

## Динамика фазовых переходов в высыхающих каплях растворов 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 динамики структуризации высыхающих капель белково-солевых растворов и их морфологических особенностей при изменении белкового состава. Показано, что повышение содержания иммуноглобулинов и фибронектина оказывает влияние на физические свойства адсорбционных слоев на границе раздела фаз, это приводит к изменению динамических параметров структуризации высыхающих капель. Данные изменения интегрально отражаются на форме кривых акустомеханического импеданса (АМИ) высыхающих капель, и эта разница может быть выражена в численной форме. Таким образом, полученные ранее феноменологические данные о возможности медицинской диагностики на основе регистрации динамики АМИ в высыхающих каплях сыворотки крови получили определенное экспериментальное обоснование.

PACS: 87.15.Rn

Экспериментально было показано, что динамика фазовых переходов в высыхающих каплях биологических жидкостей у здоровых и больных людей различна [1]. Более того, разные заболевания занимают различные области на параметрической плоскости, что позволяет проводить медицинскую диагностику [2–4]. Несмотря на полученные данные, существующих знаний явно недостаточно для построения адекватной модели структуризации высыхающих капель биологических жидкостей [5]. Поэтому работа с модельными белково-солевыми растворами является важным этапом исследования.

В предыдущей работе [6] экспериментально было показано, что крупномолекулярные белки сыворотки крови человека обладают большей поверхностной активностью по сравнению с альбумином, что обеспечивает им преимущество в формировании адсорбированных слоев на границе с воздухом. При этом иммуноглобулины G и M снижают, а фибронектин повышает поверхностное натяжение раствора альбумина. Учитывая природные свойства фибронектина, мы предположили, что на границе с воздухом он полимеризуется и образует сетчатый каркас. Следствием этого является повышение поверхностного натяжения и вязкоупругих свойств адсорбционного слоя. Цель настоящей работы заключается в выяснении влияния указанных факторов на морфологию высохших капель и динамику фазовых переходов в процессе их высыхания.

### Материалы и методы

В качестве исследуемых жидкостей были использованы растворы лиофилизированных белков сыворотки крови людей<sup>1</sup> в физиологическом (0.9%) растворе хлорида

<sup>1</sup> Лиофилизированные белки были поставлены фирмой ООО ИМТЕК, Москва.

натрия для инфузий.

1. Сывороточный альбумин человека (HSA) фирмы Sigma (США, # А-1653), 67 kDa,  $pl \sim 4.7$ ,  $E(280 \text{ nm}, 1\%) = 6.7$ .

2. Иммуноглобулин G (IgG), 150 kDa,  $E(280 \text{ nm}, 1\%) = 14$ ;

3. Иммуноглобулин M (IgM), 900 kDa,  $pl \sim 7.2$ ,  $E(280 \text{ nm}, 1\%) = 12$ .

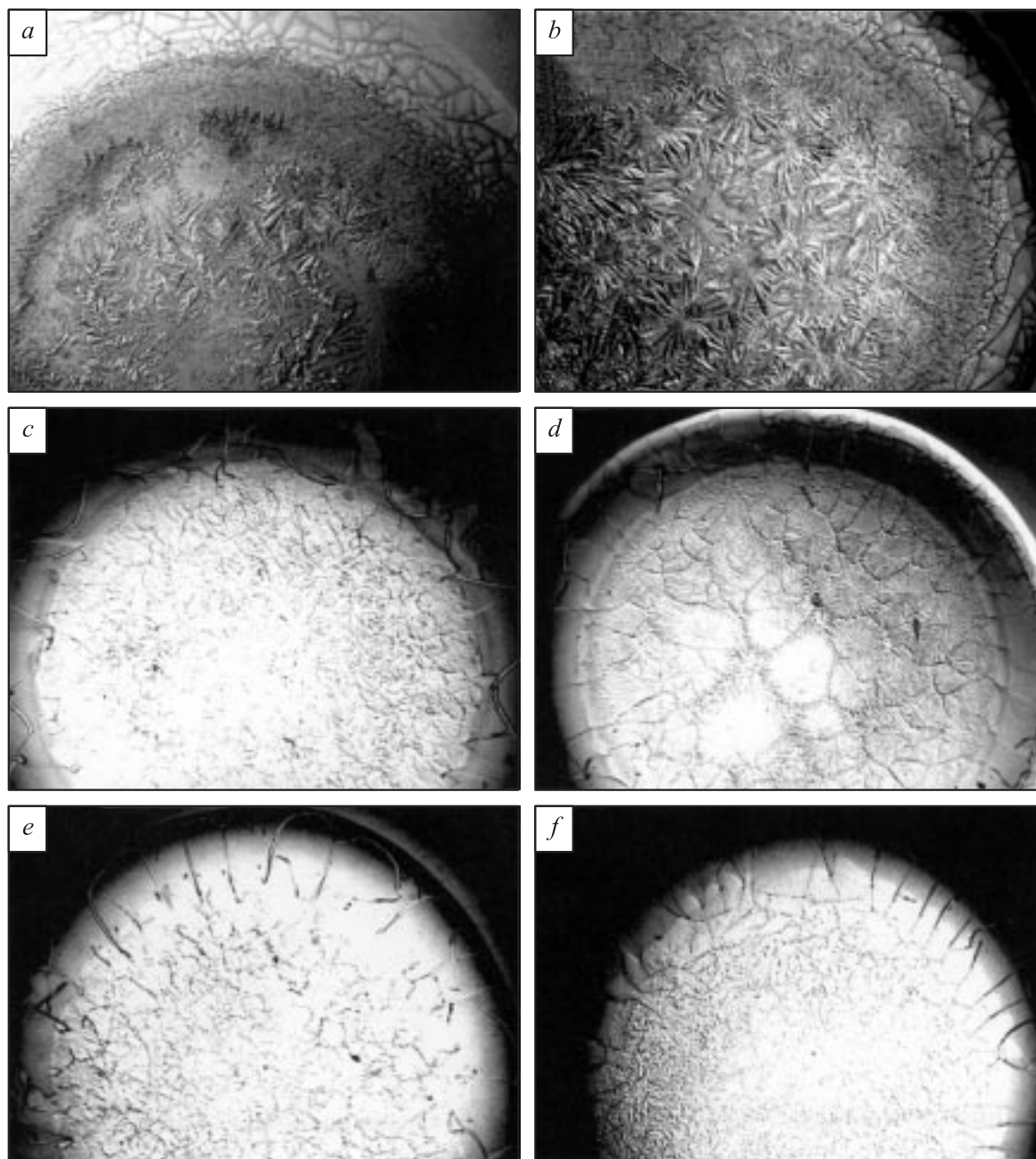
4. Фибронектин (Fn), 420 kDa,  $E(280 \text{ nm}, 1\%) = 13$ .

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 [7,8]. При исследовании смеси белков разного типа использовали соответствующий „контроль концентрации“ с равным массе общего белка содержанием сывороточного альбумина человека (см. таблицу).

Для исследования динамических характеристик структуризации высыхающих капель исследуемых жидкостей использовали программно-аппаратный комплекс, описанный ранее [9,10]. Принцип его работы заключается в следующем. Капля жидкости объемом 5  $\mu\text{l}$  высыхает на поверхности кварцевого резонатора. Резо-

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+IgG	82.0	70	–	12	–
6	HSA+IgG+IgM	84.6	70	–	12	2.16
7	HSA+Fn+IgG+IgM	84.46	70	0.3	12	2.16
8	HSA (контроль 2)	84.46	84.46	–	–	–

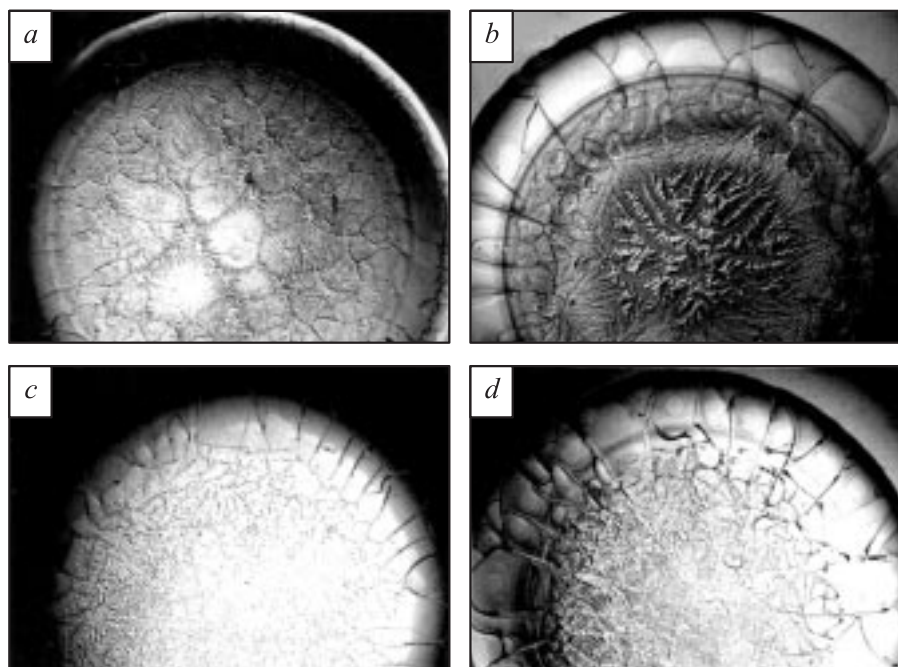


**Рис. 1.** Поверхность высохших капель растворов белков сыворотки крови человека: *a* — HSA; *b* — HSA + Fn; *c* — HSA + IgG; *d* — HSA + IgG + Fn; *e* — HSA + IgG + IgM; *f* — HSA + IgG + IgM + Fn. Добавление в исследуемые растворы фибронектина изменяет характер структуризации капель на границе с воздухом, делая его более упорядоченным.

натор совершает сдвинутые колебания с постоянной частотой 60 kHz. Регистрируемой величиной является комплексная электрическая проводимость резонатора. Регистрируемый сигнал автоматически пересчитывается в единицы акустомеханического импеданса (АМИ) и отображается на дисплее в режиме реального времени. Форма кривой АМИ отражает динамику процесса структуризации высыхающей капли [2]. С помощью разработанного программного обеспечения каждой кривой АМИ ставится в соответствие ряд параметров (индексов формы), вычисляемых по специальным алгоритмам. Ре-

зультаты параметризации и их статистическая обработка выводятся на экран, позволяя количественно сравнивать полученные наборы кривых.

Для морфологического анализа исследуемые жидкости размещали в виде капель объемом 5  $\mu$ l на чистые предметные стекла (по 6–8 капель каждой жидкости) и высушивали при комнатной температуре в течение 2 суток. Препараты фотографировали при малом увеличении микроскопа МБИ-3 с помощью цифровой фотокамеры „Сanon“ под микроскопом Люмам-ИЗ с помощью телевизионной камеры, сопряженной с ком-



**Рис. 2.** Внешний вид высохших капель белково-солевых растворов: *a* — HSA + Fn + IgG; *b* — контроль 1; *c* — HSA + Fn + IgG + IgM; *d* — контроль 2. Добавление в растворы HSA иммуноглобулинов и фибронектина изменяет характер структуризации капель на границе с воздухом.

пьютером. Измеряли средний диаметр высохших на стекле капель.

## Результаты и их обсуждение

Высохшие капли каждого из исследованных белковых растворов имели свои морфологические особенности, которые были хорошо воспроизводимы. При сравнении внешнего вида капель растворов, не содержащих и содержащих фибронектин (рис. 1, левый и правый столбы соответственно), видно, что присутствие фибронектина существенным образом меняет морфологическую картину, делая ее более упорядоченной. Особенно хорошо это заметно в высохших каплях растворов HSA и HSA + IgG (рис. 1, *a-d*). В соответствии с данными, изложенными в предыдущей работе [6], поверхностная активность белков возрастает в следующем порядке:

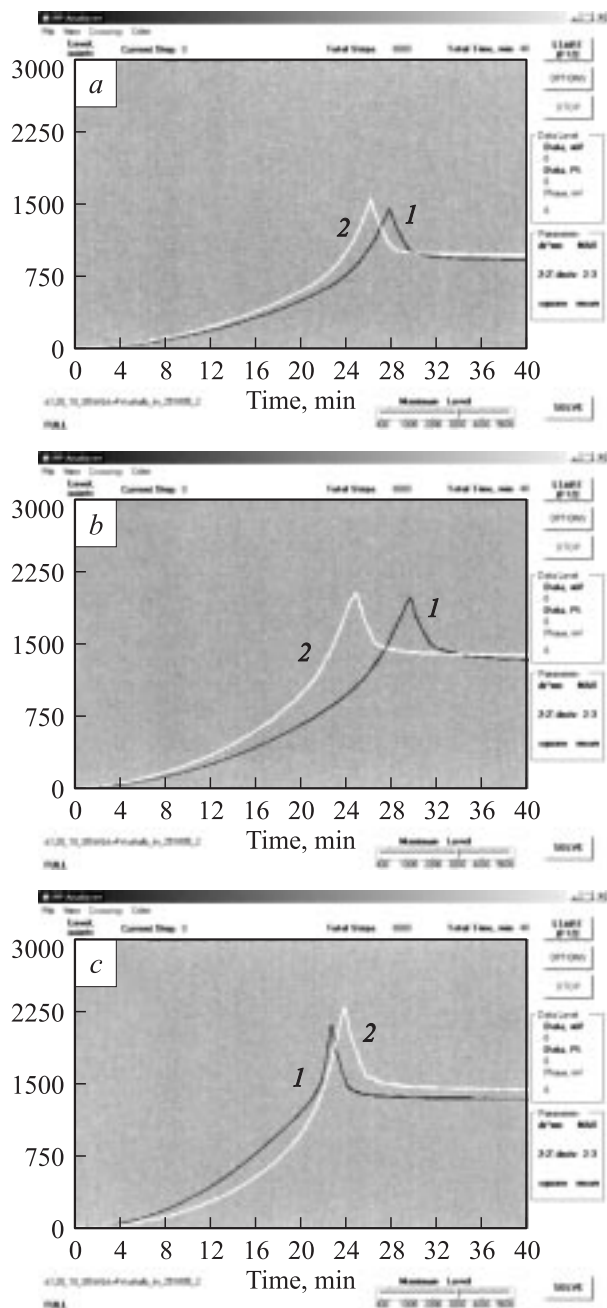
$$\text{HSA} - \text{IgG} - \text{Fn} - \text{IgM}.$$

Следовательно, можно предположить, что в высыхающей капле растворов HSA и HSA + IgG фибронектин располагается на границе с воздухом и, проявляя природные свойства структурного гликопротеина, играет роль „организатора поверхностной структуры“ в адсорбционном слое высыхающих капель белковых растворов. В растворе, содержащем IgM, фибронектин уступает в борьбе за поверхность, и его влияние на структуризацию проявляется меньше. Факт размещения компонентов в высыхающей капле в соответствии с их поверхностной активностью подтверждается также при сравнении

морфологии капель, содержащих иммуноглобулины, и капель соответствующих контрольных растворов тех же концентраций, содержащих только HSA (рис. 2).

Исходная форма капли одного и того же раствора существенно влияет на кинетику испарения. После установления краевого угла смачивания капля раствора, помещенная на твердую подложку, приклепляется к субстрату, и далее площадь соприкосновения капли с подложкой остается постоянной [11,12]. Поэтому, измерив диаметр высохших капель одинакового объема, можно получить информацию о форме жидкой капли (начальной высоте ее купола). Наши эксперименты показали, что между величиной поверхностного натяжения растворов и средним диаметром капель, высушенных на стекле, прослеживается обратная корреляция ( $K = -0.95$ ). В то же время какой-либо определенной зависимости между суммарной весовой концентрацией белков и средним диаметром капель исследуемых растворов выявить не удалось.

На рис. 3 показаны кривые АМИ сравнимых белково-солевых растворов. Начальный этап ( $\sim 4-8$  min) соответствует приклеплению капли к субстрату и образованию белкового кольца по границе раздела трех фаз, далее ( $\sim 8-20$  min) — образование геля на подложке, и наиболее крутой подъем, заканчивающийся пиком, отражает кинетику кристаллизации соли. Снижение кривой после пика соответствует испарению остатков свободной воды, а высота заключительного плато характеризует массу сухого остатка с рыхло связанной водой (в работе [2] более подробно описана динамика кривой АМИ в соответствии с процессами в высыха-

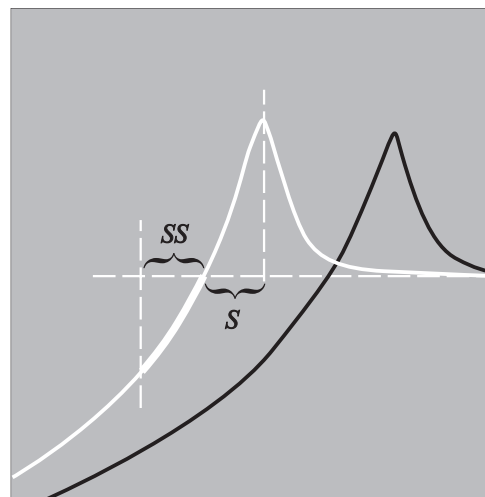


**Рис. 3.** Интерфейс программного обеспечения. Необработанные экспериментальные кривые АМИ высыхающих капель белково-солевых растворов ( $X$  — время, min,  $Y$  — АМИ, а.е.).  $a$  — HSA (1) и HSA + Fn (2);  $b$  — контроль 1 (1) и HSA + Fn + IgG (2);  $c$  — контроль 2 (1) и HSA + Fn + IgG + IgM (2).

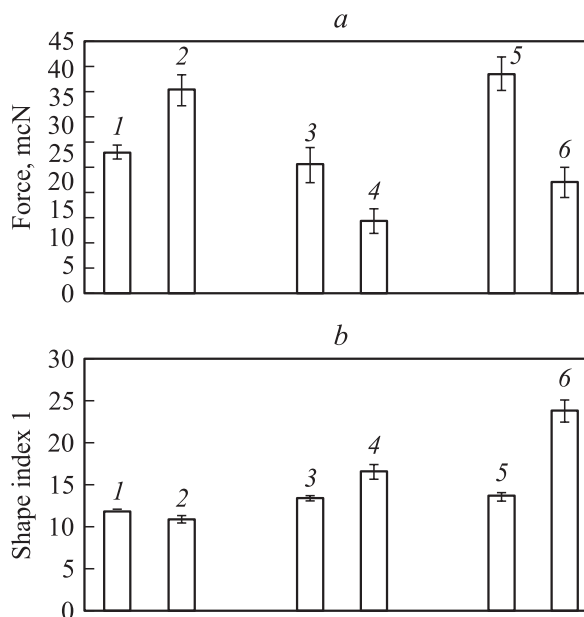
ющей капле). Поскольку процесс кристаллизации соли наиболее хорошо воспроизводим и четко коррелирует с составом исследуемой жидкости [2–4], мы использовали кинетику кристаллизации соли как информативный параметр для сравнительной оценки динамических процессов в высыхающих жидкостях разного состава (рис. 4).

На рис. 5 представлены диаграммы, иллюстрирующие связь между поверхностным натяжением растворов

(пропорциональным силе, измерявшейся в [6]) и индексом формы 1, отражающим кинетику кристаллизации соли в высыхающих каплях. Сопоставление диаграмм свидетельствует о наличии обратной зависимости между соотношением величин поверхностного натяжения в сравниваемых группах растворов и скоростью кристаллизации соли в высыхающих каплях данных растворов.



**Рис. 4.** Фрагмент рис. 3 с обозначением расчетной величины (индекс формы 1). Отрезок  $S$  соответствует времени кристаллизации соли. Длина этого отрезка отложена влево, как показано на рисунке ( $SS$ ). Индекс формы 1 численно равен усредненной производной выделенного участка кривой АМИ.



**Рис. 5.** Диаграммы, иллюстрирующие связь между поверхностным натяжением растворов и скоростью кристаллизации соли в их высыхающих каплях:  $a$  — сила отрыва индентора от поверхности жидкостей [6];  $b$  — индекс формы 1 кривых АМИ высыхающих капель данных жидкостей. 1 — HSA, 2 — HSA + Fn, 3 — контроль 1, 4 — HSA + Fn + IgG, 5 — контроль 2, 6 — HSA + Fn + IgG + IgM.

Поскольку величина начального поверхностного натяжения определяет форму капли, можно заключить, что в более плоских и широких каплях (с большим диаметром сухого остатка) кристаллизация соли происходит быстрее, чем в округлых.

В ходе работы мы смогли убедиться, что компоненты сыворотки крови, несущие традиционную диагностическую информацию о здоровье человека (иммуноглобулины G и M, фибронектин) существенным образом влияют как на морфологические, так и на динамические параметры структуризации высыхающих капель. Это влияние реализуется через изменение поверхностного натяжения и вязкоупругих свойств адсорбционного слоя на границе с воздухом. Таким образом, полученные нами ранее феноменологические данные о возможности медицинской диагностики на основе регистрации динамики АМИ в высыхающих каплях сыворотки крови [4] получили определенное экспериментальное обоснование.

## Список литературы

- [1] Яхно Т.А., Яхно В.Г., Левин Г.Я. и др. // Мат. 4-й Междунар. конф. по математическому моделированию. 27 июня–1 июля 2000 г. М.: МГТУ „Станкин“, 2001. Т. 2. С. 265–275.
- [2] Яхно Т.А., Яхно В.Г., Санин А.Г. и др. // ЖТФ. 2004. Т. 74. Вып. 8. С. 1055–1063.
- [3] Yakhno T., Sanin A., Yakhno V. et al. // Proc. SPIE. Vol. 5692. BIOS-2005. Advanced Biomedical and Clinical Diagnostic Systems III. 20–26 January 2005. San Jose. California. USA, 2005. P. 188–198.
- [4] Yakhno T., Sanin A., Yakhno V. et al. // IEEE Eng. In Medicine and Biology Magazine. 2005. Vol. 24. N 2. P. 96–104.
- [5] Тарасевич Ю.Ю., Аюпова А.К. // ЖТФ. 2003. Т. 73. Вып. 5. С. 13–18.
- [6] Яхно Т.А., Казаков В.В., Санин А.Г. и др. Сравнительная оценка механических свойств адсорбционных слоев в растворах белков сыворотки крови человека // ЖТФ. 2006. Т. 76. Вып. 4. С. 119–123.
- [7] Хейль В., Коберштейн Р., Цавта Б. Референтные пределы у взрослых и детей. Преаналитические предосторожности. М.: Лабпресс, 2001. 176 с.
- [8] Справочник по клиническим лабораторным тестам. М.: АГАТ-МЕД, 2001. 192 с.
- [9] Яхно Т.А., Яхно В.Г., Санин А.Г., Шмелев И.И. // Биофизика. 2002. Т. 47. № 6. С. 1101–1105.
- [10] Yakhno T.A., Yakhno V.G., Sanin A.G. et al. // Proc. SPIE. Bioengineered and Bioinspired Systems. 19–21 May 2003. Maspolamas. Gran Canartia. Spain, 2003. Vol. 5119. P. 87–99.
- [11] Deegan R.D. // Phys. Rev. E. 2000. Vol. 61. N 1. P. 457–485.
- [12] Deegan R.D., Bakajin O., Dupont T.F. // Phys. Rev. E. 2000. Vol. 62. N 1. P. 756–765.