

Слайд 2

Актуальность работы связана с тем, что с помощью данных о структуре белка можно создавать лекарственные препараты направленного действия с заранее известной активностью, а также синтезировать новые химические препараты. Методы лазерной спектроскопии позволяют получать информацию о структуре и подвижности функциональных групп биомолекул.

Целью данной работы являлось изучение особенностей комбинационного рассеяния (КР) света в чистых растворах гемоглобина и в растворах гемоглобина, содержащих соль хлорида железа (III). В связи с этим были поставлены следующие задачи:

1. Приготовление образцов для КР спектроскопии с расчетом соответствующих для эксперимента концентраций и ионных сил растворов
2. Выявление пиков в спектре КР гемоглобина, частоты которых будут соответствовать определенным типам связи и типам симметрии молекулы
3. Обнаружение различий или подобий в спектрах растворов белка и растворов белка с солью.

Слайд 3

Объектом исследования в работе является белковая молекула, представляющая собой полимер, состоящий из связанных остатков аминокислот.

В нашей работе исследовался глобулярный белок гемоглобин (Hb), относящийся к сложным белкам хромопротеидам. Hb составляет 35% от общей массы эритроцита, состоит из 2 частей: небелковая часть – гем (4 % молекулы гемоглобина) и белковая часть – глобин (96 %).

В состав ядра гема входит ион Fe^{2+} . Именно ион Fe^{2+} , но не Fe^{3+} , может связываться с кислородом. Fe^{2+} в составе гема (без глобина) может связывать кислород, но и оно быстро окисляется, поэтому свободный гем тоже не способен к транспорту кислорода.

Слайд 4

Хлорное железо $FeCl_3$ — средняя соль трехвалентного железа и соляной кислоты.

Железо является незаменимым микроэлементом для нормальной жизнедеятельности, однако его и пониженное и повышенное содержание оказывает пагубное воздействие на организм. Железо принимает участие в таких процессах как:

- 1) регуляция окислительно-восстановительных реакций (связывает кислород)
- 2) стимуляция эритропоэза (процесс образования эритроцитов),
- 3) восстановление кровопотери при травмах

Слайд 5

В результате взаимодействия падающего излучения с молекулами вещества возникают линии КР рассеяния света. При описании Рэлеевского рассеяния света предполагалось, что молекулы неподвижны в пространстве, однако в жидком и газообразном состояниях вещества они могут вращаться.

Кроме того, ядра молекул колеблются с определенной частотой относительно друг друга. За счет этих видов движения в спектре рассеянного света и появляются линии КР света. Рассмотрим влияние вращения молекул на спектральный состав рассеянного света.

В этом рассмотрении мы учитываем, что молекула представляет собой жесткую систему. В этом случае на молекулу действует составляющая электрического поля, под действием которой в ней возникает индуцированный дипольный момент P .

Таким образом, при разложении получается, что рассеянный свет должен содержать наряду с излучением с несмещенной частотой ω (рэлеевская линия) также и излучения, частоты которых смещены на величину. В результате в спектре рассеянного света должны появляться суммарные и разностные частоты.

При этом если молекула переходит под воздействием падающего излучения на более высокий энергетический уровень, то частоты рассеянного излучения уменьшаются. Эти переходы и соответствующие им длины волн называются Стоксовыми (красными), а если молекула занимает более низкое энергетическое состояние, то частота увеличивается. Такие переходы и соответствующие им длины волн называются Антистоксовыми (фиолетовыми).

Слайд 6

Изучив литературу по данной теме, еще до проведения первой серии экспериментов, удалось убедиться, что гемсодержащие белки подходят для изучения рамановской спектроскопии. Это связано с тем, что значительное усиление комбинационного рассеяния достигается, когда длина волны лазерного возбуждения совпадает с полосой поглощения порфиринового

кольца. Гемоглобин содержит протопорфирин железа в качестве простетической группы.

Также в статье показано, что использование Рамановского представления подходит для распределения активных фармацевтических ингредиентов в таблетке с малой концентрацией. Например, с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния можно различать полиморфы, которые представляют собой одинаковые химические соединения, встречающиеся в разных кристаллических формах. Образец, использованный для этого анализа – таблетка тиболона (синтетический стероид). Концентрация тиболона в таблетках была небольшой (около 3% по весу).

Исследования ученых с биологического факультета МГУ с помощью наночастиц серебра заключались в изучении конформации гемопорфирина и способности белка гемоглобина переносить кислород при введении животным наночастиц серебра.

Авторы выбрали в качестве объектов исследования крыс, получавших внутрибрюшинные инъекции воды и инъекции раствора серебра.

При инъекциях НЧС в течение шести месяцев было обнаружено достоверное уменьшение количества о-Гб. Авторы объясняют это следующим:

- 1) уменьшением степени оксигенации гемоглобина в эритроцитах в капиллярах легких;
- 2) высокой степенью сброса O_2 в капиллярах тканей в связи с увеличением потребления O_2 клетками.

Так, способность Гб связывать O_2 увеличивается, а способность Гб сбрасывать O_2 не изменяется ни в одной из исследуемых групп. Авторы предполагают, что увеличение способности Гб связывать O_2 является компенсаторной реакцией на снижение поступления O_2 в эритроциты.

Также на данном слайде вы можете видеть экспериментальную установку, используемую в нашем исследовании, КР-микроскоп DXR Raman Microscope (Thermo Scientific).

Слайд 7

Методом КР были исследованы колебательные и вращательные состояния молекул белка Hb. В результате лазерного излучения молекулы вещества переходят на некий энергетический виртуальный уровень, с последующим переходом в новое колебательное состояние.

Гемопорфирин Hb обладает довольно интенсивным КР света вследствие наличия в гемопорфирине гетероциклов с сопряженными связями. Спектр Hb представляет собой совокупность полос, вызванных нормальными колебаниями связей в гемопорфирине.

На данном слайде представлен спектр КР сухого Hb, и этот же спектр в диапазоне частот 700 – 1700 см^{-1} . На рисунке слева вы можете видеть характерные пики на частотах, которые соответствуют определенным типам симметрии колебаний и определенной форме молекулы Hb.

Пики 1355 и 1375 см^{-1} наблюдаются в каждом из полученных нами спектров и связаны они с симметричными колебаниями пиррольных колец (связи C_aC_b , C_aN и C_aNC_a) в молекулах дезоксигемоглобина и Hb.

Пики 1548-1552 см^{-1} и 1580-1588 см^{-1} также присутствуют в спектрах и связаны с колебанием метиновых мостиков между пирролами (связи C_aC_m , $\text{C}_a\text{C}_m\text{H}$).

Полоса КР-спектра 1618 см^{-1} , наблюдаемая как в спектре белка, так и белка с солью, характеризуется колебаниями двойных связей пирролов (C_aC_b , C_bC_b) и винильных групп.

Слайд 8

На данном слайде мы наблюдаем спектры КР раствора Hb и раствора Hb с солью при $c=0.025\text{ мг/мл}$. Это общий вид спектра во всем диапазоне частот.

Слайд 9

На этом слайде расположены те же спектры для белка и белка с солью, однако здесь есть возможность провести качественный анализ. На графике наглядно видно, что значения интенсивности в растворе белка с солью несколько ниже, чем в растворе белка. А также характерные пики на спектре белка с солью сдвинуты по оси частот и менее ярко выражены, по сравнению с чистым раствором белка.

Слайд 10

Здесь представлен диапазон частот $700 - 1700\text{ см}^{-1}$ с характерными частотами колебаний.

Слайд 11

На данном слайде мы переходим к рассмотрению спектров для растворов с концентраций, равной 0.025 мг/мл .

Слайд 12

Для следующих растворов можно провести сравнительный анализ их КР спектров. Где также наглядно видно, что характерные пики в растворе с

солью несколько сдвинуты по оси частот и менее ярко выражены, по сравнению с чистым раствором белка.

Слайд 13

Данные растворы при $c = 0.125$ мг/мл также представлены в диапазоне частот $700 - 1700$ см^{-1} , где наблюдаются характерные частоты колебаний.

Слайд 14

Проанализировав все вышепредставленные спектры, каждый из характерных пиков был сопоставлен с определенным типом симметрии колебаний и формой молекулы Hb.

Так, для КР спектра комплексов Hb с кислородом характерна полоса 1375 см^{-1} , а для дезокси – Гб – 1355 см^{-1} . Интенсивность данных полос соотносится с симметричными колебаниями пирролов гемопорфирина (C_aC_b , C_aN , C_aNC_a) и зависит от наличия лиганда (O_2), оттягивающего от Fe^{2+} электронную плотность.

Соответствующие частотам типы связи наглядно представлены на структурной формуле.

Слайд 15

В результате проделанной работы, были сделаны следующие выводы.

1) Получены соотношения интенсивностей КР-полос:

А) Таким образом (таблица 2), относительное содержание комплексов ГбNO (I типа) в эритроците относительно суммарного Hb клетки составляет примерно 0.5. Содержание комплексов ГбNO остается также в 2 раза ниже суммарного Hb клетки при повышении концентрации белка в растворе.

Б) Таблица 3. Соотношение интенсивностей $\frac{I_{1355}}{I_{1552}}$

$$В) \frac{I_{1375}}{I_{1580}} = 1.01$$

Относительная способность Hb эритроцитов связывать лиганды составляет примерно 1.1 (таблица 3), как в растворе с меньшей (0.025 мг/мл), так и большей (0.125 мг/мл), концентрацией белка. Однако относительная способность Hb сбрасывать лиганды получена только для спектра сухого белка (поскольку пиков на частоте 1580 см⁻¹ обнаружено не было), и составляет примерно 1.

2) В растворах с наименьшей концентрацией белка (с=0.025 мг/мл) были получены более высокие значения интенсивности (примерно в 3-4 раза), чем в спектре сухого Hb и растворов с большей концентрацией (с=0.125 мг/мл), что хорошо согласуется с литературными данными. Это может быть связано с ослаблением аминокислотными остатками водородных связей.

3) В каждом спектре (и растворов белка, и белка с солью) наблюдаются характерные пики, соответствующие частотам колебаний в молекулах Hb и дезоксигемоглобина. Таким образом, сделан вывод о типе симметрии колебаний и форме Hb (табл. 1). Пики 1355 и 1375 см⁻¹ свидетельствуют о симметричных колебаниях пиррольных колец, а частота 1618 см⁻¹, наблюдаемая как в спектре белка, так и белка с солью, указывает на образование гексакоординированных комплексов I типа ГбNO в эритроците.

4) Обнаружено, что при добавлении в раствор белка соли, интенсивность уменьшается примерно в 1.5 раза. На сравнительном КР спектре (рис.19,22) также наглядно видно, что при добавлении в раствор соли, пики интенсивности несколько сглаживаются и смещаются по оси частот, что, вероятно, связано с конформацией белка.

