

Сравнительная оценка механических свойств адсорбционных слоев в растворах белков сыворотки крови человека

© Т.А. Яхно, В.В. Казаков, А.Г. Санин, О.Б. Шапошникова, А.С. Чернов

Институт прикладной физики РАН,
603950 Нижний Новгород, Россия
e-mail: tanya@awp.nnov.ru

(Поступило в Редакцию 29 июня 2006 г.)

Проведена сравнительная оценка механических характеристик адсорбционных слоев белково-солевых растворов в малых объемах (0.1 ml) с помощью инденторов малого диаметра. Показано, что частичная замена альбумина в альбумин-солевом растворе на эквивалентное по массе количество иммуноглобулинов G и M снижает энергию поверхности, в то время как добавление фибронектина повышает механическую прочность слоя. Полученная информация полезна для понимания некоторых механизмов, определяющих особенности динамических процессов структуризации высыхающих капель биологических жидкостей, при медицинской диагностике.

PACS: 87.15.La

Предметом наших исследований в течение последних лет были процессы в высыхающих каплях биологических жидкостей. Экспериментально показано, что динамические параметры структуризации высыхающих капель биологических жидкостей несут информацию о состоянии здоровья и могут быть положены в основу медицинской экспресс-диагностики [1,2]. Однако механизмы, определяющие эти различия, до сих пор оставались гипотетическими. Известно, что кинетика испарения воды, регулирующая процессы структуризации в высыхающей капле, связана со скоростью диффузии. Было высказано предположение, что факторами, влияющими на нее, являются гелеобразование и плотность адсорбционного слоя на границе с воздухом [3,4].

Цель настоящей работы заключается в экспериментальной проверке предположения о том, что при одинаковой весовой концентрации общего белка и соли различный белковый состав определяет разные физические свойства поверхности раствора. Поскольку прямые измерения физических параметров поверхности капли объемом 5 ul весьма затруднительны, мы разработали методики, позволяющие проводить сравнительную оценку механических свойств адсорбционных слоев в малом объеме жидкости (100 ul).

Материалы и методы

В качестве исследуемых жидкостей были использованы растворы лиофилизированных белков, полученных из сыворотки крови людей,¹ в физиологическом (0.9%) растворе хлорида натрия для инфузий.

1. Сывороточный альбумин человека (HSA) фирмы Sigma (США, # А-1653), 67 kDa, pI ~ 4.7, E (280 nm, 1%) = 6.7.

¹ Лиофилизированные белки были поставлены фирмой ООО ИМТЕК.

2. Иммуноглобулин G (IgG), 150 kDa, E (280 nm, 1%) = 14.

3. Иммуноглобулин M (IgM), 900 kDa, pI ~ 7.2, E (280 nm, 1%) = 12.

4. Фибронектин (Fn), 420 kDa, E (280 nm, 1%) = 13.

Растворы готовили не менее чем за сутки до исследования без использования буфера. Содержание общего белка в пробах составляло 70–86.4 g/l, что находится в пределах физиологической нормы [5,6]. При исследовании смеси белков разного типа использовали соответствующий „контроль концентрации“ с эквивалентным массе общего белка содержанием сывороточного альбумина человека (табл. 1). Измерения начинали через 20 min после помещения жидкости в кювету. Все измерения были проведены при одинаковых условиях ($T = 20^\circ\text{C}$, $P = 73\text{ mm Hg}$, $H = 70\%$). Кроме растворов белков исследовали также образцы физиологического раствора и дистиллированной воды.

Для проведения экспериментов использовали небольшие пластиковые планшеты с ячейками цилиндрической формы диаметром 8 и высотой 4 mm. При этом объем исследуемой жидкости, помещаемой в каждую ячейку, составлял 100 ul. Малый объем жидкостей затрудняет использование классических методов измерения физических параметров растворов (поверхностного натяжения, вязкости) на границе с воздухом. По-

Таблица 1. Состав исследованных белково-солевых растворов

№	Состав пробы	Общий белок, g/l	HSA, g/l	Fn, g/l	IgG, g/l	IgM, g/l
1	HSA	70	70	–	–	–
2	HSA + Fn	70.4	70	0.4	–	–
3	HSA + Fn + IgG	86.4	70	0.4	16	–
4	HSA (контроль 1)	86.4	86.4	–	–	–
5	HSA + Fn + IgG + IgM	84.5	70	0.3	12	2.2
6	HSA (контроль 2)	84.5	84.5	–	–	–

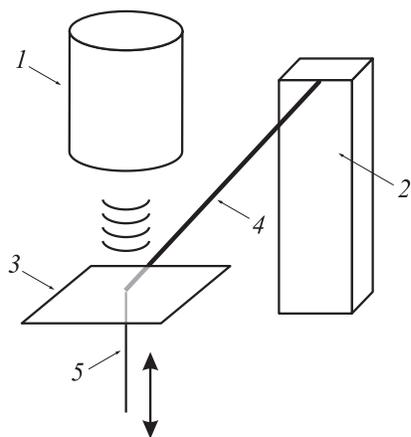


Рис. 1. Схема установки для измерения вертикальных смещений индентора: 1 — антенна ультразвукового локатора, 2 — опора упругого элемента, 3 — отражающая площадка, 4 — упругий элемент, 5 — индентор.

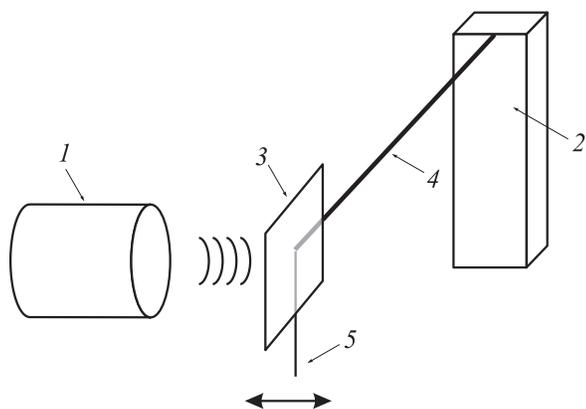


Рис. 2. Схема установки для измерения горизонтальных смещений индентора; обозначения те же, что на рис. 1.

этому для интегральной оценки физических свойств адсорбционных слоев были разработаны методики измерений, в которых контакт жидкости с измерительным преобразователем осуществлялся через переходное звено — индентор — цилиндрический стержень диаметром 0,7 мм, погружаемый в жидкость на глубину 1 мм. Преобразование реакции индентора при взаимодействии с поверхностью жидкости в измеряемый сигнал было реализовано при статических и динамических измерениях с использованием датчика силы на основе ультразвукового измерителя перемещений (рис. 1, 2) [7–9].

Несмотря на то что формирование каждой реакции было обусловлено целым рядом причин, авторы старались выделить преобладающий фактор (поверхностное натяжение, вязкость) и рассматривать его как основную причину, вносящую наибольший вклад в изменение измеряемого сигнала. Для выявления наиболее значимых факторов были проведены калибровочные измерения с использованием жидкостей, свойства которых хорошо известны: дистиллированной воды, этанола, ацетона и

глицерина. Достоверность и объективность измерений была подтверждена четырьмя независимыми сериями экспериментов для каждой исследуемой жидкости, в каждой из которых проводилось по 6–8 измерений.

Исследование изменения поверхностного натяжения

Блок-схема устройства, реализующего данный способ измерения, приведена на рис. 3 (см. также рис. 1). Антенну ультразвукового локатора, излучающую и принимающую ультразвуковую волну частоты 300 кГц, фиксировали в координатном устройстве на расстоянии 30 мм от отражателя. Особенностью этих измерений является то, что упругий элемент при взаимодействии с жидкостью проявляет свои резонансные свойства. В результате капиллярного эффекта при отодвигании кюветы с жидкостью упругий элемент изгибается, а после отрыва совершает колебания, начальная амплитуда которых пропорциональна силе отрыва. На рис. 4 приведена

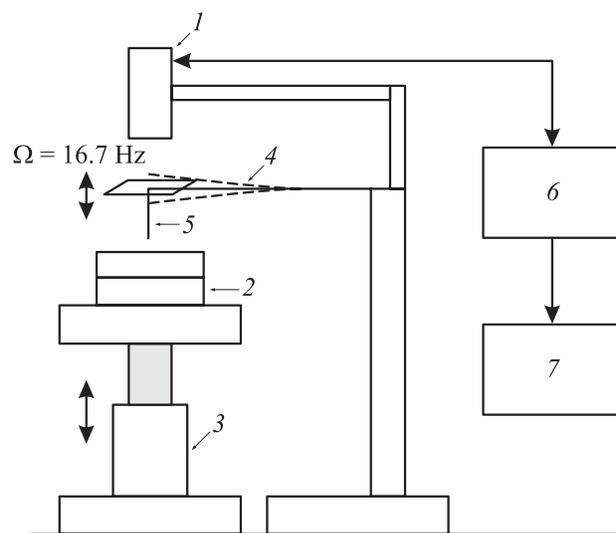


Рис. 3. Блок-схема установки с движением индентора по вертикали: 1, 4, 5 — то же, что на рис. 1; 2 — жидкость, 3 — устройство перемещения, 6 — локатор, 7 — компьютер.

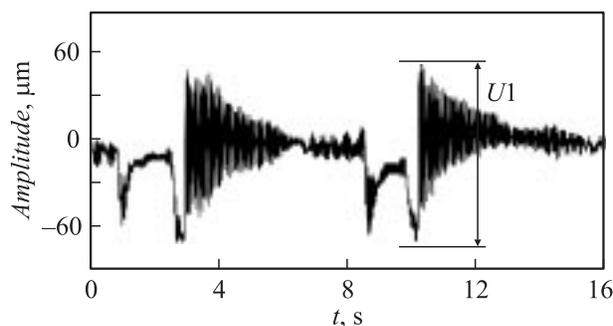


Рис. 4. Осциллограмма смещений упругого элемента при вертикальных движениях индентора. U_1 — регистрируемый параметр.

Таблица 2. Поверхностное натяжение тестовых жидкостей и результаты измерений силы отрыва

Тестовые жидкости	Поверхностное натяжение, N/m	Сила отрыва, мсN
Вода	72.8	40.6 ± 1.5
Ацетон	23.7	23.8 ± 1.5
Глицерин	59.4	25.5 ± 2.0
Этанол	22.8	22.0 ± 1.3

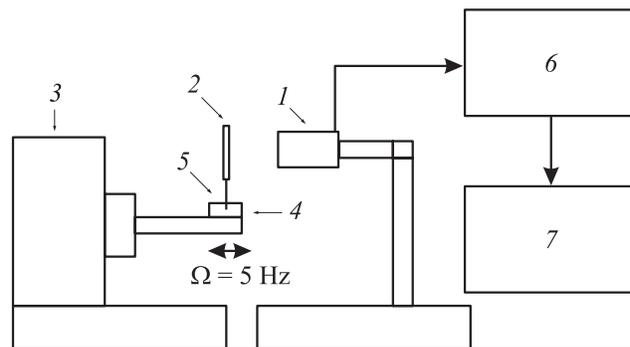
типичная осциллограмма сигнала на выходе измерителя. Значимый параметр, используемый для расчета силы отрыва, обозначен как $U1$. Результаты измерений для калибровочных жидкостей приведены в табл. 2. Коэффициент корреляции измеряемой силы с величиной коэффициента поверхностного натяжения составил 0.83, т.е. вклад поверхностного натяжения в измеряемый сигнал был наибольшим. Это позволило нам использовать данный метод для сравнительной оценки величины поверхностного натяжения белковых растворов.

Исследование изменения вязкоупругих свойств

Блок-схема экспериментальной установки, позволяющей производить колебания жидкости и измерять реакцию погруженного в нее индентора, приведена на рис. 5 (см. также рис. 2). Кювету с жидкостью закрепляли на переходном устройстве платформы вибростенда, совершавшего гармонические колебания с частотой 5 Hz и амплитудой 0.5 mm. В жидкость на глубину 1 mm погружали индентор диаметром 0.7 mm. Ось пружины была перпендикулярна направлению вибраций. В этом случае индентор из-за сопротивления колеблющейся жидкости изгибался в направлении оси ультразвукового датчика, что позволяло измерять его перемещения. На выбранной частоте колебаний вибростенда кювета и жидкость колебались как единое целое и не проявляли своих резонансных свойств (низкочастотный дорезонансный режим). Сигнал с выхода ультразвукового измерителя подавался на анализатор спектра типа 2034 (Bruel & Kear). Измеряли амплитуду частоты 5 Hz в режиме усреднения спектра по 20 реализациям. При выбранных условиях эксперимента данная амплитуда была пропорциональна силе сопротивления, действующей на индентор, и отражала изменение вязкоупругих свойств жидкости. Количественно значение силы рассчитывали по перемещению индентора после предварительной калибровки используемого упругого элемента.

Результаты и обсуждение

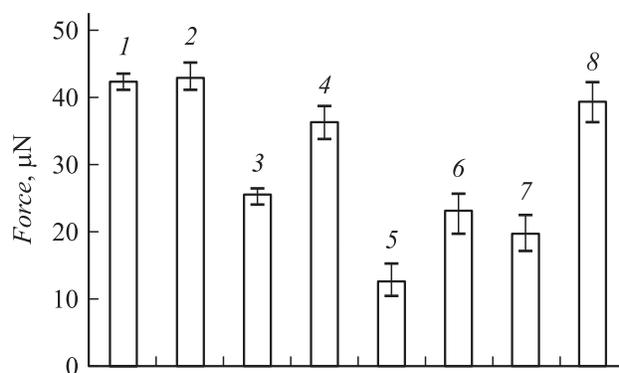
Результаты измерения силы отрыва приведены на рис. 6. Видно, что сила отрыва индентора от поверхности раствора HSA меньше, чем в воде и физиологическом

**Рис. 5.** Блок-схема установки с движением индентора по горизонтали: 1, 5, 6 — то же, что на рис. 3; 2 — отражающая площадка; 3 — вибростенд, 4 — кювета, 7 — анализатор спектра.

растворе NaCl. Это соответствует данным о более низком поверхностном натяжении раствора HSA по сравнению с представленными жидкостями [10]. Добавление в раствор HSA фибронектина в концентрации менее 0.6% от концентрации HSA (табл. 1) приводило к заметному повышению измеряемого сигнала. Растворы, содержащие помимо фибронектина иммуноглобулины, обладали меньшим поверхностным натяжением, чем растворы альбумина той же концентрации.

Результаты измерения вязкоупругих свойств жидкостей представлены на рис. 7. В отличие от результатов измерений предыдущим способом, регистрируемый сигнал был выше в растворе HSA, чем в воде. Добавление в раствор HSA фибронектина приводило к значительному повышению амплитуды сигнала.

Согласно эмпирическому правилу Дюкло–Траубе, при увеличении длины цепи молекул поверхностно-активных веществ (ПАВ) на одну CH_2 -группу их поверхностная и адсорбционная активность возрастают в 3–3.5 раза. Во столько же раз при этом снижается их растворимость в воде [11]. В приложении к нашему эксперименту это означает, что поверхностная активность

**Рис. 6.** Результаты измерения силы отрыва индентора для различных жидкостей: 1 — H_2O , 2 — NaCl, 3 — HSA, 4 — HSA + Fn, 5 — HSA + Fn + IgG, 6 — контроль 1, 7 — HSA + Fn + IgM, 8 — контроль 2.

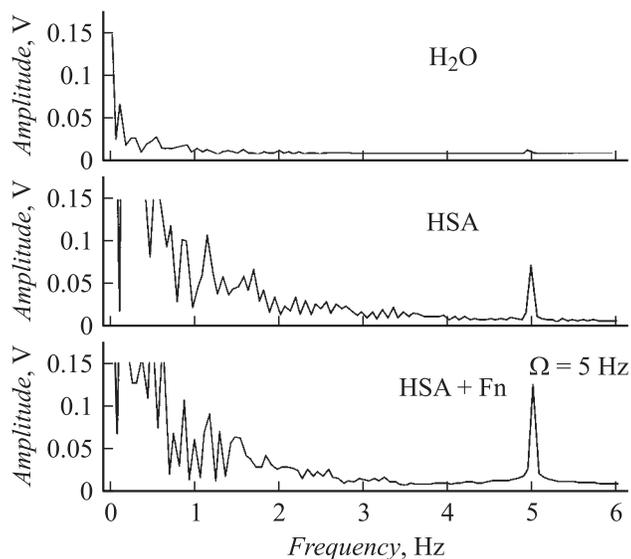
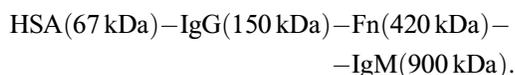


Рис. 7. Спектры сигналов с выхода ультразвукового измерителя перемещений при исследовании H_2O , HSA, HSA + Fn.

белков возрастает с ростом их молекулярной массы:



Крупномолекулярные белки, добавляемые в раствор альбумина, обладают конкурентным преимуществом при формировании адсорбционного слоя на границе с воздухом. Почему фибронектин повышает, а иммуноглобулины снижают поверхностное натяжение раствора альбумина? По-видимому, ответ надо искать в их химическом строении и природной функции.

Фибронектин является структурным гликопротеином, наиболее хорошо изученным компонентом межклеточного матрикса [12]. Он играет важную роль в репарации поврежденных тканей. Поступая в раневую поверхность, фибронектин полимеризуется и образует рыхлую сеть, служащую каркасом для тканевых клеток, заселяющих впоследствии пространство раны. В сыворотке крови он циркулирует в виде почти идентичных димеров и аффинно связывается с белками коллагеновой группы. Фибронектин участвует в опсонизации бактерий и не образует комплексов с альбумином при инкубации в растворе [13]. Вполне вероятно, что в растворе на границе „жидкость–воздух“ фибронектин также образует сетчатую структуру, которая повышает поверхностное натяжение и механическую прочность адсорбционного слоя.

Функция иммуноглобулинов в организме не связана с образованием полимерных структур. В наших экспериментах они ведут себя как „классические“ ПАВ, располагаясь на границе с воздухом и снижая поверхностную энергию раствора. Присутствие в растворе фибронектина не препятствовало понижению поверхностного натяжения иммуноглобулинами. По-видимому, это

связано с тем, что концентрация конкурентного белка (иммуноглобулина) в адсорбционном слое превышает концентрацию фибронектина в 40–50 раз.

Проведенное исследование показало, что использованный нами экспериментальный подход позволяет получать информацию о сравнительных механических свойствах адсорбционных слоев в малых объемах жидкостей. В частности, экспериментально показано, что крупномолекулярные белки сыворотки крови человека обладают большей поверхностной активностью по сравнению с альбумином, что обеспечивает им преимущество в формировании адсорбционных слоев на границе с воздухом. При этом иммуноглобулины G и M снижают, а фибронектин повышает поверхностное натяжение раствора альбумина. Учитывая природные свойства фибронектина, мы полагаем, что на границе с воздухом он полимеризуется и образует сетчатый каркас. Следствием этого является повешение поверхностного натяжения и вязкоупругих свойств адсорбционного слоя. Полученные данные будут полезны для понимания некоторых механизмов, определяющих особенности динамических процессов структуризации высыхающих капель биологических жидкостей с целью медицинской диагностики.

Список литературы

- [1] *Yakhno T., Sanin A., Yakhno V. et al. // Proc. of SPIE. Vol. 5692. BIOS-2005. Advanced Biomedical and Clinical Diagnostic Systems. III. 20–26 January 2005. San Jose. California. USA, 2005. P. 188–198.*
- [2] *Yakhno T., Sanin A., Yakhno V. et al. // IEEE Eng. in Medicine and Biology Magazine. 2005. Vol. 24. N 2. P. 96–104.*
- [3] *Яхно Т.А., Яхно В.Г., Санин А.Г. и др. // ЖТФ. 2004. Т. 74. Вып. 8. С. 1055–1063.*
- [4] *Яхно Т.А., Яхно В.Г., Соколов А.В. // Биофизика. 2005. Т. 50. № 4. С. 726–734.*
- [5] *Хейль В., Коберштейн Р., Цавта Б. Референтные пределы у взрослых и детей. Преаналитические предосторожности. М.: Лабпресс, 2001. 176 с.*
- [6] *Справочник по клиническим лабораторным тестам. М.: АГАТ-МЕД, 2001. 192 с.*
- [7] *Казаков В.В. Ультразвуковой фазовый измеритель виброперемещений. А. с. СССР. N 1357725 // Б.И. 1987. № 45.*
- [8] *Казаков В.В. Виброакустические поля сложных объектов и их диагностика. Горький, ИПФ АН СССР. 1989. С. 178–190.*
- [9] *Антонец В.А., Иванов А.Ф., Казаков В.В. Способ определения коэффициента поверхностного натяжения жидкости. А. с. СССР. N 1283621 // Б.И. 1987. № 2.*
- [10] *Измайлова В.Н., Ямпольская Г.П., Сумм Б.Д. Поверхностные явления в дисперсных системах. М.: Химия, 1988. 240 с.*
- [11] *Шукин Е.Д. Коллоидная химия. Уч. для ун-тов и химико-технологич. вузов. М.: Высш. шк., 2004. 445 с.*
- [12] *Николаев А.Я. Биологическая химия. М.: ООО „Медицинское информационное агентство“, 1998. 496 с.*
- [13] *Gilot P., Andre P., and Content J. // Infection and Immunity. 1999. Dec. P. 6698–6701.*