

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

"ИНДИКАТРИСА РАССЕЯНИЯ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ ГЕМОГЛОБИНА"

Выполнила студентка 204 М группы:  
Исаева Арина Игоревна

---

подпись студента

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

---

подпись научного руководителя

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

Зав. кафедрой

профессор Сысоев Н.Н.

---

подпись зав. кафедрой

Москва 2020

# Содержание

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 ВВЕДЕНИЕ</b>  | <b>2</b>  |
| <b>2 Основные свойства белковых молекул</b>  | <b>3</b>  |
| 2.1 Белок . . . . .  | 3         |
| 2.2 Гемоглобин . . . . .   | 5         |
| <b>3 Рассеяние света в биологических растворах</b>   | <b>8</b>  |
| <b>4 Литературный обзор</b>  | <b>10</b> |
| <b>5 Экспериментальное исследование водных растворов методом статистического рассеяния света</b>                           | <b>19</b> |
| 5.1 Объекты исследования и подготовка образцов для измерений . . . . .   | 24        |
| 5.2 Описание оборудования . . . . .  | 25        |
| 5.3 Экспериментальные данные . . . . .   | 27        |
| 5.4 Построение графиков . . . . .  | 28        |
| 5.5 Методы обработки экспериментальных данных . . . . .  | 31        |
| 5.6 Метод Дебая . . . . .  | 31        |
| 5.7 Метод асимметрии . . . . .   | 33        |
| 5.8 Метод Зимма . . . . .  | 37        |
| 5.9 Результаты экспериментального исследования водных растворов гемоглобина методами статического светорассеяния . . . . . | 39        |
| <b>6 ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ</b>  | <b>40</b> |
| <b>7 СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b>   | <b>41</b> |

# 1 ВВЕДЕНИЕ

## **Актуальность темы исследования**

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. Без гемоглобина нормальное насыщение тканей кислородом было бы невозможным. 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.

Поскольку кислород является одним из самых плохо растворимых в воде газов: его растворимость составляет 4,9 мл в 100 мл воды. Следовательно, многоклеточным аэробным организмам необходим транспортный механизм, способный селективно и обратимо связывать дыхательные газы.

Гемоглобин высокотоксичен при попадании значительного его количества из эритроцитов в плазму крови (что происходит при массивном внутрисосудистом гемолизе, геморрагическом шоке, гемолитических анемиях, переливании несовместимой крови и других патологических состояниях). Токсичность гемоглобина, находящегося вне эритроцитов, в свободном состоянии в плазме крови, проявляется тканевой гипоксией — ухудшением кислородного снабжения тканей, перегрузкой организма продуктами разрушения гемоглобина — железом, билирубином, порфиринами с развитием желтухи или острой порфирии, закупоркой почечных канальцев крупными молекулами гемоглобина с развитием некроза почечных канальцев и острой почечной недостаточности.

Дефицит гемоглобина может быть вызван, во-первых, уменьшением количества молекул самого гемоглобина (анемия), во-вторых, из-за уменьшенной способности каждой молекулы связать кислород при том же самом парциальном давлении кислорода. Прочие причины низкого гемоглобина разнообразны: кровопотеря, пищевой дефицит, болезни костного мозга, химиотерапия, отказ почек, атипичный гемоглобин.

Повышенное содержание гемоглобина в крови связано с увеличением количества или размеров эритроцитов, что наблюдается также при истинной полицитемии. Это повышение может быть вызвано: врождённой болезнью сердца, лёгочным фиброзом, слишком большим количеством эритропоэтина.

## **Цели**

В связи с этим основной целью данной работы было исследование формы и размеров гемоглобина, происходящее в водных растворах при разных концентрациях белка с помощью многоугольного метода статистического рассеяния света.

Исходя из поставленной цели вытекают следующие задачи:

- 1) Расчет концентраций для проведения эксперимента.
- 2) Приготовление раствора.
- 3) Многоугольные измерения интенсивности.
- 4) Построение индикатрис рассеяния.
- 5) Обработка полученных данных.
- 6) Построение графиков для различных параметров.
- 7) Исследование массы и формы гемоглобина.

## 2 Основные свойства белковых молекул

### 2.1 Белок

**Белки** – это сложные высокомолекулярные природные соединения, построенные из  $\alpha$ -аминокислот. Число аминокислот, входящих в молекулы отдельных белков, различно, поэтому содержание элементов в них колеблется в достаточно широких пределах.

Важнейшая и почти монополярная функция белков – ферментативный катализ химических превращений в клетке и вокруг нее. Кроме того, белки-регуляторы контролируют экспрессию генов, а рецепторные белки (они сидят в липидной мембране) обеспечивают восприятие межклеточных сигналов, часто передаваемых гормонами (тоже белками).

Иммунные белки и сходные с ними белки гистосовместимости опознают и связывают «чужие» молекулы, а также «свои» клетки, что и позволяет им (клеткам) правильно размещаться в организме.

Структурные белки образуют микрофиламенты, микротрубочки, а также фибриллы, волосы, шелк и другие защитные покровы; они армируют мембраны и поддерживают структуру клеток и тканей. Транспортные белки переносят (а запасные - накапливают) другие молекулы.

Белки, переносящие протоны и электроны через мембрану, обеспечивают всю биоэнергетику: поглощение света, дыхание, выработку АТФ. Другие белки, «сжигая» АТФ, обеспечивают механохимическую деятельность – они работают в мышцах или перемещают элементы клетки. При всем разнообразии работа белков всегда базируется на высоко специфическом, как у ключа с замком (точнее, как у гибкого ключа с гибким замком), взаимодействии белка с обрабатываемой им молекулой. Для этого взаимодействия необходима достаточно «твердая» (во всяком случае, у «работающего» белка) пространственная структура. Поэтому биологическая функция белков (как и других важнейших для жизни макромолекул – ДНК и РНК) тесно связана с определенностью их трехмерных структур. Не только разрушение, даже небольшие изменения этих структур часто ведут к утере или резкому изменению активности белков.

Знание молекулярной трехмерной структуры белка необходимо для понимания функционирования белковой молекулы. Поэтому уместно говорить о физике функционирования белков лишь в конце, сосредоточившись вначале на их структуре, на природе ее стабильности и способности к самоорганизации.

В «работающем» белке его цепь свернута строго определенным образом. В конце 1950-х годов М. Перутц и Д. К. Кендрью расшифровали пространственное строение первых белков и показали его высокую сложность. Впервые строгую определенность строения белковых молекул фактически доказал еще в 60-х годах XIX века Ф. Хоппе-Зейлер, получив кристаллы гемоглобина, в кристаллах каждый атом каждой молекулы знает свое место.

По жизненным условиям и общему типу строения белки можно разбить на три класса.

- 1) Фибриллярные белки образуют огромные агрегаты, в которых воды довольно мало; их структура обычно высоко регулярна и держится в основном взаимодействиями между разными цепями.
- 2) Мембранные белки «живут» в мембране, где нет воды, но части их выступают из мембраны в воду. Внутримембранные части таких белков, как и фибриллярные белки, высоко регулярны и прошиты водородными связями, но размер этих регулярных частей ограничен толщиной мембраны.
- 3) Водорастворимые, живущие в воде глобулярные белки наименее регулярны (особенно небольшие); их структура держится взаимодействиями белковой цепи с самой собой, причем особенно важны взаимодействия далеких по цепи, но сблизившихся в пространстве углеводородных («гидрофобных», т. е. «боящихся воды») групп, а порой также и взаимодействиями белковой цепи с кофакторами. Белки выполняют также огромное количество других функций. Так структурные функции осуществляют – коллаген (хрящи, сухожилия), кератин (перья, волосы, когти, рога); транспортные – гемоглобин (пере-

нос  $O_2$  и  $CO_2$ ), альбумин (жирные кислоты), глобулины (гормоны, металлы); сократительные – актин, миозин (работа мышц), тубулин (веретено деления, реснички); гормональные – инсулин (регулирует содержание глюкозы).

Белковые молекулы имеют четыре уровня (структуры) пространственной организации. Первичная структура молекулы белка представляет собой цепочку из аминокислот соединенных пептидными связями (рис. 1, а). Это наиболее важная структура, поскольку она определяет форму и свойства белка. Каждый белок организма имеет уникальную первичную структуру.

Вторичная структура белковой молекулы возникает в результате образования водородных связей между атомом водорода NH-группы и CO-группы разных аминокислотных остатков полипептидной цепи (рис. 1, б). Полипептид при этом закручивается в спираль. Такая структура характерна для кератина, коллагена, инсулина, миозина, фибриногена и др.

Третичная структура создается S-S связями (дисульфидными мостиками), а также гидрофобными и гидрофильными взаимодействиями разных частей молекулы полипептида (рис. 1, в). Третичной структурой определяется специфичность белковых молекул, их биологическая активность.

Некоторые белки имеют четвертичную структуру. В этом случае несколько полипептидных цепей с третичной структурой за счет межмолекулярных взаимодействий объединяются в единый комплекс. Ярким примером белка с четвертичной структурой является гемоглобин, состоящий из четырех полипептидных субъединиц и небелковой части – гема (рис. 1, г) [1].

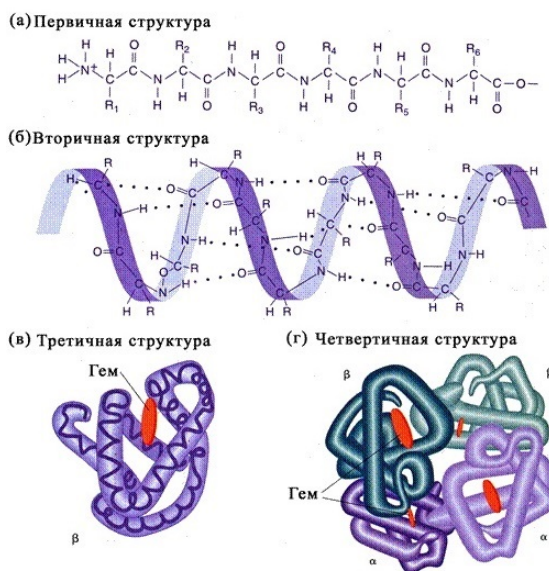


Рис. 1: Структура белка [1]

## 2.2 Гемоглобин

**Гемоглобин** – это компонент эритроцитов, относящийся к группе белков. Состоит из 96 процентов белкового вещества глобина и из 4 процентов вещества с атомом 2-валентного железа — гема. 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 (рис. 2). 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 спасается, транспортируется в костный мозг белками, называемыми трансферринами, и снова используется для производства новых эритроцитов; оставшаяся часть гемоглобина образует основу билирубина, химического вещества, которое выделяется с желчью и придает фекалиям характерный желто-коричневый цвет. Созревание эритроцитов занимает около 5 дней. Из костного мозга в кровь поступают ретикулоциты, дозревающие до эритроцитов в течение суток. По их количеству в крови судят об интенсивности эритропоэза. В сутки образуется 60-80 тысяч эритроцитов на каждый микролитр крови. Т.е. ежедневно обновляется около 1,5 процентов эритроцитов. Каждая молекула гемоглобина состоит из четырех гемовых групп, окружающих глобиновую группу, образуя тетраэдрическую структуру. Гем 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.

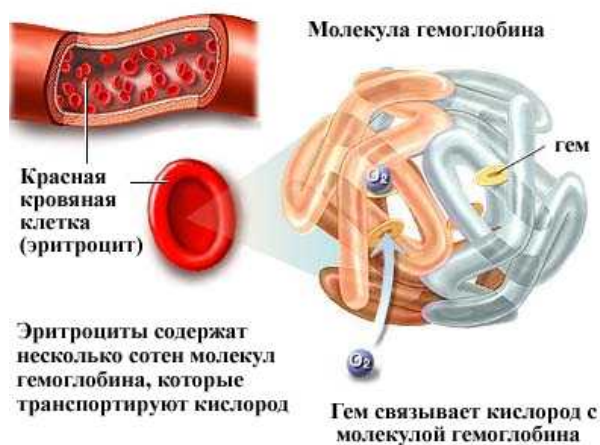


Рис. 2: Структура гемоглобина [1]

**Нормы содержания гемоглобина у человека** Нормальные значения содержания гемоглобина в крови, не считающиеся патологическим отклонением: У мужчин — 130-150 г/л. У женщин — 120-140 г/л. У детей до года 100-140 г/л, причём в первый месяц эти значения могут достигать до 220 г/л за счёт повышенной концентрации фетального гемоглобина. У детей с года до 6 лет — 110-145 г/л, а с 6 года жизни — 115-150 г/л вне зависимости от пола ребёнка. При беременности наблюдается снижение концентрация HbА до 110 г/л, что однако не считается анемией. У пожилых людей нормой считается тенденция понижения на 5 единиц от заявленной нормы в зависи-

мости от пола пациента. По возрастному цензу отличается и состав крови, содержащей одновременно разные виды гемоглобина. Так, например, у взрослого человека естественным соотношением является 99 процентов HbA и до 1 процента HbF. У детей до года процент HbF значительно выше, чем у взрослых, что объясняется постепенным распадом изначально имеющейся формы фетального гемоглобина (рис. 3).

| Возраст            | Пол | Уровень гемоглобина, г/л |
|--------------------|-----|--------------------------|
| менее 2 недель     | Ж/М | 135—200                  |
| 2 недели — 1 месяц | Ж/М | 115—180                  |
| 1—2 месяца         | Ж/М | 90—130                   |
| 2—6 месяцев        | Ж/М | 95—140                   |
| 6—12 месяцев       | Ж/М | 105—140                  |
| 1—5 лет            | Ж/М | 100—140                  |
| 5—12 лет           | Ж/М | 115—145                  |
| 12—15 лет          | Ж   | 112—152                  |
|                    | М   | 120—160                  |
| 15—18 лет          | Ж   | 115—153                  |
|                    | М   | 117—160                  |
| 18—65 лет          | Ж   | 120—155                  |
|                    | М   | 130—160                  |
| старше 65 лет      | Ж   | 120—157                  |
|                    | М   | 125—165                  |

Рис. 3: Среднее значения гемоглобина [1]

**Функции гемоглобина** Гемоглобин - белок эритроцитов, красных кровяных клеток, переносящий молекулярный кислород от легких к тканям в организмах позвоночных животных. Гемоглобин образует нестабильную, обратимую связь с кислородом; в насыщенном кислородом состоянии он называется оксигемоглобином и имеет ярко-красный цвет; в уменьшенном состоянии - пурпурно-синий. Гемоглобин входит в состав группы белков гемопротейны, которые сами являются подвидом хромопротеинов и подразделяются на неферментативные белки (гемоглобин, миоглобин) и ферменты (цитохромы, каталаза, пероксидаза).

Молекула гемоглобина представлена белковой частью – глобинами, небелковой – гемом.

Гем – структура, включающая в себя порфириновое кольцо (состоящее из 4 пиррольных колец) и иона  $Fe^{2+}$ . Железо связывается с порфириновым кольцом двумя координационными и двумя ковалентными связями. 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.

Гемоглобиновый буфер является самым мощным буфером крови (около 75 процентов от общей буфер-

ной емкости крови).

В настоящее время известно более 300 генетически обусловленных типов гемоглобина. Их современная номенклатура принята на X Международном гематологическом конгрессе в Стокгольме в 1964 году. Типы гемоглобина обозначают буквами латинского алфавита от А до G и S.

Гемоглобин представляет собой белок, включающий 4 гемсодержащие белковые субъединицы. Между собой протомеры соединяются гидрофобными, ионными, водородными связями, при этом они взаимодействуют не произвольно, а определенным участком – контактной поверхностью. Этот процесс высокоспецифичен, контакт происходит одновременно в десятках точек по принципу комплементарности. Взаимодействие осуществляют разноименно заряженные группы, гидрофобные участки, неровности на поверхности белка.

Белковые субъединицы в нормальном гемоглобине могут быть представлены различными типами полипептидных цепей:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\xi$  (соответственно, греч. - альфа, бета, гамма, дельта, эпсилон, кси). В состав молекулы гемоглобина входят по две цепи двух разных типов (рис. 4).

Гем соединяется с белковой субъединицей, во-первых, через остаток гистидина координационной связью железа, во-вторых, через гидрофобные связи пиррольных колец и гидрофобных аминокислот. Гем располагается как бы "в кармане" своей цепи и формируется гемсодержащий протомер (рис. 4).

Существует несколько нормальных вариантов гемоглобина:

*Hb* – примитивный гемоглобин, содержит 2 $\xi$ - и 2 $\epsilon$ -цепи, встречается в эмбрионе между 7-12 неделями жизни.

*HbF* – фетальный гемоглобин, содержит 2 $\alpha$ - и 2 $\gamma$ -цепи, появляется через 12 недель внутриутробного развития и является основным после 3 месяцев.

*HbA* – гемоглобин взрослых, доля составляет 98 процентов, содержит 2 $\alpha$ - и 2 $\beta$ -цепи, у плода появляется через 3 месяца жизни и к рождению составляет 80 процентов всего гемоглобина.

*HbA<sub>2</sub>* – гемоглобин взрослых, доля составляет 2 процента, содержит 2 $\alpha$ - и 2 $\delta$ -цепи.

*HbO<sub>2</sub>* – оксигемоглобин, образуется при связывании кислорода в легких, в легочных венах его 94-98 процентов от всего количества гемоглобина.

*HbCO<sub>2</sub>* – карбогемоглобин, образуется при связывании углекислого газа в тканях, в венозной крови составляет 15-20 процентов от всего количества гемоглобина.

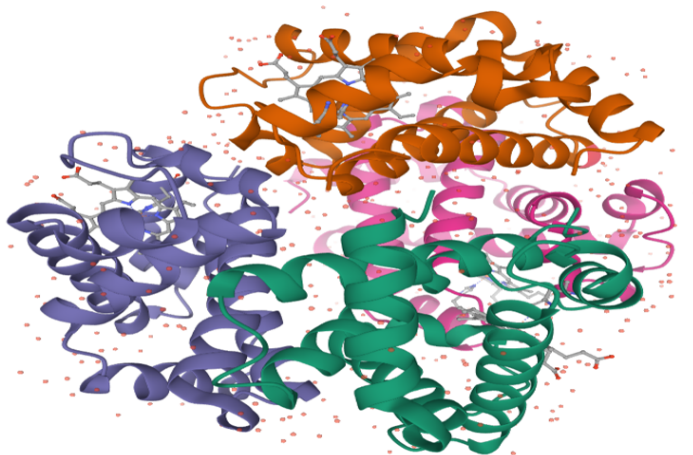


Рис. 4: 3D модель белка гемоглобина [2]



### 3 Рассеяние света в биологических растворах

Процесс рассеяния света состоит в заимствовании молекулой или частицей некоторой доли энергии у распространяющейся в среде электромагнитной волны и излучении в окружающее пространство. Процесс рассеяния можно представить следующей схемой [3]:

Рассеяние = возбуждение + переизлучение.

В результате могут происходить изменения характеристик потока излучения: пространственного распределения интенсивности, частотного спектра, поляризации. Помимо переизлучения, часть энергии падающей электромагнитной волны может быть преобразована в другие виды энергии (например, в тепло) - происходит поглощение. При распространении в среде интенсивность падающего света ослабляется с расстоянием (закон Бугера–Ламберта–Бера):

$$I = I_0^{-S*x*c} \quad (1)$$

где  $I$  и  $I_0$  - интенсивности падающего света и прошедшего через среду толщиной  $x$ ,  $S$  - коэффициент экстинкции среды,  $c$  - концентрация молекул. Как поглощение, так и рассеяние вносят вклады в общее ослабление потока.

В оптически прозрачной однородной среде плоская волна распространяется только в одном направлении, не испытывая рассеяния в стороны. Рассеяние происходит на оптических неоднородностях среды, возникающих при изменении показателя преломления.

Оптическая неоднородность среды может быть связана с присутствием в ней диспергированных частиц. Однако даже в средах, которые с макроскопической точки зрения можно считать однородными (чистые газы, жидкости или твердые тела), неизбежно присутствуют локальные неоднородности из-за хаотического теплового движения молекул: равные небольшие объемы содержат различное число частиц, т.о., имеют место 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.

По характеру изменения частоты излучения различают:

- 1) Неупругое рассеяние (комбинационное рассеяние и рассеяние Мандельштама–Бриллюэна), приводящее к появлению в рассеянном свете линий, смещенных по частоте относительно возбуждающего излучения.
- 2) Упругое рассеяние, происходящее без существенного изменения частоты.

В упругом рассеянии спектр излучения меняется: хотя центральная частота совпадает с частотой возбуждающего излучения, но амплитуда и фаза оказываются модулированы в результате процессов, вызванных флуктуациями рассеивающих центров. Параметры спектра рассеянного света зависят от скоростей процессов, обеспечивающих релаксацию неоднородностей среды: так релаксация концентрации рассеивающих частиц в растворе ограничивается диффузией, а релаксация ориентаций анизотропных молекул – временами их поворота в вязкой среде (дебаевское время релаксации). Метод статического рассеяния света (СРС), используемый в настоящей работе, основан на теориях упругого рассеяния света.

Интенсивность и пространственное распределение рассеянного излучения зависят от соотношения между длиной падающей волны  $\lambda$  и размером частиц  $d$ , можно указать следующие диапазоны:

- 1) Рассеяние Рэлея (для частиц малых по сравнению с длиной волны  $d < \lambda/15$ ).

Если линейные размеры частицы меньше, чем приблизительно  $1/15$  длины падающей волны, то рассеяние называется рэлеевским по имени Д. У. Рэлея. В этом предельном случае все элементарные диполи рассеивающей частицы излучают когерентно, в одной фазе;

- 2) Рассеяние Ми (для крупных частиц размером  $d > \lambda/15$ ) Теория Ми.

Помимо интерференции волн, рассеянных в разных областях частицы, при рассеянии Ми необходи-

мо учитывать переизлучение первичной волны элементарными диполями. В результате элементарные рассеиватели находятся внутри частицы уже не в одинаковых электромагнитных полях. Если размеры рассеивающих частиц становятся сравнимыми с длиной волны, зависимость интенсивности  $I$  рассеянного света от длины волны  $\lambda$  становится менее заметной в сравнении с зависимостью  $I = 1 / \lambda^4$  в теории Рэлея. Преобладающим становится рассеяние вперед (в направлении падающего пучка). Хотя первоначально развитая Г. А. Ми теория относилась только к сферическим частицам, термин «рассеяние Ми» используется и для частиц неправильной формы.

### 3) Дифракция Фраунгофера ( $d > \lambda$ ).

Если размер частицы превышает длину волны падающего света, то происходит преимущественно процесс дифракции. Информация о размере частицы заключается в величине малого угла дифракционного расхождения. Данный феномен описан теорией Фраунгофера и называется дифракцией Фраунгофера. Теория Ми для крупных частиц сводится к решениям, аналогичным теории Фраунгофера.

## 4 Литературный обзор

**Эхиоцит** — клетка, которая имеет шипы одинаковых размеров, располагающиеся равномерно по поверхности эритроцита (шишковидная клетка, зубчатая клетка). Встречается в донорской крови, содержащей старые эритроциты, и является основной формой измененных эритроцитов донорской крови, *in vivo* и в свежих пробах крови они обнаруживаются редко, при некоторых заболеваниях (уремия, раке желудка, пептической язве, осложненной кровотечением, гипофосфатемии, гипомагниемии). В некоторых случаях образование эхиоцита сопровождалось выходом наружу гемоглобина и части внутреннего содержимого эритроцита через небольшие участки деструкции клеточной оболочки. Функциональное физиологическое значение эхиоцитоза пока недостаточно изучено [4].

*In vitro* эхиоцит образуется под действием изменившегося pH, поэтому одной из причин образования эхиоцита считают повышенную проницаемость мембран эритроцита для ионов  $K^+$  и  $Na^+$  [5]. Эхиоциты образуются при воздействии (*in vivo* и *invitro*) токсинов (в том числе и бактериальных), радиации.

**Гемоглобины (HbS)** - гемсодержащие белки, связывающие кислород, монооксид углерода и оксид азота. Эритроциты являются наиболее известным местоположением HbS, HbS также существуют в нейронах, и они в основном локализируются во внутренней митохондриальной мембране нейронов. Недавно исследования показали [6] связь между гипоксией и нейродегенеративными нарушениями, такими как болезнь Альцгеймера (AD), и, кроме того, предположили участие Hbs в патогенезе AD.

В то время как клеточные иммуногистохимические исследования мозга AD показали снижение уровня Hb в цитоплазме предсвязывающих и несущих клубок нейронов, в других исследованиях гомогенатов образцов мозга с AD выявлено повышение уровня Hb. Это потенциальное несоответствие может быть результатом различного присутствия и функции внутриклеточного и внеклеточного HbS.

Внутриклеточные Hbs могут защитить нейроны от гипоксии и гипероксии. С другой стороны, внеклеточный свободный Hb и его продукты распада могут вызывать воспалительные иммунные и окислительные реакции против макромолекул нейронов и/или повреждать гематоэнцефалический барьер.

Следовательно, биологические процессы, приводящие к снижению транскрипции Hb (включая клинически молчащие мутации Hb), могут влиять на внутриэритроцитарный и нервный HbS и уменьшать транспорт кислорода, оксида углерода и оксида азота, которые могут быть вовлечены в (пато) физиологию нейродегенеративных расстройств, такие как AD. Такие агенты, как эритропоэтин, которые стимулируют как эритропоэз, также и уменьшают эритроцитоз и индуцируют внутриклеточный нервный HbS, могут оказывать множественные благоприятные эффекты на начало и течение AD. Таким образом, накапливаются доказательства роли HbS в центральной нервной системе, в то время как HbS заслуживают большего внимания в качестве возможных молекул-кандидатов, участвующих в AD.

**Уменьшение размеров гемоглобина:** низкое содержание железа в крови вызывает уменьшение гемоглобина и кислородное голодание органов и тканей. Органы желудочно - кишечного тракта являются важнейшими в регуляции обмена железа и кроветворения. Дефицит железа сопровождается большим количеством заболеваний гастроэнтерологического профиля.

В статье [7] обсуждаются проблемы диагностики и лечения анемий, описываются механизмы развития анемий, связанных с кровотечением, мальабсорбцией и хроническим воспалением. Приводятся современные данные по применению препаратов железа.

Новые перспективы коррекции дефицита железа при указанных заболеваниях открываются при использовании современных препаратов липосомального железа.

Только недавно был открыт механизм положительной регуляции обмена железа, который нужен для

увеличения поступления железа в кровь, например при резком росте синтеза гемоглобина в костном мозге.

**Серповидно - клеточная болезнь (СКБ)** – группа состояний, обусловленных наличием специфических мутаций в бета-глобиновом гене, приводящих к изменению физико-химических свойств гемоглобина (полимеризация в деокси-форме, нарушение сродства гемоглобина к кислороду). К СКБ относится серповидно-клеточная анемия (гомозиготность по аномальному гемоглобину S).

Замена двух остатков глутаминовой кислоты остатками валина в молекуле белка, содержащей 574 аминокислотных остатка, на первый взгляд кажется не очень значительным изменением, однако остаток, занимающий шестое положение в бета-цепи оказывает весьма сильное влияние на четвертичную структуру гемоглобина. Появление валина в положении, нормально занимаемом остатком глутаминовой кислоты, приводит к возникновению «липкого» гидрофобного контакта на поверхности молекулы, где расположен шестой остаток бета-цепи. В результате молекулы дезоксигемоглобина S слипаются и образуют аномально длинные нитевидные агрегаты, которые и обуславливают серповидную форму эритроцитов.

При исследовании крови [8] таких больных обращает на себя внимание не только резкое уменьшение числа эритроцитов, но и неправильная их форма. Наряду с необычно большим количеством незрелых эритроцитов часто попадаются удлинённые и тонкие - серповидные клетки. Число таких эритроцитов сильно возрастает при недостатке кислорода в крови. Серповидные клетки очень хрупки, легко разрываются, чем и объясняется низкий уровень гемоглобина у таких больных. Наблюдаются и еще более серьезные последствия: кровеносные капилляры там, где они особенно узки, блокируются удлинёнными эритроцитами неправильной формы, что и служит главной причиной ранней смерти во многих случаях этой болезни.

Генная терапия достигла стадии испытаний на людях и была зарегистрирована в 2017 году у пациента с серповидноклеточной анемией [9].

Пациент перенес миелоабляцию с внутривенным введением бусульфана. После трансдукции клеток CD34 + отмечалось устойчивое повышение продукции гемоглобина AT87Q с течением времени. Пациент, ранее зависящий от переливания, был в состоянии прекратить переливание эритроцитов к 88 дню после трансплантации. Гемоглобин оставался стабильным на уровне 10-12 г через 6 месяцев. Процент гемоглобина оставался на уровне 48 процентов к 15-му месяцу после трансплантации с соответствующим снижением уровня гемоглобина S.

В статье [10] отмечается, что новые подходы к лечению пациентов с серповидно-клеточной анемией приводят к попытке смягчить или вылечить расстройство. Интерес к исследованиям серповидно-клеточной анемии зародился и теперь может дать надежду многим людям, живущим с этим заболеванием во всем мире. Необходимо начать гораздо больше клинических испытаний и подвергнуть их более тщательному анализу. Необходимо приложить усилия, чтобы предложить эти методы лечения в менее развитых странах, где проживает большинство людей с серповидно - клеточной анемией. Эти инициативы сейчас кажутся более возможными, чем когда-либо прежде.

**Денатурация.** Изображения и описания белков часто создают неправильное впечатление, что они являются статическими молекулами. На самом деле, белки очень подвижны, и внутри молекулы свернутого белка происходят различные виды движений.

Функция белка тесно связана с его конформацией и динамикой, которые в свою очередь, сильно зависят от окружающей среды [11]. Таким образом, белок подвергается колебаниям в своем энергетическом состоянии вследствие взаимодействия с окружающей средой. Изменяя окружающую среду, можно вызвать изменения в естественной трехмерной структуре белка. Например, повышение температуры, изменение pH или добавление органических молекул, таких как спирты, может привести

к раскрытию белка. Этот процесс, когда структура белка изменяется от свернутого к развернутому состоянию, называется процессом разворачивания или денатурацией, поскольку естественная структура теряется и, таким образом, многие специфические свойства белка тоже. Существует несколько структурных уровней и особенностей, которые влияют на нативную трехмерную конформационную структуру водорастворимых белков и позволяют им функционировать в соответствии со своей специфической биологической ролью.

Связи, которые стабилизируют трехмерную нативную структуру, являются слабыми связями, обычно водородные связи. В процессе денатурации эти водородные связи разрушаются, и, следовательно, белок теряет свою трехмерную функциональную структуру. В процессе термической денатурации с повышением температуры ряд связей в молекуле белка ослабевает. Первые затронутые связи - это связи, которые важны для третичной структуры. Поскольку эти связи ослаблены и в последующем разрываются, белок приобретает более гибкую и подверженную воздействию растворителя структуру. Дальнейшее повышение температуры вызывает разворачивание спиральных структур и разрушение нативной структуры, что приводит к дестабилизации гидрофобной внутренней части белка, и, следовательно, гидрофобные части становятся более подверженными воздействию окружающего растворителя.

В статье [11] исследовали денатурацию белка гемоглобина Hb и динамику, связанную с гидратацией воды 1.2 грамм воды на грамм гемоглобина, с помощью квазиупругого рассеяния нейтронов «QENS». Замороженный порошок Hb, выбранный для этого исследования, был приобретен у Sigma-Aldrich и в виде сухого образца. Вода, используемая для измерения ДСК Milli Q WATER. Значение pH каждого измеренного образца составляло около 7,0.

Измерения QENS проводились на спектрометре с импульсным нейтронным источником расщепления ISIS в лаборатории Резерфорда Эплтона, Великобритания. Используя анализаторы PG002 и длину волны падающего нейтрона около 6,6 ангстрем. Для всех измерений образцы 0,3 г помещали в плоские герметично закрытые вакуумонепроницаемые алюминиевые контейнеры с внутренней толщиной 0,3 мм. Упругие сканирования выполнялись с шагом 5 К от 290 до 370 К. Данные собирались в течение 8 минут на каждую измеренную температуру с помощью плоского держателем образца, ориентированным на 135 градусов относительно падающего нейтронного пучка. Анализом данных был выполнен с использованием локальной программы MODES.

В результате исследования получены следующие результаты:

При температуре 315–320 К процесс денатурации белка для мультисубъединичного гемоглобина начинается с диссоциации тетрамерной структуры с образованием мономера с последующим разворачиванием вторичной структуры при повышении температуры. В области температур 320–330 К, происходит разворачивание -динамичность белка становится быстрой, благодаря этому структура белка становится более рыхлой. Во время диссоциации и разворачивания спиральной структуры большая часть поверхности белка подвергается воздействию окружающей воды, и, следовательно, большее количество молекул воды может связываться с поверхностью белка. Таким образом, в этом интервале температур число молекул воды, связанных с поверхностями, увеличивается с ростом температуры, что в среднем снижает подвижность воды. Однако процесс денатурации приводит не только к более доступным связываниям молекул воды, но и к воздействию гидрофобных частей белка на окружающую среду. Когда разворачивание альфа-спиральной структуры завершено, начинается агрегация развернутых частей около 330–335 К.

**Пептиды, полученные из гемоглобина HbАНР-25.** Было показано, что гемоглобин (Hb), обычно известный своей способностью переносить кислород, обладает противомикробной активностью [12]. В последние годы появились данные о роли Hb и его пептидов в защите от микробной инфекции [13], [14], [15], [16]. Гемоцидины (пептиды, полученные из Hb) с антимикробной активностью были обнаружены в маточной жидкости человека [17], влагалищном лаваже [18] и менструальной крови [19]. Гемоцидины играют важную роль в поддержании вагинального иммунитета, проявляя антибактериальную

активность и облегчая воспаление, вызванное бактериями. Они потенцируют активность различных известных противомикробных препаратов, присутствующих в женском половом тракте. Также следует отметить, что гемоцидины активны в различных ионных силах, а также при низком рН, характерном для женских половых путей. Показано, что гемоглобин и Нб-пептиды играют важную защитную роль во время менструации [19]. Следовательно, мы исследовали, имеют ли Нб-производные пептиды анти-ВИЧ-активность.

Исследование [12] показывает, что НбАНР-25, молекула, полученная из человеческого гемоглобина, имеет значительную активность против ВИЧ. Он ингибирует ВИЧ на начальных стадиях инфицирования клеток-мишеней. Кроме того, он не является цитотоксичным для клеток-хозяев и активен в широком диапазоне рН.

Проект исследования был одобрен для использования биологических образцов человека (кровь / сперма / вагинальный лаваж) Институциональным комитетом по этике клинических исследований (D / ISEC / Sci-13/18/2014). Рекомбинантные белки (CD4, gp120) и человеческие моноклональные антитела (анти-gp120, анти-CD4) и AZT были получены в рамках Программы исследований и справочной реактивов по СПИДу (ARRRP), Национального института аллергии и инфекционных заболеваний (NIAID) (Bethesda, MD, США). Все исходные реагенты растворяли в воде, не содержащей эндотоксин. Было обнаружено, что НбАНР-25 активен против штаммов штамма ВИЧ-1 CCR5-Tropic (ADA5 и BaL) и CXCR4-тропических ВИЧ-1 (ШВ и NL4-3). Поверхностный плазмонный резонанс (SPR) и ELISA выявили прямое взаимодействие между белком оболочки НбАНР-25 и HIV-1 gp120. Пептид предотвращал связывание CD4 с gp120 и блокировал последующие стадии, ведущие к входу и / или слиянию, или к тому и другому. Анти-ВИЧ-активность НбАНР-25 оказалась специфичной, поскольку она не способствовала ингибированию проникновения вируса ВИЧ-1 (HIV-1 VSV). Также важно продемонстрирована эффективность НбАНР-25 *in vitro* и *in vivo* против клинических изолятов ВИЧ, а также его безопасность до его клинического использования. В настоящее время ведутся исследования для оценки эффективности НбАНР-25 *in vivo*. Многочисленные исследования белка за последние десятилетия раскрыли особенности его молекулярной структуры. Несмотря на широкое изучение гемоглобина в водных растворах количество важных вопросов остаётся нерешенными.

**Гемоглобины типов А, А2, F и Р.** Ещё одно исследование проведенное в период с 2003 по 2009 гг. на биологическом и клиническом материале общей численностью 1288 образцов. Объектом исследования являлись изучаемые гемоглобины типов А, А2, F и Р:

В статье *"Гемоглобины человека: иммунобиохимическая характеристика и медико-биологическое значение"* [20].

Биоматериал использовали как при изучении физико-химических свойств НбА, НбА2, НбF и НбР, так и в разработке новых способов выделения и очистки названных белков. Исходным материалом для очистки НбА, и НбА2 являлась кровь доноров и здоровых беременных НбА и НбА2 являлась кровь доноров и здоровых беременных женщин; для очистки фетального гемоглобина - пуповинная кровь здоровых новорожденных и ткани плодов; для очистки НбР — эмбриональный материал сроком гестации 5-9 нед. Постановку и верификацию диагнозов в обследуемых группах проводили при участии квалифицированных специалистов. Исследованный клинический материал был разделен по нозологии на три группы:

- 1) Гепаринизированная кровь больных миелопрлиферативными заболеваниями. Всего было обследовано 244 образца крови. Т.к. в обследуемый спектр нозологии входили заболевания с редкой встречаемостью (эритремия, сублейкемический миелоз, эритроцитоз), если число вариантов в выборке не превышало 20, применяли алгоритмы статистической обработки для малых групп.
- 2) Гепаринизированная пуповинная кровь новорожденных, в количестве 196 образцов

3) Гепаринизированная периферическая кровь наркологических больных. Были обследованы образцы крови от 138 человек, из них: 52 образца от пациентов с алкогольной зависимостью; 44 — от больных опийной наркоманией и 42 пробы от здоровых взрослых (контрольная группа). Возраст больных составил от 18 до 43-х лет. Клинический статус обследуемых соответствовал острому абстинентному синдрому.

При изучении физико-химических свойств HbAb, HbA2, HbF и HbP, и при разработке новых способов выделения и очистки названных белков применяли методы механически-термического гемолиза, комбинированной щелочной денатурации (позапанная обработка гемолизата раствором сульфата аммония 50% насыщенности и 1,2 М раствором едкого натра с последующей седиментацией при 8000 g), препаративного электрофореза в агаровом геле на 0,1 М цитратном буфере pH 6,0 (в авторской модификации), электрофореза в полиакриламидном геле, ионообменной и гельпроникающей хроматографии. /

Идентификацию полученных препаратов проводили методом иммунохимического анализа (ИХА). Всего протестировано свыше 4500 образцов биоматериала. Итоги:

1. Получены новые достоверные сведения ( $P < 0,01$ ) по некоторым физико-химическим свойствам эмбрионального гемоглобина: относительной электрофоретической подвижности в полиакриламидном и агарозном гелях, изоэлектрической точке, степени щелочной резистентности и отношению к осаждающим агентам. Аналогичные сведения по HbAb, HbA и HbF уточнены и дополнены.

2. Отмечено изменение электрофоретической подвижности HbP под действием тритонов, мочевины и бихромата калия. Показано, что ДСН (додецилсульфат натрия) меняет вектор электрофоретической подвижности гемоглобинов на противоположный и увеличивает их скорость движения, что было положено в основу разработки способа количественного определения HbF.

3. Разработаны и апробированы эффективные алгоритмы выделения и очистки четырех типов гемоглобина со степенью чистоты HbF - 85,58%; HbP - 30,54%; HbA - 95,52%; HbA2 - 35,32%, позволившие получить моновалентные антисыворотки на HbA, HbA2, HbF и HbP.

4. Впервые сконструирована селективная иммунодиффузионная тест-система на эмбриональный гемоглобин с порогом чувствительности  $4,25 \pm 0,22$  мг/л и смоделированы иммунохимические тест-системы на фетальный гемоглобин с чувствительностью  $2,21 \pm 0,26$  мг/л; на гемоглобин A и A2- с порогом чувствительности  $3,24 \pm 0,18$  мг/л и  $4,42 \pm 0,19$  мг/л соответственно.

**Взаимодействие гемоглобина с солями.** Авторы статьи [21] подчёркивают, что высокая концентрация соли снижает кислородное сродство гемоглобина. Особо интересно то, что наблюдалось в процессе оксигенации гемоглобина. При этом происходит изменение четвертичной структуры белка. В результате молекула оксигемоглобина приобретает более компактную структуру, и центральная полость уменьшается. Гемы двух бета - цепей сближаются друг с другом, а двух альфа-цепей отдаляются. Ещё одним выводом, отмеченным авторами, было то, что хлорид ионы слабее связываются с оксигемоглобином, нежели с гемоглобином.

В статье [22] ученые смогли обнаружить количественную математическую корреляцию между размером сферически симметричной частицы и концентрацией раствора. С помощью моделирования функции распределения расстояния, можно определить размер частиц системы, в частности, частиц в белковых растворах. Эксперименты проводились на растворах гемоглобина человека и миоглобина лошади. В эксперименте с раствором гемоглобина концентрации образцов составляли 2, 10, 20 и 50 мг / мл соответственно. Измеренные кривые рассеяния растворов гемоглобина человека с разной концентрацией приведены на рисунке 6, а функции распределения  $P(r)$  - на рисунке 7. Авторами было замечено, что межчастичное взаимодействие проявляется при уменьшении интенсивности рассеяния под малыми углами (рис. 6) и возникновении отрицательных значений функции распределения расстояния  $P(r)$  (рис. 7). Чем выше концентрация образца, тем меньше интенсивность рассеяния при малых углах. Также

получен максимальный размер человеческого гемоглобина  $D_{max} = 6.5$  нм, которое хорошо согласуется с табличными значениями.

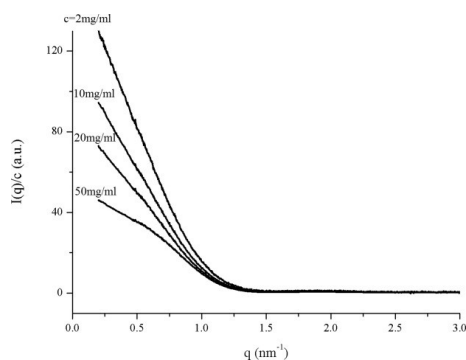


Рис. 5: График зависимости отношения интенсивности рассеянного света от концентрации

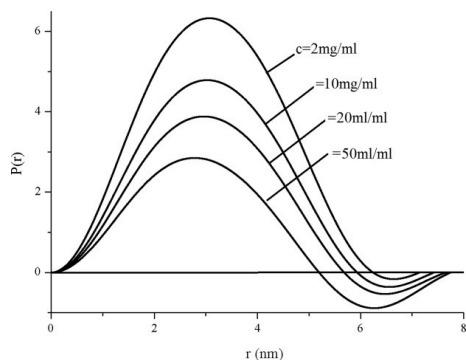


Рис. 6: Функции распределения расстояния  $P(r)$

В статье "Конкурентная сорбция  $K^+$  в присутствии  $Na^+$  бычьим сывороточным альбумином (БСА) и гемоглобином" [23] эксперименты проводили в термостатируемых условиях при температуре  $25 \pm 0,5$  градусов Цельсия на водных растворах белков бычьего сывороточного альбумина и гемоглобина (Sigma, USA, стерильные). Чистоту препаратов определяли на пламенном фотометре ПФА-378.

Степень очистки белков составляла:

- для гемоглобина содержание натрия в белке составляло 3,2 мг/л, а содержание калия 0,1 мг/л;
- для БСА содержание натрия в белке составляло 0,9 мг/л, а содержание калия 0,1 мг/л. В опытах использовались соли хлоридов ( $NaCl$ ,  $KCl$ ,  $RbCl$ ,  $CsCl$ ) с содержанием основного компонента более 99 процентов (химически чистые). Растворы солей готовились на дистиллированной воде, в концентрациях  $10^{-1} \sim 10^{-4}$  моль/л, методом разбавления маточного раствора.

Регистрацию концентраций исследуемых катионов  $K^+$  и  $Na^+$  в растворах проводили на преобразователе ионометрическом И-500 с электродной системой, включающей измерительный и вспомогательный электроды, предназначенные для измерения в водных растворах концентрации одно- и двухвалентных анионов и катионов. Предел допускаемого значения основной относительной погрешности измерения концентрации составил  $\pm 2\%$ . На основании результатов проведённых исследований можно сделано заключение о том, что при равной концентрации солей хлоридов  $NaCl$ ,  $KCl$ ,  $RbCl$ ,  $CsCl$  попарно в водных растворах бычьего сывороточного альбумина и гемоглобина наблюдалась предпочтительная сорбция исследуемыми белками элемента, имеющего бóльший порядковый номер:  $K^+$  в присутствии  $Na^+$ ,  $Rb^+$  – в присутствии  $K^+$ , а также  $Cs^+$  – в присутствии  $Rb^+$ . При исследовании сорбционных процессов клеточных катионов  $K^+$  и  $Na^+$  при различных концентрациях их солей в растворах отмечалось, что с ростом концентрации  $Na^+$  в составе водных растворов белков количество сорбированного  $K^+$ , бел-



ками возрастает. Полученные результаты по сорбции отдельно взятыми высокоочищенными белками ионов калия в присутствии различной концентрации ионов натрия полностью соответствуют данным по связыванию одновалентных клеточных катионов в мышечных клетках.

**Оптические методы.** В последнее время наиболее популярными методами диагностики являются неразрушающие оптические методы контроля, в частности, методы динамического [24], [25] и статического [26], [27] рассеяния света, которые используются по отдельности или вместе [28]. В одном из вариантов статического рассеяния света определяется зависимость интенсивности от угла рассеяния  $I(\theta)$ , который изображен в полярных координатах и называется индикатрисой рассеяния. Рассеяние света обычно анализируется в растворе макромолекул [29] или наночастиц [30] как на совокупности частиц, так и на отдельных частицах [31] под одним или двумя углами рассеяния. Чтобы получить индикатрису, угол изменяется с помощью гониометра. Одновременное измерение интенсивности рассеянного света под многими углами относительно падающего пучка обеспечивает эти измерения *in situ* при синтезе материалов [32].

В статье [33] 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 рисунке 7 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 работы [34], 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.

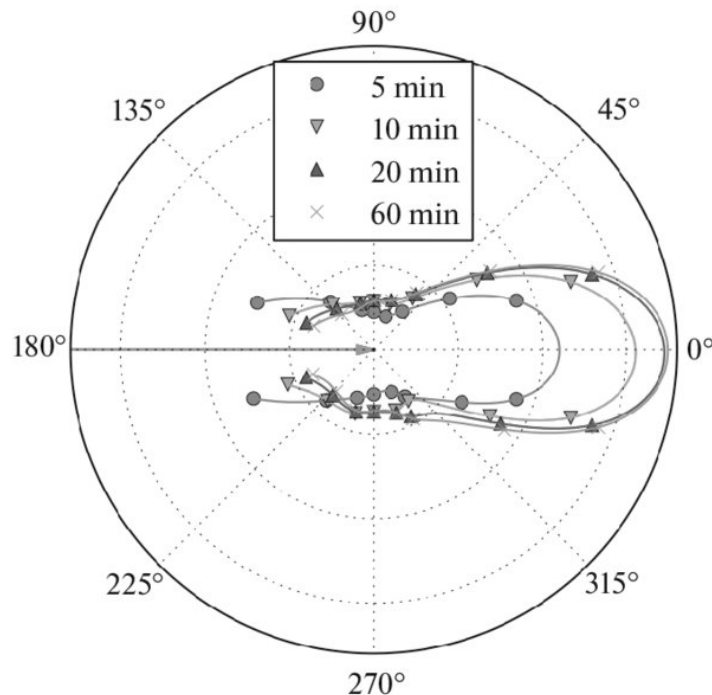


Рис. 7: Экспериментальные графики индикатрисы рассеяния частиц  $SiO_2$  через различные промежутки времени от начала синтеза [33].

Таким образом, в этой работе, показана возможность применения индикатрис рассеяния из исследований *in situ* исследований различных стадий синтеза наноматериалов показано на примере приготовления частиц  $SiO_2$ .

Метод статического рассеяния света.

В статье [35] 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  $\frac{K_{ic}}{i}$  от концентрации соли NaCl (рис. 8). На графике 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.

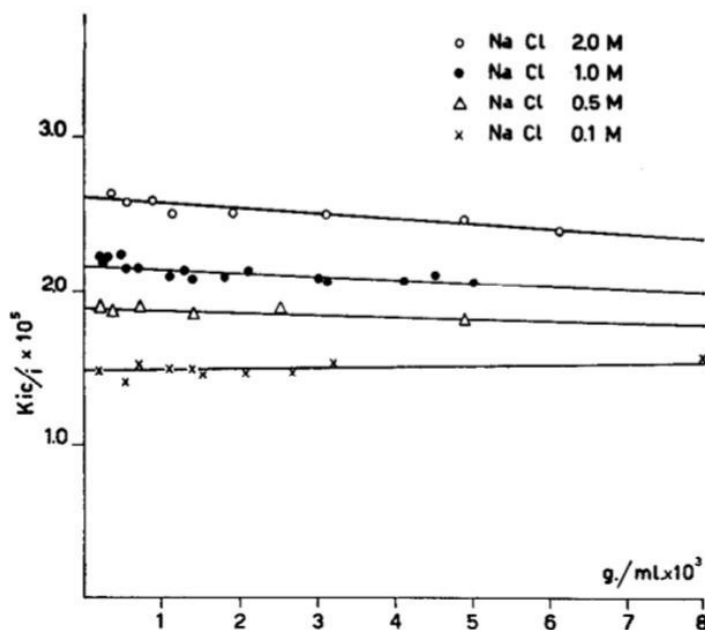


Рис. 8: График зависимости константы  $\frac{K_{ic}}{i}$  от концентрации соли NaCl [35]

**Метод цитометрии** Подсчёт количества эритроцитов и измерение таких характеристик, как объём, площадь, форма, концентрация гемоглобина позволяют оценить состояние крови и выявить такие заболевания, как анемия, наследственный сфероцитоз, наследственный эллиптоцитоз, серповидная анемия, миелопролиферативные, сердечно-сосудистые и другие заболевания [36], [37]. Исследование динамических свойств эритроцитов позволяет оценить ионную проницаемость мембраны, способность к снаб-

жению эритроцитов кислородом и выявить склонность к преждевременным родам [38].

Метод проточной цитометрии основан на измерении светорассеяния от одиночных клеток, обычно – светорассеяние в передние и боковые углы. Основное ограничение существующих приборов, основанных на принципе проточной цитометрии, в том, что они предполагают сферизацию эритроцитов перед проведением измерений, что требует дополнительной пробоподготовки. Кроме того, с помощью данного метода может быть измерен только объём и концентрация гемоглобина, но не форма клеток [39], [40]. Сканирующая проточная цитометрия (СПЦ) является перспективным подходом для полной и быстрой характеристики эритроцитов. Данный подход основывается на измерении рассеяния лазерного излучения от каждой клетки пробы с высокой скоростью (около 102 клеток в секунду) [41], [42]. В связи с тем, что пространственное распределение и поляризационные свойства света, рассеянного клеткой, зависит от морфологии: формы, размера, показателя преломления и внутренней структуры [43], существует возможность восстановить характеристики измеряемых объектов по индикатрисам светорассеяния. Существенной частью метода характеристики является решение обратной задачи светорассеяния, используя параметрическую модель измеряемых клеток [44], [45]. Потенциал данного подхода был продемонстрирован в [46], и успешно применён для характеристики тромбоцитов, бактерий, микрочастиц крови и жировых частиц молока [47], [48], [49], [50]. Распространение данного подхода на эритроциты сдерживалось сложной формой клеток. Так как обратная задача светорассеяния для одиночной частицы не имеет ни аналитического, ни явного численного решения даже для сферических частиц. При этом прямая задача должна решаться много (тысячи) раз, каждый раз требуя значительных вычислительных ресурсов, в связи с тем, что клетки крови значительно больше длины волны видимого света и имеют сложную морфологию. Поэтому выбор методов моделирования светорассеяния клеток крови с учётом точности, вычислительной сложности и требованиям к размеру оперативной памяти является также актуальной проблемой.

В статье [51] 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. 9).

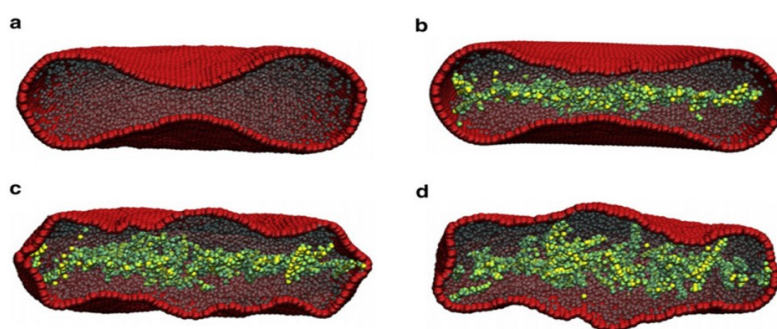


Рис. 9: Результаты для цитозольных частиц, включенных в мембрану эритроцитов (а), и молекулы серпового гемоглобина и цитозольные частицы, включенные в мембрану эритроцитов в начальном состоянии (b), в промежуточном состоянии (c) и метастабильном состоянии (d) [51]

## 5 Экспериментальное исследование водных растворов методом статистического рассеяния света

Светорассеяние – один из основных количественных методов исследования полимеров в растворе, который, не требуя специальной калибровки, 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 [52]: статическое и динамическое светорассеяние. Статическое, или упругое, светорассеяние позволяет определить молекулярную массу, второй вириальный коэффициент и, при определенных условиях, радиус инерции макромолекул.

**Статическое светорассеяние.** В приемник излучения попадает свет, рассеянный всеми частицами, находящимися в объеме фокусировки источника. Общая интенсивность рассеянного света раствора ( $I$ ) является суммой интенсивностей рассеяния, обусловленного флуктуациями плотности ( $I'$ ) и флуктуациями концентрации ( $I''$ ) [53]:

$$I = I' + I'' \quad (2)$$

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

Согласно теории Эйнштейна, параметр  $I''$  выражается уравнением:

$$I'' = I_0 * K * \frac{\nu * c}{r^2 * \frac{\partial(\frac{\pi}{RT})}{\partial c}} * (1 + \cos^2\theta) \quad (3)$$

$$K = \frac{2 * \pi^2 * n_0^2}{\lambda_0^4 * N_A} * \left(\frac{\partial n}{\partial c}\right)^2 \quad (4)$$

где  $I_0$  – интенсивность падающего света;  $\nu$  – рассеивающий объем;  $c$  – концентрация раствора;  $n_0$  – показатель преломления растворителя;  $N_A$  – число Авогадро;  $r$  – расстояние от рассеивающего объема до наблюдателя;  $\lambda$  – длина волны падающего света в вакууме;  $\pi$  – осмотическое давление,  $\left(\frac{\partial n}{\partial c}\right)$  – инкремент показателя преломления, измеряемый с помощью дифференциального рефрактометра ( $n$  – показатель преломления раствора,  $c$  – концентрация);  $n_0$  – показатель преломления растворителя,  $K$  – оптическая постоянная раствора.

Рассеяние от ансамбля  $N$  невзаимодействующих частиц является суммой их излучений. Интенсивность рассеянного света  $I$  зависит от длины волны падающего света  $\lambda_0$ , интенсивности падающего света  $I_0$ , рассеивающего объема  $\Omega$ , расстояния от рассеивающего объема до приемника  $x$ , поляризуемости молекулы  $\alpha$ , концентрации рассеивающих частиц  $c$  и угла рассеяния  $\theta$ :

$$I'' = \frac{16 * \pi^4}{\lambda_0^4 * x^2} * \alpha^2 * c * \Omega * I_0 * P(\theta) \quad (5)$$

$P(\theta)$ – 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  $\theta$ ), под которым он фиксируется, —  $R_\theta$ . Коэффициент рассеяния  $R_\theta$  может быть получен с помощью отношения Рэлея:

$$R_\theta = \frac{I'' * x^2}{I * \Omega} \quad (6)$$

Подставляя значение избыточного коэффициента рассеяния  $R_\theta$  для угла рассеяния  $\theta = 90$  градусов, определяемое уравнением (6), в уравнение Эйнштейна (3), получаем:

$$R_\theta = K * \frac{c}{\partial(\frac{\pi}{RT})/\partial c} \quad (7)$$

Дебай применил теорию Эйнштейна к разбавленным растворам полимеров. При больших разбавлениях ( $c < 0,5$  г/100 мл) в качестве флуктуаций концентрации можно рассматривать изолированные макромолекулярные клубки, они и являются рассеивающими центрами. Представив величину осмотического давления в виде ряда с вириальными коэффициентами:

$$\frac{\pi}{R_\theta * T} = A_1 + 2 * A_2 * c \quad (8)$$

И учтя, что первый вириальный коэффициент  $A_1$  связан с молекулярной массой полимера соотношением  $A_1 = 1/M_w$ , уравнение (8) можно преобразовать в выражение, называемое уравнением Дебая:

$$\frac{K * c}{R_\theta} = \frac{1}{M_w} + 2 * A_2 * c \quad (9)$$

Учитывая формулу (5) и (9), получим:

$$R_\theta = \frac{16 * \pi^4}{\lambda_0^4} * \alpha^2 * c * P(\theta) \quad (10)$$

Получим уравнение, связывающее молекулярную массу рассеивающих частиц  $M$  с измеряемыми параметрами:

$$R_\theta = K * c * M * P(\theta) \quad (11)$$

**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 (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  $P(\theta) = 1$  [3].

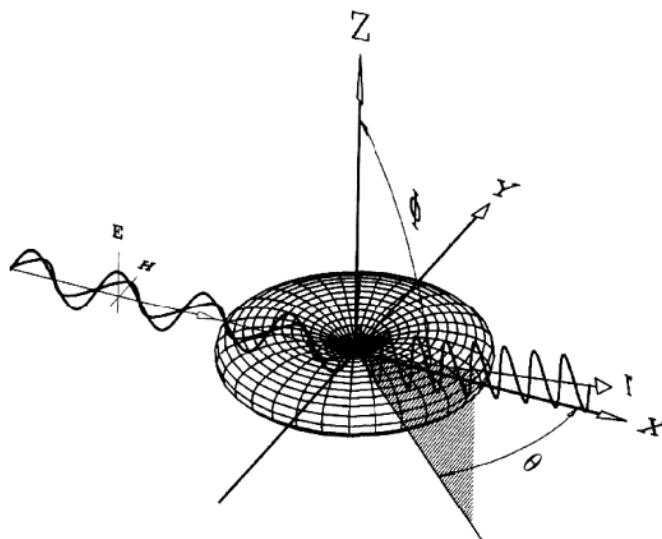


Рис. 10: Схема рассеяния вертикально поляризованного света малой частицей. Распределение интенсивности не зависит от азимутального угла  $\theta$  и зависит от полярного угла  $\Phi$ , где электрическая  $E$  и магнитная  $H$  составляющие электромагнитного поля волны [3]

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  $\theta$ . 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 (рис. 11). 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 (рис. 12). Коэффициент асимметрии больших молекул  $Z > 1$  и возрастает по мере увеличения размера молекул. [53]

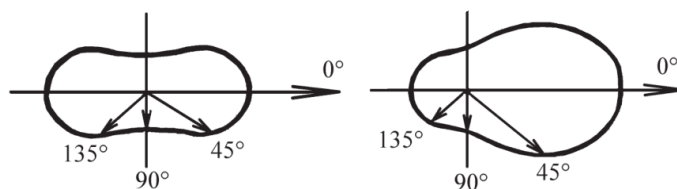


Рис. 11: Индикатрисы светорассеяния растворов малых и больших частиц [53]

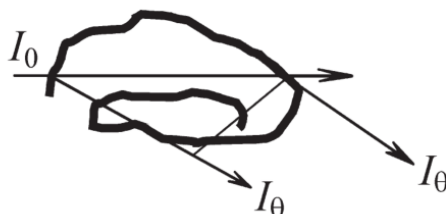


Рис. 12: Рассеяние света большой частицей [53]

При молекулярном рассеянии (рис. 13 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 [54]. Совсем иначе распределяется рассеянный свет вокруг крупной частицы. Прежде всего, теряется симметрия интенсивности рассеянного света, посылаемого вперед и назад. Назад (под углом 180) рассеянный свет почти совсем не направляется (рис. 13 б, в, г, д). На еще более крупных частицах помимо основного максимума появляются дополнительные в виде выступов или лепестков под различными углами рассеяния (рис. 13 е, ж). [54]

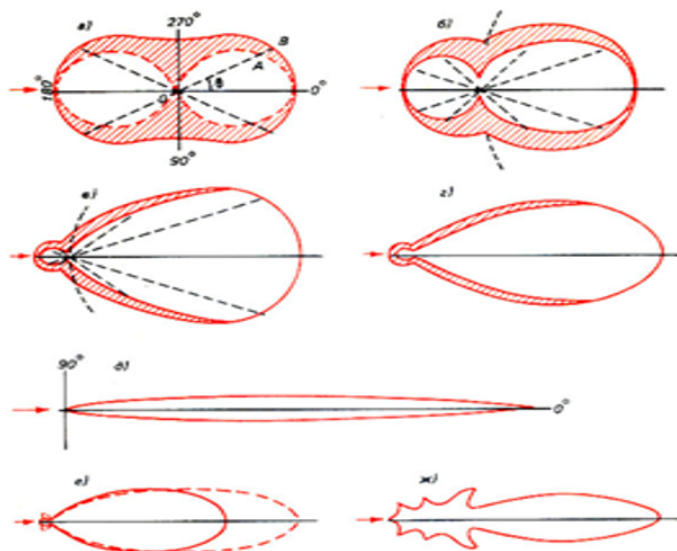


Рис. 13: Индикатрисы рассеяния: а - при молекулярном рассеянии; б - для частиц диаметром, равным  $1/3\lambda$ ; в - для частиц диаметром  $\lambda$ ; г - для частиц диаметром  $3\lambda$ ; д - для частиц диаметром  $40\lambda$ ; е, ж - с дополнительными максимумами [54]

Влияние внутренней интерференции учитывается либо введением в уравнение (11) параметра  $P(\theta)$  — фактора внутренней интерференции, либо экстраполяцией результатов измерения светорассеяния к углу  $\theta = 0$ . В зависимости от размеров рассеивающих частиц, показателей преломления и направления наблюдения интерференция волн может усиливать или ослаблять интенсивность рассеянного света. В случае рэлеевского рассеяния все диполи внутри частицы излучают в одной фазе, поэтому интенсивность рассеянного излучения для всех  $\theta$  совпадает с максимально возможной (при заданном количестве элементарных диполей).

Для более крупных частиц удобно провести нормировку на максимальную интенсивность рассеянного излучения, рассчитываемую по теории Рэля. Эффекты интерференции описываются коэффициентом формы  $P(\theta)$ , введенным ранее:

$$I(\theta) = P(\theta) * I_0 \quad (12)$$

Коэффициент формы всегда меньше либо равен 1. С увеличением размеров частицы интенсивность рассеянного света существенно возрастает, и в то же время изменяется угловое распределение рассеянного света: усиливается рассеяние вперед.

Кроме того, из-за эффектов интерференции на индикатрисе рассеяния возникает множество побочных «лепестков». А зависимость интенсивности рассеяния (под определенным углом) от размера частицы оказывается немонотонной, с множеством осцилляций.



## 5.1 Объекты исследования и подготовка образцов для измерений

**Приготовление исследуемых растворов.** Для приготовления растворов в качестве растворителя использовалась вода для инъекций “Новосибхимфарм”,  $pH = 7$ . Также взвешивание образцов производилось при помощи весов Adventurer Ohaus, погрешность которых составляет 0.01 мг. Для исследования гемоглобина, применялся человеческий гемоглобин фирмы “Sigma” H7379, который представляет собой красный порошок.

Для приготовления растворов гемоглобина в качестве растворителя была выбрана медицинская вода в ампулах для инъекций. Прибором, с помощью которого можно достаточно точно добавить или забрать определённое количество вещества из пробирки, является механический дозатор. В нашем эксперименте использовались дозаторы Biohit Proline. Их погрешность не превышает четырёх процентов. Все измерения производились при комнатной температуре.

Для удобства приготовления исследуемых систем и во избежание повреждения структуры белка, растворы готовились последовательно в несколько этапов:

1. Приготовление начального раствора гемоглобина с начальной концентрацией  $c_0 = 10$  мг/мл.
2. Приготовление раствора с концентрацией  $c_1 = 0.05$  мг/мл: количество гемоглобина и воды рассчитывалось из уравнения:  $c_0 * V_1 = c_1 * V_0$ .  
Тогда:  $c_1 = c_0 * V_1 / V_0$ ,  $V_1 = 0.025$  мл
3. В воду добавлялся раствор с концентрацией  $c_1$  и объемом  $V_1$ .
4. Далее раствор помещался в ультразвуковой прибор на 480 секунд для перемешивания гемоглобина с водой.
5. Колба с готовым раствором протиралась спиртом для обработки от пыли и грязи.
6. Приготовленный образец помещался в кюветное отделение спектрометра и запускалась программа Photocor.
7. Для того, чтобы получить концентрации:  $c_1 = 0.05$ ,  $c_2 = 0.15$ ,  $c_3 = 0.25$ ,  $c_4 = 0.35$ , добавлялся раствор гемоглобина 10 мг/мл и шагом 50 мкл. Каждая концентрация гемоглобина не хранилась больше 4 дней.

## 5.2 Описание оборудования

**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 коэффициент трансляционной диффузии, размер дисперсных частиц, молекулярный вес рассеивающих частиц, второй вириальный коэффициент (рис. 14).

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.

Обработка сигнала, длительность и число выборок устанавливается экспериментатором. Обработка сигнала включает в себя построение и усреднение автокорреляционных функций, а далее решение обратной задачи – определение коэффициентов диффузии и гидродинамических радиусов рассеивающих частиц. При решении обратной задачи используется метод регуляризации Тихонова для интегральных уравнений [55].



Рис. 14: Спектрометр Photocor Complex [55]

**Коррелятор Photocor-FC.** Коррелятор Photocor-FC предназначен для измерения в реальном времени авто- и кросскорреляционных функций. Алгоритм работы коррелятора соответствует математическому определению временной корреляционной функции (рис. 15).

Photocor-FC выполнен по технологии программируемой логики (flex-logic). Это позволяет изменять структуру и алгоритм работы прибора только программным путем, без физического изменения монтажной схемы. Всего имеется две конфигурации коррелятора: логарифмический (multiple-tau) и линейный.

Коррелятор Photocor-FC - это устройство, которое работает независимо от компьютера и не использует вычислительные мощности компьютера. Компьютер используется на этапе обработки измеренных корреляционных функций.

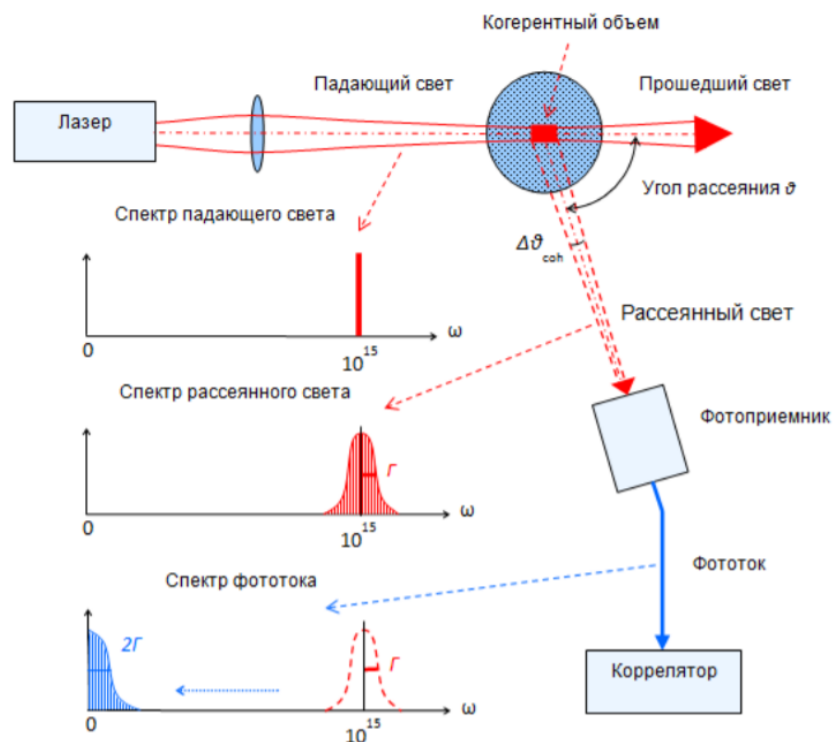


Рис. 15: Схема экспериментальной установки Photocor Complex [55]

**Система счета фотонов Photocor-PC.** Photocor-PC состоит из блока счета фотонов и блока питания. Блок счета фотонов содержит приемную оптическую систему, фотоумножитель, работающий в режиме счета фотонов, и усилитель-дискриминатор. Блок питания обеспечивает высокое напряжение 1 кВ для питания фотоумножителя, с высокой стабильностью и низким уровнем пульсаций, а также напряжение питания 5 В для усилителя-дискриминатора. Имеются две модели системы счета фотонов. В данной работе была использована вторая.

Photocor-PC1: Автокорреляционная система с одним фотоумножителем для обычных измерений.

Photocor-PC2: Кросскорреляционная система с двумя фотоумножителями с полным отсутствием после импульсов для повышения точности измерения размеров наночастиц в диапазоне 1 – 10 нм.

### 5.3 Экспериментальные данные

В ходе экспериментальной работы на Спектрометре Photocor Complex были получены:

- 1) Интенсивности при концентрациях  $c_1 = 0.05$  мг/мл,  $c_2 = 0.15$  мг/мл,  $c_3 = 0.25$  мг/мл,  $c_4 = 0.35$  мг/мл 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 рассеяния 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 (рис. 16):

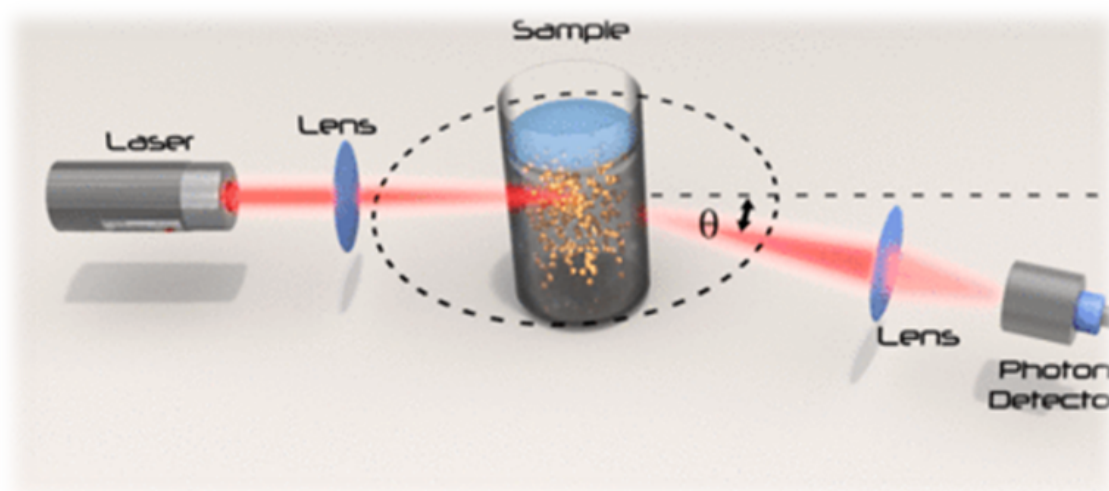


Рис. 16: Падение лазера на рассеивающий объем [56]

**Обработка полученных данных.** С помощью программы Excel данные были форматированы в удобный для расчета вид. В программе Origin были рассчитаны:

- 1) Средние значения интенсивности ( $I$ ) для углов 60-130 градусов для исследуемых концентраций.
- 2) Средние значения интенсивности воды ( $I_{water}$ ) для углов 60-130 градусов.
- 3) Средние значения интенсивности бензола ( $I_{benzol}$ ) при угле 90 градусов.
- 4) Средние значения ( $I_{darkcurrent}$ ) темнового тока.

## 5.4 Построение графиков

С помощью программы Origin были построены графики:

1) Интенсивности рассеянного света ( $I$ ) от угла  $\theta$  для концентраций  $c_1 = 0.05$  мг/мл (рис. 17),  $c_2 = 0.15$  мг/мл (рис. 18),  $c_3 = 0.25$  мг/мл (рис. 19),  $c_4 = 0.35$  мг/мл (рис. 20).

Результаты всех выше перечисленных экспериментов представлены на одном графике для сравнения (рис. 21).

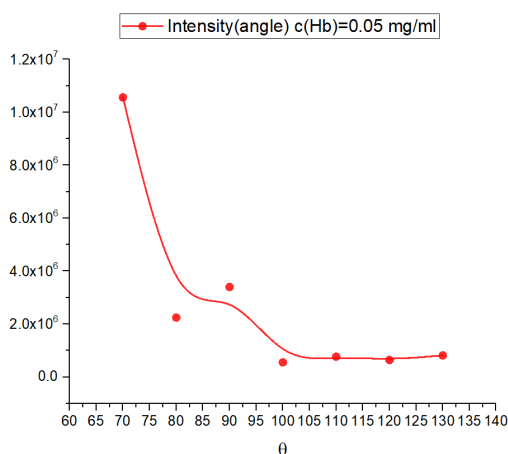


Рис. 17: Интенсивности рассеянного света ( $I$ ) от угла  $\theta$ ,  $c_1 = 0.05$

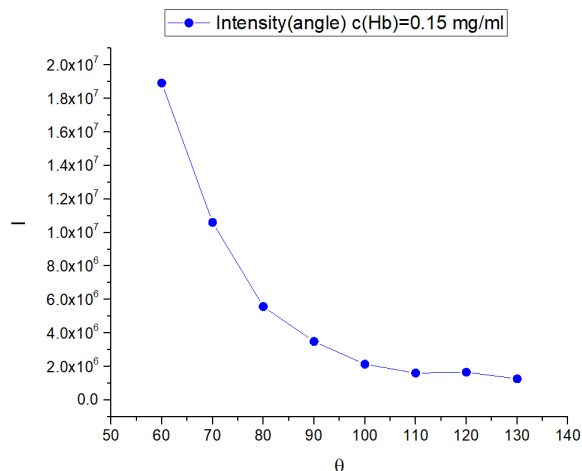


Рис. 18: Интенсивности рассеянного света ( $I$ ) от угла  $\theta$ ,  $c_2 = 0.15$

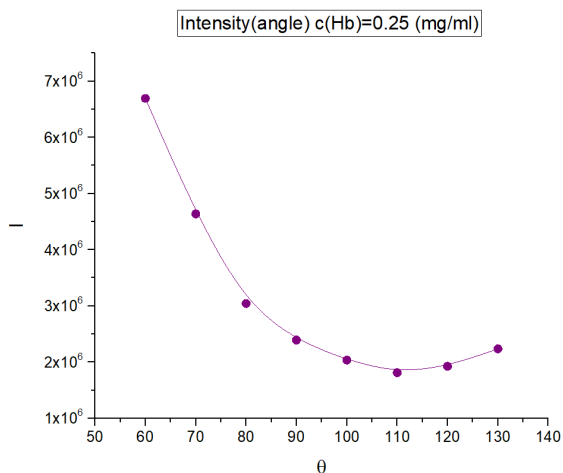


Рис. 19: Интенсивности рассеянного света ( $I$ ) от угла  $\theta$ ,  $c_3 = 0.25$

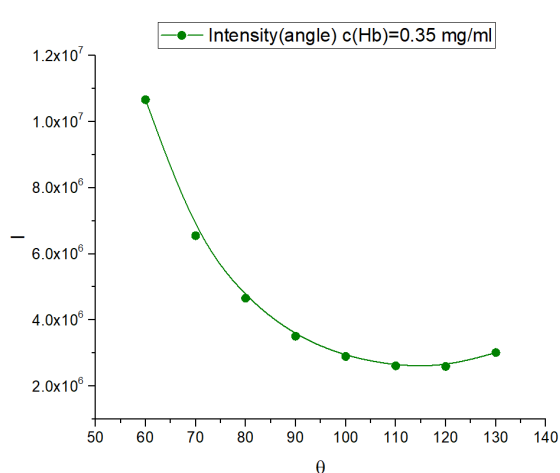


Рис. 20: Интенсивности рассеянного света ( $I$ ) от угла  $\theta$ ,  $c_4 = 0.35$

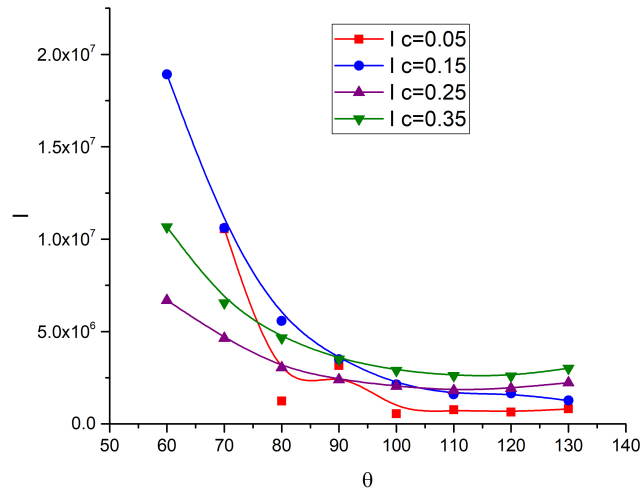


Рис. 21: Зависимость интенсивности ( $I$ ) от угла  $\theta$  при различных концентрациях

Похожие графики интенсивности от угла можно найти у И.Л. Фабелинского [57] для света, рассеянного на поверхности метилового спирта (рис. 22). Сплошная кривая - теоретическая. Кружками отмечены экспериментальные данные.

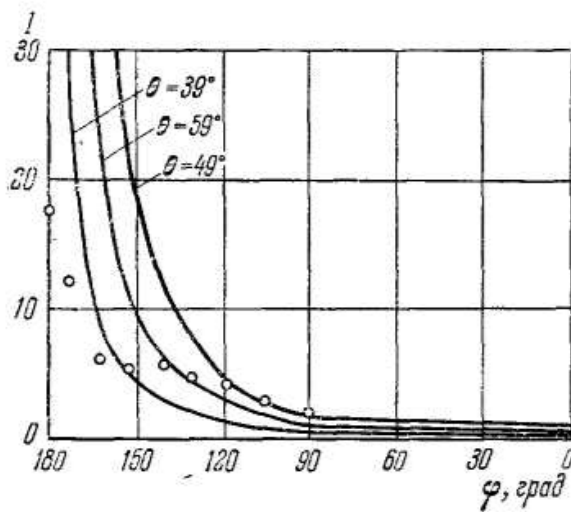


Рис. 22: Зависимость интенсивности (в условных единицах) света от угла при трех различных концентрациях [57]

Полученные экспериментальные кривые (рис. 21) имеют схожий вид с литературными данными (рис. 22). По графикам видно, что при увеличении угла интенсивность рассеянного света уменьшается.

2) Интенсивности рассеянного света ( $I$ ) от угла  $\theta$  для концентраций  $c_1 = 0.05$  мг/мл (рис. 23),  $c_2 = 0.15$  мг/мл (рис. 24),  $c_3 = 0.25$  мг/мл (рис. 25),  $c_4 = 0.35$  мг/мл (рис. 25) в полярных координатах при симметричном отображении угла.

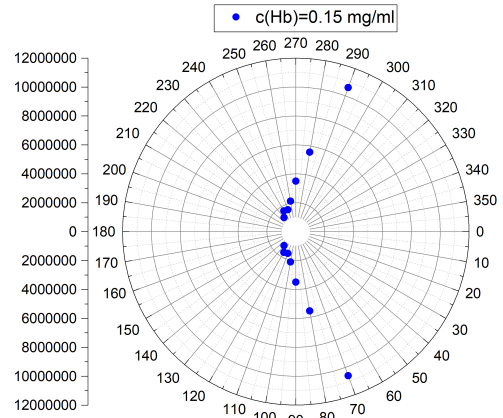
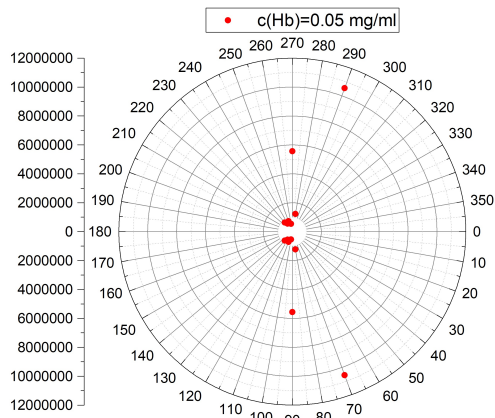


Рис. 23: Интенсивности рассеянного света ( $I$ ) от угла  $\theta$ ,  $c_1 = 0.005$

Рис. 24: Интенсивности рассеянного света ( $I$ ) от угла  $\theta$ ,  $c_2 = 0.15$

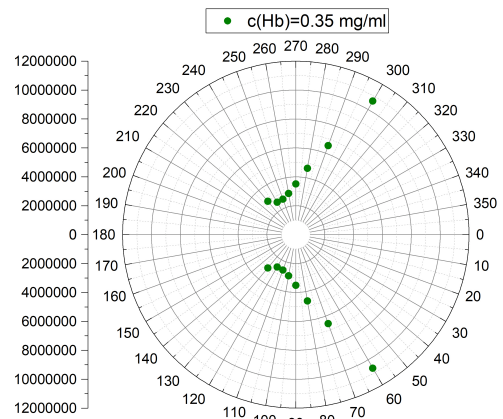
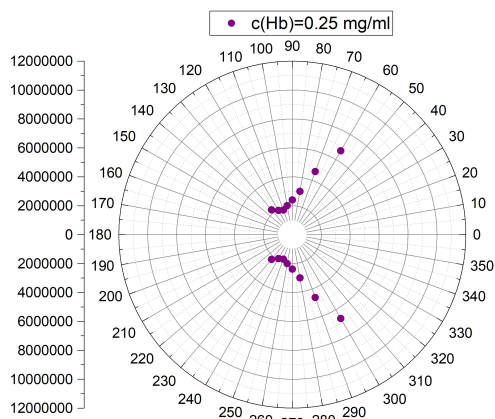


Рис. 25: Интенсивности рассеянного света ( $I$ ) от угла  $\theta$ ,  $c_3 = 0.25$

Рис. 26: Интенсивности рассеянного света ( $I$ ) от угла  $\theta$ ,  $c_4 = 0.35$

*Из графиков (рис. 23) - (рис. 26) можно сделать вывод, что вид индикатрисы рассеяния меняется. Так как теряется симметрия интенсивности рассеянного света, посылаемого вперед и назад. По мере укрупнения частицы основное количество рассеянного света направляется узким "язычком" вперед в направлении падения света, т. е. сконцентрировано в области малых углов рассеяния, близких к направлению 0 градусов.*

## 5.5 Методы обработки экспериментальных данных

Для получения полезной информации о гемоглобине, а именно – размерах и форме, необходимо было получить значения интенсивности рассеянного света при различных углах в водных растворах гемоглобина. Такие значения были получены при углах: 60-130 градусов. Дальнейшая обработка данных проводилась с помощью метода Дебая, метода асимметрии и метода Зимма. По экспериментальным данным были построены полярные диаграммы рассеяния интенсивности света для разных случаев.

## 5.6 Метод Дебая

Метод Дебая позволяет определить значение средневзвешенной молекулярной массы полимера  $M_W$  и второй вириальный коэффициент  $A_2$ , который учитывает отклонение полимерного раствора от идеального поведения. Достаточно провести измерения рассеяния света растворителя и растворов разных концентраций только под одним углом 90 градусов.  $M_W$  можно рассчитать по уравнению Дебая (8). Для расчёта оптической постоянной раствора  $K$  уравнение (3) использовались данные из таблицы 1.

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

Таблица 1: Данные для расчёта оптической постоянной раствора  $K$

С помощью данных, представленных в таблице 1 был посчитан коэффициент  $K$  для разных концентраций.

Для расчета  $R_{90}$  при разных концентрациях использовались интенсивности рассеянного света растворами 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  $R_b = 12,64 * 10^{-6}$  см<sup>-1</sup> при длине волны 6328 Å [58]).
3. Интенсивность темного тока (интенсивность фона)  $I_T$ .

Эти данные позволили перейти к коэффициенту рассеяния:

$$R_{90} = \frac{I - I_W}{I_B - I_T} \quad (13)$$

На рисунке 27 представлен пример концентрационной зависимости параметра рассеяния  $cK/R_{90}$  в водном растворе гемоглобина [53], где тангенс угла наклона позволяет оценить второй вириальный коэффициент  $A_2$ , также определить величину  $1/M$ .



| $c$ г/л                | $c_1 = 0.05$        | $c_2 = 0.15$       | $c_3 = 0.25$        | $c_4 = 0.35$        |
|------------------------|---------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| $R_{90}$               | 344.96              | 216.44             | 148.17              | 217.22              |
| $\frac{c * K}{R_{90}}$ | $2.30464 * 10^{-5}$ | $1.1019 * 10^{-4}$ | $2.68267 * 10^{-4}$ | $2.56186 * 10^{-4}$ |

Таблица 2: Данные для расчёта молекулярной массы

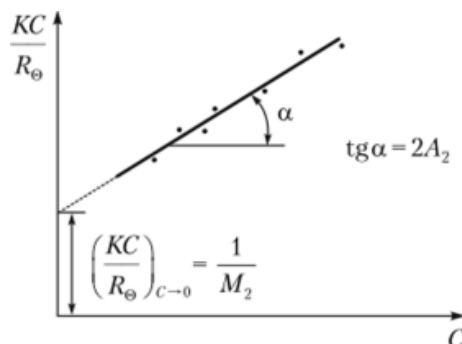


Рис. 27: Пример концентрационной зависимости параметра рассеяния в водном растворе гемоглобина [53]

С помощью программы Origin был построен график  $cK/R_{90}$  от концентрации методом наименьших квадратов (МНК) (рис. 28). 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 (табл. 2). А так же по графику зависимости  $\frac{c * K}{R_{90}}(c)$  определялась величина  $1/M$  (рис. 26) и второй вириальный коэффициент  $A_2$ .

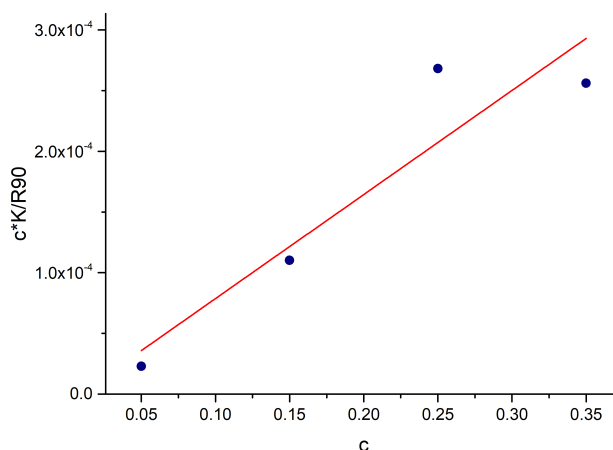


Рис. 28: Концентрационная зависимость параметра рассеяния  $cK/R_{90}$  в водном растворе гемоглобина, построенная с помощью МНК

*Вывод: с помощью экстраполяции к  $c = 0$  получено: значение обратной массы  $1/M = 1.49 * 10^{-5}$  моль/г.*

*Данное значение эффективной массы молекулы гемоглобина  $M_W = 67114.09 \pm 8474.57$  г/моль близко к литературному значению [59]:  $M = 64500$  г/моль.*

*Расчитанно значение второго вириального коэффициента  $A_2 = (4.15 \pm 0.41) * 10^{-4}$  моль \* см<sup>3</sup>/г<sup>2</sup>.*

## 5.7 Метод асимметрии

Для расчета коэффициента асимметрии использовались значения интенсивности для углов симметричных относительно 90 градусов.

$$Z = (I_{\theta})/I_{(180-\theta)}_{c=0} \quad (14)$$

С помощью коэффициента асимметрии можно определить форму и относительные размеры рассеивающей частицы [29].

Интенсивность рассеянного света при этом имеет следующий вид:

$$I_{\theta} = K * c * M_W * P(\theta) \quad (15)$$

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

$$M_W = \left(\frac{c * K}{R_{90}}\right)^{-1} * P^{-1}(\theta) \quad (16)$$

Полученную графической экстраполяцией величину называют кажущимся молекулярным весом.

В таблице представлены значения коэффициента асимметрии, фактора межмолекулярной интерференции от формы белка и относительных размеров:

| $D/\lambda$ | Палочки [31] |                      | Клубки [31] |                      | Сферы [32] |                      |
|-------------|--------------|----------------------|-------------|----------------------|------------|----------------------|
|             | $ z $        | $P_v^{-1}(90^\circ)$ | $ z $       | $P_v^{-1}(90^\circ)$ | $ z $      | $P_v^{-1}(90^\circ)$ |
| 0,05        | 1,006        | 1,006                | 1,014       | 1,012                |            |                      |
| 0,10        | 1,032        | 1,023                | 1,065       | 1,045                | 1,058      | 1,040                |
| 0,15        | 1,070        | 1,050                | 1,135       | 1,103                |            |                      |
| 0,20        | 1,127        | 1,089                | 1,257       | 1,183                | 1,257      | 1,173                |
| 0,25        | 1,210        | 1,144                | 1,410       | 1,290                |            |                      |
| 0,30        | 1,279        | 1,207                | 1,585       | 1,434                | 1,700      | 1,440                |
| 0,35        | 1,372        | 1,288                | 1,790       | 1,612                |            |                      |
| 0,40        | 1,495        | 1,377                | 2,020       | 1,809                | 2,692      | 1,941                |
| 0,45        | 1,620        | 1,486                | 2,283       | 2,049                |            |                      |
| 0,50        | 1,753        | 1,608                | 2,534       | 2,320                | 5,292      | 2,912                |
| 0,55        | 1,895        | 1,744                | 2,796       | 2,660                |            |                      |
| 0,60        | 1,971        | 1,860                | 3,060       | 2,982                |            |                      |
| 0,65        | 2,058        | 2,010                | 3,303       | 3,413                |            |                      |
| 0,70        | 2,106        | 2,193                | 3,521       | 3,814                |            |                      |
| 0,75        | 2,160        | 2,361                | 3,745       | 4,348                |            |                      |
| 0,80        | 2,200        | 2,500                | 3,915       | 4,776                |            |                      |

Рис. 29: Характеристическая асимметрия  $Z$ , фактор  $P^{-1}(90)$  и относительные размеры  $D/\lambda$  для частиц различной структуры [29]

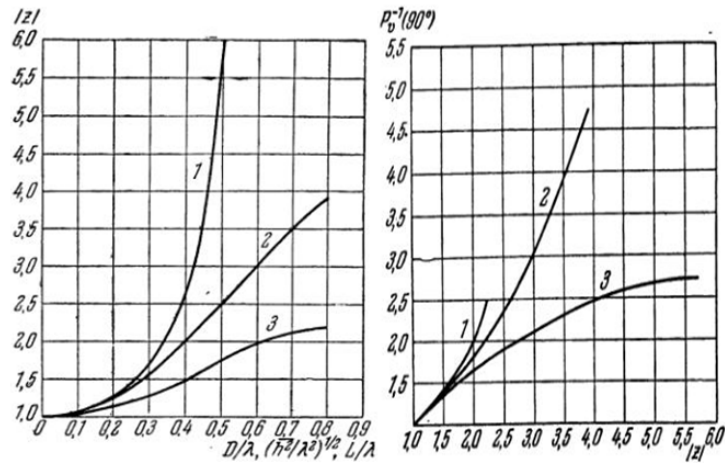


Рис. 30: Зависимость характеристической асимметрии  $Z$ , фактора  $P^{-1}(90)$  и относительных размеров  $D/\lambda$  для частиц различной структуры: 1-сфера, 2-клубок, 3-стрежень [29]

Обработка полученных данных:

Интенсивности рассеянного света ( $I$ ) от угла  $\theta$  для концентраций  $c_1 = 0.05$  мг/мл (рис. 31),  $c_2 = 0.15$  мг/мл (рис. 32),  $c_3 = 0.25$  мг/мл (рис. 33),  $c_4 = 0.35$  мг/мл (рис. 34) в полярных координатах. С помощью графиков были определены коэффициент асимметрии  $Z$ .

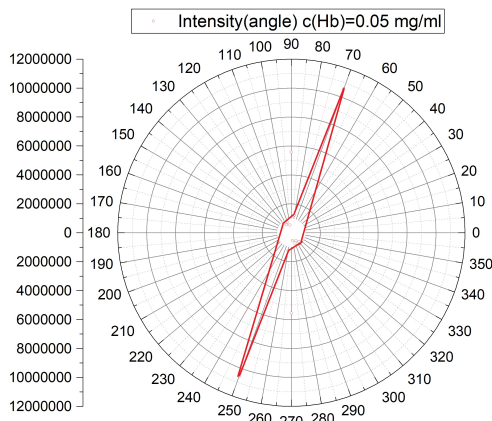


Рис. 31: Интенсивности рассеянного света ( $I$ ) от угла  $\theta$ ,  $c_1 = 0.05$

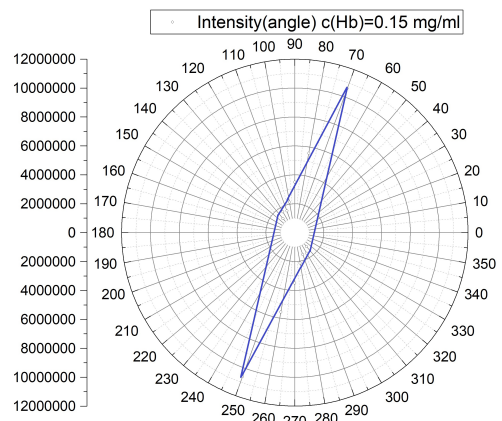


Рис. 32: Интенсивности рассеянного света ( $I$ ) от угла  $\theta$ ,  $c_2 = 0.15$

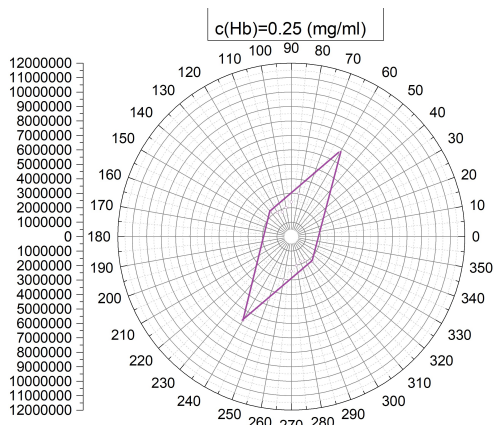


Рис. 33: Интенсивности рассеянного света ( $I$ ) от угла  $\theta$ ,  $c_3 = 0.25$

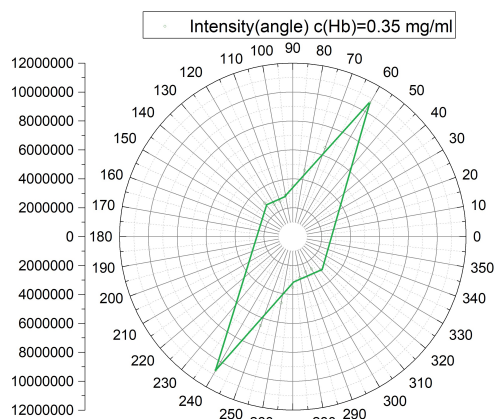


Рис. 34: Интенсивности рассеянного света ( $I$ ) от угла  $\theta$ ,  $c_4 = 0.35$

Используя уравнение (14) построен график  $R(\theta)$  от  $c \cdot K \cdot P(\theta)$  с помощью метода МНК в Excel. Тангенс наклона графика определяет молекулярную массу частиц гемоглобина. Средняя масса  $M_W$  определенная данным методом составляет 67644 г/моль.

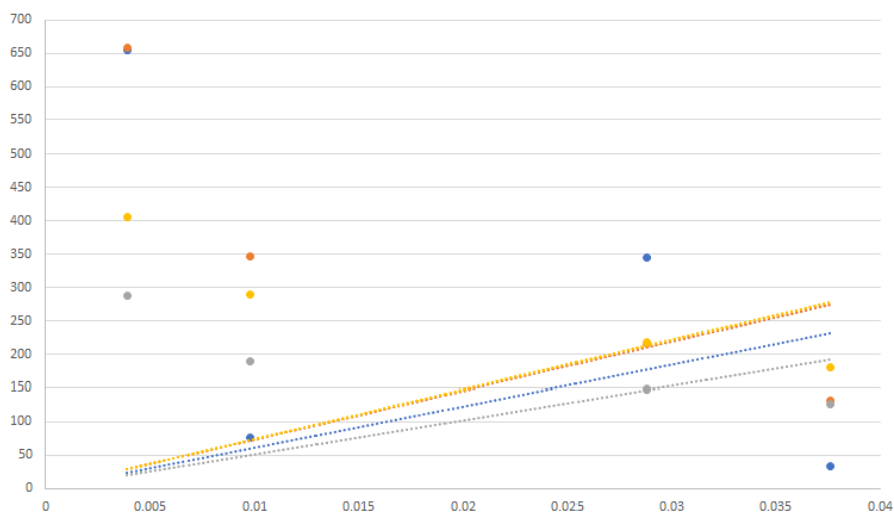


Рис. 35: График зависимости  $R(\theta)$  от  $c \cdot K \cdot P(\theta)$ . По оси ординат  $R(\theta)$ , по оси абсцисс  $c \cdot K \cdot P(\theta)$  при разных концентрациях

В таблице 3 представлены значения полученные с помощью графиков (рис. 31 - рис. 34):

| c                   | $c_1 = 0.05$ | $c_2 = 0.15$ | $c_3 = 0.25$ | $c_4 = 0.35$ |
|---------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Z                   | 2.27         | 2.61         | 1.49         | 1.61         |
| $P^{-1}$            | 2.05         | 2.44         | 1.38         | 1.48         |
| $\frac{D}{\lambda}$ | 0.45         | 0.50         | 0.40         | 0.45         |
| Форма               | клубки       | клубки       | палочки      | палочки      |

Таблица 3: Данные полученные с помощью метода асимметрии

В таблице 4 представлены молекулярные массы рассеивающих частиц полученные с помощью графика зависимости  $R(\theta)$  от  $c^*K^*P(\theta)$ :

| c | $c_1 = 0.05$ | $c_2 = 0.15$ | $c_3 = 0.25$ | $c_4 = 0.35$ |
|---|--------------|--------------|--------------|--------------|
| M | 72861        | 73961        | 50894        | 72861        |

Таблица 4: Данные полученные с помощью графика зависимости  $R(\theta)$  от  $c^*K^*P(\theta)$

*Вывод: полученные молекулярные массы гемоглобина хорошо согласуются с литературными данными [59]. Средняя масса составила  $M_{middle} = 67644.25 \pm 6564.40$  г/моль.*

*Полученные значения размеров рассеивающих частиц отличаются в большую сторону, в зависимости от концентрации. Вероятно, структура молекулы гемоглобина перешла из четвертичной структуры в третичную, во вторичную или в первичную, из-за чего длина молекулы увеличилась.*

## 5.8 Метод Зимма

Цель работы: определить значение средневзвешенной молекулярной массы полимера  $M_W$ , размер рассеивающих свет частиц, используя метод Зимма. Если размеры рассеивающих свет частиц, содержащихся в растворе, превышают  $\lambda / 20$ , то разность фаз лучей, рассеянных от разных точек частицы, становится значительной (см. рис. 12). Разность фаз рассеянных лучей, а, следовательно, и их интенсивность зависят от угла рассеяния  $\theta$ .

В направлении падающего пучка разности фаз нет, интерференция этих лучей для угла  $\theta = 0$  градусов отсутствует. На этом основан метод Зимма для расчета больших частиц. Этот метод получил название метода двойной экстраполяции [53].

Асимметрия рассеяния тем больше, чем больше размер макромолекул, поэтому угловая зависимость интенсивности рассеянного света в растворах больших частиц дает возможность определить их радиус инерции ( $R_g$ ). В этом случае  $P(\theta) \neq 1$  и основное уравнение светорассеяния называется уравнением Дебая-Зимма и выглядит следующим образом.

$$\frac{K * c}{R_\theta} = \frac{1}{M_W} \left( 1 + \frac{16\pi^2 * n_0^2}{3 * \lambda_0^2} * R_g^2 * \sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right) \right) + 2A_2 * c \quad (17)$$

Для нахождения молекулярной массы и радиуса инерции используют метод двойной экстраполяции, или построение диаграммы Зимма. Готовят серию растворов разной концентрации, и для каждого раствора измеряют интенсивность рассеяния под разными углами. А затем строят график зависимости величины  $\frac{K * c}{R_\theta}$  от сложного аргумента  $\sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right) + k * c$ . Постоянная  $k$  выбирается исходя из удобства построения графика, называемого диаграммой Зимма, таким образом, что  $kc = 1$ .

На диаграмме линия с большим наклоном отражает зависимость  $\frac{K * c}{R_\theta}$  от для определенного постоянного угла рассеяния. Экстраполяцией таких линий до пересечения с соответствующей величиной абсциссы  $\sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right)$  при  $c = 0$  получают ряд точек, отражающих зависимость  $\frac{K * c}{R_\theta}$  от  $\sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right)$  при  $c = 0$ .

Линия с небольшим наклоном (угол  $\beta$  на рис. 36) отражает зависимость  $\frac{K * c}{R_\theta}$  от  $\sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right)$  для определенной постоянной концентрации  $c$ . Путем экстраполяции этих линий до пересечения с линией, абсцисса которой равна  $kc$  при  $\theta = 0$ , получают ряд точек. Отражающих зависимость  $\frac{K * c}{R_\theta} = f(c)$  от  $\sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right) = 0$ .

Начальная ордината  $\frac{K * c}{R_\theta} \Big|_{c=0}^{\theta=0}$  получается как точка пересечения двух экстраполяционных кривых ( $c = 0$  и  $\theta = 0$ ) и определяет истинное значение молекулярной массы полимера:

$$M_W = \left( \frac{K * c}{R_\theta} \right)^{-1}, c = 0, \theta = 0 \quad (18)$$

Согласно уравнению (17), тангенс угла наклона  $\alpha$  связан с величиной второго вириального коэффициента  $\text{tg } \alpha = 2 * A_2$ . Начальный наклон кривой  $\frac{K * c}{R_\theta} \Big|_{c=0}$  графика двойной экстраполяции (угол  $\beta$ ) определяет среднеквадратичный радиус инерции частиц  $(R_g^2)^{1/2}$  рассчитываемый из уравнения:

$$R_g^2 = \frac{3 * \lambda^2}{16 * \pi^2} * M_W * \text{tg } \beta \quad (19)$$

Этот параметр связан со среднеквадратичным расстоянием между концами полимерной цепи клубка простым соотношением:

$$R_g^2 = \frac{h^2}{6} \quad (20)$$

Подчеркнем, что средние размеры, определяемые методом светорассеяния, являются абсолютными и не зависят от модельных представлений о строении частиц. Таким образом, с помощью метода светорассеяния кроме абсолютного определения молекулярной массы полимеров можно измерять и абсолютные средние размеры макромолекул в растворе.

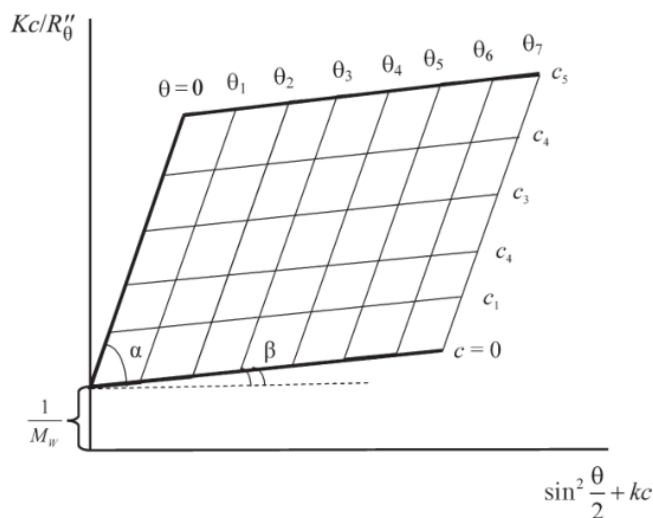


Рис. 36: диаграмма Зимма [53]

В программе Excel с помощью МНК была построена диаграмма Зимма зависимости величины  $\frac{K * c}{R_\theta}$  от сложного аргумента  $\sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right) + k * c$  для 4 концентраций (рис. 37).

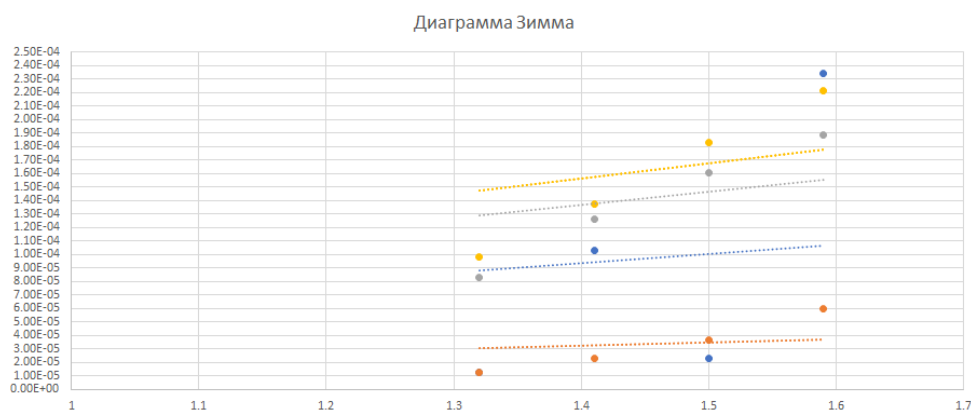


Рис. 37: График Зимма, построенный по данным светорассеяния для растворов гемоглобина; по оси ординат  $\frac{K * c}{R_\theta}$ , по оси абсцисс  $\sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right) + k * c$ . Точки - экспериментальные данные

По графику была определена молекулярная масса гемоглобина  $M_W = 65000 \pm 5850$  г/моль, через  $\text{tg}(\beta)$  радиус инерции рассеивающих частиц  $R_g = 103.28 \pm 20.67$  нм .

*Вывод: Молекулярная масса гемоглобина  $M_W = 65000 \pm 5850$  г/моль близка к литературному значению:  $M = 64500$  г/моль, радиус инерции частиц  $R_g = 103.28 \pm 20.67$  нм не соответствует литературному значению  $R = 3,4$  нм [59]. Предполагается, что молекулы белка взаимодействуют между собой и образуют вытянутую структуру, напоминающую по форме палочку, что может быть связано с процессом тромбообразования в организме человека. У молекулы белка гемоглобина наблюдается такая тенденция показанная в статье [60].*

## 5.9 Результаты экспериментального исследования водных растворов гемоглобина методами статического светорассеяния

Приведена сравнительная таблица с полученными данными (таблица 5), рассчитанными тремя методами:

| Метод            | Молекулярная масса гемоглобина | Дополнительные данные   |
|------------------|--------------------------------|---|
| Метод Дебая      | $67114.09 \pm 8474.57$ г/моль  | $A_2 = 4.5 * 10^{-4} \pm 4.15 * 10^{-5}$ моль*см <sup>3</sup> /г <sup>2</sup> |
| Метод асимметрии | $67644 \pm 6564.40$ г/моль     | $R_g = 145.58$ нм   |
| Метод Зимма      | $65000 \pm 5850$ г/моль        | $R_g = 103.28 \pm 20.67$ нм   |

Таблица 5: Данные полученные с помощью метода асимметрии

*Вывод: молекулярная масса гемоглобина, рассчитанная методом Дебая, методом асимметрии и методом Зимма близка к литературному значению. Размер рассеивающей частицы больше примерно в 15 раз. Данные результатов, рассчитанных методом асимметрии показывают, что форма молекулы гемоглобина изменилась от клубка к палочке. Данные посчитанные методом Зимма не противоречат изменению формы гемоглобина.*



## 6 ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

В данной работе исследовался гемоглобин в водном растворе при разных углах при увеличении концентрации.

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:*

1) Получено значение эффективной массы молекулы гемоглобина  $M = 67114.09 \pm 8474.57$  г/моль, которое близко к литературному значению:  $M = 64500$  г/моль.

2) Получено значение второго вириального коэффициента  $A_2 = (4.15 \pm 0.41) * 10^{-4}$  моль\*см<sup>3</sup>/г<sup>2</sup>. Положительное значение второго вириального коэффициента означает, наблюдается высокое сродство растворителя к белковому полимеру. Клубок разворачивается.

*С помощью метода асимметрии:*

1) Построены графики в полярных координатах интенсивности рассеянного света от угла при различных концентрациях для определения коэффициента асимметрии.

2) Получено значение коэффициента асимметрии  $Z$ .

3) Получено значение коэффициента фактора внутримолекулярной интерференции  $P(\theta)$ .

4) Посчитана средняя масса рассеивающих частиц, которая составила  $M_{middle} = 67644.25 \pm 6564.40$  г/моль.

5) Относительные размеры молекулы гемоглобина  $\frac{D}{\lambda}$ .

С помощью полученных величин исследованы размеры молекулы гемоглобина, из чего сделан вывод о его форме: при переходе концентраций от более низких к более высоким форма белка гемоглобина переходит от клубка к палочке. Вероятно, четверичная структура белка меняется.

Данное явление может быть объяснено тем, что силу плохой растворимости в воде свободный гем не способен к транспорту кислорода, а значит гемоглобин теряет свою основную функцию. Окисление железа гема происходит в том случае, если две молекулы гема взаимодействуют с молекулой кислорода. Связывание гема с белком (глобином) в молекуле гемоглобина предотвращает такое взаимодействие и сохраняет железо в двухвалентной форме.

*С помощью обработки данных методом Зимма:*

1) Получено значение эффективной массы молекулы гемоглобина  $M_W = 65000 \pm 5850$  г/моль.

2) Рассчитано значение радиуса инерции частиц гемоглобина  $R_g = 103.28 \pm 20.67$  нм.

Исходя из данных, полученных тремя методами можно сделать вывод о том, что данные методы подходят для определения рассеивающей массы частиц меньших длины волны излучателя. Данные, полученные методом Зимма, лучше всего сходятся с литературными данными, с учетом погрешности, так как размеры рассеивающих свет частиц, содержащихся в растворе, превышают  $\lambda / 20$ .

Большие размеры рассеивающих частиц, полученные данными методами можно объяснить тем, что диссоциация гемоглобина представляет обратимый динамический процесс, равновесие которого зависит от концентрации белка. При высокой концентрации гемоглобина (физиологические условия, которые не были использованы в работе) равновесие сильно сдвинуто в сторону образования тетрамера, так как субъединицы НЬ, имеют высокое сродство друг к другу. Поэтому при нормальных условиях концентрация мономеров относительно мала или они вообще отсутствуют. При малых концентрациях гемоглобина (ниже физиологических) равновесие смещается в сторону образования димеров и в меньшей степени мономеров [61]. Так как наиболее прочные межмолекулярные взаимодействия наблюдаются между  $\alpha_1 - \beta_1$  и  $\alpha_2 - \beta_2$  — глобулами (см. четверичную структуру НЬ), в молекуле гемоглобина выделяются димеры  $\alpha_1 - \beta_1$  и  $\alpha_2 - \beta_2$ .

Данные результаты требуют проведения дополнительного эксперимента.

## 7 СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

### Список литературы

1. Г.Г. Гончаренко, А.А. Сурков, А.Н. Лысенко; Генная инженерия: практическое руководство к выполнению лабораторных работ / М-во образования Республики Беларусь, Гомельский гос. ун-т им. Ф. Скорины. – Гомель: ГГУ им. Ф.Скорины, 2012. – 48 с.
2. <https://www.rcsb.org/3d-view/1A3N/0>.
3. Методы статического и динамического рассеяния света для исследования наночастиц и макромолекул в растворах. Учебно-методическое пособие / сост.: К. В. Бочаров, Н. И. Марукович, А. Ю. Куксин. – М.: МФТИ, 2016. – 40 с.
4. Кидалов В. Н., Сясин Н. И., Хадарцев А. А. К вопросу о физиологической значимости изменений формы, ультраструктуры и флуоресценции эритроцитов периферической крови, трансформирующихся в эхиноциты. Вестн. новых мед. технологий 2005; XII (2): 6–9.
5. Ионов Б. В., Чернух А. М. Морфологическая характеристика эритроцитов артериальной и венозной крови крысы по данным сканирующей электронной микроскопии. Бюл. эксперим. биологии и медицины 1981; 12: 749–752.
6. Tahir Bashir, Mandar Patgaonkar, Selvaa Kumar C, Achhelal Pasi, and Kudumula Venkata Rami Reddy.
7. Stuklov N.I., Iron deficiency syndromes associated with diseases of the gastrointestinal tract: prospects for treatment // People's Friendship University of Russia, 117198, Moscow, Russia, 2016.
8. Ленинджер А. Основы биохимии: В 3-х т. Т. 1. Пер. с англ.-М.: Мир, 1985.-367 с.
9. Ribeil JA, Hacein-Bey-Abina S, Payen E, et al. . Gene therapy in a patient with sickle cell disease. N Engl J Med. 2017. March 2;376(9):848-855. doi: 10.1056/NEJMoa1609677.
10. Ochsner J. Sickle Cell Disease: Advances in Treatment // 2018 Winter; 18(4): 377–389.
11. H. Janssona and J. Swenson Dynamical changes of hemoglobin and its surrounding water during thermal denaturation as studied by quasielastic neutron scattering and temperature modulated differential scanning calorimetry.
12. Cornelia L, Susann B, Cornelia H. Human hemoglobin-derived peptides exhibit antimicrobial activity. J Chromatogr, 2003; 791: 345–56.
13. Patgaonkar MS, Aranha CC, Bhonde G, Reddy KVR. Identification and characterization of anti-microbial peptides from rabbit. Vet Immunol Immunopathol/ 2011a; 139:176–186. 10.1016/j.vetimm.2010.10.012.
14. Mak P. Hemocidins: a functional and structural context of human antimicrobial peptides. Frontiers in Biosciences, 2008; 13: 6859–71.
15. Du R, Ho B, Ding JL. Rapid reprogramming of hemoglobin structure-function exposes multiple dual-antimicrobial potencies. The EMBO J., 2010; 29: 632–42. 10.1038/emboj.2009.380.
16. Dassen H, Kamps R, Punyadeera C, Dijcks F, deGoeij A, Ederveen A, et al. Hemoglobin expression in human endometrium. Human Reprod, 2008; 23: 635–41. 10.1093/humrep/dem430.
17. Deng L, Pan X, Wang Y, Wang L, Zhou XE, Li M, et al. Hemoglobin and its derived peptides may play a role in the antibacterial mechanism of the vagina. Human Reprod, 2009; 24: 211–18.

18. Mak P., Wójcik K., Wicherek L., Suder P., Dubin A. Antibacterial hemoglobin peptides in human menstrual blood. *Peptides*, 2004; 25: 1839–47.
19. Wicherek L., Mak P., Klimek M., Banaś T. The length of menstrual bleeding and the risk of urogenital infections in the context of the activity of hemoglobin-derived microbicidal peptides. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2007; 131 (1):97–100.
20. Кривенцев Юрий Алексеевич. Гемоглобины человека: иммунобиохимическая характеристика и медико-биологическое значение, 2009.
21. 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.
22. Jun Liu, Zhihong Li, Yanru Wei, Wenjia Wang, Bing Wang, Hongli Liang, Yuxi Gao. of protein size in concentrated solutions by small angle X-ray scattering // *Protein Science.* 25(8). 2016.
23. В. Г. Ребров, Д. Г. Верхов, С. В. Сидоренко, А. Д. Усанов, А. В. Скрипаль, Д. А. Усанов. Конку- рентная сорбция  $K^+$  в присутствии  $Na^+$  бычьим сывороточным альбумином и гемоглобином, 2016, журнал Известия Саратовского университета. Новая серия., том 16, № 3, с. 279-284.
24. Xia, H., Xiao, Y.Y., Huang, H., Tao, S.H., and Lin, X., Particle sizing of colloidal suspensions by low-coherence fiber optic dynamic light scattering, *J. Colloid Interface Sci.*, 2012, vol. 367, no. 1, pp. 527–530.
25. Yang, S., Ryu, J., Choi, K., Kang, T.S., Lee, J.K., Song, C.W., and Ko, S., Dynamic light scatteringbased method to determine primary particle size of iron oxide nanoparticles in simulated gastrointestinal fluid, *Food Chem.*, 2014, vol. 161, pp. 185–191.
26. Clementi, L.A. Jorge, R.V. Gugliotta, L.M. and Quirantes A. Characterization of spherical core-shell particles by static light scattering. Estimation of the core-and particle-size distributions, *J. Quant. Spectrosc. Rad. Transfer*, 2012, vol. 113, no. 17, pp. 2255–2264.
27. Harif T. and Adin A., Size and structure evolution of kaolin- $Al(OH)_3$  flocs in the electroflocculation process: A study using static light scattering, *Water Res.*, 2011, vol. 45, no. 18, pp. 6195–6206.
28. Meng Z., Hashmi S.M., and Elimelech M., Aggregation rate and fractal dimension of fullerene nanoparticles via simultaneous multiangle static and dynamic light scattering measurement, *J. Colloid Interface Sci.*, 2013, vol. 392, pp. 27–33.
29. Eskin, V.E. and Tsvetkov, V.N., *Rasseyanie sveta rastvorami polimerov i svoistva makromolekul (Light Scattering by Polymer Solutions and Properties of Macromolecules)*, Moscow: Nauka, 1986.
30. Jans, H., Liu, X., Austin, L., Maes, G., and Huo, Q., Dynamic light scattering as a powerful tool for goldnanoparticle bioconjugation and biomolecular binding studies, *Anal. Chem.*, 2009, vol. 81, no. 22, pp. 9425– 9432.
31. Tikhomirov, I.A., Myshkin, V.F., Tsimbal, V.N., and Korovin, O.M., Device for detecting the total indicatri of scattering of single disperse particles (SDP), *Prib. Tekh. Eksp.*, 2001, vol. 3, pp. 166–167.
32. Twomey, T.A.M., Mackay, M., Kuipers, H.P.C.E., and Thompson, R.W., In situ observation of silicalite nucleation and growth: A light-scattering study, *Zeolites*, 1994, vol. 14, no. 3, pp. 162–168.
33. L. B. Matyushkin, O. A. Aleksandrova, and V. A. Moshnikov, A Device for Measuring the Scattering Indicatrix of the Nanomaterial Synthesis Process, *Glass Physics and Chemistry*, 2017, Vol. 43, No. 3, pp. 263–266. Pleiades Publishing, Ltd., 2017.
34. 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.

35. A. Rossi-Fanelli, E. Antonini and A. Caputo. Studies on the relations between molecular and functional properties of hemoglobin. I. The effect of salts on the molecular weight of human hemoglobin // *J. Biol. Chem.* 1961.
36. Diez-Silva M. et al. Shape and Biomechanical Characteristics of Human Red Blood Cells in Health and Disease // *MRS Bull.* 2010. Vol. 35, № 5. P. 382–388.
37. Engström K.G., Löfvenberg E. Treatment of myeloproliferative disorders with hydroxyurea: effects on red blood cell geometry and deformability // *Blood.* 1998. Vol. 91, № 10. P. 3986–3991.
38. Chernyshova E.S. et al. Influence of magnesium sulfate on HCO<sub>3</sub>/Cl transmembrane exchange rate in human erythrocytes // *J. Theor. Biol.* 2016. Vol. 393. P. 194–202.
39. Tycko D.H. et al. Flow-cytometric light scattering measurement of red blood cell volume and hemoglobin concentration // *Appl. Opt.* 1985. Vol. 24, № 9. P. 1355–1365.
40. Sem'yanov K.A. et al. Calibration-free method to determine the size and hemoglobin concentration of individual red blood cells from light scattering // *Appl. Opt.* 2000. Vol. 39, № 31. P. 5884–5889.
41. Strokotov D.I. et al. Polarized light-scattering profile-advanced characterization of nonspherical particles with scanning flow cytometry: Polarized Light Scattering // *Cytometry A.* 2011. Vol. 79A, № 7. P. 570–579.
42. Maltsev V.P., Semyanov K.A. Characterisation of bio-particles from light scattering. Utrecht ; Boston: VSP, 2004. 133 p.
43. Strokotov D.I. et al. Is there a difference between T- and B-lymphocyte morphology? // *J. Biomed. Opt.* 2009. Vol. 14, № 6. P. 64036.
44. Moskalensky A.E. et al. Dynamic quantification of antigen molecules with flow cytometry // *J. Immunol. Methods.* 2015. Vol. 418. P. 66–74.
45. Yurkin M.A. et al. Experimental and theoretical study of light scattering by individual mature red blood cells by use of scanning flow cytometry and a discrete dipole approximation // *Appl. Opt.* 2005. Vol. 44, № 25. P. 5249–5256.
46. Konokhova A.I. et al. High-precision characterization of individual E. coli cell morphology by scanning flow cytometry // *Cytometry A.* 2013. Vol. 83A, № 6. P. 568–575.
47. Moskalensky A.E. et al. Accurate measurement of volume and shape of resting and activated blood platelets from light scattering // *J. Biomed. Opt.* 2013. Vol. 18, № 1. P. 17001–17001.
48. Konokhova A.I. et al. Super-resolved calibration-free flow cytometric characterization of platelets and cell-derived microparticles in platelet-rich plasma: Super-Resolved Characterization of Plasma Cells // *Cytometry A.* 2015. P. n/a-n/a.
49. Konokhova A.I. et al. Light-scattering flow cytometry for identification and characterization of blood microparticles // *J. Biomed. Opt.* 2012. Vol. 17, № 5. P. 570061–570068.
50. Konokhova A.I. et al. Enhanced characterisation of milk fat globules by their size, shape and refractive index with scanning flow cytometry // *Int. Dairy J.* 2014. Vol. 39, № 2. P. 316–323.
51. Effect of Chain Chirality on the Self-Assembly of Sick Hemoglobin Xuejin Li, Bruce Caswell, and George Em Karniadakis Division of Applied Mathematics and School of Engineering, Brown University, Providence, Rhode Island // *Biophysical Journal* // September 2012 // P 1130–1140  
Effect of Chain Chirality on the Self-Assembly of Sick Hemoglobin Xuejin Li, Bruce Caswell, and George Em Karniadakis Division of Applied Mathematics and School of Engineering, Brown University, Providence, Rhode Island // *Biophysical Journal* // September 2012 // P 1130–1140.

52. Е. А. Литманович. МЕТОДИЧЕСКАЯ РАЗРАБОТКА К СПЕЦПРАКТИКУМУ «РАСТВОРЫ ПОЛИМЕРОВ», Москва 2017 г.
53. С. А. Вшивков, А. П. Сафронов, Е. В. Русинова, Л. В. Адамова, А. Л. Надольский, И. С. Тюкова, Т. В. Терзиян, А. Г. Галяс. Методы исследования полимерных систем.
54. <http://geoman.ru/books/item/f00/s00/z0000111/st017.shtml>.
55. <https://www.photocor.ru/dls-instrument>.
56. <https://lsinstruments.ch/en/technology/static-light-scattering-sls/zimm-plot/>.
57. Фабелинский И.Л. Молекулярное рассеяние света // М. Наука, 1965.
58. Сергеева Ирина Александровна. Особенности межмолекулярного взаимодействия молекул коллагена в водных растворах // Физический факультет МГУ // Москва 2009.
59. <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich>.
60. Hemoglobin: Modification, Crystallization, Polymerization (Review) Viktoria A. Sergunova, Ekaterina A. Manchenko, Olga Ye. Gudkova, V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology, Moscow 107031, Russia 2 M. V. Lomonosov Moscow State University.
61. Кривенцев, Ю. А. Биохимия: строение и роль белков гемоглобинового профиля : учебное пособие для среднего профессионального образования / Ю. А. Кривенцев, Д. М. Никулина. — 2-е изд., перераб. и доп. — Москва : Издательство Юрайт, 2019. — 73 с. — (Профессиональное образование).