УДК 577.3

© А. А. Зинченко, И. В. Нога, В. М. Шаталов

ВЛИЯНИЕ ДЕГАЗАЦИИ ПРИ ЦЕНТРИФУГИРОВАНИИ НА НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ

Донецкий национальный университет; 83050, г. Донецк, ул. Щорса, 46
e-mail: inna.noga@gmail.com

Зинченко А. А., Нога И. В., Шаталов В. М. **Влияние дегазации при центрифугировании на некоторые показатели крови**. – Центрифугирование образцов дистиллированной воды приводит к возрастанию pH от 6,57 при 30°C до 7,25 при 36°C, что обусловлено дегазацией и выходом углекислоты. Дальнейшей возврат к равновесному pH происходит немонотонно в зависимости от степени дегазации. Предложена математическая модель, описывающая как процесс дегазации при центрифугировании через выход микропузырьков воздуха, так и последующий возврат раствора к равновесию. Показано, что продолжительность центрифугирования немонотонно влияет на скорость оседания эритроцитов и активность протромбиназы, что свидетельствует о важной роли микропузырьков в определении этих показателей крови.

Ключевые слова: центрифугирование, дегазация, поверхностное натяжение, кислотность, скорость оседания эритроцитов, протромбин.

Центрифугирование широко используется в промышленности, например, как метод дегазации и удаления углекислоты при подготовке воды для отопительных систем. Центрифугирование также часто используются в биологии и медицине для разделения компонентов раствора при определении различных параметров таких, например, как активность каталазы или скорость оседания эритроцитов и др. При этом вопрос о влиянии сопутствующей дегазации среды на измеряемые показатели остается невыясненным. Актуальность этой проблемы следует из работы [1], где было показано, что дегазация воды приводит к изменению ее структурных свойств, что выражается в увеличении коэффициента поверхностного натяжения. Изменение гидрофобного взаимодействия в дегазованной водной среде может послужить причиной изменения активности белков и других наблюдаемых биологических эффектов [2]. В этой связи в настоящей работе исследуются динамика дегазации воды при центрифугировании и влияние продолжительности центрифугирования на некоторые показатели крови.

Шесть образцов дистиллированной воды, выдержанной в открытом сосуде в течение трех суток после приготовления, вращались в центрифуге с угловой скоростью 2000 об/мин в пробирках объемом 20 мл в течение t_d = 5, 10, 15, 20, 30 и 40 минут соответственно. До и после центрифугирования измерялись температура и показатель кислотности pH образцов.

На рис. 1 (слева) представлена зависимость pH от времени центрифугирования t_d, значения последнего для каждого образца указаны в рамке у соответствующего маркера. Как видно из рисунка, pH растет с ростом t_d начиная с 6,57 и приближаясь асимптотически к предельному значению 7,25.

После центрифугирования мы проследили возврат pH к равновесному значению в процессе спонтанного насыщения воздухом. Довольно неожиданно в тех образцах, в которых при центрифугировании показатель pH не достиг предела, наблюдалось продолжение роста pH до предельного значения, после чего происходила релаксация к исходному значению. На рис. 1 (справа) представлена зависимость pH от времени поглощения воздуха t_s. Стрелки указывают, какие точки на графике дегазации (слева) стали начальными на графике растворения (справа), нижняя штриховая линия – исходный уровень pH. Интересно отметить, что для всех образцов сумма времени дегазации и положения максимума pH на графике растворения примерно равна 40 минутам.

Центрифугирование приводило также к незначительному возрастанию температуры образцов от 30 до, максимум, 36°C при t_d = 40 мин. Согласно [3] такой нагрев дегазованной воды приводит к уменьшению pH на 0,09, что обусловлено увеличением вероятности диссоциации молекул H_2O. Наблюдаемое нами сразу после центрифугирования изменение pH почти на порядок больше температурного и направлено в противоположную сторону.

При нормальных условиях вода, находящаяся в контакте с воздухом достаточно продолжительное время, содержит 1,9% (объемных) воздуха, в том числе 0,028% углекислого газа. Последний, реагируя с водой, образует угольную кислоту, диссоциация которой наряду с равновесной диссоциацией H_2O определяет измеренное до центрифугирования значение pH. Уменьшение кислотности после центрифугирования объясняется выходом углекислоты. Это означает, что, по закону Дальтона, из воды выходят также и другие газы воздуха. Таким образом, измеряя pH, можно судить о степени дегазации воды.

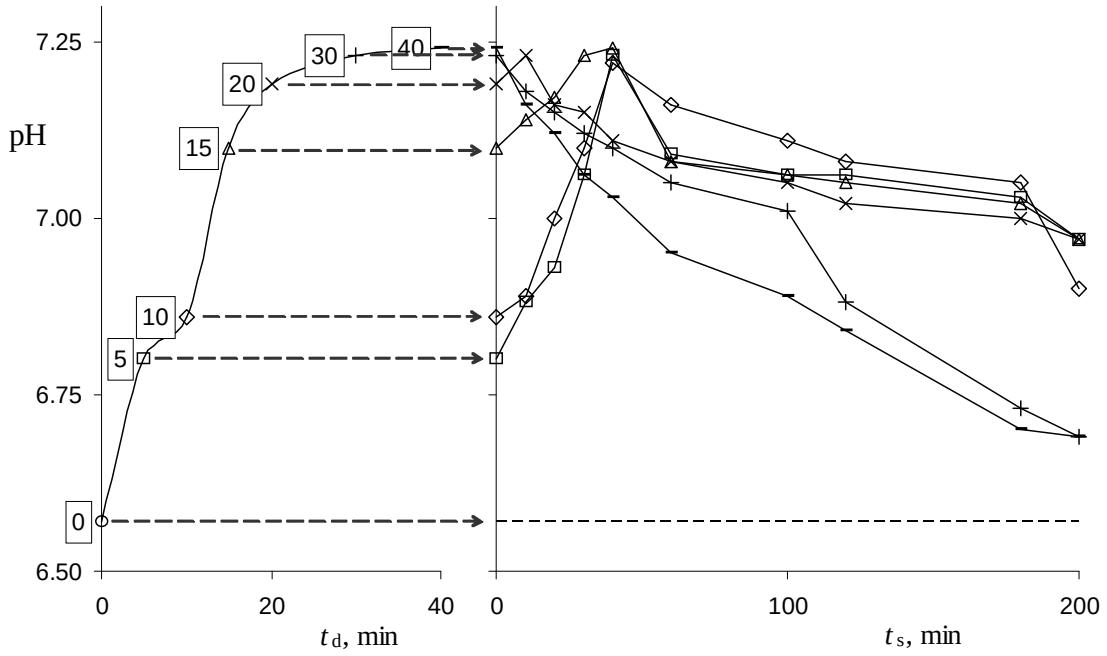

Рис. 1. Слева – график дегазации, зависимость pH воды от времени центрифугирования t_d, значения которого для каждого образца указаны в рамке у соответствующего маркера; справа – график растворения, дальнейшее восстановление pH каждого образца после центрифугирования до уровня контроля (нижняя штриховая линия) в зависимости от времени поглощения воздуха t_s. Стрелки указывают, какие точки на графике дегазации являются начальными на графике растворения.

Анализируя экспериментальные зависимости (см. рис. 1), можно прийти к выводу, что процесс дегазации при центрифугировании и дальнейший возврат к равновесному насыщению воздухом можно разбить на три стадии.

1. Как известно, небольшая часть растворенного в воде воздуха собирается в пузырьки нанометровых размеров (с чем связан голубой цвет чистой воды в морях и озерах). Сразу после начала центрифугирования при малых t_d, которые не выявляются в этом опыте, под действием центробежного давления происходит быстрое укрупнение микропузырьков за счет десольватации газов из окружающего пузырек объема до его полного истощения. Сближение и рост микропузырьков воздуха могут происходить также под действием сил Бьеркнеса [4] в акустическом поле вращающейся центрифуги.

2. Микропузырьки всплывают на поверхность под действием выталкивающей силы Архимеда. Во время вращения центрифуги эта сила увеличивается многократно за счет центробежного ускорения. Скорость всплытия пузырьков определяется противодействующей силой вязкого трения, которая, по формуле Стокса, пропорциональна скорости. Время полной дегазации при центрифугировании получается делением высоты столба жидкости на скорость всплытия. При меньших временах и неполной дегазации всплытие пузырьков (и связанная с этим дегазация жидкости) продолжается и после

остановки вращения, но с меньшей скоростью, что наблюдается как рост pH до предельного значения, соответствующего полной дегазации.

3. Одновременно с процессом выхода газов из воды, который ускоряется центрифугированием, происходит медленный обратный процесс поглощения газов на границе с воздухом. После всплытия всего столба микропузырьков процесс поглощения становится преобладающим, что и определяет наблюдаемое снижение pH до равновесного значения.

Определим степень дегазации как

$$D = \frac{pH(t) - pH(0)}{pH(t_{\max}) - pH(0)}, \tag{1}$$

где $t_{\max} \approx 50$ мин – это время дегазации до предельного значения pH ≈ 7,25.

Руководствуясь проведенным выше анализом, можно получить упрощенную зависимость степени дегазации от времени:

$$D(t_{\mathrm{d}}, t_{\mathrm{s}}) = \begin{cases} 1 - \exp\left(-\dfrac{t_{\mathrm{d}}}{\tau_1}\right) + \dfrac{t_{\mathrm{s}}}{\tau_2}, & \text{при} \quad 1 - \exp\left(-\dfrac{t_{\mathrm{d}}}{\tau_1}\right) + \dfrac{t_{\mathrm{s}}}{\tau_2} < 1; \\ \exp\left[-\dfrac{t_{\mathrm{s}} - \tau_2}{\tau_3} - \dfrac{\tau_2}{\tau_3}\left(1 - \exp\left(-\dfrac{t_{\mathrm{d}}}{\tau_1}\right)\right)\right], & \text{при} \quad 1 - \exp\left(-\dfrac{t_{\mathrm{d}}}{\tau_1}\right) + \dfrac{t_{\mathrm{s}}}{\tau_2} \geq 1. \end{cases} \tag{2}$$

Здесь t_{d} и t_{s} – времена центрифугирования и последующей выдержки на воздухе, τ_1, τ_2 и τ_3 – характерные времена вышеуказанных этапов, равные 10, 50 и 100 минут соответственно.

Результаты расчета по формуле (2), приведенные на рис. 2, в целом неплохо согласуются с опытом. По мере увеличения времени центрифугирования степень дегазации возрастает до предельного значения, а после выдержки на воздухе степень дегазации ведет себя немонотонно в зависимости от достигнутого при центрифугировании уровня дегазации.

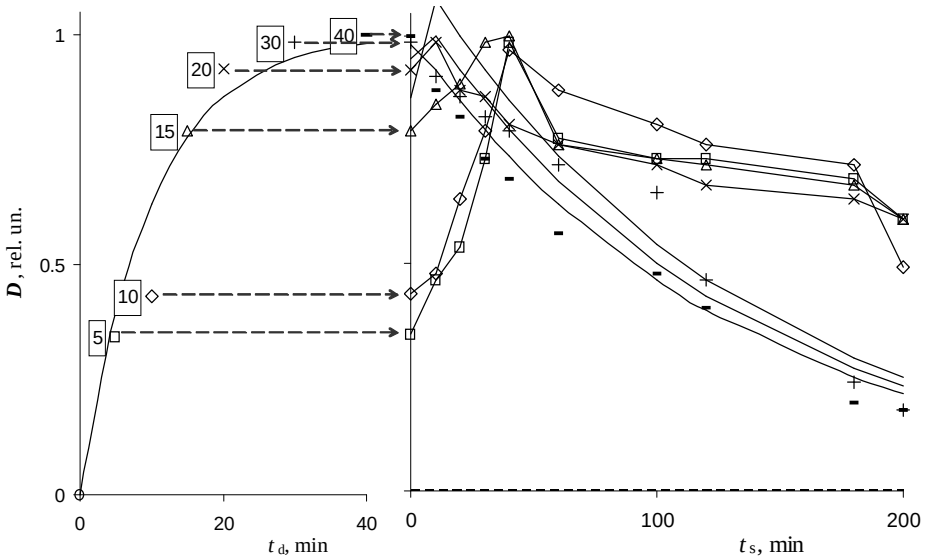

Рис. 2. Слева – зависимость степени дегазации D от времени центрифугирования t_{d}, (сплошная линия – расчет, ромбы – эксперимент); справа – зависимости от времени поглощения воздуха t_{s} (сплошные линии – расчетные кривые для t_{d} = 5, 20 и 40 min, точки – соответствующие экспериментальные значения).

Таким образом, центрифугирование приводит к дегазации и, следовательно [1, 2], к изменению структурных свойств воды. Эти изменения носят немонотонный характер с последействием, что, очевидно, не может не отразиться на результатах измерений других свойств водных растворов, например, активности белков. Как пример проявления такой

неоднозначности мы исследовали влияние центрифугирования на скорость оседания эритроцитов.

Пять образцов крови потенциально здоровых доноров помещались в центрифугу на разное время, после чего измерялся показатель СОЭ. Результаты измерений представлены на рис. 3. Для удобства сравнения разных образцов по оси ординат отложены значения СОЭ, отнесенные к начальным значениям, указанным справа от соответствующих кривых. Несмотря на большой разброс экспериментальных точек, можно отметить некоторые общие закономерности поведения показателя СОЭ в зависимости от времени центрифугирования. В течение первых десяти минут (неполная дегазация) наблюдается в среднем трехкратное уменьшение СОЭ. Возможно, кислород, растворенный в плазме (примерно 2%), освобождается быстрее, чем связанный с гемоглобином. Кроме того, также выходят и другие слабо связанные с белками газы, что увеличивает вязкость крови. При последующем росте t_d до 60 мин (почти полная дегазация) СОЭ резко возрастает в несколько раз. Можно предположить, что этот рост обусловлен полной дегазацией биожидкости и удалением кислорода, который был связан с гемоглобином, что согласуется с выводами работы [5] – чем менее насыщен эритроцит кислородом, тем больше скорость его оседания. Как видно из рис. 3, после часа центрифугирования снова наблюдается спад СОЭ, который продолжается с ростом t_d до 180 мин до различных значений для разных образцов, без какой-либо корреляции с соответствующими начальными значениями. Причиной наблюдаемых изменений СОЭ при центрифугировании может быть также изменение степени агрегации эритроцитов вследствие изменения гидрофобного эффекта при дегазации.

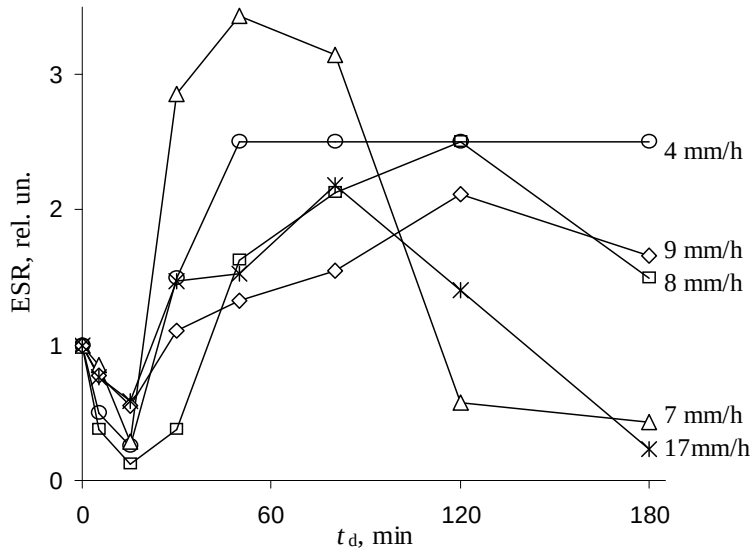

Рис. 3. Скорость оседания эритроцитов в зависимости от времени центрифугирования t_d для пяти образцов крови с различными начальными значениями СОЭ, указанными справа от соответствующих кривых.

Таким образом, продолжительность центрифугирования немонотонно влияет на скорость оседания эритроцитов, что свидетельствует о важной роли микропузырьков в определении этого показателя крови.

Как известно, динамику внешнего пути системы свертывания крови определяет активность протромбинового комплекса [6]. При этом плазма крови с минимальным содержанием кислорода имеет максимальную активность протромбиназы и наоборот. Протромбиновое время (время свертывания крови) T_A удлиняется по мере насыщения крови кислородом [7]. Значит, дегазация должна уменьшать протромбиновое время, то есть увеличивать активность протромбиназы.

Чтобы проверить, как влияет дегазация на активность протромбиназы, нами исследована кинетика активации системы свертывания крови в неразбавленной свежей

донорской плазме при различных временах центрифугирования t_d. Опыты проводились в условиях постоянной контактной активации, величину которой оценивали, измеряя скорость реакции протромбинового комплекса на изменение степени насыщения плазмы кислородом. Использовалась обедненная тромбоцитами плазма, полученная из крови здоровых доноров, с цитратным раствором путем центрифугирования при 3000 об/мин в течение 15 мин при комнатной температуре. Свертывание в такой системе остановлено тем, что большая часть кальция связана с цитратом. В роли тканевого фактора, запускающего каскад свертывания, использовался стандартизированный тромбопластин (техпластин-тест) [8]. Все измерения проводились при постоянном перемешивании при температуре 37°С. Протромбиновое время измерялось с момента добавления в пробу тромбопластин-кальциевой смеси до момента образования нитей фибрина. Контрольные пробы, те, что центрифугировались 15 минут, не меняли своих показателей в течение всего эксперимента.

На рис. 4 представлены полученные зависимости T_A от t_d для трех различных образцов плазмы, отнесенные к стандартному времени центрифугирования контрольных образцов 15 мин. Как видно из рис. 4, с увеличением времени обработки до 60 мин протромбиновое время уменьшается вдвое (активность протромбиназы растет), что связано, по-видимому, с полной дегазацией плазмы и согласуется с известной зависимостью T_A от степени насыщения плазмы кислородом [7]. При дальнейшем увеличении t_d активность протромбиназы падает, T_A возрастает в несколько раз. Причины такого немонотонного поведения $T_A(t_d)$ не ясны. Падение T_A в области дегазации $t_d < 60$ мин можно было бы связать с ростом активности протромбиназы в результате изменения гидрофобного взаимодействия при дегазации [2], а дальнейший рост, возможно, обусловлен деградацией белка при механическом воздействии, поскольку при $t_d > 100$ мин свертывания в системе вообще не происходит.

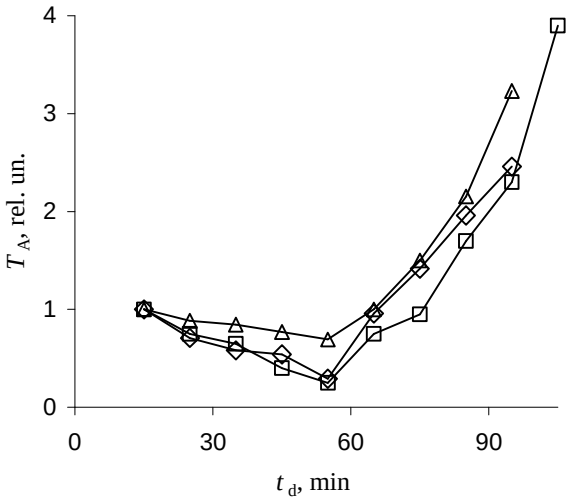

Рис. 4. Время свертывания T_A (в относительных единицах) трех образцов плазмы (разные маркеры) в зависимости от времени центрифугирования t_d.

Таким образом, проведенные измерения показывают, что имеется связь активности протромбиназы с дегазацией плазмы крови. Дальнейшие исследования в этом направления помогут понять причины патологий свертывающей системы крови.

Список литературы

1. *Ковеза Ю. В.* Изменение кислотности и дегазация среды как факторы, влияющие на гидрофобное взаимодействие и активность растительной каталазы / Ю. В. Ковеза, И. В. Нога, В. М. Шаталов // Проблемы экологии и охраны природы техногенного региона. – 2008. – № 8. – С. 290–292.

2. *Шаталов В. М.* Дегазация биожидкостей как механизм биологического действия слабых электромагнитных полей / В. М. Шаталов // Біофізичний вісник. – 2009. – Вип. 23 (2). – С. 92–99.

3. *The International Association* for the Properties of Water and Steam / Release on the Ionization Constant of H2O. – 2007. – Available from: http://www.iapws.org

4. *Казанцев В. Ф.* Движение газовых пузырьков в жидкости под действием сил Бьеркнеса, возникающих в акустическом поле / В. Ф. Казанцев // ДАН СССР. – 1959. – Т. 129, № 1. – С. 64–67.

5. *Кондаков С. В.* Седиментация форменных элементов крови. Модель активной коллоидной системы / С. В. Кондаков, М. Я. Мельников, А. А. Токарев // Вестн. Московского ун-та. Сер. 2. Химия. – 2008. – Т. 49, № 4. – С. 238–239.

6. *Шмидт Р.* Физиология человека: Пер. с англ. / Р. Шмидт, Г. Тевс. – М.: Мир, 1996. – Т. 2. – 439 с.

7. *Скипетров В. П.* Влияние аэроионов кислорода на мобильность системы свертывания крови / В. П. Скипетров // Аэроионы и жизнь. – Саранск: "Красный Октябрь", 2005. – 136 с.

8. *Гаранина Е. Н.* Стандартизация и контроль качества исследования протромбинового времени / Е. Н. Гаранина, Н. А. Авдеева // Клинич. лаборат. диагностика. – 1994. – № 6. – С. 23–25.

Зінченко А. А., Нога І. В., Шаталов В. М. **Вплив дегазації при центрифугуванні на деякі показники крові**. – Центрифугування зразків дистильованої води приводить до зростання pH від 6,57 при 30°C до 7,25 при 36°C, що зумовлено дегазацією й виходом вуглекислоти. Подальше повернення до рівноважного pH відбувається немонотонно залежно від ступеня дегазації. Запропоновано математичну модель, яка описує як процес дегазації при центрифугуванні через вихід мікропухирців повітря, так і наступне повернення розчину до рівноваги. Показано, що тривалість центрифугування немонотонно впливає на швидкість осідання еритроцитів, а також на активність протромбінази, що свідчить про важливу роль мікропухирців у визначенні цих показників крові.

Ключові слова: центрифугування, дегазація, поверхневий натяг, кислотність, швидкість осідання еритроцитів, протромбін.

Zinchenko A. A., Noga I. V., Shatalov V. M. **Influence of degassing via centrifugation on some parameters of blood**. – Centrifugation samples of the distilled water leads to increase pH from 6,57 at 30°C till 7,25 at 36°C, that is caused by degassing and an output of carbonic acid. The further return to equilibrium pH occurs nonmonotone depending on a degree of degassing. The mathematical model describing as process of degassing at centrifugation through an output of nanobubbles of air, and the subsequent return of a solution to balance is offered. It is shown, that duration centrifugation nonmonotone influences speed of subsidence erythrocytes and activity prothrombinase, that testifies to the important role of nanobubbles in definition of these parameters of blood.

Key words: centrifugation, degassing, surface tension, acidity, speed of subsidence erythrocytes, prothrombinase.