

На правах рукописи

Гибизова Виктория Валерьевна

**ОСОБЕННОСТИ РАССЕЯНИЯ СВЕТА В РАСТВОРАХ
ГЛОБУЛЯРНЫХ БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ С
МЕТАЛЛОСОДЕРЖАЩИМИ СОЕДИНЕНИЯМИ**

Специальность 01.04.05 – «Оптика»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва – 2017

Работа выполнена на кафедре молекулярных процессов и экстремальных состояний вещества физического факультета Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Научный руководитель:	доктор физико-математических наук, профессор Петрова Галина Петровна
Официальные оппоненты:	Иванов Андрей Валентинович, доктор физико-математических наук, ФГБУ «Российский онкологический научный центр имени Н.Н.Блохина» Минздрава России, ведущий научный сотрудник, г. Москва
	Чайков Леонид Леонидович, кандидат физико-математических наук, Физический институт имени П.Н.Лебедева РАН (ФИАН), заведующий лабораторией, г. Москва
Ведущая организация:	Институт проблем нефти и газа РАН, г. Москва

Защита состоится «21» июня 2017 года в 15 час. 00 мин. на заседании диссертационного совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д 501.001.45 на базе Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы д. 1 стр. 5 (19-й корпус НИИ ядерной физики имени Д.В. Скобельцына МГУ имени М.В.Ломоносова), ауд. 2-15.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова, а также на сайтах:

http://istina.msu.ru/media/dissertations/dissertation/024/712/51264240/Dissertatsiya_Gibizovaokonch.pdf

<http://www.sinp.msu.ru/ru/dissertation/25456>

Автореферат разослан «15» мая 2017 года.

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 501.001.45

кандидат физико-математических наук

Вохник О. М.

Общая характеристика работы

Данная работа посвящена исследованию оптических параметров в различных жидких системах, а именно в разбавленных растворах оптически анизотропных макромолекул, включая жизненно важные белки. К исследуемым оптическим системам относятся, в том числе трехкомпонентные растворы, содержащие белковые молекулы и соли различных металлов, а также разнообразные наночастицы (НЧ). Оптические методы, такие как методы светорассеяния – статического и динамического, являются невозмущающими (неинвазивными) и не вносят искажения в исследуемые системы.

При развитии различных патологических изменений в организме параметры белковых молекул, такие, как суммарный заряд, коэффициент взаимодействия могут существенным образом изменяться. Прямым и эффективным методом исследования межмолекулярных взаимодействий макромолекул в растворах, а также определения их молекулярного веса и формы является метод интегрального рэлеевского рассеяния света. Метод динамического рассеяния света, основанный на фотонно-корреляционной спектроскопии, позволяет изучать броуновское движение макромолекул в растворах, при этом определяется коэффициент трансляционной диффузии частиц и эффективный динамический радиус макромолекул или комплексов молекул.

Многие металлы необходимы для нормальной жизнедеятельности человеческого организма. Тем не менее, превышение допустимой концентрации некоторых из них создает угрозу здоровью человека. Особенно опасны тяжелые металлы. Попадая в организм человека даже в малых концентрациях, они способны нарушить нормальное течение физиологических процессов. Частично это связано с их биологической активностью. Многие тяжелые металлы проявляют комплексообразующие свойства.

Железо – наиболее распространенный химический элемент в природе и один из наиболее необходимых микроэлементов для человека, также может быть отнесен к тяжелым металлам. Важным свойством железа является то, что оно входит в состав крови. Этот элемент принимает участие в процессах кровотока, дыхания, иммунобиологических процессах, а также входит в состав многих ферментов. Поэтому актуальным является изучение взаимодействия белковых молекул с солями железа.

В ходе работы также было оценено влияние хлорида железа III и медицинского препарата «Мальтофер» на основные белки сыворотки крови – альбумин и γ -глобулин, а также на модельные растворы сыворотки крови методами рассеяния света.

Золото относится к тяжелым металлам, в связи с чем, важно исследовать, как взаимодействуют молекулы белков с НЧ золота в водных растворах. Золотые НЧ с

плазмонным резонансом (ПР) являются объектами интенсивного исследования в современной нанобиотехнологии. Большинство приложений основано на комбинировании двух принципов: (1) синтез конъюгатов; (2) возбуждение ПР в видимой и ближней ИК области для получения уникальных оптических свойств.

Оценка влияния различных НЧ, биомаркеров и зондов на основные белки сыворотки крови человека является одной из развивающихся областей в современной нанобиотехнологии и медицине. На данный момент активно развиваются методы лечения, диагностики, а также создание лекарств, основанных на различных НЧ, биомаркерах и зондах, которые доставляются к пораженной области посредством кровотока. Основными составляющими сыворотки крови человека являются глобулярные белки – альбумин и γ -глобулин. Присутствие различных веществ в растворах сыворотки крови будет оказывать влияние на поведение данных белков, также как и изменение некоторых параметров раствора.

Актуальность работы заключается в том, что в ней показана перспективность использования неинвазивных оптических методов, а именно, методов рассеяния света, для оценки влияния различных соединений на белки крови, как важнейшей системы живого организма.

Целью данной диссертации являлось исследование оптических свойств и молекулярно-динамических процессов, происходящих в растворах биологических макромолекул при воздействии различных внешних параметров среды (pH , концентрации биологических макромолекул, ионной силы).

В данной работе были поставлены следующие *задачи*:

- изучить с помощью рэлеевского рассеяния света поведение систем, составленных из смеси основных белков сыворотки крови – сывороточного альбумина и γ -глобулина в водных растворах, которые могут служить моделями сыворотки крови, при изменении внешних параметров среды;
- сравнить результаты, полученные на модельных системах сыворотки крови, с данными по исследованию разбавленных растворов нативных образцов сыворотки крови здоровых и больных пациентов;
- изучить поведение вышеуказанных систем, также при добавлении хлорида железа III, железосодержащего препарата «Мальтофер», а также НЧ золота.

В связи с поставленной целью *объектами исследования* являлись: альбумин, γ -глобулин, сыворотка крови человека, хлорид железа III, препарат «Мальтофер», НЧ золота. *Предметом исследования* было изучение этих систем при изменении различных внешних параметров среды с помощью оптических методов.

Научная новизна диссертации определяется рядом экспериментальных результатов, полученных впервые в данной работе:

- При помощи метода фотонной корреляционной спектроскопии измерены концентрационные зависимости коэффициента трансляционной диффузии для водных растворов белков альбумина и γ -глобулина, в том числе для модельных растворов сыворотки крови человека при добавлении железосодержащих препаратов.

- С помощью метода динамического светорассеяния обнаружено, что концентрационные зависимости коэффициента трансляционной диффузии для водных растворов белка γ -глобулина при добавлении хлорида железа III не изменяются.

- Впервые методом статического рассеяния света показано, что добавление хлорида железа III к водному раствору альбумина приводит к изменению массы рассеивающих частиц при практически неизменной величине гидродинамического радиуса.

- Обнаружено, что при добавлении в растворы белков альбумина и γ -глобулина препарата «Мальтофер» подвижность рассеивающих частиц уменьшается. В случае γ -глобулина уменьшение подвижности и относительный рост массы выражены слабее, чем в случае альбумина.

- Методом статического рассеяния света, выявлено, что концентрационные зависимости параметра рассеяния для разбавленных растворов нативных образцов сыворотки крови онкобольных при добавлении НЧ золота изменяют наклон с отрицательного на положительный. Знак второго вириального коэффициента меняется на обратный.

- Обнаружено, что добавление НЧ золота, стабилизированных ПЭГ, в растворы альбумина, а также в растворы модельных систем сыворотки крови не оказывает влияние на альбумин.

- Обнаружено, что добавление НЧ золота, стабилизированных ПЭГ, в водные растворы белка γ -глобулина приводит к уменьшению коэффициента трансляционной диффузии.

Научная и практическая значимость

Основные результаты, полученные в диссертации, позволяют расширить знания о процессах, происходящих с белковыми макромолекулами при добавлении веществ, содержащих металлы (НЧ золота, хлорид железа III, железосодержащий препарат).

Результаты исследования могут быть использованы при изучении патологических процессов, происходящих в организме человека при заболеваниях, отражающихся на свойствах основных белков сыворотки крови живого организма.

Теоретической и методологической основой исследования послужили труды отечественных и зарубежных учёных по исследованию поведения основных белков сыворотки крови при изменении внешних параметров (температуры, pH , концентрации, ионной силы, при соединении их с другими веществами и т.д.). В диссертационной работе использованы экспериментальные методы – динамического и статического светорассеяния. Проведены анализ и сравнение полученных результатов с данными методов флуоресцентной спектроскопии и ИК-спектроскопии.

Положения, выносимые на защиту

1. Оптические методы – статического и динамического светорассеяния являются весьма информативными для изучения параметров рассеивающих частиц в белковых растворах, содержащих различные соединения (хлорид железа III, железосодержащий препарат «Мальтофер», а также НЧ золота). Эти методы также могут быть использованы для оценки степени влияния различных веществ на белковые системы.

2. Железосодержащие препараты слабо реагируют с основными белками сыворотки крови (альбумином и γ -глобулином), как в чистых растворах, так и в составе модельных систем сыворотки крови.

3. Наблюдаемое увеличение массы рассеивающих частиц в растворах альбумина, содержащих хлорид железа, при неизменном гидродинамическом радиусе, связано с адсорбцией ионов, образовавшихся в результате взаимодействия хлорида железа III с водой, на молекулах альбумина.

4. Концентрационные зависимости параметра рассеяния для нативных образцов сыворотки крови онкобольных при добавлении НЧ золота изменяют наклон с отрицательного на положительный, т.е. знак второго вириального коэффициента (коэффициента межмолекулярного взаимодействия) меняется на обратный.

Личный вклад диссертанта

Все вошедшие в диссертационную работу оригинальные данные получены лично автором, либо при его непосредственном участии. Автором осуществлялись планирование и проведение эксперимента, обработка экспериментальных результатов, их анализ. Совместно с руководителем д.ф.-м.н., проф. Петровой Г.П. проходило обсуждение, обобщение и интерпретация полученных результатов, а также подготовка публикаций и докладов.

Достоверность и обоснованность результатов, полученных в диссертационной работе, подтверждается их согласием с экспериментальными данными, полученными автором с помощью других методов, а также совпадением этих результатов с данными, приведенными в работах других авторов. Все эксперименты проводились на современном научном оборудовании. Результаты исследований были апробированы и представлены более чем на

десяти международных конференциях в виде устных и стендовых докладов. Результаты, представленные в диссертационной работе, являются уникальными и получены впервые.

Апробация работы и публикации

Результаты, представленные в диссертационной работе, докладывались на следующих национальных и международных конференциях, симпозиумах и школах: XX International School for Young Scientists and Students on Optics, Laser Physics & Biophotonics III (Саратов, Россия, 2016), 24th Annual Student Conference Week of Doctoral Students 2015 (Прага, Чехия, 2015); 22th International Conference on Advanced Laser Technologies (ALT'14), (Кассис, Франция, 2014), XXI Международной научной конференции «Ломоносов-2014» (Москва, Россия, 2014), Всероссийская школа-конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Материалы и технологии XXI века", (Казань, Россия, 2014); International conference on Advanced Laser Technologies (ALT'13) (Будва, Черногория, 2013); 22nd Annual Conference of Doctoral Students – WDS 2013 (Прага, Чехия, 2013); ICONO/LAT'13 Conference, (Москва, Россия, 2013); 20th International Conference on Advanced Laser Technologies (ALT'12), (Тун, Швейцария, 2012); Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых по фундаментальным наукам "Ломоносов-2012" (Москва, Россия, 2012); 19th International Conference on Advanced Laser Technologies (ALT'11) (Золотые пески, Болгария, 2011); XVIII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных Ломоносов-2011, (Москва, Россия, 2011); XIV International School for Young Scientists and Students on Optics, Laser Physics & Biophotonics III (Саратов, Россия, 2010), Евразийский конгресс по медицинской физике и инженерии "Медицинская физика–2010" (Москва, Россия, 2010); XVII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2010» (Москва, Россия, 2010).

Основные результаты диссертационной работы опубликованы в 25 научных работах, из которых 11 статей и 14 тезисов.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, литературного обзора, 4 глав, заключения и 110 библиографических ссылок. Работа написана на 135 страницах машинописного текста и включает 54 рисунка и 12 таблиц. Первая глава посвящена методам исследования изучаемых систем: статического и динамического рассеяния света, ИК-спектроскопии, флуоресцентной спектроскопии. Во второй главе описываются экспериментальные установки, используемые для определения оптических параметров исследуемых систем. Третья глава включает в себя описание исследуемых веществ и их основные свойства. В четвертой главе представлены основные экспериментальные результаты, полученные в данной работе. В заключение приведены основные результаты и выводы, а также список работ, опубликованных по теме диссертации.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** изложена общая характеристика диссертационной работы, её актуальность; определены цель и задачи работы; сформулированы основные положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы

Диссертационная работа содержит литературный обзор, включающий различные методы исследования рассеивающих частиц; а также разнообразные способы их покрытия; описание свойств и способы использования исследуемых веществ (хлорид железа III, железосодержащий препарат «Мальтофер», НЧ золота). В данной главе рассмотрены также изучаемые вещества с точки зрения их распределения в организме человека; подробно изложены особенности их поведения в разных органах и тканях. Приведены работы отечественных и зарубежных научных коллективов.

Глава 1. Теоретические основы методов исследования

Первая глава диссертационной работы посвящена основным типам взаимодействия молекул в растворах белков. Рассмотрены взаимодействия в растворах электролитов, изложены механизмы взаимодействия в растворах, содержащих ионы металлов и заряженные макромолекулы, поскольку белки – это полиэлектролиты, с основным видом их взаимодействия – кулоновским отталкиванием. В главе 1 рассмотрены также основные положения теорий, на базе которых разработано экспериментальное оборудование.

В первой главе описаны основные экспериментальные методы – методы рэлеевского рассеяния света, являющиеся наиболее информативными для определения статических и динамических параметров белковых молекул в водных растворах.

Метод динамического рассеяния света (ДРС) позволяет определить коэффициент трансляционной диффузии, который входит в зависящую от времени корреляционную функцию флуктуаций интенсивности:

$$G_{12}(\tau) = \langle I_1(t)I_2(t + \tau) \rangle, \quad (1)$$

где τ – время задержки, а угловые скобки обозначают, усреднение интенсивности по времени t . Далее из коэффициента трансляционной диффузии может быть рассчитан гидродинамический радиус частиц – R_h :

$$D_t = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h}, \quad (2)$$

где k_B – константа Больцмана, T – абсолютная температура, η – вязкость растворителя.

Для определения таких параметров белка, как коэффициент межмолекулярного взаимодействия B и массы макромолекулы M используется метод рассеяние света Рэлея –

Дебая. Экспериментально определяемый коэффициент рассеяния света раствора R_{90} может быть связан с вириальным разложением для осмотического давления Π следующим образом:

$$\left(\frac{cHK}{R_{90}} \right) = \frac{1}{RT} \frac{d\Pi}{dc} = \frac{1}{M} + 2Bc + \dots, \quad (3)$$

$$H = \frac{2\pi^2 n_0^2}{\lambda_0^4 N_A} \left(\frac{dn}{dc} \right)^2, \quad (4)$$

где c – концентрация, R – универсальная газовая постоянная, λ_0 – длина волны возбуждающего света, K – фактор Кабанна, H – оптическая постоянная раствора, n_0 и n являются показателями преломления чистого растворителя и раствора, соответственно, N_A – постоянная Авогадро.

С помощью полученной зависимости R_{90} от c нельзя определить M путем измерения R_{90} при одной концентрации. Необходимо провести измерения для нескольких c и экстраполировать результаты к $c=0$. Т.о., получаем:

$$M = \left(\frac{cHK}{R_{90}} \right)_{c \rightarrow 0}^{-1}. \quad (5)$$

Экстраполяцию выполняют графически, откладывая $\frac{cHK}{R_{90}}$ как функцию c . Наклон прямой позволяет вычислить коэффициент B , который характеризует степень неидеальности раствора и учитывает парные межмолекулярные взаимодействия в растворе.

Глава 2. Экспериментальное оборудование

Основная часть исследований проводилась на оптический установке 'Photocor Complex', параметры диодного лазера: длина волны 647 нм, мощность 25 мВт. Прибор собран по традиционной схеме спектрометра динамического рассеяния света, предназначенного для многоугловых измерений динамического и статического рассеяния света и измерения размеров частиц. Пучок света попадает на фокусирующий узел и проходит через кювету с исследуемым раствором, рассеянный под углом 90° свет регистрируется лавинным фотодиодом фирмы *Perkin Elmer*, выходной сигнал которого обрабатывается на компьютере. В кювете с исследуемым раствором поддерживается комнатная температура (20°C) при помощи встроенного в прибор термостата. Обработка сигнала, длительность и число выборок устанавливается экспериментатором. Обработка сигнала включает в себя построение и усреднение автокорреляционных функций, а далее решение обратной задачи – определение коэффициентов диффузии и гидродинамических радиусов рассеивающих частиц. При решении обратной задачи используется метод регуляризации Тихонова для интегральных уравнений.

Для получения ИК спектров использовался ИК-спектрометр *IFS 66 v/S* немецкой фирмы *Bruker*. В основе прибора лежит интерферометр. Спектры считаются в два этапа: 1) регистрируется интерферограмма, т.е. выходной световой поток в зависимости от разности, разделенной на когерентные пучки входной волны от источника; 2) данные обрабатываются на специальной компьютерной программе.

Исследования методом флуоресцентной спектроскопии проводились на оптических установках – спектрофлуориметре *SM 2203* и спектрофотометре *UNICO SQ-4802* (спектр пропускания).

Глава 3. Исследуемые вещества

В работе исследовались водные растворы бычьего сывороточного альбумина (рис. 1) и γ -глобулина (рис. 2) (немецкой фирмы «Sigma») и различные вещества: хлорид железа III, железосодержащий препарат «Мальтофер», НЧ золота.

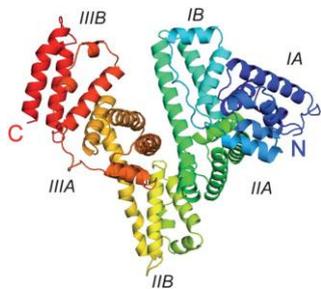


Рисунок 1. Ленточная модель белка альбумина

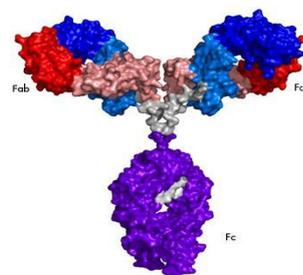


Рисунок 2. Модель γ -глобулина

Альбумин и γ -глобулин относятся к классу глобулярных белков. Основной функцией альбумина в организме человека является транспорт веществ, связанный с большой площадью его поверхности, $pI \sim 4.9$. Иммунный ответ организма осуществляется с помощью белка γ -глобулина ($pI \sim 6.0$), благодаря его способности изменять свои размеры и состав фракции. Почти при всех заболеваниях, особенно воспалительных, содержание γ -глобулина в плазме крови повышается, в то время как общее количество белков в плазме остается примерно одинаковым. Повышение содержания γ -глобулина сопровождается уменьшением фракции альбумина, в результате снижается так называемый альбумин-глобулиновый фактор. Таким образом, γ -глобулин является основным параметром в биохимических исследованиях при различных патологических заболеваниях.

Железо является незаменимым элементом для нормальной жизнедеятельности организма. Его недостаток может привести к серьезным заболеваниям, связанным с сывороткой крови человека. Медицинский препарат «Мальтофер» применяется при лечении дефицита железа в организме человека.

НЧ золота хорошо рассеивают и поглощают свет. НЧ золота могут быть использованы в качестве переносчиков лекарства, а также с помощью них можно определить местоположение раковой опухоли, т.е. использовать их в качестве биомаркеров. В данной работе изучались НЧ золота, стабилизированные ПЭГ (для использования их в кровотоке). Их размеры составляли 55 нм.

Глава 4. Экспериментальные результаты

Глава 4 содержит описание приготовления растворов, калибровочные измерения, ход проведения эксперимента и экспериментальные результаты.

Раздел 4.1 посвящен исследованию растворов глобулярных белков (БСА и γ -глобулина) при добавлении НЧ золота методом ДРС. На рис. 3а приведена концентрационная зависимость коэффициента трансляционной диффузии D_t рассеивающих частиц в водных растворах белка альбумина при добавлении НЧ золота. Измерения проводились в нейтральной среде ($pH \sim 7.0$). Видно, что коэффициенты трансляционной диффузии не изменяются при увеличении концентрации НЧ золота. Как видно из рисунка 3а, наблюдаются два компонента, один из которых соответствует коэффициентам трансляционной диффузии молекул альбумина (кривая 1), а другой – D_t НЧ золота (кривая 2). Для НЧ золота среднее экспериментальное значение коэффициентов трансляционной диффузии составляет – $\langle D_t \rangle_{\text{экс.}} \approx (7.9 \pm 1.5) \cdot 10^{-8} \text{ см}^2/\text{с}$ (рис. 3а – кривая 3), а рассчитанный по формуле (5) – $D_{\text{теор.}} \approx 8.5 \cdot 10^{-8} \text{ см}^2/\text{с}$. Этот результат указывает на то, что между частицами белка и НЧ нет взаимодействия.

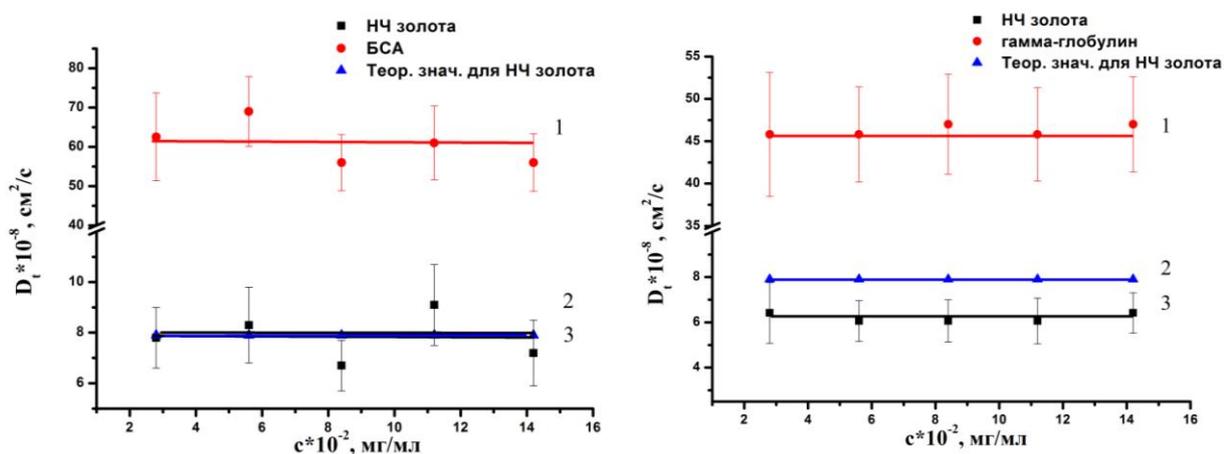


Рисунок 3. Зависимость коэффициента трансляционной диффузии D_t рассеивающих частиц от концентрации НЧ золота в водных растворах при добавлении а) БСА (слева) $\langle R \rangle_{\text{экс.}} \sim 25 \text{ нм}$, б) γ -глобулина (справа) $\langle R \rangle_{\text{экс.}} \sim 35 \text{ нм}$

В водных растворах γ -глобулина с НЧ золота (рис. 3б), радиус рассеивающих частиц увеличивается: $\langle R_h \rangle_{\text{экс.}} \approx 35 \text{ нм}$, а полученный коэффициент трансляционной диффузии уменьшается $\langle D_t \rangle_{\text{экс.}} \approx (6.2 \pm 1.01) \cdot 10^{-8} \text{ см}^2/\text{с}$ (рис. 3б – кривая 3), для сравнения –

$\langle D_t \rangle_{теор.} \approx 8.5 \cdot 10^{-8} \text{ см}^2/\text{с}$ (рис. 3б – кривая 2), кривая 1 соответствует D_t молекул γ -глобулина. Взаимодействие НЧ золота с молекулами γ -глобулина приводит к увеличению размеров рассеивающих частиц и уменьшению их молекулярной подвижности.

В дальнейших экспериментах были рассмотрены три модельных раствора (табл. 1), соответствующие: А) здоровой крови, Б) зоне риска и В) больной крови методом ДРС. Во всех трех случаях наблюдается уменьшение коэффициента трансляционной диффузии НЧ золота, что свидетельствует о взаимодействии НЧ золота и белков. Анализируя результаты предыдущей серии экспериментов, можно сделать вывод о том, что НЧ золота взаимодействуют только с одним из белков – γ -глобулином.

Модельный раствор при добавлении НЧ золота	$D_{теор.}$ НЧ золота	$D_{эксп.}$ НЧ золота	$D_{эксп.}$ белки
А) сыворотка крови «здорового» человека	$8,5 \cdot 10^{-8} \text{ см}^2/\text{с}$	$6 \cdot 10^{-8} \text{ см}^2/\text{с}$	$4,5 \cdot 10^{-7} \text{ см}^2/\text{с}$
Б) сыворотка крови «больного» человека	$8,5 \cdot 10^{-8} \text{ см}^2/\text{с}$	$5,9 \cdot 10^{-8} \text{ см}^2/\text{с}$	$4,5 \cdot 10^{-7} \text{ см}^2/\text{с}$
В) зона «риска»	$8,5 \cdot 10^{-8} \text{ см}^2/\text{с}$	$5,9 \cdot 10^{-8} \text{ см}^2/\text{с}$	$4,5 \cdot 10^{-7} \text{ см}^2/\text{с}$

Таблица 1. Сравнение результатов для трех модельных растворов сыворотки крови человека

Далее, исследования проводились с нативными образцами сыворотки крови здоровых людей и больных пациентов с онкологическими заболеваниями разных возрастов методом статического рассеяния света (рис. 4). На рисунке 4а представлены результаты для разбавленных растворов нативных образцов сыворотки крови человека для здоровых пациентов, а на рисунке 4б для разбавленных растворов нативных образцов сыворотки крови человека для больных пациентов.

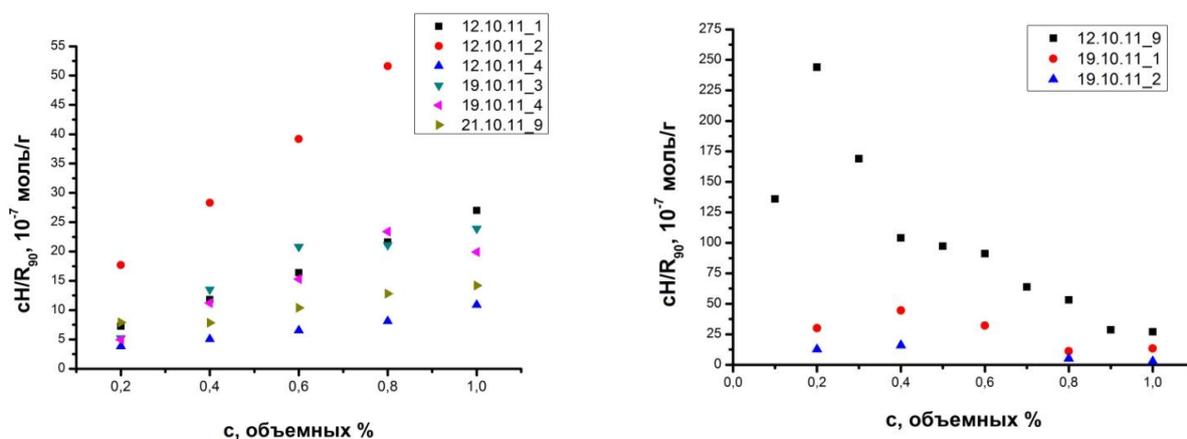


Рисунок 4. График концентрационной зависимости параметра рассеяния sH/R_{90} для разбавленных растворов нативных образцов сыворотки крови а) здоровых пациентов, б) больных пациентов

Далее исследовалось взаимодействие НЧ золота с разбавленными растворами нативных образцов сыворотки крови здорового (рис. 5а) и больного пациентов (рис. 6а). В первом случае при добавлении в раствор НЧ золота положительный наклон зависимости сохраняется (рис. 5б), т.е. не меняет своего знака. Во втором случае наклон становится отрицательным (рис. 6б). Из полученных данных следует, что, вероятно, НЧ золота взаимодействуют с белком γ -глобулином, что приводит к изменению знака коэффициента межмолекулярного взаимодействия B и наклон меняется на противоположный. Данный результат хорошо согласуется с ранее полученными экспериментальными данными по модельным растворам сыворотки крови.

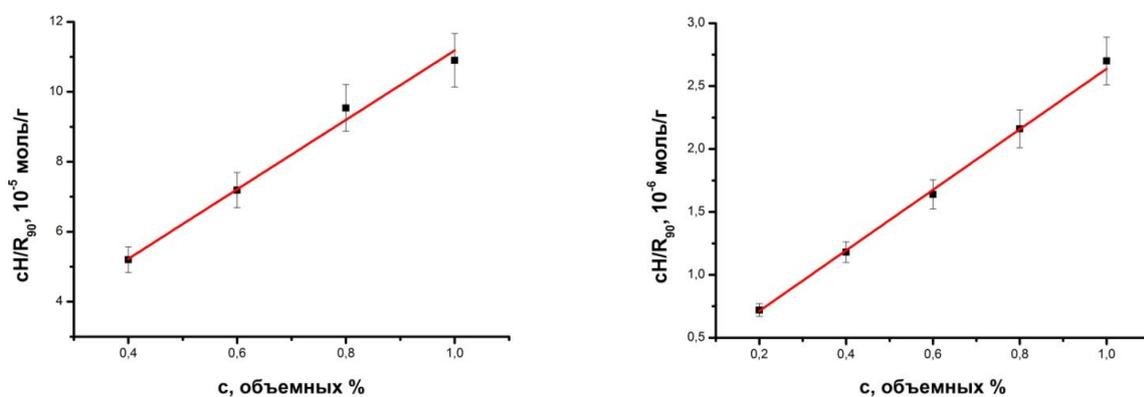


Рисунок 5. График концентрационной зависимости параметра рассеяния sH/R_{90} для разбавленных растворов нативных образцов сыворотки крови здоровых пациентов: а) без добавления НЧ золота, б) с добавлением НЧ золота

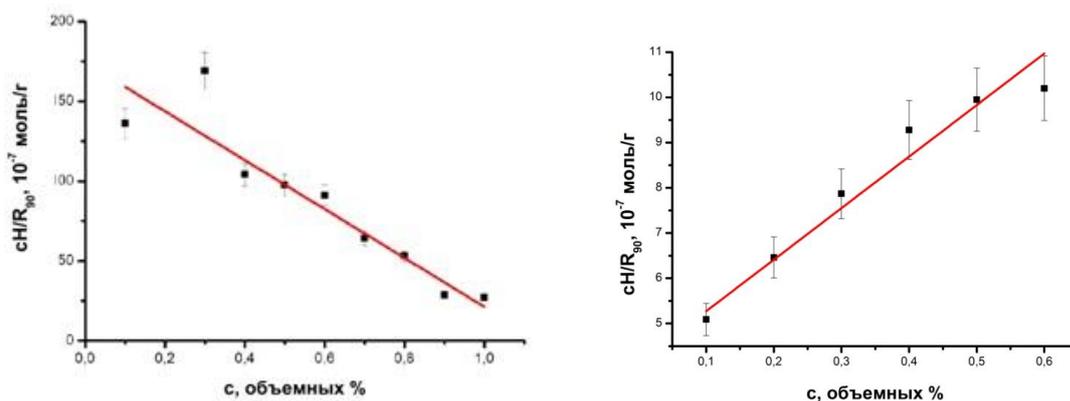


Рисунок 6. График концентрационной зависимости параметра рассеяния sH/R_{90} для разбавленных растворов нативных образцов сыворотки крови больных пациентов: а) без добавления НЧ золота, б) с добавлением НЧ золота

Раздел 4.2 содержит описание экспериментальных результатов для водных растворов γ -глобулина и альбумина при добавлении хлорида железа III.

На рисунке 7 приведены значения концентрационной зависимости коэффициента трансляционной диффузии D_t для водного раствора γ -глобулина ($pI \sim 6$). По полученным данным видно, что при изменении концентрации γ -глобулина в растворе D_t практически не изменяется и составляет $D_{тэксн.} \approx (3.5 \pm 0.4) \cdot 10^{-7} \text{ см}^2/\text{с}$, что совпадает с литературными данными $D_{теор.} \approx (3,8 \pm 0,2) \cdot 10^{-7} \text{ см}^2/\text{с}$.

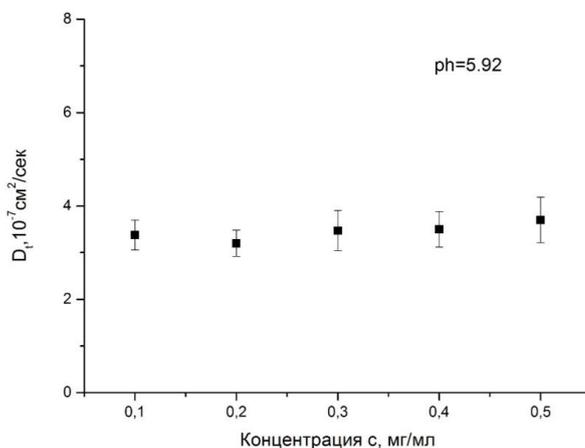


Рисунок 7. График зависимости коэффициента трансляционной диффузии D_t от концентрации γ -глобулина

Была также измерена зависимость коэффициента трансляционной диффузии D_t от концентрации γ -глобулина при концентрации $c(\text{FeCl}_3) = 0.1 \text{ мг/мл}$. Полученное значение D_t для водных растворов γ -глобулина, содержащих FeCl_3 , составляет $D_{тэксн.} \approx (5.0 \pm 0.8) \cdot 10^{-7} \text{ см}^2/\text{с}$, что согласуется в пределах погрешности со значением D_t для γ -глобулина при $pH \sim 3.85$ без добавления FeCl_3 . Это указывает на отсутствие взаимодействия белка γ -глобулина и хлорида железа III.

Методом статического рассеяния света был определен коэффициент межмолекулярного взаимодействия – B для растворов БСА при добавлении хлорида железа III (рис. 8) и молекулярная масса рассеивающих частиц – M (рис. 9).

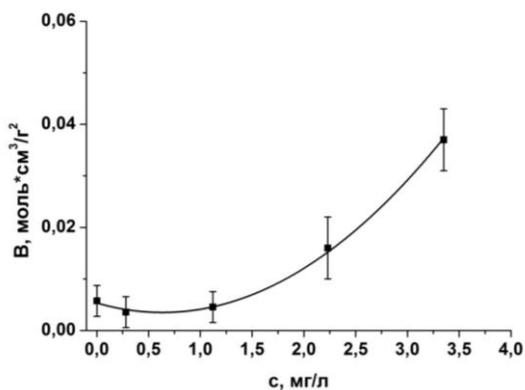


Рисунок 8. График концентрационной зависимости коэффициента межмолекулярного взаимодействия от концентрации Fe^{3+}

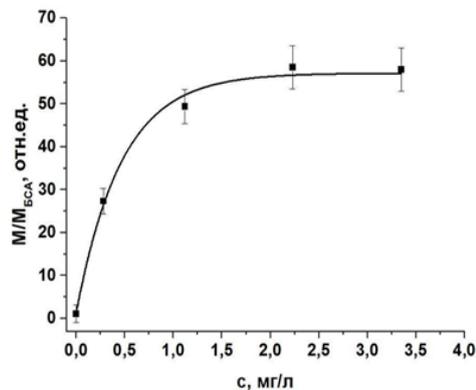


Рисунок 9. График концентрационной зависимости отношения молекулярной массы рассеивающих частиц к молекулярной массе БСА от концентрации Fe^{3+}

Раздел 4.4 посвящен экспериментальным результатам по оценки влияния железосодержащего препарата «Мальтофер».

На рисунке 10 приведены сравнительные данные для модельного раствора (альбумина больше, чем γ -глобулина) для случаев избытка, недостатка и нормального содержания ионов железа в сыворотке крови, полученные методом статического светорассеяния.

С помощью программы *Photocor* были получены массы рассеивающих частиц: $M_{\text{прак}} = 79115$ г/моль, $M_{\text{нед}} = 86783$ г/моль, $M_{\text{норм}} = 95321$ г/моль, $M_{\text{изб}} = 99456$ г/моль.

На рисунке 11 приведены сравнительные данные для модельного раствора (альбумина больше, чем γ -глобулина) для случаев избытка, недостатка и нормального содержания ионов железа в сыворотке крови, полученные методом ДРС.

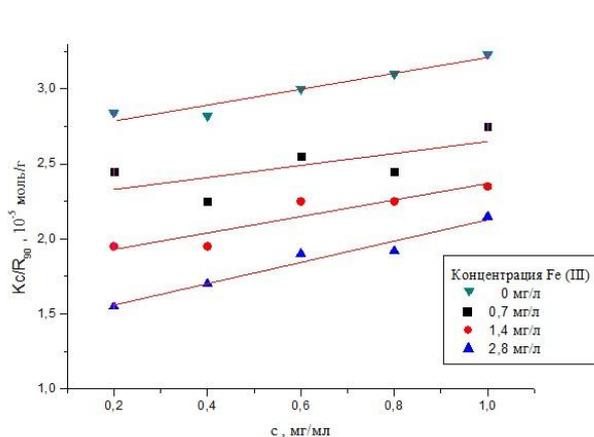


Рисунок 10. График зависимости параметра рассеяния K_s/R_{90} от концентрации модельного раствора (альбумина больше, чем γ -глобулина)

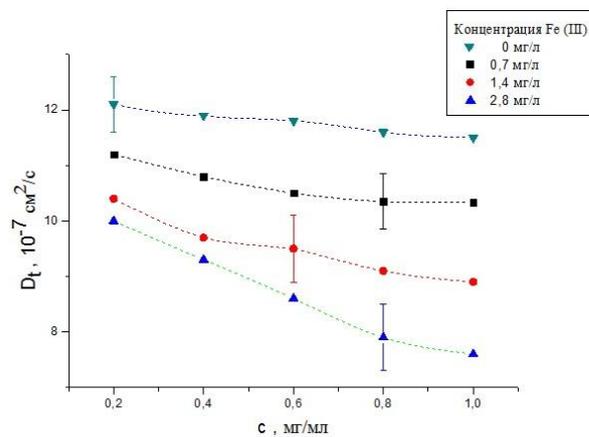


Рисунок 11. График зависимости коэффициента трансляционной диффузии D_t от концентрации модельного раствора (альбумина больше, чем γ -глобулина)

Обсуждение результатов экспериментов

Наночастицы золота

Методом ДРС было изучено взаимодействие НЧ золота и основных белков сыворотки крови – альбумина и γ -глобулина. Были получены коэффициенты трансляционной диффузии для компонент исследуемых растворов, а также их гидродинамические радиусы.

Образование кластеров белка альбумина с НЧ золота не было обнаружено. Это обстоятельство вызвано тем, что молекулы альбумина и НЧ золота имеют отрицательный заряд в исследуемых водных растворах.

В экспериментах с γ -глобулином получено, что белок слабо взаимодействует с НЧ золота. Данное взаимодействие приводит к увеличению размеров рассеивающих частиц и уменьшению их молекулярной подвижности (D_t уменьшается). Вероятно, данный результат может быть связан с формированием дополнительного слоя за счет частичной адсорбции молекул белка на поверхности НЧ золота.

В модельных растворах сыворотки крови также наблюдается взаимодействие НЧ золота с молекулами γ -глобулина, что может быть также связано с явлением частичной адсорбции молекул белка на поверхности НЧ.

В разбавленных растворах нативных образцов сыворотки крови здоровых пациентов с добавлением НЧ золота знак коэффициента межмолекулярного взаимодействия не изменяется (положительный наклон сохраняется), а в образцах крови больных пациентов меняется на противоположный (отрицательный наклон становится положительным).

Мальтофер

Была проведена серия экспериментов по исследованию воздействия ионов железа на основные белки сыворотки крови – альбумин и γ -глобулин. Все эксперименты производились при физиологических значениях pH ($pH \sim 7$). Полученные результаты, позволяют сделать следующие выводы:

Подвижность молекул альбумина уменьшается с ростом концентрации ионов железа в растворе, при увеличении концентрации препарата «Мальтофер». При этом заметно возрастает молекулярная масса рассеивающих частиц в исследуемых растворах.

В случае растворов γ -глобулина при добавлении препарата «Мальтофер» наблюдаемое уменьшение подвижности и относительный рост массы рассеивающих частиц выражены слабее (примерно на 5 %), чем в предыдущем случае. Это свидетельствует о том, что основное взаимодействие ионов железа происходит с альбумином, который осуществляет транспортную функцию – переносит железосодержащий комплекс.

Хлорид железа III

А) БСА

Полученные значения гидродинамического радиуса молекул превосходят размеры молекул БСА в чистом растворе не более чем на 60%. Это может означать, что в растворе может происходить лишь частичная агрегация белковых молекул.

Увеличение размеров рассеивающих частиц вероятнее всего связано с частичной адсорбцией ионов, образующихся в результате взаимодействия хлорида железа III с водой, на молекулах БСА. Модель данного процесса представлена на рисунке 12.

Вместе с тем, происходит незначительное снижение коэффициента трансляционной диффузии и увеличение коэффициента межмолекулярного взаимодействия, вызванное добавлением $FeCl_3$.

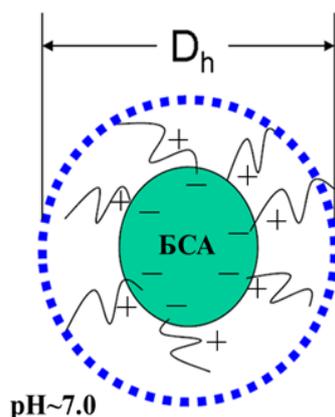


Рисунок 12. Модель частичной адсорбции ионов железа на белке БСА

Полученные в ходе измерений результаты для молекулярной массы рассеивающих частиц в растворе БСА при добавлении хлорида железа III (Табл. 2) сравнивались с величиной массы частиц в чистом растворе хлорида железа III (Табл. 3).

I, ммоль/л	0	0.025	0.1	0.2	0.3
M/M _{БСА} , отн.ед.	1.09	27.03	49.3	58.5	58

Таблица 2. Отношение массы рассеивающих частиц к массе чистого альбумина, в зависимости от ионной силы раствора

	Значение	Погрешность
M·10 ⁶ , г/моль	3.25	0.24
B, моль·см ³ ·г ²	0.601	0.012

Таблица 3. Масса рассеивающих частиц и коэффициент межмолекулярного взаимодействия в растворе хлорида железа III

Рассчитанное значение массы частиц в растворе хлорида железа III полностью объясняет столь резкое увеличение массы рассеивающих частиц при добавлении в раствор белковых молекул БСА. Тяжелые ионы комплексных соединений железа, которые, вероятно, образуются при взаимодействии с водой, представляют собой частицы, радиус которых в 50 раз меньше, чем радиус молекул БСА. Теоретически возможным становится факт существования процесса ионной адсорбции, т.е. присоединения этих тяжелых комплексов к молекулам белка, что значительно увеличивает среднюю массу рассеивающих частиц при почти не изменяющемся их гидродинамическом радиусе.

Б) γ -глобулин

В работе была проведена серия экспериментов по исследованию поведения молекул γ -глобулина в водных растворах, содержащих хлорид железа III. Исходя из полученных результатов, можно сделать выводы:

Гидродинамический радиус и подвижность молекул γ -глобулина не изменяются при увеличении концентрации γ -глобулина в растворе и составляет $R_h \approx (6.38 \pm 0.67)$ нм, что согласуется с литературными данными $R_h \approx (7.12 \pm 0.2)$ нм, $D_f \approx (3.45 \pm 0.38) \cdot 10^{-7}$ см²/с, что согласуется с литературными данными $D_f \approx (3.8 \pm 0.2) \cdot 10^{-7}$ см²/с.

При изменении pH раствора γ -глобулина коэффициент трансляционной диффузии D_t изменяется по зависимости близкой к параболической. Это связано с тем, что при отклонении pH от изоэлектрической точки заряд на белке возрастает (как в положительную, так и в отрицательную стороны), молекула белка перестает быть электронейтральной и создает вокруг себя электрическое поле, за счет чего кулоновское отталкивание частиц увеличивается и подвижность частиц возрастает.

При добавлении $FeCl_3$ в раствор γ -глобулина значение D_t практически не изменяется в пределах погрешности. Из чего можно сделать вывод, что частицы γ -глобулина практически не взаимодействуют с частицами $FeCl_3$.

В **заключении** приведены основные результаты и сформулированы выводы диссертационной работы.

Выводы:

- (1) В водных растворах альбумина с НЧ золота наблюдаются два независимых компонента коэффициента трансляционной диффузии, что указывает на отсутствие взаимодействия между исследуемыми частицами.
- (2) В водных растворах γ -глобулина с НЧ золота коэффициент трансляционной диффузии уменьшается, что может свидетельствовать о взаимодействии НЧ золота с молекулами γ -глобулина.
- (3) В модельных растворах сыворотки крови также наблюдается взаимодействие НЧ золота с молекулами γ -глобулина, что может быть связано с формированием дополнительного слоя белковых молекул на поверхности НЧ за счет их частичной адсорбции.
- (4) В разбавленных растворах нативных образцов сыворотки крови здоровых пациентов с добавлением НЧ золота знак коэффициента межмолекулярного взаимодействия не меняется (положительный наклон концентрационной зависимости параметра рассеяния сохраняется), а в образцах крови больных пациентов меняется на противоположный (отрицательный наклон становится положительным).
- (5) НЧ золота, стабилизированные ПЭГ, могут быть использованы при создании методов лечения и диагностики распространенных заболеваний.
- (6) При добавлении FeCl_3 в раствор γ -глобулина значение коэффициента трансляционной диффузии практически не изменяется в пределах погрешности. Из чего можно сделать вывод, что частицы γ -глобулина практически не взаимодействуют с FeCl_3 .
- (7) При добавлении FeCl_3 в раствор альбумина имеет место процесс ионной адсорбции, т.е. присоединения тяжелых комплексов железа, соединенных с молекулами воды к белковым макромолекулам, что значительно увеличивает среднюю массу рассеивающих частиц при почти не изменяющемся их гидродинамическом радиусе.
- (8) Подвижность молекул альбумина уменьшается с ростом концентрации ионов железа в растворе, при увеличении концентрации препарата «Мальтофер».
- (9) В случае растворов γ -глобулина при добавлении препарата «Мальтофер» наблюдаемое уменьшение подвижности и относительный рост массы рассеивающих частиц выражены слабее (примерно на 5 %), чем в предыдущем случае. Основное взаимодействие ионов железа происходит с альбумином.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методами рассеяния света (статического и динамического) были определены оптические параметры в растворах основных белков сыворотки крови, а также в модельных и нативных системах сыворотки крови при воздействии различных соединений, в том числе, хлорида железа III, медицинского препарата «Мальтофер», содержащего железо, и НЧ золота, стабилизированных ПЭГ. Из полученных результатов можно сделать вывод, что, в основном, используемые препараты, содержащие железо, слабо реагируют с белками сыворотки крови (альбумином и γ -глобулином), за исключением альбумина, который по всей вероятности может взаимодействовать с комплексами, образованными железом с молекулами воды. Эти результаты показывают, что данные препараты не оказывают негативного влияния на белки сыворотки крови, что было также подтверждено методом флуоресцентной спектроскопии. В связи с этим они являются безопасными для медицинских целей.

Результаты, полученные для НЧ золота, показывают, что как модельные системы, так и нативные образцы сыворотки крови реагируют на добавление НЧ золота. Наличие НЧ золота в разбавленных растворах образцов сыворотки крови здоровых пациентов не изменяет знак коэффициента межмолекулярного взаимодействия. Эксперименты, проведенные с разбавленными растворами образцов сыворотки крови больных пациентов, выявили, что НЧ золота меняют знак коэффициента межмолекулярного взаимодействия с отрицательного на положительный (характерный для здоровых пациентов), что является весьма интересным результатом, который может быть использован для медицинских приложений.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ДИССЕРТАЦИИ:

Статьи в рецензируемых журналах:

- 1) **В. В. Гибизова**, И. А. Сергеева, Г. П. Петрова, А. В. Приезжев, Н. Г. Хлебцов. *Взаимодействие молекул альбумина и γ -глобулина с золотыми наночастицами в водных растворах* // Вестник Московского университета. Серия 3: Физика, астрономия. 2011. № 5. 39–42.
- 2) Ю. С. Самсонова, А. В. Приезжев, А. Е. Луговцов, Г. П. Петрова, **В. В. Гибизова**, Е. И-Щ, Су Т-Х, Е. В. Переведенцева, Ч.Л. Ченг. *Исследование взаимодействия молекул альбумина с наночастицами алмазов в водных растворах методом динамического рассеяния света* // Квантовая электроника. 2012. 42 (6). 484–488.
- 3) И. А. Сергеева, Е. А. Ширшин, Н. Г. Жданова, **В. В. Гибизова**, Г. П. Петрова, С. А. Кургузенков, В. В. Фадеев. *Влияние катионов свинца на флуоресцентные характеристики бычьего сывороточного альбумина в водном растворе* // Оптика и спектроскопия. 2013. 115 (2). 201–206.
- 4) К. А. Аненкова, Г. П. Петрова, **В. В. Гибизова**, Л. А. Осминкин, К.П. Тамаров. *Свойства водных растворов сывороточного альбумина, содержащих частицы мезопористого кремния* // Оптика и спектроскопия. 2013. 115 (2). 195–200.
- 5) **В. В. Гибизова**, К. А. Аненкова, А. Д. Масленникова, К. В. Федорова, И. А. Сергеева, Г. П. Петрова. *Определение фундаментальных физических параметров белков сыворотки крови для развития методов диагностики злокачественных новообразований* // Альманах клинической медицины. 2016. 44 (2). 158–164.
- 6) **Victoria V. Gibizova**, Viktor A. Sapozhnikov, Ksenia V. Fedorova, Galina P. Petrova. *Serum albumin molecular mobility in water solutions, containing iron chloride III* // Journal of Biomedical Photonics & Engineering. 2016. 2 (4). 040304-1 – 040304-5.

Статьи в сборниках:

- 1) М. Riabchikova, **V. Gibizova**, G. Petrova. *Interaction of γ -globulin and $FeCl_3$* // WDS'16 Proceedings of Contributed Papers. Physics. Matfyzpress Prague. 2016. 204–208.
- 2) **В. В. Гибизова**, А. В. Комарова, И. А. Сергеева, Г. П. Петрова, А. В. Шленская. *Intermolecular interaction of gold nanoparticles with native human serum samples* // Сборник материалов международных научных e-симпозиумов. Технические и естественные науки: теория и практика. МЦНИП Киров. 2015. 245–258.

- 3) **В. В. Гибизова**, А. В. Комарова, И. А. Сергеева, К. В. Федорова, Г. П. Петрова. *Interactions between biomarkers and main blood proteins* // WDS'13 Proceedings of Contributed Papers: Part III. Physics. Prague. Matfyzpress. 2013. 177–179.
- 4) **V. V. Gibizova**, X. Zhang, I. A. Sergeeva, G. P. Petrova, K. V. Fedorova. *Photon-correlation spectroscopy in albumin water solutions containing gadolinium ions* // Bern Open Publishing: Proceedings of the International Conference on Advanced Laser Technologies 2012. 1.
- 5) **В. В. Гибизова**, И. А. Сергеева, Г. П. Петрова. *Межмолекулярное взаимодействие наночастиц золота с модельными и нативными образцами сыворотки крови* // Международный конкурс научных работ по приоритетным направлениям развития науки, технологий и техники в Российской Федерации. Сборник трудов. МГТУ им. Н.Э. Баумана. 2012. 42–47.

Тезисы докладов:

1. М. С. Рябчикова, В. В. Гибизова, Г. П. Петрова. *Особенности взаимодействия гамма-глобулина и $FeCl_3$* // Материалы XXIII Международной научной конференции Ломоносов-2016. Материалы международного молодежного научного форума ЛОМОНОСОВ-2016. МАКС Пресс Москва. 2016. С. 228.
2. I. A. Sergeeva, A. V. Komarova, **V. V. Gibizova**, A. V. Shlenskaya, A. D. Maslennikova G. P. Petrova. *The interaction of cesium with globular proteins in model and native serum solutions of healthy and cancer patients by static light scattering (sls)* // Book of Abstracts of 22th International Conference on Advanced Laser Technologies (ALT'14). Cassis. France. 2014. S2–22.
3. А. В. Шленская, А. В. Комарова, **В. В. Гибизова**. *Взаимодействия наночастиц золота и ионов цезия с нативными образцами сыворотки крови в водных растворах* // Материалы XXI Международной научной конференции Ломоносов-2014. Материалы международного молодежного научного форума ЛОМОНОСОВ-2014. МАКС Пресс Москва. 2014. 109–110.
4. **В. В. Гибизова**, А. В. Шленская, И. А. Сергеева, Г. П. Петрова. *Оптические свойства нативных образцов сыворотки крови человека при добавлении ионов хлорида цезия* // Сборник Тезисов Всероссийской школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых “Материалы и технологии XXI века”. 11–12 декабря 2014. Казань: Изд-во Казанского федерального университета. 213–213.
5. I. A. Sergeeva, A. V. Komarova, **V. V. Gibizova**, G. P. Petrova. *The interaction of cesium with model solutions of serum by static light scattering (sls)* // International conference ALT'13. Book of abstracts. Montenegro. 2013. 37–37.

6. A. V. Komarova, **V. V. Gibizova**, I. A. Sergeeva. *The interaction of heavy metals with the model solutions of serum by static light scattering (sls)* // Proceedings of ICONO/LAT'13 Conference. ICONO-06 Nano-Optics and Photonics. Moscow. 2013. 120–120.
7. I. A. Sergeeva, **V. V. Gibizova**, G. P. Petrova. *Investigation of proteins aggregation in water solutions containing heavy metal ions with laser fluorescence methods* // Book of Abstracts of 20th International Conference on Advanced Laser Technologies (ALT'12). Thun. Switzerland. 2012. 336–336.
8. G. P. Petrova, A. M. Makurenkov, I. A. Sergeeva, T. N. Tikhonova K. V. , Fedorova, **V. V. Gibizova**. *Laser optical methods in investigations of toxic metal ions influence on proteins and enzymes* // Book of Abstracts of 20th International Conference on Advanced Laser Technologies (ALT'12). Thun. Switzerland. 2012. 281–281.
9. **V. V. Gibizova**, X. Zhang, I. A. Sergeeva, G. P. Petrova. *Photon-correlation spectroscopy in albumin water solutions containin gadolinium ions* // Book of Abstracts of the 20th International Conference on Advanced Laser Technologies ALT'12. Thun. Switzerland. 2012. 337–337.
10. А. В. Комарова, **В. В. Гибизова**, И. А. Сергеева. *Межмолекулярное взаимодействие наночастиц золота с нативными образцами сыворотки крови* // Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых по фундаментальным наукам "Ломоносов-2012". Секция "Физика". Москва. 2012. 137–137.
11. **V. V. Gibizova**, I. A. Sergeeva, G. P. Petrova. *Study of gold nanoparticles behavior in model solutions of blood serum by dynamic light scattering* // Book of Abstracts of 19th International Conference on Advanced Laser Technologies (ALT'11). Golden Sands. Bulgaria. 2011. 122–122.
12. **В. В. Гибизова**, И. А. Сергеева. *Изучение поведения наночастиц золота в модельных растворах сыворотки крови методом динамического рассеяния света* // XVIII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных Ломоносов-2011. Москва. 2011. 161–162.
13. **В. В. Гибизова**, К. А. Аненкова, Г. П. Петрова, А. В. Приезжев, Н. Г. Хлебцов. *Исследование взаимодействия молекул альбумина с наночастицами золота в водных растворах с помощью метода фотонно-корреляционной спектроскопии* // III Евразийский конгресс по медицинской физике и инженерии "Медицинская физика". 2010. 1. 219–219.
14. К. А. Аненкова, **В. В. Гибизова**, К. В. Федорова. *Исследование взаимодействия молекул альбумина с наночастицами золота и кремния в водных растворах с помощью метода фотонно-корреляционной спектроскопии* // Нанотехнологии в онкологии. 2010. 83–83.

Подписано к печати 13.04.2017 г.
Тираж 100 экз. Заказ № 73
Отпечатано в отделе оперативной печати
Физического факультета МГУ