

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

ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

КАФЕДРА МОЛЕКУЛЯРНЫХ ПРОЦЕССОВ И ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ  
СОСТОЯНИЙ ВЕЩЕСТВА

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

**«Исследование структуры гемоглобина при изменении ионной силы  
раствора методом комбинационного рассеяния»**

Выполнила студентка 204 М группы  
Рубцова Ольга Владимировна

\_\_\_\_\_   
подпись студента

Научный руководитель:  
к.ф.-м.н., м.н.с.  
Гибизова Виктория Валерьевна

\_\_\_\_\_   
подпись научного руководителя

Допущена к защите « \_\_\_\_ » « \_\_\_\_\_ » 2020г.

Зав. кафедрой

профессор Сысоев Н.Н.

\_\_\_\_\_   
подпись зав. кафедрой

Москва  
2020

## Оглавление

Введение.....	3
Литературный обзор .....	7
1.1. Белки.....	26
1.2. Гемоглобин .....	28
1.3. Хлорид железа (III) .....	29
Глава 2. Теоретические основы метода измерений. Теория комбинационного рассеяния света.....	31
Глава 3. Экспериментальная установка.....	35
3.1. Первичная обработка экспериментальных данных. Программное обеспечение OMNIC Spectra.....	36
3.2. Метод сравнения .....	36
Глава 4. Приготовление исследуемых образцов.....	38
4.1. Приготовление исследуемых растворов.....	38
4.2. Расчет ионной силы для исследуемых растворов.....	39
Глава 5. Результаты исследования .....	40
5.1. Обработка экспериментальных данных.....	40
5.2. Обсуждение полученных результатов .....	46
Выводы .....	48
Список литературы .....	49

## Введение

Белки – высокомолекулярные соединения. Они играют ключевую роль в процессах жизнедеятельности любого организма, управляют действием генов; при их участии реализуется генерация нервных импульсов, кроме того являются неотъемлемой частью иммунной системы, составляют основу костной и соединительной ткани и выполняют ряд других важнейших функций, тем самым представляя огромный интерес для изучения.

Белок представляет собой сложную колебательную систему, в которой перемещение функциональных групп имеет направленный характер и зависит от его структуры. Молекулы белков состоят из 20 аминокислот, а число аминокислотных остатков может достигать нескольких тысяч. При этом только 9 из 20 аминокислот гидрофобны, а остальные, гидрофильны [1]. Таким образом, белки достаточно схожи по химическому составу, а основные различия связаны с их размерами и структурой.

Металлы и их соединения необходимы для нормальной жизнедеятельности организма, однако при превышении допустимой концентрации могут создать угрозу для здоровья.

Железо – наиболее распространенный в природе и необходимый организму человека химический элемент. Важным свойством железа является то, что оно входит в состав гемоглобина, обуславливая тем самым красную окраску вещества. Этот элемент принимает участие в процессе кровотока, дыхания, иммунозащитных ответах организма и входит в состав многих ферментов. Поэтому актуальным является изучение взаимодействия белковых молекул с солями железа.

Одним из основных белков сыворотки крови человека является гемоглобин. Этот белок является переносчиком кислорода, тем самым осуществляет в организме дыхательные процессы.

Исследование структуры белка – одна из важнейших задач при изучении биологических молекул, поскольку функциональная активность белков связана с их структурой. Эти задачи расширяют знания о различных жизненных процессах, и могут способствовать улучшению качества жизни человека. С помощью данных о структуре белка можно создавать лекарственные препараты направленного действия с заранее известной активностью, а также синтезировать новые химические препараты.

Молекулы белка являются одними из наиболее интересных биологических структур, поскольку они участвуют в функционировании живых организмов. Сложная пространственная структура макромолекулы белка определяет его функциональную активность. Даже незначительные структурные изменения могут вызвать существенные изменения в ферментативной активности.

Оптические методы исследования часто применяются в исследованиях биологических объектов, биомедицинской диагностике и терапии. Методы лазерной спектроскопии позволяют получать информацию о структуре и подвижности функциональных групп биомолекул.

Лазерные источники света характеризует одновременное сочетание таких свойств, как: узкая ширина полосы излучения, высокая мощность и когерентность. Спектроскопия комбинационного рассеяния света (КР) является одним из наиболее информативных методов исследования конформации белков. Очевидным преимуществом КР спектроскопии является её равносильная пригодность как для исследования жидкостей, растворов, газов, так и пленок, поверхностей, кристаллов. Кроме того, количества веществ, необходимые для исследования этим методом ограничены лишь поперечными размерами сфокусированного лазерного луча.

Узкая спектральная ширина линии лазерного возбуждения и использование многоканальной системы регистрации позволяет измерять КР спектры в диапазоне от 10 до 4000 см<sup>-1</sup>. Также возможно получение информативных спектров даже при небольших концентрациях веществ, поскольку в видимом диапазоне белки

практически прозрачны. С помощью метода КР спектроскопии можно получить уникальную информацию о структуре различных связей (пептидных, дисульфидных и т.д.) в молекулах белков.

Кроме того, в настоящее время считается установленным фактом, что ведущими причинами гибели нейронов при поражениях мозга (инсульт, ишемия/гипоксия, нейродегенеративные процессы) являются разрушение гематоэнцефалического барьера и повышение свободнорадикальных соединений – NO, NO<sub>2</sub>. Гипоксия относится к состоянию, при котором организм, отдельные органы и ткани испытывают недостаток кислорода.

Практически любой паталогический процесс в живых организмах прямо или косвенно связан с нарушением кислородной обеспеченности. Белком, отвечающим за присоединение кислорода в легких и отдачу его тканям, является гемоглобин. При этом стремление гемоглобина связываться с кислородом должно быть достаточным, чтобы обеспечить кровь кислородом, но не избыточным, чтобы не нарушить процесс отдачи кислорода клеткам.

Известно также, что прогрессирование ряда заболеваний сопровождается морфофункциональными изменениями форменных элементов крови, в частности эритроцитов. При таких заболеваниях, травмах, сопровождающихся сильным повреждением тканей, происходит нарушение водно-электролитного состава крови, и, как следствие, нарушается функционирование форменных элементов крови. А гемореологические нарушения способствуют развитию гипоксии, от выраженности и длительности которой зависит вероятность осложнений и летальности [2].

Таким образом, под воздействием неблагоприятных факторов (заболевания, травмы) с эритроцитами могут происходить различные изменения – изменяется структура, нарушается нормальное функционирование. По этой причине был выбран метод лазерной спектроскопии – метод КР, позволяющий получать информацию о структуре и подвижности функциональных групп биомолекул.

Целью данной работы являлось изучение особенностей 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.

## Литературный обзор

Изучив литературу по данной теме, еще до проведения первой серии экспериментов, удалось убедиться, что гемсодержащие белки подходят для изучения рамановской спектроскопии. Рамановские и ИК-спектроскопические методы являются эффективными инструментами для изучения молекулярных структур.

Теория используемого в работе метода КР описана авторами статьи [3] с точки зрения «теории поляризуемости» (теория Плачека, 1934), которая справедлива в приближении, если частота возбуждения намного выше, чем частота колебательного перехода, но ниже частоты перехода в электронное возбужденное состояние.

Согласно квантовой механике, молекула может поглощать энергию  $h\nu$ , чтобы достичь первого колебательно - возбужденного состояния, где световые кванты в инфракрасной области с длиной волны от 2,5 до 1000 мкм обладают энергией  $h\nu = h_c\nu'$  с  $\nu'=4000...10 \text{ см}^{-1}$ . Молекула, которая облучается непрерывным спектром инфракрасного излучения, может поглощать кванты света, которые имеют эту энергию. Спектр оставшегося излучения показывает полосу поглощения на частоте  $\nu_R$  (рис.1а). Колебание двухатомной молекулы или одной колебательной степени свободы многоатомной молекулы возбуждается переходом от энергетического уровня  $n = 0$  к  $n = 1$ .

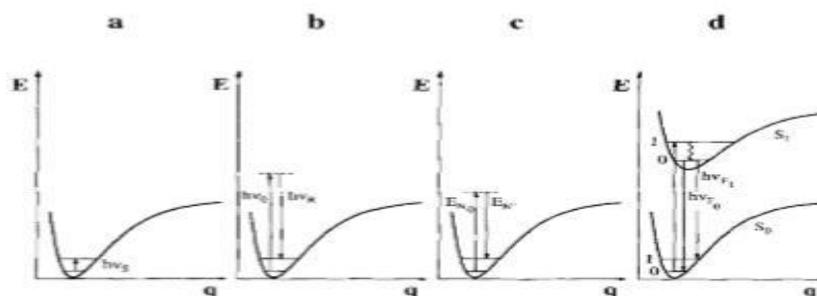


Рисунок 1. а) поглощение ИК-излучения, б) Рамановское рассеяние, в) неупругое рассеяние нейтронов, г) флуоресценция [3]

Существует другой способ возбуждения того же колебания – с помощью неупругого рассеяния световых квантов с более высокой энергией, так называемым эффектом Рамана, проиллюстрированным на рисунке 1б. При неупругом воздействии светового кванта на молекулу, колебательная энергия  $h\nu$  может измениться.

Таким образом, рассеиваются световые кванты, которые имеют более низкую или более высокую энергию, в соответствии с уравнением:

$$h\nu_R = h\nu_0 \pm h\nu_S, \quad (1)$$

где  $h\nu_S$  - это колебательная энергия. Кванты энергии  $h\nu_R$  дают спектр КР. В то же время возбуждающие световые кванты также упруго рассеиваются, это явление рэлеевского рассеяния.

Облучение световыми квантами молекул  $h\nu_0$  в основном колебательном состоянии может привести к рассеиванию молекул в возбужденном колебательном состоянии, квантов с энергией  $h\nu_R = h\nu_0 - h\nu_S$ . Поскольку некоторые молекулы уже находятся в возбужденном состоянии, возможен также процесс, который дает кванты с большей энергией  $h\nu_R = h\nu_0 + h\nu_S$ . Интенсивность линии дает информацию о молекулярной структуре и показывает модуляцию поляризуемости молекулы [3].

Испускается квант энергии  $h\nu_0 \pm h\nu_S$ . При температуре окружающей среды большинство молекул находятся в основном колебательном состоянии, гораздо меньшее число молекул находится в возбужденно-колебательном состоянии. Следовательно, происходит КР, которое передает колебательную энергию молекуле и покидает квант с более низкой энергией ( $h\nu_0 - h\nu_S$ ) с большей вероятностью, чем обратный процесс.

Линии Стокса вызваны квантами более низкой энергии. Поскольку их интенсивности выше, чем у антистоксовых линий, только они обычно регистрируются как спектры КР.

На рисунке 2 показана неполярная молекула, такая как бензол, которая находится между пластинами заряженного конденсатора. Отрицательно заряженная пластина притягивает ядра, а положительная - электроны. Таким образом, дипольный момент индуцируется.

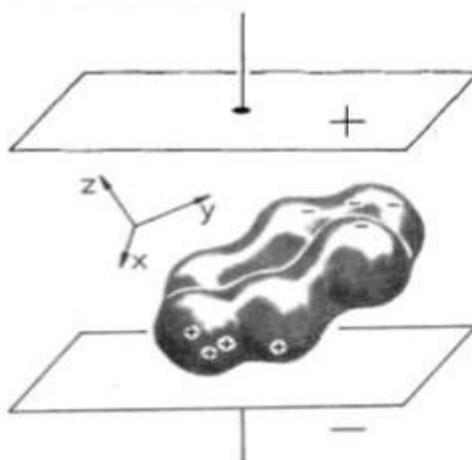


Рисунок 2. Молекулярно-дипольный момент, индуцированный электрическим полем [3]

Когда молекула подвергается воздействию переменного электрического поля высокой частоты, индуцированный дипольный момент также будет изменяться с той же частотой  $\nu_0$ . Следовательно, молекула будет излучать с этой частотой. В результате этого процесса происходит рэлеевское рассеяние.

Гибкость электронов и ядер в молекуле зависит от их взаимного расстояния. Если расстояние мало, то внешнее поле оказывает меньшее влияние на частицы. Следовательно, поляризуемость молекулы может модулироваться колебаниями, а индуцированный дипольный момент и амплитуда излучаемого поля модулируются частотой этих колебаний. Можно сказать, что молекула ведет себя как радиоантенна, которая излучает сигналы, генерируемые амплитудной модуляцией определённой несущей частоты с частотой сигнала  $\nu_s$  (рис. 3).

В результате спектрометр даёт информацию по центральной частоте, а также по боковым полосам на расстоянии  $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ . Боковая полоса с более низкой частотой имеет интенсивность выше, чем боковая полоса с более высокой частотой.

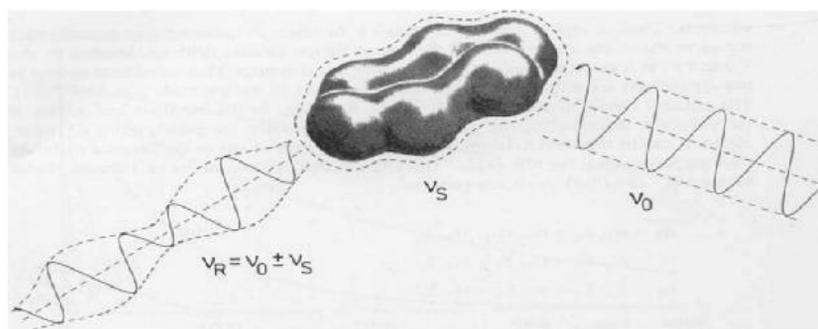


Рисунок 3. Преобразование рассеянного света с помощью колебаний молекулы [3]

Если же  $\nu_0$  приближается к  $\nu_s$ , то возникают резонансы, которые значительно увеличивают интенсивности комбинационных линий, т. е. резонансный эффект КР. Если возбуждающее излучение имеет очень высокую интенсивность, как в «гигантских лазерных импульсах», то индуцированный дипольный момент больше, чем в линейном приближении: это приводит к «нелинейным эффектам» (таким как гиперкомбинационное рассеяние и др). [3]

Когда молекула подвергается воздействию электрического поля, электроны и ядра вынуждены двигаться в противоположных направлениях, возникает дипольный момент, который пропорционален напряженности электрического поля. Молекулярные колебания могут наблюдаться в спектре КР, если есть колебания молекулярной поляризуемости.

Спектры КР могут возбуждаться монохроматическим излучением, испускаемым различными лазерами в видимом или ближнем инфракрасном диапазоне. Обычно регистрируется только спектр КР, который смещен в сторону меньших волновых чисел - спектр КР Стокса (Ar<sup>+</sup>-лазер на 488 и 515 нм, HeNe-лазер на 623 нм, GaAs-лазер на 780 нм и Nd. YAG лазер при 1064 нм).

Если квант света  $h\nu_0$  попадает в молекулу, то с наибольшей вероятностью имеет место процесс упругого рассеяния квантов с энергией  $h\nu_0$ . Неупругий процесс, во время которого происходит обмен энергией, возможен с гораздо меньшей вероятностью - это называется рамановским рассеянием (рис. 4) [4].

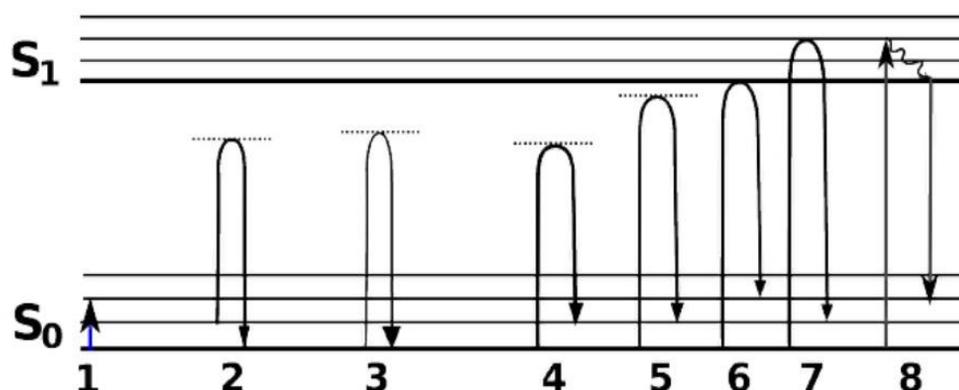


Рисунок 4. Схема переходов между колебательными подуровнями и электронными уровнями молекулы при инфракрасном поглощении света (1), КР света (2-7) и флуоресценции (8) [4]

На данной схеме (рис. 4) цифра 2 соответствует переходу молекулы между колебательными подуровнями при анти-Стоксовском КР света, цифра 3 — при Рэлеевском рассеянии света, цифры 4-7 — при Стоксовском КР света (горизонтальные пунктирные линии - виртуальные энергетические уровни). Цифрой 8 показано поглощение света с последующим испусканием кванта флуоресценции и возвращением молекулы на основной электронный уровень  $S_0$ . Переход 4 — нерезонансное КР света, 5 — предрезонансное КР света, 6 и 7 - резонансное КР [4].

Белки гема являются одним из наиболее изученных классов биомолекул, главным образом из-за их разнообразного спектра структур и их биологических функций во многих жизненных процессах.

Гемсодержащие белки можно легко изучить с помощью резонансно-рамановской спектроскопии (РРС). Это связано с тем, что значительное усиление Рамана достигается, когда длина волны лазерного возбуждения совпадает с полосой поглощения порфиринового кольца. Гемоглобин содержит протопорфирин железа в качестве простетической группы.

Авторами статьи [5] были исследованы 26 белков различной структуры с помощью спектроскопии КР с 488, 532 и 1064 нм. Выбранные белки были разделены в соответствии со структурной классификацией белков на четыре класса в зависимости от их вторичной структуры: спиральная (a),  $\beta$ -листовая (b), смешанные структуры (a / b, a + b, s) и другие.

С помощью спектроскопии КР можно использовать несколько мод колебаний для анализа пептидной структуры. Большинство характерных полос связаны с группой CONH, называемой амидом А (растяжение NH, при  $\nu = 3500 \text{ см}^{-1}$ ), амидом В (растяжение NH, при  $\nu = 3100 \text{ см}^{-1}$ ) и амидом I-VII. Рамановская спектроскопическая характеристика может быть применена к белкам в различных состояниях: водный (разбавленный) раствор (имеет низкую интенсивность в спектрах Рамана), аморфные агрегаты, твердые частицы и кристаллы.

Были измерены альбумин человека, коллаген из крысиного хвоста и из ахиллового сухожилия быка, гемоглобин и т.д.

Спектры КР белков регистрировали с использованием рамановского микроскопа WITecconfocal CRM alpha 300. Спектры регистрировали в нескольких точках на образце, а после сравнения и подтверждения профиля спектра были выбраны спектры с высоким отношением сигнал / шум.

Наиболее сильные полосы в спектре гемоглобина (Hb), возбуждаемые светом 532 нм, появляются при 1585, 1131 и 751  $\text{см}^{-1}$ . В спектре Hb, полученном при 488 нм, самые сильные полосы наблюдались при 1360 и 1585  $\text{см}^{-1}$ . Эти полосы указывают на то, что измеряемый белок может соответствовать неподвижным состояниям ионов железа ( $\text{Fe}^{2+}$  /  $\text{Fe}^{3+}$ ). Для получения спектра чистых дезоксигемопорфиринов ( $\text{Fe}^{2+}$ ) было использовано добавление дитионита натрия в растворы Hb. Такая же ситуация наблюдается в случае белка миоглобина (Mb). Спектры Mb характеризуются в основном полосами 1585, 1380, 751  $\text{см}^{-1}$  (с лазером 488 нм).

Особое внимание следует обратить на сравнение положения характерных полос в спектрах, полученных при различном возбуждении. Кроме того, когда сигналы перекрываются, максимум полос может быть считан с некоторой неопределенностью.

Авторы предположили, что это вызвано загрязнением образцов или их деградацией. Более того, белки, классифицируемые как  $\alpha$ -спиральный или  $\beta$ , иногда показывают фактически смешанные структуры [5].

Рамановское представление также отлично подходит для оценки пространственного распределения активных фармацевтических ингредиентов в таблетке с малой концентрацией.

Фармацевтическая промышленность должна быть в состоянии полностью охарактеризовать активный фармацевтический ингредиент (API) в рецептурах продукта. Некоторые API адаптируют различные структурные формы, которые влияют на функциональное поведение препарата. Сольваты, полиморфы, степень кристаллизации и солеобразование представляют собой некоторые из возможных структурных изменений API. Они могут влиять на способ доставки лекарственного средства и его эффективность. Гомогенное распределение компонентов часто является важным фактором при разработке рецептур и процедур обработки. Различные производственные процессы могут изменить характер и распределение API, поэтому часто необходимо проверять продукт после этапов обработки, а не только конечный продукт [6].

Рамановская спектроскопия может использоваться для идентификации и проверки компонентов, а также для предоставления подробной информации о молекулярной структуре и химической среде. Её можно использовать с целью определения различий в очень похожих материалах. Например, рамановская спектроскопия может различать полиморфы, которые представляют собой одинаковые химические соединения, встречающиеся в разных кристаллических формах. Конкретный присутствующий полиморф будет зависеть от условий

кристаллизации и стабильности различных форм. Некоторые полиморфы могут преобразовываться в другие формы на этапах обработки, что важно отметить, поскольку полиморфы могут иметь различную эффективность.

При использовании рамановской визуализации обеспечивается представление всей выборки с учётом пространственной информации, что особенно важно при оценке однородностей и пространственного распределения компонентов, а также для определения местоположения компонентов с более низкой концентрацией.

Данные КР для образцов были получены авторами статьи [6] с помощью рентгеновского микроскопа ThermoScientific «DXR» и прилагаемого программного обеспечения ThermoScientific «OMNIC».

Образец, использованный для этого анализа – таблетка тиболона. Тиболон – это синтетический стероид, используемый в гормональной терапии у женщин в постменопаузе. Концентрация тиболона в таблетках была небольшой (около 3% по весу). Цель исследования - идентифицировать тиболон в таблетке, показать его пространственное распределение и проверить существование различных полиморфов в таблетке. Первым шагом в анализе было создание комбинационного изображения из целой таблетки (рис. 5А).

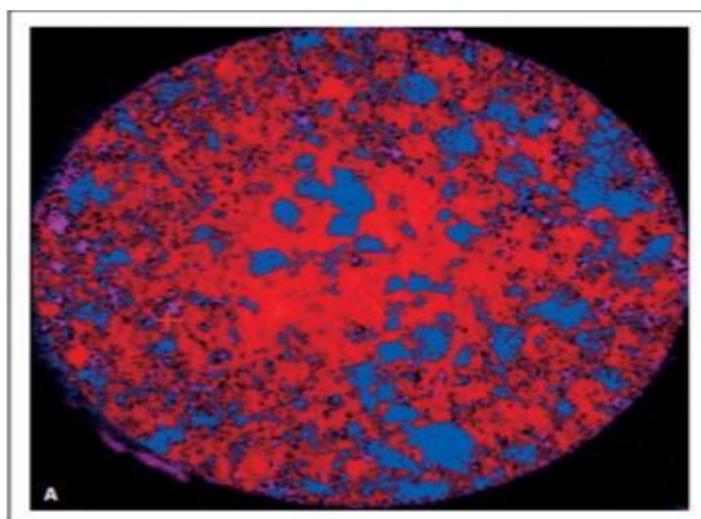


Рисунок 5А. Комбинационное изображение таблетки тиболона (красная область - крахмал, синяя – лактоза [6])

Это изображение генерируется из 52000 спектров с интервалом 25 микрон.

Лазер 532 нм использовался вместе с объективом 10х. В этом случае большая часть таблетки определяется двумя составляющими. Красные частицы представляют собой крахмал, а синие частицы - лактозу. Присутствие тиболона в таблетке было наиболее очевидным, когда комбинационное изображение строилось при интенсивности (высоте пика)  $2102 \text{ см}^{-1}$ .

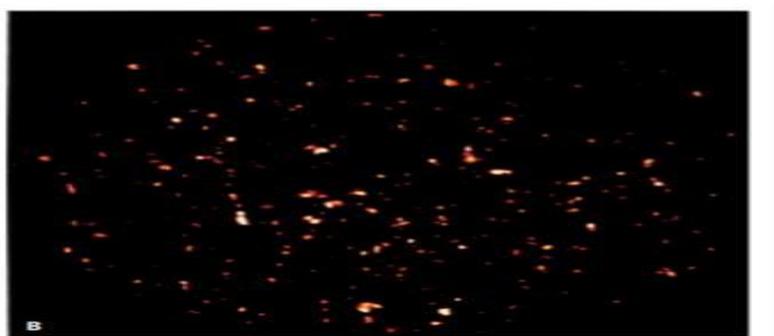


Рисунок 5Б. Пространственное распределение тиболона [6]

Изображение на рисунке 5Б состоит из 75000 спектров с интервалом в пять микрон. Частота 50 Гц и 25 сканирований были использованы, и для построения этого изображения потребовалось около 10 часов.

В данной статье показано, как рамановская визуализация может быть использована для анализа фармацевтических продуктов, где АРІ присутствует в довольно низких концентрациях (стандартно для многих фармацевтических продуктов) [6].

В последние несколько десятилетий исследование полимеров становится все более важным для промышленности. Целью может являться укрепление полимера, сделать его менее хрупким, более теплостойким или облегчить переработку и технологичность.

Понимание механизма взаимодействия между компонентами в неоднородных материалах требует анализа этих материалов в микронном или

даже субмикронном масштабе. Развитие атомно-силовой микроскопии (АСМ) открыло новые горизонты в исследовании материалов на микронном, субмикронном и нано уровнях. АСМ используется для количественных исследований локальных механических и электромагнитных свойств. Однако дополнительную информацию можно получить с помощью других аналитических методов, таких как расширение измерений АСМ с помощью комбинационного прибора. Интеграция обеспечивает одновременно пространственную и молекулярную информацию, которая дополняет механическую и электромагнитную информацию, предоставленную АСМ.

Способность идентифицировать отдельные компоненты полимерных смесей в сочетании с АСМ-визуализацией предоставляет ценную информацию, которая явно устанавливает связь между химическими, морфологическими свойствами в материалах.

Инфракрасные спектры с Фурье-преобразованием и спектры КР белков с существенно различными структурами были измерены в спектральном интервале от 50 до 500  $\text{см}^{-1}$  в работе [7] и были обнаружены заметные спектральные различия. Интенсивности нескольких спектральных полос коррелируют с содержанием элементов вторичной структуры.

Измерения проводились в диапазоне отпечатков пальцев (т.е. в области, где положение интенсивности полос поглощения сугубо индивидуальны для каждого конкретного органического соединения: 1500-500  $\text{см}^{-1}$ ).

Результаты показывают перераспределение интенсивности полос, связанных с конформационными переходами. Такие переходы могут вызывать изменения молекулы белка в целом.

В одной из первых работ с использованием низкочастотной рамановской спектроскопии спектры кристаллического лизоцима сравнивались со спектрами раствора белка. Полоса при 290  $\text{см}^{-1}$ , по-видимому, чувствительна к структуре воды в белковых растворах. Полосы при 230, 280 и 310  $\text{см}^{-1}$  были отнесены к

внутримолекулярным колебаниям, а полоса при  $100\text{ см}^{-1}$  – к межмолекулярным колебаниям.

Спектры нативных белков сравнивали со спектрами термически и химически денатурированных молекул. Спектральные данные показывают, что влияние термической денатурации сильнее, чем химических агентов, которые вызывают разрыв дисульфидных связей в белках.

В экспериментах использовались бычий сывороточный альбумин (БСА), человеческий сывороточный альбумин от Sigma (CAS 70024-90-7), коллаген от MP Biomedicals и другие белки.

Рамановские спектры измеряются с помощью микроскопа ThermoScientific DXR с 10-кратным объективом при длине волны возбуждения 532 нм, максимальной мощности 10 мВт и спектральном разрешении 5 см. Для Фурье измерений используется спектрометр ThermoScientific Nicolet-6700 со спектральным разрешением 2 см. Каждый спектр получается в результате более 500 сканирований.

На рисунке 6 сравниваются Фурье-спектры белков в спектральном интервале от 70 до  $200\text{ см}^{-1}$ . Видно, что в спектрах  $\alpha$ -спиральных белков (БСА и лизоцима) наблюдается развитое плечо на частоте  $150\text{ см}^{-1}$ .

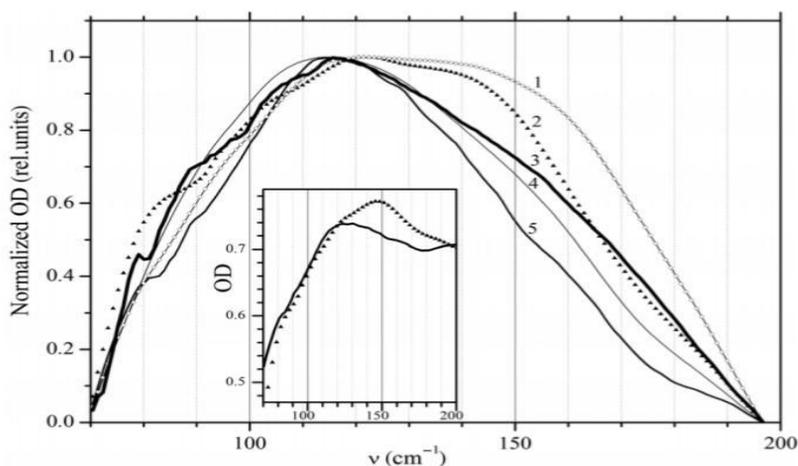


Рисунок 6. Фурье-спектры :1- лизоцим, 2 – БСА, 3 –химотрипсин, 4 – овалбумин, 5 –конканавалин [7]

В ИК-спектрах отчётливо наблюдается уменьшение интенсивности в интервале от 220 до 260  $\text{см}^{-1}$ – в серии конканавалин, химотрипсин, овальбумин, лизоцим и БСА.

Несколько чувствительных к конформации интервалов также наблюдалось в спектрах КР исследуемых белков (рис. 7).

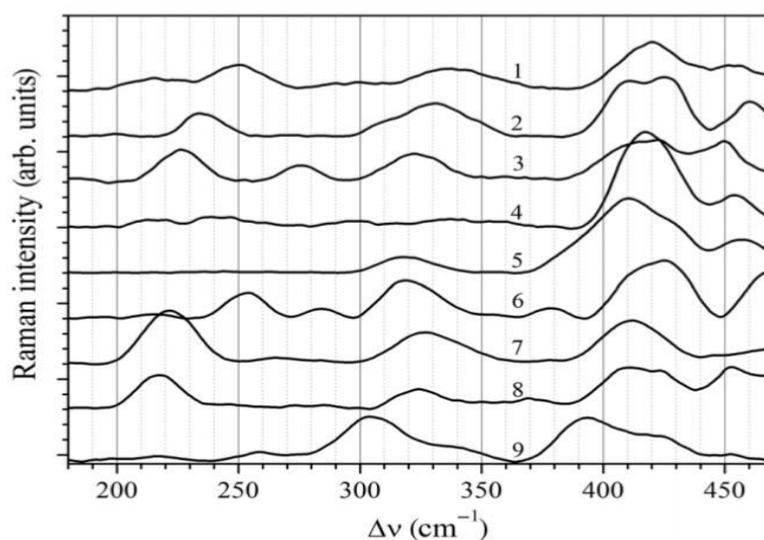


Рисунок 7. КР спектры: 1 – конканвалин, 2 –химотрипсин, 3 – лактальбумин, 4 – овальбумин, 5 – фибриноген, 6 –лизоцим, 7 – БСА, 8 – ЧСА (человеческий сывороточный альбумин), 9 –коллаген [7]

Авторы предполагают, что различия в спектрах могут быть связаны с различиями в третичной и / или четвертичной структуре.

Спектры КР для фибриллярных белков (фибриногена и коллагена) обычно отличаются от спектров глобулярных белков, хотя спектр овальбумина аналогичен спектру фибриногена. В спектрах КР имеется много полос, отнесенных к отдельным аминокислотам или атомным группам.

Заметные различия спектров КР белков в интервале от 190 до 470  $\text{см}^{-1}$  не соответствуют различиям вторичных структур или молекулярных масс (размеров) молекул белка [7].

Превращение оптически неактивных лиганд в оптически активные частицы, за счет взаимодействия с асимметричными белковыми структурами, используется авторами статьи [8].

Анализ области отпечатков пальцев в рамановских спектрах позволяет идентифицировать конкретные соединения и характеризовать структуры белков, липидов, углеводов и т. д.

Авторы статьи [8] изучали спонтанный и катализируемый ферментами гидролиз 2,4-динитрофенилацетата ( $C_8H_6N_2O_6$ , DNPA). Для гидролиза DNPA продуктами являются 2,4-динитрофенол ( $C_6H_4N_2O_5$ , DNP) и уксусная кислота (HOAc). В экспериментах использовались фосфатные буферные растворы при pH=7.8, кристаллический  $\alpha$ -химотрипсин (CT1) из поджелудочной железы крупного рогатого скота от Sigma (C4129, лот № SLBV2540) (CT1) и Samson-Med (CT2).

Начальная концентрация DNPA в AcN-буферном растворе составляет 2 мМ. Для ферментативного гидролиза DNPA в AcN добавляют к растворам CT1 и CT2 в буфере (5 мг / мл) для достижения концентраций DNPA и CT, равных 2 и 0,2 мМ соответственно.

Рамановские спектры измерялись с помощью многофункционального лазерного рамановского спектрометра с длиной волны возбуждения 532 нм и спектральным разрешением  $2\text{ см}^{-1}$ . Мощность возбуждения на образце составляла до 1 Вт, а соответствующая интенсивность - до  $100\text{ кВт} / \text{см}^2$ .

Все измерения проводились при комнатной температуре от 24 до 26 °С. Результаты показали, что рамановские измерения белковых растворов даже для существенно более высоких концентраций при указанных средних мощностях и плотностях мощности не вызывают изменения структуры белка. Измеренные интенсивности КР не пропорциональны концентрации соответствующих компонентов из-за наличия широкополосного фона.

В этой работе в основном рассматривались рамановские сигналы в относительно узких спектральных интервалах (рамановские полосы компонентов реакции), в которых фон может быть хорошо аппроксимирован с помощью линейной функции.

Для анализа была выбрана полоса КР в интервале  $1315\text{--}1330\text{ см}^{-1}$ . После двойного дифференцирования со сглаживанием Савицкого-Голея спектральные кривые усреднялись и нормировались по времени накопления и мощности лазера.

На рисунке 8а приведен ряд спектров КР реакционной смеси, исходными компонентами которых являются буферные растворы DNPA и СТ1. Возрастающие спектральные полосы (отмечены стрелками) соответствуют продукту реакции (ДНП). Полосы АсN и буфера остаются неизменными.

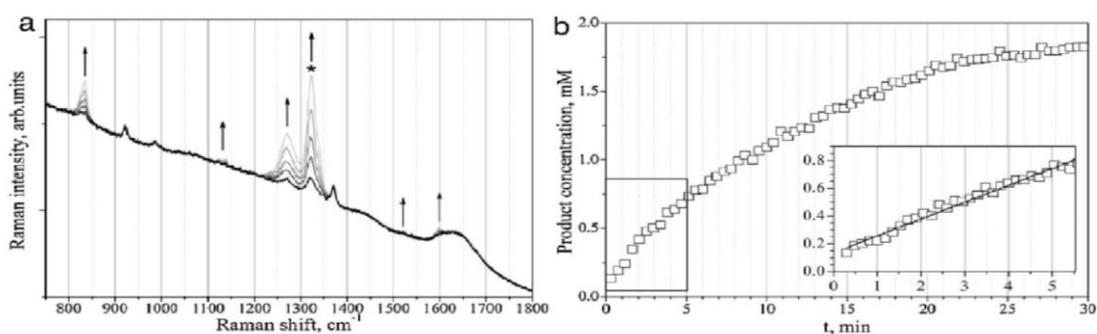


Рисунок 8. (а) Серия спектров КР, которые характеризуют гидролиз DNPA в буферном растворе, (б) Зависимость концентрации DNP от времени для катализируемого СТ1 гидролиза DNPA при  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  [8]

На рисунке 8б показана усредненная кинетика обработанного комбинационного сигнала в интервале  $1315\text{--}1330\text{ см}^{-1}$  для СТ1-катализируемого гидролиза DNPA. Когда концентрация DNPA (субстрата) намного превышает концентрацию СТ, кинетика проявляет «начальный выброс» и стадию квазилинейного увеличения концентрации продукта. Последняя стадия

соответствует концентрации продукта, которая медленно увеличивается до постоянного уровня (от 100 до 1200 с).

При исследовании ферментативных реакций колебательная спектроскопия позволяет использовать различные субстраты, в том числе виды, которые не поглощают в видимом и ультрафиолетовом диапазонах спектра. Проблемы в применении ИК-Фурье спектроскопии могут возникнуть из-за взаимодействия компонентов реакции с поверхностью кристалла АТР. Рамановская спектроскопия лишена таких недостатков [8].

Цель исследования [9] заключалась в изучении конформации гемопорфирина и способности гемоглобина переносить кислород при введении животным наночастиц серебра (НЧС), а также способности этих частиц усиливать КР при использовании наноструктурированных подложек. Авторы исследовали три группы животных:

- 1) контрольная;
- 2) крысы, получавшие внутривентральные инъекции воды;
- 3) крысы, получавшие внутривентральные инъекции раствора серебра.

Капилляр (диаметр 2 мм) с суспензией эритроцитов помещался в ячейку спектрометра и на нем фокусировался луч лазера ( $\lambda = 473$  нм,  $P = 18\text{--}20$  мВт). Для анализа конформации использовались определенные полосы спектра КР, характеризующие число комплексов дезоксигемоглобина (д-Гб) и его способность связывать  $O_2$ , а также число комплексов оксигемоглобина (о-Гб) и его способность связывать  $O_2$ .

Для усиления КР использовали наноструктурированные подложки серебра (НСП) с покрытием на основе серебра, на которые наносили образцы крови.

При инъекции животному НЧС регистрировали следующие параметры: количество комплексов оксигемоглобина, сродство Гб к  $O_2$ , а также способность Гб связывать и сбрасывать  $O_2$ .

Авторами установлено, что при инъекциях животным НЧС в течение одного месяца изменялось содержание комплексов Гб-О<sub>2</sub>: в обеих группах содержание комплексов Гб-О<sub>2</sub> в 2–3 раза меньше комплексов Гб. Известно, что в венозной крови млекопитающих содержание Гб-О<sub>2</sub> составляет около 60% от всего Гб. Поскольку в экспериментах использовалась венозная кровь, при инъекции НЧС животным эритроциты, вероятно, сбрасывали в ткани меньше О<sub>2</sub>, чем в контроле.

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 О<sub>2</sub> в капиллярах тканей в связи с увеличением потребления О<sub>2</sub> клетками.

При инъекциях НЧС животным в течение одного месяца каких-либо изменений способности Гб связывать О<sub>2</sub> обнаружено не было, однако заметно увеличение способности гемоглобина сбрасывать О<sub>2</sub> (как следствие уменьшение сродства Гб к О<sub>2</sub>). Кроме того, увеличение относительного содержания комплексов о-Гб, не связано с уменьшением выделения О<sub>2</sub> в ткани. Происходит оптимальное насыщение гемоглобина кислородом, вследствие изменения физико-химических свойств мембраны и более легкого проникновения О<sub>2</sub> в клетку.

Вероятно, усиление способности Гб сбрасывать О<sub>2</sub> и, как следствие, уменьшение сродства Гб к О<sub>2</sub> свидетельствует об отсутствии повреждающего действия НЧС: в капиллярах легких кислород связывается с Гб также, как и в контрольной группе.

Напротив, инъекция НЧС в течение шести месяцев существенно меняет кислород-связывающие свойства гемоглобина. Так, способность Гб связывать О<sub>2</sub> увеличивается, а способность Гб сбрасывать О<sub>2</sub> 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.

При инъекциях НЧС животному наблюдалось увеличение сродства Гб к  $O_2$ , что обусловлено увеличением способности Гб связывать  $O_2$ . Итак, при инъекциях НЧС животному в течение шести месяцев существенно менялась конформация гемоглобина, и  $O_2$  лучше связывался с Гб.

Авторами исследования [9] был сделан вывод о том, что применение спектроскопии КР и НЧС актуально для оценки свойств гемоглобина, а также её можно использовать в биомедицинских исследованиях и диагностике ряда заболеваний.

В работе [10] представлены низкочастотные спектры ближнего инфракрасного и КР диапазона ( $80 - 400 \text{ см}^{-1}$ ) некоторых белков и их водных растворов, а также низкочастотные видимые спектры КР ( $10 - 400 \text{ см}^{-1}$ ). В этих спектрах наблюдается низкочастотная полоса (на частоте приблизительно  $100 \text{ см}^{-1}$ ). На этой полосе наблюдается водородная связь атомов.

Низкочастотная часть колебательных спектров имеет особое значение, поскольку могут наблюдаться некоторые спектральные особенности, возникающие в результате межмолекулярных взаимодействий.

В течение длительного времени измерения происходило некоторое испарение растворителя, поэтому ячейка повторно заполнялась несколько раз в течение одного эксперимента.

Используемый прибор представлял собой рамановский спектрометр DilorZ-24 с ионным возбуждением Ar ( $514,5 \text{ нм}$ ), тройной монохроматор и охлаждаемую фотоумножительную трубку. Спектральное разрешение составляло  $3 \text{ см}^{-1}$ , а мощность лазера -  $350 \text{ кВт}$ .

Апротинин является синтетической формой белка бычьего ингибитора трипсина поджелудочной железы. Спектры КР имеют одинаковую форму полосы

примерно до  $80 \text{ см}^{-1}$ . Это подтверждает то, что нижний предел спектров составляет  $80 \text{ см}^{-1}$ .

Фильтр центральной линии Рэлея блокирует большую часть измеренного спектра ниже этого волнового числа. В результате, наблюдались два максимума в этих спектрах: первый примерно при  $100 \text{ см}^{-1}$ , а второй примерно при  $290 \text{ см}^{-1}$ .

Наблюдалось, что интенсивность полосы при  $100 \text{ см}^{-1}$  и  $290 \text{ см}^{-1}$  возрастает с увеличением концентрации белка. При этом интенсивность возрастала более чем в 10 раз в диапазоне температур от  $-40$  до  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  (переохлажденная жидкость).

Фактически, полоса на  $\nu = 300 \text{ см}^{-1}$  может возникать из-за внутренних колебаний в белках, что наблюдается в жидком состоянии N - метилацетамида. В водном растворе лизоцима также появляется широкая полоса с максимумом около  $100 \text{ см}^{-1}$ , что наблюдается в порошковых спектрах и спектрах водных растворов с другими концентрациями других белков [10].

В работе [11] были исследованы низкочастотные КР спектры кристаллов тетрагонального лизоцима и ДНК-пленок с различным содержанием воды. Было показано, что низкочастотные измерения КР могут дать информацию о динамике гидратации воды. Также на основе поляризованных спектров КР кристаллов лизоцима, был сделан вывод, что затухающие осцилляторы соответствуют внутримолекулярным колебательным модам.

Используя прозрачные кристаллы лизоцима и упорядоченные ДНК-пленки, были получены спектры КР в диапазоне от 1 до 250 см при комнатной температуре. Время релаксации молекул воды было получено на образцах с различным содержанием воды. Форма спектра зависит от состояния белка (например, денатурированный или высушенный).

Лизоцим представляет собой типичный глобулярный белок, который легко кристаллизуется в тетрагональной форме. Были использованы три типа кристаллов лизоцима: 1 - выращенный кристалл, содержание воды в котором  $\sim 34\%$  (влажный

кристалл); второй - полусухой кристалл (полукристалл); последний - высушенный кристалл (сухой кристалл).

Интенсивность центрального компонента резко понижается с уменьшением содержания воды. Таким образом, основная часть центрального компонента обусловлена содержанием молекул воды.

Влажные кристаллы тетрагонального лизоцима содержат 33,5 % воды, то есть 400 моль  $H_2O$  / 1 моль лизоцима. Количество незамерзающей воды составляет 240–300 моль  $H_2O$  / 1 моль лизоцима. Содержание воды в сухих кристаллах лизоцима составляет 20% от содержания влажных кристаллов. Следовательно, 320 моль  $H_2O$  / 1 моль лизоцима теряется при сушке.

Интенсивность уменьшается при высушивании образца. Более длительное время релаксации ( $10^{-11}$  с), полученное для кристаллов и пленок ДНК, меньше или равно пределу рамановских измерений.

Режим релаксации появляется не только во влажных образцах, но также в полусухих кристаллах лизоцима и пленках ДНК, хотя интенсивность в этих образцах намного меньше, чем во влажных. Это сразу говорит о том, что молекулы воды, время релаксации которых примерно на порядок больше, чем у объемной воды, существуют даже в полусухих кристаллах лизоцима или плёнках ДНК. Кроме того, мы получаем режим релаксации с очень низкой интенсивностью для ДНК. В этих образцах не существует замерзшей воды, то есть почти все молекулы воды находятся в первичной гидратной оболочке [11].

Сорбция ионов  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Rb^+$ ,  $Cs^+$  на сывороточном альбумине и гемоглобине, а также взаимное влияние этих ионов при сорбции белками (с различными концентрациями в среде) исследовались авторами статьи [12]. В опытах использовались соли хлоридов ( $NaCl$ ,  $KCl$ ,  $RbCl$ ,  $CsCl$ ) с содержанием основного компонента более 99%. Растворы солей готовились в дистиллированной воде, в концентрациях -  $10^{-1}$ – $10^{-4}$  моль/л.

Исследуемые растворы с концентрацией белка 0.25 г/л прокачивались через сорбционный фильтр, после чего фильтр дважды промывался дистиллированной водой. Фильтр слегка подсушивали, затем проводили анализ содержания ионов в осажденных на фильтрах белках.

Результаты определения концентрации щелочных металлов обрабатывались по методу фундаментальных параметров (метод, в котором интенсивность рентгеновского излучения связывается с химическим составом, а далее с концентрацией элементов в образце). Измерения концентраций катионов в водных растворах белков проводили потенциометрическим методом при постоянном перемешивании лабораторной магнитной мешалкой.

В результате концентрации связанных катионов белками расположились следующим образом:  $\text{Na}^+ < \text{K}^+ < \text{Rb}^+ < \text{Cs}^+$ , т.е. наблюдалась предпочтительная сорбция элемента, имеющего больший порядковый номер.

Также получены результаты исследования сорбции ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  при различных концентрациях солей. Авторами было замечено, что с ростом концентрации  $\text{Na}^+$  в водном белковом растворе, количество сорбированного  $\text{K}^+$  возрастает.

Авторы, исследовавшие взаимодействие хлорид - ионов с гемоглобином человека, подчёркивают, что высокая концентрация соли снижает кислородное сродство гемоглобина [13]. Особо интересно то, что наблюдалось в процессе оксигенации гемоглобина. При этом происходило изменение четвертичной структуры белка. В результате молекула оксигемоглобина приобретала более компактную структуру, и центральная полость уменьшалась. Гемы двух  $\beta$ -цепей сближались друг с другом, а двух  $\alpha$ -цепей отдалялись. Ещё одним выводом, отмеченным авторами, было то, что хлорид ионы слабее связываются с оксигемоглобином, нежели с гемоглобином.

## **Глава 1. Объекты исследования**

### **1.1. Белки**

Белковая молекула представляет собой полимер, состоящий из связанных остатков аминокислот. Их молекулярный вес колеблется в пределах от 10 000 до нескольких миллионов единиц Да. Аминокислоты — органические соединения, в молекуле которых одновременно содержатся карбоксильные и аминные группы (рис. 9). При синтезе в большинстве случаев используется 20 стандартных аминокислот, которые отличаются друг от друга строением боковых групп (радикалов). Боковые группы могут быть основными, кислыми или нейтральными и содержать различные атомы (C, H, O, S, N).

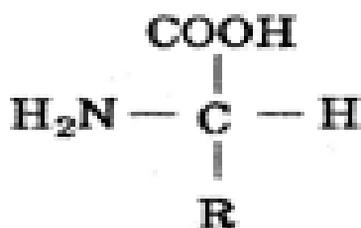


Рисунок 9. Структура аминокислот

Аминокислоты соединяются в полипептидные цепи, в реакции поликонденсации. Полипептидные цепи являются основой белковой молекулы. Звенья цепи располагаются так, что конец одной аминокислоты связан с началом другой пептидной связью, которая образуется в результате выделения молекулы воды из карбоксильной группы одной аминокислоты и аминогруппы другой. Число и характер чередования звеньев определяет первичную структуру молекулы.

Полипептидные цепочки обладают большой тенденцией к сворачиванию в  $\alpha$ -спираль, что создает вторичную структуру в виде жесткой спиральной конформации цепи. Между гидрофобными боковыми звеньями или разноименно заряженными группами удаленных звеньев могут возникать избирательные взаимодействия между гидрофобными боковыми звеньями или разноименно заряженными группами удаленных звеньев. Они приводят к вторичному изгибу (складыванию) цепей, причем вблизи от складок  $\alpha$ -спиральная структура,

естественно, нарушается. Упаковка цепей в готовой молекуле носит название третичной структуры. Несколько третичных структур могут объединяться и формировать четвертичную структуру [14].

Изложенная схема, предложенная Линдерштрем-Лангом, отвечает строению компактных, плотноупакованных макромолекул, относящихся к классу глобулярных белков (рис. 10).

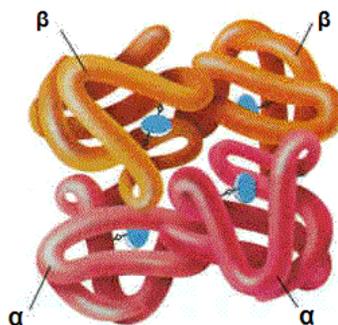


Рисунок 10. Четвертичная структура гемоглобина [15]

## 1.2. Гемоглобин

Гемоглобин (Hb) (от греч. *Наето* – кровь и лат. *Globus* – шар) – глобулярный белок. Относится к сложным белкам хромопротеидам. В организме Hb выполняет транспортно – дыхательную функцию. Молекулярная масса основных типов гемоглобина колеблется в пределах 64.5–68 кДа [15].

Гемоглобин является сложным белком, представленным двумя частями: 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. Свободные ионы  $Fe^{2+}$  спонтанно окисляются до  $Fe^{3+}$ , поэтому неорганическое железо не может быть хорошим переносчиком кислорода.  $Fe^{2+}$  в составе гема (без глобина) может связывать кислород, но и оно быстро окисляется, образуя гематин. Поэтому (а также в силу плохой растворимости в воде) свободный гем тоже неспособен к транспорту кислорода.

Нб – главный и самый распространенный белок эритроцитов. Нб составляет 35% от общей массы эритроцита. Подсчитано, что в одном эритроците содержится около 340 000 000 молекул Нб, каждая из которых состоит примерно из  $10^3$  атомов.

Нормальная концентрация Нб у взрослого колеблется от 130 до 185 г/л (80–115 %). За среднюю величину принимают 160 г/л (100%). Количество Нб в крови у мужчин составляет 13–170 г/л (8.56–10.7 ммоль/л), у женщин несколько меньше (на 10 %), чем у мужчин - 120–150 г/л (7.5–9.36 ммоль/л) [15].

Определение количества Нб в крови имеет большое значение, т.к. этот параметр отвечает за важные дыхательные функции.

Снижение концентрации Нб может привести к различным заболеваниям (гепатит, пневмония, туберкулез, заболевания и др.). В свою очередь, повышенное содержание Нб в крови также может являться симптомом различных опасных заболеваний, которые приводят к патологическим изменениям в организме.

### 1.3. Хлорид железа (III)

Хлорное железо  $FeCl_3$  — средняя соль трехвалентного железа и соляной кислоты. На вид представляет собой мягкую кристаллическую массу ржаво-коричневато-черного цвета. Температура его кипения составляет 319 °С, температура плавления – 309 °С. Природным источником для получения хлорного железа является молизит (минерал). Самый простой метод получения данного химического реактива – это нагревание железа с хлором до определенной температуры плавления [16].

Железо в виде солей является основным источником поступления железа в организм, особенно при его пониженном содержании – анемии. Но, в свою очередь, и повышенное содержание железа может быть вредным для организма. В этом случае избыточное, ненужное организму железо откладывается в тканях, образуется соединение трехвалентного железа с белками, но уже в виде нерастворимого в воде комплекса – гемосидерина. Это соединение уже не может

быть использовано организмом в будущем. Его накопление расстраивает функции тканей и органов и приводит к развитию заболевания – гемосидероза.

Железо является незаменимым микроэлементом для нормальной жизнедеятельности организма и принимает участие в следующих процессах:

- 1) регулирует окислительно-восстановительные реакции (связывает кислород),
- 2) стимулирует эритропоэз (процесс образования эритроцитов),
- 3) восстанавливает кровопотери при травмах,

также хлорное железо используют как:

1. катализатор в органическом синтезе,
2. с его помощью осветляются природные воды в системах водоподготовки,
3. удаляется масло из стоков масложировых комбинатов,
4. при очистке сточных вод кожевенно-меховых предприятий от соединений хрома,
5. для смягчения хозяйственно-питьевой воды.

В данном эксперименте используется водный 30%-ый раствор  $\text{FeCl}_3$  компании «Panreac» (рис. 11).



Рисунок 11. Водный раствор хлорида железа

## Глава 2. Теоретические основы метода измерений. Теория комбинационного рассеяния света

В результате взаимодействия падающего излучения с молекулами вещества возникают КР 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.

*Вращательное КР света.* Будем считать, что молекула представляет собой жесткую систему. В твердом теле обычно выделяют три компоненты момента инерции  $L_x, L_y, L_z$ , где  $x, y, z$  – система координат, жестко связанная с молекулой. Для анализа вращения системы координат  $x, y, z$ , жестко связанной с молекулой, относительно неподвижной системы координат  $X, Y, Z$ , вводятся углы Эйлера ( $\theta, \varphi, \psi$ , где  $\psi$  – собственный угол вращения).

$$\Psi = \omega_r t + \delta, \quad (1.2)$$

Где  $\omega_r$  – частота вращения молекулы,  $\delta$  – угол, характеризующий положение молекулы в момент времени  $t = 0$ .

Пусть на молекулу вдоль направления оси  $Y$  падает монохроматическая волна, электрический вектор которой лежит в плоскости  $YZ$ . В этом случае на молекулу действует только составляющая электрического поля  $E_z$ , под действием которой в ней возникает индуцированный дипольный момент  $P$ :

$$P_x = \frac{\alpha_{xx} - \alpha_{yy}}{2} [\sin\varphi \sin\theta \cos\theta + \cos\varphi \sin\theta \sin 2\psi + \sin\varphi \sin\theta \cos\theta \cos 2\psi] E_z,$$
$$P_y = \frac{\alpha_{yy} - \alpha_{xx}}{2} [\cos\varphi \sin\theta \cos\theta - \sin\varphi \sin\theta \cos\theta + \cos\varphi \sin\theta \cos 2\psi] E_z, \quad (1.3)$$

$$P_z = \frac{\alpha_{yy} - \alpha_{xx}}{2} [\alpha_{xx} \cos^2 \theta + \alpha_{yy} \sin^2 \theta + \frac{\alpha_{yy} - \alpha_{xx}}{2} \sin^2 \theta - \dots \frac{\alpha_{yy} - \alpha_{xx}}{2} \sin^2 \theta \cos 2\psi] E_z,$$

Индукцированный дипольный момент является источником излучения, мощность которого пропорциональна второй производной от Р. Первый член в (1.3) описывает Рэлеевское рассеяние света, и при подстановке (1.2) в (1.3) он не изменится.

Представим эти значения в следующей форме:

$$2 \cos \omega t \sin(2\omega_r t + 2\delta) = \sin[(\omega + 2\omega_r)t + 2\delta] - \sin[(\omega - 2\omega_r)t - 2\delta],$$

$$2 \cos \omega t \sin(2\omega_r t + 2\delta) = \cos[(\omega + 2\omega_r)t + 2\delta] - \cos[(\omega - 2\omega_r)t - 2\delta].$$

Таким образом, рассеянный свет должен содержать наряду с излучением с несмещенной частотой  $\omega$  (рэлеевская линия) также и излучения, частоты которых смещены на величину  $\pm 2\omega_r t$ . 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 (рис. 12). Эти переходы и соответствующие им длины волн называются Стоксовыми (красными). Если же в результате взаимодействия с падающей световой волной молекула занимает более низкое энергетическое состояние, то частота рассеянного света увеличивается. Такие переходы и соответствующие им длины волн называются Антистоксовыми (фиолетовыми). В результате наблюдаются вращательные спектры КР света (вращательные КР – спектры).

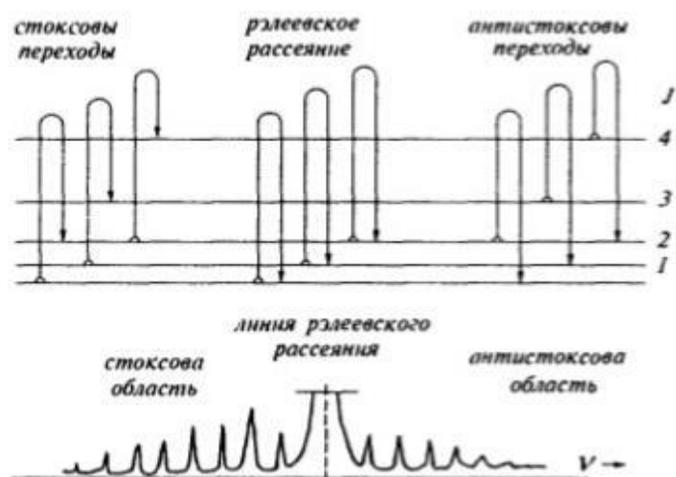


Рисунок 12. Схема образования вращательного КР - спектра [17]

*КР света, обусловленное колебаниями молекулы.* Наряду с вращательным движением происходят и колебания отдельных атомов в молекуле относительно друг друга. Эти колебания называются собственными, а их частоты – собственными частотами внутренних колебаний молекул. Колебания атомов, значительно более медленные, чем колебания электронов, приводят к изменению поляризуемости молекулы. Возникающий при этом дополнительный индуцированный дипольный момент обуславливает возникновение КР света с частотой  $\nu$ , отличающейся от частоты возбуждающего света  $\nu_0$ .

За счет модуляции колебаний индуцированного дипольного момента молекулы колебаниями ядер в спектре рассеянного света появляются новые линии с частотами  $\nu_0 - \nu$  (красный или стоксовый спутник) и  $\nu_0 + \nu$  (фиолетовый или антистоксовый спутник).

С точки зрения квантовой теории появление спутников в спектре рассеянного света можно объяснить следующим образом. Пусть молекула находится в основном колебательном энергетическом состоянии  $E_1$ . Если величина падающего кванта света  $\hbar\nu_0$  больше энергии, соответствующей разнице энергий двух соседних колебательных уровней, то часть ее может пойти на

переход молекулы в возбужденное состояние  $E_2$ , другая рассеется в виде кванта света  $\hbar\nu'$ . Из закона сохранения энергии следует, что

$$\hbar\nu_0 = \hbar\nu' + (E_2 - E_1),$$

или

$$\hbar\nu_0 = \hbar\nu' + \hbar\nu_{12},$$

откуда  $\nu' = \nu_0 - \nu_{12}$ , где  $\nu_{12}$  – частота перехода с 1 на 2 энергетический уровень.

Следовательно, рассеянный квант будет иметь меньшую частоту по сравнению с падающим квантом и в спектре появится стоксовый (красный) спутник.

В том случае, если падающий квант света взаимодействует с молекулой, находящейся в возбужденном состоянии с энергией  $E_2$ , она может перейти в основное состояние  $E_1$  с передачей энергии рассеянному кванту света (рис.13). Это приведет к образованию антистоксова (фиолетового) спутника с частотой  $\nu' = \nu_0 + \nu_{12}$ .

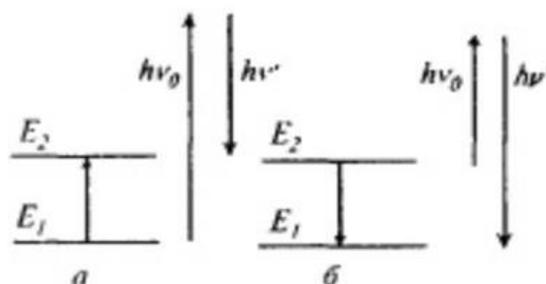


Рисунок 13. Схема элементарных квантовых актов в случае образования красного (а) и фиолетового (б) спутников в колебательном спектре КР света [17]

Между явлениями излучения и поглощения света и его рассеянием имеется принципиальное различие. Если первые два процесса являются процессами первого порядка (участвует один фотон), то рассеяние света – процесс второго порядка (участвует как падающий, так и рассеянный квант), и отсутствует поглощение кванта света [17].

### Глава 3. Экспериментальная установка

Эксперимент проводился на КР-микроскопе DXR Raman Microscope (Thermo Scientific), представленном на рисунке 14.



Рисунок14. КР микроскоп DXR Raman Microscope

Спектральный диапазон прибора от 50 до 3550  $\text{см}^{-1}$ . Микроскоп позволяет проводить измерения на трех различных длинах волн возбуждения – 532, 633 и 780 нм. Источниками возбуждения являются твердотельный Nd:YAG лазер с диодной накачкой на длине волны 532 нм, при этом максимальная мощность на образце составляет 10 мВт, HeNe лазер на длине волны 632,8 нм, максимальная мощность которого составляет 8 мВт, а также диодный одномодовый лазер со стабилизацией частоты на длине волны 780 нм и максимальной мощностью 24 мВт. Микроскоп оснащен пятью сменными объективами с увеличением 4x (цифровая апертура 0,1), 10x (цифровая апертура 0,25), 20x (цифровая апертура 0,4), 50x (цифровая апертура 0,75), 50x длиннофокусный (цифровая апертура 0,5; рабочее расстояние 10,6 мм) и 100x (цифровая апертура 0,9). Изображение объекта записывается цветной цифровой видеокамерой с матрицей 1024×768 пикселей. Спектральное изображение записывается ПЗС детектором с матрицей 1024×128 пикселей.

Микроскоп имеет 2 круглые апертуры, обеспечивающие конфокальный режим, и 2 щелевые апертуры, обеспечивающие возможность регистрировать слабые сигналы за счет потери конфокальности. Спектральное разрешение зависит от используемого объектива и апертуры и изменяется в диапазоне от 1 до 8 см<sup>-1</sup>, пространственное разрешение – до 1 мкм. Также прибор позволяет усреднять спектры по нескольким измерениям, с ручным контролем времени экспозиции и времени измерения.

### **3.1. Первичная обработка экспериментальных данных. Программное обеспечение OMNIC Specta**

Обработка полученных данных по КР спектроскопии значительно упрощается, так как к ним применимо стандартное программное обеспечение Omnic, позволяющее преобразовывать данные в нужные форматы.

Specta Software включает в себя инструменты идентификации и интерпретации различных спектров. Программное обеспечение индексирует данные на жестком диске, создавая базу данных всех спектров. Многокомпонентный поиск и поиск загрязняющих веществ позволяют идентифицировать компоненты в образцах смесей. Эти уникальные функции отличают OMNIC Specta от других программ для спектроскопии [18]. Таким образом, результатом измерений являются спектры поглощения и рассеяния образцов.

### **3.2. Метод сравнения**

Метод сравнения спектров позволяет сравнивать между собой как два различных спектра, так и один спектр с суперпозицией нескольких без предварительного вычитания фона [19].

Спектр произвольного образца можно представить в виде суммы полезного сигнала и фона. Если в результате эксперимента измерены спектры  $n$  произвольных образцов  $\xi_i(x_q)$  ( $i=1, \dots, n$ ), то можно записать равенство

$$\xi_i(x_q) = f_i(x_q) + v_i(x_q), \quad (i=1, \dots, n),$$

где  $f_i(x_q)$  и  $v_i(x_q)$  – полезные сигналы и фоны соответственно,  $x_q$  – абсцисса спектральной точки.

Если рассматривать спектр модельного образца  $\zeta'(x_q)$  содержащего только те вещества, которые определяют спектры  $\xi_i(x_q)$ , то его тоже можно представить в виде суперпозиции полезного сигнала и фона. При этом  $f'(x_q) = \sum_{i=1}^n k_i f_i(x_q)$ . Таким образом, можно записать:

$$\zeta'(x_q) = \sum_{i=1}^n k_i \xi_i(x_q) + \Phi(x_q), \quad \text{где } \Phi(x_q) = v'(x_q) - \sum_{i=1}^n k_i v_i(x_q).$$

Функция  $\Phi(x_q)$  может быть задана полиномом конечной степени. Тогда

$$\zeta'(x_q) = \sum_{i=1}^n k_i \xi_i(x_q) + \sum_{j=1}^P \alpha_j x_q^j.$$

Таким образом, любой спектр можно аппроксимировать суммой спектров компонент. Используя результаты разложения, мы можем делать выводы о наличии каких-либо изменений в образце в результате взаимодействия.

## Глава 4. Приготовление исследуемых образцов

### 4.1. Приготовление исследуемых растворов

Для приготовления растворов использовался Нб человека (фирма Sigma H-7379) (рис. 18), а в качестве растворителя - вода для инъекций (ОАО «БЗМП»). Также взвешивание образцов производилось при помощи весов AdventurerOhaus, погрешность которых составляет 0.01 мг. С помощью механических дозаторов BiohitProline можно достаточно точно добавить определённое количество вещества из пробирки. Их погрешность не превышает 4%. Для исследования свойств чистого раствора Нб в 2 мл воды добавляется раствор Нб 10 мг/мл. Таким образом, измерения проводились для концентраций Нб 0.025 мг/мл ( $37 \cdot 10^{-5}$  ммоль/л) и 0.125 мг/мл ( $187 \cdot 10^{-5}$  ммоль/л).

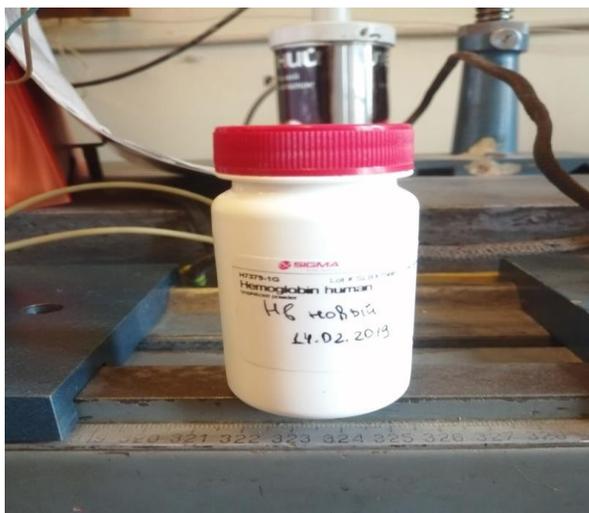


Рисунок 15. Гемоглобин человека фирмы Sigma

Для эксперимента по исследованию взаимодействия Нб с  $\text{FeCl}_3$  использовалось 5 мкл раствора соли, которые добавлялись в 2 мл воды. Получался первичный раствор с ионной силой 0.105 моль/л. 4 мкл данного раствора добавлялись в каждый раствор Нб с соответствующими концентрациями (0.025 и 0.125 мг/мл). Ионная сила итогового раствора белка с солью составляла 0.03 ммоль/л.

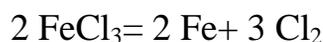
## 4.2. Расчет ионной силы для исследуемых растворов

Проведем расчет ионной силы соли, которую необходимо добавить к раствору белка Нв. Ионная сила соли рассчитывается по формуле:

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1} c_i z_i^2$$

где  $c_i$  – концентрация вещества,  $z_i$  - заряд иона

Запишем уравнение диссоциации соли  $\text{FeCl}_3$ :



$$\omega (\text{FeCl}_3) = \frac{m(\text{вещества})}{m(\text{раствора})} = 30\%$$

$$M (\text{FeCl}_3) = (56 + 3 \cdot 35.5) \text{ г/моль} = 162.5 \text{ г/моль}$$

$$m (\text{FeCl}_3) = M \cdot N_A = 162.5 \text{ г/моль} \cdot 6 \cdot 10^{23} = 975 \cdot 10^{23} \text{ г}$$

Составим пропорцию:

$$1.306 \text{ кг} - 1 \text{ л}$$

$$X \text{ кг} - 5 \cdot 10^{-6} \text{ л}$$

$$\text{Тогда } X = m (\text{FeCl}_3) = 5 \cdot 10^{-6} \cdot 1.306 = 6.53 \text{ мг}$$

$$c (\text{FeCl}_3) = \frac{m (\text{FeCl}_3)}{M(\text{FeCl}_3) \cdot V(\text{FeCl}_3)} = \frac{6.53}{162.5 \cdot 10^3 \cdot 2 \cdot 10^{-3}} = 0.02 \text{ г/л}$$

$$c (\text{Fe}) = c (\text{FeCl}_3) = 0.02 \text{ г/л}$$

$$\text{Тогда ионная сила составит: } I = \frac{1}{2} (0.02 \cdot 3^2 + 0.03 \cdot 1^2) = 0.105 \text{ моль/л.}$$

## Глава 5. Результаты исследования

### 5.1. Обработка экспериментальных данных

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 [20].

Гемопорфирин Hb обладает довольно интенсивным КР света вследствие наличия в гемопорфирине гетероциклов с сопряженными связями (рис. 16). Спектр Hb представляет собой совокупность полос, вызванных нормальными колебаниями связей в гемопорфирине [21]. В областях 410-430 нм и 520-560 нм Hb поглощает свет.

Изменения в структуре спектра наблюдаются при химической дезоксигенации эритроцитов с использованием дитионита натрия — вещества, взаимодействующего с кислородом в любой среде: воздухе, воде и в белках, в том числе, с кислородом, связанным на Hb. Пики 1355 и 1375  $\text{см}^{-1}$  наблюдаются в каждом из полученных нами спектров (рис. 17-23) и связаны они с симметричными колебаниями пиррольных колец (связи  $\text{C}_a\text{C}_b$ ,  $\text{C}_a\text{N}$  и  $\text{C}_a\text{NC}_a$ ) в молекулах дезоксигемоглобина и Hb.

Поскольку количество кислорода в крови на 3-4 порядка выше содержания NO или CO, то интенсивность полосы 1375  $\text{см}^{-1}$  зависит, в основном, от содержания о-Гб. Таким образом, соотношение интенсивностей  $I_{1375}/(I_{1355}+I_{1375})$  является характеристикой количества оксигенированного Hb по сравнению с общим содержанием различных форм Hb в эритроците.

Пики 1548-1552  $\text{см}^{-1}$  и 1580-1588  $\text{см}^{-1}$  также присутствуют в спектрах и связаны с колебанием метиновых мостиков между пирролами (связи  $\text{CaCm}$ ,  $\text{CaCmH}$ ) в молекулах Hb, в которых гемопорфирин растянут и деформирован

(1548-1552  $\text{cm}^{-1}$ ) и в которых гемопорфирин имеет более компактную конформацию (1580-1588  $\text{cm}^{-1}$ ).

Полоса КР-спектра 1618  $\text{cm}^{-1}$ , наблюдаемая как в спектре белка, так и белка с солью, характеризуется колебаниями двойных связей пирролов ( $\text{C}_a\text{C}_b$ ,  $\text{C}_b\text{C}_b$ ) и винильных групп, что указывает на образование гексакоординированных комплексов I типа ГбНО в эритроците.

При образовании ГбНО (I) атом  $\text{Fe}^{2+}$  входит в плоскость порфиринового кольца, расстояние между Fe и N пиррольных колец – 2.180 Å [20]. Соотношение интенсивностей КР-полос  $I_{1618}/(I_{1355}+I_{1375})$  характеризует относительное содержание комплексов ГбНО (I типа) в эритроците относительно суммарного Hb клетки [22]. Соотношение интенсивностей КР-полос  $I_{1355}/I_{1552}$  отражает относительную способность Hb эритроцитов связывать лиганды, а соотношение  $I_{1375}/I_{1580}$  — относительную способность Hb сбрасывать лиганды (табл.1) [22].

Таблица 1. Характеристика полос спектра КР гемопорфирина Hb

Частотный сдвиг, $\text{cm}^{-1}$	Связь	Тип симметрии колебаний	Чувствительность колебания	Форма Hb	Интенсивность, отн.ед.				
					снб=0.025 мг/мл			при с=0.125 мг/мл	
					Сухой Hb	Hb	Hb+FeCl <sub>3</sub>	Hb	Hb+FeCl <sub>3</sub>
1355	$\text{C}_a\text{C}_b$ , $\text{C}_a\text{N}$ , $\text{C}_a\text{N}\text{C}_a$	Симметричные колебания пиррольных полуколец	Ферро-состояние железа ( $\text{Fe}^{2+}$ ), наличие лиганда	д-Гб	115	370	255	59	
1375			Ферри-состояние железа ( $\text{Fe}^{3+}$ ), наличие лиганда	о-Гб	113	360		58	36
1552	$\text{C}_a\text{C}_m$ , $\text{C}_a\text{C}_m$ Н	Асимметричные колебания метиновых мостиков между пирролами	Высокоспиновое состояние железа ( $\text{Fe}^{2+}$ )	д-Гб	105	330	235	57	34
1580			Низкоспиновое состояние железа ( $\text{Fe}^{3+}$ )	о-Гб	112				
1618	$\text{C}_a\text{C}_b$ ,	$\nu(\text{C}=\text{C})$	Редокс и	NO-	103	312	225	53	33

	СbСb		спиновое состояние железа, наличие лиганда	Гб					
--	------	--	--	----	--	--	--	--	--

## ГЕМ

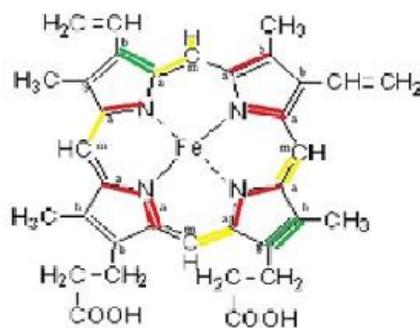


Рисунок 16. Структурная формула гемопорфирина Нв

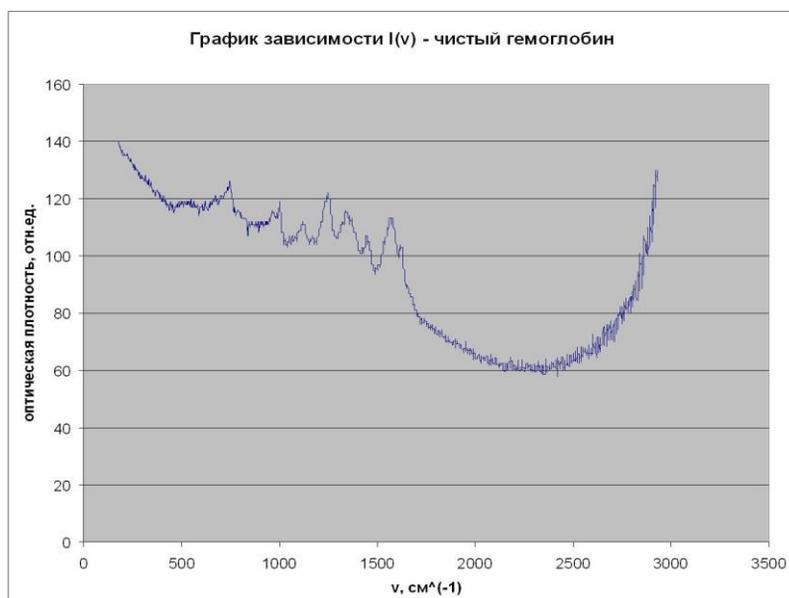


Рисунок 17. Слева - спектр КР сухого Нв, справа - спектр КР сухого Нв в диапазоне частот 700 – 1700  $\text{cm}^{-1}$

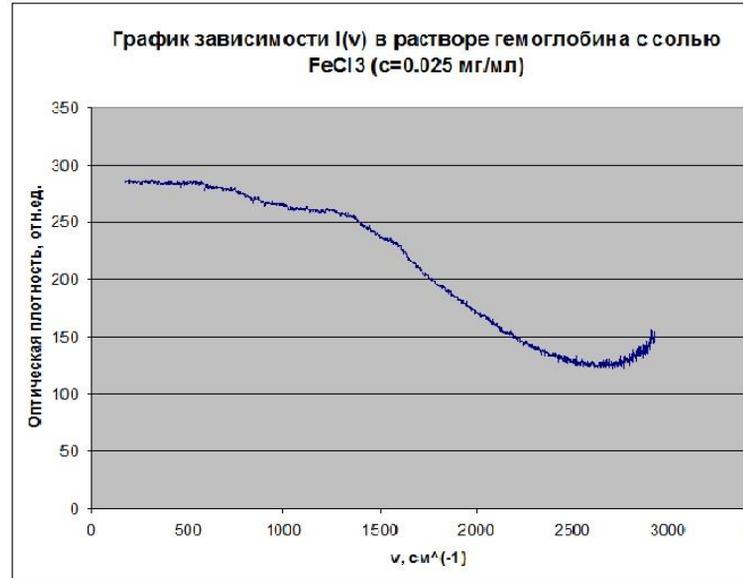
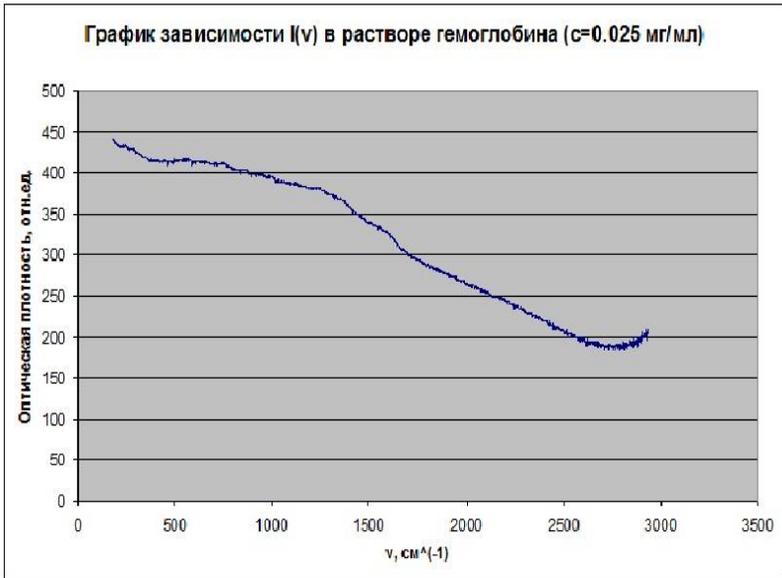


Рисунок 18. Спектры КР при  $c=0.025$  мг/мл: слева - раствора Нб; справа - раствора Нб с солью  $FeCl_3$

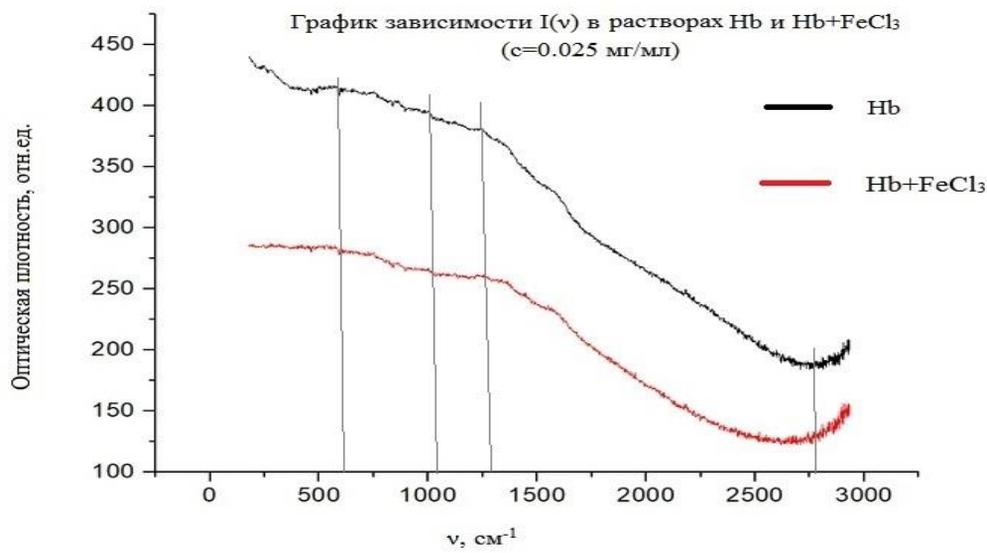


Рисунок 19. Сравнительный спектр КР растворов Нб и Нб с солью  $FeCl_3$  ( $c = 0.025$  мг/мл)

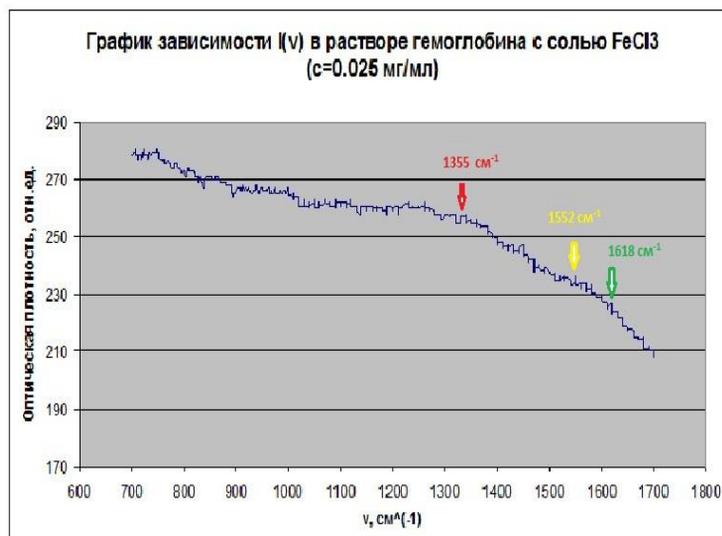
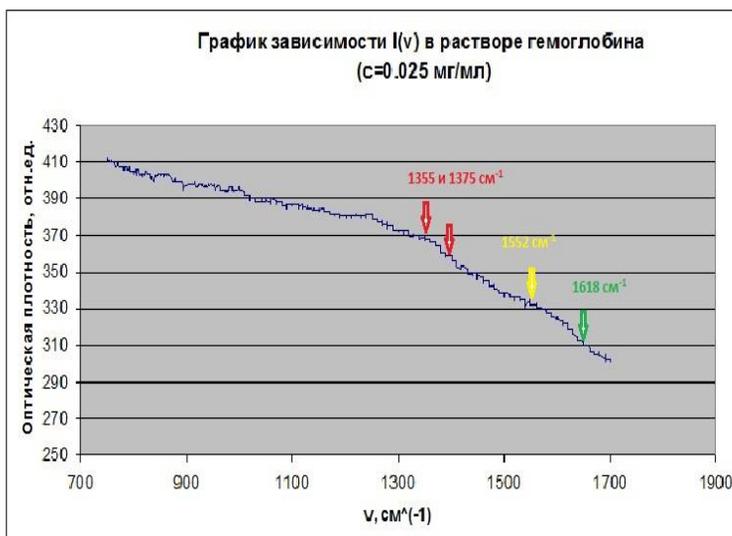


Рисунок 20. Спектры КР в диапазоне частот  $700 - 1700 \text{ см}^{-1}$  при  $c = 0.025$  мг/мл: слева - раствора Hb; справа - раствора Hb с солью  $FeCl_3$

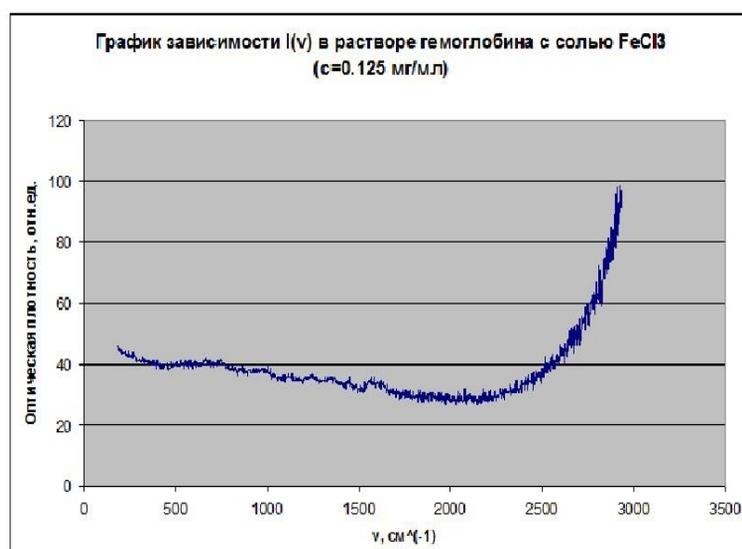
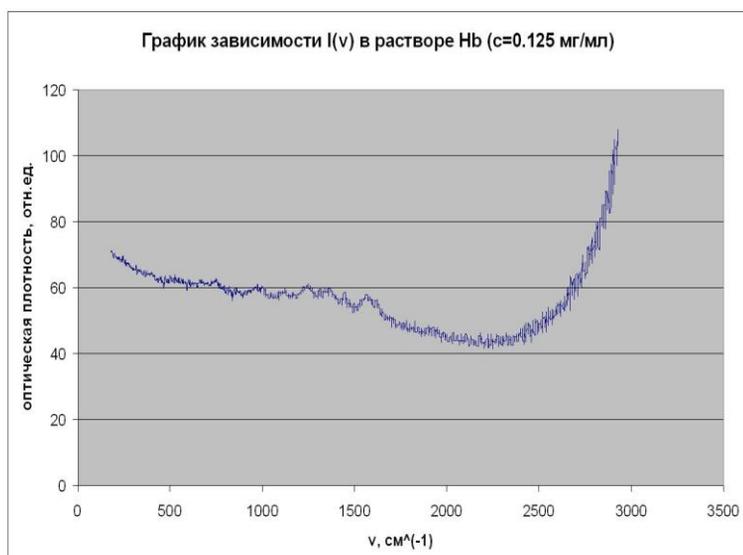


Рисунок 21. Спектры КР при  $c = 0.125$  мг/мл: слева - раствора Hb; справа - раствора Hb с солью  $FeCl_3$

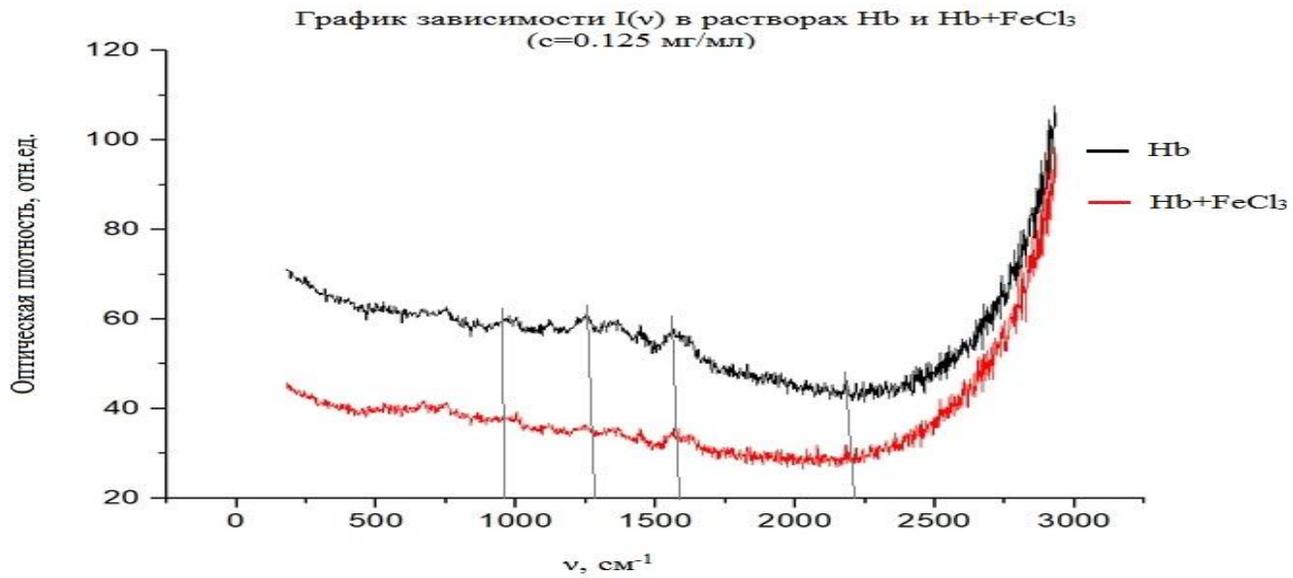


Рисунок 22. Сравнительный спектр КР растворов Hb и Hb с солью FeCl<sub>3</sub> (с = 0.125 мг/мл)

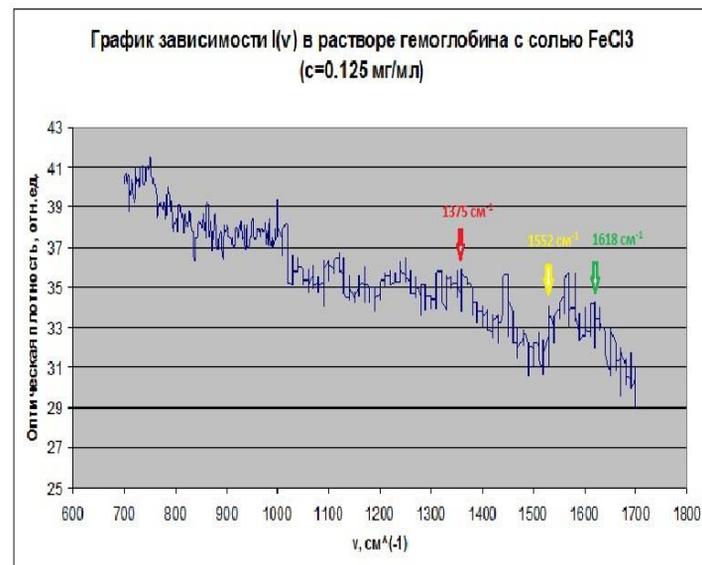


Рисунок 23. Спектры КР в диапазоне частот 700 – 1700 см<sup>-1</sup> при с=0.125 мг/мл: слева - раствора Hb; справа - раствора Hb с солью FeCl<sub>3</sub>

## 5.2. Обсуждение полученных результатов

В результате были получены соотношения интенсивностей КР-полос:

А) расчеты для рисунков 17, 20, 23 представлены в таблице 2, отсюда видно, что относительное содержание комплексов ГбNO (I типа) относительно суммарного Hb клетки составляет примерно 0.5. Содержание комплексов ГбNO остается примерно в 2 раза ниже суммарного Hb клетки при повышении концентрации белка в растворе.

Таблица 2. Соотношение интенсивностей  $\frac{I_{1618}}{I_{1355}+I_{1375}}$

Исследуемые образцы	$\frac{I_{1618}}{I_{1355} + I_{1375}}$
сухой Hb	0.45
Hb (с=0.025 мг/мл)	0.43
Hb (с=0.125 мг/мл)	0.45

Б) Произведен расчет относительной способности Hb связывать лиганды и она составляет примерно 1.1 (таблица 3), как в растворе с меньшей (0.025 мг/мл), так и большей (0.125 мг/мл), концентрацией белка.

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

Исследуемые образцы	$\frac{I_{1355}}{I_{1552}}$
сухой Hb	1.10
Hb (при с=0.025 мг/мл)	1.12
Hb (при с=0.125 мг/мл)	1.04

В) Относительная способность Hb сбрасывать лиганды получена только для спектра сухого белка (поскольку пиков на частоте 1580 см<sup>-1</sup> обнаружено не было), и составляет примерно 1:

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

## Выводы

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

2) 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  $1375$   $\text{см}^{-1}$  свидетельствуют о симметричных колебаниях пиррольных колец, а частота  $1618$   $\text{см}^{-1}$ , наблюдаемая как в спектре белка, так и белка с солью, указывает на образование гексакоординированных комплексов I типа ГбNO.

3) 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 изменением конформации белка.

## Список литературы

[1] И. Березин, К. Мартинек. Основы физической химии ферментативного катализа. - М.: Высшая школа. 1977

[2] В.В. Мороз, А.М. Голубев, А.В. Афанасьев, А.Н. Кузовлев, В.А. Сергунова, О.Е. Гудкова, А.М. Черныш. Структура и функция эритроцита в норме и при критических состояниях // НИИ общей реаниматологии им. В.А. Неговского РАМН. Москва. 2011

[3] Bernhard Schrader, John Wiley & Sons. Infrared and Raman spectroscopy: methods and applications. 2008

[4] Кэри П. Применение спектроскопии КР и РКР в биохимии, пер. с англ., М., 1985

[5] A. Rygula, K. Majzner, K.M. Marzec, A. Kaczor, M. Pilarczyk and M. Baranska. Raman spectroscopy of proteins: a review. 2013

[6] Dr. Robert Heintz. The Analysis of Low Dose Tablets and Polymorphs using Raman Imaging // Thermo fisher Scientific, Madison, W, USA. 2014

[7] I.A. Balakhnina, N.N. Brandt, A.Y. Chikishev et al. Low-frequency vibrational spectroscopy of proteins with different secondary structures // Journal of Biomedical Optics. 2017

[8] I. A. Balakhnina, N. N. Brandt, A. Y. Chikishev et al. Raman spectroscopy in the study of chymotrypsin-catalyzed reactions // *Vibrational Spectroscopy*. 2020

[9] Г.В. Максимов, Т.Г. Сазонтова, С.С. Коваленко, Н.А. Браже, А.А. Семенова, Е.Ю. Паршина, Л.В. Кузьмичева, В.В. Шутова, А.И. Юсипович, О.В. Сосновцева, Е.А. Гудилин, Ю.В. Архипенко. Спектроскопия комбинационного рассеяния и наночастицы серебра в биомедицинских исследованиях гемоглобина // МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет МГУ имени Огарева, Саранск; медицинский факультет университета в Копенгагене

[10] S.E. May Colaianni and O. Faurskov. Low-Frequency Raman Spectroscopy // Nielsen Chemical Institute, H.C. Orsted Institute, Copenhagen University, Universitetsparken 5, DK-2100 Copenhagen, Denmark. 1995

[11] H. Urabe, Y. Sugawara, M. Ataka, A. Rupprecht. Low-Frequency Raman Spectra of Lysozyme Crystals and Oriented DNA Films: Dynamics of Crystal Water // Biophysical journal. 1998

[12] В.Г. Ребров, Д.Г. Верхов. Конкурентная сорбция  $K^+$  в присутствии  $Na^+$  бычьим сывороточным альбумином и гемоглобином // Известия Саратовского Ун-та, серия химия, биология, экология. 2016

[13] S.H. De Bruin, H.S. Rollema, L.H.M. Janseen and G.A.J. Van Os. The interaction of chloride ions with human hemoglobin // Biochemical and biophysical research communications. 58(1). 1974

[14] Г. Шульц, Р. Ширмер. Принципы структурной организации белков // Мир. 1982

[15] Р.А. Бисалиева, Ю.А. Кривинцев. Гемоглобины человека // ВАГТУ. 2007

[16] Ю.Д. Третьяков. Неорганическая химия. Химия элементов // учебник для вузов. 2004

[17] Левшин Л.В., Салецкий А.М. Оптические методы исследования молекулярных систем. 1994

[18] Интернет – ресурс: [www.thermofisher.com/learnraman](http://www.thermofisher.com/learnraman)

[19] N.N. Brandt, A.Yu. Chikishev, A.I. Chulichkov, P.A. Ignatiev, S.I. Lebedenko, O.V. Voronina. A method of comparing Raman spectra // Laser Phys. 2004.

[20] Гуринович Г.П. Спектроскопия порфиринов / Г.П. Гуринович, А.И. Севченко, К.Н. Соловьев // Успехи физических наук. – 1963. – Т. LXXIX. – № 2.

[21] Kang J.W. Combined confocal Raman and quantitative phasemicroscopy system for biomedical diagnosis / J.W. Kang, N. Lue, C.R. Kong // Biomedical Optics Express. 2011

[22] Yoshimura T. Nitric oxide, a versatile biological ligand for hemeproteins / T. Yoshimura // Bioradicals Detected by ESR Spectroscopy / eds. H. Ohya-Nishiguchi, L. Packer. – Basel: Birkhauser Basel, 1995

[23] Polakovs M. Micro-Raman scattering and infrared spectra of hemoglobin / M. Polakovs, N. Mironova-Ulmane, N. Kurjane // SPIE 7142, Sixth International Conference on Advanced Optical Materials and Devices. 2008.

[24] Блюменфельд Л.А. Гемоглобин / Л.А. Блюменфельд // Соровский образовательный журнал. 1998.

В заключение автор выражает благодарность за помощь в процессе работы над диссертацией:

Виктории Валерьевне Гибизовой, за помощь в организации и проведении экспериментов, интерпретации результатов, безграничное терпение и колоссальную поддержку

Ксении Вячеславовне Фёдоровой, за ценные советы и постоянное внимание к работе

Николаю Николаевичу Брандту, за помощь в организации и проведении экспериментов

Всему коллективу кафедры молекулярных процессов и экстремальных состояний вещества.