

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

# "ИНДИКАТРИСА РАССЕЯНИЯ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ ГЕМОГЛОБИНА"

ВЫПОЛНИЛА:

ИСАЕВА АРИНА ИГОРЕВНА

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

К.Ф. – М.Н., М.Н.С. В.В. ГИБИЗОВА

ГРУППА: 204М

## АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ЦЕЛИ РАБОТЫ



➤ 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.

➤ Целью работы - исследование изменений **формы и размеров** гемоглобина, происходящих в водных растворах при разных концентрациях белка с помощью многоугольного метода статистического рассеяния света.

# ГЕМОГЛОБИН

- *Гемоглобин* – это компонент эритроцитов, относящийся к группе белков. Состоит из 96 % белкового вещества глобина и 4 % вещества с атомом 2-валентного железа — гема. В одной клетке эритроцита его содержится порядка 280 млн молекул, что и формирует красный цвет крови.
- Гемоглобин представляет собой тетрамер, состоящий из 2 пар полипептидных цепей, называемых глобинами и 4 групп гема.

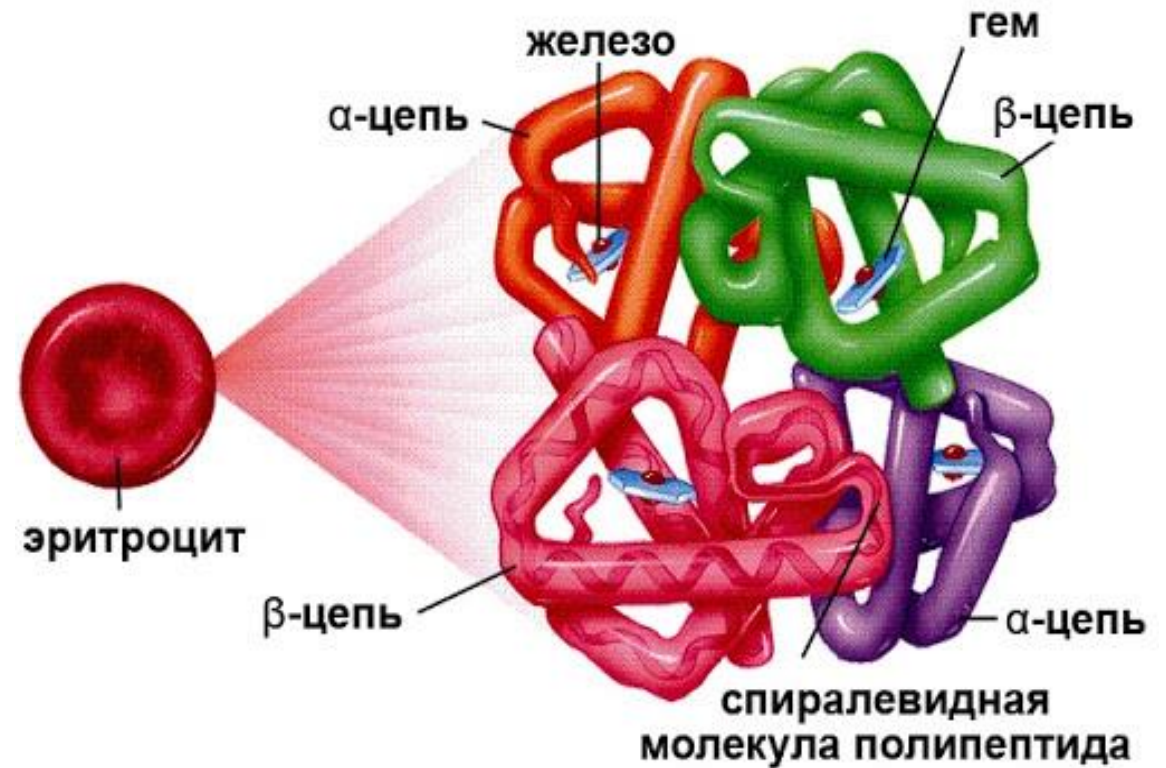


Рисунок 1. Гемоглобин [1]

## ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

В статье [2] было проведено исследование наночастиц диоксида кремния  $\text{SiO}_2$ . Для приготовления наночастиц  $\text{SiO}_2$  использовали водный раствор этилового спирта, содержащий воду, аммиак и тетраэтоксисилан с соответствующими молярными соотношениями 25 : 1 : 0,14.

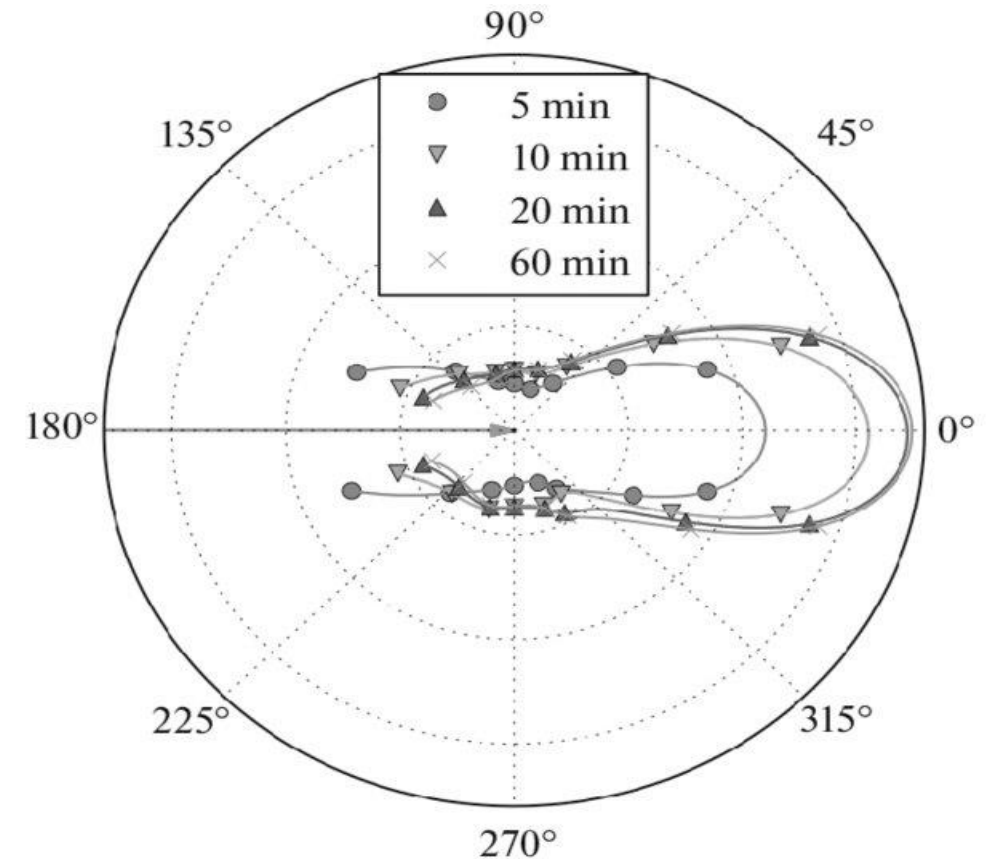


Рисунок 2.

Экспериментальные графики индикатрисы рассеяния частиц  $\text{SiO}_2$  через различные промежутки времени от начала синтеза [2]

[2] 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

# ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

## Метод статического рассеяния света

- В статье [3] 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.
- 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.

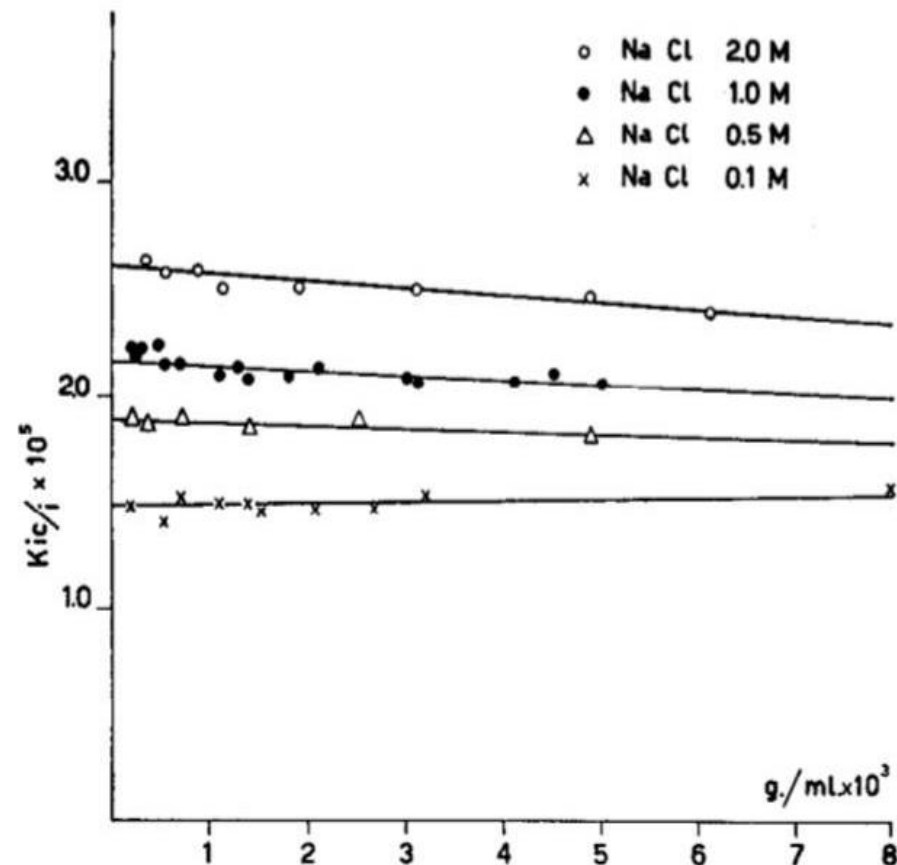


Рисунок 3. График зависимости оптической постоянной раствора  $K$  от концентрации соли  $\text{NaCl}$  [3]

[3] 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

## ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

В статье [4] был смоделирован гемоглобин при серповидно-клеточной анемии.

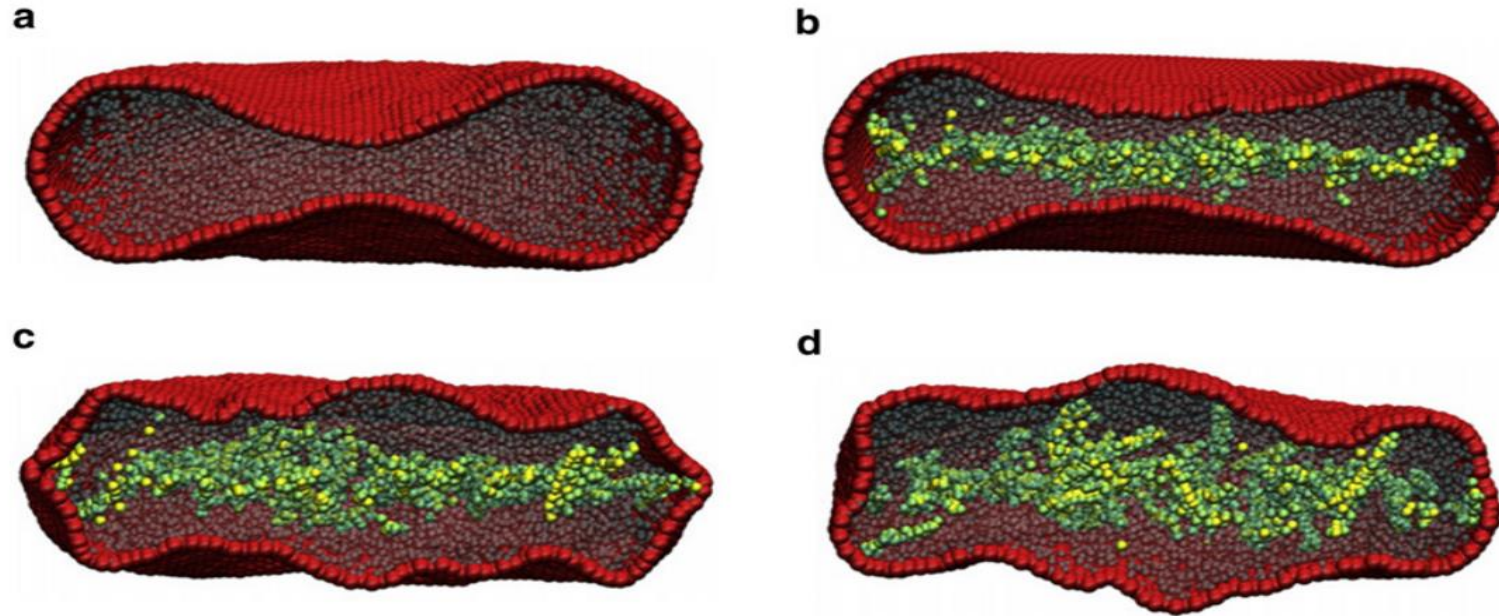


Рисунок 4. Результаты для цитозольных частиц, включенных в мембрану эритроцитов (a); и молекулы серпового гемоглобина и цитозольные частицы, включенные в мембрану эритроцитов в начальном состоянии (b), в промежуточном состоянии (c) и метастабильном состоянии (d) [4]

# СПЕКТРОМЕТР PHOTOCOR COMPLEX.

- 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.
- Прибор РС предназначен предназначенного 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.



Рисунок 5. Спектрометр Photocor Complex [5]

*Светорассеяние – один из основных количественных методов исследования полимеров в растворе, который, не требуя специальной калибровки, позволяет определять молекулярную массу и радиус инерции макромолекул.*

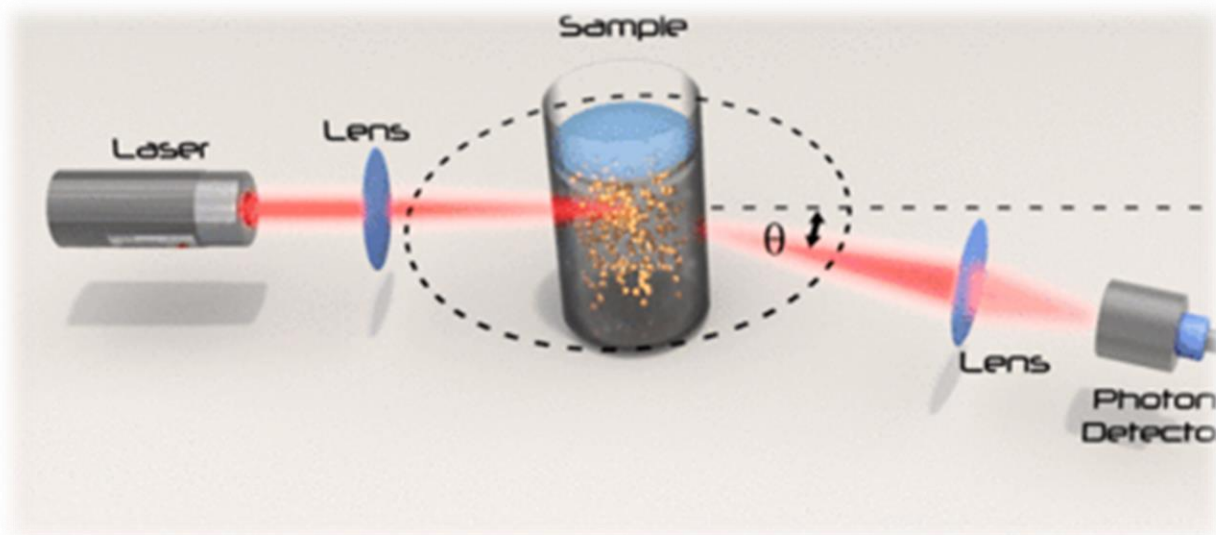


Рисунок 6. Прохождение луча лазера через рассеивающий объем [6]

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  $I''$

$$I = I' + I''$$



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  $\theta$ :

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

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

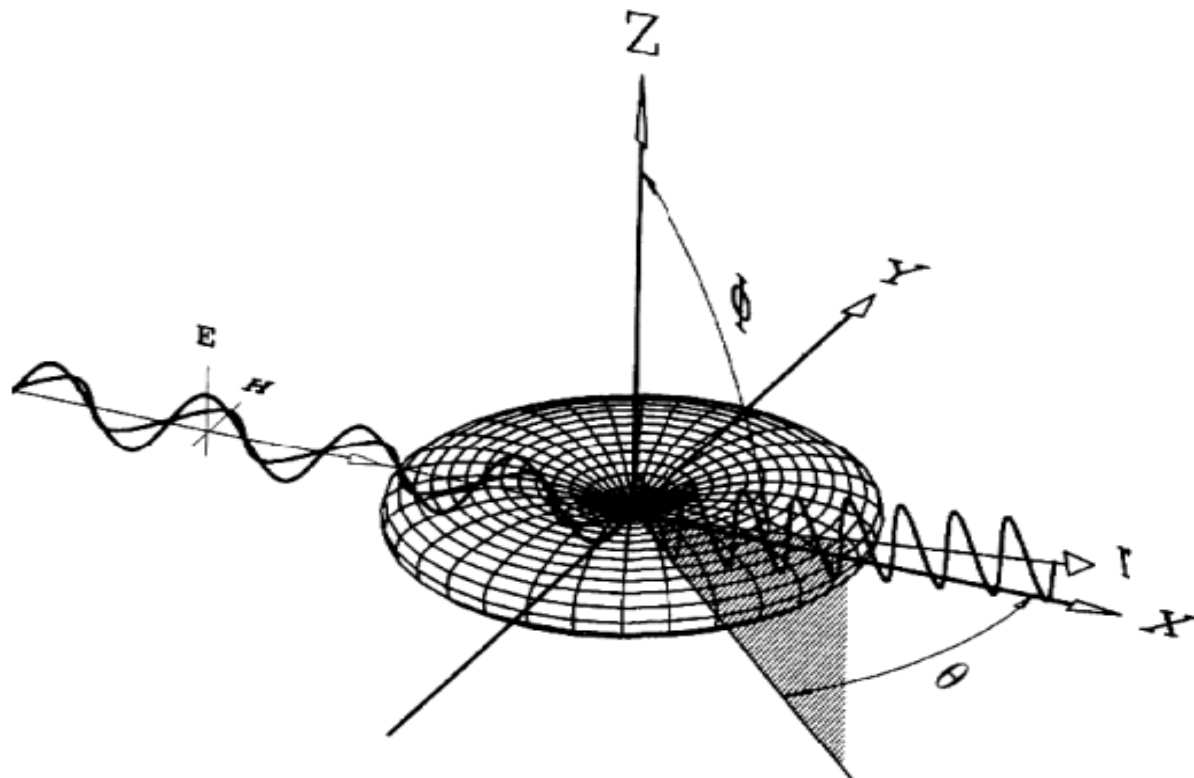


Рисунок 7. Рассеяния вертикально поляризованного света малой частицей. Распределение интенсивности не зависит от азимутального угла  $\theta$  и зависит от полярного угла  $\Phi$ . Указаны электрическая  $E$  и магнитная  $H$  составляющие электромагнитного поля волны [7]

[7] 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.

# ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ

Зависимости интенсивности рассеянного света от угла в при различном содержании белка гемоглобина

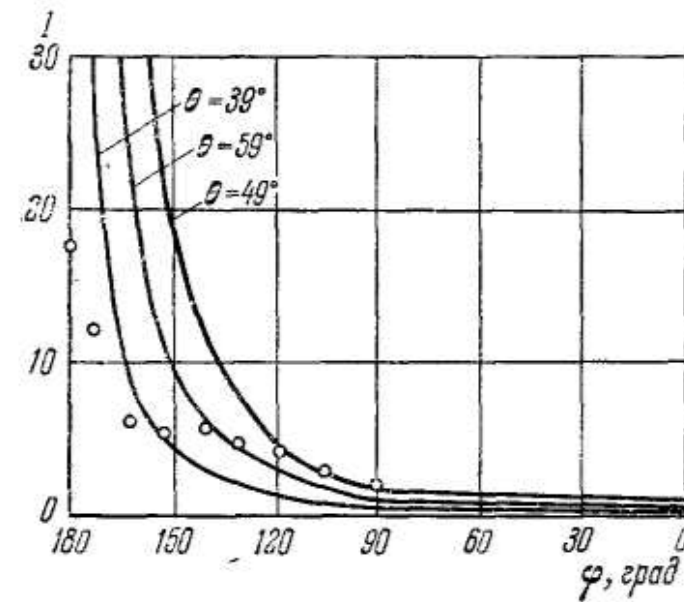
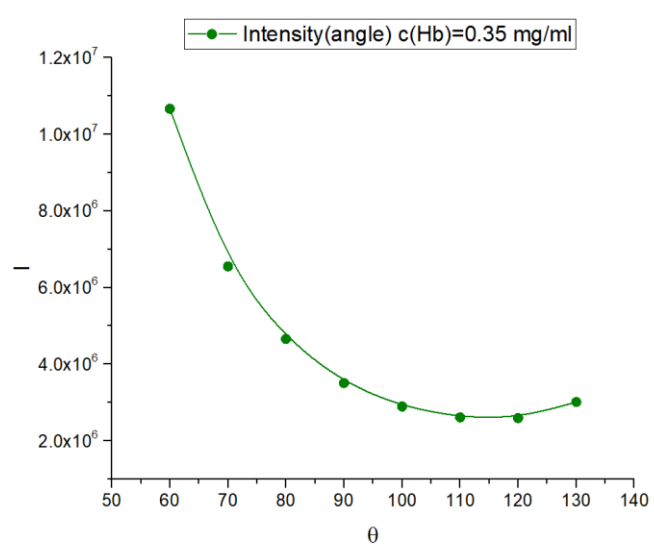
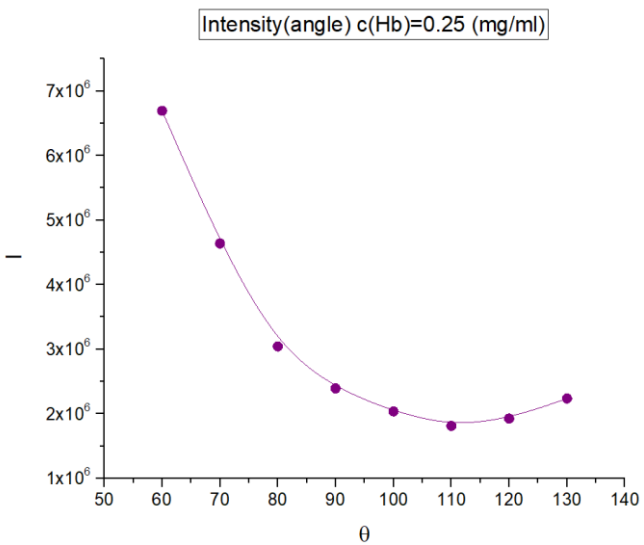
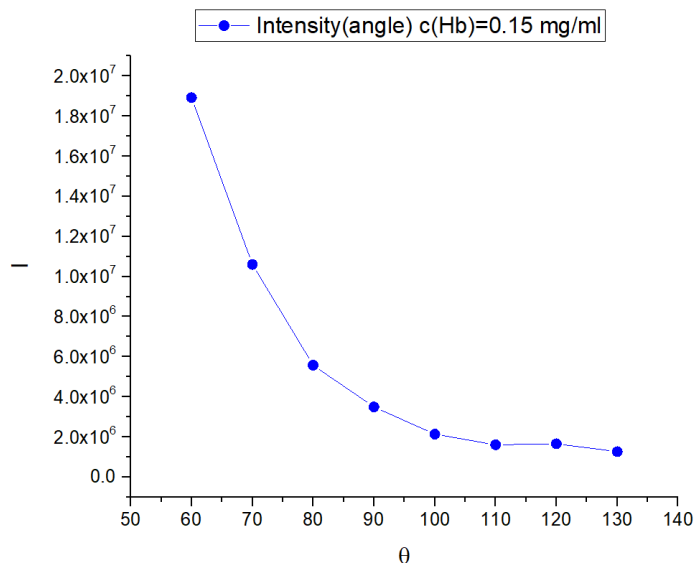
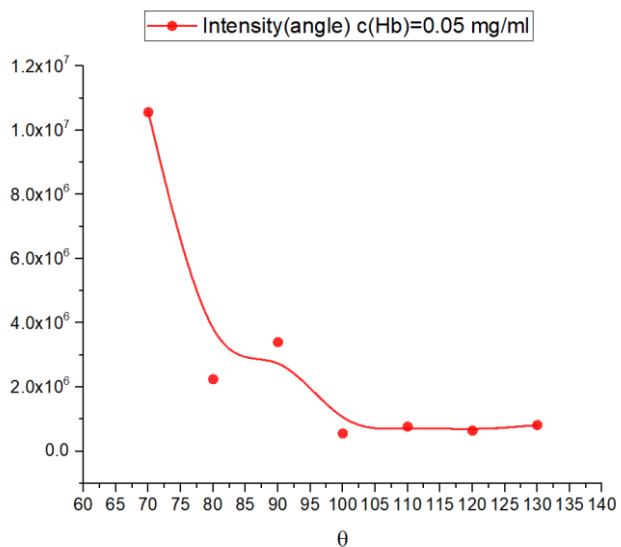


Рисунок 8. Зависимость интенсивности (в условных единицах) света от угла при трех различных концентрациях

Отношение интенсивностей рассеянного света, измеренных под двумя углами, симметричными относительно 90 градусов, называется коэффициентом асимметрии  $Z$ :

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

$Z = 1$  для малых частиц (рис. 8 а),

$Z > 1$  для больших молекул и возрастает по мере увеличения размера молекул (рис. 8 б).

Если размеры рассеивающей частицы соизмеримы с длиной волны падающего света, то удаленные друг от друга участки частицы рассеивают свет с некоторой разностью фаз (рис. 8 в).

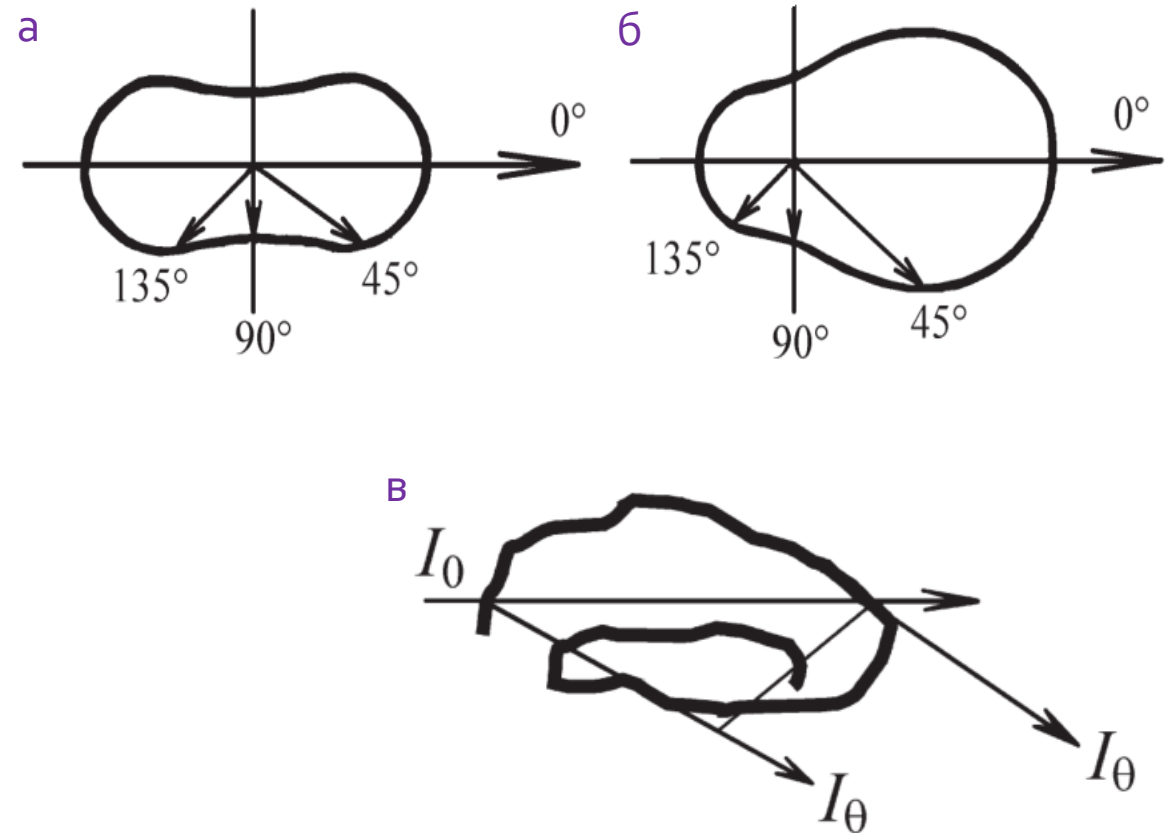
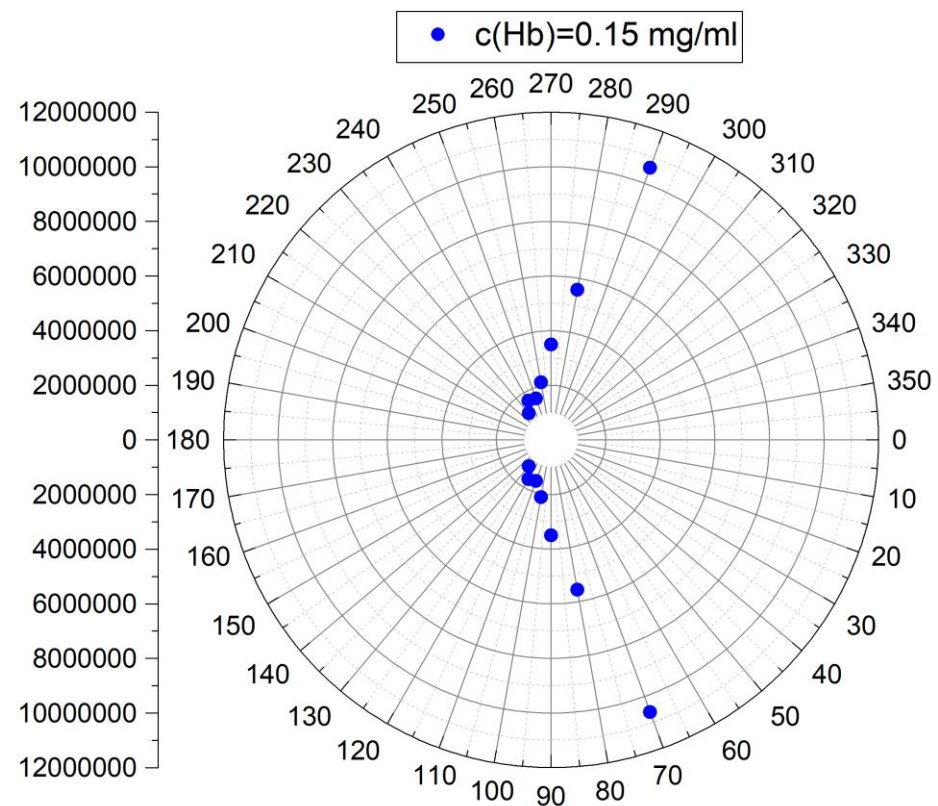
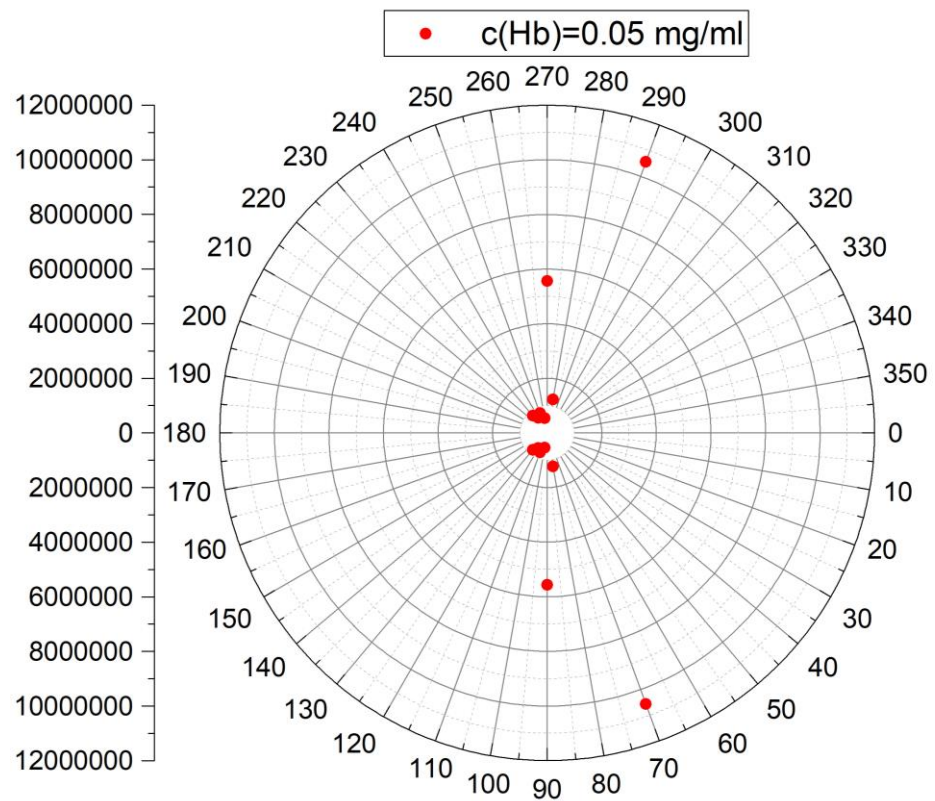
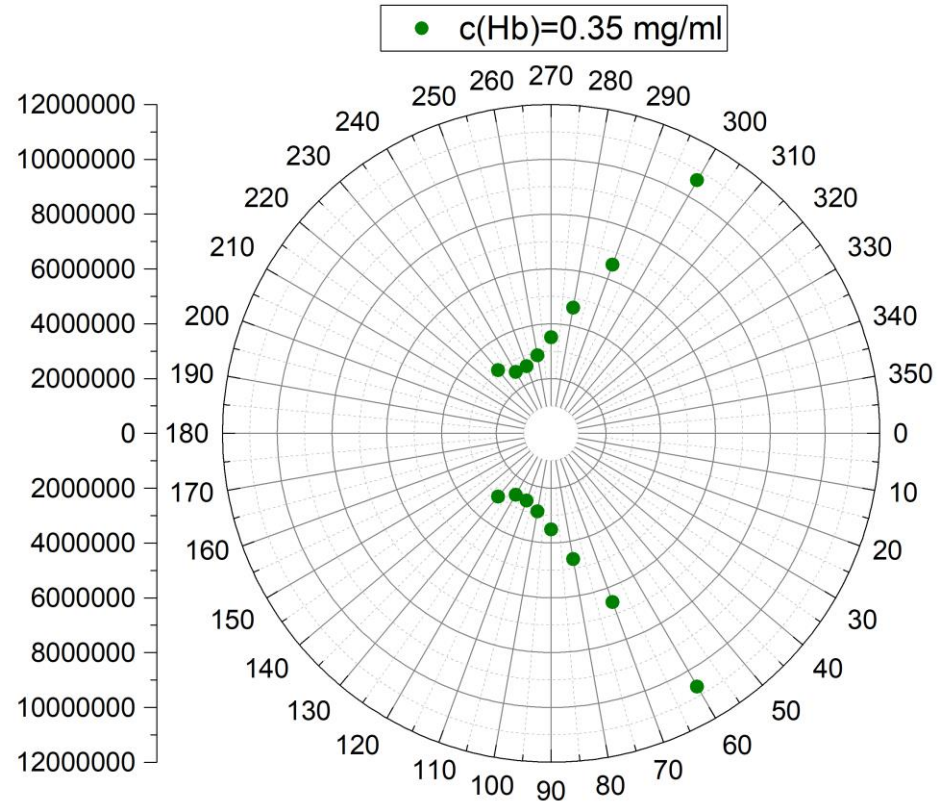
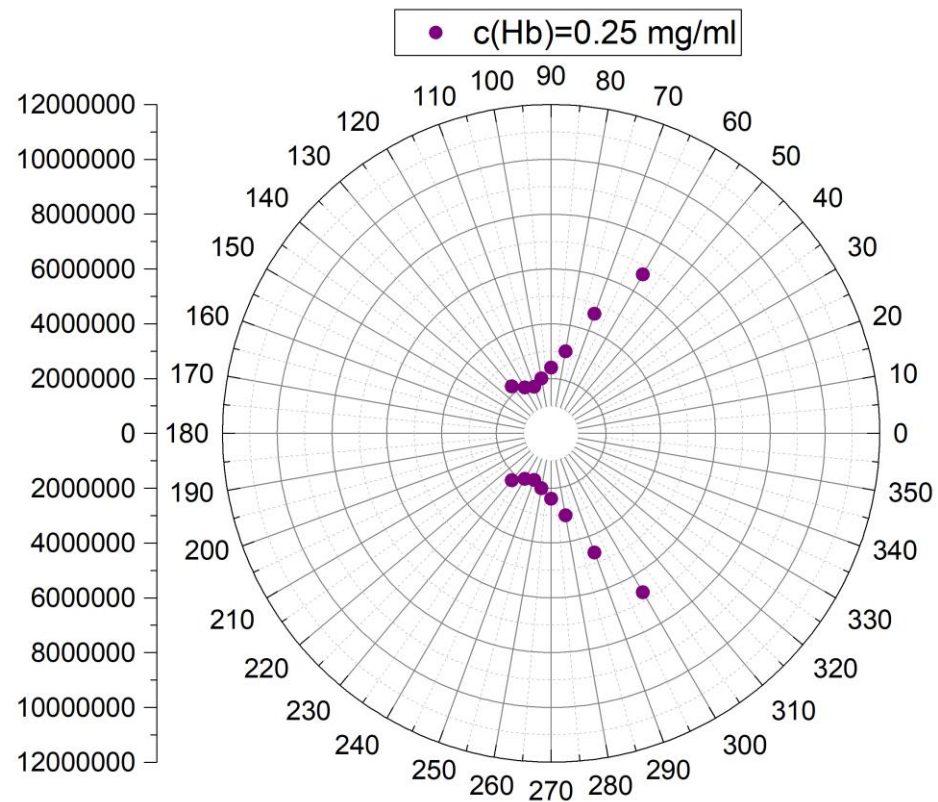


Рисунок 8. Примеры индикатрис рассеяния для частиц различных размеров

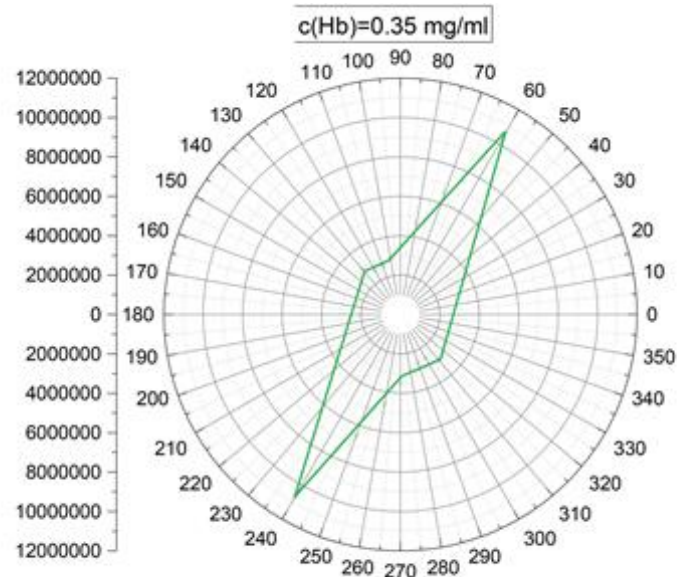
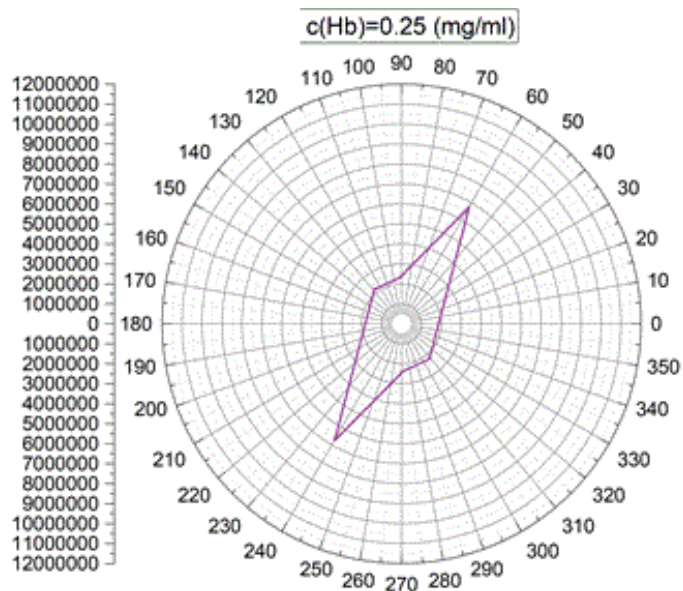
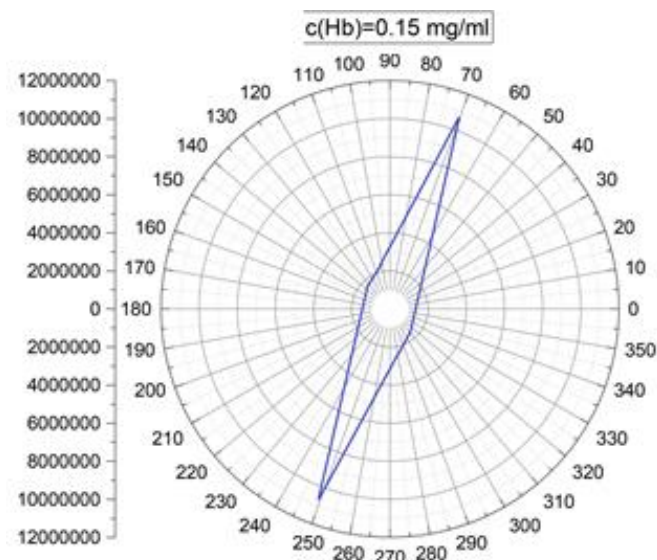
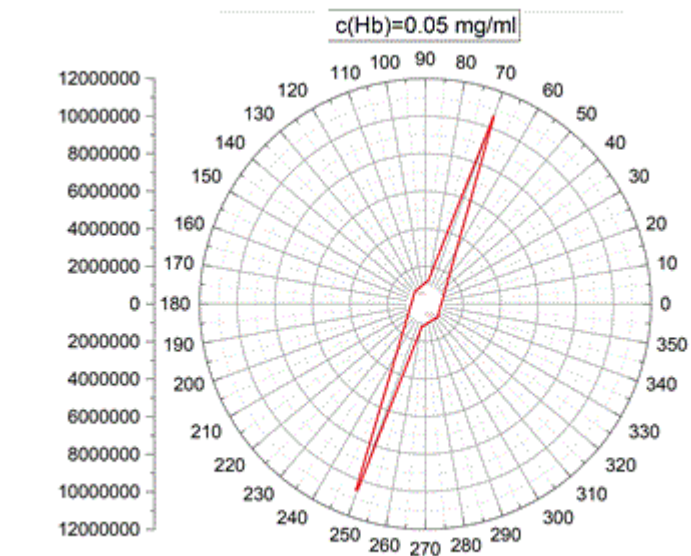
# Индикатрисы рассеяния для разных концентраций гемоглобина



## Индикатрисы рассеяния для разных концентраций гемоглобина



# Зависимости интенсивности рассеянного света от угла в полярных координатах при разных концентрациях гемоглобина



## МЕТОД АСИММЕТРИИ

Расчётная формула коэффициента асимметрии при разных углах

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

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

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

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

$c$	$c_1 = 0.05$	$c_2 = 0.15$	$c_3 = 0.25$	$c_4 = 0.35$
$Z$	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 1. Результаты обработки экспериментальных данных

*Вывод: средняя масса  $M$  определенная данным методом составляет  $67644.25 \pm 6564.40$  г/моль.*

## МЕТОД

### Уравнение Дебая:

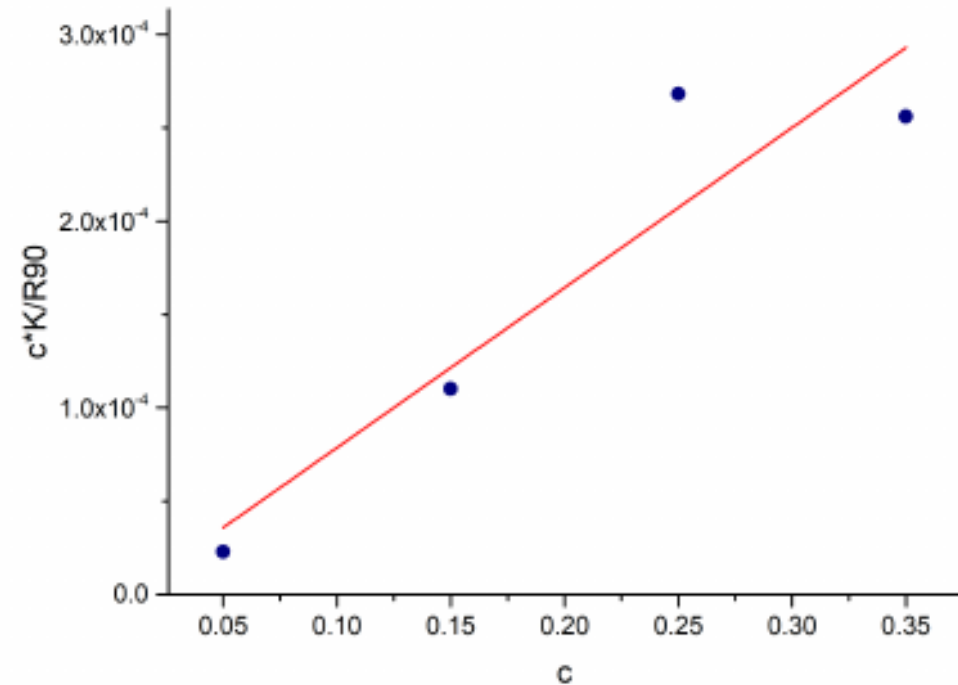
$$\frac{K * c}{R_{90}} = \frac{1}{M_w} + 2 * A_2 * c$$

$$R_{90} = \frac{I - I_W}{I_B - I_T}$$

Коэффициент рассеяния

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

Оптическая постоянная раствора



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  $M = 64500$  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>.*



# МЕТОД ЗИММА

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

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

$$R_g^2 = \frac{3 * \lambda^2}{16 * \pi^2} * M_W * \operatorname{tg} \beta$$

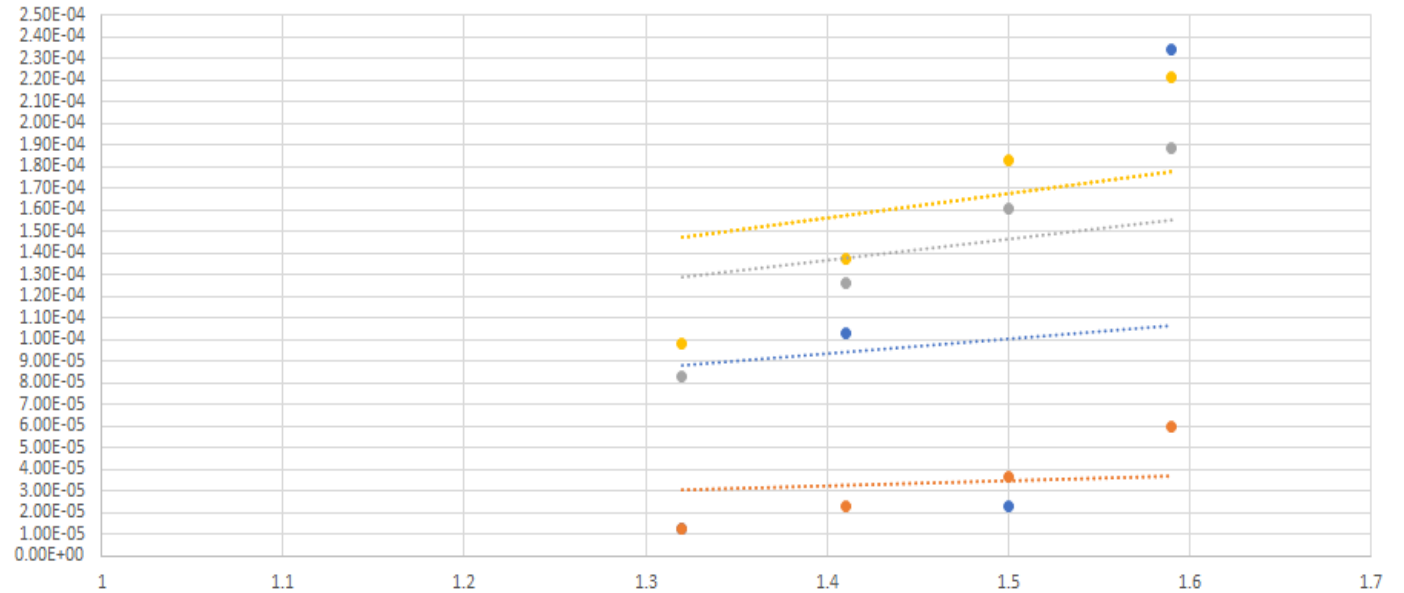
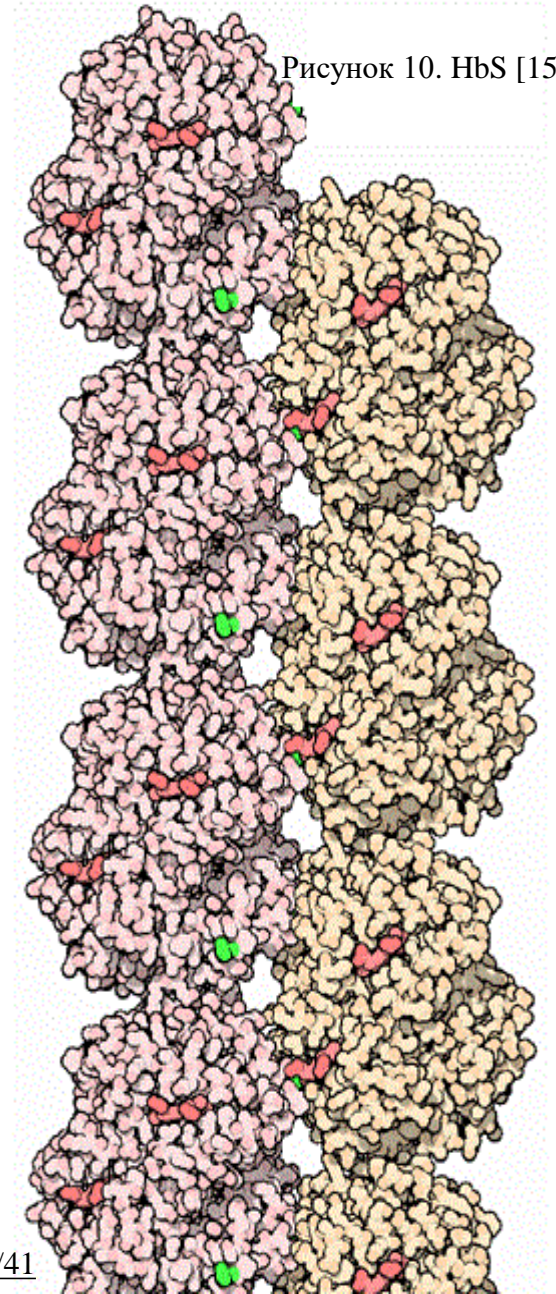


График МНК, построенный по данным светорассеяния для растворов гемоглобина; по оси ординат  $K*c/R(\theta)$ , по оси абсцисс  $\sin^2(\theta/2+k*c)$ . Точки - экспериментальные данные

*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*

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ:

- Получены угловые зависимости интенсивности рассеянного света в чистом водном растворе гемоглобина при разных концентрациях.
- Построены индикатрисы рассеянного света, которые показывают распределение интенсивности света в чистых водных растворах гемоглобина.
- С помощью обработки данных методом Дебая:
  - ❑ Получено значение эффективной массы молекулы гемоглобина  $M = 67114.09 \pm 8474.57$  г/моль, которое близко к литературному значению:  $M = 64500$  г/моль.
  - ❑ Получено значение второго вириального коэффициента  $A_2 = (4.15 \pm 0.41) \cdot 10^{-4}$  моль $\cdot$ см $^3$ /г $^2$
- С помощью метода асимметрии получены значения при разных концентрациях :
  - ❑ Коэффициента асимметрии  $Z$ .
  - ❑ Фактор внутримолекулярной интерференции  $P$ .
  - ❑ Исследована форма гемоглобина.
  - ❑ Относительные размеры молекулы гемоглобина  $D/\lambda$ .
  - ❑ Средняя масса  $M$  определенная данным методом составляет  $M = 67644.25 \pm 6564.40$  г/моль.
  - ❑ Рассчитано значение радиуса инерции частиц гемоглобина  $R=145.58$  нм.
  - ❑ 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.
- С помощью обработки данных методом Зимма:
  - ❑ Получено значение эффективной массы молекулы гемоглобина  $M = 65000 \pm 5850$  г/моль.
  - ❑ Рассчитано значение радиуса инерции частиц гемоглобина  $R=103.28 \pm 20.67$  нм.
- Большие размеры рассеивающих частиц, полученные данными методами можно объяснить тем, что диссоциация гемоглобина представляет обратимый динамический процесс, равновесие которого зависит от концентрации белка.





СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!