, и число столбцов соответствует количеству признаков. Для каждого вещества подбирается ориентировочно 100 препаратов, у которых содержание данного вещества выше нормы, а содержание остальных веществ в норме. Для каждого препарата вычисляется степень наличия для каждого признака. Все значения признаков нормированы: 0 - нет признака, 1 - максимальное значение признака. Вычисляются значения таблицы F_{ij} - среднее значение признака j для препаратов, в которых превышено значение вещества i .

Затем для каждого вещества i величины F_{ij} упорядочиваются по убыванию, и получаем значения информативности признаков для диагностики данного вещества. Выбираем несколько наиболее информативных признаков и используем их для диагностики количества данного вещества в сыворотке крови.

Часто по данным биохимических анализов за пределами нормы находится не один, а несколько параметров. Ориентировочно, из 1000 анализов: 600 - норма, 200 - 1 параметр не норма, 100 - 2 параметра не норма, 60 - 3 параметра не норма, 40 -

142

более трех параметров не норма. Случаи, когда вне нормы имеется несколько параметров, рассматриваются отдельно.

Например, содержание белка в крови очень сильно связано со структурой капли. Чем больше альбумина - тем более правильная структура трещин в виде ромашки. Например, если альбумина меньше 43 г/моль - то ромашки нет. Если альбумина больше 43 г/моль - то ромашка есть.

5.7 Установление взаимосвязи: от диагноза - к структуре капли.

Задача поиска взаимосвязи решается путем группировки препаратов в соответствии с диагнозом заболевания.

Затем среди препаратов, соответствующих одному заболеванию, выделяются структурные элементы капли, которые имеются в данной группе, и отсутствуют в других группах. Данный структурный элемент будет служить диагностическим признаком данного заболевания. Трудность данного подхода состоит в том, что количество различных заболеваний достаточно велико. В соответствии с МКБ-10 их несколько тысяч. Выход из положения состоит в том, что выбирается ограниченное число наиболее распространенных заболеваний, и работа осуществляется только по ним. Например, атеросклероз, диабет, ишемическая болезнь сердца,. (Однако необходимо иметь в виду, что иногда диагноз не соответствует истинному заболеванию.)

Метод решения задачи.

-Формируем список из наиболее важных диагностируемых заболеваний. Например: ИБС (ишемическая болезнь сердца), атеросклероз, интоксикация, воспаление, простудное заболевание, опухоль,

-Формируем список структурных элементов капли, признаков на основе которых будет производиться диагностика.

Строится таблица, в которой число строк соответствует количеству заболеваний, и число столбцов соответствует количеству признаков. Для каждого заболевания подбирается ориентировочно 100 препаратов, у которых диагностировано данное заболевание, и других заболеваний нет.. Для каждого препарата вычисляется степень наличия для каждого признака. Все значения признаков нормированы: 0 - нет признака, 1 - максимальное значение признака. Вычисляются значения таблицы F_{ij} - среднее значение признака j для препаратов, в которых диагностировано заболевание i .

Затем для каждого вещества i величины F_{ij} упорядочиваются по убыванию, и получаем значения информативности признаков для диагностики данного заболевания. Выбираем несколько наиболее информативных признаков и используем их для диагностики данного заболевания.

5.8 Установление взаимосвязи: от структуры капли - к диагнозу.

Структура высушенной капли крови отражает состав сыворотки крови, который в свою очередь отражает состояние организма (заболевание). Структура капли определяется составом и состоянием сыворотки крови. Любое заболевание и отклонение в состоянии организма мы выявляем только через изменения в сыворотке, связанные с этим заболеванием. В структуре высушенной капли сыворотки крови мы видим не заболевание, а проявление патологических процессов в виде изменения физико-химических свойств сыворотки крови. Более точно - видим изменение состояния надмолекулярных структур сыворотки крови.

Взаимосвязь понятий: состав и состояние сыворотки крови. Можно предположить, что строение высушенной капли определяется не только составом сыворотки крови, но и ее состоянием. При этом под состояние сыворотки крови понимается не только ее состав, но и другие характеристики и свойства. Например,

вода может находиться в различных состояниях, хотя химически это одна и та же вода, но имеющая различное пространственное расположение молекул. В понятие состояния сыворотки можно включать энергетическое состояние. Некоторые считают, что кроме химического состава структура высушенной капли определяется еще энергетическим состоянием сыворотки крови. Энергетическое состояние сыворотки отражает общее состояние организма. Энергетическое состояние никак не регистрируется биохимическими методами.

На самом деле решается сложная задача - не просто определить состав сыворотки, а поставить диагноз, оценить состояние организма и функционирование отдельных подсистем организма. Эти задачи похожи, но не совпадают. Много различных соотношений в составе сыворотки могут соответствовать нормальному состоянию организма. Одна и та же форма и структура капли может соответствовать различным заболеваниям. Одно и то же заболевание может проявляться в различных формах и структурах капли.

Это не означает, что вообще нет никакой взаимосвязи между типом заболевания и структурой капли. Это только означает, что язык структуры капли состоит не из тех терминов, которыми пользуется врач при постановке заболевания, а соответствует некоторым другим понятиям.

Например, при атеросклерозе возникают ковы Серпинского. Однако это не означает, что ковы Серпинского являются диагностическим признаком атеросклероза. Ковы Серпинского являются диагностическим признаком процессов воспаления, которые имеют место при атеросклерозе.

Вопрос в том, какие состояния организма отражаются в состоянии высушенной капли. Для диагностики по высушенной капле, как и для каждого метода диагностики, существуют свои плюсы и минусы. Например, методом высушенной капли можно диагностировать микозы, которые биохимическими методами диагностировать очень сложно.

Например, если произошла травма, то изменится структура капли. Но причиной изменения состава крови станет не сама травма, а ответная реакция организма на травму. С помощью анализа структуры капли можно судить о состоянии обменных процессов в организме:

-состояние белкового обмена,

-состояние липидного обмена, -состояние углеводного обмена.

Например, можно судить о гиперхолестеринемии - повышенном содержании холестерина. Можно судить о гиперурикемии - повышенном содержании мочевой кислоты. С одной стороны, регистрируя гиперурикемию, можно разбираться с причинами (богатая пуринами пища или внутренние нарушения). С другой стороны можно прогнозировать развитие мочекаменной болезни, если это состояние сохраняется в течении длительного периода времени.

Для исследования препараты делаются от всех пациентов (больных и здоровых), которые сдают кровь из вены. Затем все полученные препараты раскладываются на группы в соответствии с наличием сходных структурных элементов. В одну группу объединяются препараты, на которых капли выглядят похожим образом, или имеют сходные особенности. Затем выясняется из истории болезни, чем болеет основная группа пациентов с одинаковым структурным элементом, и этот признак считается диагностическим для данного заболевания.

Преимущества этого пути - выявляются все заболевания, о которых можно судить по структуре капли. Недостаток - отсутствие полного математического описания всех структурных элементов высушенной капли, по которым можно проводить диагностику.

Тем более, пока не существует деления структурных элементов на две группы, которые характеризуют свойства капли и условия дегидратации соответственно.

Дальнейшее развитие метода состоит в том, что на основе анализа большого количества препаратов формируется как можно более полный список признаков (структурных элементов, особенностей), которые встречаются в высушенных каплях сыворотки крови. Эти признаки можно рассматривать как буквы некоторого алфавита, или слова некоторого языка, на котором описывается капля.

Большинство признаков являются качественными, с нормированными значениями от 0 до 1. Например - признак «структура трещин имеет вид ромашки» может принимать два значения (0- нет ромашки, 1- есть ромашка), ибо промежуточное значение между 0 и 1 как степень похожести вида трещин на ромашку.

При анализе препаратов для каждого препарата вычисляются значения всех N найденных признаков. Каждый препарат в этом случае отображается точкой в N-мерном пространстве. В этом пространстве определяется метрика (мера сходства между препаратами). Затем стандартными методами кластерного анализа (методами таксономии) выделяются группы сходных препаратов.

Для каждой найденной группы препаратов выписывают диагнозы заболеваний для соответствующих пациентов. Выбирают наиболее часто

Создается 100 препаратов здоровых людей, и 100 препаратов людей с каким то заболеванием ААА. Обнаруживается, что какой-то признак ССС отсутствует у здоровых людей и присутствует у больных людей. На основе этого делается вывод, что признак ССС является диагностическим для заболевания ААА. И если на препарате обнаруживается признак ССС, то ставится диагноз - заболевание ААА.

Ошибка состоит в том, что велика вероятность того, что существует другое заболевание ВВВ, которое так же вызывает появление признака ССС. Следовательно, на основании появления признака ССС можно говорить лишь о том, что может быть имеется заболевание ААА, а может быть имеется другое заболевание.

5.9 Диагностические маркеры.

На основе анализа морфологии высушенной капли можно производить диагностику различных заболеваний. Морфология капли описывается наличием или отсутствием различных структурных элементов высушенной капли - диагностических маркеров. Структурные элементы оставляют алфавит, или язык, на котором капля рассказывает о состоянии организма.

Таблица 1-21. Структурные элементы в высохшей капле сыворотки крови.

Зоны: 1- краевая зона, 2- переходная зона, 3-центральная зона.

Маркеры заболеваний	Описание	Зона 1	Зона 2	Зона 3	Причины возникновения	Связь с заболеваниями
0-Общее строение фации						
Двойная фация		+				Эндогенная интоксикация
Ширина зон	1-Белковая (краевая) зона 2- Переходная зона 3-Солевая (центральная) зона	+	+	+	Ширина краевой зоны пропорциональна концентрации белка	
Усиленная пигментация						Процессы распада
1-Трещины						
Общая структура фации, структура трещин	1- Радиальная (преобладают радиальные трещины) 2- Иррадиальная (много косых трещин) 3-Циркулярная (преобладают циркулярные трещины)	+	+	+	Анизотропия возникает в результате различного соотношения скорости испарения и скорости гелеобразования	В норме- радиальные трещины. При наличии отклонений от нормы, увеличивается доля нерадиальных

						трещин.
Гребешковые структуры	Линейная трещина с отходящими с одной стороны мелкими трещинами	+			Растрескивание	
Трещины «серебра»	Ряд мелких радиальных трещин на краю ячеек	+			Растрескивание	Нарушение эластичности сосудов, гипертоническая болезнь
Жгутовые трещины				+		Хроническая гипоксия и ишемия
Трехлучевые трещины				+		Застойные явления в головном мозге
Штриховые трещины		+	+			Нарушение микроциркуляции мозга
Косые трещины		+				
Широкие трещины		+			Высокое содержание белков большой молекулярной массы	Склероз
Тупиковые трещины						
2-Структуры						
Листья	Растрескивание (осадок) вдоль радиальных трещин 0-отсутствие 1-слабые (видны в темном поле) 2-сильные (видны в светлом поле)	+				Склеротическое поражение кровеносных сосудов
Бляшки	Округлые образования	+			Наличие продуктов интоксикации	Эндогенная интоксикация
Складки морщины -		+			Наличие белково-аминокислотных агрегатов	Прием белковой пищи
Языковые структуры (Ковры Серпинского, языки Арнольда)			+			Воспаление
Мицелии	Агрегаты, нити (в поляризованном свете)	+	+	+	Мицелии гриба Candida	Кандидоз
					находятся в сыворотке крови	

Дендриты, кристаллы				+		Кристаллы NaCl
Пигментация вокруг ядра ячейки						Желчекаменная болезнь

Считается, что в норме структура трещин капли имеет радиальное строение. Чем сильнее отклонения от радиального строения - тем сильнее нарушения в организме. При этом обычно капля имеет симметричное строение. Однако, встречаются случаи, когда капля имеет асимметричное строение - половина капли имеет вид ромашки (что соответствует норме), а на второй половине капли полностью отсутствует радиальное строение (что говорит о патологии).

Компоненты сыворотки крови:

- Хлорид натрия (соль) - дендриты, пластины.
- Холестерин - сферолиты.
- Эфиры холестерина - капли, мальтийский крест в скрещенных поляроидах, -Триглицериды - ветвистые дендриты.
- Фосфолипиды (лецитин) - аморфные скопления, капли с мальтийским крестом. -Мочевая кислота, моноурат натрия - иглы.

Диагностические маркеры, определяемые разными авторами.

- 1- Морщины, бляшки - интоксикация (Шатохина),
- 2- Языки Арнольда и ковы Серпинского - воспалительные процессы (Шатохина),
- 3- Листья - склеротические повреждения кровеносных сосудов (Шатохина),
- 4- Двойная фация - хроническая интоксикация (Шатохина),

Структуры трещин:

- 1- Отсутствие радиальных трещин - патология (Шатохина),
- 2- Гребешковые структуры - при спазмах сосудов, гипертоническая болезнь, нарушение микроциркуляции (Шатохина), атеросклероз, хроническая ишемическая болезнь сердца (Савина),
- 3- Дуговые трещины - нарушение эластичности сосудов (трещины «серебра»- Шатохина)
- 4- Жгутовые трещины - гипоксические и ишемические процессы в тканях (Шатохина),
- 5- Трехлучевые трещины - застойные явления (Шатохина), эндогенная интоксикация (Обухова),
- 6- Трещины «рыбья чешуя» - нарушения липидного обмена (Обухова).

5.10 Примеры диагностики различных заболеваний.

1. Диагностика микозов, кандидоз (candida). При наблюдении в поляризованном свете при кандидозе в капле видно свечение аморфных образований, которые являются спорами или мицелием грибов Candida. Аморфные образования могут быть локализованы в любой зоне капли. Наиболее вероятная локализация - переходная зона.

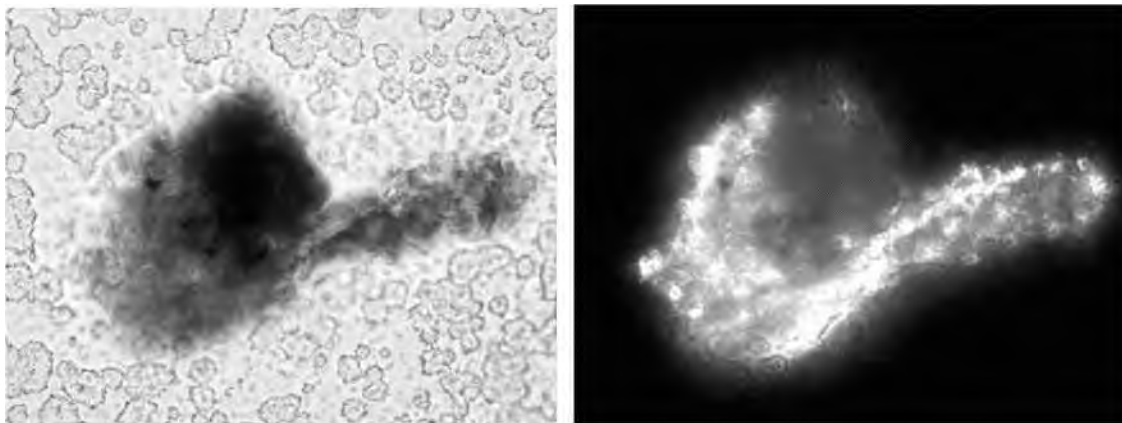


Рис. 1-75. Кандидоз. Грибница. Освещение светлое поле и поляризованный свет. Поле зрения 0,3 мм.

Тот факт, что изображения микозов выглядят аналогичным образом подтверждается наблюдением различных препаратов (мазок) от больных с установленным диагнозом - кандидоз.

2. Гиперхолестеринемия. При повышении холестерина в крови при краевой гидратации возникают кристаллы в виде сферолитов.

3. Гиперурикемия. При повышении содержания мочевой кислоты в крови возникают кристаллы в виде иголок. На самом деле мочевая кислота в крови существует в виде моноурата натрия, и биохимическими методами диагностируется не содержание мочевой кислоты, а содержание моноурата натрия. Причины повышения уровня мочевой кислоты: лейкозы, повышенное потребление пищи богатой пуринами. Следствия повышения уровня мочевой кислоты: подагра, мочекаменная болезнь.

Глава 6. Тезиографический метод исследования капли сыворотки крови.

6.1 История применения тезиографического метода.

Тезиографический метод исследования биожидкостей (метод кристаллических налетов) основан на изучении кристаллизации не самой биожидкости, а специального кристаллизующегося вещества. Суть метода состоит в том, что если в раствор кристаллизующегося вещества добавить другое вещество, биожидкость, то происходит изменения в процессе образования кристаллов. Изучается изменение формы кристаллов кристаллообразующего вещества при добавлении к нему биологических жидкостей. Наиболее чувствительным кристаллообразующим веществом, реагирующим на присутствие биожидкости, оказался хлорид меди ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Иногда в качестве кристаллообразующего вещества используют NaCl . В случае, если используется NaCl , то результирующая картина принципиально не отличается от картины получаемой в результате применения метода открытой капли. Только увеличивается центральная зона с солями.

Для повышения чувствительности тезиографического метода можно применить предварительное разведение сыворотки крови дистиллированной водой в соотношении 1:1000. Это позволяет получить более четкую структуру растущих кристаллов кристаллообразующего вещества.

Возможные варианты метода:

- 1- Открытая капля (угловая дегидратация, дегидратация на открытой поверхности, кристаллизация в открытой ячейке,
- 2- Закрытая капля (краевая дегидратация, дегидратация на закрытой поверхности, кристаллизация в закрытой ячейке,

Михаил Васильевич Ломоносов (1711-1765) - исследовал явление кристаллизации из растворов. Он ввел в русский язык слово «кристаллизация». В 1740 году открыл закон постоянства углов для кристаллов. 1763 год - труд «Первые основания металлургии или рудных дел».

1794 - Санкт-Петербург, Российская Академия Наук, кафедра химии
Ловиц Товий Егорович (Иоганн Тобиас) (1757-1804) - ученик Ломоносова М.В. - Ловиц Т.Е. написал работу «Заметки о кристаллизации солей» изучал процессы кристаллизации в жидкости. Он разработал два способа изучения химических веществ:

-«метод выветренных налетов», метод качественного анализа веществ по рисункам кристаллических налетов на стекле, образующихся после выпаривания капель раствора, которые можно наблюдать с помощью микроскопа.

-метод микрохимического анализа, при котором к раствору соли на стекле добавляется другое вещество, что приводило к образованию кристаллов. [Т.Е.Ловиц. Показание нового способа испытывать соли. Технологический Журнал, 1804, т.1, ч.3, с.27.] Суть метода «выветренных налетов» состоит в том, что если на стеклянную пластинку нанести раствор соли, а затем испарить растворитель, то на стекле останется «соляной налет», с характерным для каждой соли рисунком. Ловиц изготовил 85 таких налетов солей. Преимущество метода «выветренных налетов» перед методом микрохимического анализа состоит в том, что он позволяет идентифицировать вещества без применения реактивов. Ловиц исследовал кристаллизацию солей из растворов. Обнаружил явление пересыщения и переохлаждения растворов; установил условия выращивания

151

кристаллов. Предложил при анализе солей использовать индивидуальные кристаллические модификации; для этого изготовил 288 моделей - эталонов - различных веществ и классифицировал их по химическим признакам. Он применил микроскопический анализ для исследования кристаллов.

1831 - Немецкий химик Friedlieb Ferdinand Runge (1794-1867) изучал периодические химические реакции.

1896 - Немецкий химик Лизеганг (Rafael Eduard Liesegang, 1869-1947) является первооткрывателем образования периодических колец (колец Лизеганга) происходящих при процессах самоорганизации в химических системах. Он не первым наблюдал этот эффект, но он первым осуществил целенаправленные исследования в этой области. Он развил учение о самоорганизации в неравновесных системах. Работая в химической лаборатории фотофабрики, он обнаружил, что при высыхании капли 20% раствора нитрата серебра AgNO_3 на фотопластинке, покрытой слоем смеси желатина и хромпика ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) образуется система концентрических колец, которые состоят из продукта реакции AgNO_3 и $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ - бихромата серебра. Кольца возникают в результате периодического осаждения различных соединений при диффузии в гелевых средах.

1897 - Немецкий химик В.Оствальд (Wilhelm Fridrich Ostwald, 1853-1932) описал механизм возникновения колец Лизеганга на основе метастабильного состояния. Ostwald W. Lehrbuch der Allgemeinen Chemie (Engelmann, Leipzig, 1897).

1907 - Французский биолог Ледюк Стефан (LeDuc Stefan) (1855-1939) помещал капли крови на тонкий слой раствора соли, нанесенного на поверхность стекла. Он наблюдал потоки жидкости.

1920 - Steiner Rudolf , Германия, Берлин

Рудольф Штейнер (Steiner Rudolf) (1861-1925) предложил метод «чувствительной кристаллизации» (тезиографический метод) для регистрации и изучения «эфирных сил» растений. (Rudolf Steiner. Copper chloride crystallization of blood)

1925 - Nouy P. du, “3rd Colloid Symposium Monograph”. 1925 - Дюноу наблюдал периодическую кристаллизацию хлористого натрия в коллоидном растворе.

1935 - Ehrenfried Pfeiffer (1899-1961), Dornach, Швейцария,

Выходит книга Pfeiffer, Ehrenfried. Sensitive Crystallization Processes. A Demonstration of Formative Forces in the Blood. Anthroposophic Press, Spring Valley, NY. 1936 (second printing 1975), 59 p.

Немецкий ученый Pfeiffer, ученик Штайнера, написал работу на степень доктора медицины по методу чувствительной кристаллизации хлорида меди. Он разработал аналитический метод на основе кристаллизации хлорида меди для исследования крови при диагностике рака. В 1937 году Pfeiffer уезжает в США и работает в Philadelphia's Hahnemann Medical College.

-[Pfeiffer, E., and Miley, G., presentation at Third International Congress on Cancer Research in Atlantic City, NJ, June 6, 1939, referenced in Time article, op. cit.]

1935 Шемякин Ф.М. Изучал периодические наслоения, получающиеся при выпаривании на часовом стекле при температуре 30-40 градусов водопроводной воды. Журнал Общей Химии. 1931. т.1. с.455.

- 1950 - Pagnamenta C. - тезиографическая диагностика селикоза.
Pagnamenta C. Uber die Silikose. Zurcherische Arbeitsgemeinschaft zur Erforschung und Bekampfung der Silikose in der Schweiz. 1950. №2. s.46
- 1951 - Kleber W.
- 1952 - A.Selawry-Lippold исследовала методом тезиографии сыворотку крови 500 больных раком с различной локализацией и выявила некоторые закономерности. кристаллографические исследования крови 500 больных раком различной локализации, В 83% случаев наблюдался ряд однотипных канцероматозных изменений в картине кристаллов. Эти изменения в первую очередь касались характерных поперечных форм и наслоений одних кристаллических форм на другие. Статья «Кристаллизация хлорида меди в естествознании и медицине», Штутгарт, 1957.
- 1952 - Jung H. -тезиографическое исследование крови для диагностики рака.
- 1952 - A. Sole - исследовал кристаллизацию соли в сыворотке крови людей и животных.
Sole A. Stagoskopie. Wiener klinische Wochenschrift. 1952. Band.64. №1. s.24.
Sole A. Die Rhythmik im Influenzstadiogramm. Kolloid-Zeitschrift. 1955. Band.143. s.73-83
Sole A/ Untersuchung ber die Bewegung der Teilchen im Stadiogramm und Influenzstadiogramm. Kolloid-Zeitschrift. 1957. Band.151.s.55-62.
- 1954 - Koch C.
Koch C. Feinbau und Entstehungsweise von Kristallstrukturen in getrockneten Tropfen hochmolekularsalzhaltiger Flussigkeiten. Kolloid-Zeitschrift. 1954. Band 138. Helt 2. s.81-86.
- 1957 - Москва - МГУ - химический факультет
Фигуровский Николай Александрович - метод тезиографии для качественного определения лекарственных препаратов.
[Фигуровский Н.А., Борисова В.Г. Аптечное дело 1957, №5, с.46]
- 1960- Киев. [Позднякова В.Т. Микрокристаллоскопические реакции на алкалоиды. Киев, 1960.], [Позднякова В.Т. Микрокристаллоскопический анализ фармацевтических препаратов и ядов. М. Медицина, 1968.]
- 1964 - Голландский ученый Daems провел кристаллографическое исследование крови. Он проводил кристаллизацию $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ с добавлением гемолизированной крови. Были выявлены различия в форме кристаллов, полученных в присутствии крови здоровых людей, и больных с гипертрофией и карциномой простаты.
Daems W.F. Chem. Courant. 1964. v.63. p.17
Dams W.F. - РЖ Биологическая химия, 1965, №9, с.4.
Daems W.F. Chem. conrant, 63, №1970, 15, 17, 1964
- 1965 - Витебск, Витебский Медицинский Институт, кафедра токсикологической и аналитической химии
[Бубон Н.Т., Пузыревский К.Я. Аптечное дело. 1965, т.14, №2, с.50-52.]
Тезиографический метод для идентификации лекарств.
- 1966 - Илясов Я.З. Судебно медицинская экспертиза, 1966, №4, с.43.

Тезиографический метод для судебно-химического анализа.

1967 - Москва - Институт общей и коммунальной гигиены им. А.Н.Сысина АМН СССР. Статья Кожинной Л. А., Масленниковой Л. С. «Об использовании в медицине кристаллографических методов анализа» - тезиография.

1969 - Ленинград - Ленинградский технологический институт холодильной промышленности. [Кузьмин М.П., Галкин А.В. «Применение тезиографии для определения изменений в пищевых продуктах». Пищевая промышленность. 1969, т.3, с.176.] Применили метод тезиографии для выявления сортового различия плодов.

1977 - Леусс П. А. - исследовал микрокристаллизацию слюны.

1977 - Москва, 4-е Главное управление МЗ СССР.

[Неретин В.Я., Кирьянов В.А. Кристаллографический метод исследования спинномозговой жидкости при заболеваниях центральной нервной системы. Советская медицина, 1977, №7, с.96-103] - тезиографический метод исследования спинномозговой жидкости.

1977 - Москва, МОНИКИ

Мороз Л. А. Кристаллографический метод при заболеваниях центральной нервной системы. Методические указания. Москва.

Усовершенствовали метод для исследования различных биологических субстратов и жидкостей в диагностике ряда патологических состояний (спинномозговая жидкость, моча, мокрота, слюна, плевральная и асцитическая жидкость, кусочки опухоли).

В 1985 г. разработан упрощенный метод тезиографии слезной жидкости.

1987 - Шевердин Ю.П. и Чумак П.Я. - тезиография крови при заболеваниях острым панкреатитом.

1988 - Хайбуллин Т.Н. (Казахстан, Семипалатинск) исследовал кристаллограммы ликвора при ишемической инсульте.

1995 - Усин В.В. (Саратов, СГМУ) - исследовал кристаллографические свойства биожидкостей.

2001 - Москва - РМАПО Кафедра судебно-медицинской экспертизы -

Гайворонская Валентина Ивановна -

Кристаллографический метод диагностики черепно-мозговой травмы и некоторых других патологических состояний в судебно-медицинской практике. Диссертация доктора медицинских наук.- М.,-2001.С.31.

2007 - Нижний-Новгород, Нижегородский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии Росмедтехнологий

Мартусевич Андрей Кимович - диссертация кнм «Особенности кристаллогенеза биологических сред человека и животных в норме и при патологии».

2008-Нижний Новгород - ННИИТО. Воробьев А.В., Мартусевич А.К., Перетягин С.П. Книга «Кристаллогенез биологических жидкостей и субстратов в оценке состояния организма».

2009 -Хадарцев Александр Агубечирович - Тула, НИИ новых медицинских технологий,

Кидалов Владимир Николаевич - Санкт-Петербург, ВМА Выпустили книгу «Тезиография крови и биологических жидкостей», Тула, Тульский полиграфист, 2009.

6.2 Методы оценки кристаллограммы.

При использовании метода тезиографии формируются дендритные кристаллы кристаллообразующего вещества. Для количественной оценки полученных дендритов используются различные критерии:

- 1- фрактальная размерность
- 2- количество центров кристаллизации
- 3- количество и суммарная длина первичных лучей
- 4- количество и суммарная вторичных лучей
- 5- количество и суммарная третичных лучей
- 6- толщина лучей
- 7- угол расхождения лучей (перпендикулярный или нет)

Фрактальная размерность дендритного кристалла - показатель плотности заполнения пространства дендритным кристаллом. Фрактальная размерность является дробной величиной. Фрактальная размерность линии равна 1, фрактальная размерность плоскости равна двум. Фрактальная размерность плоского дендрита находится в диапазоне от 1 до 2. Фрактальная размерность снежинка равна 1,71.

Угол расхождения лучей. При отклонении состояния от нормы наблюдается расхождение лучей под разными углами.

Глава 7. Диагностика по капле цельной крови. Тест Болена.

В 1942 году американский хирург Bolen H.L. (Massachusetts) - использовал кристаллизацию капли цельной крови для диагностики раковых заболеваний (HLB blood test - тест Болена). Результаты работы были опубликованы - Bolen H.L. The Blood Pattern as a Clue to the Diagnosis of Malignant Disease. J. Lab.&Clin. Med., 27:1522-1536. 1942.

Капля цельной крови высушивается на предметном стекле. Структура капли

после высыхания анализируется с помощью микроскопа. Было обнаружено, что структура капли здоровых пациентов и пациентов с онкологическими заболеваниями значительно отличаются. Чем более однородна структура высохшей капли, тем более нормальное состояние. Если в структуре капли имеются нарушения однородной структуры - это свидетельствует об отклонении от нормального состояния.

В отличие от дегидратации капля сыворотки крови, в капле цельной крови содержится много эритроцитов. В связи с этим при дегидратации меньше проявляется структура компонент плазмы, а проявляется только общая структура крови. У здорового человека структура крови однородна, и при гидратации образуется капля с равномерной структурой. При заболеваниях происходит нарушение однородности структуры крови. В плазме крови начинает происходить агрегация молекул белка и образуются кластерные структуры в виде фрагментов сети связанных молекул. При дегидратации эти фрагменты стягиваются, и одновременно они стягивают эритроциты, которые находятся в этих фрагментах сети. Происходит образование псевдотрещин - разрывов в структуре высохшей капли в виде участков без эритроцитов. Чем больше нарушений в структуре сыворотки крови - тем больше будет нарушений в структуре высохшей капле цельной крови.

Таким образом, тест Болена выявляет только неоднородность плазмы крови на макроуровне. Для более информативного проведения теста необходимо проводить разведение цельной крови. В этом случае структура неоднородностей будет проявляться более четко.

Более общим является тест, когда проводят дегидратацию сыворотки крови с добавлением небольшого количества эритроцитов. В этом случае проявляется и структура сыворотки, и структура макро неоднородностей.

Диагностику состояния организма на основе анализа крови применяют уже давно. С возникновением новых технологий и с накоплением новых знаний возникают новые методы диагностики. Можно выделить следующие методы:

- 1- Биохимический метод исследования крови - общепринятый метод,
- 2- СОЭ - скорость оседания эритроцитов - общепринятый метод,
- 3- Дегидратация сыворотки крови на предметном стекле - широко изучаемый метод,

- 4- Дегидратация цельной крови на предметном стекле (тест Болен),
- 5- Исследование живой крови под микроскопом (гемосканирование),
- 6- Спектральные методы исследования крови (оптическая спектроскопия, БИК-спектроскопия, ИК спектроскопия, КР - Рамановская спектроскопия),
- 7- Люминесцентная спектроскопия,
- 8- ЛКС - лазерная корреляционная спектроскопия.

Разумеется, что не существует универсального или лучшего метода. Каждый из методов имеет свои достоинства и недостатки. Все методы взаимно дополняют друг друга. Наиболее полная оценка состояния крови получается только при комплексном использовании различных методов.

8.1 Сравнение диагностики методом дегидратации с биохимическими методами.

Не существует универсальных методов диагностики. Все методы диагностики являются взаимодополняющими, а не взаимоисключающими. У каждого метода имеются свои преимущества и свои недостатки.

Биохимические методы диагностики очень мощные, но необходимо понимать разницу между мощностью метода и практическим применением метода. С помощью биохимических методов можно провести диагностику очень многих заболеваний, но имеются некоторые тонкости.

1- Стоимость. Диагностика каждого параметра при биохимических исследованиях стоит дополнительных реагентов, значит дополнительных денег. Диагностика методом дегидратации не требует реагентов, стоимость затрат - это стоимость предметного и покровного стекла - примерно 2 рубля. Для диагностики методом дегидратации нет необходимости приобретать дорогостоящее оборудование. Диагностику можно производить на обычных микроскопах, которые уже имеются в каждой лаборатории.

2- Оперативность. Проведение биохимических анализов - длительная процедура.

Диагностика методом дегидратации - оперативна, диагноз можно поставить в течении одного часа.

3- Комплексность. Так как диагностика каждого параметра это дополнительная стоимость анализа, то нет возможности для всех пациентов производить диагностику по всем параметрам. Врачу приходится ограничивать количество параметров, назначаемых на обследование. К сожалению, не всегда удается правильно угадать параметры, значения которых находятся вне нормы. При диагностике по сухой капле нет необходимости назначать параметры исследования, диагностика всегда происходит по всем параметрам. Структура капли сама выявляет отклонения от нормы. Например, при кристаллизации можно сразу наблюдать область с эфирами холестерина. Стандартными методами проанализировать количество эфиров холестерина сложно.

157

4- Оценка результатов анализа. Стандартное принятие решения осуществляется по одному параметру - норма или нет. Более точным является разбиение области значения параметра на три области - норма, слабые отклонения от нормы, патологические отклонения.

Еще более точным подходом является учет пола и возраста пациента при оценке значения параметра. Это связано с тем, что нормальные значения различны для мужчин и женщин, а так же зависят от возраста.

Для диагностики некоторых нарушений в функционировании организма необходимо судить не по величине одного какого-то параметра (норма или нет), а

оценивать значения нескольких параметров одновременно. Возможны случаи, когда каждый отдельный параметр находится в норме, а их комбинация - соответствует некоторой патологии.

Пример 1. При ХС=6,48, ЛПВП-1,04 - оба показателя находятся в норме, а индекс атерогенности равен 5,23, что значительно превышает норму.

Пример 2. На трехфазной диаграмме вода-холестерин-лецитин имеется только маленькая область, в которой холестерин растворим. При остальных комбинациях параметров холестерин выпадает в осадок.

При анализе структуры капли мы судим не о концентрации отдельных компонент, а о процессах, которые происходят в организме. Прежде всего можно судить о процессах кристаллизации различных веществ, которые являются причинами многих заболеваний.

5- Точность. Биохимические анализаторы обеспечивают достаточно высокую точность определения концентрации отдельных веществ. Хотя на основе метода определения концентрации - проведение химической реакции и фотометрическое определение концентрации результата, можно предположить, что точности более 10% вряд ли удастся достигнуть.

Методом дегидратации можно выявлять малые концентрации веществ. Но дело в том, что способность кристаллизоваться зависит не только от концентрации вещества, но и от того, в каком состоянии и в каких связях находится данное вещество в сыворотке крови. Поэтому точности трудно сравнивать.

6- Интегральная оценка состояния организма. Даже если все параметры в норме, нельзя сказать, что человек здоров. При диагностике по сухой капле можно судить об общем состоянии организма, о степени отклонения состояния от нормы. Возможно так же судит об устойчивости этого состояния.

8.2 Сравнение различных методов кристаллизации капли сыворотки крови.

Существуют принципиальные различия в исследовании капли сыворотки крови различными методами.

1- Метод открытой капли. При применении метода открытой капли происходит относительно быстрое испарение воды и загустение капли. В этом случае различные компоненты сыворотки крови не успевают кристаллизоваться. Вся сыворотка затвердевает. Однако метод открытой капли позволяет оценивать состояние белков, так как в структуре высохшей капли проявляется структура альбуминов и глобулинов. Сохранность препаратов, полученных методом открытой капли не очень хорошая. Со временем сыворотка отскакивает от стекла и препарат разрушается.

2- Метод закрытой капли. При применении метода закрытой капли процесс испарения воды происходит очень медленно. Долгое время капля сохраняет жидкое состояние. Затвердевает только узкая полоска сыворотки вдоль края. Вся остальная сыворотка остается в все время в виде геля. Это приводит к тому, что

различные компоненты сыворотки крови успевают кристаллизаться. Таким образом, метод закрытой капли позволяет оценивать компонентный состав сыворотки крови, особенно наличие в количестве тех компонент, которые легко выкристаллизовываются (минеральные соли, мочевины), или образуют жидкие кристаллы (липиды). Сохранность препаратов, полученных методом закрытой капли, очень высокая, так как препарат защищен покровным стеклом.

3- Метод тизеографии. При применении метода тизеографии можно оценить состояние белков по степени их взаимодействия с кристаллообразующим веществом. При нарушении состояния белков нарушается их взаимодействие с кристаллообразующим веществом, что приводит к нарушению структуры кристаллов.

8.3 Дополнительные изображения.

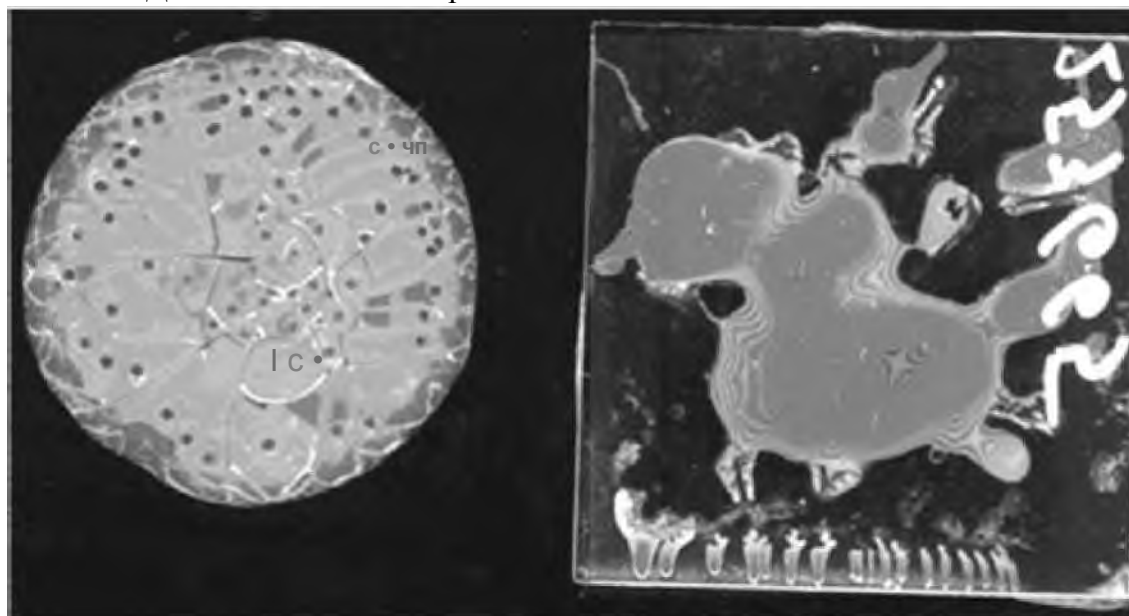


Рис. 1-76. Капли, полученные методом открытой и закрытой дегидратации. Поле зрения 75 мм.

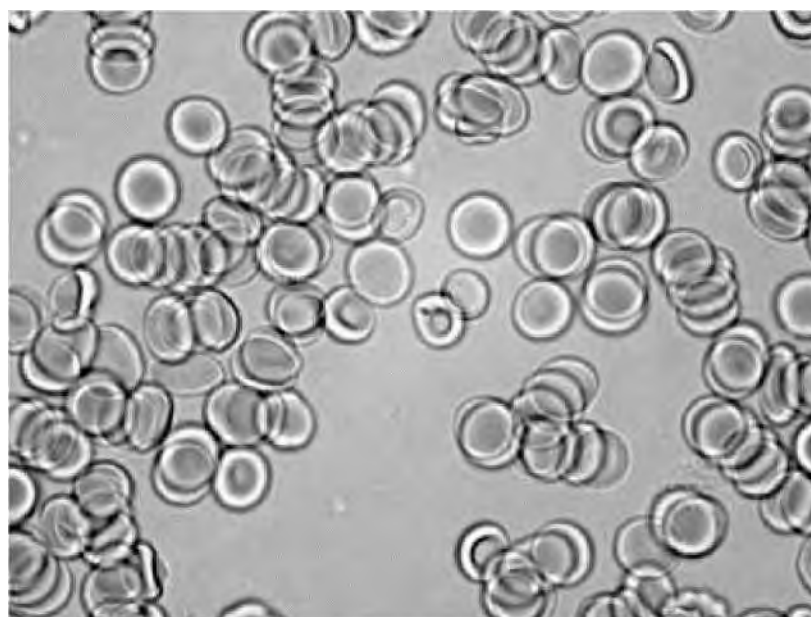


Рис. 1-77. Эритроциты крови. Поле зрения 0,1 мм.

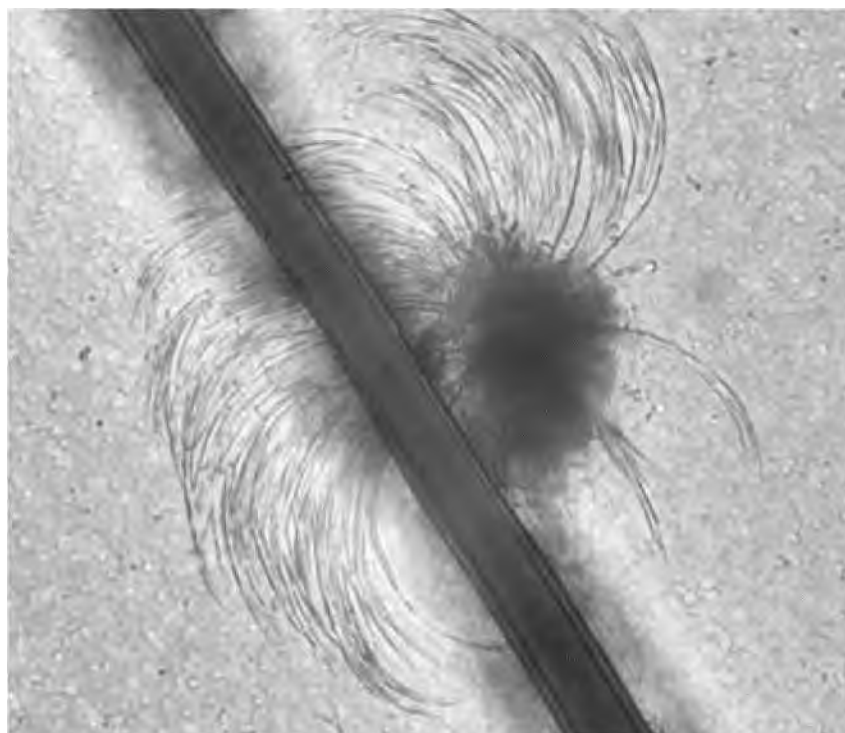


Рис. 1-78. Неизвестный объект. Застыл в геле и был рассечен трещиной. Поле зрения 0,2 мм.

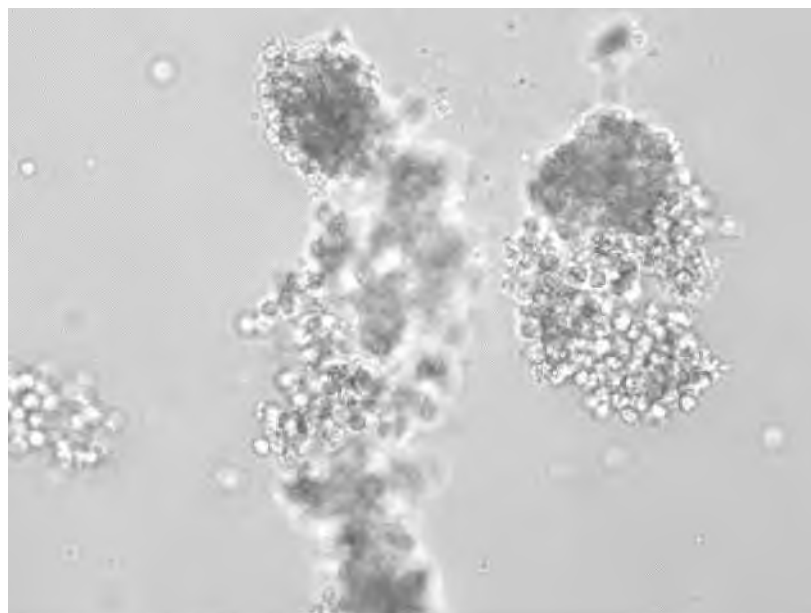


Рис. 1-79. Агрегаты. Поле зрения 0,7 мм

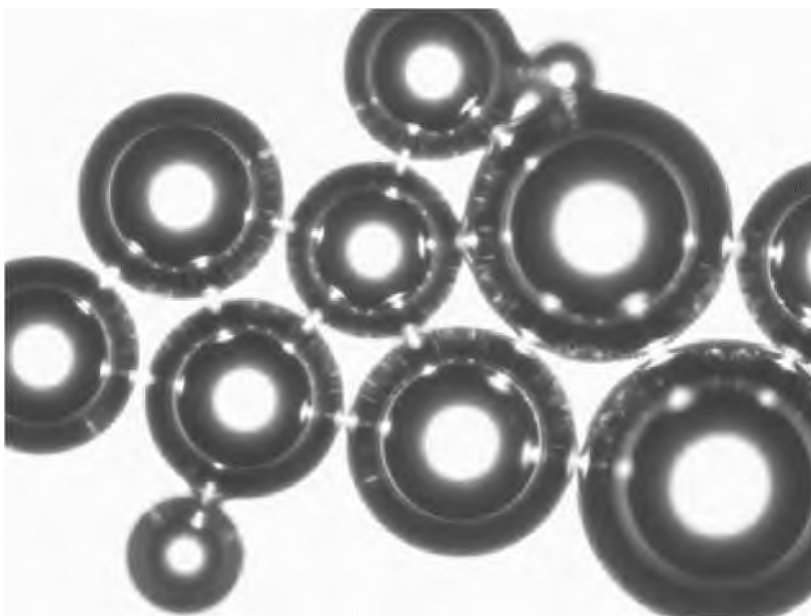


Рис. 1-80. Пузырьки воздуха. Поле зрения 1,5 мм.