

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ "МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ имени
М.В.ЛОМОНОСОВА"

ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

Кафедра молекулярных процессов и экстремальных состояний вещества

"Индикатриса рассеяния водных растворов гемоглобина"

Выполнила студентка :
Исаева Арина Игоревна

Научный руководитель:
к.ф. – м.н., м.н.с. В.В.Гибизова

Группа: 205м

1 Текст к Предзащите диплома:

1.1 Слайд 1

Добрый день!

Моя дипломная работа называется : “Индикатриса рассеяния водных растворов гемоглобина”.

1.2 Слайд 2

В современном мире заболевания, связанные с системой кровотока, встречаются очень часто. Гемоглобин является важнейшим элементом крови, железосодержащим белком и основным компонентом эритроцитов. Он обладает способностью захватывать кислород и транспортировать его в органы.

Однако как дефицит, так и избыток белка очень опасен. Изучение формы гемоглобина является актуальной проблемой. Исследование модификации и трансформации молекулы гемоглобина может быть использовано для разработки стратегии реанимации и лечения угрожающих жизни типов анемии, связанных с изменением формы гемоглобина.

В связи с этим основной целью данной работы было исследование формы и размеров гемоглобина, происходящее в водных растворах при разных концентрациях белка с помощью метода многоуглового статистического рассеяния света. Исходя из поставленной цели вытекали следующие задачи:

- 1) Расчёт концентраций гемоглобина для проведения эксперимента.
- 2) Построение индикатрис рассеяния.
- 3) Обработка полученных данных.
- 4) Построение графиков для различных параметров.
- 5) Исследование массы и формы гемоглобина.

1.3 Слайд 3

Гемоглобин – это компонент эритроцитов, относящийся к группе белков. Состоит из 96 процентов белкового вещества глобина и 4 процента вещества с атомом 2-валентного железа — гем. В одной клетке эритроцита его содержится порядка 280 млн молекул, что и формирует красный цвет крови. Главное свойство гемоглобина – это способность железа присоединять и отщеплять газы, формируя перемещение кислорода из лёгких к тканям и углекислого газа от тканей к лёгким. Таким образом, его роль в процессе газообмена в организме незаменима.

Гемоглобин развивается в клетках костного мозга, которые становятся эритроцитами. Когда эритроциты умирают, гемоглобин разрушается, железо снова используется для производства новых эритроцитов.

Каждая молекула гемоглобина состоит из четырех гемовых групп, окружающих глобиновую группу, образуя тетраэдрическую структуру. Гем, который составляет всего 4 процента от массы молекулы, состоит из кольцеобразного органического соединения, известного как порфирин, к которому присоединен атом железа. Именно атом железа связывает кислород, когда кровь перемещается между легкими и тканями. В каждой молекуле гемоглобина содержится четыре атома железа, которые, соответственно, могут связывать четыре атома кислорода. Глобин состоит из двух связанных пар полипептидных цепей (рис. 2).

Гемоглобин входит в состав группы белков гемопротеины, которые сами являются подвидом хромопротеинов и подразделяются на неферментативные белки (гемоглобин, миоглобин) и ферменты (цитохромы, каталаза, пероксидаза).

Гемоглобин выполняет следующие биологические функции:

1)Транспортно-дыхательная:

-Перенос молекулярного кислорода от альвеолярной ткани дыхательных органов к периферическим тканям;

-Транспорт углекислого газа и катионов водорода от периферических тканей к легким для последующего выведения из организма.

2)Буферная функция – заключается в сохранении кислотно-основного баланса крови. Буферная система, создаваемая гемоглобином, способствует поддержанию рН крови в нормальном диапазоне.

1.4 Слайд 4

В последнее время наиболее популярными методами диагностики являются неразрушающие оптические методы контроля, в частности, методы динамического и статического рассеяния света, которые используются по отдельности или вместе. В одном из вариантов статического рассеяния света определяется зависимость интенсивности от угла рассеяния, который изображен в полярных координатах и называется индикатрисой рассеяния.

В статье [1] было проведено исследование наночастиц диоксида кремния SiO_2 . Для приготовления наночастиц SiO_2 использовали водный раствор этилового спирта, содержащий воду, аммиак и тетраэтоксисилан с соответствующими молярными соотношениями 25 : 1 : 0,14.

Результаты эксперимента согласуются с теорией Ми, которая широко используется при описании рассеяния электромагнитных волн на малых частицах, которые сходны по порядку с длинами волн оптического диапазона. Например, сравнивая индикатрисы в течение 5 и 10 минут после начала синтеза, мы можем видеть, что при росте частиц рассеяние на различных углах не соответствует симметричной зависимости теории Рэлея. На (рис. 4) видно, что химический процесс прекращается через 20 минут, а индикатриса имеет такую же форму через 60 минут, как и через 20 минут. Эти данные согласуются с результатами другой работы (Masalov, V.M., Sukhinina, N.S., and Emel'chenko, G.A., Colloidal particles of silicon dioxide for the formation of opal-like structures, Phys. Solid State, 2011, vol. 53, no. 6, pp. 1135–1139), где при указанных концентрациях компонентов и комнатной температуре синтеза в течение 20 мин наблюдался линейный рост диаметра частиц, который прекратился после этого времени. Конечный диаметр частиц, определенный с помощью атомно-силовой микроскопии, соответствовал 150 нм.

1.5 Слайд 5

В статье [5] авторы исследуют процесс рассеяния света на растворах гемоглобина с солями при различных концентрациях. Акцент делается на некотором изменении молекулярной массы гемоглобина в нейтральных растворах, содержащих различные компоненты. Особый интерес, по мнению авторов, представляет влияние высоких концентраций NaCl, в результате чего происходит расщепление оксигенированной молекулы на субъединицы, равные примерно половине молекулярной массы белка. С помощью рефрактометра были сделаны измерения приращения показателя преломления, его значение для гемоглобина и оксигемоглобина составило 0.197 (как в слабых, так и в концентрированных солевых растворах).

Методом статического рассеяния света были получены данные, расчёт которых проводился с помощью уравнения Дебая. В результате был построен график зависимости эмпирической константы K (оптическая постоянная раствора) от концентрации соли NaCl.

На графике 5 видно, что линии для более высоких концентраций соли всегда лежат выше, чем для более низких концентраций солей, и имеют больший отрицательный наклон. Исходя из этого, авторами был сделан вывод, что увеличение концентрации соли приводит к уменьшению молекулярной массы, и, что диссоциация белка на субъединицы происходит в сильных солевых растворах.

1.6 Слайд 6

В статье [6] ученые из Университет Брауна представили результаты моделирования поведения самосборки серповидного гемоглобина (HbS). Крупнозернистая модель HbS, которая содержит гидрофильные и гидрофобные частицы, построена так, чтобы соответствовать структурным свойствам и физическому описанию HbS.

Ученые показывают, что, помещая волокна HbS внутрь эритроцитов и подвергая их линейному удлинению и изгибу, они получаем различные типы серповидных эритроцитов, которые наблюдаются при серповидноклеточной анемии (рис. 6).

1.7 Слайд 7

Спектрометр Photocor Complex. Принцип работы спектрометра Photocor Complex (PC) основан на методе Динамического рассеяния света (ДРС). Измерение корреляционной функции флуктуаций интенсивности рассеянного света позволяет находить ряд динамических и статических параметров, таких как размер дисперсных частиц, молекулярный вес рассеивающих частиц, второй вириальный коэффициент. Прибор PC предназначен для многоугловых измерений динамического и статического рассеяния света. В установке использовался диодный лазер с длиной волны 647 нм и мощностью 25 мВт. Красная область спектра, где коэффициенты поглощения малы, является наиболее приемлемой для эксперимента, поскольку в видимом и ближнем ультрафиолетовом диапазоне гемоглобин имеет очень большие коэффициенты поглощения.

Пучок света попадает на фокусирующий узел и проходит через кювету с исследуемым раствором, рассеянный под разными углами, свет регистрируется лавинным фотодиодом, выходной сигнал которого обрабатывается на компьютере. Прибор позволяет регулировать температуру исследуемых растворов.

Экспериментальные данные: В ходе экспериментальной работы на Спектрометре Photocor Complex (Рис.7) были получены:

- 1) Интенсивности при концентрациях $c_1 = 0.05$, $c_2 = 0.15$, $c_3 = 0.25$, $c_4 = 0.35$ гемоглобина при температуре 20 градусов Цельсия при углах от 60 до 130 градусов.
- 2) Темновой ток для угла 90 градусов.
- 3) Интенсивность чистой воды для углов 60-130 градусов при температуре 20 градусов Цельсия.
- 4) Интенсивность бензола для угла 90 градусов.

Интенсивность при каждом угле при определенной концентрации измерялась 3-5 раз. В качестве калибровочных веществ использовались обеспыленные бензол и вода, которые находятся в герметичных запаянных ампулах. Измерения проводились в программе Photocor-FC. Программное обеспечение PhotocorFC позволяет наблюдать изменение сигнала на мониторе, оценивать результаты для текущих значений интенсивности и параметров раствора

1.8 Слайд 8

Светорассеяние – один из основных количественных методов исследования полимеров в растворе, который позволяет напрямую определять молекулярную массу и радиус инерции макромолекул, а также позволяет оценивать термодинамические параметры межмолекулярного взаимодействия.

Если частицы среды образуют правильные ряды (квазирешетчатая модель жидкости), то свет, рассеянный от разных частиц, интерферирует, и интерференция уничтожает светорассеяние. Однако, из-за хаотического теплового движения молекул равные небольшие объемы жидкости или газа содержат разное число частиц; в результате возникают флуктуации плотности. В растворах, помимо флуктуаций плотности растворителя, возникают флуктуации концентрации растворенного вещества. В результате среда становится оптически неоднородной, и на этих неоднородностях рассеивается свет. Интенсивность рассеянного света зависит от числа, размеров, поляризуемости и асимметрии частиц.

Существует два основных метода исследования рассеяния света: статическое и динамическое светорассеяние. Статическое, или упругое, светорассеяние позволяет определить молекулярную массу, второй вириальный коэффициент и, при определенных условиях, радиус инерции макромолекул. Динамическое, или квазиупругое, светорассеяние дает возможность измерить коэффициент диффузии и рассчитать гидродинамический радиус полимерных цепей в растворе.

В приемник излучения попадает свет, рассеянный всеми частицами (рис. 8), находящимися в объеме фокусировки источника. Общая интенсивность рассеянного света раствора (I) является суммой интенсивностей рассеяния, обусловленного флуктуациями плотности (I') и флуктуациями концентрации (I''):

$$I = I' + I'' \quad (1)$$

Интенсивность рассеяния, обусловленная флуктуациями концентрации и определяемая как $I'' = I - I'$, называется избыточной интенсивностью светорассеяния.

1.9 Слайд 9

Рассеяние от ансамбля N невзаимодействующих частиц является суммой их излучений. Интенсивность рассеянного света I зависит от длины волны падающего света λ_0 , интенсивности падающего света I_0 , рассеивающего объема Ω , расстояния от рассеивающего объема до приемника x , поляризуемости молекулы α , концентрации рассеивающих частиц c и угла рассеяния θ :

$$I'' = \frac{16 * \pi^4}{\lambda_0^4 * x^2} * \alpha^2 * c * \Omega * I_0 * P(\theta) \quad (2)$$

$P(\theta)$ – функция, содержащая угловую зависимость интенсивности рассеяния. Она называется «фактор внутримолекулярной интерференции».

Вид функции $P(\theta)$ определяется размерами и формой рассеивающих частиц, то есть, для малых частиц интенсивность рассеянного света не зависит от угла рассеяния.

Коэффициент рассеяния может быть определен под разными углами, поэтому принято обозначать угол рассеяния (угол между направлением прошедшего светового пучка и направлением наблюдения θ), под которым он фиксируется, — R_θ . Коэффициент рассеяния R_θ может быть получен с помощью отношения Рэлея:

$$R_\theta = \frac{I * x}{I_0 * \Omega} \quad (3)$$

Угловую зависимость интенсивности рассеянного света представляют в виде индикатрисы рассеяния. Индикатриса рассеяния – кривая, графически отображающая зависимость интенсивности рассеянного света от угла рассеяния. Также индикатрису называют диаграммой направленности излучения. В общем случае индикатриса рассеяния не выражается явной функцией и описывается таблично либо в виде диаграмм в полярных или сферических координатах.

Вид угловой зависимости рассеяния $P(\theta)$ определяется размерами и формой рассеивающих частиц. Для рассеяния вертикально поляризованного излучения (на рис.10) вектор E направлен по нормали к плоскости XY , $E \parallel OZ$) малыми частицами, размер которых много меньше длины волны излучения, интенсивность рассеянного света не зависит от угла рассеяния при регистрации интенсивности в плоскости XY , т.е. функция $P(\theta) = 1$.

1.10 Слайд 10

Действительно, при рэлеевском рассеянии все составляющие частицу элементарные диполи излучают практически как один диполь. Причем его дипольный момент направлен вдоль оси Z . Создаваемая им электромагнитная волна симметрична относительно оси Z , т.е. интенсивность рассеянного излучения не зависит от θ . Уравнение Дебая справедливо для определения молекулярных масс только в том случае, когда размер рассеивающей частицы макромолекулярного клубка мал по сравнению с длиной волны света (менее $\lambda/20$). Интенсивность рассеяния света такой частицей, рассматриваемой как точечный излучатель, одинакова во всех направлениях. Индикатриса светорассеяния $I = f(\theta)$ в этом случае симметрична. Отношение интенсивностей рассеяния света, измеренных под двумя углами, симметричными относительно 90 градусов, называется коэффициентом асимметрии Z . Для малых частиц: $Z = I_{45}/I_{135} = R_{45}/R_{135} = 1$.

Если размеры рассеивающей частицы соизмеримы с длиной волны падающего света, то удаленные друг от друга участки частицы рассеивают свет с некоторой разностью фаз. Разница фаз этих элементарных волн будет тем больше, чем больше размеры частиц и чем больше угол рассеяния. В направлении светового пучка при $\theta = 0$ разность фаз равна нулю, в обратном направлении она наибольшая, поэтому с увеличением размеров частиц рассеяние света под углом 180 градусов оказывается наименее интенсивным. Коэффициент асимметрии больших молекул $Z > 1$ и возрастает по мере увеличения размера молекул (рис. 11).

1.11 Слайд 11

Рассмотрим вторую характеристику рассеянного света - угловое распределение яркости рассеянного света при молекулярном и аэрозольном рассеянии.

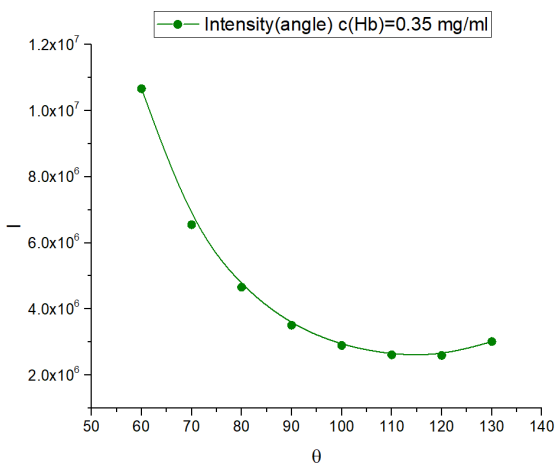
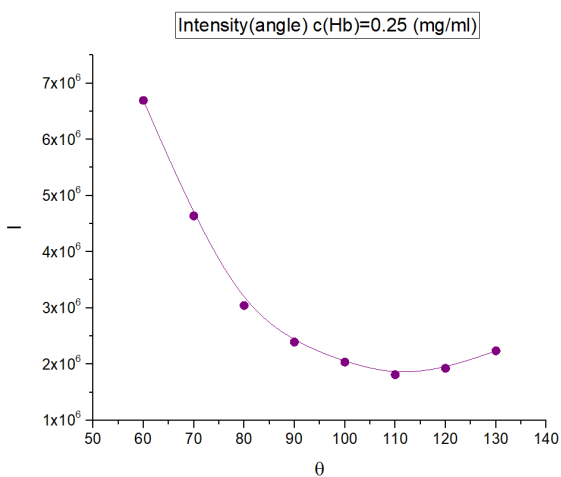
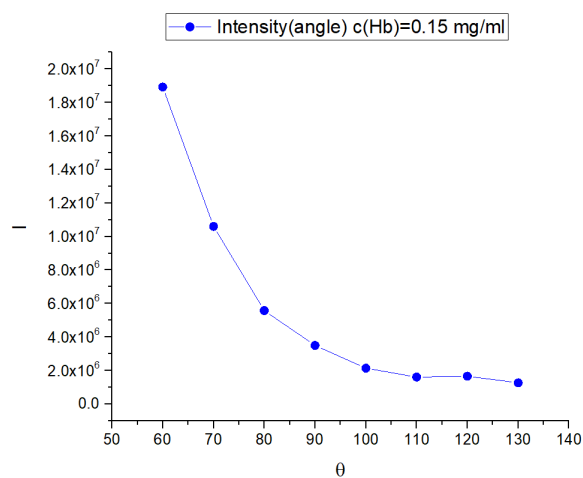
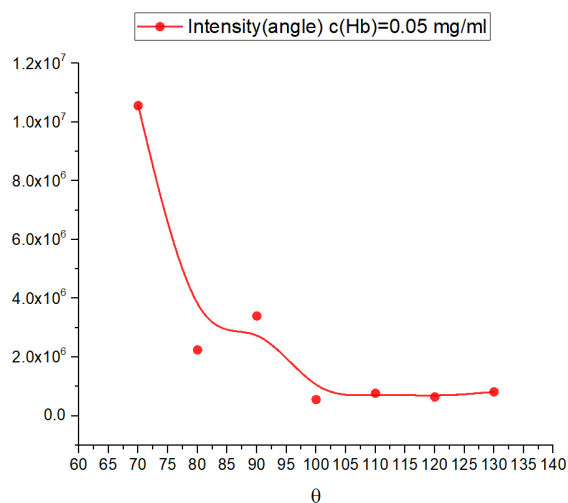
Зависимость яркости рассеянного света от угла рассеяния принято изображать в виде полярной диаграммы (рис. 13). Рассеивающая частица на рисунке помещена в центре полярной диаграммы. Свет падает на частицу слева направо. Углы рассеяния $\theta_{c=0}$ отсчитываются от 0 до 360 градусов против часовой стрелки. Длина радиуса-вектора от центра диаграммы до любой точки на индикатрисе рассеяния (внешней кривой) показывает в относительных единицах интенсивность света, рассеянного под этим углом. Поворачивая радиус-вектор вокруг точки O от 0 до 360, мы получим представление о том, как изменяется яркость рассеянного света с изменением угла рассеяния.

При молекулярном рассеянии (рис. 14 а) интенсивность света, рассеянного вперед и назад (углы 0 и 180 соответственно), в два раза больше, чем в направлениях, перпендикулярных падению света, т. е. под углами 90 и 270. В остальных направлениях интенсивность рассеянного света находится между этими двумя значениями.

Совсем иначе распределяется рассеянный свет вокруг крупной частицы. Прежде всего, теряется симметрия интенсивности рассеянного света, посылаемого вперед и назад. По мере укрупнения частицы основное количество рассеянного света направляется узким "языком" вперед в направлении падения света, т. е. сконцентрировано в области малых углов рассеяния, близких к направлению θ . Назад (под углом 180) рассеянный свет почти совсем не направляется (рис. 14 б, в, г, д). На еще более крупных частицах помимо основного максимума появляются дополнительные в виде выступов или "лепестков" под различными углами рассеяния (рис. 14 е, ж).

1.12 Слайд 12

С помощью программы Origin были получены графики: Интенсивности (I) от угла θ для концентраций $c_1 = 0.05$, $c_2 = 0.15$, $c_3 = 0.25$, $c_4 = 0.35$.



Аналогичные графики интенсивности от угла можно найти у И.Л. Фабелинского [11] для света, рассеянного на поверхности метилового спирта (рис. 58). Сплошная кривая - теоретическая. Кружками отмечены экспериментальные данные.

1.13 Слайд 13

1.14 Слайд 14

Интенсивности (I) от угла θ для концентраций $c_1 = 0.05$, $c_2 = 0.15$, $c_3 = 0.25$, $c_4 = 0.35$ в полярных координатах при отображении угла.

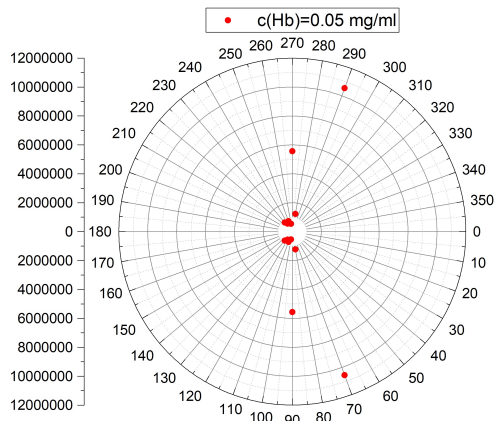


Рис. 1: Интенсивности (I) от угла θ

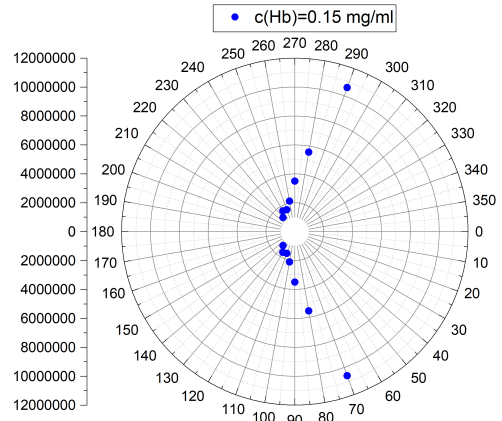


Рис. 2: Интенсивности (I) от угла θ

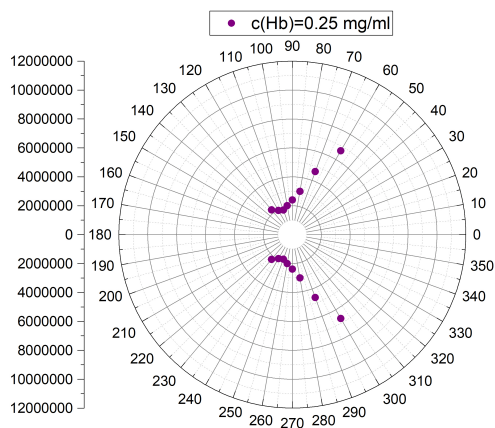


Рис. 3: Интенсивности (I) от угла θ

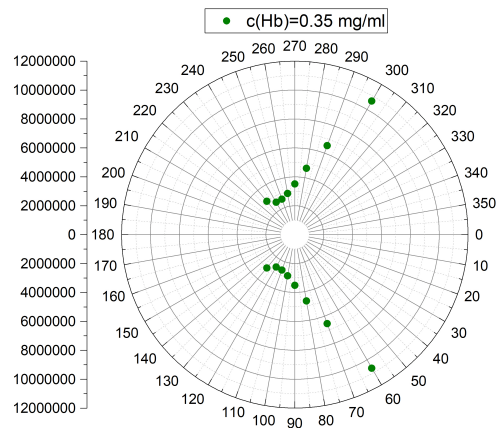


Рис. 4: Интенсивности (I) от угла θ

1.15 Слайд 15

Метод Дебая позволяет определить значение средневзвешенной молекулярной массы полимера (w) и второй вириальный коэффициент системы полимер — растворитель (2). Достаточно провести измерения рассеяния света растворителя и растворов разных концентраций только под одним углом (90 градусов). w можно рассчитать по уравнению Дебая (8).

Для расчёта оптической постоянной раствора K использовались данные :

Параметр	Значение
λ	647 нм
π	3.14
n_0	1.33
$(\frac{\partial n}{\partial c})$	$2 * 10^{-4}$ л/Г

Таблица 1: Данные для расчёта K

Используя данные, был посчитан коэффициент K для разных концентраций.

Для расчета R_{90} при разных концентрациях использовались интенсивности света растворов гемоглобина I , а также были использованы калибровочные интенсивности:

1. Интенсивность воды I_W (для разных концентраций при углах 60-130).
2. Интенсивность бензола I_B (согласно литературным данным [62], коэффициент рассеяния бензола $R_b = 12,64 * 10^{-6} \text{ см}^{-1}$ при длине волны 6328 А).
3. Интенсивность темного тока (интенсивность фона) I_T .

Эти данные позволили перейти к коэффициенту рассеяния:

$$R_{90} = \frac{I - I_W}{I_B - I_T} \quad (4)$$

Следующим шагом находились зависимости $\frac{c * K}{R_{90}}(c)$ и при помощи экстраполяции к $c=0$ рассчитывались массы рассеивающих частиц и значения коэффициентов взаимодействия. А так же по графику зависимости $\frac{c * K}{R_{90}}(c)$ определялась величина $1/M$ и второй вириальный коэффициент $2A_2$.

С помощью программы Origin был построен график cK/R_{90} от c методом наименьших квадратов (МНК).

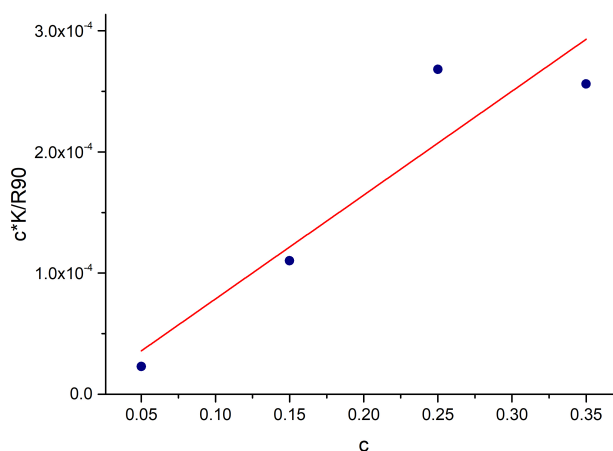


Рис. 5: Концентрационная зависимость параметра рассеяния cK/R_{90} в водном растворе гемоглобина, построенная с помощью МНК

Вывод: с помощью экстраполяции к $c=0$ получено: $1/M = 1.49 \cdot 10^{-5}$. Полученное значение эффективной массы молекулы гемоглобина $M = 67000$ г/моль близко к литературному значению: $M = 64500$ г/моль. Получено значение второго вириального коэффициента $A_2 = 4.5 \cdot 10^{-4}$.

1.16 Слайд 16

Интенсивности (I) от угла θ для концентраций $c_1 = 0.05$, $c_2 = 0.15$, $c_3 = 0.25$, $c_4 = 0.35$ в полярных координатах, полученные с помощью метода асимметрии.

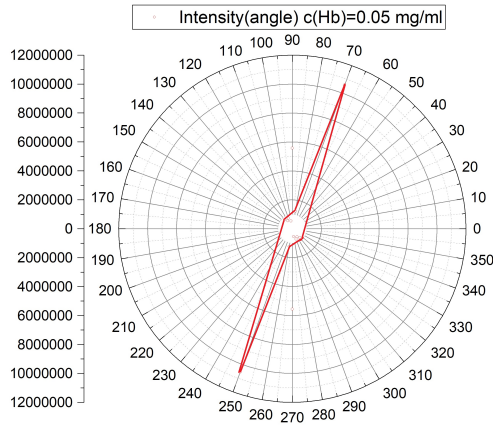


Рис. 6: Интенсивности (I) от угла θ

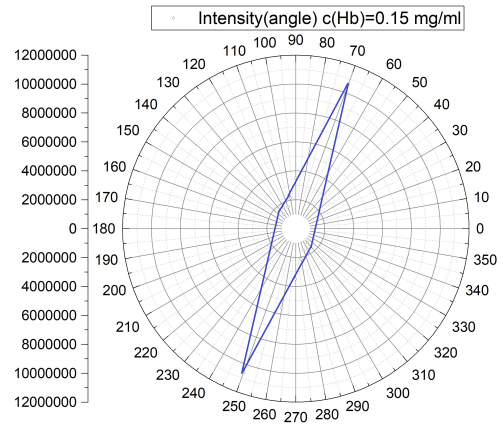


Рис. 7: Интенсивности (I) от угла θ

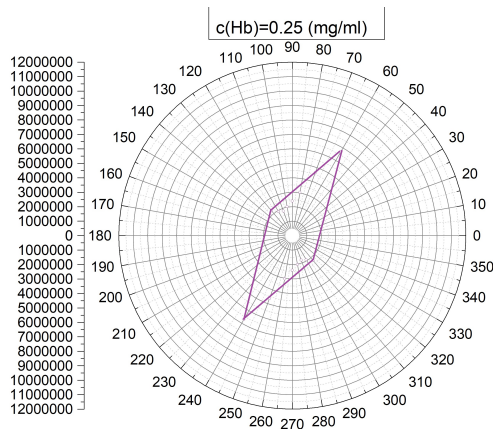


Рис. 8: Интенсивности (I) от угла θ

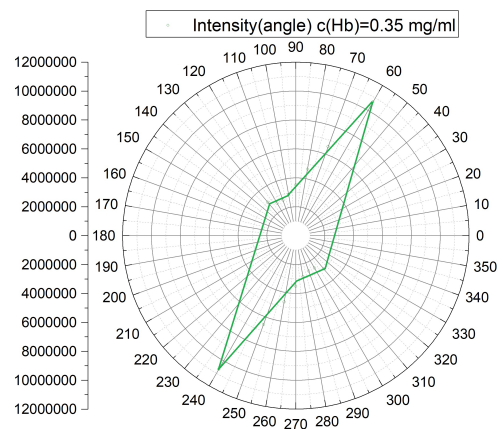


Рис. 9: Интенсивности (I) от угла θ

1.17 Слайд 17

$$Z = (I_{\theta})/I_{(180-\theta)}_{c=0} \quad (5)$$

$$I_{\theta} = K * c * M * P(\theta) \quad (6)$$

Путем умножения обратной величины начальной ординаты графика $cK/2I_{90}$ от c на фактор $P^{-1}(\theta)$:

$$M = \left(\frac{c * K}{R_{90}}\right)^{-1} * P^{-1}(\theta) \quad (7)$$

С помощью графиков был определен коэффициент асимметрии Z .

1.18 Слайд 18

Получены угловые зависимости интенсивности рассеянного света в чистом водном растворе гемоглобина при разных концентрациях.

Построены индикатрисы рассеянного света, которые показывают распределение интенсивности света в чистых водных растворах гемоглобина.

С помощью обработки данных методом Дебая:

Получено значение эффективной массы молекулы гемоглобина $M = 67000$ г/моль, которое близко к литературному значению: $M = 64500$ г/моль.

Получено значение второго вириального коэффициента $A_2 = 4.5 * 10^{-4}$

С помощью метода асимметрии получены значения при разных концентрациях :

Коэффициента асимметрии Z .

Фактор внутримолекулярной интерференции $P(\theta)$.

Исследована форма гемоглобина.

Относительные размеры молекулы гемоглобина D/λ .

При приближении исследуемых водных растворов к концентрациям близким к физиологическим форма гемоглобина стремится к патологическому виду - HbS.

1.19 Слайд 19

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!