

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова

(повне найменування вищого навчального закладу)

Факультет математики, фізики та інформаційних технологій

(повне найменування факультету)

Кафедра загальної фізики і фізики теплоенергетичних та хімічних процесів

(повна назва кафедри)

Дипломна робота

бакалавра

(ступінь вищої освіти)

на тему: «Динамічне розсіяння світла модельними біологічними системами»

«Dynamic light scattering of model biological systems»

Виконала: студентка денної форми навчання
спеціальність: 105 – Прикладна фізика та наноматеріали
Грац Марія Олександрівна

Керівник: д.ф.-м.н., проф. Гоцульський В.Я. _____

Рецензент: к.ф.-м.н., с.н.с. НДІ фізики Чечко В.Є.

Рекомендовано до захисту:

Протокол засідання кафедри

№ __ від __.__. 2021 р.

Захищено на засіданні ЕК № _

протокол № __ від __.__.2021 р.

Оцінка _____ / _____ / _____
(за національною шкалою, шкалою ECTS, бали)

Завідувач кафедри

Голова ЕК

Гоцульський В.Я

Ваксман Ю.Ф.

(підпис)

(підпис)

ЗМІСТ

| | |
|---|----|
| ВСТУП _____ | 3 |
| РОЗДІЛ I. ФІЗИКО-ХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА БІЛКОВИХ МОЛЕКУЛ. МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ВОДНО-ПРОТЕЇНОВИХ РОЗЧИНІВ _____ | 5 |
| 1.1. Загальні властивості молекул білків _____ | 5 |
| 1.2. Особливості сироваткового альбуміну людини як об'єкта дослідження _____ | 7 |
| 1.3. Динамічне розсіяння світла _____ | 10 |
| ПОСТАНОВКА ЗАДАЧІ _____ | 16 |
| РОЗДІЛ II. МОЛЕКУЛЯРНЕ РОЗСІЯННЯ У ВОДНИХ РОЗЧИНАХ СІРОВАТКОВОГО АЛЬБУМІНУ ЛЮДИНИ _____ | 17 |
| 2.1. Приготування препаратів _____ | 17 |
| 2.2. Рефрактометричні дослідження водних розчинів альбуміну _____ | 20 |
| 2.3. Статичне розсіяння світла у водних розчинах альбуміну _____ | 23 |
| 2.3. Динамічне розсіяння світла у водних розчинах альбуміну _____ | 25 |
| РЕЗУЛЬТАТИ РОБОТИ ТА ВИСНОВКИ _____ | 29 |
| Список використаних літературних джерел _____ | 30 |

ВСТУП

Сьогодні вимірювання фізичних параметрів молекул у водних розчинах викликає великий інтерес у дослідників. Стан рідких розчинів в будь-який момент часу характеризується набором якісних і кількісних параметрів. Для таких систем властиві безліч параметрів стану, що характеризуються нестабільністю в часі і при зміні зовнішніх умов.

Водні біологічні дисперсні системи або біодисперсії — широко поширені в природі біологічні об'єкти, дисперсна фаза яких представлена нано- і мікрочастинками біологічного походження (наприклад, білками і іншими біополімерами, вірусами, клітинами і т. п.), а дисперсійним середовищем є вода або (частіше) водні розчини електролітів. Зокрема, до біологічних дисперсних систем відносяться всі біологічні рідини людини і тварин, а також численні природні середовища. З такими системами доводиться мати справу як в ході проведення фундаментальних біофізичних досліджень, так і в практичній сфері — біотехнології, екології, медицині.

Макромолекули білків і їх водні розчини є унікальними для дослідження за допомогою оптичних методів, оскільки маса білкової молекули строго визначена для кожного виду білка, при цьому поверхня білкової молекули має певну величину заряду, яку можна змінювати шляхом зміни pH розчину. Динамічні параметри молекул білків — різні часи кореляції і трансляційні рухи, а також параметри перенесення визначаються такими статичними характеристиками молекул, як поверхневий заряд, молекулярна маса, форма молекул і характер міжмолекулярної взаємодії. Статичні параметри макромолекул можна ефективно визначати за допомогою методу релеєвського світлорозсіяння. Результати небагатьох експериментів, проведених до теперішнього часу методом світлорозсіяння, неоднозначні. Зважаючи на широку поширеність водних біологічних дисперсних систем і значимість їх для ряду біо- та

медичних технологій, вивчення властивостей таких систем є вкрай актуальним завданням. Застосування когерентних оптичних методів таких як динамічне розсіяння світла дозволяє з'ясувати характерні розміри у системах, де кооперація між молекулами відбувається на тлі теплового руху та інших чинників і є динамічним квазірівноважним процесом. Раніше було показано, що у водних розчинах альбуміну людини виникають особливі точки при розбавленні до концентрацій протеїнів 0,9 від фізіологічної норми [1,2].

Метою роботи є дослідження таких оптичних характеристик водно-протеїнових розчинів як показник заломлення, коефіцієнт Релея та характерні часи флуктуацій інтенсивності розсіяного когерентного випромінювання при різних концентраціях. Визначення методами динамічного розсіяння світла (лазерною кореляційною спектроскопією) змін характерних часів в залежності від концентрації дозволить підтвердити наявність особливостей у структуруванні водно-альбумінових систем при концентраціях близьких до нативних.

Об'єктом дослідження є водні розчини сироваткового альбуміну людини.

Методи дослідження: пікнометрія, рефрактометрія, лазерна кореляційна спектроскопія.

РОЗДІЛ I. ФІЗИКО-ХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА БІЛКОВИХ МОЛЕКУЛ. МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ВОДНО-ПРОТЕЇНОВИХ РОЗЧИНІВ

1.1. Загальні властивості молекул білків

Білки, або протеїни, — найважливіший клас біологічно активних біополімерів, які відіграють ключову роль в клітині, присутні у вигляді головних компонентів у будь-яких формах живої матерії та виконують різноманітні функції, забезпечуючи процес життєдіяльності.

Білки належать до високомолекулярних сполук, до складу яких входять сотні і навіть тисячі амінокислотних залишків, об'єднаних в макромолекулярну структуру. Молекулярна маса білків коливається від 6000 (нижня межа) до 1000000 і вище в залежності від кількості окремих поліпептидних ланцюгів у складі єдиної молекулярної структури білка. Для вираження молекулярної маси білків використовують також спеціальну одиницю — дальтон, — практично рівну масі атома водню (тобто 1,0000 за шкалою атомних мас).

Білки характеризуються високою в'язкістю розчинів, незначною дифузією, здатністю до набухання в великих межах, оптичною активністю, рухливістю в електричному полі, низьким осмотичним і високим онкотичним тиском, здатністю до поглинання УФ-променів при 280 нм (ця властивість, обумовлена наявністю в білках ароматичних амінокислот, використовується для кількісного визначення білків).

Більшість білків добре розчиняються у воді, що обумовлено наявністю на поверхні білкової молекули вільних гідрофільних груп ($-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$ та ін.) [20]. Альбуміни розчиняються в дистильованій воді, а глобуліни розчиняються у воді тільки в присутності електролітів.

Білки є оптично-активними сполуками: вони обертають плоскополяризоване світло, яке проходить через їх розчин, і неоднаково

поглинають ліве і праве циркулярно поляризоване світло. Зазначена властивість білків пояснюється наявністю в їх молекулі хіральних атомів вуглецю. Взаємодію з білками поляризованого світла вивчають за допомогою методів дисперсії оптичного обертання, кругового дихроїзму. Ці методи застосовують для загального опису вмісту спіральних структур у білках і дослідження конформаційних змін

На сьогоднішній день єдиним експериментальним способом з атомарної точністю дізнатися, що являє собою тривимірна структура білка, є рентгеноструктурний, або кристалографічний, аналіз, що дозволяє визначити просторові координати всіх атомів досліджуваного об'єкта. При наявності даних про стан окремих атомів можна обчислити міжатомні відстані, валентні кути, кути обертання навколо зв'язків, розподіл поверхневого заряду і інші деталі молекулярної геометрії. Всі ці дані особливо цікаві хімікам, біохімікам і біологам, що вивчають залежності між структурними характеристиками і функціональними властивостями, а також фахівцям, які займаються електронною структурою і міжмолекулярними взаємодіями.

1.2. Особливості сироваткового альбуміну людини як об'єкта дослідження

Одним із найбільш розповсюджених об'єктів біофізичних досліджень є сироватковий альбумін (як людини, так і тваринного походження). Альбумін становить 40-60% від загальної кількості білка плазми і вносить найзначніший внесок у підтримання її онкотичного тиску. Як відомо, онкотичний тиск перешкоджає витіканню рідини з капілярів в навколишній інтерстиціальний (міжклітинний) простір під дією тиску всередині судин. На 65-80% онкотичний тиск плазми обумовлено альбуміном.

Іншою важливою функцією альбуміну є підтримання об'єму циркулюючої крові (ОЦК). Підтримка сталості ОЦК залежить від утримання в судинному руслі води. При цьому артеріальний тиск сприяє переміщенню рідини в позасудинний (міжклітинний) простір. За відсутності ефективної протидії цьому процесу сталася б швидка втрата води з судинного русла. На відміну від клітинних мембран, стінки капілярів проникні для невеликих молекул, тому натрій майже не справляє осмотичного ефекту в кровоносних капілярах. Найменшою з молекул, концентрація яких значна в кровотоці, але поза кровоносних судин низька, виступає молекула альбуміну. В нормі стінки капілярів мало проникні для нього, тому концентрація альбуміну в крові виступає найбільш важливим фактором, що протистоїть загальному артеріальному (гідростатичному) тиску.

Альбумін є критично важливим для метаболізму кальцію, оскільки до 45% загального кальцію сироватки пов'язані з альбуміном, а також виконує транспортну функцію: альбумін пов'язує неполярні речовини, такі, як білірубін і жирні кислоти, холестерин, і є переносником деяких гормонів, ферментів, лікарських препаратів і токсинів.

Важливою для вибору в якості об'єкта дослідження особливістю даного білка є мінливість його структури. У нативному стані молекула альбуміну має форму, близьку до сферичної, з невеликим осьовим ставленням, що визначає порівняно невисоку в'язкість його розчинів[6]. Сироватковий альбумін людини містить понад 580 амінокислот. Він складається з одного ланцюга, але молекулу білка можна умовно розділити на три гомологічних домена — I, II і III, кожен з яких містить два субдомена — А та В [18, 19] (рис. 1).

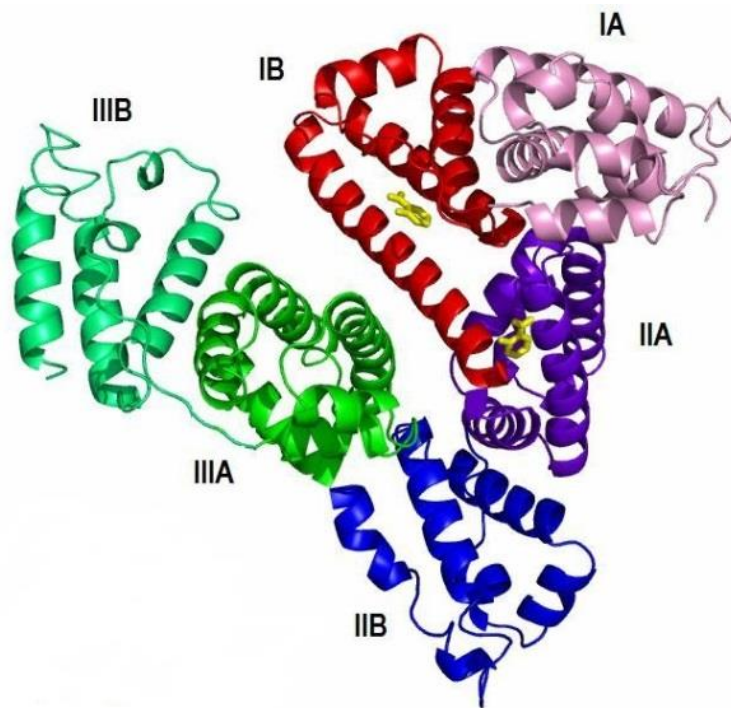


Рис. 1. Будова сироваткового альбуміну людини.

Результати сучасних методів дослідження конформації білка, серед яких найбільш точним є кристалографічний аналіз з високою просторовою роздільною здатністю, показали, що молекула сироваткового альбуміну людини має близьку до рівнобедреного трикутника зі стороною 80 Å і висотою 30 Å форму, що нагадує форму «серця» [20].

У BrookhavenProteinDataBank міститься три незалежно визначені структури для знежиреного альбуміну сироватки людини в різному

оточенні. Незважаючи на наявність деяких невеликих відмінностей між трьома структурами, переважно в розташуванні домену III, в цілому підтверджується серцеподібна форма, яка вказує на те, що навряд чи це є артефактом кристалізації.

Для виділення альбуміну з плазми використовують такі основні способи: висолювання неорганічними солями (зазвичай сульфатом амонію), осадження органічними розчинниками при зниженій температурі, виборча денатурація з подальшим осадженням сторонніх білків. Подальше очищення білка з метою підвищення ступеня його гомогенності здійснюють, використовуючи методи препаративного електрофорезу, гель-фільтрації, хроматографії тощо.

1.3. Динамічне розсіяння світла

До теперішнього часу був розроблений ряд методик визначення розмірів, заряду, електрофоретичної рухливості, маси, структури і ряду інших характеристик нано- і мікророзмірних частинок методами лазерного світлорозсіяння [4, 13-16]. Ці методики продовжують розвиватися і вдосконалюватися. При цьому значна увага приділяється підвищенню економічності, зменшенню об'єму аналізованої речовини і часу аналізу. Одним з найбільш ефективних методів вирішення існуючих завдань з визначення фізичних параметрів молекул у водних розчинах є метод динамічного розсіяння світла.

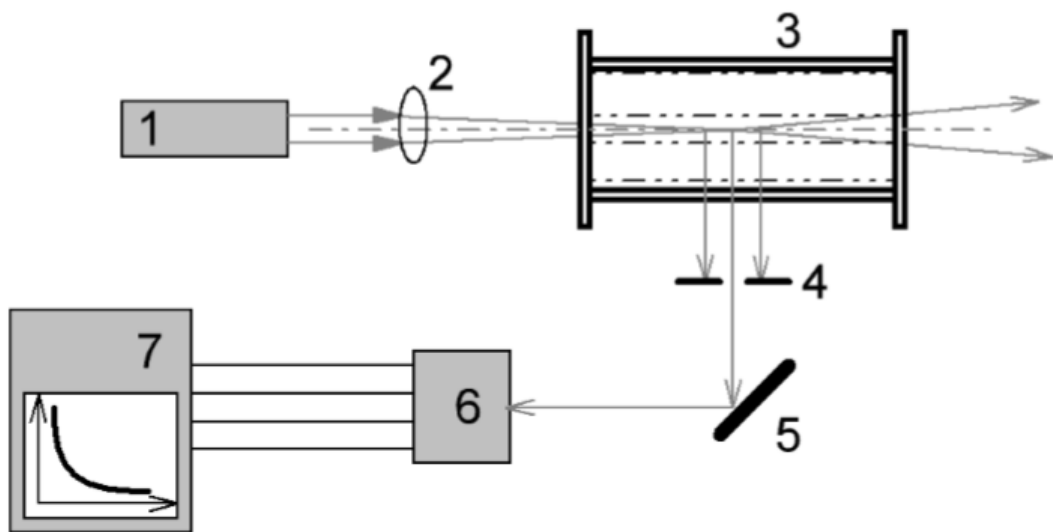


Рис. 2. Схема реалізації метода лазерної кореляційної спектроскопії: 1 — лазерне джерело випромінювання, 2 — лінза, 3 — досліджуваний зразок (розчин), 4 — діафрагма, 5 — дзеркало, 6 — фотоприймач, 7 — багатоканальний корелометр.

Динамічне розсіяння світла (ДРС, інша назва — фотонна кореляційна спектроскопія) — метод дослідження структури і динаміки газоподібних і рідких середовищ, заснований на аналізі часової

автокореляційної функції інтенсивності розсіяного випромінювання. Принцип вимірювання розмірів частинок заснований на вимірюванні та аналізі флуктуацій інтенсивності розсіяного світла в об'ємі, що містить колоїдні частинки в розчині, в різні моменти часу. Флуктуації інтенсивності розсіяного світла виникають через неоднорідність середовища. Завдяки випадковому руху частинок, викликаному некомпенсованими поштовхами молекул розчину, інтенсивність світла осцилює відносно свого середнього значення. За частотою цих осциляцій можна отримати інформацію про коефіцієнт дифузії колоїдних частинок, який, в свою чергу, залежить від розмірів частинок.

Для спостереження часових кореляцій розсіяного випромінювання необхідно використовувати саме лазерне випромінювання, що характеризується високим ступенем когерентності та монохроматичністю. Застосовувати теорію динамічного світлорозсіяння варто при малих концентраціях частинок, коли відстані між ними значно перевищують їх розміри, і можна знехтувати ефектами вторинного розсіяння світла.

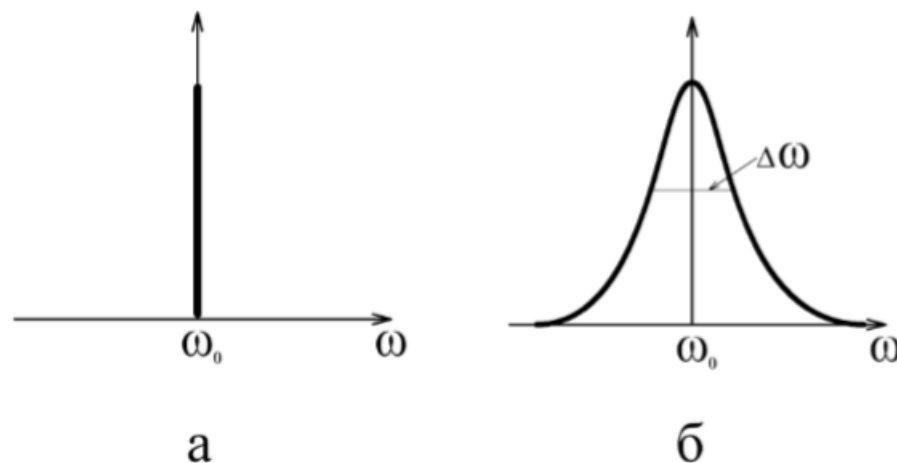


Рис. 3. Демонстрація розширення спектра випромінювання при його розсіянні на динамічних об'єктах в середовищі: а — спектр випромінювання одномодового лазера з частотою ω_0 до розсіяння; б —

спектр випромінювання після розсіяння на флуктуаціях показника заломлення в середовищі [7].

Хаотичний броунівський рух дисперсних частинок призводить до мікроскопічних флуктуацій їх локальної концентрації і відповідних локальних неоднорідностей показника заломлення середовища. При проходженні лазерного променя через таке середовище частина світла буде розсіяна на цих неоднорідностях (рис. 3). Флуктуації інтенсивності розсіяного світла будуть відповідати флуктуаціям локальної концентрації дисперсних частинок. Інформація про коефіцієнт дифузії частинок міститься в залежній від часу кореляційній функції флуктуацій інтенсивності. Часова автокореляційна функція за визначенням має наступний вигляд:

$$G(\tau) = \langle I(t)I(t + \tau) \rangle = \lim_{\Delta t \rightarrow \infty} \frac{1}{\Delta t} \int_0^{\Delta t} I(t)I(t + \tau) dt, (1)$$

де інтенсивність I має різні значення в моменти часу t і $(t + \tau)$, Δt — це час інтегрування (час накопичення кореляційної функції). Зрозуміло, що при $\tau = 0$ автокореляційна функція дорівнює середньоквадратичній інтенсивності розсіяння $\langle I^2(t) \rangle$.

Для кращого розуміння автокореляційної функції як міри кореляції розглянемо довільний сигнал $A(t)$, який флюктує в часі відносно свого середнього значення (рис. 4). Цей сигнал має такі властивості: значення сигналу A для часу t завжди відрізняється від значення A для часу $t + \tau$. Коли час t малий в порівнянні з типовим інтервалом кореляції змінної $A(t)$, $A(t + \tau)$ буде близьким до величини $A(t)$. Коли величина τ збільшується, відхилення $A(t + \tau)$ від $A(t)$ стає більш імовірним. Таким чином, можна сказати, що величина $A(t + \tau)$ корелює з $A(t)$ коли часовий інтервал τ малий, але ця кореляція втрачається, коли τ стає великим у порівнянні з характерним періодом флуктуацій.

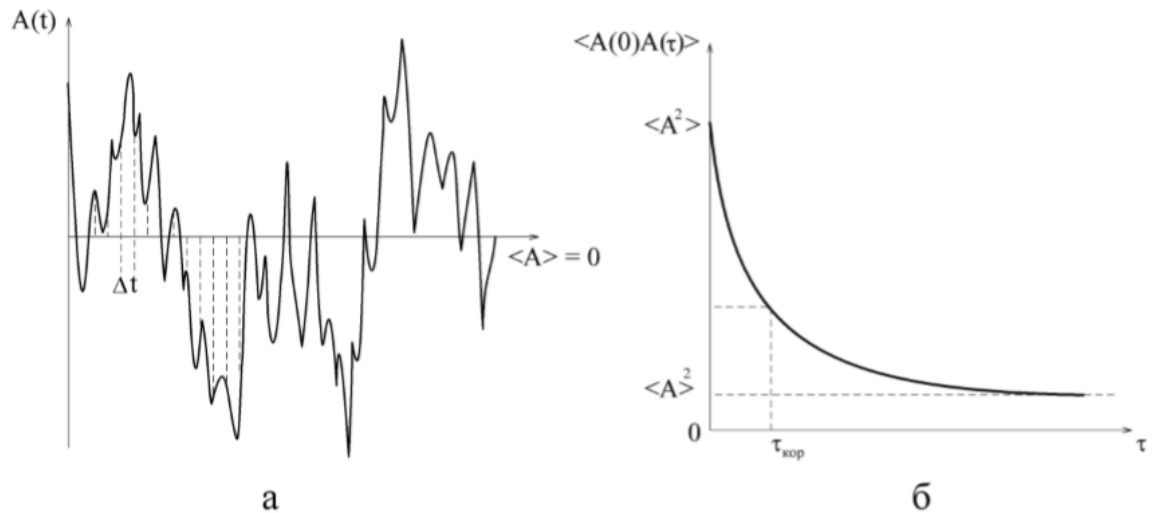


Рис. 4. а — зображення сигналу $A(t)$, який флюктує в часі щодо свого середнього значення $\langle A \rangle$; б — кореляційна функція $\langle A(0)A(\tau) \rangle$ сигналу $A(t)$.

Флюктуації інтенсивності розсіяного світла мають характерний час [4], який, в свою чергу, є часом загасання експоненційної часової кореляційної функції розсіяного світла, яка вимірюється за допомогою цифрового корелометра, а обернена величина до характерного часу життя такої флюктуації, відповідно до рішення рівняння дифузії, дорівнює:

$$\frac{1}{t_c} = Dq^2. \quad (2)$$

Модуль хвильового вектора флюктуацій концентрації при розсіянні світла q описується виразом:

$$q = \frac{4\pi n_0}{\lambda_0} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right), \quad (3)$$

де n_0 — показник заломлення рідини, в якій зважені дисперсні частинки, λ_0 — довжина хвилі лазерного світла і θ — кут розсіювання (рис. 5).

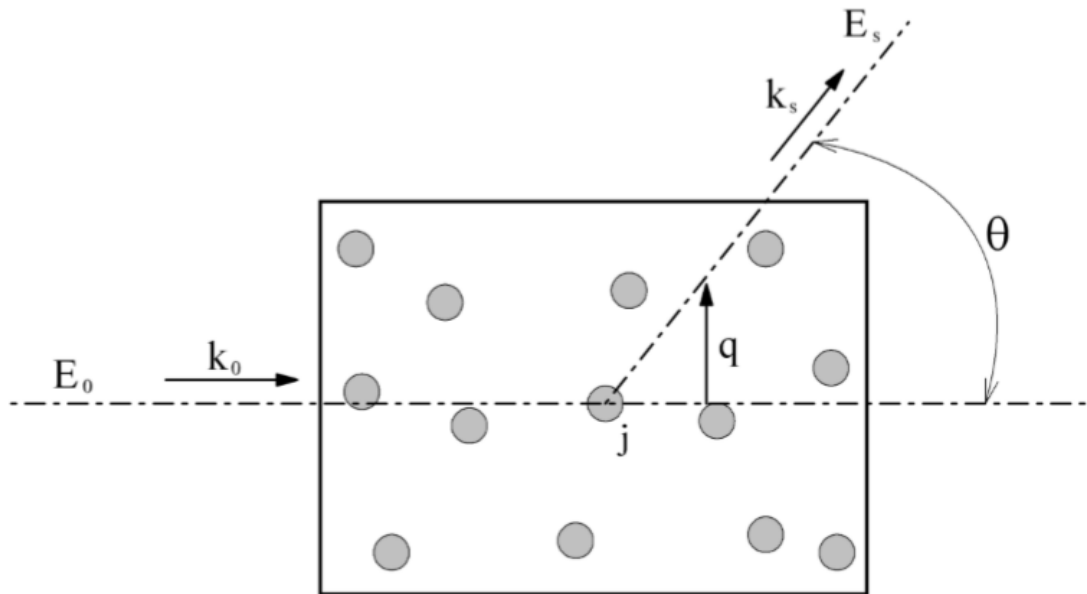


Рис. 5. Ілюстрація розсіяння випромінювання на частинці.

Для досліджуваного зразка буде справедливим зазначити, що малим часовим інтервалам відповідають сильні кореляції, тому що за час порядку τ швидкість рухомих розсіюючих частинок не встигає сильно змінитися. Великим часовим інтервалам відповідають слабкі кореляції, оскільки за великий проміжок часу втрачається інформація про минулі стани.

Кореляційна функція інтенсивності розсіяного світла (рис. 6):

$$G(\tau) = \langle I^2 \rangle (1 + \beta |g(\tau)|^2) = B_l + A e^{-\frac{2\tau}{t_c}}, \quad (4)$$

де B_l — базова лінія, A — амплітуда сигналу.

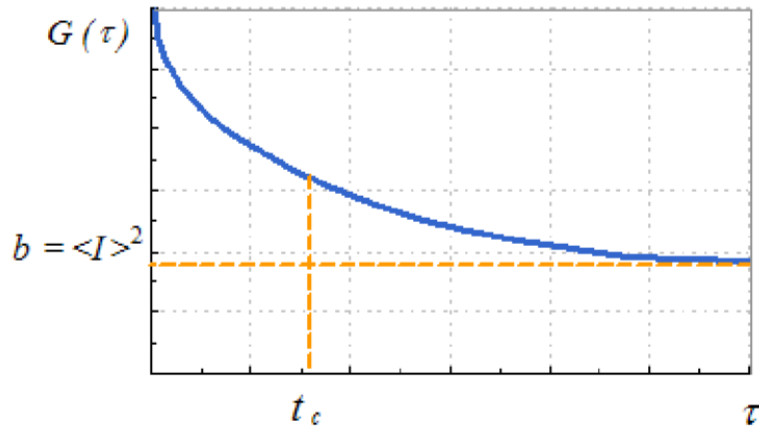


Рис. 6. Типова автокореляційна функція розсіяного світла.

За результатами апроксимації автокореляційної функції інтенсивності розсіяного світла за допомогою теоретичної експоненціальної функції можна визначити коефіцієнт дифузії частинок D . Гідродинамічний радіус — розмір об'єкта, який розраховується, виходячи з припущення про його сферичну форму, за величиною коефіцієнта дифузії в рідині. Таким чином можна розрахувати гідродинамічний радіус R_h відповідно до співвідношення Стокса-Ейнштейна:

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D}, \quad (5)$$

де k_B — стала Больцмана, T — абсолютна температура, η — в'язкість розчинника.

Основною перевагою даного методу є неруйнівний характер досліджень, що дозволяє визначати розміри структур в біологічних рідинах і їх зміни в часі, чого не дозволяють практично ніякі з вживаних в даний час діагностичних методів. При цьому розміри структур є важливим показником, що дозволяє отримати діагностичні дані про стан організму, що включають активність імунної системи, білковий склад рідин, функціональність окремих молекулярних компонентів в крові та інших біологічних рідинах.

ПОСТАНОВКА ЗАДАЧІ

Дослідження макромолекул білків та їх водних розчинів має давню історію, в якій дослідження за допомогою оптичних методів грають значну роль. Динамічні параметри молекул білків — різні часи кореляції і трансляційні рухи, а також параметри перенесення визначаються такими статичними характеристиками молекул, як поверхневий заряд, молекулярна маса, форма молекул і характер міжмолекулярної взаємодії. Всі ці параметри можуть бути визначеними за допомогою динамічного розсіяння світла і одного з базових методів цього напрямку — лазерної кореляційної спектроскопії.

Статичні параметри макромолекул можна ефективно визначати за допомогою методу релеєвського світлорозсіяння. Результати небагатьох експериментів, проведених до теперішнього часу методом світлорозсіяння, неоднозначні. Зважаючи на широку поширеність водних біологічних дисперсних систем і значимість їх для ряду біо- та медичних технологій, вивчення властивостей таких систем є вкрай актуальним завданням.

У роботі поставлена задача — визначити особливості характерних часів та відповідних гідродинамічних радіусів у водних розчинах альбуміну людини (базового компоненту плазми крові) при концентраціях, які збігаються з нативними, та зменшеними до гематологічної границі (приблизно 0,9 від фізіологічної норми). Саме при таких концентраціях попередні дослідження в'язкості плазми, її густини та параметру pH показують наявність структурного фазового переходу у цій модельній системі. Визначення параметрів статичного світлорозсіяння та показника заломлення модельної біологічної системи (водного розчину альбуміну) допоможуть у складанні фізичної картини процесів у крові при кровозаміні.

РОЗДІЛ II. МОЛЕКУЛЯРНЕ РОЗСІЯННЯ У ВОДНИХ РОЗЧИНАХ СИРОВАТКОВОГО АЛЬБУМІНУ ЛЮДИНИ

2.1. Приготування препаратів

При виготовленні розчинів нами було використано пікнометричний метод, оскільки вихідними компонентами були фармакологічний водний розчин альбуміну 20% (200мг/1см³) та бідисцилят води. При виготовленні розчинів чистота та відсутність пилу контролювалися лазерним зондуванням.

Визначення густини пікнометром є високоточним методом. Густина — елементарна фізична величина, що характеризує властивості речовини. Для однорідного об'єкта визначається як відношення його маси до об'єму.

$$\rho = \frac{m}{V}. \quad (6)$$

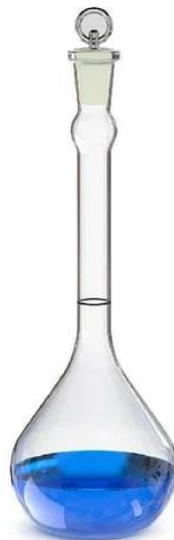


Рис. 7. Пікнометр.

Пікнометричний метод заснований на зважуванні рідини, яка займає певний відомий об'єм, а сам пікнометр (рис. 7) являє собою скляну посудину невеликої ємності та спеціальної форми. Для визначення густини досліджуваної речовини (в нашому випадку — фармакологічний 20% водний розчин сироваткового альбуміну людини) проводяться три послідовних вимірювання: спочатку визначають масу пікнометра, потім зважується пікнометр, заповнений робочою рідиною з добре відомою густиною та досліджуваною речовиною. В якості робочої рідини ми використовували дистильовану воду, для якої значення густини (ρ_{H_2O}) приймали за $1 \frac{\text{кг}}{\text{м}^3}$. Густина розчину визначається за формулою:

$$\rho_{HSA} = \frac{m_{HSA}}{m_{H_2O}} \rho_{H_2O} \cdot (7)$$

Отримане значення густини 20% водного розчину сироваткового альбуміну людини:

$$\rho_{HSA} = (1,0587 \pm 0,00002) \frac{\text{кг}}{\text{м}^3}.$$

Оскільки цілісна кров є складною гетерогенною системою, має сенс проводити дослідження, використовуючи модельні системи сироватки крові. Сироватка крові — плазма (рідка гомогенна складова) крові, з якої видалено згортувальні білки — фібриноген, — за рахунок відсутності якого різко збільшується стабільність розчину.

Досліджувані системи готувалися в лабораторних умовах безпосередньо перед проведенням експерименту. Для виготовлення модельних розчинів, як вже було зазначено, використовували фармакологічний 20% водний розчин альбуміну людини, який розбавлявся водою для ін'єкцій у відповідних пропорціях з метою отримання розчинів різної концентрації (від 2% до 8%). Необхідний для досліджень кінцевий об'єм кожного розчину складає приблизно 5 мл. Визначення маси компонентів розчину проводилося на аналітичних вагах з похибкою, що не перевищує 10^{-4} г (рис. 8). Оскільки приготувати розчини точної концентрації неможливо через людський фактор, їх концентрації повторно

обчислювалися за результатами зважування компонентів і це враховано в подальших дослідях.



Рис. 8. Зважування компонентів при приготуванні розчинів сироваткового альбуміну людини різних концентрацій.

2.2. Рефрактометричні дослідження водних розчинів альбуміну

Рефрактометр Аббе — візуальний оптичний прилад для вимірювання показника заломлення рідких і твердих середовищ (рис. 9, 10). Основними елементами є дві скляні прямокутні призми P_1 і P_2 , виготовлені зі скла з великим показником заломлення. У розрізі призми мають вигляд прямокутних трикутників, звернених один до одного гіпотенузами; проміжок між призмами має ширину близько 0,1 мм і служить для розміщення досліджуваної рідини (дослідження твердих речовин вимагає додаткових пристроїв).

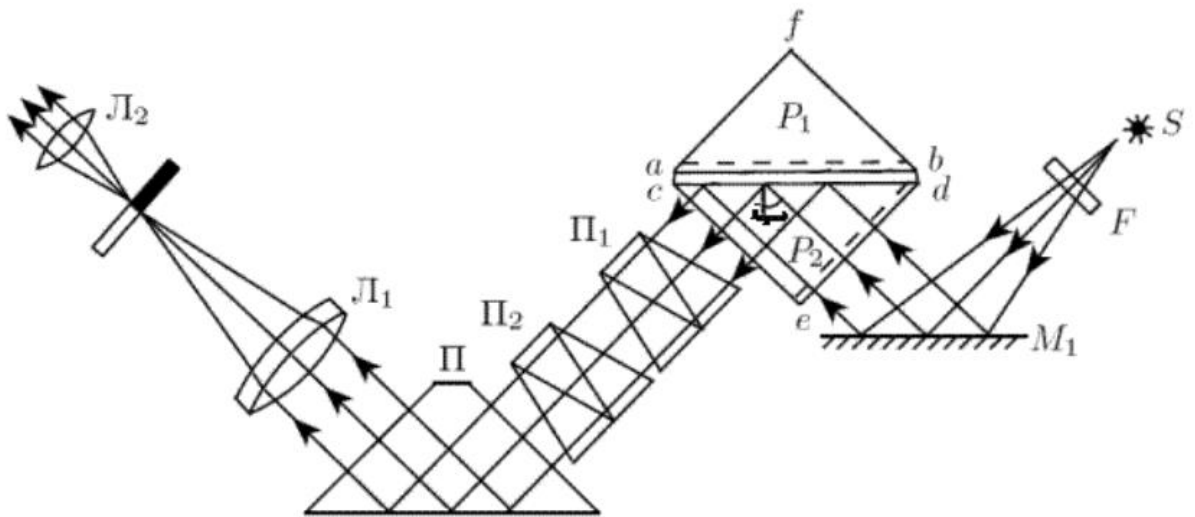


Рис. 9. Оптична схема рефрактометра Аббе. Хід променів в рефрактометрі при вимірюванні показника заломлення зразка рідини методом порушеного повного внутрішнього відбиття.

При вимірюванні показника заломлення рідини методом повного внутрішнього відбивання призму P_2 освітлюють з боку матової грані ed . Промінь світла в цьому випадку потрапляє на кордон розділу cd під різними кутами i . При $i < i_{gp}$ світло відбивається лише частково. Граничному куту відповідає випадок, коли в полі зору труби спостерігається різка межа світла і півтіні. Компенсатор, що складається з

двох дисперсійних призм прямого зору (призм Амічі), дозволяє обертанням призм в протилежні сторони компенсувати дисперсію вимірювальної призми і зразка та виміряти величину показника заломлення рефрактометром Аббе при використанні немонохроматичного джерела (білого світла) [23].



Рис. 10. Рефрактометр.

Отримана залежність показника заломлення водного розчину альбуміну від концентрації продемонстрована на графіку нижче (рис. 11). Концентрацію 5% (5 мг/см³) можна виділити як особливу, оскільки при розбавленні фармакологічного розчину саме починаючи з цієї концентрації крива даної залежності відхиляється від лінійної, що може вказувати на динамічний фазовий перехід другого роду, що підтверджується

попередніми дослідями з визначення залежності коефіцієнту в'язкості та густини водних розчинів альбуміну від концентрації.

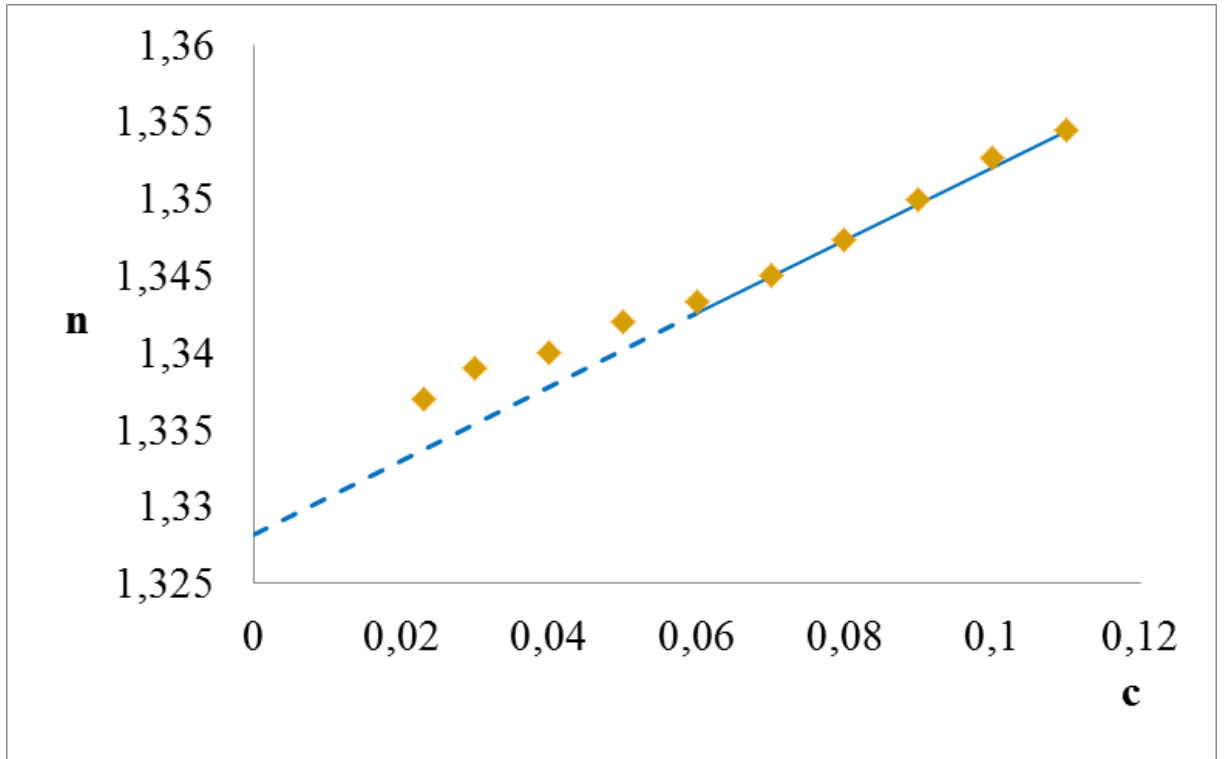


Рис. 11. Графік залежності показника заломлення n від концентрації c альбуміну в розчині.

2.3. Статичне розсіяння світла у водних розчинах альбуміну

Теорія Релея встановлює взаємозв'язок між молекулярною масою (розміром молекул) і інтенсивністю розсіяного світла. Відповідно до теорії Релея молекули більшого розміру розсіюють більше світла від даного джерела, ніж молекули меншого розміру, а інтенсивність розсіяного світла прямо пропорційна молекулярній масі молекули. В експериментах зі статичного світлорозсіяння спостерігається усереднена (за часом) інтенсивність розсіяння світла розчином.

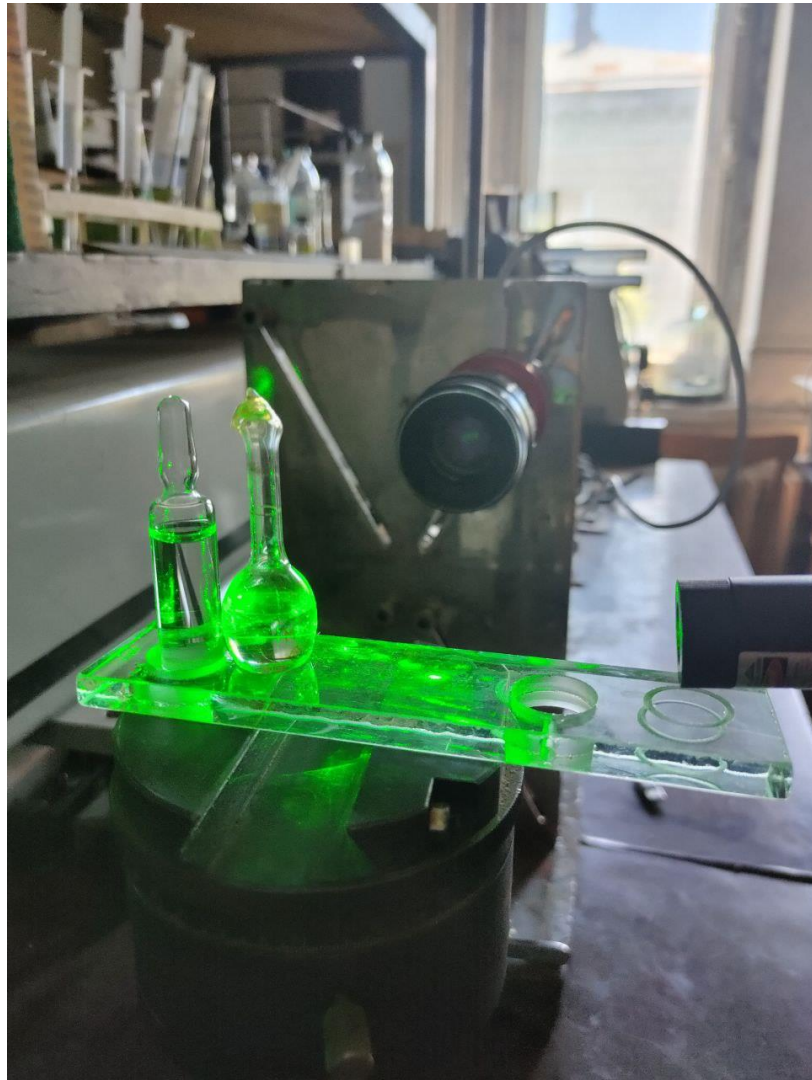


Рис. 12. Установка для проведення дослідів з інтегрального розсіяння світла.

Оскільки нас цікавить характер залежності інтенсивності розсіяного випромінювання від концентрації, а не молекулярна маса альбуміну в розчині, ми проводили дослідження відносним методом. За результатами експерименту в особливій точці з концентрацією 5 мг/см^3 спостерігається максимум інтенсивності розсіяного випромінювання, що свідчить про виникнення великої кількості неоднорідностей, тобто значну олігомеризацію білкових макромолекул при такій концентрації альбуміну у водному розчині.

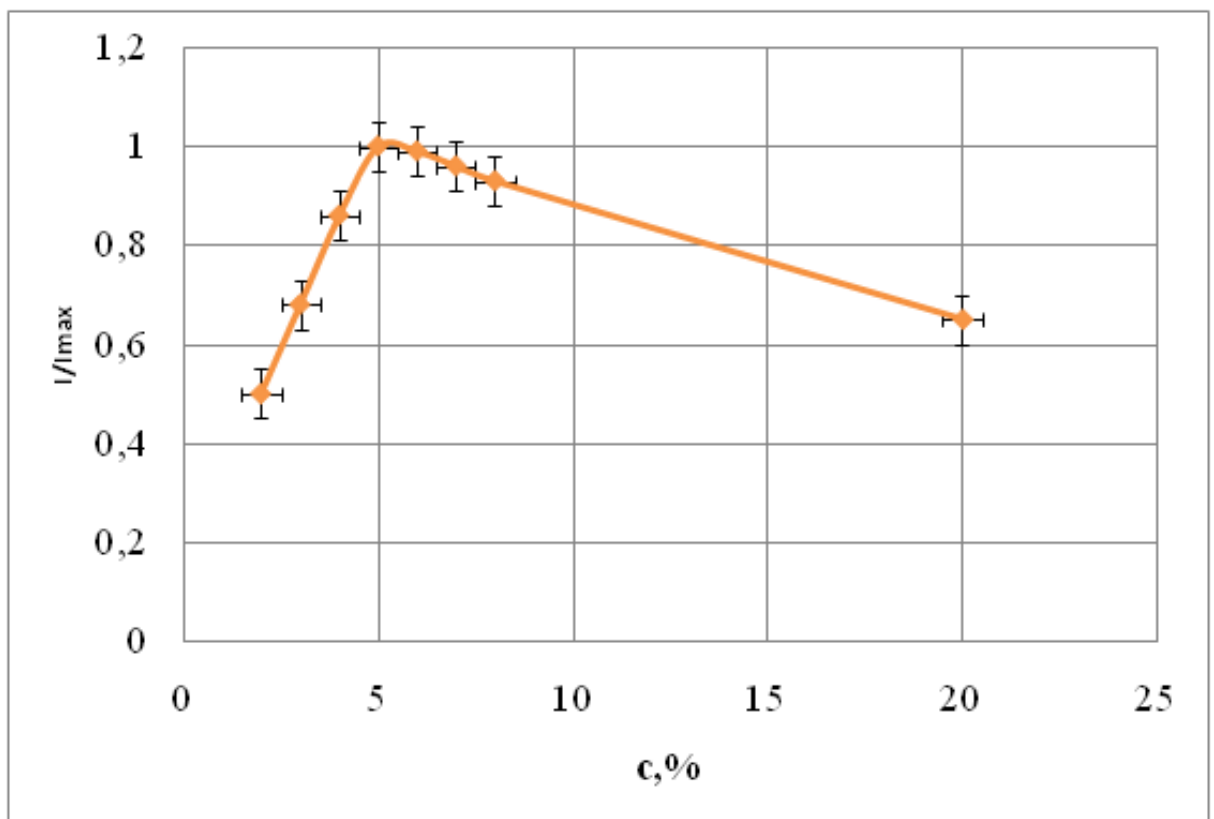


Рис. 13. Графік залежності відносної інтенсивності I/I_{\max} розсіяного світла від концентрації c альбуміну в розчині.

2.3. Динамічне розсіяння світла у водних розчинах альбуміну

У типовій установці для проведення експерименту методом фотонної кореляційної спектроскопії (рис. 14) зразок освітлюється випромінюванням від когерентного монохроматичного джерела світла. Зазвичай використовуються лазери з вертикальною поляризацією. Розсіяне світло від частинок детектується під кутом θ . Як детектори розсіяного випромінювання в установках використовуються фотоелектронні помножувачі (ФЕП) або лавинні фотодіоди (ЛФД). У вхідному вікні фотопомножувача встановлений фотокатод. Коли фотон від розсіяного світла досягає фотокатода, завдяки фотоелектричному ефекту утворюється електрон. Потім цей сигнал посилюється за допомогою вторинної емісії, яка, в кінцевому рахунку, приводить до вимірюваного струму на аноді.

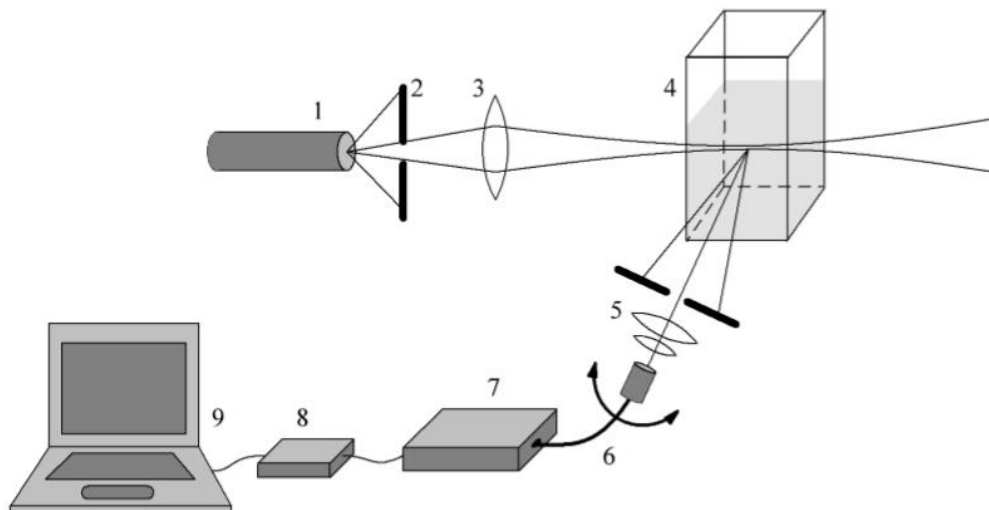


Рис. 14. Принципова схема установки для дослідження розчинів методом динамічного розсіяння світла: 1 — лазер, 2 — екран з отвором, 3 — збиральна лінза, 4 — кювета з досліджуваним розчином, 5 — колімуюча система, 6 — оптоволокно, 7 — фотоелектронний помножувач, 8 — аналого-цифровий перетворювач, 9 — персональний комп'ютер з програмою обробки [8].

Інший варіант підсилювачів сигналу — використання лавинних фотодіодів. З функціонального принципу ФЕП і ЛФД слідує, що вимірювання інтенсивності розсіяння означає підрахунок збуджуючих фотонів. Число фотонів за одиницю часу є еквівалентом інтенсивності, фотострум на виході ФЕП повторює флуктуації інтенсивності. Зафіксований сигнал обробляється для отримання інформації про дифузійні властивості речовини. Для виведення даних і управління використовується комп'ютер.

Отримання даних в методі ДРС полягає в накопиченні автокореляційної функції (АКФ) розсіяного випромінювання. Як правило використовується режим, в рамках якого АКФ накопичуються протягом ряду коротких проміжків часу, тривалість і кількість яких задаються оператором. Після закінчення циклу функції, що збігаються, складаються і усереднюються автоматично, а ті функції, які не задовольняють критерію збігів, ігноруються [8].



Рис. 15. Фотоелектронний помножувач (працює в режимі лічильника фотонів).

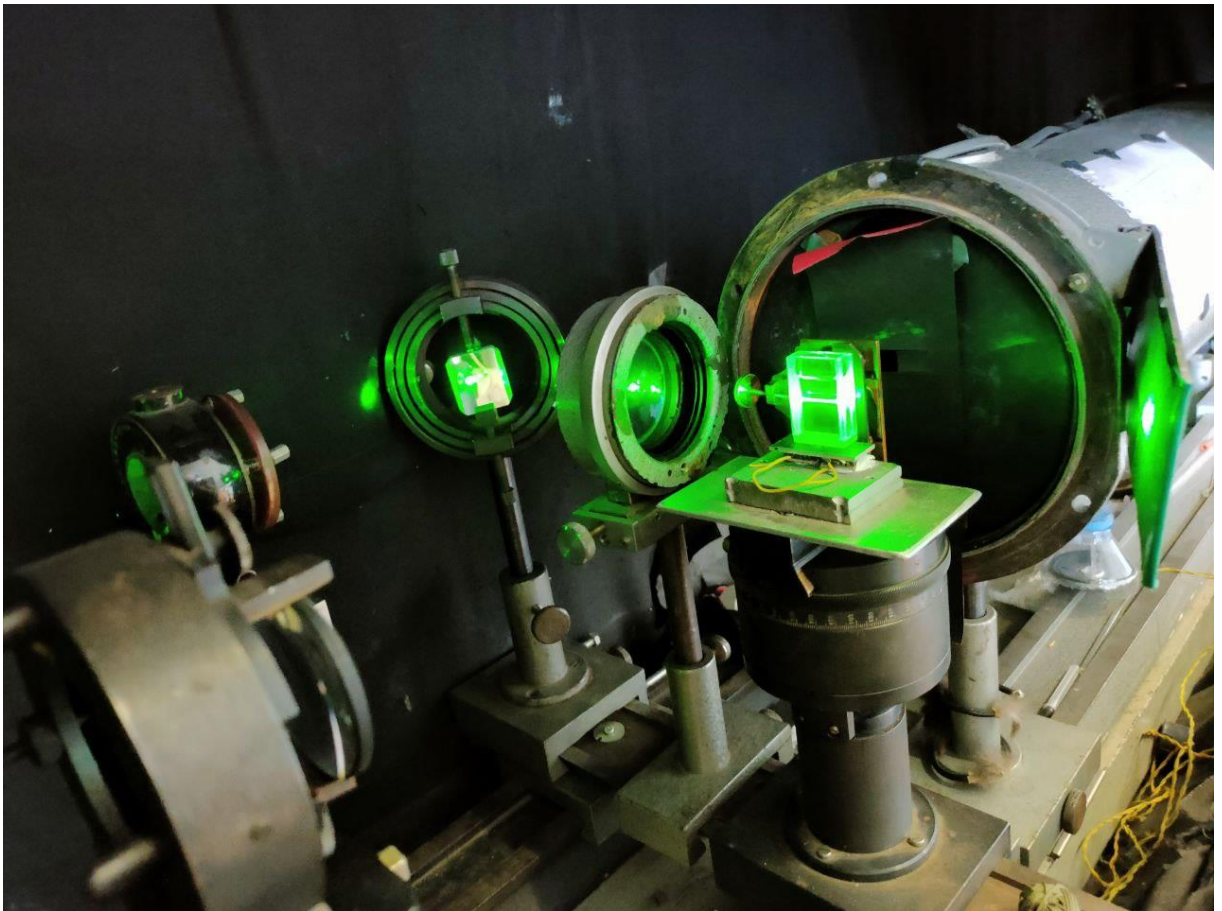


Рис. 16. Установка для визначення статичних параметрів макромолекул альбуміну у водних розчинах методом лазерної кореляційної спектроскопії.

Для обробки результатів використовувався алгоритм розкладання кореляційної функції по експонентам. В цьому випадку результат представляється у вигляді розподілу інтенсивності розсіяного світла за характерними часами кореляції частинок, за якими можна розрахувати коефіцієнт дифузії та відповідний гідродинамічний радіус частинок.

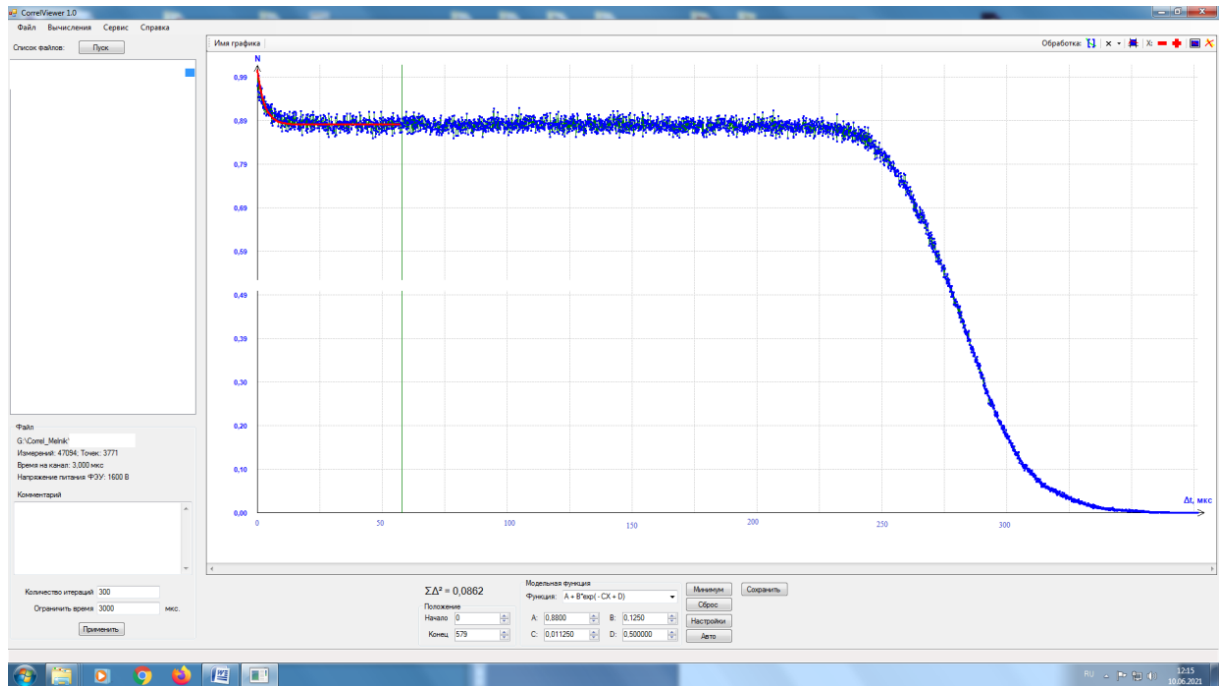


Рис. 17. Робоче вікно програми CorrelViewer, яка дозволяє переглядати та обробляти (апроксимувати) отримані в ході експерименту автокореляційні функції.

Під час проведення дослід з фотонної кореляційної спектроскопії зразки освітлювалися лазерним випромінюванням з довжиною хвилі 523 нм під кутом 90 градусів. Вдалося отримати характерний час та розрахувати гідродинамічний радіус лише для фармакологічного розчину альбуміну (200 мг/см³). Характерний час флуктуацій інтенсивності при такій концентрації становить 8-10 мкс, а отже гідродинамічний радіус приблизно дорівнює 1 нм, що відповідає двом молекулам альбуміну. При нижчих концентраціях (близьких до нативних) неможливо розрахувати гідродинамічний радіус, оскільки немає характерного часу флуктуацій інтенсивності розсіяного випромінювання.

РЕЗУЛЬТАТИ РОБОТИ ТА ВИСНОВКИ

1. Отримана залежність показника заломлення водних розчинів альбуміну від його концентрації показує, що аналогічно раніше отриманим залежностям коефіцієнту зсувної в'язкості та густини можна виділити концентрацію 5 мг/см^3 як особливу. Ця концентрація відповідає емпіричному правилу «гематологічна границя», за якої кровозаміна не може відбуватися у об'ємах більших за 10% загального об'єму крові.

2. Середня інтенсивність розсіяного водними розчинами альбуміну людини має за концентрації 5 мг/см^3 максимум, що можна пояснити виникненням великої кількості оптичних неоднорідностей. Необхідне додаткове дослідження індикатриси розсіяння інтенсивності розсіяння для підтвердження субмікронних масштабів надмолекулярних утворень.

3. Динамічне розсіяння світла показує, що за максимальних концентрацій водних розчинів альбуміну людини (фармакологічна форма 20%) спостерігаються характерні часи інтенсивності розсіяного світла 8-10 мкс при куті розсіяння 90 градусів та довжині лазерного випромінювання 532 нм. Визначений гідродинамічний радіус складає за цих концентрацій $\sim 1 \text{ нм}$. При наближенні до максимуму розсіяння при концентраціях близьких до нативних спектр характерних часів стає нескінченно широким, що можливо або при дуже великих неоднорідностях, або при великому розкиді їх характерних розмірів.

Список використаних літературних джерел

1. Bulavin, L.A., Gotsulskyi, V.Y., Malomuzh, N.P., Fisenko, A.I. Crucial role of water in the formation of basic properties of living matter// Ukrainian Journal of Physics, 2020, 65(9), pp. 788–795
2. Malomuzh, N.P., Bulavin, L.A., Gotsulskyi, V.Y., Guslisty, A.A. Characteristic changes in the density and shear viscosity of human blood plasma with varying protein concentration// Ukrainian Journal of Physics, 2020, 65(2), pp. 149–154.
3. P. W. Atkins, Physical Chemistry, 4th Ed., Oxford University Press, Oxford, 1994.
4. Cummins H. Z. Photon Correlation and Light Beating Spectroscopy / H. Z. Cummins [Eds H. Z. Cummins, E.R. Pike]. — Plenum Press, New York, 1974.
5. Физическая химия. В 2 кн. Кн. 1. Строение вещества. Термодинамика: Учеб, для вузов / К.С. Краснов, Н.К. Воробьев, И.Н. Годнев и др.; Под ред. К.С. Краснова — 2-е изд., перераб. и доп. — М.: Высш. шк., 1995. — 512 с.
6. Власова О. Л. Экспериментальные методы исследований. Физикохимические основы многопараметрического оптического анализа иодисперсий: учеб. пособие / О. Л. Власова. — СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2013. — 117 с.
7. Биофизические основы работы с белками. Протоколы : учебное пособие / Я. А. Забродская [и др.]. — СПб., 2020. — 83 с.
8. Метод динамического рассеяния света. Физические основы и области применения: учеб. пособие / Е.Н. Величко, Э.К. Непомнящая, Е.А. Савченко. — СПб.: ПОЛИТЕХ-ПРЕСС, 2019. — 116 с.
9. Куликов К. Г., Кошлан Т. В. Определение размеров коллоидных частиц при помощи метода динамического рассеяния света // Журнал технической физики. — 2015. — Т. 85. — №. 12. — С. 26-32.

10. Стромберг А. Г., Семченко Д. П. Физическая химия — М. : Высшая школа, 1999. — 527 с.
11. Степанов В.М. Молекулярная биология. Структура и функции белков: Учеб. для биол. спец. вузов / Под ред А.С. Спирина. – М.: Высшая школа, 1996. – 335 с.
12. Лопатин В. Н. Методы светорассеяния в анализе дисперсных биологических сред. Москва: Физматлит, 2004.
13. Спектроскопия оптического смешения и корреляция фотонов, под ред. Г. Камминса и Э. Р. Пайка. Наука, М., 1978
14. Pike E. R., Abbiss J. B. Light Scattering and Photon Correlation Spectroscopy // E. R. Pike, J. B. Abbiss. — Kluwer Academic Publishers, 1997.
15. Лебедев А.Д. Лазерная корреляционная спектроскопия в биологии. Киев: Наук. думка, 1987.
16. Dynamic Light Scattering. Applications of Photon Correlation Spectroscopy [eds. R. Pecora]. – N.Y.: Plenum Press, 1985. – 420 p.
17. Petrucci, Ralph H.; Harwood, William S.; Herring, F. Geoffrey (2002). General Chemistry (8th ed.). Prentice-Hall. p. 557-558.
18. Behrens P. Q., Spiekerman A. M., Brown J. R. Structure of HSA // Fed. Proc. Fed. Am. Soc. — Exp. Biol. — 1975. — Vol. 34. — P. 591.
19. Ghuman J., Zunszain P. A., Curry S. Structural analysis of ligands binding to human serum albumin // J. Biol. Chem. — 2000. — Vol. 275. — P. 12743—12751.
20. Carter D. C., Ho J. X. Structure of serum albumin // Adv. Protein Chem. — 1994. — Vol. 45. — P. 153-196.
21. Биологическая химия и молекулярная биология: Руководство к лабораторным работам/ФГОУ ВПО «Сибирский федеральный университет», кафедра биохимии и физиологии человека и животных; сост. Н. М.Титова, Т. Н.Замай, Г. И. Боровкова. – Красноярск, 2007. – с.

22. Размер молекулы сывороточного альбумина человека в растворе /М. А. Киселев [и др.] // Биофизика. – 2001. – Т. 46, вып. 3. — С. 423-427.
23. Власова О.Л., Безрукова А.Г. Физико-химические основы оптического анализа структуры и состава биосистем в медицине: Учеб. пособие. СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2004. 75с.
24. Иоффе Б. В., Рефрактометрические методы химии, 3 изд., Л., 1983.
25. Волькенштейн М. В. Молекулярная оптика. М.-Л: ГИТТЛ, 1951.
26. Волькенштейн М. В. Молекулярная биофизика. Монография. Изд-во Наука, М., 1975 – 516 с.
27. Нейтронна діагностика рідкого стану речовини: монографія / Л. А. Булавін; НАН України, Ін-т проблем безпеки АЕС. – Чорнобиль (Київ. обл.) : Ін-т проблем безпеки АЕС, 2012. – 532 с.
28. Цветков В. Н., Эскин В. Е., Френкель С. Я. Структура макромолекул в растворах. М.: Наука, 1964.
29. Эскин, В. Е. Рассеяние света растворами полимеров и свойства макромолекул. Л.: Наука, 1986.
30. Курс загальної фізики : підруч. для студ. ВНЗ : у 6 т. / ОНУ ім. І.І. Мечникова; за заг. ред. В. А. Сминтина. – Одеса : Астропринт, 2011. - Т.4 : Оптика / В. А. Сминтина, Ю. Ф. Ваксман. – 2012. – 275 с.
31. Debye P. Light scattering in solutions. // Journal Appl. Phys. – 1944 – № 15. – P.338-349.
32. Левшин Л.В., Салецкий А.М. Оптические методы исследования молекулярных систем. // М.: Изд. Московского университета, 1994. – 320 с.
33. Pecora R. Spectrum of Light Scattered from Optically Anisotropic Macromolecules // J. Phys. Chem. C. - 1968. - V.49. - I.3. - P.P. 1036 - 1043.