

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ ФИЗИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ ИМ. П.Н. ЛЕБЕДЕВА РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

УДК 535.36:53.088:612.11:612.398.1

Кириченко Марина Николаевна

**ДИНАМИКА РАЗМЕРОВ И КОНЦЕНТРАЦИЙ БЕЛКОВ И ИХ
КОМПЛЕКСОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ IN VITRO ПО ДАННЫМ
СВЕТОРАССЕЯНИЯ**

Специальность – 01.04.05

ОПТИКА

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва – 2015

Работа выполнена в Лаборатории нелинейной оптики и рассеяния света Отделения Оптики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Физический институт им. П.Н. Лебедева Российской академии наук (ФИАН)

Научный руководитель: кандидат физико-математических наук
Чайков Леонид Леонидович (ФИАН)

Официальные оппоненты:

доктор физико-математических наук
Иванов Андрей Валентинович (РОНЦ им. Н.Н. Блохина)

кандидат физико-математических наук
Красовский Виталий Иванович (ИОФАН)

Ведущая организация: Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Защита состоится «15» июня 2015 года в 12-00 часов на заседании диссертационного совета Д 002.023.03 при ФИАН по адресу: г. Москва, Ленинский проспект, д.53.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФИАН, с авторефератом – на сайте института www.lebedev.ru

Автореферат разослан « » _____ 2015 г.

Отзывы на автореферат просим присылать по адресу: 119991 ГСП-1 г. Москва, Ленинский проспект, д.53, ФИАН, Отделение Оптики.

Учёный секретарь
диссертационного совета Д 002.023.03
доктор физико-математических наук,

профессор Казарян М.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Работа посвящена исследованию плазмы крови методами динамического и статического рассеяния света, изучению изменений ее характеристик во времени, связи концентраций частиц плазмы крови и их размеров, а также применимости теорий и моделей, описывающих интенсивность рассеяния и диффузию частиц, для неразбавленной плазмы крови.

Актуальность работы

Исследования плазмы и сыворотки крови важны с точки зрения как фундаментальных проблем биофизики крови, так и диагностики заболеваний. Методы динамического и статического светорассеяния успешно применяются для исследования этих биологических объектов. С помощью методов динамического рассеяния света (ДРС) определяются гидродинамические радиусы белков, агрегатов и везикулярных частиц, в то время как методы статического светорассеяния позволяют получить молекулярные массы белков, коэффициенты их межмолекулярного взаимодействия и др.

В настоящее время изучение с помощью методов светорассеяния разбавленных образцов сыворотки [1] и плазмы крови [2], а также их модельных аналогов [3–5] привело к разработке методик диагностики различных заболеваний [6–10]. Авторами этих методик показано, что о наличии сердечно-сосудистых или онкологических заболеваний у пациента можно судить по изменению по сравнению с нормой перечисленных выше характеристик частиц сыворотки или плазмы крови. Так, появление в этих жидкостях агрегатов белков определенных размеров [8,10], изменение соотношения концентраций альбуминов и глобулинов в ней [9], а также изменение коэффициента межмолекулярного взаимодействия белков [8] могут свидетельствовать о сердечно-сосудистых, онкологических или других патологиях.

Наиболее часто исследуемым объектом в указанных работах является сыворотка крови, поскольку она считается «более чистой» по сравнению с плазмой крови. Это определяется, в первую очередь, тем, что последняя содержит в своем составе фибриноген, а также продукты его ферментативного распада и дальнейшей агрегации (фибриновые сгустки), образующиеся при запуске механизма свертывания крови [11]. Однако именно вопрос о влиянии этих процессов на размеры и концентрации частиц в плазме крови после ее взятия является чрезвычайно актуальным. В первую очередь, это связано с тем, что такие изменения могут отражаться на картине распределений частиц по размерам, получаемых с помощью ДРС, и приводить к постановке неправильного

диагноза. С другой стороны, информация о стабильности белков и их агрегатов в плазме крови важна для вопросов, связанных с ее хранением для переливаний.

Изучение динамики размеров и концентраций частиц в плазме крови дает также ценную информацию о процессах ферментативного распада белков и агрегации белков и частиц, существенную и с точки зрения биофизики крови. Ясно, что процессы могут по-разному протекать в разбавленной и неразбавленной плазме крови, в которой из-за относительно большой концентрации белков (6-8 мг/мл) возможно их взаимодействие. Поэтому актуальным является вопрос о применимости формулы Стокса-Эйнштейна [12,13], а также теории Ми и ее приближений [14–16] для определения размеров и концентраций частиц в неразбавленной плазме крови

Не менее важным обстоятельством, которое может повлиять на регистрируемые радиусы частиц является нестабильность разложения функции корреляции интенсивности рассеянного света по временам когерентности (и, следовательно, по размерам частиц) в случае многокомпонентных полидисперсных суспензий, каковой является и плазма крови. Такая нестабильность отмечалась ранее авторами [17], но пути решения этой проблемы без потери части информации так и не были разработаны. Поэтому весьма актуальным является предложение способа получения и обработки данных, позволяющего определить статистически достоверные размеры частиц в плазме крови.

Таким образом, работа является актуальной с точки зрения теории рассеяния света в полидисперсных средах, поскольку предлагается решение проблемы определения статистически достоверных размеров частиц с помощью методов ДРС и решается вопрос о применимости моделей для определения радиусов и концентраций в разбавленных и концентрированных суспензиях. Работа актуальна также с точки зрения биофизики крови, диагностики заболеваний и хранения донорской крови, поскольку дает информацию о размерах и концентрации белков и агрегатов крови, о соотношении между ними и об их изменении во времени.

Цель и задачи исследования

Цель работы – с помощью методов светорассеяния исследовать размеры и концентрации частиц в плазме крови и их изменение в течение 30 часов после взятия крови из организма.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

1) провести сравнение распределений интенсивности рассеянного света по размерам частиц $I(r)$ для образцов плазмы с гепарином и ингибиторами протеолитических ферментов с целью выбора антикоагулянта для исследований;

2) исследовать характер изменений размеров частиц и устойчивость получаемых результатов в течение 30 часов после взятия крови из организма;

3) получить распределения интенсивности рассеянного света по размерам частиц $I(r)$ в образцах плазмы крови через каждые 2-4 минуты, получить массив размеров частиц, достаточный для его статистической обработки и разработать методику определения статистически достоверных размеров.

4) исследовать изменение статистически достоверных размеров частиц в течение 30 часов после взятия крови из организма;

5) исследовать динамику интенсивности света, рассеянного образцом за 30 часов после взятия пробы крови из организма;

6) оценить концентрации частиц в приближении Релея-Ганса-Дебая (РГД) и их изменение в течение 30 часов, а также исследовать соответствие концентраций частиц их размерам;

7) получить и сравнить графики соответствия концентраций частиц их размерам для образцов размороженной плазмы крови с различным разбавлением физиологическим раствором (в 10 и 100 раз).

В качестве основных положений на защиту выносятся:

1) Методика получения статистически достоверных размеров частиц в плазме крови, основанная на многократном измерении распределений интенсивности рассеянного света по размерам частиц $I(r)$, формировании массива значений размеров и построении гистограммы числа их регистраций, исключающая неустойчивость отдельных измерений.

2) Устойчивость в течение 30 часов статистически достоверных размеров частиц, определяемых как положения максимумов гистограммы числа регистраций размеров частиц, в образцах плазмы крови здоровых доноров.

3) Колебательный характер временной зависимости полной интенсивности рассеянного света и уменьшение средней ее величины на 20% на вторые сутки наблюдений.

4) Связь между концентрациями N_p частиц в плазме крови и их размерами r , полученная по данным светорассеяния для сферической и цилиндрической формы частиц, выражаемая эмпирической формулой: $\log N_p = a \log r + b$. Причем коэффициент a в

диапазоне размеров от 1 нм до 25 нм для обеих моделей равен -3.99 ± 0.09 , в диапазоне от 25 нм до 300 нм - уменьшается (то есть наклон увеличивается), и увеличивается до первоначального значения в диапазоне размеров свыше 300 нм для цилиндрической модели.

5) Сохранение связи между концентрациями частиц N_p и их размерами r при разбавлении размороженной плазмы крови в 10 и 100 раз физиологическим раствором: $\log N_p = a \log r + b$. Причем коэффициент a для сферической модели частиц не меняется в диапазоне размеров от 1 нм до 200 нм, а для цилиндрической модели во всем диапазоне размеров (для неразбавленного образца $a = -3.98 \pm 0.16$, для разбавленного в 10 раз $a = -3.91 \pm 0.07$, для разбавленного в 100 раз $a = -4.03 \pm 0.05$).

Научная новизна диссертации

Проведенная работа позволила расширить возможности применения метода ДРС для исследования многокомпонентных систем, выявить новые характеристики плазмы крови, а также исследовать динамику этих характеристик в часовом масштабе времени. В диссертации были получены новые научные результаты.

1) Предложена новая методика обработки результатов, полученных с помощью метода динамического рассеяния света для образцов плазмы крови и других систем с многомодальным распределением частиц по размерам, основанная на формировании массива данных (размеров частиц), подсчете числа регистраций каждого из размеров и определении положений пиков гистограммы числа регистраций каждого размера.

2) С помощью предложенной методики впервые получена новая характеристика размерного состава плазмы крови *in vitro*: гистограмма числа регистраций размеров частиц $P(r)$, позволяющая определять статистически достоверные размеры частиц в образце;

3) Обнаружена новая закономерность: связь концентраций частиц N_p и их размеров r , которая в двойном логарифмическом масштабе описывается линейной зависимостью;

4) Впервые исследована динамика полной интенсивности рассеянного света $I_s(t)$ в плазме крови *in vitro*, и обнаружено уменьшение ее средней величины на вторые сутки наблюдений, свидетельствующее о том, что процессы протеолитической деградации белков приводят к перераспределению материала частиц в сторону частиц с малыми размерами.

Научная и практическая значимость исследования

Результаты настоящей диссертационной работы имеют *фундаментальное и прикладное значение*. В работе предложен оригинальный подход к получению и обработке данных, полученных с помощью методов ДРС, заключающийся в формировании массива значений размеров частиц, построении гистограммы числа регистраций этих размеров $P(r)$ и нахождении статистически достоверных размеров. Эти размеры оказались устойчивыми в течение 30 часов наблюдений, в то время как отдельные измерения интенсивности рассеянного света по размерам частиц такой устойчивостью не обладали. Обнаружена связь между концентрациями частиц N_p в плазме крови и их размерами r , график соответствия которых в двойном логарифмическом масштабе близок к линейной.

Предложенный подход к анализу данных расширяет также *возможности применения* методов светорассеяния для исследования сложных многокомпонентных систем и для решения прикладных задач медицинской практики. Например, при разработке методик диагностики нарушений обмена веществ обнаруженное постоянство статистически достоверных размеров плазмы крови, а также наклон диаграммы соответствия могут служить диагностическими критериями патологий. Кроме того, результаты работы могут помочь выработать критерии определения годности плазмы крови для переливания после ее хранения.

Личный вклад автора

Автор участвовал в постановке цели и задач диссертации, получал данные и самостоятельно их обрабатывал, играл определяющую роль в обсуждении результатов экспериментов. Подготовка образцов плазмы крови для измерений (зачастую объектом исследования служили образцы плазмы крови автора), обеспыливание кювет и юстировка установки ДРС проводились лично автором с некоторой помощью сотрудников лаборатории НОРС.

Для образцов плазмы крови различных доноров автором были получены большие массивы экспериментальных данных с помощью методов статического и динамического светорассеяния. Ею предложен и реализован специальный алгоритм обработки этих данных, позволивший построить гистограмму числа регистраций размеров частиц и определить статистически достоверные размеры частиц в плазме крови.

Автором был произведен расчет концентраций частиц в приближении Релея-Ганса-Дебая (РГД) и получена диаграмма соответствия концентраций частиц их размерам.

Проведенный при определяющем участии автора эксперимент с разбавлениями образцов размороженной плазмы крови показал адекватность применения формулы Стокса-Эйнштейна и приближения РГД для оценки концентраций частиц в плазме крови.

Апробация работы

Результаты работы были доложены и представлены на 7 международных и всероссийских конференциях и представлены в сборниках трудов, в том числе: в 2013 году на конференциях «Ломоносов-2013», «V Всероссийская молодежная конференция по фундаментальным и инновационным вопросам современной физики» в Москве (Россия); в Филадельфии «Biophysical Society 57th Annual Meeting» (США) и в Амстердаме «The 5-th EMBO Meeting» (Нидерланды), в 2014 году на конференциях в Сан-Франциско «Biophysical Society 58th Annual Meeting» (США) и в Москве «Ломоносов-2014» и на XV Школе молодых ученых «Актуальные проблемы физики» (Россия), (См. «Тезисы докладов» в конце автореферата).

Публикации

По материалам диссертационной работы имеется 8 публикаций, в числе которых 3 статьи в российских и международных научных журналах, входящих в перечень ВАК.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения, приложения и списка литературы. Объем диссертации составляет 135 страниц, включая 43 рисунка и 5 таблиц. Список литературы включает в себя 109 наименований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность работы, сформулирована цель и задачи, необходимые для ее решения, перечислены полученные в диссертации результаты, показана их новизна, а также научная и практическая ценность, представлены положения, выносимые на защиту, и описана структура диссертации.

Глава 1 посвящена обзору имеющейся литературы по теме диссертации.

В разделе 1.1. описана природа возникновения рассеяния света и кратко изложена теория этого явления. В разделе 1.2. приводится описание метода динамического рассеяния света (ДРС) и обсуждаются стратегии аппроксимации корреляционных функций света и решения обратной математической задачи для получения распределений

интенсивности рассеянного света по размерам частиц. В разделе 1.3. приводится обзор литературы, посвященной применению методов ДРС для исследования сыворотки и плазмы крови и диагностики ряда заболеваний. В разделах 1.3.1 – 1.3.7. проводится анализ литературных данных о размерах и концентрациях частиц в плазме крови. Раздел 1.4. посвящен описанию механизма свертывания крови, протекающих в плазме крови процессов, а также применения методов ДРС для исследования процессов деградации белков и агрегации продуктов распада белков в модельных растворах. Раздел 1.5. посвящен применению методов динамического и статического рассеяния света для изучения процессов агрегации белков в модельных растворах при изменении внешних условий – температуры (раздел 1.5.1.), pH (раздел 1.5.2) и концентрации аминокислот (раздел 1.5.3) и др.

Глава 2 посвящена описанию используемой в настоящей работе экспериментальной установки ДРС, построенной по традиционной схеме, а также описанию методики проведения экспериментов.

В разделе 2.1. представлена схема экспериментальной установки ДРС, подробно описан принцип работы коррелятора со сдвиговым регистром, а также указано используемое в работе программное обеспечение (Photocor и DynaLS). В разделе 2.2. перечислены особенности измерений размеров частиц, возникающие при исследовании сложных многокомпонентных и/или концентрированных образцов методами ДРС. В разделе 2.3. представлена методика подготовки кювет, образцов плазмы крови для экспериментов, перечислены химические вещества, используемые в работе для ингибирования процессов свертывания крови. Кроме того, представлены способы получения данных для исследования динамики размеров частиц в плазме крови и для формирования массивов регистрируемых размеров частиц в координатах время t – размер r .

В Главе 3 диссертации представлены полученные автором результаты исследования распределений интенсивности рассеянного света по размерам частиц и динамики этих размеров в образцах плазмы крови в течение 30 часов после взятия крови из организма. Эта глава включает также описание разработанной методики обработки данных измерений ДРС, которая позволила определить статистически достоверные размеры частиц в плазме крови.

В разделах 3.1. и 3.2. представлены результаты получения одиночных распределений интенсивности рассеянного света $I(r)$ по размерам частиц и проверки неизменности средних по пикам размеров частиц в плазме крови при изменении угла рассеяния θ (40, 60 и 90 градусов). Выяснено, что для исследуемых образцов плазмы крови распределения

состоят из 3-4 выраженных пиков, средние размеры по которым в диапазоне от 1 нм до 3000 нм соответствуют диффузионным модам движения частиц, а, следовательно, реальным частицам.

Разделы 3.3. и 3.4. посвящены выбору антикоагулянта для исследований динамики размеров частиц. Для этого проведено сравнение распределений $I(r)$ в образцах плазмы крови с добавлением гепарина и ингибиторов протеолитических ферментов и изменений во времени средних по пику размеров в них. Анализ полученных данных показал, что для исследования динамики наиболее предпочтителен гепарин, который, с одной стороны, предотвращает свертывание крови при взятии ее из организма, а, с другой стороны, ингибирует процессы в плазме в такой степени, что их можно исследовать на удобных для эксперимента временных интервалах. Результаты исследования влияния ингибиторов на средние размеры частиц в различных образцах представлены в работе автора [18].

В разделе 3.5. приведены среднеквадратичные погрешности измерений размеров частиц, полученные для образцов плазмы крови двух доноров (мужчин, 71 год и 73 года) по 3-4 измерениям распределений интенсивности по размерам частиц в 9 сериях измерений. Определенные относительные погрешности максимальны (~30%) для частиц малых размеров, и минимальны (~10%) для крупных частиц.

В разделе 3.6. представлена динамика усредненных размеров частиц для образцов плазмы крови двух доноров (мужчин, 71 года и 73 лет), наблюдаемая в течение 30 часов. Изменение размеров частиц по каждому из регистрируемых пиков носит нерегулярный колебательный характер. Подобные колебания нами были надежно зарегистрированы во временном ходе полной интенсивности рассеяния I_s , подробно описанном в разделе 4.1. Однако амплитуды колебаний размеров частиц оказались сравнимы с определенными ранее ошибками измерений, а иногда и меньше них. Поэтому нам не удалось определить параметры колебаний размеров. Результаты исследования колебаний размеров и концентраций частиц в плазме крови представлены в работах автора [19–21].

Разделы 3.7. и 3.8. посвящены изучению характера вариаций измеряемых распределений интенсивности рассеянного света по размерам частиц $I(r)$ в плазме крови, а также описанию методики получения статистически достоверных размеров частиц.

При исследовании динамики усредненных размеров частиц нами были предприняты попытки улучшить точность результатов путем увеличения времени накопления (более 300 сек) функции автокорреляции и/или увеличения количества распределений $I(r)$. Однако было обнаружено, что увеличение времени накопления не приводило к воспроизводимости результатов, а нестабильность числа пиков в распределениях $I(r)$ либо

ставила под вопрос возможность усреднения полученных радиусов, либо приводила к потере части данных.

Преодолеть указанную проблему удалось только изменив сам подход к получению и обработке результатов измерений $I(r)$. Для этого проводилось накопление 100÷150 распределений $I(r)$ с интервалом 2-4 минуты и сведение значений средних по пикам этих распределений радиусов в массив в координатах: время (t , час) – радиус (r , нм) (рис. 1б). Далее производился подсчет числа регистраций каждого из размеров частиц в пределах выбранного шага (0,1 от показателя степени логарифма размеров), что позволило получить гистограмму числа регистраций радиусов частиц $P(r)$, представленную на рис. 1а (сглаженный вид). Подробное описание методики получения гистограммы регистраций представлено в работе автора [22].

Размеры частиц, соответствующие положениям максимумов пиков гистограммы $P(r)$, составляют (3 ± 1) нм – для первого пика, (25 ± 6) нм – для второго пика, (126 ± 30) нм – для третьего и (2000 ± 700) нм – для четвертого. Эти размеры мы считаем статистически достоверными, поскольку при разбиении массива данных на более мелкие подмассивы (меньше 20 распределений интенсивности по размерам), в гистограмме появляется много мелких пиков, которые при увеличении количества данных в массиве (более 40 распределений) сливаются в те, которые представлены на рис. 1а.

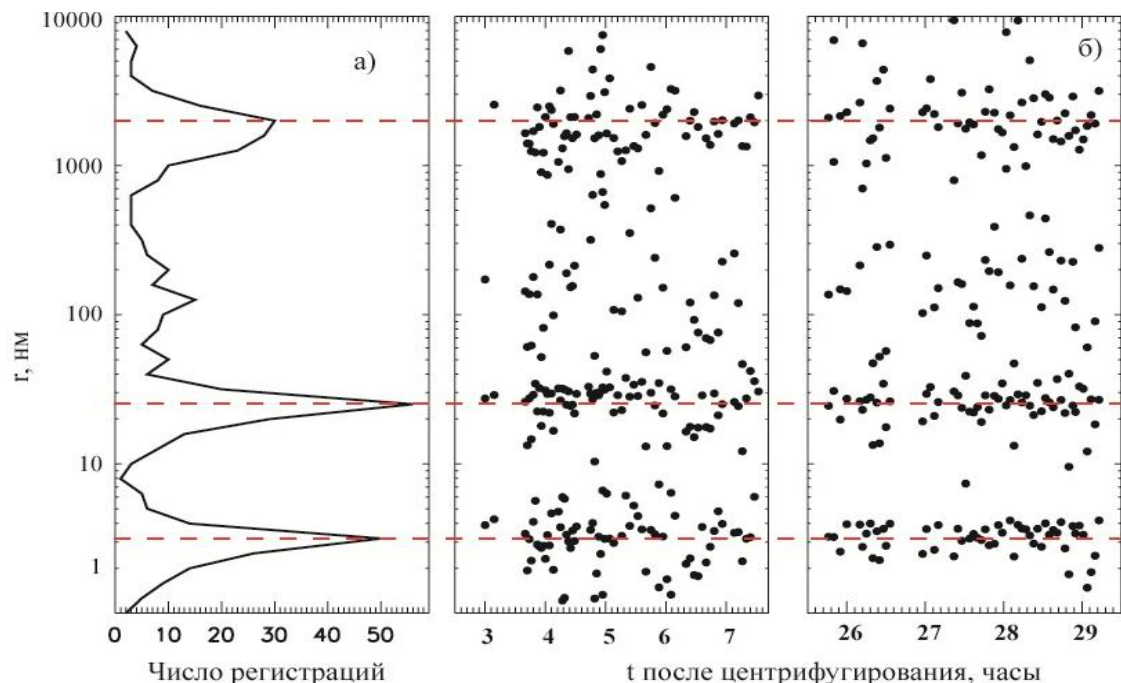


Рис. 1. а) Гистограмма числа регистраций радиусов частиц; б) массив радиусов частиц (зависимости радиусов частиц от времени), полученный в первый и второй день после взятия крови из организма

Раздел 3.8. посвящен исследованию гистограмм числа регистраций, полученных для первого и второго дня наблюдений. При разбиении массива (рис. 1б) на два подмассива в соответствии с интервалом получения данных (3-8 часов и 25-30 часов после взятия крови) и обработке их указанным выше способом были получены гистограммы числа регистраций радиусов частиц. Эти гистограммы, нормированные на пик с максимальной амплитудой $P(r)/P_{\max}$, представлены на рис. 2 (сплошная линия – первый день, пунктирная – второй день). Видно, что размеры частиц, соответствующие максимумам пиков гистограммы, повторяют друг друга с точностью лучшей, чем ширины этих пиков на полувысоте. Это свидетельствует о том, что статистически достоверные размеры частиц устойчивы в течение 30 часов после взятия крови из организма.

Основное отличие гистограмм заключается в изменении соотношения амплитуд пиков. Видно, что на второй день амплитуда первого пика увеличилась, в то время как амплитуды второго и четвертого пика уменьшились. Такое изменение амплитуд пиков может свидетельствовать об увеличении концентрации частиц малых размеров и уменьшении концентрации крупных частиц. Результат представлен в работе автора [23].

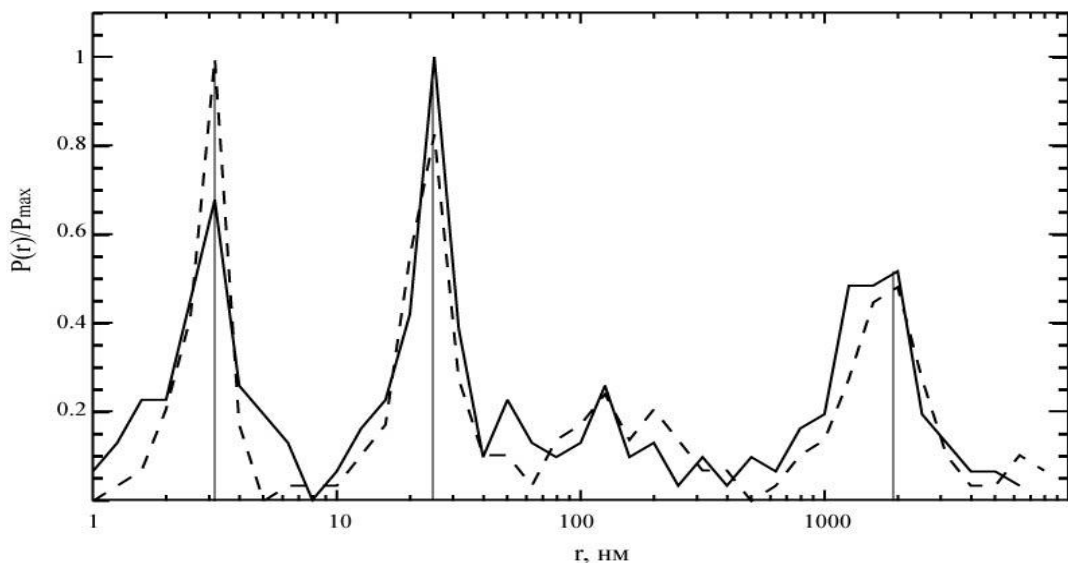


Рис. 2. Гистограммы числа регистраций радиусов частиц, полученные на первый (сплошная линия) и второй (пунктирная линия) день измерений, нормированные на пик с максимальным числом регистраций

Глава 4 посвящена исследованию динамики интенсивности рассеянного света $I_s(t)$, оценке концентраций частиц N_p и получению графика соответствия концентраций частиц N_p их размерам r .

В разделе 4.1. представлены результаты исследования динамики полной интенсивности рассеянного света $I_s(t)$, регистрируемой в течение того же промежутка времени и для того

же образца плазмы крови (донор женского пола, 26 лет), для которого в главе 3 было установлено постоянство статистически достоверных размеров частиц.

Обнаружено, что зависимость интенсивности рассеянного света от времени $I_s(t)$ имеет квазипериодический осциллирующий характер (рис.3), и в ней можно выделить характерные колебания, составляющие в первые сутки 34 минуты, а во вторые – 40 минут и 2 часа. Кроме того, средняя величина полной интенсивности уменьшается на вторые сутки на ~20% от исходной величины.

Подобные колебания интенсивности наблюдались также Kita et al. [24] при исследовании процессов деградации фибриногена под воздействием тромбина и дальнейшей агрегации образовавшегося фибрина в модельном растворе. Однако вместо уменьшения средней величины интенсивности, они наблюдали ее увеличение, которое авторы [24] объясняли увеличением концентрации крупных комплексов фибрина.

Уменьшение же средней величины интенсивности с течением времени может объясняться уменьшением либо размеров крупных частиц, либо их концентрации в результате их распада на более мелкие частицы или оседания. Установленная нами в разделе 3.3 неизменность статистически достоверных размеров частиц в плазме крови в течение времени проведения эксперимента указывает на, то, что уменьшение интенсивности рассеянного происходит именно из-за уменьшения концентрации частиц крупных размеров. Это соответствует изменению соотношения пиков гистограмм на рис. 2.

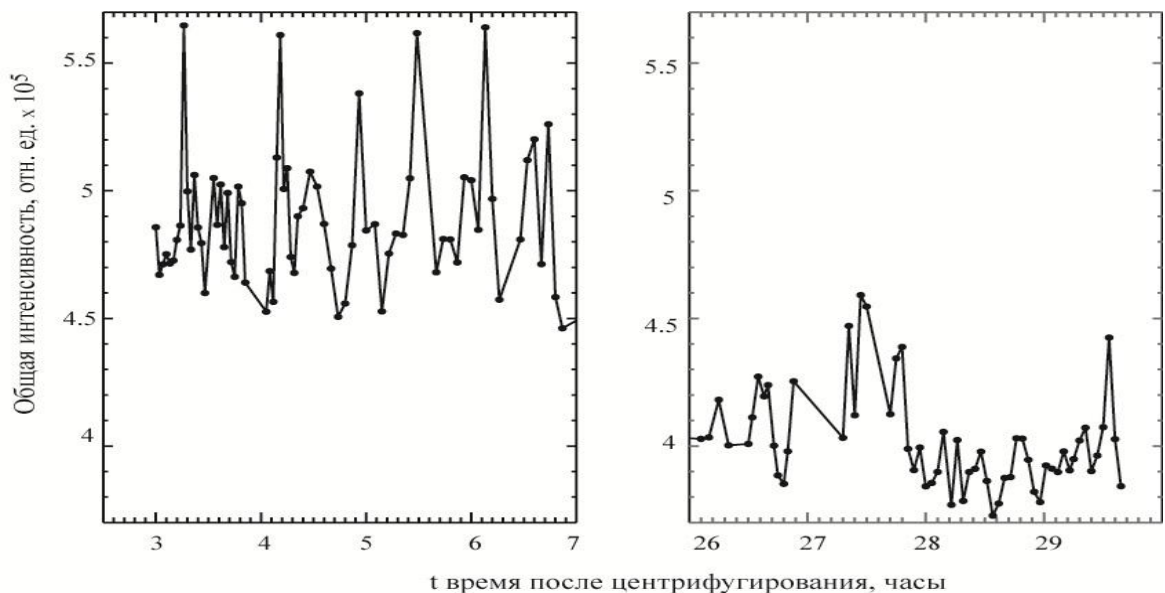


Рис. 3. Динамика полной интенсивности рассеянного света I_s для образца плазмы крови, регистрируемая под углом 40 градусов в течение 4-х часов, через 3 и 25 часов после получения плазмы (донор женского пола, 26 лет)

Раздел 4.2. и 4.3. посвящен анализу временного хода доли интенсивности света (в логарифмическом масштабе), полученной для каждого из регистрируемых размеров частиц. Обнаружено, что доля интенсивности света, рассеянного на самых крупных частицах, уменьшается на вторые сутки наблюдений на 20%, в то время как доля интенсивности, приходящаяся на частицы самых малых размеров, увеличивается в среднем на ту же величину. Такое противоположно направленное изменение этой величины также свидетельствует о перераспределении материала между группами частиц, происходящем в результате распада частиц более крупного размера с появлением частиц меньшего размера.

Разделы 4.4. и 4.5. посвящены оценке концентраций частиц в образцах плазмы крови в приближении Релея-Ганса-Дебая (РГД) для двух моделей формы частиц: однородной сферы или однородного бесконечно тонкого цилиндра (стержня). Для расчетов использовались данные, получаемые в каждом единичном измерении распределений $I(r)$: размеры частиц r , доля интенсивности света ($Area$) и полная интенсивность рассеянного света I_s . В результате такого расчета был получен массив значений концентраций частиц N_p (част/мкм³) для каждого из регистрируемых размеров. Средняя концентрация частиц малых размеров, как для модели сфер, так и модели цилиндров, на второй день наблюдений увеличилась с $(5,2 \pm 1,4) \cdot 10^6$ до $(7,4 \pm 1,5) \cdot 10^6$ частиц/мкм³, в то время как концентрация крупных частиц уменьшилась с $(4,2 \pm 1,9) \cdot 10^{-7}$ до $(1,85 \pm 0,5) \cdot 10^{-7}$ частиц/мкм³ (для цилиндрической модели формы частиц). Этот результат также согласуется с установленным с помощью гистограмм числа регистраций $P(r)$ перераспределением числа частиц между группами регистрируемых размеров частиц.

В разделе 4.6. представлены результаты сопоставления концентраций частиц N_p их радиусам r для сферической и длинам l для цилиндрической модели формы частиц. Рис. 4 демонстрирует диаграмму соответствия концентрации частиц их размерам (длинам) в двойном логарифмическом масштабе.

Из рис. 4 видно, что в области размеров от 1 нм до 300 нм значения концентраций частиц N_p , полученные для сферической и цилиндрической модели их формы, совпадают. Связь между концентрациями и размерами в этой области может быть аппроксимирована линейной зависимостью вида: $\log N_p = a \log r + b$, где $a = -3.99 \pm 0.09$ в диапазоне от 1 нм до 25 нм, $a = -5.59 \pm 0.17$ в диапазоне от 25 нм до 300 нм. Для цилиндрической модели формы частиц связь их концентраций и длин может быть аппроксимирована линейной зависимостью во всем диапазоне регистрируемых значений радиусов с коэффициентом $a = -4,38 \pm 0.17$.

Для сферической модели в области размеров частиц свыше 300 нм происходит нарушение такой монотонности, что может быть связано с тем, что реальные частицы с такими размерами имеют форму, отличную от сферы, или с тем, что реальные размеры, не попадающие в РГД минимумы [16], тем не менее могут быть зарегистрированы как находящиеся в области одного из минимумов из-за нестабильности разложения автокорреляционной функции по экспонентам. Для цилиндрической модели в этой области размеров связь концентраций частиц и их длин близка к линейной, что, в свою очередь, определяется монотонным характером зависимости форм-фактора частиц $G^2(\theta, l)$ от длины l .

Поскольку крупные молекулы фибриногена и фибриновые агрегаты в плазме крови имеют нитеобразную форму, то применение модели тонких стержней для описания формы частиц в этом диапазоне размеров в плазме крови может оказаться более целесообразным, чем использование модели сфер.

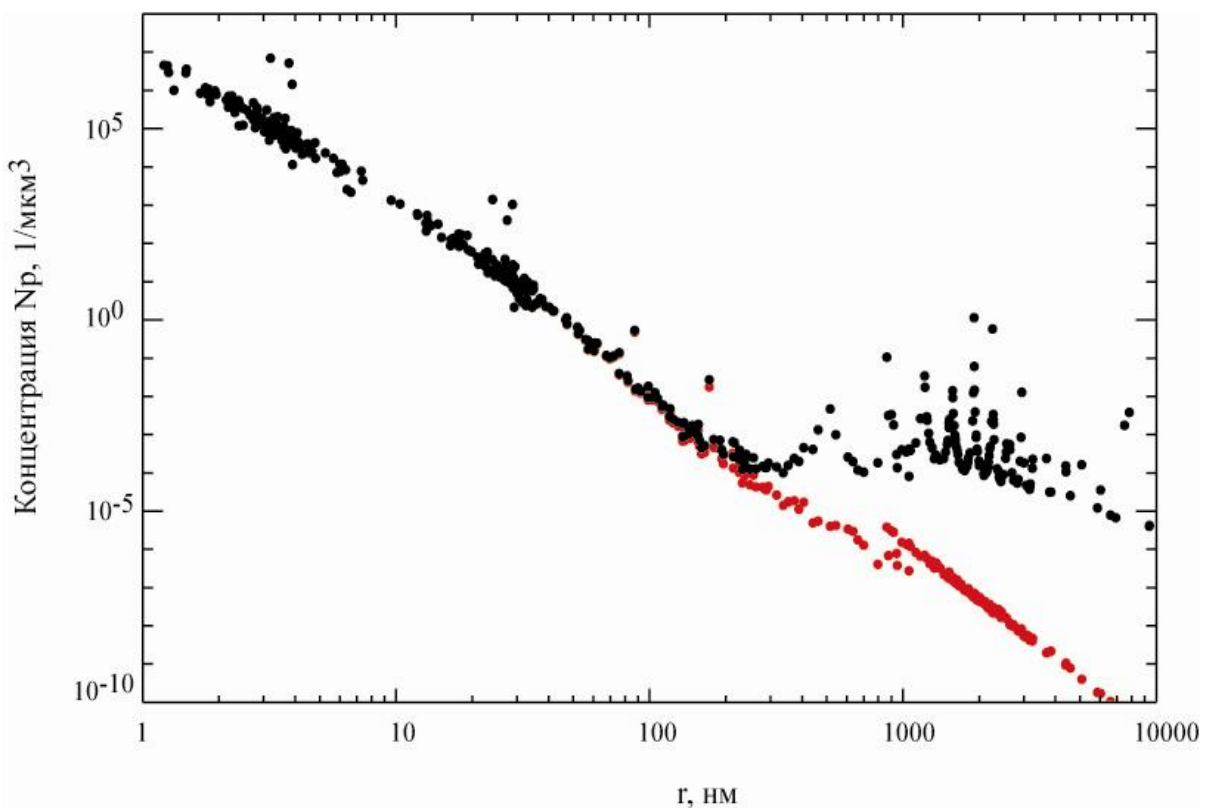


Рис.4. Диаграмма соответствия концентраций частиц N_p их радиусам r для сферической (черные точки) и длине l для цилиндрической (красные точки) модели их формы (в диапазоне от 1 нм до 300 нм точки для двух моделей совпадают)

Раздел 4.7. посвящен исследованию соотношения размеров и концентраций частиц в неразбавленных и разбавленных образцах размороженной плазмы крови.

Согласно теории Ми и приближению РГД [11–13] рассеяние света происходит независимо на каждой частице и полная интенсивность рассеянного света пропорциональна концентрации присутствующих в жидкости частиц. Приближение независимости рассеяния на отдельных частицах может нарушаться по мере роста их концентрации, когда полная интенсивность обусловлена не суммой интенсивностей рассеяния на отдельных частицах, а амплитудой флуктуаций среднего по длине волны показателя преломления. С другой стороны, при высоких концентрациях молекул или агрегатов белков неизбежно возникает их взаимодействие, что может исказить соотношение между коэффициентом диффузии D и радиусом частиц r , которое в отсутствие взаимодействия описывается формулой Стокса-Эйнштейна [14, 15].

Объемная доля материала частиц (белка) связана с концентрацией частиц N_p следующим соотношением: $C_v = 4\pi r^3 N_p / 3$, тогда $C_v \sim 1/r$, то есть большая часть материала сосредоточена в самых мелких частицах ($r \sim 3.2$ нм). При общей объемной концентрации белков в плазме крови порядка 7% [25] и сосредоточении основной части белков в самых мелких частицах расстояние между их центрами ~ 15 -20 нм. Поэтому необходимо было проверить применимость моделей, используемых для определения гидродинамического радиуса частиц (соотношение Стокса-Эйнштейна) и их концентраций (приближение РГД) в образце неразбавленной плазмы крови. Поскольку расстояние между частицами больших размеров (более 20 нм) \sim длины волны света и больше, то взаимодействие частиц, приводящее к неадекватности указанных приближений, должно иметь место только для малых частиц (менее 10 нм) в неразбавленной плазме с соответствующим искажением формы графиков $N_p - r$. Поэтому для проверки применимости используемых моделей для плазмы крови было проведено сравнение графиков соответствия концентраций частиц их размерам, полученных для размороженной плазмы крови с различным разбавлением ее физиологическим раствором (без разбавления, в 10 и 100 раз). Такие графики представлены на рис. 5 в логарифмическом масштабе для неразбавленного образца плазмы крови (кружки), для образца плазмы, разбавленной в 10 раз (квадраты) и для образца плазмы крови, разбавленной в 100 раз (треугольники).

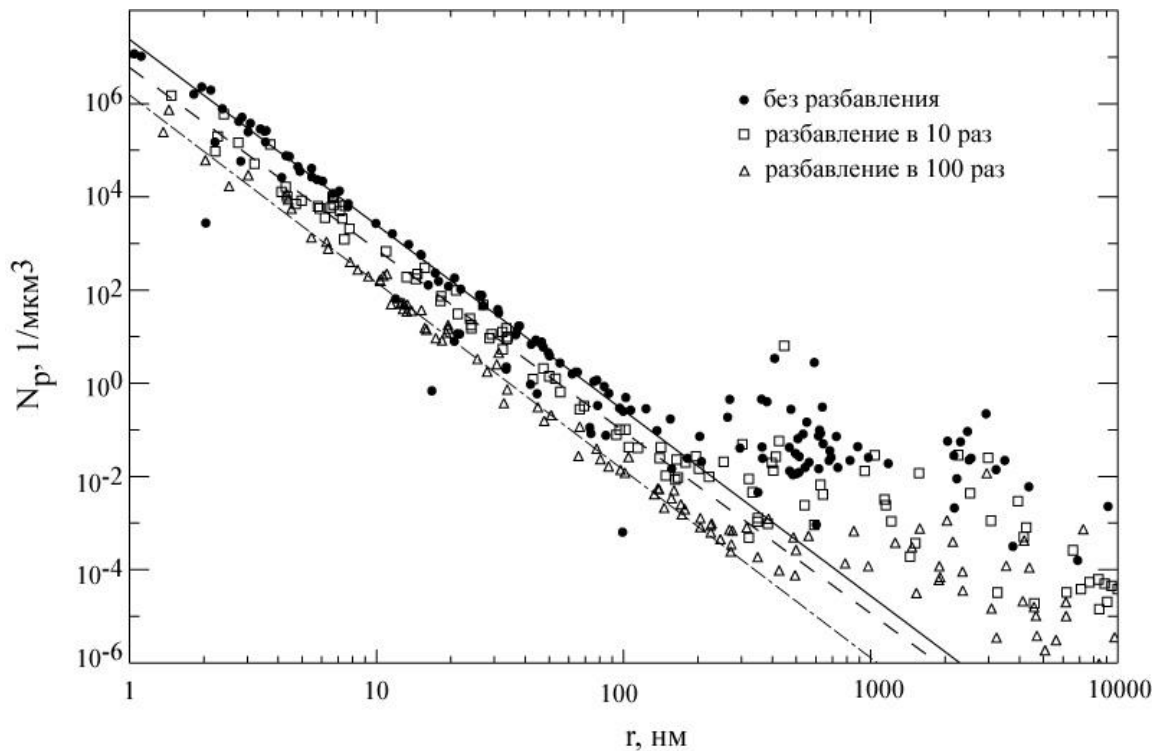


Рис.5. Графики соответствия концентраций частиц N_p их размерам r , полученные для образцов неразбавленной (кружки), разбавленной в 10 (квадраты) и 100 раз (треугольники) размороженной плазмы крови

Видно, что для всех разбавлений плазмы крови сохраняется линейная связь между концентрациями частиц и их размерами в области концентраций от 0 до 300 нм для двух моделей формы частиц, а для цилиндрической модели – во всем диапазоне размеров. Разбавление плазмы крови в 10 и 100 раз привело к смещению точек графиков соответствия в сторону более низких концентраций частиц относительно неразбавленного образца. При этом коэффициент a , определяющий наклон прямых, оставался неизменным в пределах ошибки для трех исследованных образцов: a (для неразбавленной плазмы крови -3.98 ± 0.16 , для 10-кратного разбавления -3.91 ± 0.07 , для разбавления в 100 раз – 4.03 ± 0.05). Неизменность форм графиков для трех разбавлений свидетельствуют о том, что формула Стокса-Эйнштейна и приближение РГД подходит для оценки концентраций частиц, как для разбавленных, так и неразбавленных образцов плазмы крови.

Коэффициент b , показывающий смещение графика по оси ординат (логарифм концентраций) изменяется не пропорционально разбавлению. Так, для десятикратного разбавления плазмы крови коэффициент b по сравнению с неразбавленным образцом должен был бы уменьшиться на единицу, но он изменился лишь на 0.36, а для образца плазмы крови при следующей разбавлении еще в 10 раз – уменьшился на 0.97. Такое несоответствие полученного смещения графика соответствия ожидаемому может быть

объяснено отличием эффективного показателя преломления дисперсионной среды n_2 от показателя преломления воды при достаточно большой концентрации белков в неразбавленной плазме крови. Если при десятикратном разбавлении значение n_2 сильно меняется и приближается к значению n_2 для воды $n = 1.333$ (изменение b на 0.38), то при следующем разбавлении ещё в 10 раз значение n_2 измениться уже не должно, и действительно изменение b оказывается 0.97, т.е. практически равно ожидаемому изменению на 1.

Результаты исследования влияния разбавления на соотношение концентраций частиц и их размеров представлены в работе автора [26].

В заключении приведены **основные результаты** диссертационной работы:

1) Обнаружена неустойчивость многомодальных распределений интенсивности рассеянного света по гидродинамическим радиусам частиц, получаемых в образцах плазмы крови в отдельных измерениях с использованием методов ДРС, причем накопление функции автокорреляции интенсивности в течение длительного времени (в наших условиях больше 240 секунд) не дает устойчивый результат, а усреднение положений пиков распределений невозможно из-за нестабильности их числа (общего вида распределений).

2) Предложена методика определения статистически достоверных размеров частиц в полидисперсных суспензиях, в том числе и в плазме крови, состоящая в многократном измерении методом ДРС распределений интенсивности рассеянного света по размерам частиц, подсчете числа регистраций каждого из размеров и определении положений максимумов пиков гистограммы числа регистраций размеров.

3) С помощью предложенной методики установлено, что в плазме крови существуют группы частиц, средние размеры которых неизменны в течение 30 часов после взятия крови из организма - (3 ± 1) нм, (25 ± 6) нм, (126 ± 30) нм и (2000 ± 700) нм.

4) Установлено, что зависимость интенсивности рассеянного света от времени имеет квазипериодический характер, а ее средняя величина уменьшается на 20% на второй день наблюдений. Такие изменения средней величины могут быть обусловлены происходящими в плазме крови процессами деградации белков, приводящими к перераспределению материала частиц в сторону малых их размеров.

5) Обнаружена связь между концентрациями частиц N_p и их размерами r , выражаемая эмпирической формулой: $\log N_p = a \log r + b$, где $a = -3.99 \pm 0.09$. Данное соотношение с указанной величиной a выполняется для сферической и цилиндрической модели формы частиц в диапазоне от 1 нм до 25 нм с тенденцией к уменьшению коэффициента (увеличению наклона прямой) в диапазоне от 25 нм до 300 нм. Для цилиндрической модели указанное соотношение выполняется и в диапазоне размеров свыше 300 нм, причем величина a принимает значение, близкое к начальному.

6) Выяснено, что при разбавлении размороженных образцов плазмы крови физиологическим раствором в 10 и 100 раз, указанная линейная связь между концентрациями частиц и их размерами сохраняется с незначительным изменением коэффициента a (для неразбавленного образца - -3.98 ± 0.16 , для разбавленного в 10 раз - -3.91 ± 0.07 , для разбавленного в 100 раз - -4.03 ± 0.05).

Результаты диссертационной работы изложены в следующих публикациях (основная часть работ опубликована под девичьей фамилией автора – Маслова М.Н.):

Статьи:

1. **M.N. Maslova**, A.R. Zaritskiy, L.L. Chaykov. The Usage of Proteolytic Enzymes Inhibitors in Studies of the Blood Plasma Particle Size Distribution by the Dynamic Light Scattering. Biophysical Journal, **104**(2), pp. 577a, (2013).

2. **M.N. Maslova**, A.R. Zaritskiy, L.L. Chaykov. The Blood Plasma Particles Sizes Oscillations Observed by Dynamic Light Scattering. Biophysical Journal, **106**(2) pp. 457a - 458a, (2014).

3. **М.Н. Кириченко**, А.В. Масалов, Л.Л. Чайков, А.Р. Зарицкий. Соотношение размеров и концентраций частиц в неразбавленной и разбавленной плазме крови по данным светорассеяния. Краткие сообщения по физике ФИАН. **42**(2), стр. 3, (2015).

Тезисы докладов:

1. **М.Н. Маслова**, А.Р. Зарицкий, Л.Л. Чайков. Исследование динамики размеров белков плазмы крови *in vitro* методами молекулярного рассеяния света. XX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых. "Ломоносов-2013", сборник тезисов докладов, 2013, с. 35.

2. **M. Maslova**, L. Chaykov, A. Zaritskiy. Study of the effect of the degradation and aggregation processes on the mean sizes of the blood plasma particles by dynamic light

scattering. The 5th EMBO meeting. Advancing the life sciences, abstract book, Amsterdam, 2013, p.181.

3. **М.Н. Маслова**, А.Р. Зарицкий, Л.Л. Чайков. Колебания размеров и концентраций частиц в плазме крови, обнаруженные методами динамического рассеяния света. V Всероссийская молодежная конференция по фундаментальным и инновационным вопросам современной физики, Сборник тезисов докладов, Москва, ФИАН, 2013, с. 54.

4. **М.Н. Маслова**, И.С. Бурханов. Статистический анализ данных, получаемых для образцов плазмы крови методами динамического рассеяния света. XXI Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2014", Сборник тезисов докладов, 2014, с. 13.

5. **М.Н. Маслова**. Исследование крови и ее составляющих *in vitro* с использованием оптических методов. Сборник трудов XV Школы молодых ученых «Актуальные проблемы физики». Москва, ФИАН, 2014, с. 160.

Список использованной литературы:

1. Петрова Г.П. et al. Метод рэлеевского рассеяния в диагностике онкологических заболеваний. // В сб. науч. тр. Медицинская физика. 2002. с. 156– 167.
2. Ivanov Y.V. et al. Biochemical Properties of Plasma // J. Russ. Laser Res. 2005. Vol. 26, № 5. P. 363–372.
3. Van der Pol E. et al. Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. // J. Thromb. Haemost. 2010. Vol. 8, № 12. P. 2596–2607.
4. Petrova G.P. et al. Optical properties of solutions consisting of albumin and γ -globulin molecules in different ratio modeling blood serum // Laser Phys. 2009. Vol. 19, № 6. P. 1303–1307.
5. Papok I.M. et al. Using the dynamic light-scattering method for the analysis of a blood-serum model solution // Moscow Univ. Phys. Bull. 2012. Vol. 67, № 5. P. 452–456.
6. Ковальчук Ю.П. et al. Экспресс диагностика тяжести течения ургентных состояний по оценке гомеостаза методом лазерной корреляционной спектроскопии. // Клинико-лабораторный консилиум. 2005. № 7. с. 21 – 23.
7. Здраевская О.Н. et al. Диагностическая значимость метода лазерной корреляционной спектроскопии при воспалительных и опухолевых заболеваниях легких. // Клиническая лабораторная диагностика. 2006. № 5. с. 21–24, 33.
8. Petrusevich Y.M., Petrova G.P. The method of light scattering measurement in tumor diagnostics // Proc. SPIE / ed. Ivanov A. V., Kazaryan M.A. 1996. Vol. 2728. P. 2–9.

9. Alekseev S.G. et al. Multiparametrical Testing of Blood Proteins Solutions with Diagnostic Purpose // Proc. SPIE / ed. Ivanov A. V., Kazaryan M.A. 2005. Vol. 5973. P. 597301–597301–10.
10. Zheng X.-H. et al. Centrifugation: an important pre-analytic procedure that influences plasma microRNA quantification during blood processing. // Chin. J. Cancer. 2013. Vol. 32, № 12. P. 667–672.
11. Walsh P.N., Ahmad S.S. Proteases in blood clotting. // Essays Biochem. 2002. Vol. 38. P. 95–111.
12. Smoluchowski M. Zur kinetischen Theorie der Brownschen Molekularbewegung und der Suspensionen // Ann. Phys. 1906. Vol. 326, № 14. P. 756–780.
13. Einstein A. Zur Theorie der Brownschen Bewegung // Ann. Phys. 1906. Vol. 324, № 2. P. 371–381.
14. Лопатин В.Н. и др. Методы светорассеяния в анализе дисперсных биологических сред. Москва: Физматлит, 2004.
15. Van de Hulst H.C. Light Scattering by Small Molecules. New York: Wiley, 1957.
16. Rayleigh J.W.S. No Title // Proc. R. Soc. London. 1911. Vol. A84. P. 25.
17. Лебедев А.Д. et al. Лазерная корреляционная спектроскопия в биологии. Киев: Наук. думка, 1987. с. 256.
18. Maslova M.N., Chaykov L.L., Zaritsky A.R. The Usage of Proteolytic Enzymes Inhibitors in Studies of the Blood Plasma Particle Size Distribution by the Dynamic Light Scattering // Biophys. J. Elsevier, 2013. Vol. 104, № 2. P. 577a.
19. Maslova M.N., Zaritskiy A.R., Chaykov L.L. The Blood Plasma Particles Sizes Oscillations Observed by Dynamic Light Scattering. // Biophys. J. Elsevier, 2013. Vol. 106, № 2. P. 457a – 458a.
20. Маслова М.Н., Бурханов И.С. Исследование динамики размеров белков плазмы крови *in vitro* методами молекулярного рассеяния света // Сборник тезисов XIX Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых “Ломоносов-2013”, 8-13 апреля. Москва, 2013. с. 35.
21. Maslova M.N., Zaritskiy A.R., Chaykov L.L. Study of the effect of the degradation and aggregation processes on the mean sizes of the blood plasma particles by dynamic light scattering // Abstract book 5th EMBO Meet. Adv. life Sci. Amsterdam, 2013. P. 181.
22. Маслова М.Н., Зарицкий А.Р., Чайков Л.Л. Статистический анализ данных, получаемых для образцов плазмы крови методами динамического рассеяния света // Сборник тезисов XXI Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых “Ломоносов-2014”, 7-11 апреля. Москва, 2014. с. 13.
23. Маслова М.Н. Исследование крови и ее составляющих *in vitro* с использованием оптических методов. // Сборник трудов XV Школы молодых ученых «Актуальные проблемы физики». 2014. с. 160.

24. Kita R., Takahashi A., Kaibara M. Formation of Fibrin Gel in Fibrinogen - Thrombin System: Static and Dynamic Light Scattering Study // *Biomacromolecules*. 2002. Vol. 3. P. 1013–1020.
25. Марри Р. et al. Биохимия человека. Москва: Мир, 2003.
26. Кириченко М.Н. и др. Соотношение размеров и концентраций частиц в неразбавленной и разбавленной плазме крови по данным светорассеяния // *Краткие сообщения по физике ФИАН*. 2015. Т. 42, № 2. с. 3–11.