

УДК 612.664.1

МЕТОД МЕЖФАЗНОЙ ТЕНЗИОМЕТРИИ ДЛЯ СРАВНИТЕЛЬНОГО АНАЛИЗА МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМ И КРОВИ КАК ВАЖНЕЙШЕЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ

С.Ю. Зайцев

(Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина»; e-mail: szaitsev@mail.ru)

Межфазная тензиометрия – информативный коллоидно-химический метод для анализа жидкостей, который используется во многих областях естественных наук и медицинской практике. Этот метод в виде измерения динамического поверхностного натяжения (ДПН) предложен для изучения плазмы (сыворотки) крови животных и смесей белков, липидов и солей в качестве модельных систем. Установлено, что солевой раствор влияет значительно меньше на водные дисперсии лецитина по сравнению с таковыми для белков. Получены значения ДПН и биохимических показателей сыворотки крови коров для одних и тех же образцов. Установлена корреляция между данными ДПН и биохимическими показателями сыворотки крови, которые имеют как фундаментальное, так и прикладное значение в лабораторной диагностике.

Ключевые слова: межфазная тензиометрия, динамическое поверхностное натяжение, сыворотка крови, биохимические показатели, корреляция.

В последнее время современные методы измерения динамического поверхностного натяжения (ДПН) успешно применяются для изучения различных биологических жидкостей [1–3]. Применение такого коллоидно-химического метода для анализа крови имеет особое значение для ветеринарии и биомедицины в целом. Сделаны некоторые попытки определить статическое поверхностное натяжение в образцах сыворотки крови или плазмы, но не изучены специфические различия по возрасту и полу человека [4, 5], не установлена статистическая корреляция результатов с уровнем общего сывороточного холестерина и ферментов сыворотки крови [5], не изучена зависимость содержания свободного «плазменного» гемоглобина от особенностей кровообращения и типом оксигенатора [6]. Ранее успешные исследования биологических жидкостей человека были выполнены только в Донецком медицинском университете [1, 2] с помощью приборов для измерения ДПН и технологий, разработанных в Макс-Планк-Институте коллоидов и поверхностей и внедренных на фирме «Sinterface» (Германия) [7]. Важно подчеркнуть, что до начала наших работ [3, 8] не было установлено достоверных корреляций между результатами измерения ДПН и наиболее важными биохимическими параметрами крови животных. В области ветеринарии изучение ДПН (особенно его зависимость

от физиологического состояния животного, его биохимического статуса и содержания различных биохимических веществ в биологических жидкостях) может дать ценную информацию для ранней оценки физиолого-биохимического статуса организма, для общего обследования скота перед вакцинацией (иммунизацией) или убоем, для быстрого распределения животных на здоровых и больных в случае появления инфекции и т.д. Для коллоидной химии важно накопление большого массива данных о модельных и биологических жидкостях, усовершенствование методов и внедрение технологий в хозяйственную деятельность.

Цель данной работы – изучение параметров динамического поверхностного натяжения (ДПН) смесей, состоящих из белков, липидов и солей; изучение биохимических параметров и ДПН сыворотки крови животных; установление корреляции между биохимическими параметрами и параметрами ДПН различных систем.

Материал и методы

Метод измерения максимального давления в пузырьке воздуха, висящем в жидкости (maximal pressure in the buoyant bubble) как один из методов межфазной тензиометрии позволяет получить большой массив значений динамического поверхностного натяжения, которые визуализи-

руются в кривые зависимости поверхностного натяжения (σ) в широком временном диапазоне, называемые «тензиограммами» [1, 2]. Для измерения образцов модельных систем и биологических жидкостей использовали наиболее компактный и удобный, по нашему мнению, тензиометр «ВРА-1Р» («Sinterface», Германия) с установлением следующих параметров ДПН: σ_1 – очень короткий промежуток времени существования поверхности раздела фаз (0,1 с), σ_2 – средний промежуток времени (1 с), σ_3 – большой промежуток времени (100 с), а также наклоны начального и конечного участков «тензиограмм» (λ_0, λ_2) [1–3].

Исследованы образцы крови от здоровых животных (32 коровы в возрасте примерно 2 лет). Все манипуляции с животными проводили с одобрения Комитета по уходу за животными Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии, в соответствии с общепринятыми международными правилами. Образцы крови отбирали в пробирки без антикоагулянта и хранили при -20°C . Биохимические анализы крови проводили с помощью спектрофотометра «КФК-2-UChL» и стандартных биохимических наборов («DIACOM», Россия). Важно использовать свежие образцы сыворотки крови (только в нескольких случаях для дальнейших измерений с целью контроля использовали замороженные образцы), так как данные ДПН для сыворотки после процедуры повторного замораживания довольно сильно отличаются от значения, полученного в случае свежего образца.

Статистический и корреляционный анализ полученных данных выполнен с помощью общих статистических программ для Windows с критическими значениями критерия надежности на основе распределений Стьюдента (P)

0,05; 0,01; 0,001 и коэффициентами корреляции $r > 0,7$; $r = 0,5-0,7$; $r < 0,5$ соответственно.

Результаты и обсуждение

Основные системы, моделирующие плазму крови или сыворотку крови животных и человека, представляют собой смеси их основных компонентов, таких как белки, липиды и соли. Примером могут служить следующие смеси: 1) бычий сывороточный альбумин (БСА) как главная белковая фракция плазмы (сыворотки) крови; 2) природный фосфатидилхолин (ФХ) или так называемый лецитин; 3) хлорид натрия (NaCl) как основной солевой компонент плазмы (сыворотки) крови. Для того чтобы изучить и понять поведение таких сложных систем с помощью метода межфазной тензиометрии (измерения ДПН), важно начать измерения с растворов отдельных компонентов. В первую очередь были получены тензиограммы ДПН для водных растворов БСА в концентрации 30–80 г/л (табл. 1). Такие условия близки к диапазону концентраций общего белка в плазме (или сыворотке) крови человека и основных видов животных.

Данные, приведенные в табл. 1, соответствуют результатам, полученным ранее с помощью другого метода – метода «висячей капли» [7]. Параметры ДПН водных растворов БСА (табл. 1) при коротком времени существования поверхности раздела фаз (σ_1) практически совпадают с таковыми для бидистиллированной воды. Параметры ДПН растворов БСА уменьшаются на 4–6% при среднем времени (σ_2) по сравнению с коротким промежутком времени (σ_1). При большом промежутке времени (σ_3) параметры ДПН достигают минимальных значений порядка 55,9–58,4 мН/м, которые примерно на 25–30% ниже, чем в случае короткого времени (σ_1). Эти значения соответствуют равновесным значениям ДПН в растворах с

Т а б л и ц а 1

Параметры динамического поверхностного натяжения водных растворов БСА

БСА, г/л	σ_1 , мН/м	σ_2 , мН/м	σ_3 , мН/м	λ_0 , мН·м ⁻¹ ·с ^{-1/2}	λ_2 , мН·м ⁻¹ ·с ^{-1/2}
30	71,56±0,16	69,1±0,2	58,4±0,2	6,51±0,12	13,3±0,3
40	71,9±0,3	67,2±0,2	56,7±0,2	6,1±0,2	13,82±0,12
50	70,9±0,3	67,03±0,19	57,1±0,3	7,32±0,12	11,51±0,12
60	70,1±0,3	67,5±0,3	55,9±0,3	5,43±0,12	15,42±0,13
70	71,9±0,2	66,3±0,3	56,6±0,3	5,6±0,2	12,7±0,2
80	72,9±0,2	68,3±0,3	56,25±0,18	7,12±0,13	15,92±0,12

низкой концентрацией БСА. Наклоны начальной (λ_0) и конечной (λ_2) частей тензиограммы отличаются в 1,5–2 раза, что можно рассматривать как ценный параметр анализа ДПН. Наблюдаемые изменения (табл. 1) могут объясняться действием некомпенсированного электрического заряда белковых молекул, адсорбированных на поверхности.

Таким образом, параметры ДПН несколько отличались для растворов с низкими и высокими концентрациями БСА в определенном диапазоне времени существования поверхности раздела фаз. Важно, что только когда концентрация глобулярных белков становится меньше 10 г/л, они могут представлять собой в таких растворах отдельные или неассоциированные молекулы [2]. Такие неассоциированные белковые молекулы способны к быстрой адсорбции на границе раздела. При более высокой концентрации белка ассоциация белковых молекул происходит в объеме раствора. Важно подчеркнуть, что концентрация таких не-

ассоциированных молекул в растворах практически постоянна, если существует достаточно высокая концентрация общего белка в растворе. Это объясняет слабое влияние концентрации БСА на значения динамического поверхностного натяжения растворов БСА.

Известно, что хлорид натрия и подобные соли относятся к поверхностно-инактивным веществам [1–3]. Таким образом, NaCl не адсорбируется на поверхности и не вызывает почти никаких изменений параметров ДПН при измерении их растворов при концентрации 110–160 мМ (табл. 2).

Важно оценить влияние фосфолипидов на ДПН модельных систем, например, таких как дисперсные растворы водного лецитина (Л) в концентрациях, близких к таковым в сыворотке животных (табл. 3). Оказалось, что лецитин не оказывает существенного влияния на параметры ДПН в дистиллированной воде, независимо от концентрации лецитина и диапазона времени су-

Т а б л и ц а 2

Параметры динамического поверхностного натяжения водных растворов хлорида натрия

NaCl, мМ	σ_1 , мН/м	σ_2 , мН/м	σ_3 , мН/м	λ_0 , мН·м ⁻¹ ·с ^{-1/2}	λ_2 , мН·м ⁻¹ ·с ^{-1/2}
110	72,93±0,17	71,48±0,18	70,8±0,2	1,51±0,11	1,12±0,11
120	72,1±0,2	71,6±0,2	71,2±0,2	0,72±0,12	0,5±0,3
130	72,9±0,2	71,72±0,11	71,2±0,3	0,9±0,2	0,7±0,2
140	72,8±0,3	71,77±0,17	71,3±0,3	0,9±0,2	0,41±0,12
150	73,9±0,3	72,3±0,2	71,9±0,3	2,2±0,2	0,5±0,2
160	72,9±0,2	71,48±0,18	70,8±0,2	1,51±0,11	1,12±0,11

Т а б л и ц а 3

Параметры динамического поверхностного натяжения водного раствора лецитина (Л) и его смесей с водными растворами NaCl и БСА

Лецитин (мМ), БСА (г/л), NaCl (мМ)	σ_1 , мН/м	σ_2 , мН/м	σ_3 , мН/м	λ_0 , мН·м ⁻¹ ·с ^{-1/2}	λ_2 , мН·м ⁻¹ ·с ^{-1/2}
Л-1	72,2±0,2	70,70±0,19	70,42±0,11	1,17±0,12	0,3±0,3
Л-2	71,9±0,3	71,20±0,16	70,93±0,06	1,76±0,13	0,3±0,2
Л-3	72,8±0,3	71,6±0,2	71,21±0,15	1,62±0,12	0,52±0,11
Л-4	72,3±0,2	71,2±0,2	70,99±0,13	2,4±0,2	0,25±0,13
Л-3 с БСА-40	72,9±0,2	67,3±0,3	51,92±0,08	6,45±0,13	19,73±0,12
Л-3 с NaCl-140	72,9±0,2	72,0±0,2	65,52±0,12	1,3±0,2	10,93±0,15

Т а б л и ц а 4

Результаты корреляционного анализа между показателями динамического поверхностного натяжения (ДПН) и биохимическими показателями сыворотки крови крупного рогатого скота

ДПН \ Биохимия	σ_1 , мН/м	σ_2 , мН/м	σ_3 , мН/м	λ_0 , мН·м ⁻¹ ·с ^{-1/2}	λ_z , мН·м ⁻¹ ·с ^{-1/2}
Общий белок, г/л	↑↑↑	↑↑	↓	↑↑↑	↑↑↑
Альбумины, г/л	↓	↑	↓↓	↓↓	↓↓
Триглицериды, мМ	↑↑↑	↑↑	↓	↑↑↑	↑↑↑
Натрий, мМ	↑↑	↑↑↑	↓↓↓	↓	↓
Хлориды, мМ	↓↓↓	↓↓↓	↑↑↑	↓↓	↓↓

↑(↓) – слабо положительная (отрицательная) корреляция, коэффициент корреляции от 0,01 до 0,29; ↑↑(↓↓) – средне положительная (отрицательная) корреляция, коэффициент корреляции 0,3 до 0,69; ↑↑↑(↓↓↓) – сильно положительная (отрицательная) корреляция, коэффициент корреляции более 0,69.

существования границы раздела фаз. Напротив, при добавлении водных дисперсий лецитина (3 мМ) к раствору белка параметры ДПН снижаются на 6 и 27% соответственно при среднем и длинном промежутках времени. Значения наклонов (λ_0 и λ_z) тензиограмм отличаются на порядки (в 4 и 38 раз соответственно). Таким образом, параметры ДПН существенно зависят от наличия как белковых, так и липидных молекул в среде. При добавлении водной дисперсии лецитина (3 мМ) к солевому раствору наблюдалось снижение параметров ДПН на 8% только при большом временном интервале. Так, солевой раствор влияет значительно меньше на водные дисперсии лецитина по сравнению с таковыми для белков.

Для всех исследуемых групп животных максимальные значения ДПН наблюдались при очень коротких временных интервалах ($\sigma_1 = 71,1 \pm 0,7$ мН/м). Затем поверхностное натяжение сыворотки крови постепенно снижалось (с увеличением времени существования поверхности) приблизительно на 7,5%.

Значения ДПН при средних (σ_2) или длинных (σ_3) промежутках времени составляют $68,1 \pm 0,4$ или $66,0 \pm 1,0$ мН/м соответственно. Таким образом, каждый из этих двух параметров находится приблизительно на том же уровне с учетом погрешности измерений. Наклон начальной (λ_0) и конечной (λ_z) частей тензиограммы составляет $3,3 \pm 0,3$ и $5,06 \pm 0,19$ мН·м⁻¹·с^{-1/2}, т.е. наклон конечной части значительно выше.

Для того чтобы определить влияние отдельных компонентов сыворотки на данные пара-

метры ДПН, проводили биохимический анализ показателей сыворотки крови, таких как содержание общего белка, альбуминов, триглицеридов, натрия, хлоридов и т.д. (т.е. тех параметров, которые имеют наибольшее влияние на значения ДПН биологических жидкостей). При наличии такого набора данных были рассчитаны коэффициенты корреляции между ДПН и биохимическими показателями (табл. 4).

Сильная положительная корреляции была установлена (для крупного рогатого скота) между σ_1 , обоими углами наклона и уровнем общего белка и триглицеридов; между σ_2 и уровнем натрия; между σ_3 и уровнем хлоридов. Сильные отрицательные корреляции были обнаружены (для крупного рогатого скота) между σ_1 , σ_2 и уровнем хлоридов, между σ_3 и уровнем натрия (табл. 4).

Таким образом, установлено, что основное влияние на параметры ДПН оказывают липид-белковые смеси. Получены корреляции, показавшие тесную взаимосвязь между биохимическими показателями сыворотки крови животных и соответствующими значениями динамического поверхностного напряжения. Такие корреляции крайне важны как для фундаментальных исследований, так и для применения в ветеринарии и медицине.

Автор благодарен сотрудникам кафедры химии ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина: И.В. Милаевой, Е.Н. Зарудной, Н.А. Довженко и М.С. Царьковой за оказание технической помощи и ценные замечания.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-16-00046).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Возьянов, А.Ф., Казаков В.Н., Синяченко О.В., Файнерман В.Б., Миллер Р.* Поверхностное тензиометрия и реометрия в нефрологии. Донецк, 1999. С. 126.
2. *Kazakov V.N., Sinyachenko O.V., Fainerman V.B., Pison U., Miller R.* In *Studies in Interface Science* (eds. D. Möbius, R. Miller). Elsevier, Amsterdam, 2000. P. 34.
3. *Зайцев С.Ю.* Супрамолекулярные наноразмерные системы на границе раздела фаз. Концепции и перспективы для бионанотехнологий. М., 2010. С. 29.
4. *Harkins H.N., Harkin W.D.* J. of Clinical Investigation. 1929. N 7. P. 263.
5. *Hrncir E., Rosina J.* Physiology Research. 1997. Vol. 46. P. 319.
6. *Butler B.D., Conti V.R.* Perfusion. 1986. N 1. P. 187.
7. *Fainerman V.B., Miller R.* In *Studies in Interface Science* (eds. D. Möbius, R. Miller). Elsevier, Amsterdam, 1998. P. 279.
8. *Zaitsev S.Yu., Milaeva I.V., Zarudnaya E.N., Maximov V.I.* Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects. 2011. Vol. 383. P. 109.

Поступила в редакцию 01.03.2016

INTERFACIAL TENSOMETRY METHOD FOR THE ANALYSIS OF MODEL SYSTEMS IN COMPARISON WITH BLOOD AS THE MOST IMPORTANT BIOLOGICAL LIQUID

S.Yu. Zaitsev

(Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Moscow state Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – MVA by K.I. Skryabin")

Interfacial tensiometry of various liquids is an informative colloid-chemical method for the analysis of various liquids in many areas of sciences and medical practice. This method of dynamic surface tension (DST) measurements proposed for the study of plasma (serum) animal blood and mixtures of proteins, lipids and salts as model systems. It is found that the saline affects significantly less of lecithin aqueous dispersion in comparison with those of the proteins. The DST values and biochemical parameters of the cows blood serum of the same sample were obtained. Correlations between the DST values and biochemical parameters of blood serum were found, which are both fundamental and practical importance in laboratory diagnostics.

Key words: interfacial tensiometry, dynamic surface tension, blood serum, biochemical parameters, correlations.

Сведения об авторах: *Сергей Юрьевич Зайцев* – зав. кафедрой химии имени профессоров С.И. Афонского, А.Г. Малахова, ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА им. К.И. Скрябина, докт. биол. наук, докт. хим. наук, профессор (szaitsev@mail.ru).