

БИОФИЗИКА И МЕДИЦИНСКАЯ ФИЗИКА

Исследование модельных растворов сыворотки крови методом динамического рассеяния света

И. М. Папок^{1,а}, Г. П. Петрова¹, К. А. Аненкова¹, Е. А. Папиш²

¹Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, физический факультет, кафедра молекулярной физики. Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 2.

²Российская медицинская академия последипломного образования, кафедра радиологии. Россия, 125284, Москва, 2-й Боткинский пр., д. 7.

E-mail: ^аirinapapok@mail.ru

Статья поступила 15.05.2012, подписана в печать 16.06.2012.

Методом фотонно-корреляционной спектроскопии были исследованы молекулярно-динамические процессы, происходящие в модельных растворах сыворотки крови при изменении поверхностного заряда макромолекул и концентрации раствора. Изучение характера полученных зависимостей коэффициента трансляционной диффузии (D_t) от показателя рН среды и от концентрации позволило сделать вывод о возможности использования метода динамического рассеяния света для диагностики распространенных заболеваний, таких как сердечно-сосудистые и онкологические.

Ключевые слова: бычий сывороточный альбумин, гамма-глобулин, модельные растворы сыворотки крови, динамическое рассеяние света, фотонно-корреляционная спектроскопия, корреляционная функция, коэффициент трансляционной диффузии.

УДК: 553. PACS: 36.20.-г.

Введение

Изучение белков как основного составного элемента живой природы, а также оценка влияния внешних факторов на белковые системы представляет собой огромный интерес для современной медицинской биофизики и молекулярной физики. Это связано с тем, что белки в виде водных растворов присутствуют во всех живых организмах, определяя многие жизненно важные функции [1].

Развитие патологических процессов в организме, таких как сердечно-сосудистые и онкологические заболевания, сопровождается изменениями ряда молекулярных параметров в клетках, тканях, а также в сыворотке крови. Поэтому исследование поведения белковых макромолекул в растворах, которые могут быть использованы в качестве моделей сыворотки крови или лимфы, является очень важным моментом для понимания процессов, происходящих в живых организмах.

Решающую роль в успешном лечении таких распространенных заболеваний, как сердечно-сосудистые и онкологические, играет их ранняя диагностика. В современной медицине ведутся работы по исследованию различных методов диагностики онкологических заболеваний. В настоящее время для этой цели применяется такая сложная дорогостоящая аппаратура, как, например, ЯМР-томограф. К сожалению, такая уникальная аппаратура, имеющаяся в единичных экземплярах в наиболее крупных медицинских центрах, не может обеспечить массовую профилактическую диагностику заболеваний на ранних стадиях их развития. Поэтому создание достаточно простых, недорогих, надежных и эффективных диагностических методов остается актуальной проблемой медицины.

В настоящей работе приводятся результаты экспериментов по исследованию модельных растворов сыво-

ротки крови при изменении параметров раствора, таких как поверхностный заряд макромолекул и концентрация белка, методом динамического рассеяния света, анализ которых позволил сделать вывод о возможности использования метода динамического рассеяния света для диагностики распространенных заболеваний.

Метод динамического рассеяния

Метод динамического рассеяния света позволяет определить коэффициент диффузии дисперсных частиц в жидкости путем анализа характерного времени флюктуаций интенсивности рассеянного света [2].

Хаотическое броуновское движение дисперсных частиц вызывает микроскопические флюктуации их локальной концентрации. В свою очередь эти флюктуации приводят к локальным неоднородностям показателя преломления среды. При прохождении лазерного луча через такую среду часть света будет рассеяна на этих неоднородностях. Флюктуации интенсивности рассеянного света будут соответствовать флюктуациям локальной концентрации дисперсных частиц. Информация о коэффициенте диффузии частиц может быть получена из автокорреляционной функции сигнала рассеянного света. Автокорреляционная функция описывает связь между сигналом в момент времени τ и $\tau + d\tau$:

$$G(t) = \langle I(t) \cdot I(t + \tau) \rangle. \quad (1)$$

Соответствующий метод определения корреляционной функции называется методом корреляции фотонов, или методом фотонно-корреляционной спектроскопии (ФКС) [2, 3].

В простейшем случае монодисперсного раствора, содержащего невзаимодействующие сферические частицы одного размера, можно показать, что спектр мощности фототока представляет собой лоренцевскую кривую

с полушириной Γ , а нормированная автокорреляционная функция сигнала — экспоненту со временем релаксации $\tau_{\text{rel}} = 1/\Gamma$:

$$g_1(\tau) = e^{-\Gamma t}. \quad (2)$$

Полуширина рассеянного света Γ определяется формулой

$$\Gamma = D_t q^2, \quad (3)$$

где D_t — коэффициент трансляционной диффузии броуновских частиц, который связан с гидродинамическим радиусом частицы формулой Стокса–Эйнштейна

$$D_t = \frac{kT}{6\pi\eta R} \quad (4)$$

где k — константа Больцмана, T — абсолютная температура, η — вязкость растворителя, q — модуль вектора рассеянной волны, который определяется формулой

$$q = k_i - k_s = \left(\frac{4\pi n}{\lambda} \right) \sin \frac{\theta}{2}, \quad (5)$$

где k_i — волновой вектор падающего излучения, k_s — волновой вектор рассеянного излучения, n — показатель преломления среды, λ — длина волны рассеянного излучения в вакууме, θ — угол рассеяния.

Нормированная автокорреляционная функция интенсивности $g_2(t)$ связана с нормированной автокорреляционной функцией сигнала $g_1(t)$ следующим образом:

$$g_2(\tau) = 1 + g_1(\tau)^2 = 1 + e^{-2\Gamma t}. \quad (6)$$

Уравнение (6) известно как соотношение Зигерта и позволяет вычислить через нормированную автокорреляционную функцию сигнала $g_1(t)$ нормированную автокорреляционную функцию интенсивности $g_2(t)$, накапливаемую коррелятором во время эксперимента [2, 4].

В случае полидисперсных растворов, когда размеры частиц различаются, спектр фототока представляет собой непрерывное множество (интеграл) лоренцевых кривых с разными полуширинами. Следовательно, для нахождения распределения частиц по размерам (коэффициентам диффузии) необходимо решать обратную спектральную задачу в виде интегрального уравнения с лоренцевым ядром:

$$g_1(t) = \int P(\Gamma) e^{-\Gamma t} d\Gamma. \quad (7)$$

Интегральное уравнение (7) формирует основной принцип обработки данных в методе фотонно-корреляционной спектроскопии. Это уравнение относительно $P(\Gamma)$ — интегральное уравнение Фредгольма первого рода, известное в математике как некорректно поставленная задача, т. е. задача с принципиально отсутствующим алгоритмом нахождения точного решения. В связи с этим разрабатываются различные приближенные методы решения, многие из которых дают весьма хорошие результаты.

В проводимых экспериментах обработка результатов производилась с помощью программного обеспечения Alango Dynals, в котором поиск приближенного решения (6) осуществляется с помощью метода регуляризации А. Н. Тихонова для интегральных уравнений [5].

В работе [4] показано, что данный метод может быть применен для исследования молекулярной подвижно-

сти в растворах заряженных молекул. Коэффициенты диффузии заряженных и нейтральных молекул могут различаться согласно формуле (8):

$$D_t = D_0 \{ 1 + 2BM - [\eta]c \}, \quad (8)$$

где D_0 — коэффициент диффузии в изоэлектрической точке, B — вириальный коэффициент межмолекулярного взаимодействия, c — концентрация раствора, M — масса частицы, $[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta - \eta_0}{c\eta}$ — характеристическая вязкость, зависящая от электростатического взаимодействия молекул, η_0 — вязкость растворителя. В формуле (8) зависимость от зарядового состояния белковой молекулы в явном виде отсутствует, однако вириальный коэффициент и характеристическая вязкость $[\eta]$ являются функциями электростатических параметров макромолекул, что и обуславливает зависимость D_t от поверхностного заряда макромолекул [4, 5].

Экспериментальная установка и материалы

Макромолекулы белков представляют собой сложные полимерные структуры с молекулярной массой до нескольких сотен тысяч единиц Да. На поверхности молекул белков могут находиться до нескольких сотен заряженных групп, что обуславливает большие значения дипольных моментов белковых молекул — до 1000 единиц Дебая. Наличие больших дипольных моментов у белковых макромолекул обуславливает сильное электростатическое взаимодействие между ними, а также между молекулами полярного растворителя и заряженными поверхностными группами белка. Это в свою очередь влияет на характер броуновской динамики молекул [1, 6]. В растворе белки представляют собой полиэлектролиты, при этом суммарный заряд на поверхности белка может изменяться в широких пределах в зависимости от концентрации свободных протонов [7].

В работе использовались растворимые белки — бычий сывороточный альбумин и гамма-глобулин фирмы «Sigma». В табл. 1 приведены молекулярные веса, значения изоэлектрических точек, значения коэффициентов трансляционной диффузии в нейтральной среде этих белков. В ходе экспериментов проводилось исследование отдельно водных растворов альбумина и гамма-глобулина, а также растворов смеси белков альбумина и гамма-глобулина, которые могут быть использованы в качестве моделей биологических жидкостей, таких как кровь или лимфа, при различных массовых соотношениях. В табл. 2 приведены значения масс белков используемых для приготовления модельных растворов. Определенное значение pH ниже нейтрального для H_2O достигалось добавлением соляной кислоты HCl, для повышения pH использовалась щелочь KOH.

Взвешивание белков проводилось на электронных аналитических весах ВЛР-20, при этом достигалась точность до 0,1 мг. Растворы готовились в медицинских ампулах емкостью 5 мл с использованием фабричной медицинской воды для инъекций. Для измерения значений водородного показателя среды применялся pH-метр Mettler Toledo-MP220, который позволяет измерить pH с точностью до 0,01 единиц.

Таблица 1
Характеристики белков

	Молекулярная масса, г/моль	Изоэлектрическая точка, рН	Коэффициент трансляционной диффузии белков в нейтральной среде (рН 7.0) $D_t \cdot 10^{-7}$, см ² /с
Бычий сывороточный альбумин	68 000	4.9	5.6
Гамма-глобулин	200 000	6.0	3.7

Таблица 2
Массовые соотношения белков в модельных растворах [10]

	Альбумин, мг	Гамма-глобулин, мг
Модельный раствор сыворотки «здоровой» крови	5.5	1.6
Модельный раствор сыворотки крови «группы риска»	3.5	3.5
Модельный раствор сыворотки «больной» крови	1.6	5.5

Эксперименты по исследованию модельных растворов сыворотки крови проводились на установке Photocor Compact. Принцип работы анализатора размеров частиц Photocor Compact основан на методе динамического рассеяния света. В качестве источника излучения используется термостабилизированный диодный лазер с длиной волны 650 нм. Поляризованный пучок света подается на цилиндрическую стеклянную кювету с исследуемым раствором. Рассеянный под углом 90° свет регистрируется фотоэлектронным умножителем, сигнал с которого затем поступает на резонансный усилитель и отображается на экране компьютера.

Обработка данных проводится в программе Alango Dynals. Данная программа рассчитывает коэффициент трансляционной диффузии и радиус частиц и выводит результаты в виде графиков и таблиц. Диапазон измерений размеров частиц: от 0.5 нм до 6 мкм; коэффициента диффузии: $10^{-5} - 10^{-10}$ см²/с. Типичная погрешность измерений составляет 5–10% [8].

Экспериментальные результаты

Методом динамического рассеяния света были получены зависимости коэффициентов трансляционной диффузии D_t рассеивающих центров от значений рН и от концентрации белков в исследуемых растворах (рис. 1–4).

Из рис. 1 видно, что коэффициенты D_t для раствора бычьего сывороточного альбумина и раствора гамма-глобулина зависят от заряда на поверхности

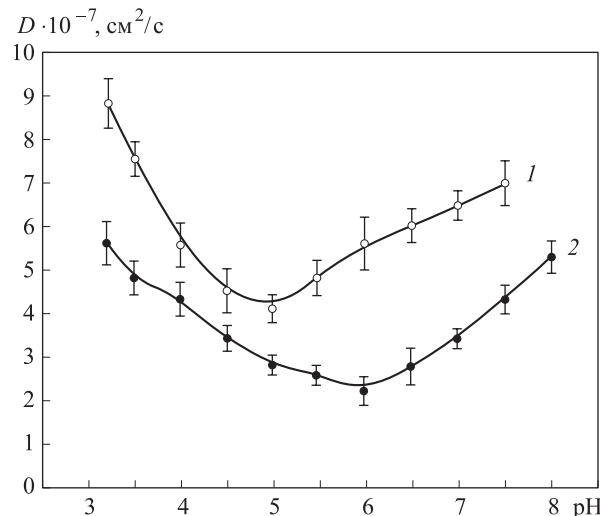


Рис. 1. Зависимость коэффициента трансляционной диффузии D_t от показателя рН: для водного раствора бычьего сывороточного альбумина (кривая 1, концентрация белка $c = 0.5$ мг/мл), для водного раствора гамма-глобулина (кривая 2, концентрация белка $c = 1$ мг/мл)

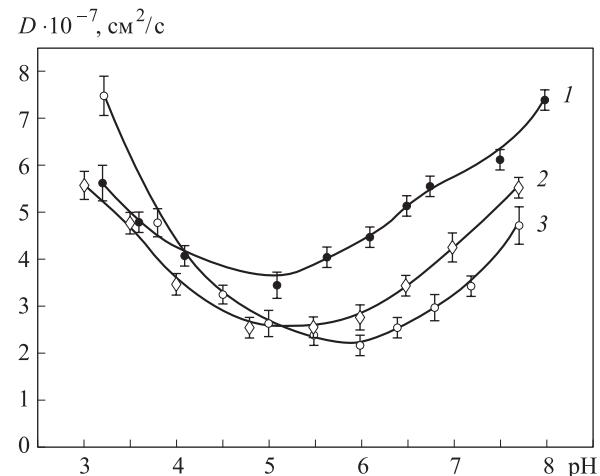


Рис. 2. Зависимость коэффициента трансляционной диффузии D_t от показателя рН: для модельного раствора сыворотки «здоровой» крови (кривая 1, концентрация белка $c = 0.5$ мг/мл), для модельного раствора сыворотки крови «группы риска» (кривая 2, концентрация белка $c = 0.5$ мг/мл), для модельного раствора сыворотки «больной» крови (кривая 3, концентрация белка $c = 0.5$ мг/мл)

белка (рН) нелинейным образом с минимумом в соответствующей изоэлектрической точке, что согласуется в результатаами, приведенными в работах [4, 7].

Для модельных растворов (рис. 2) зависимости $D_t(pH)$ имеют нелинейный характер. При этом наблюдается минимум зависимости от рН для модельного раствора сыворотки «здоровой» крови при $pH \approx 4.9$, что соответствует изоэлектрической точке альбумина; для модельного раствора сыворотки «больной» крови при $pH \approx 6$, что соответствует изоэлектрической точке гамма-глобулина, и для модельного раствора сыворотки крови «группы риска» при $pH \approx 5$, что соответствует изоэлектрической точке альбумина. Наличие таких

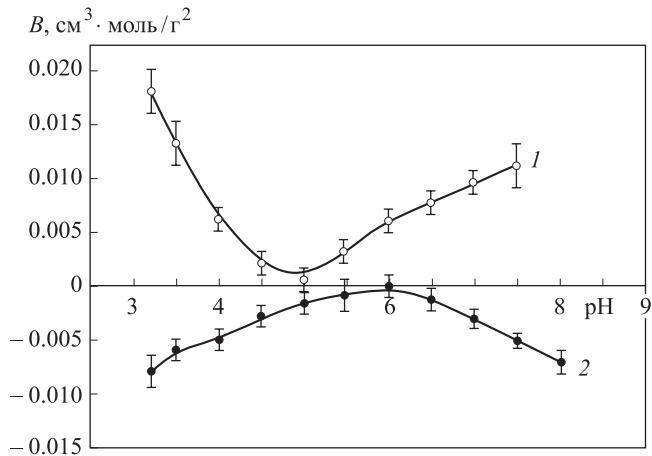


Рис. 3. Зависимость второго вириального коэффициента B от pH: для водного раствора бычьего сывороточного альбумина (кривая 1), для водного раствора гамма-глобулина (кривая 2)

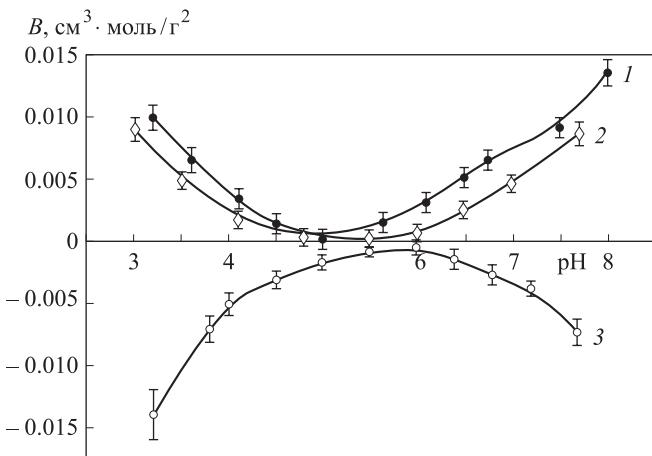


Рис. 4. Зависимость второго вириального коэффициента B от pH: для модельного раствора сыворотки «здоровой» крови (кривая 1), для модельного раствора крови сыворотки «группы риска» (кривая 2), для модельного раствора сыворотки «больной» крови (кривая 3)

положений минимумов можно объяснить тем, что в модельном растворе сыворотки «здоровой» крови преобладает альбумин, а в модельном растворе сыворотки «больной» крови гамма-глобулин, их наличие и задает характер полученных зависимостей.

Экспериментальные данные для $D_t(\text{pH})$ были использованы для расчета зависимостей $B(\text{pH})$ по формуле (8) (рис. 3, 4). Характер зависимостей $B(\text{pH})$ полученных графиков совпадает с характером зависимостей $B(\text{pH})$ для кривых, полученных непосредственно из эксперимента по статическому рассеянию [9].

Параболический вид зависимостей, представленных на рис. 5 и 6, согласуется с теорией Скэтчарда [10]. Согласно данной теории, парные взаимодействия в растворах частиц, содержащих кроме низкомолекулярного растворителя еще и третью компоненту — сильный электролит, описываются вторым вириальным коэффициентом в разложении для свободной энергии:

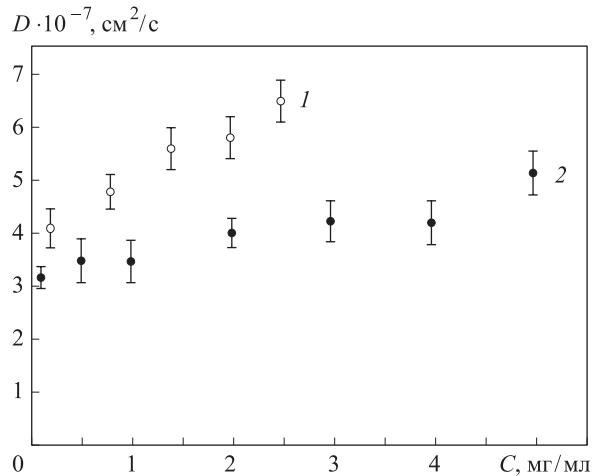


Рис. 5. Зависимость коэффициента трансляционной диффузии D_t от концентрации белка при pH 7.0: для водного раствора бычьего сывороточного альбумина (кривая 1), для водного раствора гамма-глобулина (кривая 2)

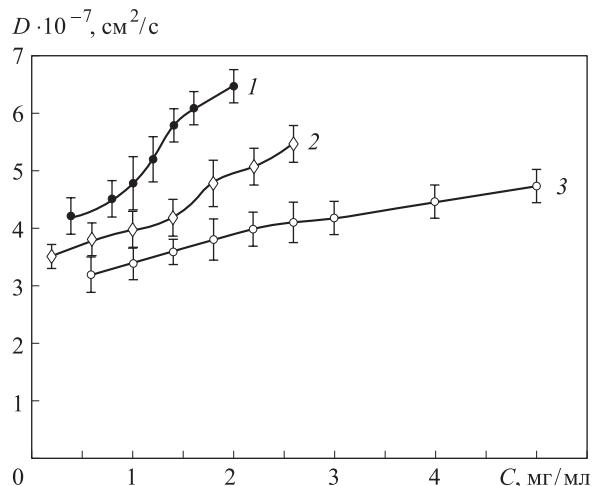


Рис. 6. Зависимость коэффициента трансляционной диффузии D_t от концентрации белка при pH 7.0: для модельного раствора сыворотки «здоровой» крови (кривая 1), для модельного раствора сыворотки крови «группы риска» (кривая 2), для модельного раствора сыворотки «больной» крови (кривая 3)

$$B = \frac{V_1}{M_2^2} \left(\frac{Z^2}{4m_3} + \frac{\beta_{22}}{2} - \frac{\beta_{23}^2 m_3}{4 + 2\beta_{33} m_3} \right). \quad (9)$$

Здесь V_1 — удельный объем растворителя, Z — заряд макроиона, M_2 — масса макроиона, m_3 — концентрация ионов соли. Параметры β_{ij} характеризуют различные взаимодействия между ионами в растворе: эффект исключенного объема и взаимодействие между парами ионов (индекс 2 — макромолекула белка, 3 — ион соли). Коэффициент взаимодействия меняется с ростом суммарного заряда на белке по параболическому закону (эффект Доннана) с минимумом в изоэлектрической точке.

На рис. 5 и 6 представлены зависимости коэффициента трансляционной диффузии D_t от концентрации белка в растворе при pH 7.0. По приведенным кривым видно, что при увеличении концентрации белка коэффициент диффузии увеличивается. Такой аномальный

рост коэффициента диффузии при увеличении концентрации объясняется на основе теории, предложенной Джеймсом и Эвансом:

$$D_t = D_0(1 - \lambda_H c + \lambda_s c), \quad (10)$$

где коэффициент λ_H , связанный с гидродинамическими потерями энергии, значительно меньше коэффициента λ_s , связанного с электростатическими потерями энергии [11].

Как видно из рис. 5, график зависимости $D_t(c)$ для водного раствора альбумина имеет больший наклон, чем график зависимости $D_t(c)$ для водного раствора гамма-глобулина. Полученный результат объясняется тем, что при pH 7.0, при котором проводились измерения, макромолекулы альбумина имеют больший поверхностный заряд, чем макромолекулы гамма-глобулина, так как изоэлектрическая точка альбумина лежит дальше от нейтрального значения pH 7.0. Это приводит к тому, что для раствора альбумина коэффициент λ_s , связанный с электростатическими силами, больше, чем для раствора гамма-глобулина.

Из рис. 6 видно, что графики зависимостей $D_t(c)$ для модельных растворов также имеют разный наклон. Это связано с тем, что наклон зависимости $D_t(c)$ для модельного раствора сыворотки «здоровой» крови определяется наклоном графика зависимости $D_t(c)$ для водного раствора альбумина, что связано с преобладанием альбумина в модельном растворе сыворотки «здоровой» крови. Аналогичная картина наблюдается для модельного раствора сыворотки «больной» крови, в котором характер зависимости задает гамма-глобулин.

Заключение

С помощью метода фотонно-корреляционной спектроскопии были исследованы изменения коэффициента трансляционной диффузии, происходящие в модельных растворах сыворотки крови при изменении поверхностного заряда макромолекул и концентрации белка в растворе.

По результатам проведенных экспериментов установлено, что зависимости коэффициента трансляцион-

ной диффузии от поверхностного заряда макромолекул и концентрации раствора существенно различаются для модельных растворов сыворотки крови «здорового» и «больного» человека, в частности графики зависимости $D_t(\text{pH})$ различаются положением минимума коэффициента трансляционной диффузии, а графики зависимости $D_t(c)$ — тангенсами угла наклона. Изучение характера полученных зависимостей и сравнение экспериментальных данных с теорией позволили предположить, что данный метод исследования сыворотки крови, а именно исследование сыворотки крови методом динамического рассеяния света, может быть применим для диагностики онкологических заболеваний.

Стоит заметить, что преимуществом метода динамического рассеяния света как диагностического является то, что он позволяет определить измеряемые параметры образца за время порядка минуты и не требует большого количества сыворотки крови.

Список литературы

1. Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж. и др. Молекулярная биология клетки. М., 1994.
2. Камминс Г.З., Пайк Е.Р. Спектроскопия оптического смешения и корреляция фотонов. М., 1978.
3. Pecora R. Dynamic light scattering from macromolecules. Stanford, 1984.
4. Петрова Г.П. Оптические спектральные методы исследования жидкостей и растворов. Ч. 2. М., 2009.
5. Петрова Г.П., Петрусеевич Ю.М. // Биомед. радиоэлектрон. 2000. № 3. С. 41.
6. Эскин В.Е. Рассеяние света растворами полимеров и свойства макромолекул. Л., 1986.
7. Бойко А.В., Гаркуша Е.В., Петрова Г.П. и др. // Структурные фазовые переходы в растворах белков, содержащих ионы легких и тяжелых металлов. Препринт МГУ. 2005. № 2. С. 1303.
8. <http://www.photocor.ru> (официальный сайт компании «Фотокор»).
9. Petrova G.P., Boiko A.V. // Laser Phys. 2009. N 6. P. 1308.
10. Петрова Г.П. Оптические спектральные методы исследования жидкостей и растворов. Ч. 1. М., 2008.
11. Бриллиантов В.Н., Ревокатов О.П. Молекулярная динамика неупорядоченных сред. М., 1996.

Investigation of blood serum model solution by dynamic light scattering

I. M. Papok^{1,a}, G. P. Petrova¹, K. A. Anenkova¹, E. A. Papish²

¹Department of Molecular Physics, Faculty of Physics, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow 119991, Russia.

²Department of Radiology, Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow 125284, Russia.
E-mail: ^airinapapok@mail.ru.

We investigated molecular-dynamic processes occurring in the blood serum model solution at different net charge and concentration of protein. In our research we used the method of photon-correlation spectroscopy. Obtained dependences between translational diffusion coefficient (D_t) on the solution's concentration and pH suggest the possibility of using dynamic light scattering method for the common diseases diagnostics such as cardiovascular and oncology diseases.

Keywords: bovine serum albumin, gamma globulin, the model solutions of blood serum, photon-correlation spectroscopy, dynamic light scattering, correlation function, mass diffusivity.

PACS: 36.20.-r.

Received 15 May 2012.

English version: *Moscow University Physics Bulletin* 5(2012).

Сведения об авторах

1. Папок Ирина Михайловна — студентка; e-mail: irinapapok@mail.ru.
2. Петрова Галина Петровна — докт. физ.-мат. наук, профессор; e-mail: petrova@phys.msu.ru.
3. Аненкова Ксения Александровна — аспирантка; e-mail: ksensanna@gmail.com.
4. Папиш Елена Андреевна — ст. науч. сотрудник; тел.: (495) 483-57-76.