

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

На правах рукописи

**Кириченко Марина Николаевна**

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

Специальность:

01.04.05 – Оптика

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата физико-математических наук

**Научный руководитель:**  
**кандидат физико-математических наук**  
**Чайков Леонид Леонидович**

Москва – 2015

## СОДЕРЖАНИЕ:

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	29
1.1. Природа рассеяния света.....	29
1.2. Методы динамического рассеяния света.....	33
1.2.1. Функция автокорреляции интенсивности рассеянного света .....	33
1.2.2. Связь корреляционной функции интенсивности рассеянного света и электрического поля со временем релаксации флуктуаций концентраций частиц. Уравнение Стокса-Эйнштейна.....	36
1.2.3. Стратегии аппроксимации корреляционной функции.....	37
Анализ кумулянтов (метод моментов).....	38
Алгоритм Contin .....	39
1.3. Исследование биологических жидкостей с помощью методов динамического и статического светорассеяния как основа диагностики некоторых болезней .....	39
1.3.1. Состав плазмы крови .....	41
1.3.2. Альбумины плазмы крови.....	41
1.3.3. Глобулины плазмы крови.....	42
1.3.4. Фибриноген.....	43
1.3.5. Белковые комплексы плазмы крови.....	43
1.3.6. Липопротеины плазмы крови .....	44
1.3.7. Микрочастицы.....	45
1.4. Основные процессы, протекающие в плазме крови и влияющие на изменения ее состава.....	47
1.4.1. Механизм свертывания крови.....	48
1.4.2. Исследование процессов деградации фибриногена в модельных растворах с помощью ДРС .....	49
1.4.3. Предотвращение свертывания крови.....	50

1.5. Процессы агрегации молекул белков и частиц в плазме крови. Применение методов ДРС для изучения различных типов агрегации в модельных растворах белков .....	52
1.5.1. Влияние температуры и добавления ПАВов на агрегацию белков в модельных растворах. Обратимая и необратимая агрегация .....	52
1.5.2. Влияние рН на агрегацию белков в модельных растворах.....	54
1.5.3. Влияние аминокислот и пептидов на агрегацию белков в модельных растворах .....	54
Заключение к Главе 1 .....	56
<b>ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ УСТАНОВКА И МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТОВ.....</b>	<b>59</b>
2.1. Экспериментальная установка .....	59
2.1.1. Принцип работы коррелятора со сдвиговым регистром.....	62
2.1.2. Программное обеспечение .....	65
2.2. Особенности применения метода ДРС для определения размеров частиц в полидисперсном концентрированном образце .....	67
2.2.1. Регистрация двух размеров частиц во взвеси, отличающихся больше, чем в два раза .....	67
2.2.2. Зависимость измеряемых размеров частиц, получаемых с помощью методов ДРС, от угла рассеяния .....	68
2.2.3. Влияние концентрации частиц на регистрируемый размер .....	71
2.3. Методика проведения экспериментов .....	72
2.3.1. Подготовка кювет для измерений .....	73
2.3.2. Подготовка образцов плазмы крови.....	73
2.3.3. Проверка угловой зависимости времен когерентности (или гидродинамических радиусов частиц) от угла рассеяния.....	75
2.3.4. Получение функций автокорреляции интенсивности рассеянного света и распределений интенсивности рассеянного света по размерам частиц .....	76
Заключение к Главе 2.....	77

ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ РАЗМЕРОВ ЧАСТИЦ ПЛАЗМЫ КРОВИ И ИХ ИЗМЕНЕНИЙ ВО ВРЕМЕНИ .....	78
3.1. Получение распределений интенсивности рассеянного света по размерам частицам .....	78
3.2. Сравнение распределений интенсивности рассеянного света, получаемых под различными углами рассеяния (40, 60, 90 градусов) .....	80
3.3. Размеры частиц в образцах плазмы крови с добавлением гепарина и ингибиторов протеолитических ферментов .....	82
3.4. Изменение размеров частиц в образцах плазмы крови с гепарином и ингибиторами протеолитических ферментов с течением времени .....	84
3.5. Экспериментальное определение ошибок измерения размеров частиц в образце плазмы крови .....	86
3.6. Динамика размеров частиц в образцах плазмы крови, наблюдаемая в течение 30 часов после взятия крови из организма .....	88
3.7. Набор массива размеров частиц .....	90
3.8. Обработка массива размеров частиц и определение статистически достоверных размеров частиц в плазме крови .....	92
3.9. Устойчивость статистически достоверных размеров частиц в образцах плазмы крови в течение 30 часов после взятия крови из организма .....	95
Заключение к главе 3 .....	99
ГЛАВА 4. ДИНАМИКА ИНТЕНСИВНОСТИ РАССЕЯННОГО СВЕТА И КОНЦЕНТРАЦИЙ ЧАСТИЦ В ПЛАЗМЕ КРОВИ .....	101
4.1. Динамика полной интенсивности рассеянного света .....	101
4.2. Динамика логарифмической доли интенсивности света, рассеянного на частицах разных размеров .....	103
4.3. Динамика логарифмической доли интенсивности, рассеянного частицами крупного и малого размера .....	105

4.4. Оценка концентраций частиц различных размеров в образце плазмы крови в приближении Релея-Ганса-Дебая (для сферической и цилиндрической модели их формы).....	106
4.5. Изменение концентраций частиц на второй день после взятия крови из организма .....	110
4.6. Связь концентраций частиц и их размеров в плазме крови .....	111
4.7. Подтверждение адекватности расчета концентраций в приближении РГД разбавлением плазмы крови.....	114
Заключение к главе 4 .....	119
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	121
ПРИЛОЖЕНИЕ 1 .....	123
БЛАГОДАРНОСТИ .....	126
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ .....	127

## **ВВЕДЕНИЕ**

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).

### **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.

### **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  $-3.99 \pm 0.09$ , 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 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 **возможности применения** методов светорассеяния для исследования сложных многокомпонентных систем, а также 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  $\theta$  (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].

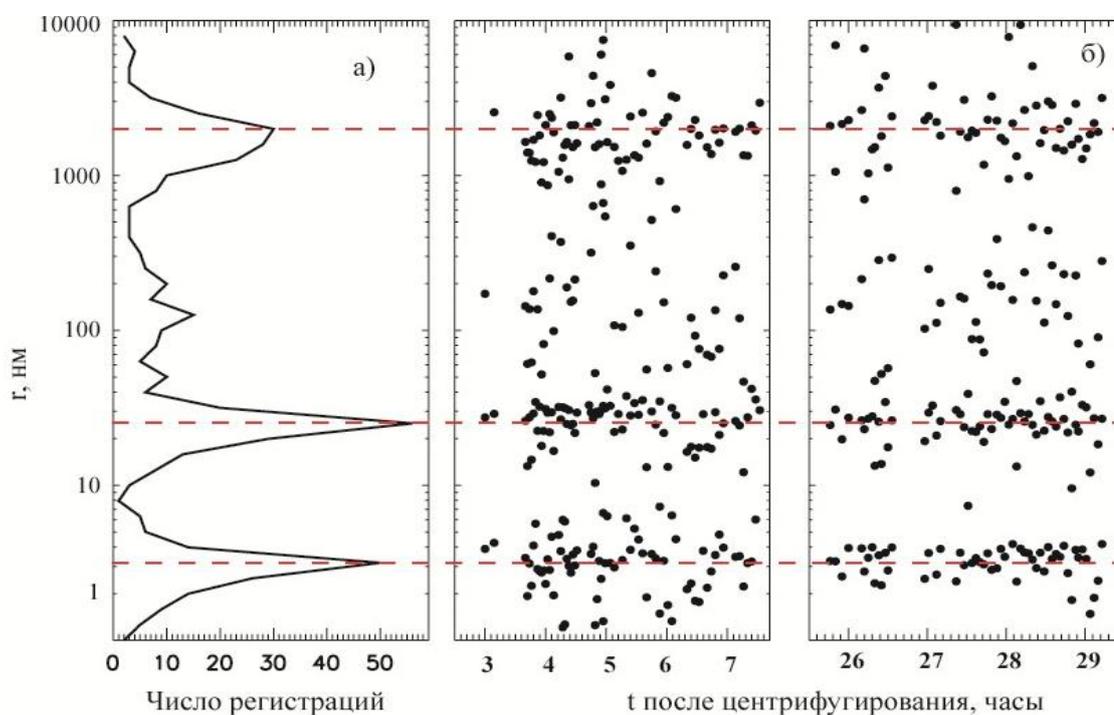
Разделы 3.7. и 3.8. посвящены изучению характера вариаций измеряемых распределений интенсивности рассеянного света по размерам частиц  $I(r)$  в плазме крови, а также описанию методики получения статистически достоверных размеров частиц.

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  $(3\pm 1)$  нм – для первого пика,  $(25\pm 6)$  нм – для второго пика,  $(126\pm 30)$  нм – для третьего и  $(2000\pm 700)$  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,

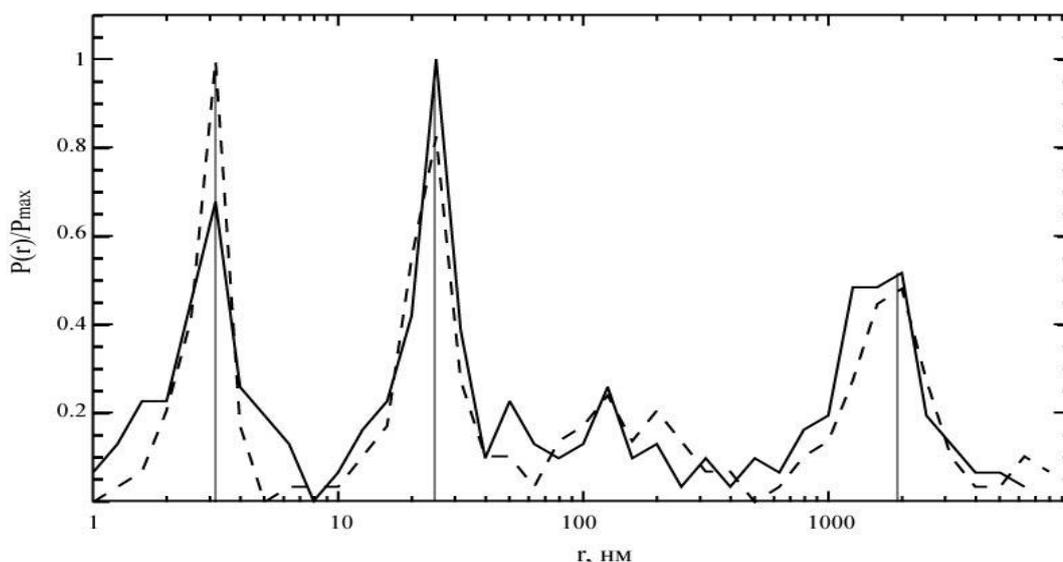
которые при увеличении количества данных в массиве (более 40 распределений) сливаются в те, которые представлены на рис. 1а.



**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 в первый и второй день 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 этих 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

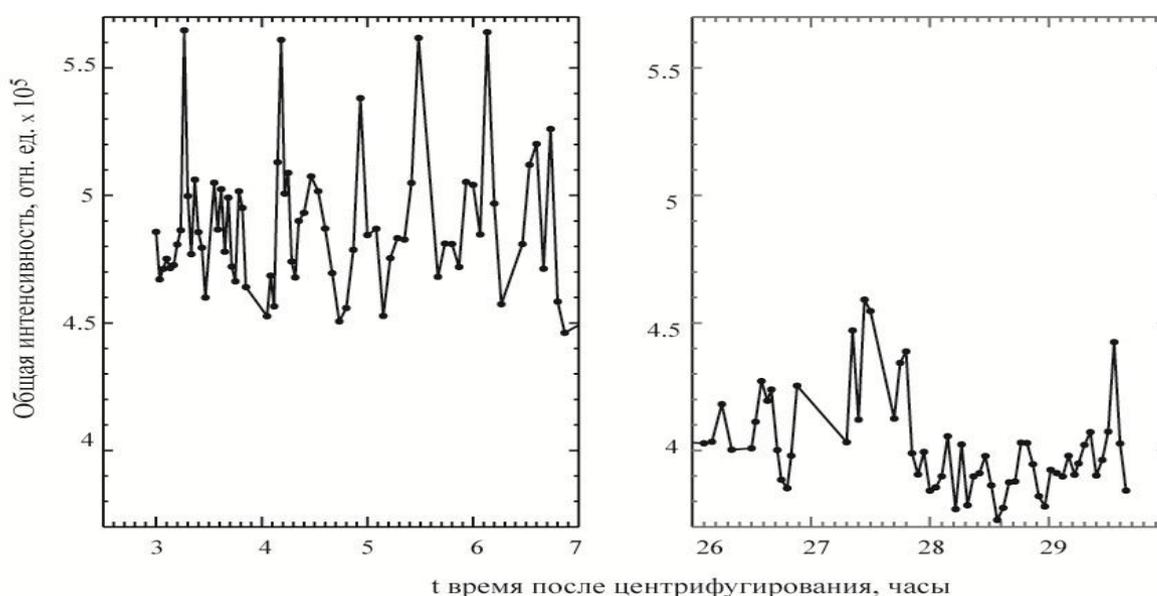
**Глава 4** посвящена исследованию динамики интенсивности рассеянного света  $I_s(t)$ , оценке концентраций частиц  $N_p$  и получению графика соответствия концентраций частиц  $N_p$  их размерам  $r$ .

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.



**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)

Уменьшение 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.

Разделы 4.2. и 4.3. посвящены 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.

Раздел 4.4. и 4.5. посвящен 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/мкм<sup>3</sup>) 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/мкм<sup>3</sup>, 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/мкм<sup>3</sup> (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.

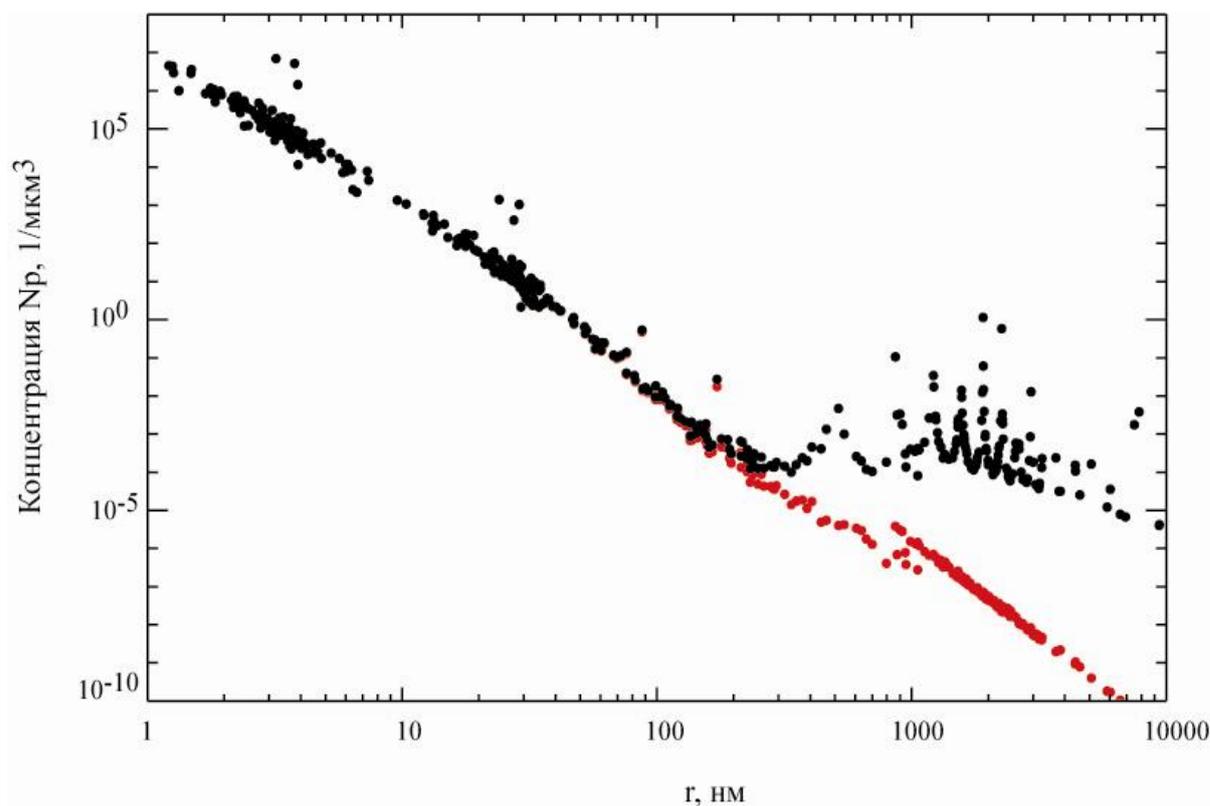
В разделе 4.6. представлены результаты сопоставления концентраций частиц  $N_p$  их радиусам  $r$  для сферической и длинам  $l$  для цилиндрической модели формы

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, а  $a = -5.59 \pm 0.17$  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.

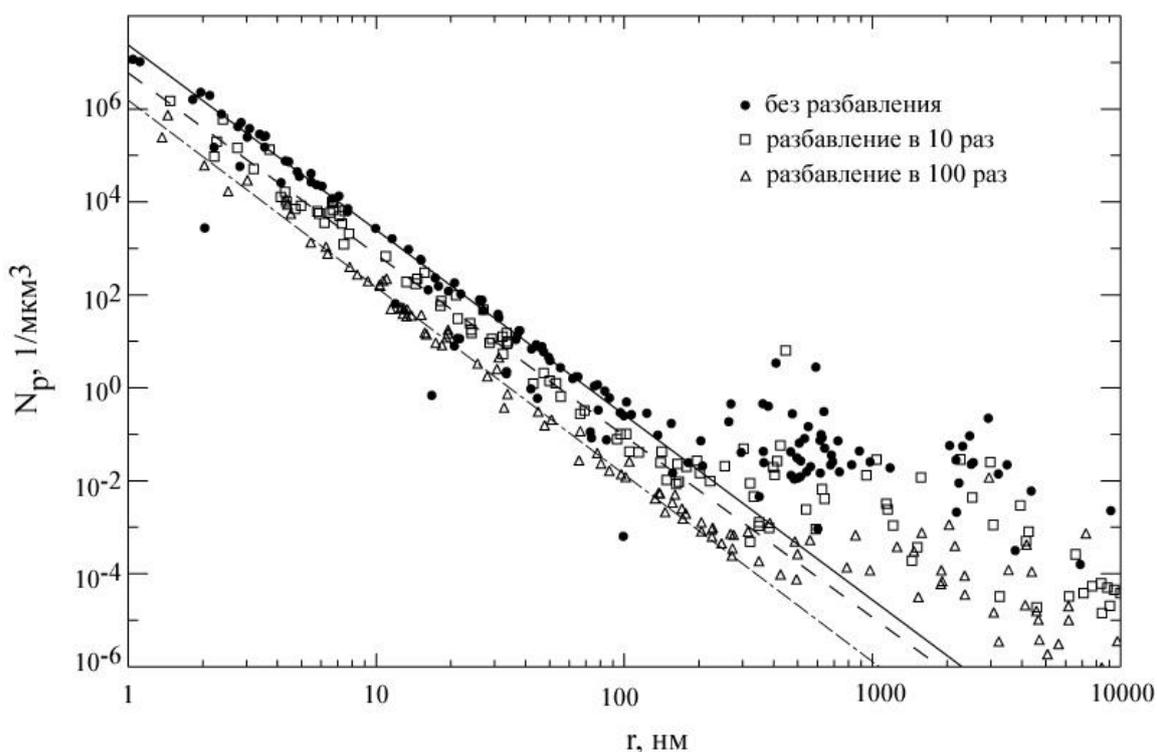


**Рис.4.** Диаграмма соответствия концентраций частиц  $N_p$  их радиусам  $r$  для сферической (черные точки) и длине  $l$  для цилиндрической (красные точки) модели их формы (в диапазоне от 1 нм до 300 нм точки для двух моделей совпадают)

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  $\sim 15-20$  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  $-3.98 \pm 0.16$ , для 10-кратного разбавления  $-3.91 \pm 0.07$ , для разбавления в 100 раз  $-4.03 \pm 0.05$ ). 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 -  $(3\pm 1)$  нм,  $(25\pm 6)$  нм,  $(126\pm 30)$  нм и  $(2000\pm 700)$  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 -  $-3.98\pm 0.16$ , для разбавленного в 10 раз -  $-3.91\pm 0.07$ , для разбавленного в 100 раз -  $-4.03\pm 0.05$ ).

**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. **M. Maslova**, L. Chaykov, A. Zaritskiy. The usage of proteolytic enzyme inhibitors in studies of the blood plasma particle size distribution by the dynamic light scattering. 57th Annual Meeting of Biophysical society, Philadelphia, February 2-6, 2013.

2. **Маслова М.Н.**, Зарицкий А.Р., Чайков Л.Л. Исследование динамики размеров белков плазмы крови *in vitro* методами молекулярного рассеяния света. XX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых. "Ломоносов-2013", 8-13 апреля 2013, с. 35.

3. **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, Amsterdam, 21-24 September, 2013, p.181.

4. **Маслова М.Н.**, Зарицкий А.Р., Чайков Л.Л. Колебания размеров и концентраций частиц в плазме крови, обнаруженные методами динамического

рассеяния света. V Всероссийская молодежная конференция по фундаментальным и инновационным вопросам современной физики, Москва, ФИАН, 2013, с. 54.

5. **M. Maslova**, A. Zaritskiy, L. Chaykov. The Blood Plasma Particles Sizes Oscillations Observed by Dynamic Light Scattering. 58th Annual Meeting of Biophysical society, San Francisco, February 15-19, 2014.

6. **Маслова М.Н.**, Бурханов И.С. Статистический анализ данных, получаемых для образцов плазмы крови методами динамического рассеяния света. XXI Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2014", 7-11 апреля 2014, с. 13.

7. **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.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В настоящее время методы статического и динамического светорассеяния применяются для решения широкого круга исследовательских и прикладных задач в различных областях, таких как: химия, экспериментальная физика, физическая химия, медицина и биология [28,29]. Являясь достаточно простыми и доступными (по сравнению с атомно-силовой и электронной микроскопией), эти методы позволяют исследовать частицы в жидкостях в широком диапазоне их размеров (от 1 нм до 4 000 нм).

Благодаря неинвазивности методов светорассеяния, а также возможности их использования без нарушения целостности образцов, эти методы являются незаменимыми для исследования растворов биологических макромолекул (белков, ДНК и др.) [3,4]. Эти методы позволяют успешно исследовать процессы агрегации и диссоциации макромолекул [32], оценивать их молекулярную массу и форму [6,7], определять размеры белков и их агрегатов [8,9], а также изучать процессов с участием белков в водных растворах в зависимости от концентрации солей (в том числе и тяжелых металлов [37]), кислотности pH [38] и концентрации самих белков [39].

### 1.1. Природа рассеяния света

Рассеяние света в среде возникает в результате наличия в ней неоднородностей [40]. Такими неоднородностями являются локальные флуктуации диэлектрической проницаемости, что впервые показал М. Смолуховский [41].

Для интенсивности рассеяния естественного света  $I$  используется формула, предложенная Эйнштейном [42]:

$$I = I_0 \frac{\pi^2 V^* V_{sc}}{2\lambda^4 L^2} \Delta\varepsilon^2 (1 + \cos^2 \theta) , \quad (1.1)$$

где  $V^*$  – объем флуктуации,  $V_{sc}$  – рассеивающий объем,  $\lambda$  – длина волны света,  $\theta$  – угол между направлением распространения рассеянного света и осью  $z$ ,  $\Delta\varepsilon^2$  – разность диэлектрической проницаемости невозмущенной среды и флуктуации, усредненной по всему ансамблю,  $L$  – расстояние между рассеивающим объёмом и точкой наблюдения.

Если регистрацию рассеянного света осуществляют в горизонтальной плоскости  $XY$  и возбуждающий свет имеет вертикальную поляризацию ( $\theta=90$  градусов), то интенсивность  $I$  вертикально поляризованного рассеянного света будет иметь вид:

$$I = I_0 \frac{\pi^2 V^* V_{sc}}{\lambda^4 L^2} \Delta\varepsilon^2, \quad (1.2)$$

Флуктуации диэлектрической проницаемости обусловлены флуктуациями основных термодинамических параметров – плотности  $\rho$  и температуры  $T$  (для описания светорассеяния удобнее разложить их на флуктуации давления  $P$  и энтропии  $S$ ), а также флуктуациями концентрации  $C$  растворенного вещества. В зависимости от природы флуктуации возникают и «рассасываются» во времени, следуя различным законам. Возникшая флуктуация давления представляет собой упругую волну, которая будет распространяться в жидкости со скоростью звука  $V$ . Флуктуации энтропии и концентрации неподвижны и релаксируют со скоростью, которая в первом случае определяется коэффициентами температуропроводности, а во второй – диффузии.

Флуктуации диэлектрической проницаемости могут быть представлены в виде пространственного Фурье-разложения – бесконечного множества синусоидальных решеток. При соответствующем выборе угла регистрации рассеяние света на флуктуациях можно рассматривать как дифракцию на одной единственной пространственной Фурье-компоненте флуктуации.

Пусть направление падающего света задается положением лазера, а направление рассеянного света положением фотоприемника, тогда волновой

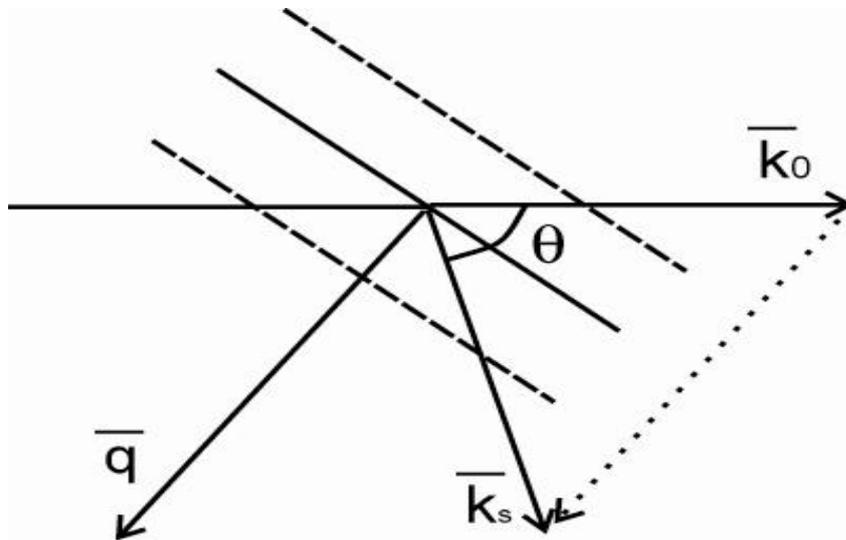
вектор выбранной решетки будет лежать в плоскости X-Y и определяться следующим выражением:

$$\vec{q} = \vec{k}_s - \vec{k}_0, \quad (1.3)$$

где  $\vec{k}_0$  – волновой вектор падающего света,  $\vec{k}_s$  – волновой вектор рассеянного света,  $\vec{q}$  – волновой вектор рассеяния, соответствующий Брэгговской Фурье-составляющей флуктуаций.

На Рис. 1.1 показана схема рассеяния света на одной Фурье-компоненте флуктуации. Параллельными линиями показана решетка Фурье-составляющей, отвечающей условию Брэгга. Таким образом, выбор Брэгговской решетки задается углом рассеяния  $\theta$  и длиной волны света  $\lambda$ , так что модуль волнового вектора рассеяния  $q$  определяется выражением:

$$q = |\vec{q}| = \frac{4\pi m}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2}, \quad (1.4)$$



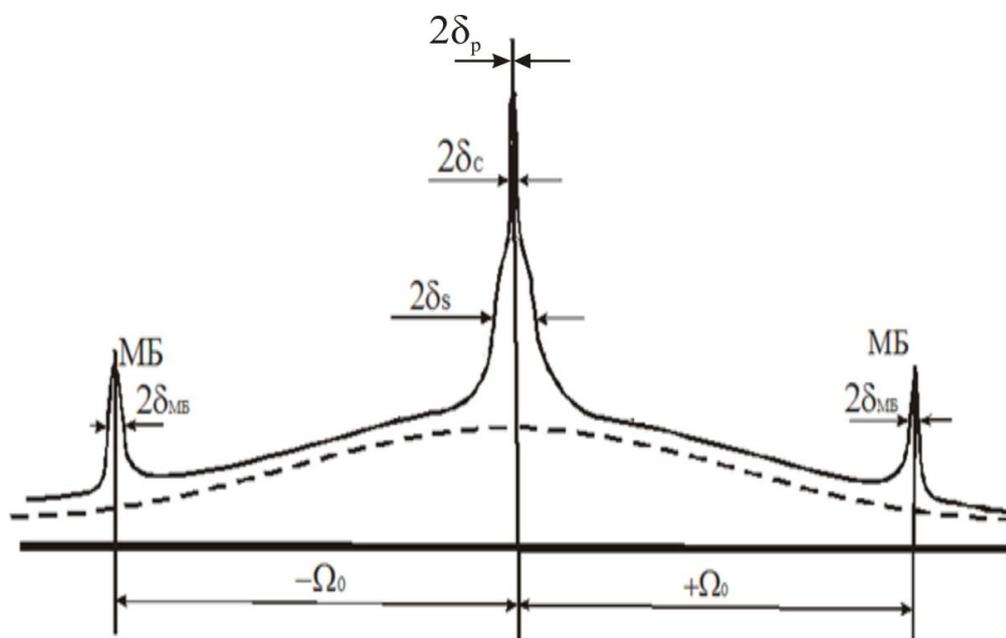
**Рис. 1.1.** Рассеяние света на Фурье-составляющей поля флуктуаций, отвечающей условию Брегга

Распространяющиеся со скоростью  $V$  флуктуации давления  $\delta P$  (звуковая волна) дают в спектре рассеяния линии, сдвинутые на частоту:

$$\Omega_0 = V|q| = \frac{4\pi nV}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2} = 2n \frac{V}{c} \omega_0 \sin \frac{\theta}{2}, \quad (1.5)$$

(рассеяние Мандельштама-Бриллюэна).

Флуктуации энтропии  $\delta S$  и концентрации  $\delta C$  неподвижны. Их релаксация дает уширение линии рассеяния света до 10 МГц (флуктуация энтропии), до 30 КГц (флуктуации концентрации растворенного вещества), от 3 КГц до нескольких десятых Гц (флуктуации концентраций частиц). Схематический вид спектра рассеянного света представлен на Рис. 1.2.



**Рис. 1.2.** Схематический вид спектра рассеяния света (молекулярного и динамического)

$\omega_0$  – частота возбуждающего света;

$\pm\Omega_0$  – частотный сдвиг компонент Мандельштама – Бриллюэна (1-10ГГц);

$\delta_{мб}$  – полуширина компонент Мандельштама - Бриллюэна (~100МГц);

$\delta_s$  – полуширина спектра рассеяния на флуктуациях энтропии (1-10МГц);

$\delta_c$  – полуширина спектра рассеяния на флуктуациях концентрации растворенного вещества (~30 КГц);

$\delta_p$  – полуширина спектра рассеяния на частицах (0.2Гц-1КГц).

## 1.2. Методы динамического рассеяния света

В 1964 году Пекорой была опубликована работа [43], в которой были проанализированы работы Бриллюэна [44,45], а также советских и индийских ученых, и описана существующая теория динамического рассеяния света в терминах автокорреляционной функции. Он также теоретически предсказал возможность экспериментального измерения очень малых частотных сдвигов и ширин спектра света, рассеянного на макромолекулах в жидкости. Он показал, что ширины этих линий содержат информацию о константах диффузии макромолекул в растворе.

На практике оказалось, что столь малые частотные сдвиги не могут быть измерены даже с помощью самого лучшего интерферометра Фабри-Перо. В настоящее время для измерения таких узких спектров применяются методы оптического смешения [46], сводящиеся к гетеродинамизации [47] или к исследованию самобиений частот рассеянного света. Последний принцип впервые был предложен Г.С. Гореликом в 1947г [48] и экспериментально реализован Гумундсенем и Форрестером в 1955г [49].

Сущность метода самобиений состоит в том, что свет, рассеянный исследуемым участком образца, направляется на фотокатод квадратичного по полю фотоприемника. На катоде возникают биения между различными частотными компонентами спектра падающего света. При этом освещенность фотокатода и, следовательно, фототок оказываются промодулированы по амплитуде частотами биений (от нуля до ширины спектра рассеяния).

### 1.2.1. Функция автокорреляции интенсивности рассеянного света

С помощью используемого в работе коррелятора (подробное описание которого приведено в разделе 2.1.1) накапливается функция корреляции фототока, пропорционального интенсивности рассеянного света, т.е. функция корреляции интенсивности  $G^{(2)}(\tau)$ :

$$G^{(2)}(\tau) = \langle I(0)I(\tau) \rangle = g^{(2)}(\tau) \cdot \langle I_s \rangle^2, \quad (1.6)$$

где  $\langle I_s \rangle$  – усредненная за время накопления интенсивность рассеянного света.

Математическое выражение для спектра мощности света имеет вид:

$$S(\omega) = \left\langle \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \left| \int_{-T/2}^{T/2} E(t) e^{-i\omega t} dt \right|^2 \right\rangle, \quad (1.7)$$

где  $E(t)$  – электрической поле рассеянного света частоты  $\omega$ .

или

$$S(\omega) = \left\langle \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_{-T/2}^{T/2} \int_{-T/2}^{T/2} \langle E(t) E^*(t') \rangle e^{-i\omega(t-t')} dt dt' \right\rangle, \quad (1.8)$$

где  $E^*(t)$  – сопряженное поле.

В случае стационарности поля рассеянного света (когда частотный состав спектра не изменяется с течением времени) имеем:

$$S(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} \langle E(\tau) E(0) \rangle e^{-i\omega\tau} d\tau, \quad (1.9)$$

То есть спектральная мощность  $S(\omega)$  есть Фурье-преобразование корреляционной функции поля, которая определяется выражением:

$$g^{(1)}(\tau) = \frac{1}{\langle I_s \rangle} \langle E(\tau) E^*(0) \rangle, \quad (1.10)$$

Причем, корреляционная функция поля  $g^{(1)}(\tau)$  связана с корреляционной функцией интенсивности  $g^{(2)}(\tau)$  через соотношение Зигерта:

$$g^{(2)}(\tau) = 1 + A |g^{(1)}(\tau)|^2, \quad (1.11)$$

Коэффициент  $A$  связан с пространственной когерентностью рассеянного света и обусловлен геометрией эксперимента (размером источника и апертурой приемника).

Таким образом, нормированная функция корреляции интенсивности рассеянного света:

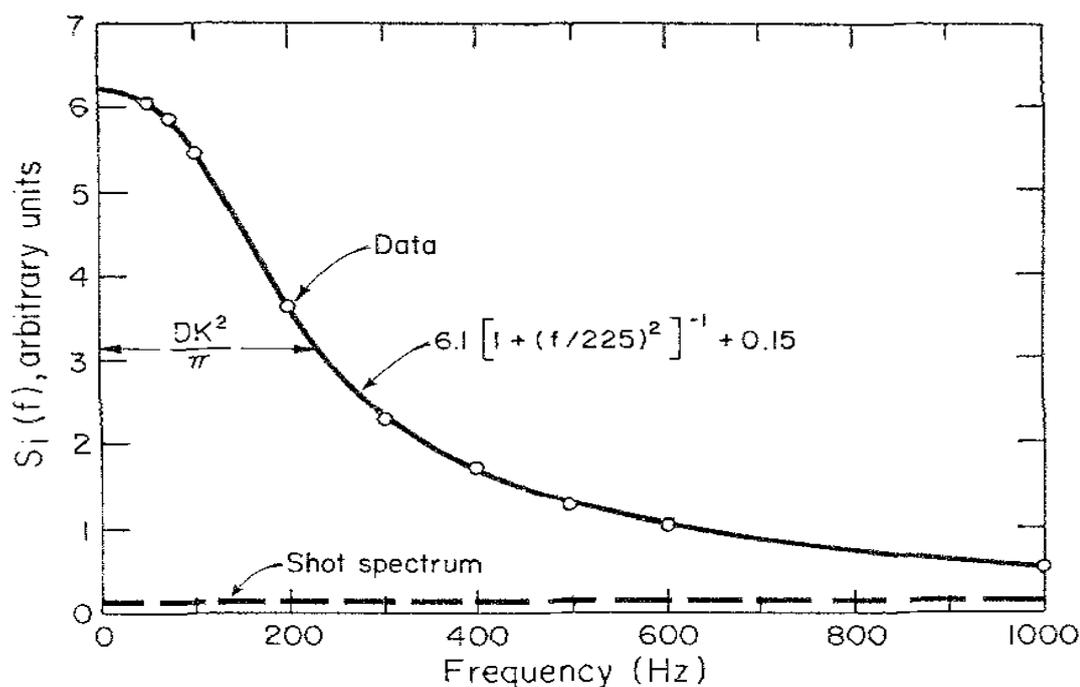
$$g^{(2)}(\tau) = \frac{\langle I(\tau)I(0) \rangle}{\langle I_s \rangle^2}, \quad (1.12)$$

связана со спектром рассеянного света  $S(\omega)$ .

Спектр фототока (Рис. 1.3), а, следовательно, и рассеянного света представляет собой лоренциан [50], максимум которого, расположен на частоте возбуждающего света, с шириной на полувысоте:

$$\Gamma = 2\pi(\Delta f)_{1/2} = Dq^2, \quad (1.13)$$

где  $D$  – коэффициент диффузии частиц,  $q$  – волновой вектор рассеяния света.



**Рис. 1.3.** Спектр фототока для суспензии полистереновых сфер диаметром 0,234 мкм под углом рассеяния 90 градусов. Пунктиром показан дробовой шум. [50]

Измерив ширину спектра фототока, согласно (1.13), можно найти коэффициенты диффузии частиц в жидкости.

### 1.2.2. Связь корреляционной функции интенсивности рассеянного света и электрического поля со временем релаксации флуктуаций концентраций частиц. Уравнение Стокса-Эйнштейна

Релаксационная динамика флуктуаций концентраций частиц описывается уравнением диффузии:

$$\frac{\partial N_p}{\partial t}(r,t) = -D \cdot \Delta N_p(r,t), \quad (1.14)$$

где  $N_p$  – это концентрация частиц,  $\Delta$  – оператор Лапласа и  $D$  – коэффициент диффузии, который является ключевым параметром для определения размеров.

Как известно, решением уравнения диффузии (1.14) в одномерном случае является экспонента с показателем степени, содержащим коэффициент диффузии частиц  $D$ . Можно показать, что в случае рассеяния света на флуктуациях концентраций монодисперсных частиц, функция  $g^{(1)}(\tau)$  есть:

$$g^{(1)}(\tau) = \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right), \quad (1.15)$$

где  $\tau$  – время релаксации флуктуаций концентраций частиц, которое обратно пропорционально характерной ширине спектральной линии  $\Gamma$  света, рассеянного на флуктуациях концентрации.

Из соотношений (1.13) и (1.15) следует, что:

$$g^{(1)}(\tau) = \exp(-Dq^2t), \quad (1.16)$$

Коэффициент диффузии  $D$  связан с радиусом монодисперсных сферических частиц соотношением Стокса-Эйнштейна [14,15]:

$$D_i = \frac{kT}{6\pi\eta r_i}, \quad (1.17)$$

где  $k$  – константа Больцмана,  $T$  – температура,  $\eta$  – это вязкость раствора,  $r_i$  – радиус частицы в приближении ее сферичности.

Следовательно, радиус частиц  $r_i$  в случае сферической их формы будет определяться соотношением:

$$r_i = \tau_i \frac{kT}{6\pi\eta} q^2, \quad (1.18)$$

В случае несферических частиц речь будет идти об эффективном гидродинамическом радиусе.

### 1.2.3. Стратегии аппроксимации корреляционной функции

Фотонная корреляционная спектроскопия является непрямым методом исследования размеров частиц. Для определения интересующих величин (коэффициентов диффузии, размеров частиц или распределений интенсивности рассеянного света по размерам) корреляционную функцию электрического поля, связанную с получаемой в ходе эксперимента автокорреляционной функцией флуктуаций интенсивности рассеянного света  $g^{(2)}(t)$ , математически обрабатывают с помощью специальных алгоритмов.

В самом простом случае моодисперсного раствора, который содержит только сферические частицы одинакового размера, нормированная функция автокорреляции интенсивности описывается экспонентой:

$$g^{(2)}(\tau) = P \cdot \exp(-2 \cdot \Gamma \cdot \tau) + 1, \quad (1.19)$$

В случае полидисперсного раствора, когда частицы неидентичные, автокорреляционная функция интенсивности рассеянного света описывается следующей парой уравнений:

$$g^{(2)}(\tau) = [g^{(1)}(\tau)]^2 + 1 + \xi(\tau), \quad (1.20)$$

$$g^{(1)}(\tau) = \int_0^{\infty} I(\Gamma) \exp(-\Gamma t) d\Gamma, \quad (1.21)$$

где  $I(\Gamma)$  – амплитуды отдельных экспонент, представляющие собой долю интенсивности света, рассеянного частицами с характерной шириной линии спектра  $\Gamma$ .

Интегральное уравнение (1.21) является основным при обработке данных в фотонной корреляционной спектроскопии. Оно относится к типу интегральных уравнений Фредгольма первого порядка, а поиск его решения является некорректно поставленной математической задачей. Фактически это означает, что, если функция  $g^{(1)}(t)$  известна даже с малой ошибкой, то точное решение задачи (распределение  $I(\Gamma)$ ) может или не существовать, или быть отличным от реального распределения. С другой стороны, приближительное решение никогда не единственное.

Нахождение  $I(\Gamma)$  сводится к обратному преобразованию Лапласа от определяемой функции  $|g^{(1)}(\tau)|$ . Для решения этой задачи разработаны специальные методы, основными из которых являются метод моментов или кумулянтов [51,52], а также метод регуляризованных преобразований Лапласа (алгоритм Contin) [53,54].

### **Анализ кумулянтов (метод моментов)**

Функцию корреляции поля  $g^{(1)}(t)$  разлагают в ряд по степеням времени задержки  $t$  (кумулянтная развертка), так что:

$$q^{-2} \cdot \log[(g_2(q, \tau) - 1)^{1/2}] \xrightarrow{fit} p_0 - p_1 \cdot \tau + p_2 \cdot \tau^2 - \dots, \quad (1.22)$$

где  $p_0$ ,  $p_1$ ,  $p_2$  – свободные параметры, с помощью которых аппроксимируется экспериментальная кривая. Параметр  $p_0$  описывает спад функции,  $p_1$  – дает средний коэффициент диффузии частиц в растворе, параметр  $p_2$  дает оценку полидисперсности образца, то есть среднеквадратичное отклонение коэффициентов диффузии.

Метод моментов подходит для аппроксимации функции корреляции  $g^{(1)}(\tau)$  в случае, когда распределение частиц по размерам мономодально, то есть в этом распределении имеется один пик. Для исследования сложных многокомпонентных растворов необходимы другие методы аппроксимации функции автокорреляции рассеянного света.

## Алгоритм Contin

В алгоритме CONTIN для аппроксимации функции автокорреляции интенсивности рассеянного света, используются схемы обратных преобразований Лапласа. Основная идея этого метода заключается в том, что для аппроксимации функции автокорреляции  $g^{(1)}(\tau)$  подбирается целый набор экспонент. Другими словами, вместо единственного коэффициента диффузии  $D$ , отыскивается функция распределения  $I(D)$ , такая что:

$$(g^{(2)}(\tau) - 1)^{1/2} = g^{(1)}(\tau) = \int_0^{\infty} I(D) \exp[-D \cdot q^2 \cdot \tau_i] dD, \quad (1.23)$$

где  $i=1, M$  – число каналов коррелятора.

Улучшением схемы аппроксимации является использование так называемых регуляризаторов Тихонова, которые представляют собой абстрактные функции, без какого-либо физического смысла, вводимые в алгоритм для уменьшения числа кандидатов для решения уравнения (1.23).

Алгоритмы нахождения распределений  $I(D)$  реализованы в программном обеспечении DynaLS (Alango Ltd.), в котором упрощены вычислительные процедуры, а результат может быть представлен как в графическом, так и числовом виде.

### **1.3. Исследование биологических жидкостей с помощью методов динамического и статического светорассеяния как основа диагностики некоторых болезней**

Исследования характеристик частиц (размеров, молекулярных масс, концентраций и др.) в биологических жидкостях человека с помощью методов светорассеяния представляет большой интерес, поскольку результаты таких исследований имеют практическое значение для медицины.

В настоящее время изучение разбавленных образцов сыворотки [50] и плазмы крови [18], а также их модельных аналогов [51]–[53], привело к разработке методик диагностики различных заболеваний [13], [54]–[56]. Авторами этих методик показано, что о наличии заболеваний у человека можно судить по изменению перечисленных выше характеристик частиц сыворотки крови. Так, появление в сыворотке или плазме крови агрегатов белков определенных размеров [21], [56], изменение соотношения концентраций альбуминов глобулинов в ней [13], а также изменение вириального коэффициента [14] 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 сыворотка не содержит в своем составе белок – фибриноген, а также продукты его протеолитической деградации, образующиеся при запуске механизма свертывания крови. Кроме того, при активации этого механизма в плазму могут выделяться микрочастицы из тромбоцитов и других форменных элементов крови.

Несмотря на перечисленные затрудняющие факторы, исследования плазмы крови с помощью методов светорассеяния являются весьма актуальными, поскольку дают информацию о скоростях протекания обменных процессов *in vitro*, которые коррелируют со скоростями процессов в организме донора. Кроме того, приготовление образцов плазмы крови более стандартизовано, чем приготовление образцов сыворотки, что уменьшает влияние на результаты человеческого фактора. И, наконец, при переливании донорской крови требуется именно плазма крови, поэтому исследование изменений ее состава с течением времени может дать новую информацию, необходимую для разработки методик хранения донорской крови.

Поскольку метод ДРС дает информацию о характерных коэффициентах диффузии (или размерах) частиц, присутствующих в жидкости, то для исследования изменений состава, происходящих в плазме крови с течением

времени, необходимо провести анализ размеров и концентраций частиц, присутствующих в ней.

### **1.3.1. Состав плазмы крови**

Объектом исследования настоящей работы является плазма крови, представляющая собой жидкую составляющую крови. В плазме взвешены форменными элементы (эритроцитами, тромбоцитами, лейкоцитами и др.), а также различные белки, жиры, углеводы и другие частицы. Получение образцов плазмы крови является рутинной, стандартизированной процедурой, проводимой в любом медицинском учреждении. Эту жидкость получают путем отделения ее от форменных элементов либо в результате их естественного оседания, которое происходит из-за разницы в плотностях форменных элементов ( $1,1 \cdot 10^3 \text{ кг/м}^3$ ) и плазмы крови ( $1,03 \cdot 10^3 \text{ кг/м}^3$ ) [55], либо в результате центрифугирования.

По данным нормальной физиологии [56] состав плазмы крови представлен: анионами –  $\text{Cl}^-$  (110 ммоль/кг воды плазмы),  $\text{HCO}_3^-$  (28 ммоль/кг),  $\text{PO}_4^{2-}$  (1 ммоль/кг),  $\text{SO}_4^{2-}$  (1 ммоль/кг), катионами –  $\text{Na}^+$  (153 ммоль/кг воды плазмы крови),  $\text{K}^+$  (5 ммоль/кг),  $\text{Ca}^{2+}$  (3 ммоль/кг),  $\text{Mg}^{2+}$  (1 ммоль/кг), органическими кислотами (6 ммоль/кг), а также белками (1 ммоль/кг). Подробнее см. [57].

К органическим соединениям плазмы крови относят белки (преальбумины, альбумины, глобулины, факторы сворачивания крови) и их агрегаты, а также пептиды, аминокислоты, липиды, углеводы.

Основным компонентом плазмы крови являются белки. Общее количество их в плазме – 70-75 г/л (объемная их концентрация  $C_v \approx 7-8\%$ ) и они составляют основную часть твердых веществ плазмы [58].

### **1.3.2. Альбумины плазмы крови**

По данным нормальной физиологии человека [56] около 60% всех белков плазмы крови составляют альбумины, концентрация которых в ней 35-45 г/л.

Молекулярная масса молекулы альбумина составляет 69 кДа (69 кг/моль). Одной из основных его функций является перенос транспортируемых кровью веществ, поэтому этот белок склонен к образованию комплексов с присутствующими в плазме крови соединениями [59].

В растворе альбумины могут существовать в виде как мономеров, так и агрегатов. С помощью гель-электрофореза могут быть выделены мономеры, димеры, тетрамеры и гексамеры, размеры которых в растворах различны [60].

Размеры молекул альбумина интенсивно изучаются с помощью методов атомно-силовой микроскопии [61], рассеяния нейтронов на малых углах [62], а также методов динамического светорассеяния [63,64]. В последних работах показано, что при физиологических  $\text{pH}=7,4$  альбумин имеет наиболее компактную конфигурацию и гидродинамический радиус его составляет 59-62 Å.

### **1.3.3. Глобулины плазмы крови**

Следующими по процентному содержанию белками плазмы крови, образующими отдельную функциональную группу, являются глобулины. По данным нормальной физиологии [56] их концентрация составляет 15-25% (8-16 г/л) от общего количества белка плазмы крови. Средняя молекулярная масса глобулинов варьируется от 90 до 160 кДа, а размеры их составляют около 20-30 нм. Глобулины относят к основным белковым переносчикам липидов и полисахаридов, они удерживают в плазме крови липиды и жиры. В результате сродства липидов к этим белкам, средние размеры их комплексов в плазме крови могут существенно варьироваться.

Концентрация глобулинов в плазме крови повышается практически при всех заболеваниях (особенно, воспалительных) [58]. В работе [4] представлены результаты исследования модельных систем сыворотки крови с различным соотношением альбуминов к глобулинам (3:1 и 1:3) с помощью методов динамического и статического светорассеяния. При соотношении альбуминов к глобулинам 3:1 параметры светорассеяния модельной системы были сходными с

теми, которые авторы получали для сыворотки крови здоровых людей. В то время как для системы с соотношением этих белков 1:3 те же параметры оказывались аналогичными тем, которые получали для сыворотки доноров с онкологическими заболеваниями. Таким образом, на основе сравнения данных светорассеяния, полученных для модельных систем и сыворотки крови, авторами работы [4] была установлена взаимосвязь между изменением соотношения альбуминов и глобулинов в сыворотке и развитием патологических процессов в организме.

### **1.3.4. Фибриноген**

Этот белок участвует в процессах свертывания плазмы крови. Его молекула состоит из трех структурных единиц с диаметром около 60 Å, соединенных между собой более тонкими белковыми тяжами. Общая длина молекулы фибриногена составляет около 50 нм по данным работы [65] и 73 нм по данным нормальной физиологии [56]. Концентрация этого белка в плазме крови составляет 2-4 г/л.

В работе [66] представлены результаты исследования изменения формы, структуры и гидродинамического радиуса молекул фибриногена в зависимости от изменений кислотности pH и электролитного состава среды с помощью методов ДРС. Показано, что pH среды влияет на конформацию фибриногена, а, следовательно, и на эффективный гидродинамический радиус его молекулы.

В настоящей диссертационной работе исследуется плазма крови, которая, благодаря своим хорошим буферным свойствам [67], поддерживает pH на постоянном уровне (7,2 – 7,4). Поэтому влияние pH на размеры молекул белков в образцах плазмы крови исключено.

### **1.3.5. Белковые комплексы плазмы крови**

Известно, что большинство белков в жидкости склонно к образованию комплексов (агрегатов) с другими белками, пептидами, липидами, углеводами и др. В плазме крови присутствуют белки (альбумины, глобулины), чья

деятельность определяется именно способностью связывать другие белки и пептиды [68]. Кроме того, как уже указывалось ранее, развитие в организме человека патологий отражается на способности белков к агрегации [9], [13], [55].

### **1.3.6. Липопротеины плазмы крови**

Липопротеины представляют собой комплексы белков с липидами и холестерином [69]. Эти частицы обычно подразделяются на группы от самых больших и менее плотных до меньших и более плотных. Такое разделение базируется на данных, полученных методами электрофореза и ультрацентрифугирования.

Липопротеины имеют сродство к липидам, триглицеридам (жир), холестерину, и поэтому способны образовывать агрегаты с этими соединениями, осуществляя свою транспортную функцию от печени к клеткам других органов и тканей (и обратно). Известно, что липопротеины представляют практический интерес для исследователей. Так, в работах [70,71] показано, что уровень липопротеинов низкой плотности в плазме крови коррелирует с развитием коронарной болезни сердца.

По данным нормальной физиологии [56] и биохимии человека [58] размеры липопротеинов очень низкой плотности в плазме крови варьируются от 30 до 80 нм; липопротеинов средней плотности – от 25 до 50 нм; липопротеинов низкой плотности (липопротеинов «плохого холестерина») от 18 до 28 нм; а липопротеинов высокой плотности (липопротеины «хорошего холестерина») – от 2 до 15 нм.

В работах [69,72,73] представлены результаты применения методов светорассеяния для определения коэффициентов диффузии и размеров липопротеинов различных плотностей. В работе [73] показано, что липопротеины очень низкой плотности имеют коэффициент диффузии –  $5,4 \cdot 10^{-7}$  см<sup>2</sup>/с со средним диаметром  $792 \pm 30 \text{ \AA}$ , низкой плотности –  $1,8 \cdot 10^{-7}$  см<sup>2</sup>/с со средним диаметром  $265 \pm 13 \text{ \AA}$ , высокой плотности  $0,72 \cdot 10^{-7}$  см<sup>2</sup>/с со средним диаметром  $110 \pm 10 \text{ \AA}$ .

Такие результаты, полученные с помощью методов ДРС с использованием гомодинной установки, согласуются с данными нормальной физиологии [56].

### **1.3.7. Микрочастицы**

В 1967 году Вульф показал [74], что свежая плазма содержит зернистый материал (или микрочастицы), который выделяется из тромбоцитов в результате активации механизма свертывания крови. Позже в работе [75] было показано, что помимо тромбоцитов, источниками микрочастиц могут быть и другие форменные элементы крови, такие как лейкоциты, эритроциты, а также эндотелиальные клетки.

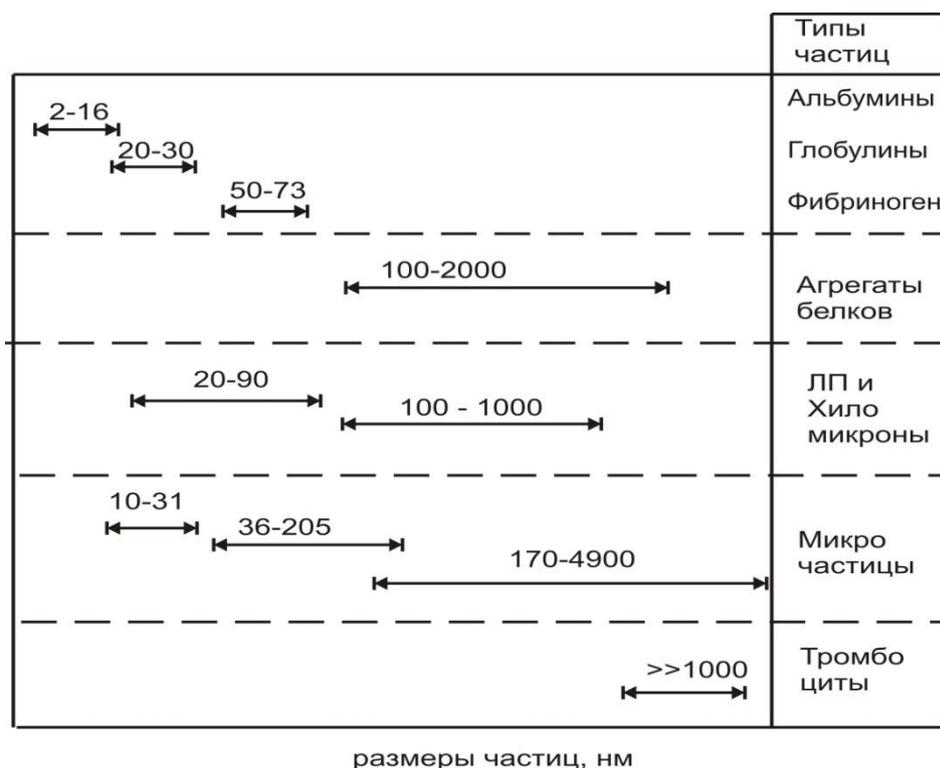
Исследование размеров микрочастиц в настоящее время проводится с помощью различных методов. В работах [76,77] показано, что их размеры варьируются в широком диапазоне от 100 до 1000 нм.

В работе [13] представлены результаты исследования распределений интенсивности рассеянного света по размерам микрочастиц в образцах свежезамороженной плазмы крови после ее размораживания с помощью двух установок ДРС, – это Zetasizer Nano S (Malvern Instruments Ltd, UK) и N5 анализатор размеров субмикронных частиц (Beckman Coulter, CA, USA). Обнаружено, что размеры микрочастиц в образцах плазмы крови, полученной от различных доноров (n=20), варьируются от 50 до 1000 нм. Авторы [20] выяснили, что распределения частиц по размерам, получаемые для образцов плазмы различных доноров, имеют 3 основных пика, средний размер по первому из которых лежит в диапазоне от 10 до 31 нм, для второго пика – от 36 до 205 нм, для третьего пика – от 172 до 4866 нм. Доля интенсивности рассеянного света каждым размером частиц от образца к образцу также варьировалась: для первого пика – от 6 до 69 %, для второго пика – от 25 до 100 %, для третьего пика – от 0 до 93 %.

Таким образом, проведенный анализ литературных данных о размерах частиц, выделенных из плазмы и сыворотки крови, позволил определить

диапазоны размеров, в которых ожидаются пики в распределениях  $I(r)$  при исследовании образцов плазмы крови методом ДРС. Рис. 1.4 иллюстрирует диапазоны размеров основных типов частиц, присутствующих в плазме крови (белков, агрегатов, липопротеинов и др.).

Представленные на Рис. 1.4 диапазоны размеров различных частиц плазмы крови пересекаются, поэтому при исследовании плазмы крови (без выделения ее компонентов) нельзя установить однозначное соответствие между полученным размером и типом частиц. При анализе распределений  $I(r)$ , полученных для нативных образцов плазмы или сыворотки крови, авторы некоторых работ пренебрегают частицами, концентрации которых малы по сравнению с основными белковыми компонентами образцов. Так, авторы работ [4,37] утверждают, что пики в распределениях интенсивности рассеянного света по размерам частиц в разбавленной сыворотке крови соответствуют преимущественно белкам (альбуминам, глобулинам) и их комплексам. Авторы работ [13,77] считают, что получаемые размеры в распределениях  $I(r)$  следует относить к микрочастицам, которые выделяются из эритроцитов и тромбоцитов при взятии пробы крови (см. строку «микрочастицы» Рис. 1.4). Однако, как видно из Рис. 1.4, каждому пику в распределении интенсивности рассеянного света по размерам частиц  $I(r)$  могут соответствовать разные типы молекул, агрегатов и частиц, размеры которых попадают в конкретный диапазон.



**Рис. 1.4.** Диапазоны размеров основных типов частиц, присутствующих в плазме крови (белков, их агрегатов, липопротеинов (ЛП) и хиломикронов, микрочастиц, а также тромбоцитов)

Проведенный анализ присутствующих в плазме крови молекул и частиц (белков, липопротеинов, микрочастиц и др.) необходим для дальнейшего анализа изменений их размеров и концентраций с течением времени.

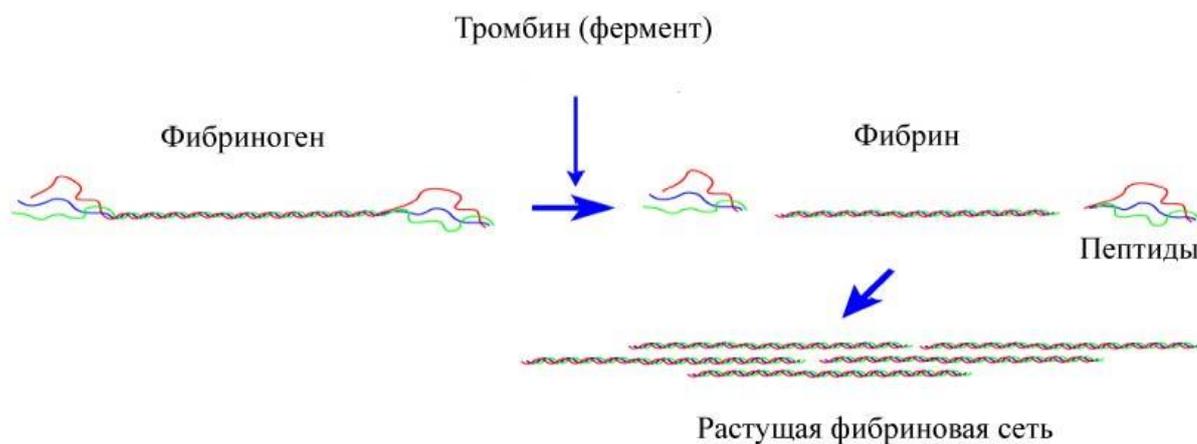
#### **1.4. Основные процессы, протекающие в плазме крови и влияющие на изменения ее состава**

Известно, что в плазме крови *in vivo* короткие пептиды разбираются на отдельные аминокислоты за 8-10 минут, в то время как крупные белки живут 2-3 месяца [67]. Постоянство их концентраций поддерживается в потоке за счет противоположно направленных скоростей притока (из клеток и с пищей) и убыли (в результате ферментативной деградации и оттока из плазмы). После взятия крови из организма приток из клеток и отток веществ в них прекращается, однако продолжается их ферментативная деградация. В результате этого процесса в плазме крови появляются продукты распада белков – пептиды и аминокислоты,

которые не могут уходить из плазмы крови и накапливаются в ней. Такое накопление продуктов распада белков может влиять на протекающие в плазме процессы. В разделе 1.4.3. описаны работы, посвященные исследованию влияния аминокислот и коротких пептидов на процессы агрегации белков в модельных растворах.

#### **1.4.1. Механизм свертывания крови**

При взятии крови из организма в ней активируются процессы, лежащие в основе механизма свертывания крови [11]. Этот механизм очень сложен и насчитывает несколько десятков участников и различных реакций. Основными ферментами этого механизма, являются тромбин [78], участвующий в процессе расщепления фибриногена на фибрин и отдельные пептиды, и плазмин [79], осуществляющий расщепление образовавшихся сгустков и предотвращающий в организме излишнее тромбообразование. Образовавшиеся в результате расщепления фибриногена молекулы фибрина агрегируют друг с другом и образуют фибриновую сеть. В то же время образовавшиеся пептиды далее разбираются карбокси- и аминопептидазами до отдельных аминокислот, что показано в работах [80,81] с помощью методов масс-спектрометрии. На Рис. 1.5 схематично показан процесс расщепления фибриногена на фибрин и пептиды и дальнейшее образование фибриновой сети.



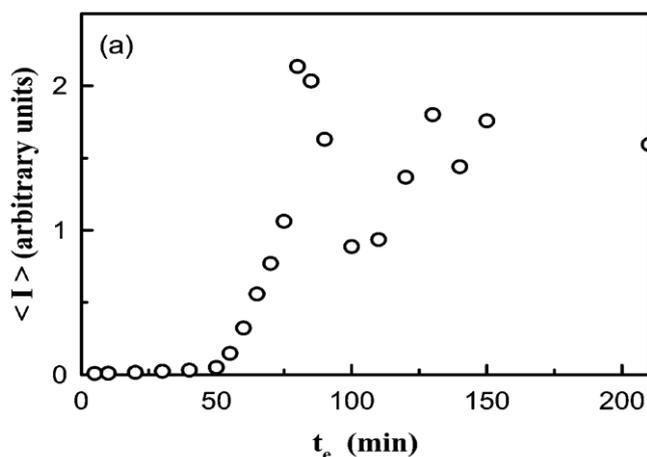
**Рис. 1.5.** Схематичное представление процесса деградации фибриногена под воздействием тромбина и образования фибриновой сети

Деградация фибриногена, осуществляемая ферментами, приводит, с одной стороны, к появлению частиц более мелких размеров (пептидов и аминокислот), а, с другой, к агрегации продуктов распада с образованием крупных частиц. Такие изменения могут отражаться на характеристиках светорассеяния, получаемых для образцов плазмы крови (или ее модельных аналогов).

#### **1.4.2. Исследование процессов деградации фибриногена в модельных растворах с помощью ДРС**

В работе [26] приведены результаты исследования процессов деградации фибриногена под воздействием тромбина в модельном растворе. С помощью методов статического светорассеяния получен временной ход интенсивности рассеянного света в образце (Рис. 1.6). Авторами обнаружено, что на начальном этапе превращения фибриногена в фибрин интенсивность светорассеяния не изменяется (от 0 до 50 минут), что соответствует стадии образования комплексов фибриногена с ферментом тромбином. На втором этапе интенсивность рассеянного света растет (от 50 до 75 минут), что авторы работ приписывают стадии образования фибриновых агрегатов, а также росту их числа и размеров. На

третьем этапе наблюдаются колебания интенсивности, что соответствует стадии дальнейшего формирования фибриновой гелевой сети.



**Рис. 1.6.** Временной ход интенсивности рассеянного света в растворе фибриноген - тромбин с высокой концентрацией тромбина, полученный под угол рассеяния  $30^\circ$ , длина волны лазера 633 нм [26]

Заметим, что поскольку в модельном растворе, содержащем фибриноген и тромбин, зарегистрированы колебания интенсивности рассеянного света, то такие колебания могут иметь место и при исследовании образцов плазмы крови методами светорассеяния.

### 1.4.3. Предотвращение свертывания крови

Как уже было сказано выше, в норме в организме происходит как свертывание крови за счет протеолитической деградации фибриногена (с помощью фермента тромбина), так и предотвращение свертывания крови за счет действия плазмина и других веществ (таких как, гепарин). *In vitro* в крови и ее препаратах (в частности, в плазме крови) для предотвращения свертывания необходимо предпринимать специальные меры, а именно добавлять антикоагулянты, наиболее часто используемыми из которых являются гепарин, цитрат натрия и ЭДТА.

Гепарин тормозит свертывание крови как *in vitro*, так и *in vivo*, являясь естественным метаболитом, присутствующим в плазме крови. Его молекулярная

масса составляет 13-15 кДа, средняя длина молекулы – 9 нм [82,83]. Этот антикоагулянт представляет собой смесь полисульфатных эфиров гликозаминов. Он образует комплекс с ингибитором – антитромбином III, повышая тем самым эффективность ингибирования, подавляя образование и действие тромбина. Помимо этого, гепарин активирует фибринолизис, то есть способствует растворению сгустков крови и коагулянтов плазмы.

В работе [84] показано, что гепарин может взаимодействовать с некоторыми белками, приводя к образованию их агрегатов. Следовательно, добавление гепарина в плазму крови может приводить к изменению скоростей агрегации белков.

Другой антикоагулянт - цитрат натрия, связывая ионы  $Ca^{2+}$ , необходимые для процессов свертывания, замедляет процессы коагуляции плазмы.

ЭДТА широко используется как антикоагулянт для анализов крови. Его молекулярная масса – 292 кДа. Как и цитрат натрия, он связывает ионы кальция и переводит их в нерастворимую форму.

В работе [85] приведено сравнение аминокислотного состава образцов плазмы крови с добавлением цитрата натрия, гепарина и ЭДТА с образцами сыворотки крови. Обнаружено, что в пробах сыворотки крови (в образцы не добавляются антикоагулянты) концентрации различных аминокислот в среднем выше на 27,8% (диапазон от 10 до 50% в зависимости от образца), чем в пробах плазмы крови с добавлением различных антикоагулянтов. Это свидетельствует о том, что добавление антикоагулянтов в кровь при подготовке образцов плазмы замедляет работу протеолитических ферментов, которая приводит к увеличению концентрации аминокислот.

В работе [81] представлены результаты исследования динамики деградации фибринопептида А, искусственно введенного в образцы плазмы крови с различными антикоагулянтами. Авторами выяснено, что этот пептид имеет наименьшую стабильность и интенсивность пика, получаемого с помощью масс-спектрометрии (MALDI-TOF), в образцах плазмы крови с добавлением гепарина, поскольку через 3 часа после его введения пик практически исчезает. Затем в

порядке возрастания стабильности пика, отвечающего за фибринопептид А, следуют образцы плазмы крови с добавлением цитрата натрия (6 часов), ЭДТА (12 часов) и ингибиторов протеолитических ферментов (48 часов).

Рассмотренные вопросы, касающиеся процессов протеолитической деградации белков и их ингибирования, неразрывно связаны с процессами агрегации частиц, белков и составляющих плазмы крови. В следующей части обзора представлены работы, посвященные исследованию процессов агрегации модельных растворов белков и пептидов с помощью методов динамического и статического рассеяния света.

## **1.5. Процессы агрегации молекул белков и частиц в плазме крови. Применение методов ДРС для изучения различных типов агрегации в модельных растворах белков**

Агрегация белков и частиц и протеолитическая деградация белков суть процессы, приводящие к изменению белково-пептидного состава плазмы крови, в результате протекания которых исчезают частицы одних размеров и появляются частицы других. Как было сказано выше, процессы агрегации могут приводить к появлению частиц более крупного размера, а процессы деградации – к появлению более мелких размеров (которые, в свою очередь, могут также агрегировать).

Белки, находящиеся в растворе и предоставленные сами себе, со временем неизбежно образуют агрегаты [86]. Исследованию агрегационной кинетики [87], [88], а также влиянию различных факторов, таких как рН, температура и наличие в растворе других веществ и др., на скорость агрегации белков в растворе, посвящено большое количество работ. Для изучения процессов агрегации белков часто используются методы ДРС.

### **1.5.1. Влияние температуры и добавления ПАВов на агрегацию белков в модельных растворах. Обратимая и необратимая агрегация**

Работа [89] посвящена изучению агрегации белков вируса табачной мозаики методами динамического рассеяния света. В этой работе использовались два различных метода индуцирования агрегации белков. Один из методов заключался в нагревании образца до 52°C, а другой в добавлении поверхностно-активного вещества к раствору белка. Результаты исследования первого типа агрегации, вызванного нагреванием образца, показали, что в растворе имело место образование и рост агрегатов, что приводило к изменению регистрируемых гидродинамических радиусов частиц. Как следствие, наблюдался также рост интенсивности рассеянного света с течением времени. Кроме того, авторами обнаружено, что «начальные» агрегаты с размерами порядка 25 нм появлялись практически сразу при увеличении температуры раствора. По прошествии короткого промежутка времени в растворе возникали «основные» агрегаты с размерами порядка 100 нм. Эти агрегаты затем сгруппировывались, что приводило к формированию «супер» агрегатов (>1000 нм), которые могли выпадать в осадок. Авторами установлено, что агрегация, вызванная нагреванием, необратима.

Второй тип агрегации, индуцированной добавлением к раствору белков поверхностно-активного вещества, приводил к формированию только одного типа агрегатов, размеры которых увеличивались с течением времени. Ни одного «супер» агрегата, сформированного из менее крупных «начальных», в исследуемом растворе не было обнаружено. Авторы работы [91] показали также, что процессы агрегации, вызванные добавлением ПАВов, обратимы.

В работе [90] представлены результаты исследования агрегации белка человеческого трансферрина при изменении температуры от 20 до 47 °C. Обнаружено, что «основные» белковые агрегаты (см. работу [89]) формируются при температуре ниже и выше температуры человеческого тела, а при температуре выше 47 °C «супер» агрегаты формируют фрактальные агрегаты. Авторы работы обнаружили, что «основные» агрегаты формировали дендрические структуры, которые в растворе существовали вместе с большими фрактальными агрегатами. Похожие результаты были получены при

исследовании агрегации  $\alpha$ -лактальбумина, во время которой также происходило формирование промежуточных агрегатов [91].

Из представленных результатов работы [89], [90] следует, что существуют обратимые и необратимые типы агрегации. В экспериментах, выполненные в данной работе, температура не превышала 25°C, поэтому в исследуемых образцах плазмы не могло происходить необратимое образование «супер»-агрегатов. Это лучше перенести ниже в анализ результатов.

### **1.5.2. Влияние pH на агрегацию белков в модельных растворах**

В работе [92] представлены результаты исследования процессов агрегации бычьего сывороточного альбумина (БСА) при изменениях кислотности образца. Авторами установлено, что изменение pH раствора БСА возле его изоэлектрической точки, приводит к агрегации этих белков. При малых изменениях pH (от pH=7.4 до pH=7.2) процесс являлся обратимым и протекал без образования «супер» агрегатов. При больших изменениях pH в сторону подкисления (от 7.4 до 6.2 pH) происходила необратимая агрегация с формированием «супер» агрегатов, которая сопровождалась выпадением осадка (седиментацией).

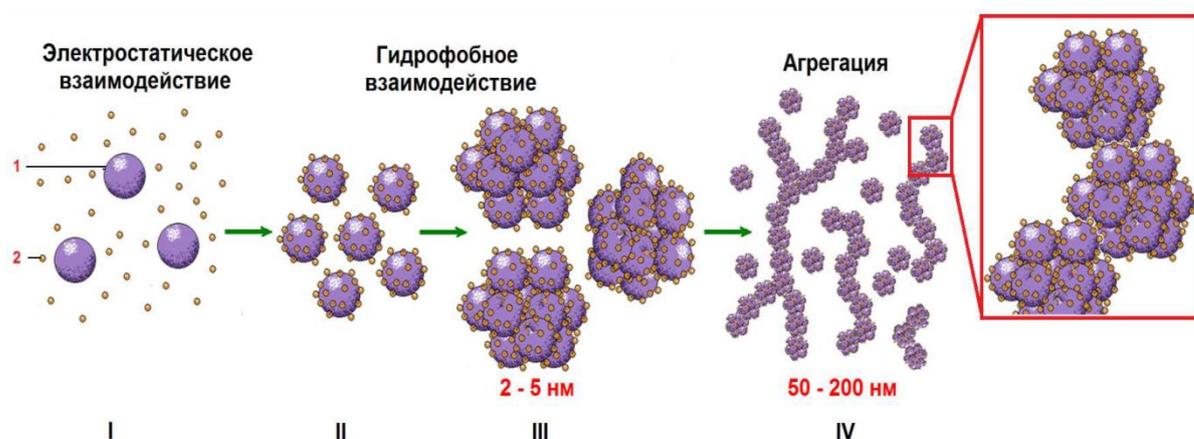
### **1.5.3. Влияние аминокислот и пептидов на агрегацию белков в модельных растворах**

В работе [93] представлены результаты исследования влияния аминокислот на агрегацию белков в модельных растворах. Оказалось, что аргинин наилучшим образом предотвращает агрегацию белка лизоцима в модельном растворе. Авторы этой работы обнаружили, что добавление 200 мМ аргинина препятствовало агрегации белков, вызванной как тепловой денатурацией, так и разбавлением. В настоящее время эта аминокислота применяется для предотвращения агрегации белков в растворах при их хранении [94,95].

Заметим, что аргинин всегда присутствует в плазме крови и наряду с другими аминокислотами появляется в результате протеолитической деградации пептидов и белков. В работе [85] показано, что концентрация этой аминокислоты в свободном виде в плазме крови с добавлением гепарина составляет 67 мкМ, что почти на 3.5 порядка ниже, чем концентрация, необходимая для ингибирования процессов агрегации белков [93]. Поэтому о существенном влиянии аминокислот на скорость агрегации белков в плазме крови можно говорить в том случае, когда не менее 10% белков полностью деградировали на аминокислоты.

В работах [96,97] представлены результаты исследования влияния различных пептидов на агрегацию белков в модельных растворах. С помощью методов ДРС обнаружено, что амфифильные пептиды вызывают агрегацию белковых молекул. Так, короткие пептиды Arg-Phe и Asp-Phe, усиливали агрегацию белков дрожжевой алкогольдегидрогеназы (АДГ) и  $\alpha$ -лактальбумина. На Рис. 1.7 схематически изображен процесс агрегации белка  $\alpha$ -лактольбумина под воздействием Arg-Phe. Видно, что агрегация приводит к изменению как размера частиц, так и самой структуры агрегатов.

В работе [97] показано, что добавление к модельному раствору лизоцима гидрофобных опиоидных пептидов, наоборот, приводило к торможению агрегации молекул белка.



**Рис. 1.7.** Схематическое представление процесса агрегации  $\alpha$ -лактальбумина, индуцируемой под влиянием положительно заряженного амфифильного пептида Arg-Phe. 1 – денатурированная молекула  $\alpha$ -лактальбумина, 2 – молекула Arg-Phe [96]

В приведенных выше работах показано, что пептиды некоторых видов ускоряют агрегацию, а аминокислоты и пептиды других видов ее замедляют или предотвращают. Аминокислоты и пептиды, появляющиеся в образцах плазмы крови в результате процессов деградации белков, не могут быть отведены из нее в клетки, как в организме. Поэтому накопление таких веществ в образцах плазмы крови может приводить либо к катализу процессов агрегации, либо к их ингибированию. Кроме того, сами аминокислоты и пептиды имеют склонность к агрегации, и в случае образования их агрегатов, их влияние на белки, по-видимому, прекращается. В литературе не освещается вопрос о том, как появление и накопление аминокислот и их агрегация сказываются на процессах агрегации белков в плазме крови. Но, судя по приведенным ниже нашим экспериментальным данным, в результате процесса деградации белков, то есть распада их на отдельные пептиды и аминокислоты, скорость агрегации белков и частиц не увеличивается, то есть появляющиеся аминокислоты и пептиды либо не влияют на агрегацию, либо ингибируют ее.

## **Заключение к Главе 1**

В обзоре литературы представлены теоретические основы метода динамического рассеяния света, а также возможности его применения для исследования размеров биологических молекул и частиц. На приведены размеры основных видов частиц плазмы крови, на которых происходит рассеяние света: белки и их агрегаты, липопротеины, микрочастицы и др. Из анализа приведенной литературы следует, что при исследовании плазмы крови методами ДРС в распределениях интенсивности рассеянного света по размерам частиц  $I(r)$  будут ожидать пики в следующих диапазонах размеров: от 1 нм до 10 нм – в результате наличия альбуминов, от 11 нм до 20 нм – глобулинов, от 20 до 70 –

молекул фибриногена и липопротеинов, в диапазоне от 70 до 150 нм – белковых комплексов, свыше 150 нм – микрочастиц и агрегатов фибрина.

Выяснено, что в результате запуска механизма свертывания крови в плазме крови происходит распад фибриногена на фибрин и пептиды, которые также подвергаются распаду на отдельные аминокислоты. Фибрин, в свою очередь, имеет склонность к образованию крупных агрегатов. Причем появившиеся пептиды и аминокислоты могут также образовывать агрегаты или существовать в свободном виде. Представленные в обзоре результаты свидетельствуют о том, что некоторые аминокислоты и пептиды в свободном виде могут ингибировать агрегацию молекул белков, однако для этого необходимы достаточно большие их концентрации. Наши оценки показывают, что для заметного ингибирования агрегации белков с помощью аминокислот в плазме крови должен осуществиться полный распад заметной доли (~10%) белков.

В литературе показано, что в модельных растворах белков под воздействием различных факторов (рН, температура, добавление ПАВов) могут возникать обратимая и необратимая агрегации. Поскольку в наших экспериментах рН поддерживался на уровне 7.2-7.4, а температура – около 27° С, а ПАВы не добавлялись вовсе, то в образцах плазмы крови, может иметь место только обратимая агрегация.

Таким образом, в имеющейся литературе представлены результаты, полученные либо в динамике для растворов, в которых моделируются процессы, аналогичные процессам плазмы крови, либо одномоментных измерений для образцов разбавленной плазмы и сыворотки крови. Известно всего две работы, посвященные исследованию неразбавленной плазмы крови, причем измерения, представленные в них однократные и одномоментные. Кроме того, авторы одной из работ [13] не ясно из каких соображений утверждают, что они измеряли размеры только микрочастиц. Что же касается другой работы [10], то она была целиком направлена на исследование отличий в размерах частиц неразбавленной плазмы крови здоровых и онкологически больных людей. Вопросы статистики измерений, а также динамики размеров и концентраций частиц в этих работах не

затрагивались. Динамика этих распределений интенсивности рассеянного света по размерам частиц исследовалась только на модельных образцах, а концентрации частиц не рассматривались вообще.

Поэтому настоящая работа посвящена исследованию статистики измерений размеров частиц плазмы крови, их концентраций и изменению этих характеристик во времени. Поскольку размеры частиц в плазме крови лежат в пределах от 1 нм до 3000 нм, то удобными методами исследования этих изменений являются методы светорассеяния, в том числе метод ДРС.

## ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ УСТАНОВКА И МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

В первой части данной главы приводится описание экспериментальной установки для исследования динамического и статического светорассеяния. Перечислены основные компоненты, входящие в ее состав, и даны характеристики работы каждого из них. Представлены две программы, используемые для накопления и анализа автокорреляционных функций интенсивности рассеянного света. Вторая часть главы посвящена описанию методики проведения экспериментов, подготовки кювет и образцов плазмы крови. Перечислены некоторые особенности метода динамического светорассеяния, имеющие место при исследовании сложных многокомпонентных образцов, а также образцов, содержащих частицы в очень больших и очень малых концентрациях.

### 2.1. Экспериментальная установка

Установка для получения корреляционных функций и относительной интенсивности рассеянного света, собранная на массивном столе, работает по методу самобиений. Рассеянный образцом свет попадает на квадратичный фотоприемник (ФЭУ), а фототок на выходе ФЭУ повторяет флуктуации интенсивности. В качестве анализатора фототока применялся цифровой многобитовый коррелятор «Photocor FСт» фирмы ООО «Антек-97» (ныне ООО «Фотокор»), Москва.

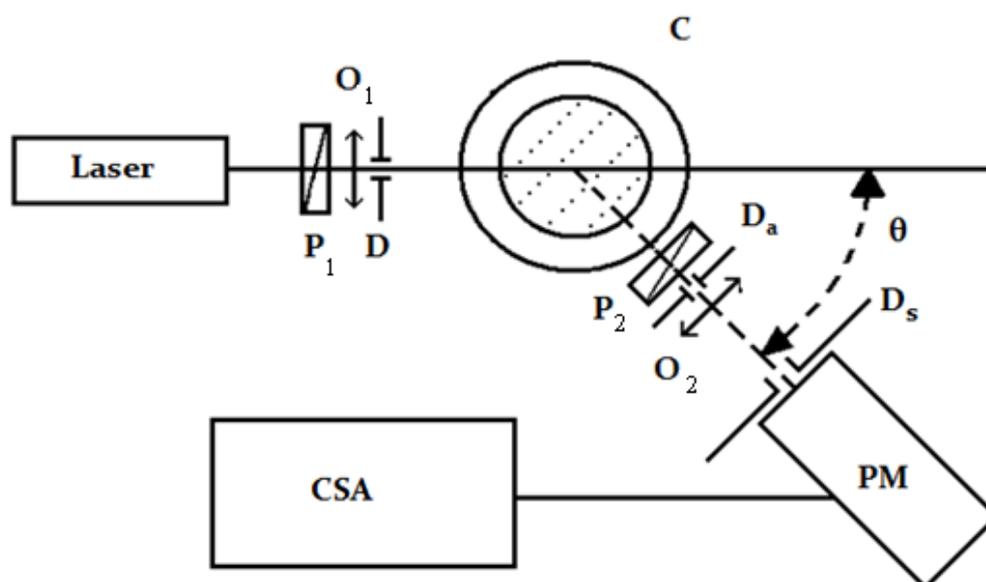
Схема установки приведена на Рис. 2.1. Источником света служил He-Ne лазер мощностью 5-30мВт. Стабильность интенсивности лазерного излучения контролировалась с помощью фотоэлемента Ф-5 и микроамперметра Щ-31. В качестве поляризаторов использовались призма Франка—Риттера (P1) и пленочный поляризатор ПФ(P2). Лазерный пучок линзой  $O_1$  с фокусным

расстоянием 300 мм фокусировался в кювету С с раствором. Диафрагмы  $D_a$  и  $D_s$  служили для обеспечения пространственной когерентности.

Луч лазера выставлялся горизонтально с помощью специального уровня, состоящего из двух трубок с водой, соединенных резиновой трубкой и разнесенных на 3,5 м. Ось гониометра Г1-5 выставлялась вертикально с помощью чувствительного уровня, помещенного на вращающийся столик гониометра. Для совмещения оси гониометра и лазерного луча на вращающийся столик помещался отвес на подставке. Чтобы облегчить юстировку, столик гониометра был переделан таким образом, что допускал перемещение грузовой площадки столика в горизонтальной плоскости в двух взаимно перпендикулярных направлениях. С помощью этих перемещений нить отвеса совмещалась с вертикальной осью гониометра и на неё направлялся лазерный луч. Предварительная юстировка проводилась без линзы  $O_1$ , окончательная – с линзой. Таким образом, достигалось положение, когда луч лазера был перпендикулярен оси гониометра и пересекался с ней. Цилиндрическая кювета с исследуемым раствором устанавливалась соосно с гониометром. Юстировка кюветы производилась по совмещению отраженного от цилиндрической поверхности кюветы луча лазера с диафрагмой D и контролировалась по совпадению положения прямого луча лазера в отсутствие кюветы и луча, прошедшего через кювету. Юстировка кюветы проводилась по сфокусированному линзой  $O_1$  лучу.

Вместо коллиматора на алидаду гониометра помещался приемник рассеянного излучения.

В качестве приемника рассеянного излучения использовался фотоумножитель (ФЭУ) ЕМ1 9863 КВ 100. Источником питания фотоумножителя служил стабилизированный высоковольтный источник ВС-22.



**Рис. 2.1.** Схема экспериментальной установки: Laser – He-Ne лазер; P – поляризаторы; O – объективы или линзы; C – кювета;  $\theta$  – угол рассеяния;  $D_a$  – апертурная диафрагма; PM – фотоприёмник; CSA – коррелятор;  $D_s$  – диафрагма перед фотоприёмником

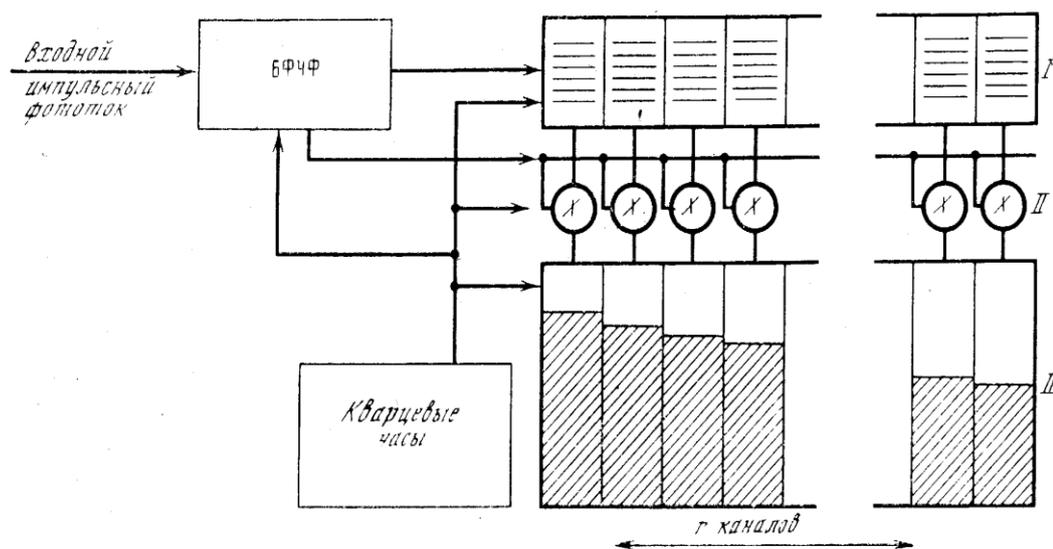
Перед фотоприемником (PM) помещались затвор, катодная диафрагма  $D_s$  диаметром 180-370 мкм, ограничивающая эффективный объем рассеяния, линза  $O_2$ , передающая изображение лазерного луча на катодную диафрагму, и съемная апертурная диафрагма  $D_a$  диаметром 400-300 мкм. Перед апертурной диафрагмой помещался поляризатор  $P_2$  – пленка ПФ, которая могла вращаться вокруг горизонтальной оси.

Нулевой угол рассеяния определялся по прохождению прямого луча через апертурную и катодную диафрагмы. Погрешность в определении нулевого угла не превышала 3'.

Сигнал с ФЭУ поступал на усилитель-дискриминатор, а с выхода усилителя-дискриминатора подавался на вход коррелятора. Темп счета фотонов контролировался по интенсивметру ПИ-4-1. Интенсивметр позволял дополнительно контролировать попадание изображения рассеивающего объема на диафрагму перед катодом ФЭУ.

### 2.1.1. Принцип работы коррелятора со сдвиговым регистром

Прибором, производящим цифровое накопление корреляционной функции в реальном времени, является коррелятор со сдвиговым регистром. Его схема представлена на Рис. 2.2.



**Рис. 2.2.** Структурная схема полного коррелятора. I – сдвиговый регистр, II – схемы перемножения, III – счетчики-накопители каналов памяти коррелятора; БФЧФ – блок формирования числа фотоотсчетов

В корреляторе имеются кварцевые часы, управляющие работой всей схемы. Эти часы вырабатывают тактовые импульсы через интервалы времени длительностью  $t_s$ , которое задается экспериментатором. Отрезок времени длительностью  $t_s$  называется временем выборки. Важно отметить, что время выборки должно быть намного меньше характерного времени флуктуации интенсивности, то есть времени когерентности  $\tau_c$ . Тогда в соответствии с изменениями флуктуирующей интенсивности  $I(t)$  будет изменяться и число фотоотсчетов за  $\ell$ -е от начала эксперимента время выборки  $n(\ell t_s)$ . Суть цифровой обработки импульсного сигнала коррелятором состоит в том, что с помощью коррелятора (в  $m$ -м канале памяти коррелятора) получают функцию:

$$G^{(2)}(mt_s) = G^{(2)}(\tau_m) = \sum_{l=1}^{N_t} [(n(lt_s)n(lt_s + mt_s))] \approx \frac{N^2}{N_t} \langle n(0)n(mt_s) \rangle = \frac{N^2}{N_t} g^2(mt_s) \quad (2.1)$$

где  $N_t$  – число времен выборки за время накопления функции,  $N$  – полное число фотонов за время измерения.

Накопление происходит следующим образом. В момент начала эксперимента сдвиговый регистр, счетчики-накопители каналов памяти и блок формирования числа фотоотсчетчиков (БФЧФ) содержат нули. Импульсы, приходящие с фотодетектора за время выборки  $t_s$ , накапливаются в счетчике БФЧФ. По сигналу каждого тактового импульса производятся следующие операции.

1. В каждой из  $r$  схем перемножения производится умножение содержимого БФЧФ и соответствующего канала сдвигового регистра. Результат перемножения накапливается в соответствующем канале памяти коррелятора.

2. Содержимое каждого из каналов сдвигового регистра передается в следующий канал.

3. Содержимое БФЧФ передается в первый канал сдвигового регистра.

4. Счетчик БФЧФ зануляется.

Таким образом, через  $r$  времен выборки каналы сдвигового регистра заполняются числами фотоотчетов за  $r$  последовательных времен выборки и в каждом  $m$ -м канале памяти начинается накопление функции (2.1).

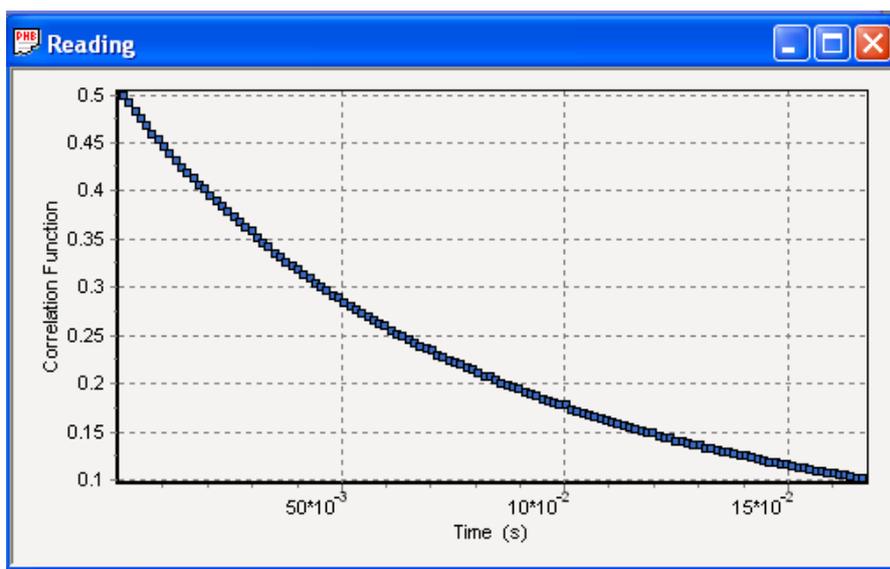
Заметим, что нормировочный коэффициент может отклоняться от своего значения  $N^2/N_t$  при изменении мощности возбуждающего пучка за время эксперимента или при наличии пыли, создающей непостоянный во времени фон. Поэтому при аппроксимации экспериментальной функции нормировочный коэффициент часто рассматривают как свободный параметр.

Коррелятор, работающий таким образом, накапливает фактически значения функции корреляции интенсивности при временах задержки  $\tau_m = mt_s$ . Эти

значения получаются сразу в цифровой форме, что удобно для численной обработки.

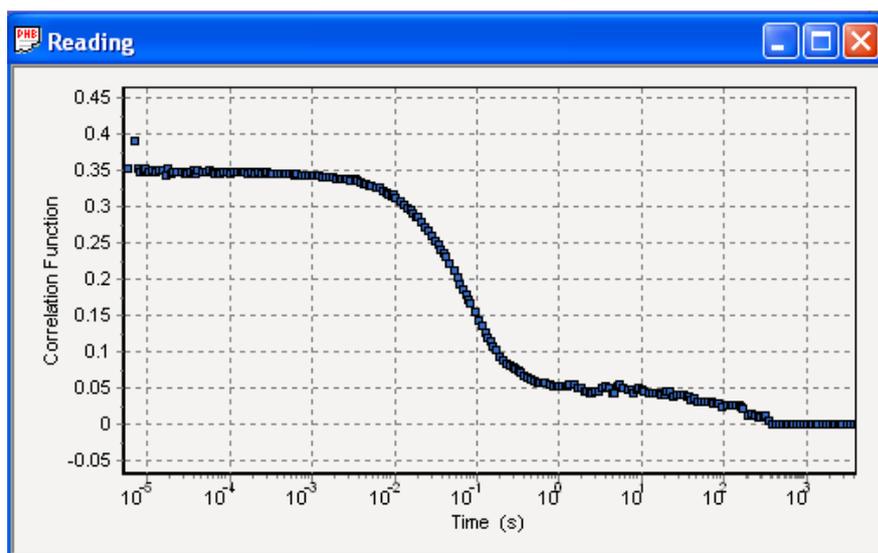
Теперь, зная  $g^{(2)}(\tau_m)$ , мы можем из соотношения Зигерта (1.11) определить  $g^{(1)}(\tau_m)$ , а, следовательно, и спектральную плотность мощности сигнала.

Выше описан так называемый линейный режим работы коррелятора, при котором интервалы накопления по всем каналам одинаковы. Коррелятор может работать и в режиме логарифмическом («Multiple tau»), в котором время, приходящееся на каждый канал, увеличивается экспоненциально с возрастанием номера канала (точнее, как  $2^{n/8}$ ,  $n$  – номер канала). На Рис. 2.3 и Рис. 2.4 показаны реальные изображения функции автокорреляции интенсивности рассеянного света с коррелятора в обоих режимах накопления.



**Рис. 2.3.** Функция корреляции, полученная в линейном режиме (масштаб по времени задержки – линейный)

Во всех экспериментах данной работы использовался только логарифмический режим накопления автокорреляционной функции.



**Рис. 2.4.** Функция корреляции, полученная в режиме Multiple tau (масштаб по времени задержки – логарифмический)

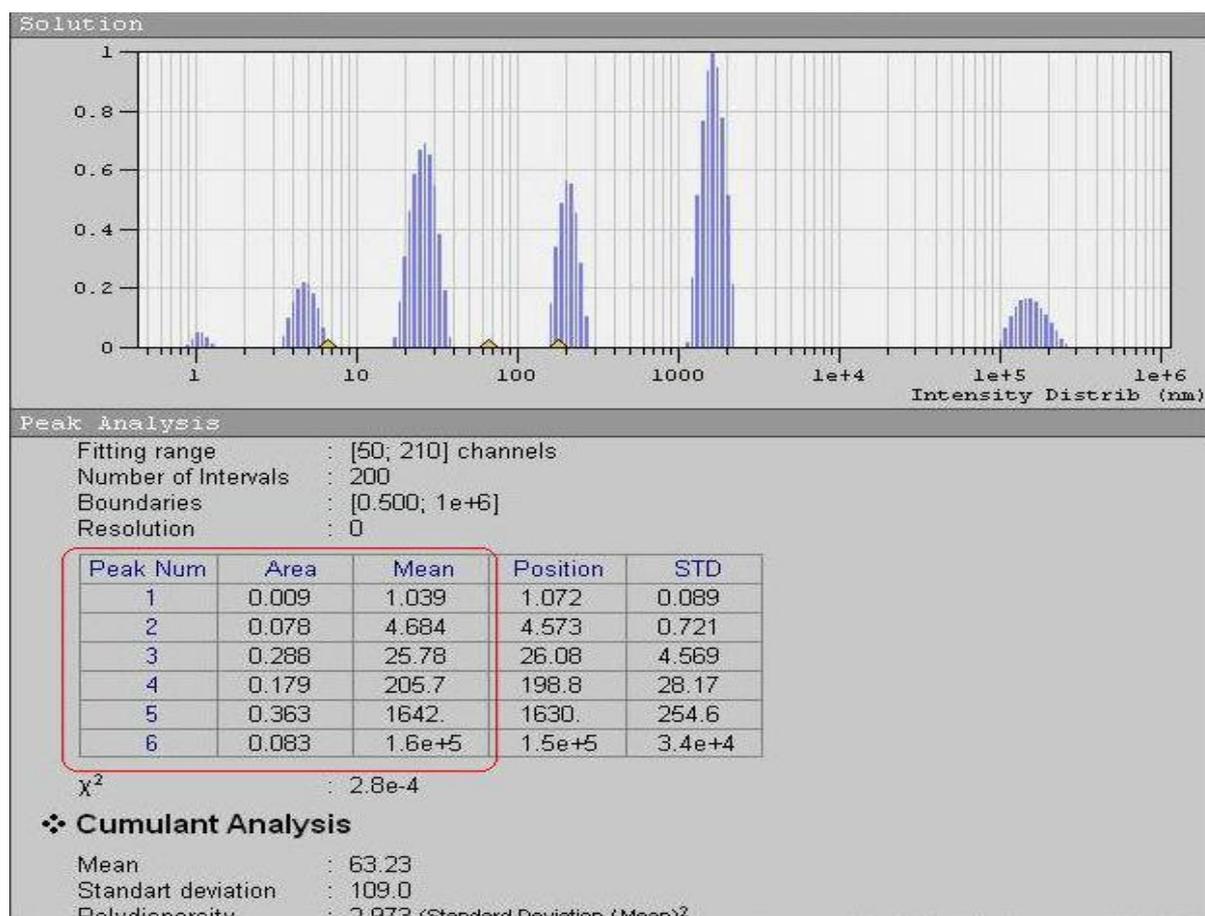
### 2.1.2. Программное обеспечение

В работе использовался коррелятор «Photocor-FCm» и две основные коммерческие программы, разработанные специально для использования в экспериментах по динамическому рассеянию света. Они позволяли производить накопление и анализ автокорреляционных функций интенсивности рассеянного света.

Первой из таких программ является программа «Photocor-FCm», с помощью которой осуществляется управление коррелятором и обмен информацией с другими программами. Эта программа позволяет записывать файлы, которые содержат информацию об автокорреляционной функции и других параметрах проведения эксперимента (температуре, плотности, угле, средней интенсивности рассеянного света) для дальнейшей их обработки.

Далее данные, полученные с помощью коррелятора, обрабатывались с программой DynaLS v2.0 (Alango), которая позволяет получать коэффициенты диффузии частиц в соответствии с алгоритмами аппроксимации функции корреляции (метод гистограмм, кумулянтный анализ или разложение функции по экспонентам). В случае использования алгоритма разложения функции по экспонентам результат выдается программой в виде распределения

интенсивности рассеянного света по характерным временам корреляции частиц (или по коэффициентам диффузии и радиусам частиц). На Рис. 2.5 результат обработки корреляционной функции, полученной для плазмы крови с помощью программы DynaLS, включающий распределение интенсивности рассеянного света по размерам частиц в логарифмическом масштабе по оси  $r$  или  $\tau$  (верхняя часть Рис. 2.5), и таблицу с результатами обработки в числовом виде (нижняя часть Рис. 2.5).



**Рис. 2.5.** Вид распределения интенсивности рассеянного света по размерам частиц и данных, который выдает DynaLS. Поскольку ось  $r$  представлена в логарифмическом масштабе, то

$$I(r) = \text{Area} \cdot r$$

Поскольку каждый пик распределения может иметь конечную ширину и несимметричную форму, то в работе использовалось, не положение пика (position), а средняя по пику величина времени когерентности или радиуса частиц (MEAN).

Таким образом, программа DynaLS позволяет:

- 1) анализировать распределения интенсивности рассеянного света по размерам частиц с помощью метода гистограмм;
- 2) проводить кумулянтный анализ с различным числом кумулянтов;
- 3) проводить устойчивый много-экспоненциальный анализ с автоматическим выбором начальных условий.

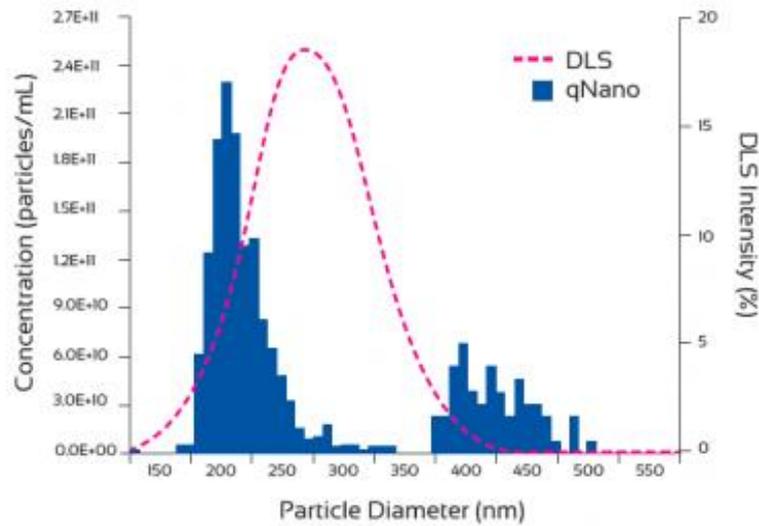
## **2.2. Особенности применения метода ДРС для определения размеров частиц в полидисперсном концентрированном образце**

Ниже приведены некоторые особенности применения методов ДРС при исследовании сложных биологических растворов, а также эффекты, возникающие в самих образцах при увеличении концентрации исследуемого белка.

### **2.2.1. Регистрация двух размеров частиц во взвеси, отличающихся больше, чем в два раза**

При исследовании полидисперсных образцов (в которых содержатся частицы различных размеров), размеры, получаемые с помощью ДРС, могут не соответствовать реальным размерам в жидкости [3]. Это связано с тем, что используемый метод не позволяет зарегистрировать отдельные пики, соответствующие частицам, размеры которых отличаются меньше, чем в 2 раза. Так, в работе [3] показано, что при исследовании частиц с размерами 220 нм и 380 нм, находящихся в жидкости, метод динамического светорассеяния позволил зарегистрировать лишь один пик со средним размером, смещенным в сторону меньших размеров частиц, и равным 260,4 нм. На Рис. 2.6 пунктирной красной линией показан результат, полученный с помощью метода ДРС, а гистограммами – реальное распределение концентраций частиц по размерам. Очевидно, что такое ограничение методов ДРС имеет большое значение в случае необходимости

получения точных размеров частиц (например, для вакцин или переносчиков лекарств) [103].



**Рис. 2.6.** Сравнение распределений концентраций частиц по их размерам, полученных с помощью неоптических и оптических (ДРС) методов [103]

### 2.2.2. Зависимость измеряемых размеров частиц, получаемых с помощью методов ДРС, от угла рассеяния

Наличие в исследуемом образце различных размеров частиц, отличающихся друг от друга на порядки, приводит к необходимости проведения измерений на установке ДРС под разными углами. Это связано с тем, что интенсивность светорассеяния зависит не только от размеров и концентраций частиц, но также от волнового вектора рассеяния  $k$ , и от форм-фактора частиц  $G^2(\theta)$ , учитывающего внутреннюю интерференцию света в крупных частицах.

Интенсивность  $I_S$  света, рассеянного частицами под углом  $\theta$ , в случае небольшого отличия их показателей преломления ( $n_1$ ) от окружающей среды ( $n_2$ ) описывается приближением Релея-Ганса-Дебая (РГД) [17,104]:

$$\frac{I_S}{I_L} = \eta_e \frac{k^4 V_p^2 \left| \frac{n_1}{n_2} - 1 \right|^2}{4\pi} \frac{V_{sc}^{90}}{R^2} G^2(\theta) N_p \frac{1}{\sin \theta}, \quad (2.2)$$

где  $I_L$  – интенсивность возбуждающего лазерного пучка,  $\eta_e$  – квантовая эффективность катода ФЭУ,  $k = \frac{4\pi n_2}{\lambda}$  – волновой вектор падающей волны,  $V_p$  – объем частицы,  $V_{sc}^{90}$  – рассеивающий объем под углом  $90^\circ$ ,  $R$  – расстояние до точки наблюдения от рассеивающего объема,  $N_p$  – концентрация частиц,  $G^2(\theta)$  – форм-фактор частиц, в случае их сферической формы он равен:

$$G^2(\theta) = \frac{9}{(qr)^6} (\sin qr - qr \cos qr)^2, \quad (2.3)$$

где  $q$  – волновой вектор рассеяния (см. (1.4)):

Для того чтобы получить абсолютные значения интенсивностей рассеяния, проводилось их сравнение с интенсивностью рассеяния  $I_T$  в толуоле, коэффициент рассеяния которого известен.

Согласно соотношению Релея, коэффициент рассеяния ( $R_I$ ) в жидкости равен [40]:

$$R = \frac{I}{I_L} \cdot \frac{R^2}{V_{sc}}, \quad (2.4)$$

где  $V_{sc}$  – объем рассеяния,  $R$  – расстояние до точки детектора.

Для толуола имеем:

$$\frac{I_T}{I_{TL}} = \eta_e R_T \frac{V_{sc}^{90}}{R^2} \frac{1}{\sin \theta}, \quad (2.5)$$

где  $R_T$  – коэффициент рассеяния в толуоле, значение которого  $R_T = 1.28 \cdot 10^{-5} \text{ см}^{-1}$ .

Тогда измерив постоянную для нашей установки величину

$$N_T = \frac{I_T}{I_L} \sin \theta, \quad (2.6)$$

Из (2.5) и (2.6) получим значение комбинации неизвестных величин в (2.2):

$$\eta_e \frac{V_{sc}^{90}}{R^2} = \frac{N_T}{R_T}, \quad (2.7)$$

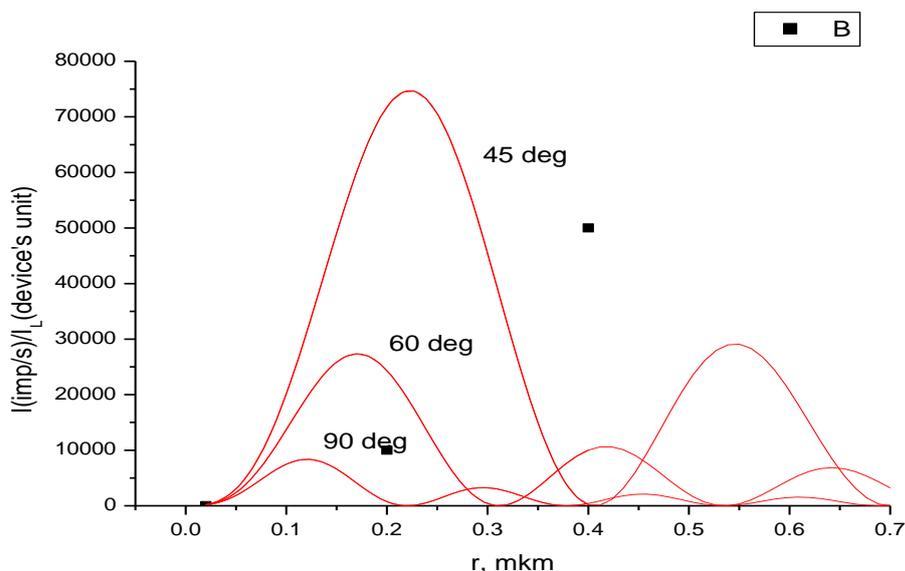
Используя (2.2) и (2.7) получаем:

$$\frac{I_S}{I_L} \sin \theta = \frac{N_T}{R_T} \left( \frac{2\pi n_2}{\lambda} \right)^4 \cdot \left| \frac{n_1}{n_2} - 1 \right|^2 \cdot \frac{4}{9} \cdot r^6 \cdot G^2(\theta) \cdot N_p, \quad (2.8)$$

Или в пересчете на объемную концентрацию  $C_V$  вещества частиц:

$$\frac{I_S}{I_L} \sin \theta = \frac{N_T}{R_T} \left( \frac{2\pi n_2}{\lambda} \right)^4 \cdot \left| \frac{n_1}{n_2} - 1 \right|^2 \cdot \frac{1}{3\pi} \cdot r^3 \cdot G^2(\theta) \cdot C_V, \quad (2.9)$$

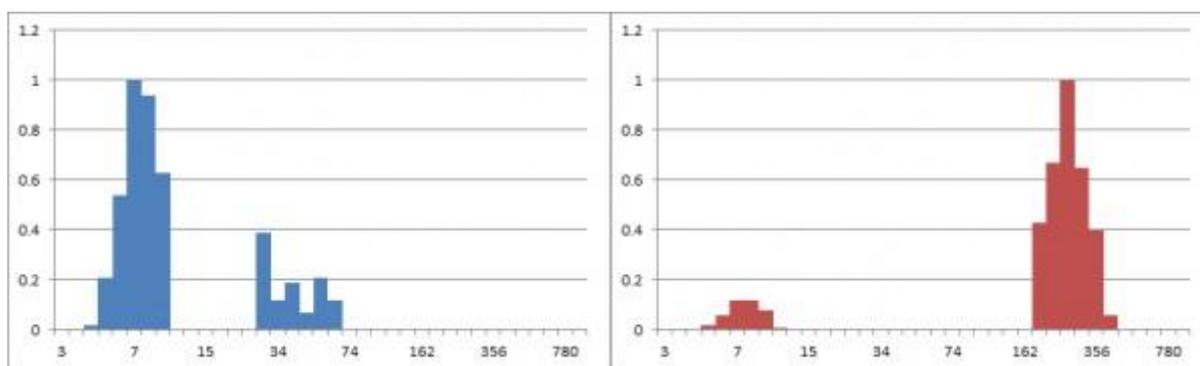
Учитывая вид зависимости форм-фактора  $G^2(\theta)$  для сферической модели частиц, получаем немонотонный тип зависимости интенсивности рассеянного света от угла рассеяния и размера (Рис. 2.7). Из рисунка видно, что при некоторых размерах наблюдается нулевая интенсивность, так что для их регистрации необходимо проводить исследования на других углах.



**Рис. 2.7.** Рассчитанная зависимость интенсивности рассеяния от размера сферических частиц при  $C_{AW}^V = 3 \cdot 10^{-4}$  и углах рассеяния 90, 60 и 45°

В работе [105] показано, что в растворе бычьего сывороточного альбумина присутствуют крупные агрегаты белков, которые могут быть надежно зарегистрированы под углом 20 градусов. Рис. 2.8а иллюстрирует распределение интенсивности рассеянного света по размерам частиц, полученное под углом 90°. Это распределение состоит из двух пиков с размерами 6 нм и 50 нм. Первый пик соответствует присутствующем в растворе мономерам белка. Пик с большим

диаметром соответствуют агрегаты альбумина (размеры которых определены неточно в связи с малой их концентрацией). Наибольшая интенсивность в данном случае приходится на пик с размером 6 нм, и поэтому этот угол больше подходит для детектирования именно мономеров белка (а не агрегатов).



**Рис. 2.8.** Распределения интенсивности рассеянного света по размерам частиц в растворе альбумина, полученные под углами: а) 90 градусов, б) 20 градусов [105]

На Рис. 2.8б представлено распределение интенсивности рассеянного света по размерам частиц в растворе сывороточного альбумина, полученное под углом 20°. Видно, что большая доля интенсивности света, рассеянного под этим углом, приходится на второй пик, что свидетельствует о том, что углом 20° наиболее является более удачным для детектирования агрегатов, чем угол 90°.

В случае если второй пик в распределении широкий, то средний размер по этому пику и положение его максимума будет смещаться в сторону меньших значений при увеличении угла рассеяния.

Таким образом, для точного определения размеров и идентификации малых количеств агрегатов в белковых растворах необходимо проводить измерения под разными углами (многоугловое ДРС).

### 2.2.3. Влияние концентрации частиц на регистрируемый размер

На оптические характеристики, получаемые с помощью методов светорассеяния, могут влиять следующие факторы:

- 1) большая концентрация частиц (белков) малых размеров;  
Такие эффекты обычно имеют место при высоких концентрациях белков (например, при 5-10 мг/мл и выше). В плазме крови концентрация альбуминов 40-50 г/л, глобулинов 26-46 г/л, фибриногена 2-4 г/л. Такая высокая концентрация белков может сказываться на регистрируемых размерах, связанных с взаимодействием между молекулами белка.
- 2) малая концентрация больших частиц, которая может быть сопряжена с появлением дополнительного времени корреляции, обусловленного входом-выходом одиночных частиц из объема рассеяния, а, следовательно, дополнительного пика в распределении интенсивности по размерам частиц. Это время пропорционально квадрату ширины лазерного пучка  $a$  и обратно пропорционально коэффициенту диффузии частиц  $D$ . Характерные времена диффузии частиц и входа выхода в объем рассеяния должны соотноситься как  $Dq^2$  к  $a^2/D$ .
- 3) двукратное рассеяние. При большой концентрации крупных частиц измерениям может мешать двукратное и многократное рассеяние. Его наличие можно заметить по появлению ореола вокруг следа лазерного луча в образце. Такой образец нам встретился один раз и мы его не исследовали.

### **2.3. Методика проведения экспериментов**

Проведение экспериментов на установке ДРС включало в себя несколько этапов: юстировку установки, подготовку кювет для измерений (то есть их обеспыливание), подготовку образцов плазмы крови для измерений (взятие крови у донора, добавление в нее специальных стабилизирующих веществ, центрифугирование образцов и отделение плазмы крови), проверку угловой зависимости размеров частиц плазмы крови и непосредственно проведение измерений.

### **2.3.1. Подготовка кювет для измерений**

В экспериментах по светорассеянию большое значение имеет чистота кюветы, а также качество стекла, из которого она изготовлена. В настоящей работе использовались кюветы диаметром 15 мм из медицинского стекла марки «НС-3», которые были сделаны из медицинских ампул, содержащих изначально стерильную воду для внутривенных инъекций, и отобранных по принципу цилиндричности, которая определялась с помощью микрометрических измерений и была не хуже 0,02 мм. Перед проведением экспериментов кювета также тщательно очищалась и промывалась несколько раз бидистиллированной водой с целью удаления пыли и других загрязнений.

Важно отметить, что малый диаметр кюветы с образцом приводит к тому, что отраженный и прошедший лучи сильно размазываются в пространстве по углу, и точная юстировка кюветы становится невозможной. Поэтому в наших экспериментах кювета с образцом коаксиально помещалась в цилиндрическую иммерсионную кювету диаметром 34 мм, что позволяло производить более точную юстировку первой кюветы. Иммерсионной жидкостью являлась вода.

### **2.3.2. Подготовка образцов плазмы крови**

В работе исследовалась плазма крови различных доноров, подготавливаемая для измерений стандартным способом. Кровь забирали из локтевой вены донора в шприцы по 10 мл. В зависимости от типа и целей эксперимента, в шприц добавляли различные антикоагулянты (гепарин или ингибиторы протеолитических ферментов Sigma Aldridge, P2714 и P8340). Кровь из шприцов переливали в пробирки и центрифугировали в течение 15-20 минут при 3000 об/мин на лабораторной трехступенчатой центрифуге ЦЛК-1 с целью осаждения форменных элементов крови. Время, прошедшее от момента взятия крови до момента центрифугирования, варьировалось для различных образцов (от

10 до 20 минут). Затем плазму крови аккуратно отделяли (с помощью шприца) от осевших клеток и переливали в заранее обеспыленные цилиндрические кюветы диаметром 15 мм и иммерсионную кювету диаметром 34 мм и далее исследовались на установке ДРС, описанной в разделе 2.1.

*Используемые вещества:*

*Гепарин.* В качестве антикоагулянта практически во всех экспериментах использовался медицинский раствор гепарина, предназначенный для внутривенного введения (5000 МЕ/мл). Его добавляли непосредственно в шприц перед забором крови у донора. Конечная концентрация раствора гепарина составляла 10% от объема крови.

*Ингибиторы протеолитических ферментов.* В экспериментах также использовались ингибиторы протеолитических ферментов Sigma Aldrich (Product No – P2714 и P8340). Раствор ингибиторов протеолитических ферментов (P2714) был исследован в качестве реперного для получения средних размеров частиц, содержащихся в нем.

*Ингибиторы P2714* представляют собой смесь водорастворимых ингибиторов протеаз широкого спектра: с высокой специфичностью к ингибированию сериновых, цистеиновых и металлопротеаз. Состав, концентрации, молекулярная масса и краткая характеристика этих ингибиторов были следующими: AEBSF (2 mM) – растворимый в воде, необратимый ингибитор сериновых протеаз с молекулярной массой 239,5 Да. Замедляет действие таких протеаз как химотрипсин, каликреин, плазмин, тромбин и трипсин. Апротинин (0,3 мкМ) – ингибитор сериновых протеаз с молекулярной массой 6,5 кДа. Бестатин (130 мкМ) – конкурентный ингибитор протеаз. Он ингибирует аминопептидазы В, аминопептидазы N. Молекулярная масса 308 Да. ЭДТА (1мМ) – В медицине ЭДТА используется для связывания ионов металлов, а также как антикоагулянт для приготовления образцов крови для исследований. Молекулярная масса – 292 Да. E-64 (14 мкМ) – это эфир с тремя кольцевыми атомами, который ингибирует цистеиновые пептидазы (такие как папаин, катепсин L, катепсин В). Молекулярная масса – 357 Да. Леупептин (1 мкМ) –

ингибирует сериновые, треониновые и цистеиновые пептидазы. Молекулярная масса – 426 Да.

*Ингибиторы типа P8340* также представляют собой смесь ингибиторов протеаз с высокой специфичностью к ингибированию сериновых, цистеиновых, аспарагиновых протеаз, а также аминопептидаз. Состав ингибиторов данного типа практически такой же, как и у ингибиторов P2714. Отличия заключаются лишь в концентрациях содержащихся веществ и в том, что вместо вещества ЭДТА, который склонен к образованию комплексов с ионами металлов, включает в состав пепстатин. Концентрации веществ были следующими: AEBSF – 104 mM; апротинин – 80 μM; бестатин – 4 mM; E-64 – 1.4 mM; леупептин – 2 mM и пепстатин А – 1.5mM.

Концентрация ингибиторов протеолитических ферментов, рекомендованная фирмой-изготовителем, составляет 1% от объема исследуемого образца.

### **2.3.3. Проверка угловой зависимости времен когерентности (или гидродинамических радиусов частиц) от угла рассеяния**

Для изучения динамики размеров частиц в плазме крови нами был выбран угол рассеяния 40°-45°, который считался оптимальным, поскольку под этим углом были видны частицы каждого размера, но еще не сказывалось влияние бликов (как при меньших углах рассеяния).

Перед исследованием каждого образца плазмы крови проводилась проверка соответствия получаемых в распределениях времен корреляции  $\tau_c$  диффузионным модам движения. Для этого получали зависимости каждой из регистрируемых времен  $\tau_{ci}$  (или радиусов  $r_i$ ) от угла рассеяния (30°, 45°, 60°, 90°). Известно, что для диффузионных мод движения частиц для времен когерентности выполняется соотношение  $\tau_{ci}=1/D_i q^2$ , так что при изменении угла регистрируемые коэффициенты диффузии (радиусы) частиц не меняются. В случае присутствия в корреляционной функции недиффузионной моды релаксации (например, релаксации внутренних степеней свободы молекул), время когерентности,

соответствующее ей, не будет зависеть от угла, и при пересчёте  $\tau_c$  в  $r$  (см. (1.18)) окажется, что  $r \sim q^2$ .

Если какой-то из пиков имеет большую ширину, то при увеличении угла средний размер по этому пику может сдвигаться в сторону меньших размеров. Однако это изменение, в том случае, если он обусловлен диффузионной модой движения, не должно превышать ширину пика.

Появление в распределении интенсивности рассеянного по размерам частиц пиков в области больших размеров (около 1 мкм) может определяться не временем релаксации флуктуаций концентраций частиц, а временем прохождения частиц через объем рассеяния. При этом, если реальных частиц с таким временем корреляции (а, следовательно, размером) в растворе не было, то такие пики при анализе распределений интенсивности рассеянного света по размерам частиц не рассматривались.

#### **2.3.4. Получение функций автокорреляции интенсивности рассеянного света и распределений интенсивности рассеянного света по размерам частиц**

Накопление автокорреляционной функции проводилось двумя способами. Первый способ включал в себя накопление функции автокорреляции интенсивности рассеянного света в течение некоторого промежутка времени (около 150-250 сек) и дальнейшую обработку этой функции с помощью программы DynaLS с целью получения распределений интенсивности рассеянного света по размерам частиц. Накопление корреляционной функции и ее обработка повторялись 3-4 раза, после чего значения средних по каждому пику радиусов каждого полученного распределения, усреднялись по серии измерений и использовались для дальнейшего анализа данных.

Второй способ получения данных заключался в накоплении автокорреляционной функции в режиме «Циклы», который позволял накапливать их в течение ряда коротких промежутков времени, продолжительность и количество которых задавались оператором. По окончании цикла совпадающие

функции складывались и усреднялись автоматически, а не удовлетворяющие критерию совпадений игнорировались. Критерий совпадений функций в процентах и число повторений (число циклов) этой процедуры также задавались оператором. Такой способ накопления функции позволял избавляться от помех, которые неизбежно возникают во время накопления функции (например, попадание в лазерный луч пыли), а, с другой стороны, позволял получать функции автокорреляции практически непрерывно в течение достаточно длительного промежутка времени.

## **Заключение к Главе 2**

В данной главе была представлена и описана схема экспериментальной установки ДРС, на которой проводились измерения. Описан принцип работы коррелятора со сдвиговым регистром (в линейном и логарифмическом режиме). Перечислены особенности регистрации частиц с многомодальным распределением по размерам: невозможность регистрации двух размеров частиц, отличающихся меньше, чем в два раза; зависимость измеряемых размеров от угла рассеяния (минимумы интенсивности рассеяния); влияние концентраций частиц на измеряемый размер частиц.

Во второй части главы 2 была описана методика проведения экспериментов, подготовка кювет и образцов плазмы крови для измерений. Перечислены используемые вещества, применяемые для ингибирования процессов свертывания крови. Обоснована необходимость проверки угловой зависимости измеряемых гидродинамических радиусов частиц перед началом измерений. Приведены режимы накопления функций автокорреляции интенсивности рассеянного света (простой и циклический).

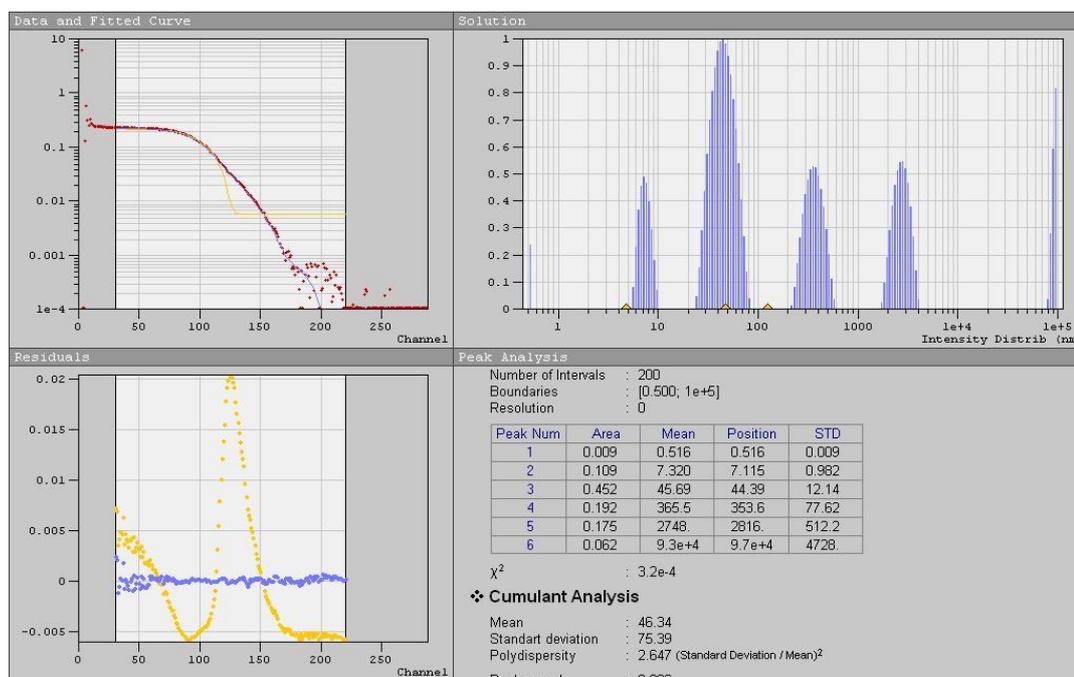
## ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ РАЗМЕРОВ ЧАСТИЦ ПЛАЗМЫ КРОВИ И ИХ ИЗМЕНЕНИЙ ВО ВРЕМЕНИ

Для исследования изменений размеров частиц плазмы крови, обусловленных процессами деградации белков и агрегации частиц в ней, получали распределения интенсивности рассеянного света по размерам частиц в различных образцах плазмы крови и проводили анализ их динамики. Описанию результатов таких исследований и посвящена настоящая глава.

### 3.1. Получение распределений интенсивности рассеянного света по размерам частицам

Для каждого исследуемого образца плазмы крови регистрировалась автокорреляционная функция интенсивности рассеянного света, после обработки которой с помощью DynaLS получалось распределение  $I(r)$  интенсивности рассеянного света по размерам частиц. На Рис. 3.1 представлен результат обработки этой функции, получаемый непосредственно на экране монитора ПК.

В левой верхней части Рис. 3.1 представлена корреляционная функция поля  $E$  (красные точки), а также возможные варианты ее аппроксимации с помощью алгоритма разложения ее по экспонентам (синяя кривая), а также с помощью метода кумулянтов (желтая кривая). В левой нижней части показаны остаточные погрешности для двух методов аппроксимации. Желтые точки, соответствующие методу кумулянтов, имеют периодический характер и большое значение погрешности в области основной ступени кривой аппроксимации, что свидетельствует о большой неточности получаемого среднего размера частиц в образце с помощью этого метода. Синие же точки расположены хаотично в районе нулевого значения погрешности, что говорит о достаточно хорошей аппроксимации корреляционной функции с помощью метода разложения ее по экспонентам.



**Рис. 3.1.** Вид распределения интенсивности рассеянного света по размерам частиц в образце плазмы крови с добавлением гепарина (донор женского пола, 25 лет)

В правой верхней части Рис. 3.1 представлено распределение интенсивности рассеянного света по размерам частиц в логарифмическом масштабе, полученное путем разложения функции корреляции по экспонентам. Это распределение состоит из нескольких выраженных пиков. Число и положение этих пиков варьировалось в зависимости от исследуемого образца и времени измерения. В таблице под распределением показан результат аппроксимации функции корреляции в численном виде. Основными параметрами, используемыми нами при дальнейшем анализе данных, являлись номер пика, средний по пику радиус (mean), а также логарифмическая доля интенсивности рассеянного света, приходящаяся на определенный пик (Area).

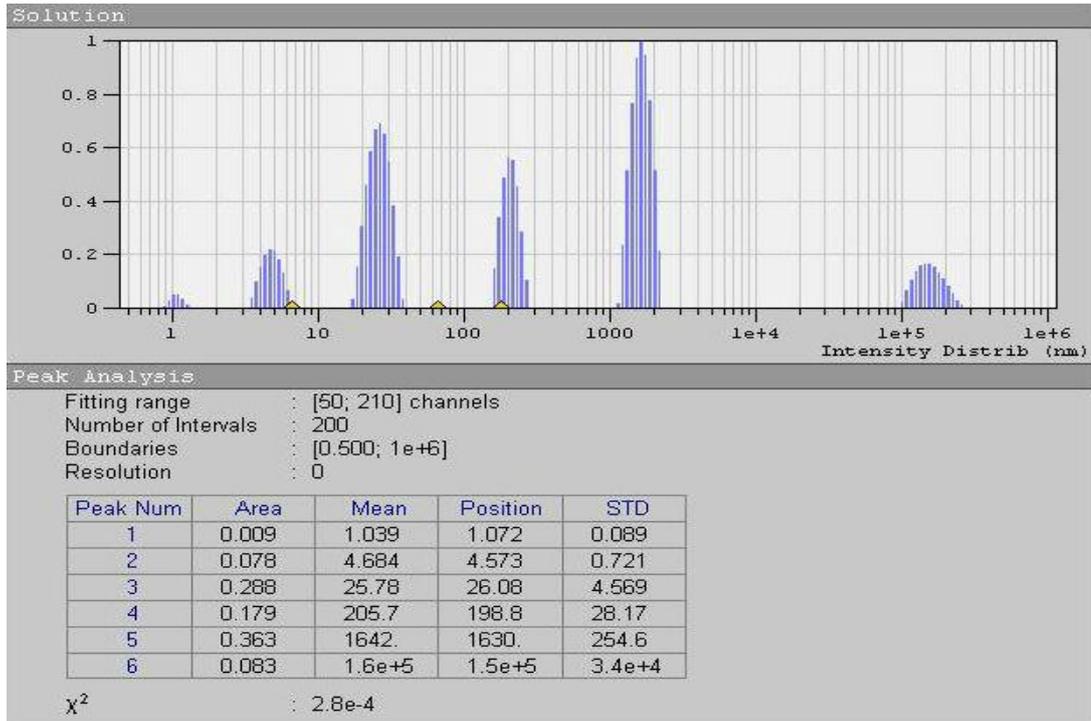
Наличие нескольких пиков размеров частиц в распределении  $I(r)$  экспериментально подтверждает многокомпонентность плазмы крови и согласуется с данными, представленными в работах других авторов [8,10].

### 3.2. Сравнение распределений интенсивности рассеянного света, получаемых под различными углами рассеяния (40, 60, 90 градусов)

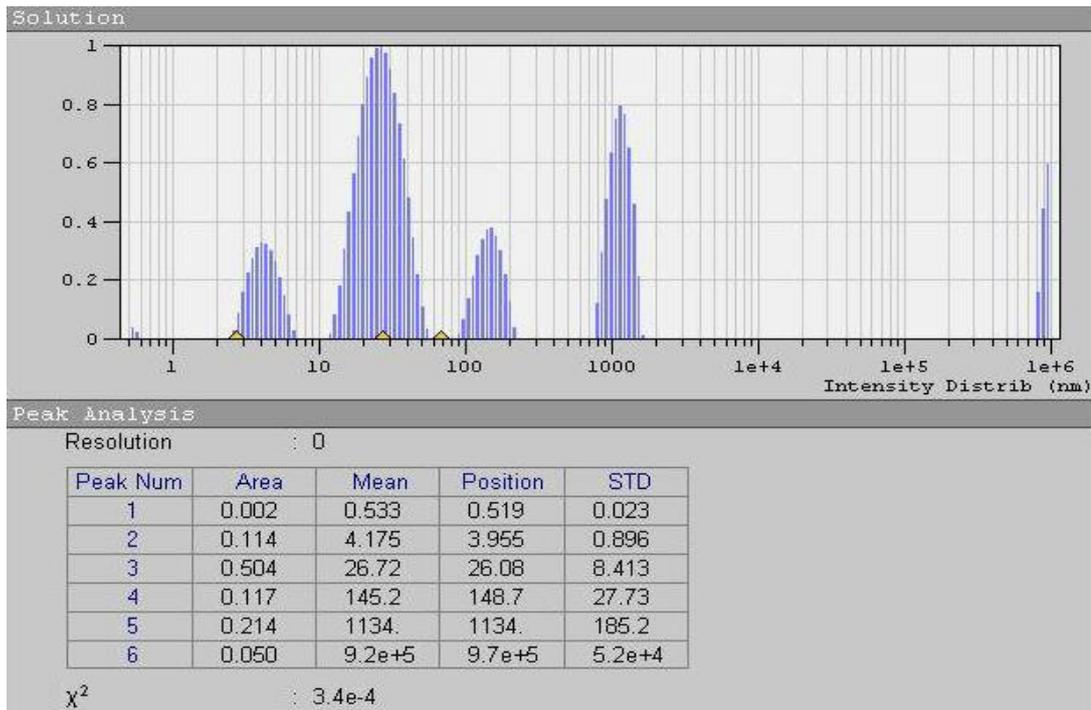
Для проверки отсутствия в распределениях артефактных размеров, связанных с недиффузионными модами движения, проводилось измерение зависимости размеров частиц от угла рассеяния  $\theta$ , то есть проверка закономерности  $\tau \sim 1/q^2$ . Поскольку программа DynaLS выдает размеры с учетом  $q^2$ -зависимости (см. (1.18)), то для диффузионных мод релаксации концентрации частиц получаемый радиус не должен меняться при изменении угла рассеяния.

На Рис. 3.2 - Рис. 3.4 представлены распределения  $I(r)$ , полученные под углом рассеяния 40, 60 и 90 градусов для плазмы крови донора женского пола, 25 лет. Видно, что средние размеры в каждом из регистрируемых пиков остаются практически неизменными для трех углов рассеяния. Изменяется лишь конфигурация пиков и доля интенсивности. Поскольку средние размеры в каждом из пиков в диапазоне от 2 нм до 4000 нм не зависят от угла, то все соответствующие им времена корреляции обуславливаются только диффузионными модами движения.

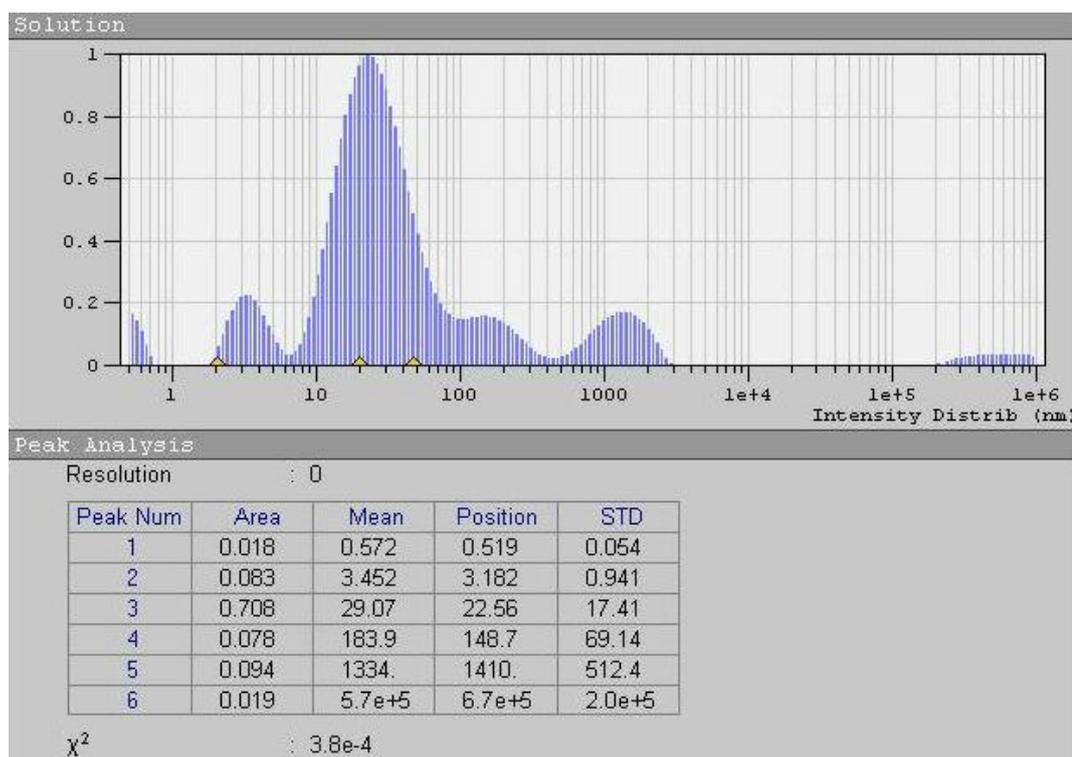
Пик с размерами меньше 1 нм не принимался в расчет и объяснялся эффектами самокорреляции послеимпульсов ФЭУ в первых каналах коррелятора. Пик со средним размером порядка  $10^5$  нм также не рассматривался, поскольку не подчиняется закону  $r(\theta) = const$  и его наличие в распределении интенсивности рассеянного света по размерам частиц объясняется, по-видимому, вышеупомянутым эффектом прохождения частиц через объем рассеяния.



**Рис. 3.2.** Распределение интенсивности рассеянного света по размерам частиц, полученное под углом 40 градусов (донор женского пола, 25 лет)



**Рис. 3.3.** Распределение интенсивности рассеянного света по размерам частиц, полученное под углом 60 градусов



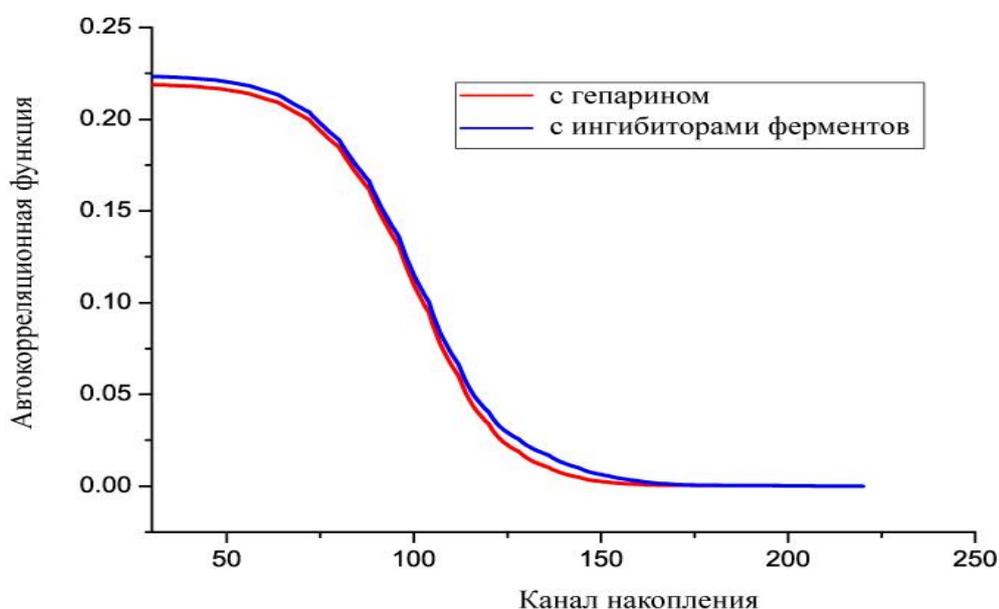
**Рис. 3.4.** Распределение интенсивности рассеянного света по размерам частиц, полученное под углом 90 градусов

### 3.3. Размеры частиц в образцах плазмы крови с добавлением гепарина и ингибиторов протеолитических ферментов

Как следует из раздела 1.4. литературного обзора после взятия пробы крови из организма в ней нарушается гомеостаз в результате разрыва связи с организмом (отсутствие оттока и притока в кровь веществ) и активации механизма свертывания крови (протеолитической деградации фибриногена и дальнейшей агрегации фибрина). В медицинской практике для замедления этих процессов в пробу крови добавляются различные антикоагулянты, наиболее часто используемыми из которых являются гепарин и цитрат натрия, а также ингибиторы протеолитических ферментов [80].

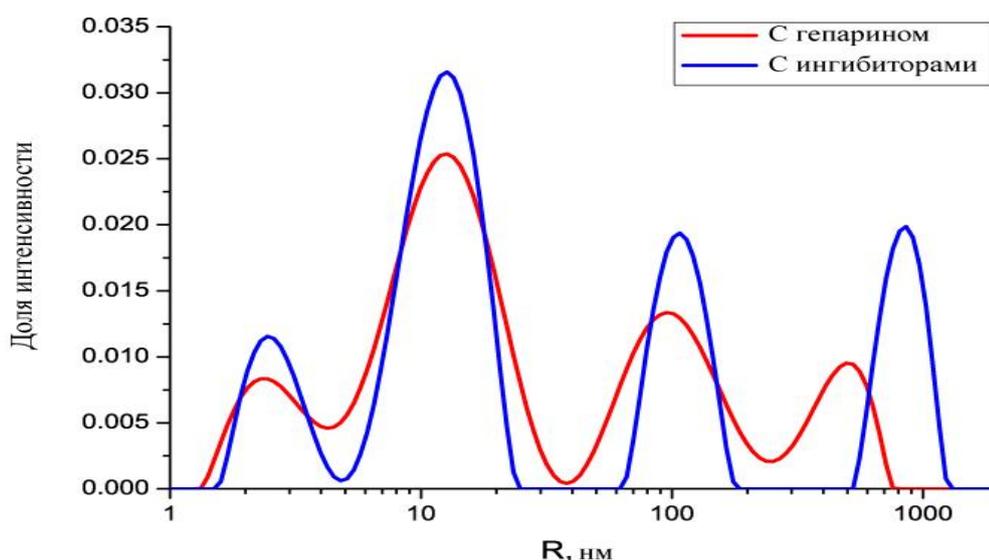
Для определения степени влияния разных стабилизирующих веществ на размеры частиц в плазме крови, было проведено сравнение отдельных распределений  $I(r)$ , полученных для образцов с добавлением гепарина и ингибиторов протеолитических ферментов (состав приведен в п. 2.2.3), а также временного хода средних размеров  $r(t)$  в каждом из пиков.

На Рис. 3.5 представлены аппроксимированные функции автокорреляции интенсивности рассеянного света, полученные для образцов плазмы крови с ингибиторами протеолитических ферментов (синяя кривая) и с гепарином (красная кривая). Видно, что существенных отличий в функциях автокорреляции интенсивности рассеянного света для этих двух образцов плазмы нет.



**Рис. 3.5.** Аппроксимированные автокорреляционные функции, полученные для образцов плазмы крови с гепарином (красная кривая) и с ингибиторами протеолитических ферментов (синяя кривая) (донор женского пола, 25 лет)

На Рис. 3.6 показаны распределения интенсивности рассеянного света по размерам частиц в образцах плазмы крови с добавлением ингибиторов (синее распределение) и без них (красное распределение), полученные с помощью программы DynaLS при разложении функций корреляции по экспонентам. Эти распределения очень похожи: количество пиков в распределениях одинаково, хотя средние размеры частиц в них, а также доли интенсивности, приходящиеся на каждый из пиков, слабо различаются.



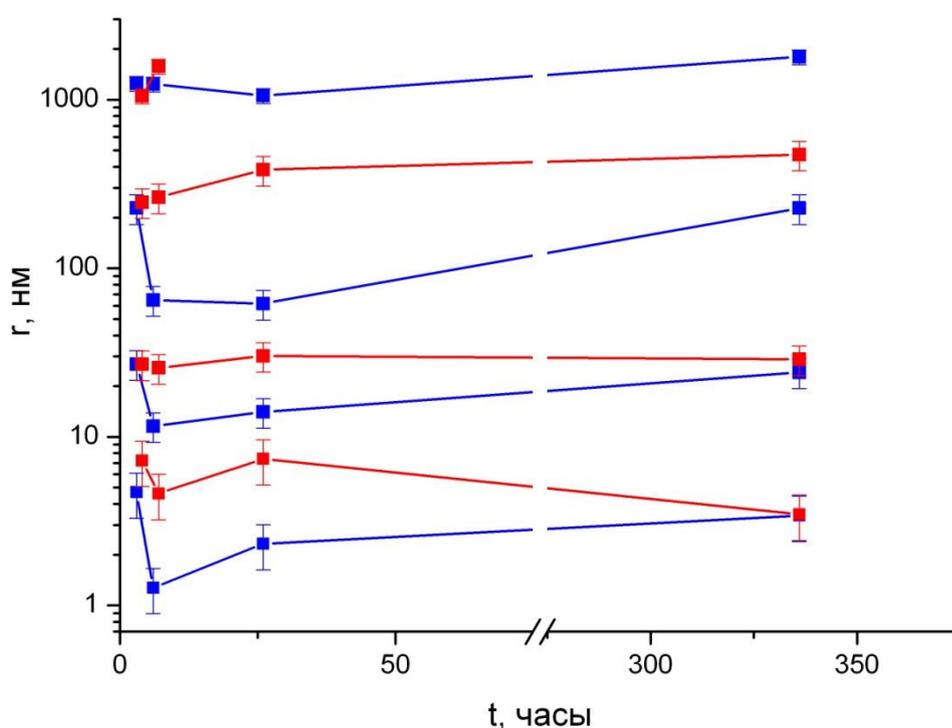
**Рис. 3.6.** Распределения интенсивности рассеянного света по размерам частиц в образцах плазмы крови с добавлением гепарина (красная кривая) и ингибиторов протеолитических ферментов (синяя кривая) (угол рассеяния  $45^\circ$ ) (донор женского пола, 25 лет)

Сравнение размеров частиц, полученных в отдельных измерениях для образцов плазмы крови с добавлением ингибиторов протеолитических ферментов и с добавлением гепарина, существенных отличий не показало, однако поведение размеров с течением времени оказалось различным, поэтому необходимо было сравнить динамику средних размеров частиц в этих образцах.

### **3.4. Изменение размеров частиц в образцах плазмы крови с гепарином и ингибиторами протеолитических ферментов с течением времени**

Для получения зависимости средних размеров частиц от времени для образцов плазмы крови с добавлением гепарина и с добавлением протеолитических ферментов измерения проводили через 2, 5, 25 и 325 часов после взятия крови из организма. Полученный временная зависимость средних размеров частиц по каждому из пиков в этих образцах представлен на Рис. 3.7 в логарифмическом масштабе (красные кривые – образец с добавлением гепарина, синие кривые – с добавлением ингибиторов протеолитических ферментов). Снизу

вверх – красные и синие кривые соответствуют изменению средних размеров в первом пике (частицы самых мелких размеров), следующая пара – второму пику в распределении (более крупные частицы) и т.д. Динамика средних размеров частиц крупных размеров в образце с добавлением ингибиторов, не подчиняется общей динамике, поскольку через 25 и 325 часов после взятия крови из организма частицы такого размера в этом образце не были зарегистрированы. Исчезновение частиц данного размера из объема рассеяния можно объяснить их распадом или выпадением их в осадок.



**Рис. 3.7.** Изменение во времени средних по пикам размеров частиц для образцов плазмы крови с добавлением ингибиторов протеолитических ферментов (синие кривые) и с гепарином (красные кривые) в логарифмическом масштабе. (Донор женского пола, 25 лет)

Изменения средних по пикам размеров частиц, представленные на Рис. 3.7, для каждого из образцов различны. В образце плазмы крови с добавлением ингибиторов протеолитических ферментов средние размеры по каждому из пиков более стабильны в течение всего времени наблюдений, чем в образце с гепарином, в котором наблюдалось значительное уменьшение средних размеров

через 5 часов после взятия крови (для первых трех пиков) с дальнейшим их увеличением. Такие различия в динамике средних размеров частиц в исследуемых образцах плазмы крови, по-видимому, связаны с более сильным замедлением процессов протеолитической деградации пептидов и белков в образце с добавлением протеолитических ферментов. Поскольку наиболее выраженные изменения размеров по каждому из регистрируемых пиков наблюдались в образце с добавлением гепарина, то этот антикоагулянт оказался более предпочтительным для исследования процессов, протекающих в образцах плазмы крови. Так, этот антикоагулянт, 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 различных ингибиторов на размеры частиц плазмы крови различных доноров представлены в работе автора [22].

### **3.5. Экспериментальное определение ошибок измерения размеров частиц в образце плазмы крови**

Для определения экспериментальных ошибок размеров частиц проводились специальные серии измерений. Одна серия измерений включала в себя накопление 3-4 функций автокорреляции интенсивности (по 100-300 сек) подряд и получение из них распределений интенсивности рассеянного света по размерам. Размеры частиц, полученные в одной серии для каждого из пиков распределения, усредняли по 3-4 измерениям, и, таким образом, для каждого из пиков получали одну экспериментальную точку, соответствующую времени середины серии. В течение 30 часов после взятия крови из организма доноров было проведено 9 серий таких измерений. В результате для двух исследуемых образцов плазмы крови, полученных от различных доноров (мужчин, 71 год и 73 года), определили среднеквадратичное отклонение для каждого размера в каждой серии измерений.

В табл. 1 для двух исследованных образцов плазмы крови представлены максимальные, минимальные и средние по сериям величины среднеквадратичного отклонения размеров для каждой из групп размеров.

**Табл. 1.** Относительные значения (в процентах) минимальных, максимальных и средних погрешностей средних размеров частиц в каждом из регистрируемых пиков для двух различных образцов плазмы крови

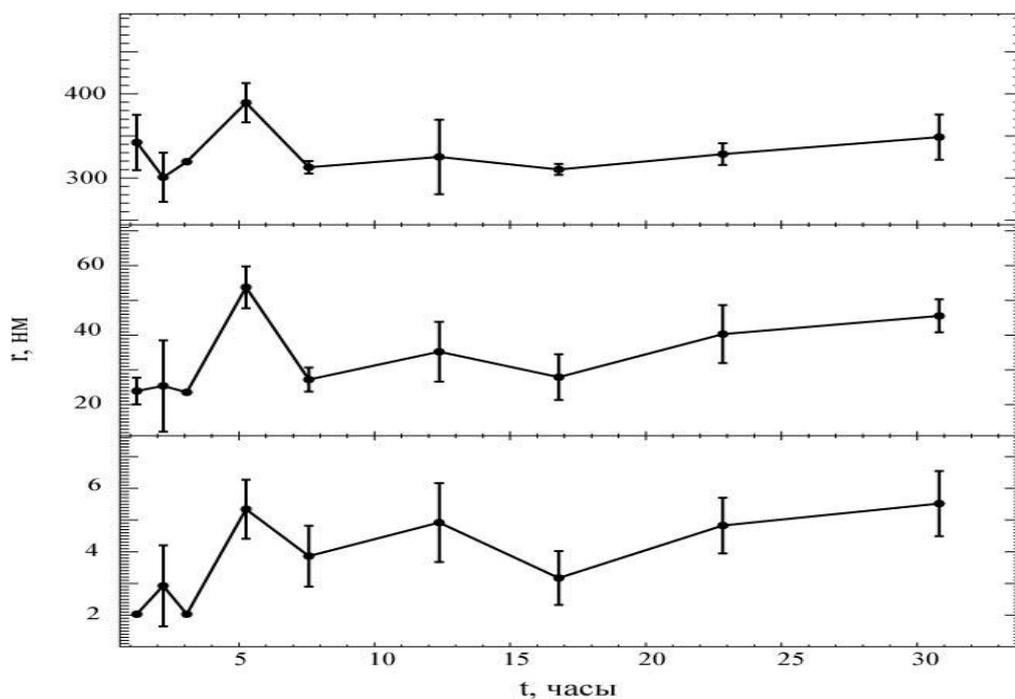
	Образец №1 (Рис. 3.8)			Образец №2 (Рис. 3.9)		
	1 пик	2 пик	3 пик	1 пик	2 пик	3 пик
Величина Погрешности, %						
минимальная	0,14	10,4	2,10	9,85	4,21	0,99
максимальная	66,21	51,61	13,63	68,91	40,46	14,00
средняя	27,31	18,33	6,86	38,68	23,36	6,84

Величины среднеквадратичных отклонений, представленные в табл. 1, существенно различаются от серии к серии для каждого пика. Относительная средняя величина погрешности размеров для первого пика (то есть для частиц с наименьшим размером) для образцов плазмы крови от двух доноров, является максимальной (30-40%), то есть частицы с наименьшими размерами регистрируются с наименьшей точностью. Для размеров частиц в третьем пике относительная средняя величина погрешности минимальна (не более 10%), что свидетельствует о том, что размеры частиц в третьем пике регистрируются с наибольшей точностью.

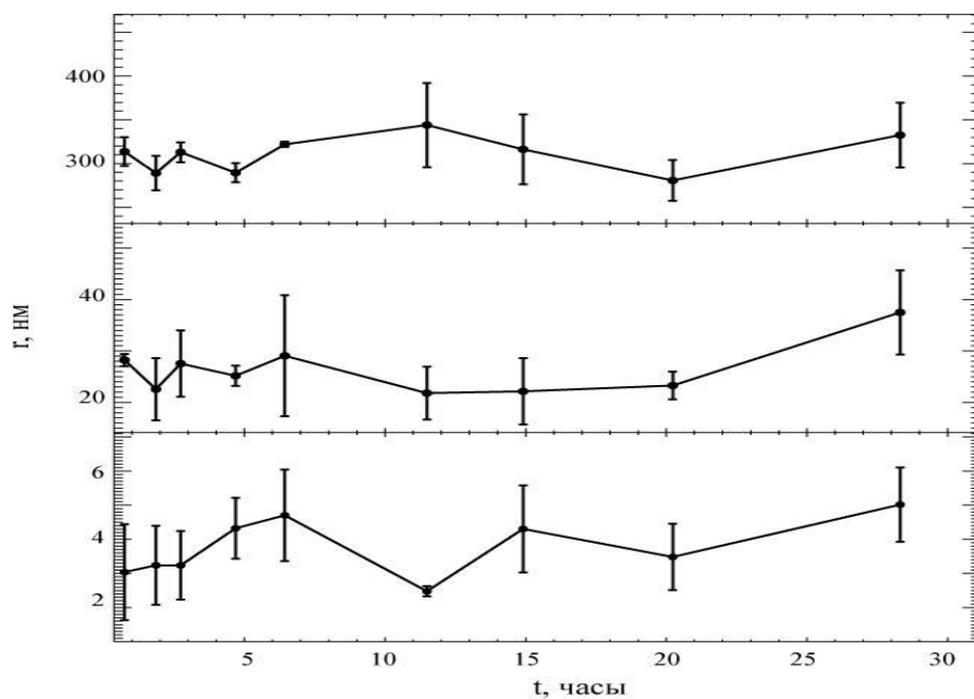
### **3.6. Динамика размеров частиц в образцах плазмы крови, наблюдаемая в течение 30 часов после взятия крови из организма**

Динамика усредненных величин размеров для каждого из пиков распределений  $I(r)$  была получена в соответствии с описанным в предыдущем разделе методом. На Рис. 3.8 и Рис. 3.9 представлена временная зависимость этих значений для образцов гепаринизированной плазмы крови двух различных доноров (муж. 71 и 73 года).

Зависимости размеров частиц от времени для двух образцов плазмы крови носят нерегулярный колебательный характер. Причем для образца плазмы крови, динамика размеров которого представлена на Рис. 3.8, эти колебания синхронны во всех регистрируемых пиках. В то же время для образца плазмы крови на Рис. 3.9 имеют место как синхронные, так и асинхронные изменения размеров частиц в каждой из групп. Что касается среднеквадратичного отклонения, оцененного для каждой точки, то для первого образца, оно не очень велико, и колебания размеров превышают эту величину, а для второго образца изменения средних размеров практически полностью находятся в пределах этих погрешностей. Подобные колебания нами были надежно зарегистрированы во временном ходе полной интенсивности рассеяния  $I_s$ , подробно описанные 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 этих колебаний. Результаты исследования динамики размеров и концентраций частиц, а также интенсивности рассеянного света в образцах плазмы крови представлены в работах автора [23–25].



**Рис. 3.8.** Динамика средних размеров в каждом из регистрируемых пиков для образца плазмы крови с добавлением гепарина, наблюдаемая в течение 30 часов после взятия пробы из организма (угол рассеяния - 40 градусов). Донор мужского пола, 73 года

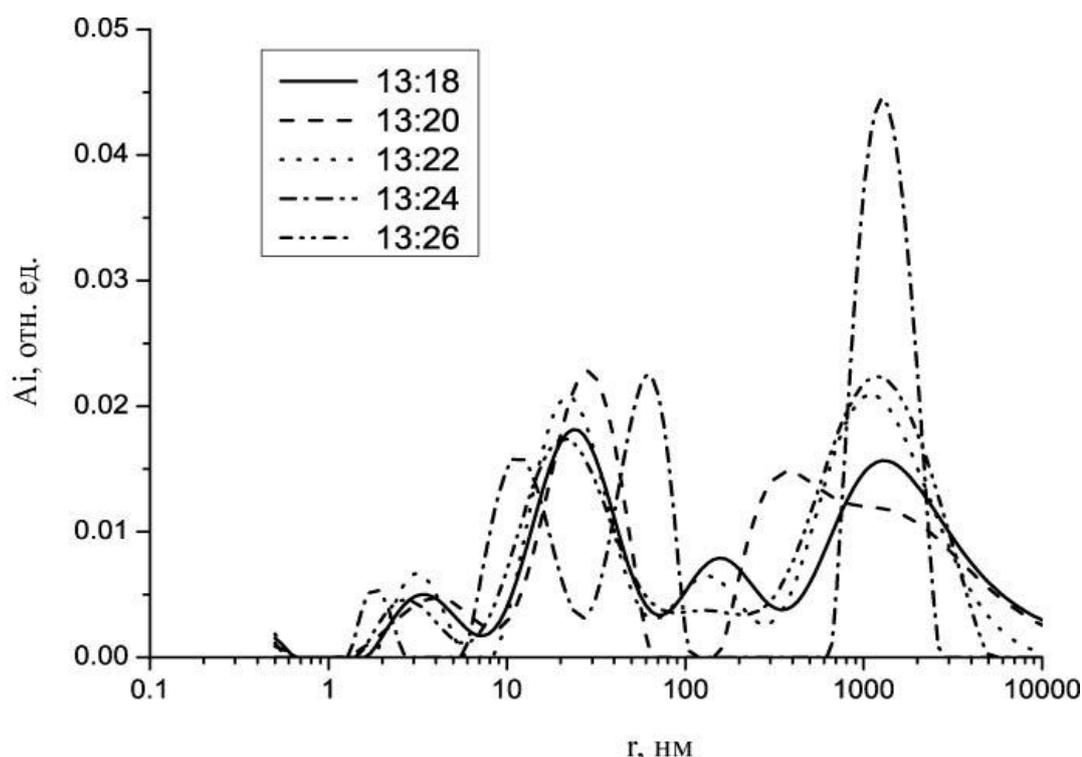


**Рис. 3.9.** Динамика средних размеров в каждом из регистрируемых пиков для образца плазмы крови с добавлением гепарина, наблюдаемая в течение 30 часов после взятия пробы из организма (угол рассеяния - 40 градусов). Донор мужского пола, 71 года

Помимо изменения размеров частиц в каждом из получаемых пиков, от измерения к измерению существенным образом иногда изменялся сам вид распределения, а именно число пиков в нем. Такая неустойчивость распределений не исчезала даже при существенном увеличении времени накопления функции автокорреляции интенсивности рассеянного света (в нашем случае более 300 секунд). Для того чтобы усреднение данных по каждому из пиков было возможным, нами для получения временных зависимостей, приведенных на Рис. 3.8 и Рис. 3.9, выбирались лишь те распределения, число пиков в которых было одинаковым (в данном случае 3 пика). Распределения с большим или меньшим числом пиков нами не рассматривались, поскольку возникала неопределенность, к какому из пиков относить полученный размер частиц. При такой статистической обработке, основанной на усреднении результатов нескольких измерений, часть информации просто теряется (для рассматриваемых образцов распределения с 2 или 4 пиками). Ошибка также могла быть сильно завышена в случае, слияния отдельных пиков распределения, так что при обработке мы приписывали одному и тому же пику размеры частиц, возможно, принадлежащие к разным размерным модам.

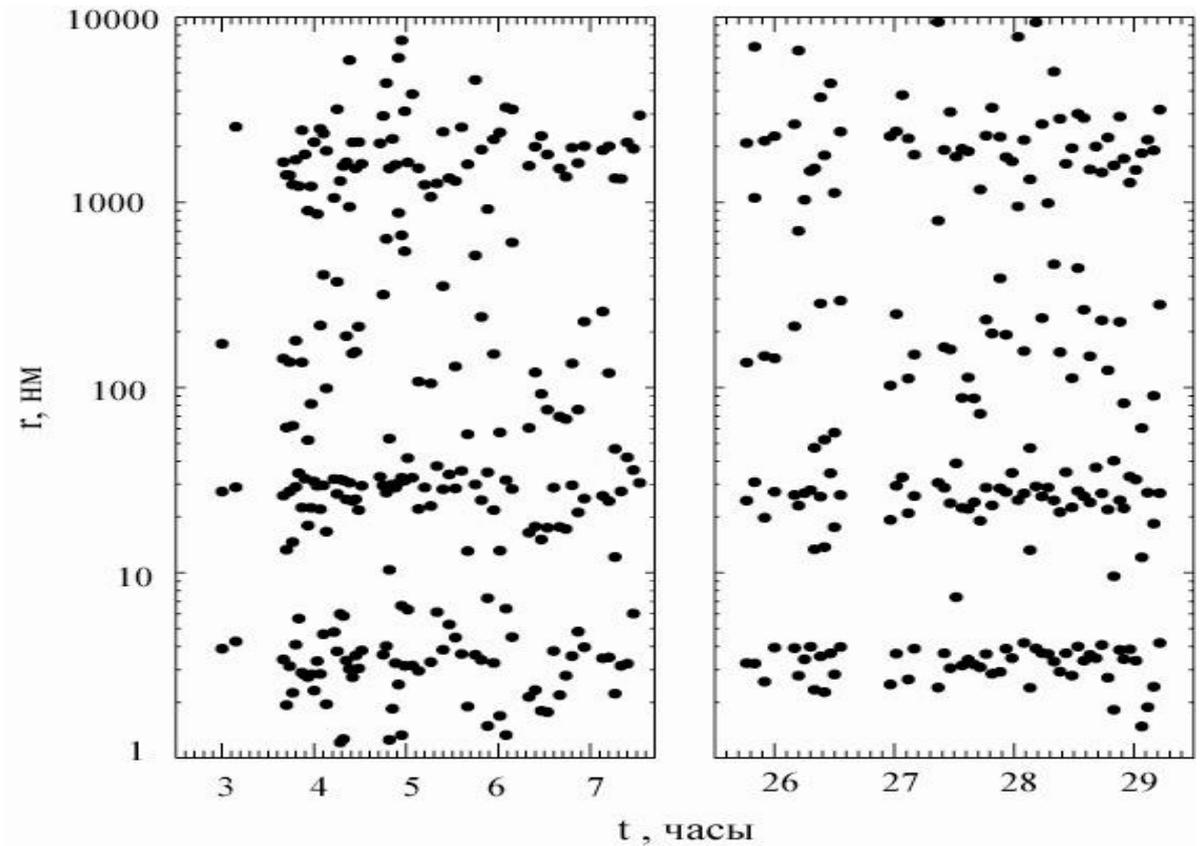
### **3.7. Набор массива размеров частиц**

На Рис. 3.10 представлены распределения  $I(r)$ , полученные в течение 10 минут через равные (2 минуты) промежутки времени, для образца плазмы крови здорового донора (женского пола, 26 лет). Эти распределения, как и распределения, полученные для других образцов плазмы крови, отличаются друг от друга не только размерами и долей интенсивности, приходящейся на каждый из пиков, но и количеством самих пиков. В диапазоне размеров частиц от 70 до 600 нм такие отличия наиболее выражены. Наиболее устойчивым является пик, соответствующий наибольшему размеру частиц (Рис. 3.10).



**Рис. 3.10.** Распределения интенсивности рассеянного света по размерам частиц  $I(r)$ , полученные для одного образца плазмы крови через равные (2 минуты) промежутки времени

Такая неустойчивость распределений привела к необходимости изменения подхода к получению и обработке данных. Нами был получен массив радиусов частиц, сформированный из значений средних по пикам радиусам 130 распределений, полученных в течение двух 5-часовых промежутков времени, через 3 и 25 часов после взятия крови из организма. Этот массив представлен на рис. 3б в координатах  $r$  (логарифм среднего радиуса по пику, нм) –  $t$  (время с момента центрифугирования крови, часы). Этот массив был получен с помощью циклического режима работы коррелятора, описанного в разделе 2.2.4 «Способы получения функций автокорреляции интенсивности рассеянного света».



**Рис. 3.11.** Массив средних по пикам значений размеров частиц в образце плазмы крови, полученный в течение 5 часов после взятия, через 3 и 25 часов после получения плазмы (донор женского пола, 26 лет)

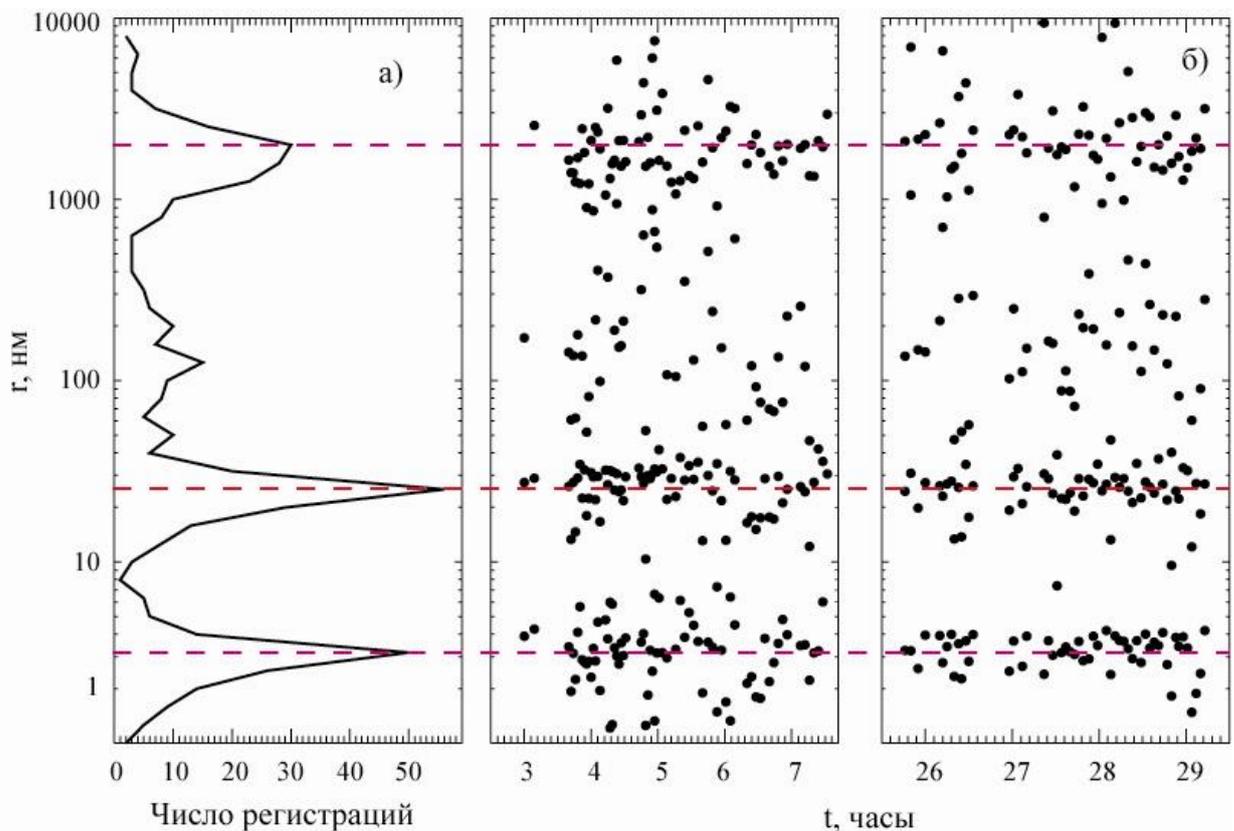
Экспериментальные точки массива (Рис. 3.11) формируют группы (сгущения вокруг определенных средних размеров) в диапазоне размеров от 1 до 10 нм, от 10 нм до 60 нм и от 1000 нм до 2000 нм. Поскольку ни в одной из групп размеров не обнаруживается тенденции к увеличению или уменьшению размеров частиц с течением времени, то можно сделать вывод о случайном разбросе значений размеров возле среднего.

### **3.8. Обработка массива размеров частиц и определение статистически достоверных размеров частиц в плазме крови**

Дальнейшая обработка массива данных осуществлялась с помощью специально разработанного алгоритма, реализованного в программе, написанной

на языке программирования IDL 6.1. Алгоритм включал в себя формирование массива значений размеров из имеющихся в числовом виде данных, подсчет числа регистраций каждого размеров частиц в пределах выбранного шага (0,1 от показателя степени логарифма размеров), построение гистограммы числа регистраций размеров, а также определение положений максимумов пиков гистограммы и их ширин на полувысоте.

Полученная после сглаживания гистограмма числа регистраций размеров частиц для массива размеров (Рис. 3.12б) в плазме крови представлена на Рис. 3.12а. Она имеет два выраженных пика в диапазоне размеров от 1 нм до 100 нм и один пик в области крупных размеров (больше 1000 нм). В области от 70 нм до 600 нм присутствует несколько менее выраженных пиков, что отражает большой разброс значений размеров, регистрируемых в том диапазоне.



**Рис. 3.12. а:** гистограмма числа регистраций размеров частиц; **б:** временной ход размеров частиц в образце плазмы крови (донор женского пола, 25 лет)

В табл. 2 представлен результат числовой обработки гистограммы числа регистраций размеров частиц (Рис. 3.12а): значения размеров, соответствующих положениям максимумов пиков гистограммы и ширины этих пиков на полувысоте, а также усредненные значения размеров и среднеквадратичное отклонение для них (СКО). Размеры частиц, соответствующие максимумам пиков гистограммы, составили:  $(3,0 \pm 0,5)$  нм – для первого пика,  $(27 \pm 3)$  нм – для второго,  $(130 \pm 82)$  нм – для третьего и  $(2000 \pm 740)$  нм – для четвертого.

**Табл. 2.** Числовые величины, характеризующие гистограмму числа регистраций размеров частиц, представленную на Рис. 3.12а.

Номер пика	Средний по пику размер	СКО	Положение максимума пика	Ширина на полувысоте
1	3,0	0,5	3,0	1,0
2	25	3	27	5
3	145	50	130	82
4	1850	390	2000	740

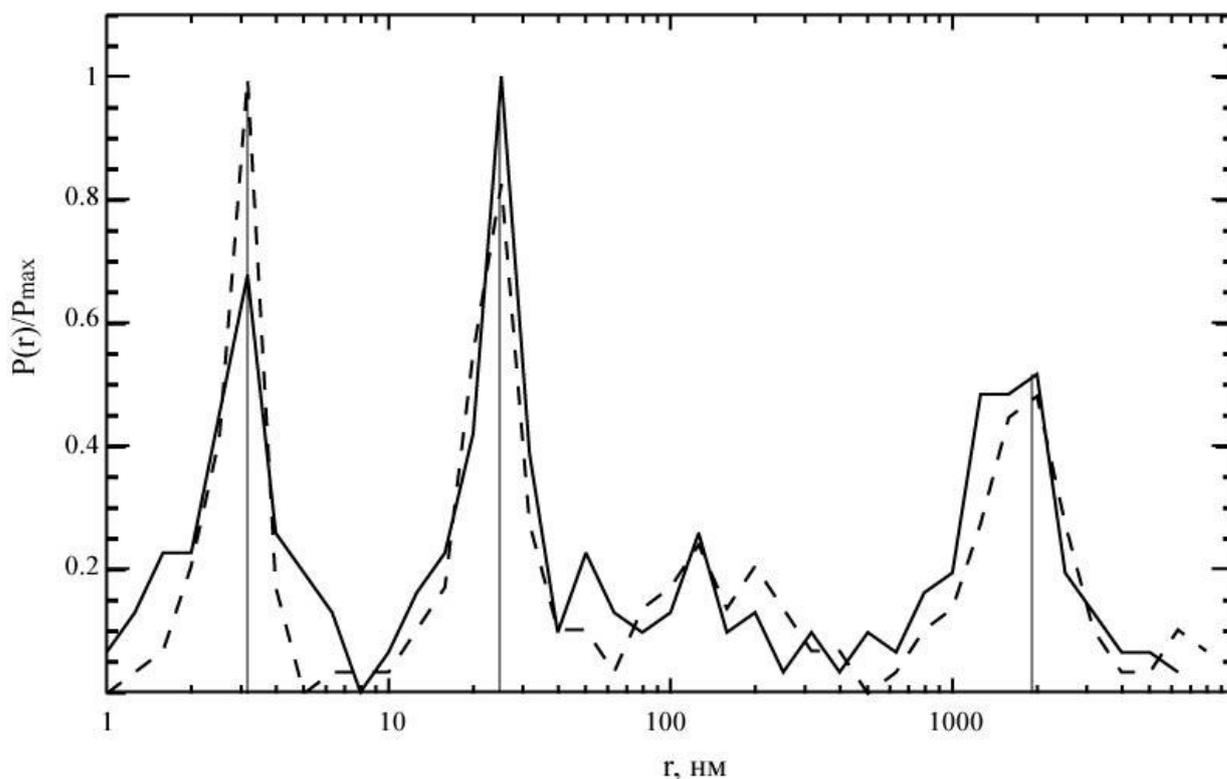
Положения максимумов пиков в гистограмме числа регистраций мы считаем статистически достоверными размерами частиц, поскольку при разбиении массива на мелкие подмассивы (менее 20 распределений) гистограмма числа регистраций имеет много мелких пиков, которые при увеличении числа данных в массиве (более 40 распределений) постепенно сливаются в пики, представленные на Рис. 3.12а.

Полученным таким образом статистически достоверным размерам в плазме крови можно сопоставить белки с известными размерами. Первому пику ( $\sim 3$  нм) могут соответствовать молекулы альбуминов, второму ( $\sim 25$  нм) – молекулы глобулинов, третьему ( $\sim 130$  нм) – молекулы фибриногена, а четвертому пику ( $\sim 2000$  нм) – фибриллы (агрегаты) фибрина, тромбоциты или микрочастицы.

Таким образом, переход от отдельных измерений распределений интенсивности по размерам частиц к формированию массива размеров частиц и подсчету числа регистраций каждого из них позволил избежать неопределенности, к какому из пиков относить тот или иной размер при усреднении, и определить статистически достоверные размеры частиц в такой многокомпонентной биологической жидкости, как плазма крови.

### **3.9. Устойчивость статистически достоверных размеров частиц в образцах плазмы крови в течение 30 часов после взятия крови из организма**

Для оценки устойчивости размеров частиц в плазме крови на первый и второй день после взятия ее из организма весь массив экспериментальных точек, представленный на Рис. 3.12б, был разделен на два массива в соответствии с днем получения данных. Подсчет числа регистраций каждого из размеров в этих массивах позволил получить гистограммы, аналогичные той, которая была построена для всего массива данных (Рис. 3.12а). На Рис. 3.13 представлены гистограммы числа регистраций размеров частиц для первого (сплошная линия) и второго дня (пунктирная линия), нормированные на пик с максимальным числом регистраций (для удобства сравнения). Видно, что размеры, соответствующие максимумам пиков, повторяют друг друга с точностью лучшей, чем ширины этих пиков на полувысоте. Это свидетельствует о том, что статистически достоверные размеры частиц в плазме крови устойчивы в течение 30 часов после взятия пробы крови из организма.



**Рис. 3.13.** Нормированные (на пик с максимальным числом регистраций) гистограммы числа регистраций размеров частиц, полученные в течение 5 часов через 3 часа (сплошная линия) и 25 часов (пунктирная линия) после взятия крови из организма

Гистограммы числа регистраций размеров, полученные для первого и второго дня наблюдений, похожи, хотя и имеют отличия в форме пиков и соотношении величин их максимумов. В первый день измерений (сплошная линия) максимум регистраций приходится на второй пик, а на второй день наблюдается обратная картина – максимальное число регистраций приходится на первый пик, соответствующий частицам с наименьшими размерами. Увеличение числа регистраций частиц малого размера можно объяснить увеличением их концентрации вследствие перераспределения частиц между группами размеров из-за протекающих в плазме крови процессов деградации белков. Поскольку для частиц более крупных размеров 25 нм и 2000 нм отмечается уменьшение числа регистраций, то можно сделать вывод об уменьшении количества частиц с такими размерами. Что же касается области размеров от 70 до 700 нм, то в гистограмме числа регистраций на второй день отмечено уменьшение количество мелких пиков с пяти до трех. В случае если за наличие размеров в этой области

отвечают именно молекулы фибриногена, то такое уменьшение количества пиков может быть связано с уменьшением концентрации фибриногена вследствие процессов его ферментативной деградации в плазме крови на второй день после взятия крови из организма.

Основным и наиболее ценным с точки зрения биофизики результатом, полученным при сравнении гистограмм числа регистраций размеров частиц, является неизменность размеров частиц в каждом из выраженных пиков на первый и второй день измерений. В табл. 3 и табл. 4 представлены статистически достоверные размеры (положения максимумов пиков гистограммы) и ширины пиков на полувысоте, а также средние по пикам размеры и среднеквадратичные отклонения. Видно, что размеры частиц с максимумом регистраций совпадают для каждого из пиков в пределах ширины на полувысоте пика, а средние размеры для них – в пределах стандартного отклонения. Результат о неизменности размеров частиц в плазме крови в течение 30 часов опубликован в работе автора [107].

Аналогичным образом были получены массивы размеров частиц и построены гистограммы числа регистраций размеров частиц для образца плазмы крови второго донора (см. прил. 1, рис. 1). Оказалось, что для образца плазмы крови второго донора размеры частиц, соответствующие положениям максимумов пиков в гистограмме, также не изменялись в течение 30 часов после взятия крови из организма, то есть были устойчивыми (см. прил. 1 рис.2). Это свидетельствует о том, что процессы протеолитической деградации белков и агрегации, протекающие в образцах плазмы крови, также не влияют на регистрируемые размеры частиц в ней за время наблюдения, однако приводят к перераспределению материала между группами регистрируемых размеров частиц, что находит свое отражение в изменении числа регистраций каждого из регистрируемых размеров (см. прил. 1, табл. 2).

**Табл. 3.** Числовые величины, характеризующие гистограмму числа регистраций размеров частиц в плазме крови в течение первых 5 часов после взятия крови, представленную на Рис. 3.13 сплошной линией

Номер пика	Средний размер	Среднеквадратичное отклонение	Размер с максимумом регистраций	Ширина пика на полувысоте
1	3	1	3	1
2	27	3	25	5
3	127	14	126	26
4	1700	400	2000	700

**Табл. 4.** Числовые величины, характеризующие гистограмму числа регистраций размеров частиц в плазме крови в течение 5 часов через 24 часа после взятия крови, представленную на Рис. 3.13 пунктирной линией

Номер пика	Средний размер	Среднеквадратичное отклонение	Размер с максимумом регистраций	Ширина пика на полувысоте
1	3	1	3	1
2	25	3	25	6
3	172	65	126	110
4	1960	380	2000	760

### Заключение к главе 3

В главе 3 представлены результаты исследования размеров частиц в образцах плазмы крови с помощью методов ДРС. Выяснено, что распределения интенсивности рассеянного света по размерам частиц, получаемые для различных образцов многомодальны, то есть состоят из нескольких отдельных пиков с соответствующими им размерами частиц. Проверка угловой зависимости размеров частиц показала, что получаемые времена когерентности (или размеры частиц) в диапазоне от 1 нм до 3000 нм соответствуют только диффузионным модам движения частиц.

Распределения интенсивности рассеянного света по размерам частиц, полученные для образцов плазмы крови одного донора, с добавлением различных антикоагулянтов (гепарина и ингибиторов протеолитических ферментов), существенно не отличались и состояли из четырех отдельных пиков. Исследование временного хода размеров частиц в этих образцах показало, что размеры частиц в образце с добавлением гепарина сильнее изменяются во времени, что может быть связано с меньшим замедлением протекающих в плазме крови процессов, чем в образцах с ингибиторами протеолитических ферментов. Добавление гепарина препятствует свёртыванию, но не полностью тормозит процессы деградации белков и агрегации частиц, так что за те временные промежутки, которые выбраны для эксперимента, мы можем наблюдать влияние этих процессов на размеры и концентрации частиц. Поэтому для дальнейших исследований процессов в плазме крови нами был выбран антикоагулянт гепарин.

Исследование распределений, полученных подряд в одной серии измерений для образцов плазмы крови с добавлением гепарина, позволило выявить неустойчивость этих распределений: от измерения к измерению менялись как размеры частиц в каждом из пиков, так и количество пиков в распределении. При этом накопление автокорреляционной функции интенсивности рассеянного света в течение длительного промежутка времени (более 300 секунд) не приводило к

получению устойчивого результата. Большие отличия размеров частиц в каждом из пиков при их усреднении приводили к возникновению больших погрешностей среднего, а разное количество пиков приводило к невозможности адекватного усреднения или потери части информации.

Накопление большого количества распределений интенсивности по размерам частиц (более 40), формирование массива размеров частиц и подсчет числа регистраций каждого из размеров частиц в пределах выбранного шага позволили определить статистически достоверные размеры частиц, которым соответствуют положения максимумов пиков *гистограмме числа регистраций размеров частиц  $P(r)$* .

Статистически достоверные размеры частиц в плазме крови, определенные описанным выше способом, оказались устойчивыми в течение 30 часов после взятия плазмы крови из организма. Такая устойчивость указывает на то, что протекающие в плазме крови процессы агрегации различных частиц и деградации белков не влияют на размеры частиц за выбранный промежуток времени. Отмеченное же изменение амплитуд пиков *гистограммы  $P(r)$*  на второй день наблюдений свидетельствует, по-видимому, об изменении количества частиц различных размеров в результате протекания указанных выше процессов.

Переход от отдельных измерений распределений интенсивности рассеянного света по размерам частиц к построению *гистограмм числа регистраций размеров частиц* позволил расширить возможности применения метода ДРС при исследовании как плазмы крови, так и других многокомпонентных систем с многомодальным распределением частиц по размерам.

## **ГЛАВА 4. ДИНАМИКА ИНТЕНСИВНОСТИ РАССЕЯННОГО СВЕТА И КОНЦЕНТРАЦИЙ ЧАСТИЦ В ПЛАЗМЕ КРОВИ**

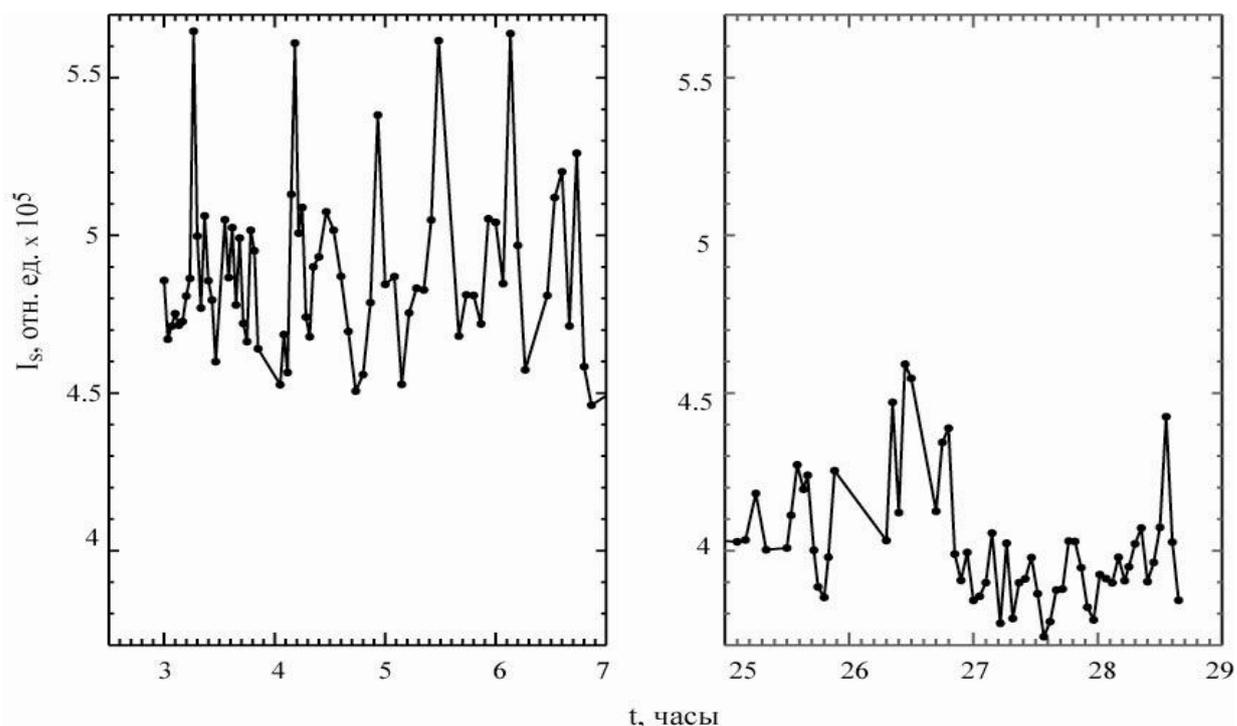
Полученные в разделе 3.9 результаты, свидетельствуют о том, что процессы протеолитической деградации белков и агрегации частиц, протекающие в плазме крови, не меняют статистически достоверные размеры частиц в ней на протяжении 30 часов после взятия крови из организма. Однако, как показано в том же разделе, на второй день наблюдений изменяется конфигурация пиков гистограммы регистраций, что может свидетельствовать о перераспределении материала частиц между регистрируемыми группами в результате протекания указанных процессов. Данная глава посвящена исследованию динамики интенсивности света, рассеянного частицами в плазме крови, и их концентраций, полученных из данных об интенсивности и размерах в приближении Релея-Ганса-Дебая.

### **4.1. Динамика полной интенсивности рассеянного света**

Используемая в настоящей работе установка по исследованию динамического рассеяния света наряду с автокорреляционными функциями интенсивности рассеянного света позволяет регистрировать полную, то есть суммарную по пикам распределения  $I(r)$ , интенсивность рассеянного света. На Рис. 4.1 представлен временной ход суммарной интенсивности света, рассеянного образцом плазмы крови под углом 40 градусов. Массив значений регистрируемых радиусов частиц представлен на Рис. 3.11.

Зависимость величины полной интенсивности рассеянного света от времени носит квазипериодичный осциллирующий характер. В первый день измерений наблюдаются выбросы величины интенсивности с амплитудой в 1,5 минимальные интенсивности. На второй день измерений такие осцилляции происходят реже и с меньшей амплитудой. Периоды наиболее выраженных колебаний, полученные с помощью быстрого Фурье-преобразования, составляли в первый день измерений

34 минуты, а во второй день – 40 минут и 2 часа. Изменение характера осцилляций на второй день наблюдений свидетельствуют, по-видимому, об изменении состояния исследуемого образца, которое связано с изменением протекающих в нем процессов деградации белков и агрегации частиц. При уменьшении концентрации фибриногена под действием пептидаз скорость деградации белка неизбежно уменьшается.



**Рис. 4.1.** Временной ход общей интенсивности рассеянного света, полученный для образца плазмы крови под углом рассеяния 40 градусов

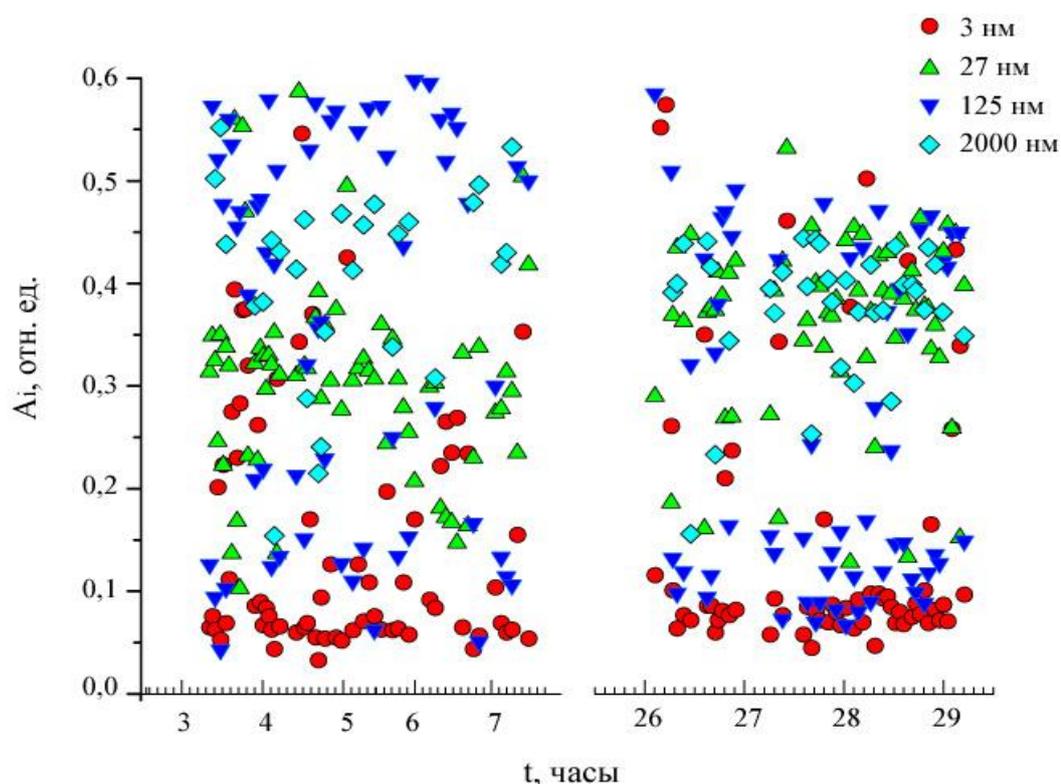
Помимо обнаруженных осцилляций и изменения их характера на второй день наблюдений во временном ходе интенсивности рассеянного света обнаружено уменьшение на 20% средней величины интенсивности. Из приближения Релея-Ганса-Дебая следует, что интенсивность света, рассеянного на частицах каждого из регистрируемых радиусов, пропорциональна шестой степени радиуса частиц  $r$ , их концентрации  $N_p$ , квадрату относительной разности показателей преломления частиц  $\Delta n/n_2$  и форм-фактору  $G^2(\theta)$  частиц (см. 29). При этом полная интенсивность света представляется в виде суммы вкладов

интенсивностей света, рассеянного на частицах каждой группы размеров. В главе 3 было установлено, что за 30 часов после взятия крови из организма размеры частиц в плазме не изменяются. Поэтому уменьшение интенсивности рассеянного света, при неизменности их относительного показателя преломления и формы, может объясняться лишь изменением распределения числа частиц по их размерам. Концентрации частиц могут изменяться в результате протекания в плазме крови процессов протеолитической деградации, когда частицы более крупных размеров превращаются в частицы более мелких размеров, а также процессов агрегации, когда частицы мелких размеров соединяются в более крупные агрегаты. При образовании агрегатов очень больших размеров может происходить выпадение их в осадок, а деградация белков, в свою очередь, может приводить к появлению отдельных пептидов и аминокислот, которые в силу малости размеров не могут быть зарегистрированы на фоне крупных частиц.

#### **4.2. Динамика логарифмической доли интенсивности света, рассеянного на частицах разных размеров**

Как было сказано выше, причиной уменьшения полной интенсивности рассеянного света на вторые сутки наблюдений при неизменности размеров частиц является либо выпадение крупных частиц в осадок, либо перераспределение материала частиц между группами их размеров. О перераспределении материала частиц можно судить по изменению логарифмической доли интенсивности  $A_i$  (Area, выдаваемой программой DynaLS), приходящейся на каждую из регистрируемых групп размеров частиц.

На Рис. 4.2 представлен массив экспериментальных точек, представляющий собой зависимость  $A_i$  от времени  $t$  регистрации распределения интенсивности рассеянного света по размерам частиц.



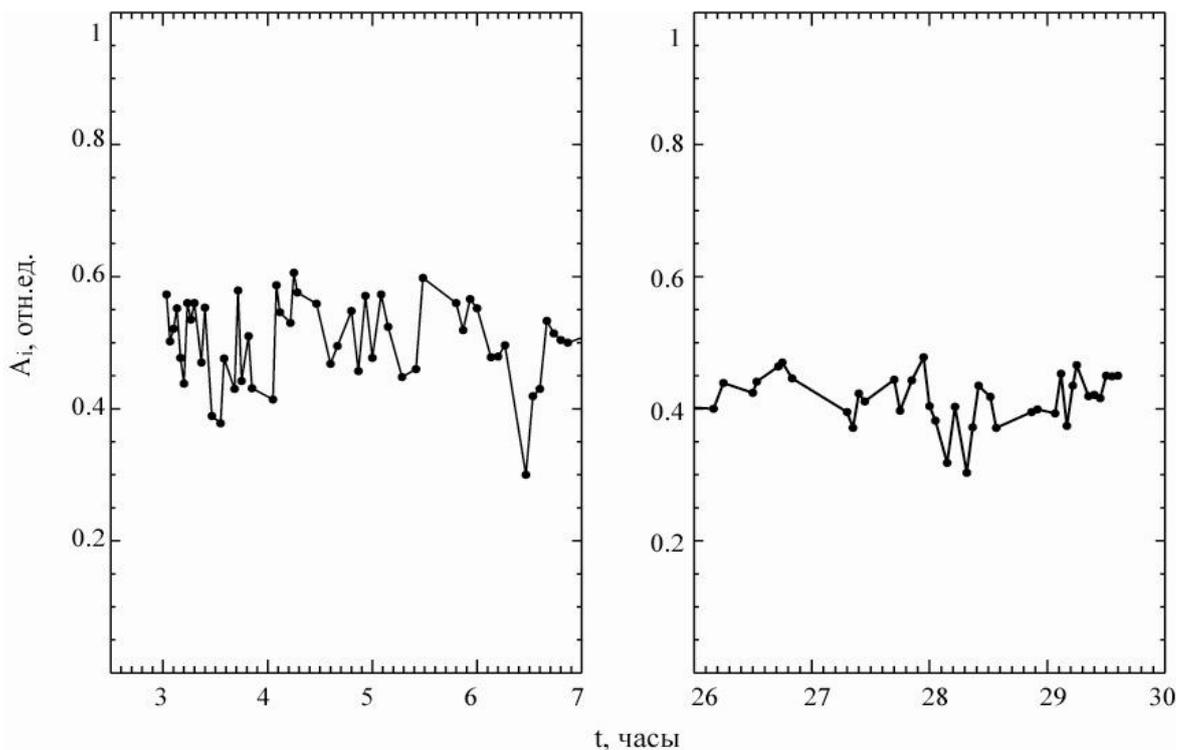
**Рис. 4.2.** Массив экспериментальных точек, представляющий собой зависимость доли интенсивности от времени наблюдения для каждой группы регистрируемых частиц. Красные кружки – доля интенсивности света, рассеянного на частицах самых малых размеров (3 нм), салатные треугольники – частицах средних размеров (27 нм), синие перевернутые треугольники – частицах из третьей группы размеров (125 нм), голубые ромбы – частицы самых крупных размеров (2000 нм)

Из данных, представленных на Рис. 4.2, видно, что через сутки после начала эксперимента величины  $A_i$  для частиц крупного размера (голубые ромбы) и частиц из третьей группы (синие перевернутые треугольники), уменьшаются. При этом также наблюдается увеличение доли интенсивности, приходящейся на частицы из второй группы размеров (салатные треугольники), так что практически все точки, соответствующие второй, третьей и четвертой группе размеров оказываются в одном диапазоне значений доли интенсивности ( $\sim 0,3$ ). Что касается частиц самых малых размеров, то для них так же, как и для частиц из второй группы размеров, наблюдается увеличение доли интенсивности рассеянного света.

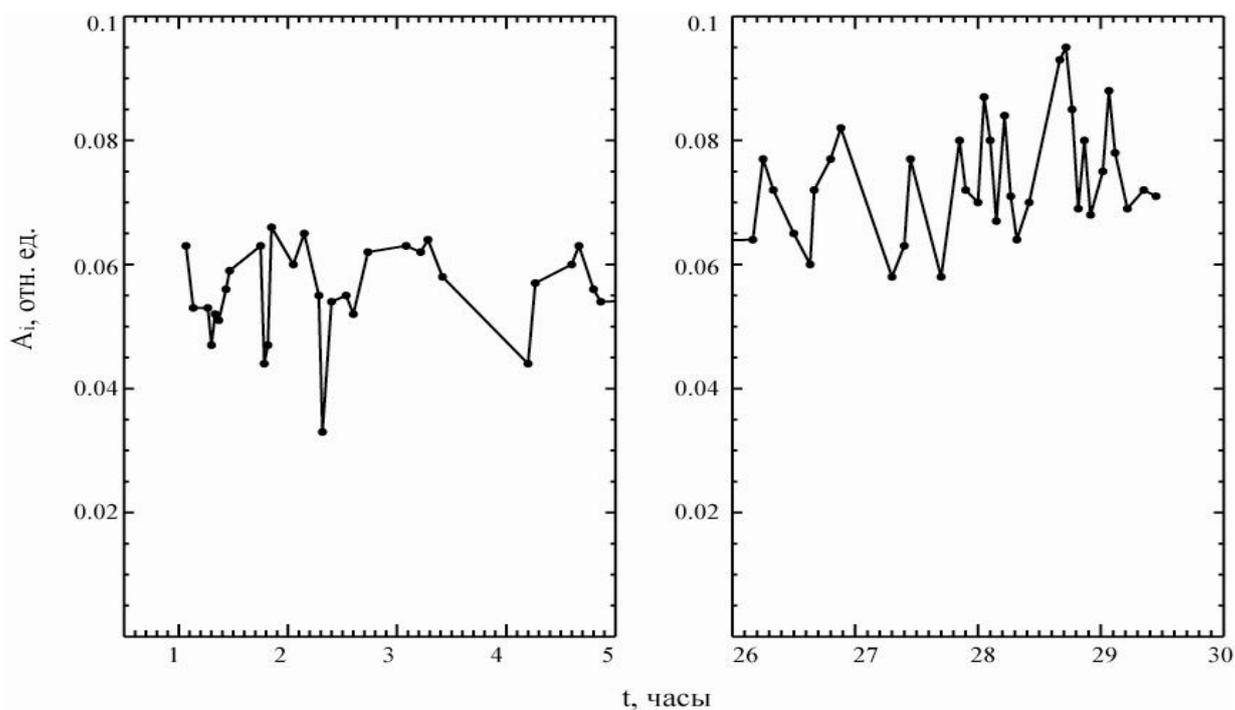
### 4.3. Динамика логарифмической доли интенсивности, рассеянного частицами крупного и малого размера

На Рис. 4.3 представлена динамика логарифмической доли интенсивности света, рассеянного частицами крупного размера. Значения  $A_i$  для графика Рис. 4.3 выбирались из тех распределений интенсивности  $I(r)$  по размерам, в которых соответствующие значения  $r_i$  попадали в пределы ширины на полувысоте пика гистограммы Рис. 3.12а. Из представленного ниже рисунка видно, что среднее значение величины  $A_i$  на вторые сутки наблюдений уменьшилось на  $\sim 10-15\%$ .

Временной ход доли интенсивности света (выбор значений которых также отбирался в пределах ширины на полувысоте пика, соответствующего малым размерам в гистограмме на Рис. 3.12а), рассеянного группой частиц малых размеров, представлен на Рис. 4.4. Видно, что на второй день среднее значение этой величины увеличивается на 20%.



**Рис. 4.3.** Временной ход логарифмической доли интенсивности ( $A_i$ ), рассеянной крупными частицами ( $r_i$  от 1300 нм до 2700 нм)



**Рис. 4.4.** Временной ход логарифмической доли интенсивности света ( $A_i$ ), рассеянного самыми мелкими частицами ( $r_1$  от 4 нм до 6 нм)

Из представленных на Рис. 4.2-Рис. 4.4 данных видно, что логарифмическая доля интенсивности рассеянного света увеличивается в группах частиц малых размеров и уменьшается в группах больших размеров, что свидетельствует в пользу перераспределения материала частиц (пептидов, аминокислот и др.) в исследуемом образце плазмы крови. Это соответствует изменению гистограммы числа регистраций размеров на второй день наблюдений: амплитуда пика, соответствующего мелким частицам увеличивается, а пик, соответствующий крупным частицам, незначительно уменьшается по амплитуде, но заметно уменьшается по площади (Рис. 3.13).

#### **4.4. Оценка концентраций частиц различных размеров в образце плазмы крови в приближении Релея-Ганса-Дебая (для сферической и цилиндрической модели их формы)**

Для оценки числа частиц  $N_{pi}$  каждого размера в единице объема было использовано приближение Релея-Ганса-Дебая. Согласно этому приближению

свет независимо рассеивается на каждой оптически «мягкой» частице с определенным размером и дает вклад в полную интенсивность рассеянного света, так что она представляется в виде суммы вкладов от частиц различных размеров, присутствующих в образце. В этом случае концентрация частиц  $N_{pi}$  может быть вычислена по следующей формуле:

$$N_{pi} = \frac{I_S \cdot \frac{A_i \cdot r_i}{\sum_i A_i \cdot r_i} \cdot \sin \theta}{\frac{N_T}{R_T} \left( \frac{2\pi n_2}{\lambda} \right)^4 \cdot \left| \frac{n_1 - n_2}{n_2} \right|^2 \cdot \frac{4}{9} \cdot r_i^6 \cdot G^2(\theta)}, \quad (4.1)$$

где  $\frac{A_i \cdot r_i}{\sum_i A_i \cdot r_i}$  – доля интенсивности света, рассеянного частицами с размером  $r_i$  (в пересчете из логарифмической шкалы размеров).

Для всех частиц использовалась одна и та же относительная разность показателей преломления  $\Delta n/n_2 = 0.013$ ;

Для модели сферических частиц форм-фактор  $G^2(\theta)$  имеет следующий вид [18]:

$$G^2(\theta) = \left[ \frac{3}{x^3} (\sin x - x \cos x) \right]^2, \quad (4.2)$$

$$x = qr = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2} \cdot r, \quad (4.3)$$

Для цилиндрической модели частиц форм-фактор  $G^2(\theta)$  [108]:

$$G^2(\theta) = \frac{1}{x} \int_0^{2x} \frac{\sin \omega}{\omega} d\omega - \left( \frac{\sin x}{x} \right)^2, \quad (4.4)$$

$$x = ql = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2} \cdot l, \quad (4.5)$$

где  $l$  – длина цилиндра (однородного стержня).

Обратимся к условиям оптической «мягкости» частиц [109]:

$$\left| \frac{n_1}{n_2} - 1 \right| \ll 1, \quad (4.6)$$

$$2kr \left| \frac{n_1}{n_2} - 1 \right| \ll 1, \quad (4.7)$$

Напомним, что  $\mathbf{k}=2\pi/\lambda$  – волновой вектор падающего света.

Для оценки оптической «мягкости» частиц воспользуемся принятыми в литературе показателями преломления белков (от 1.3460 до 1.3529) и воды как дисперсионной среды (1,333). Тогда условие (4.6) выполняется с достаточно высокой точностью ( $0,0009 \ll 1$ ). Что касается условия (41), то для минимального регистрируемого размера частиц (3 нм), оно надежно выполняется, а для самых крупных (2000 нм), левая часть (4.7) неамного, но заметно меньше единицы (0,35). В работе [109] показано, что при таких значениях второго критерия «мягкости» частиц, приближение РГД может быть применено для расчета концентраций частиц и даже при больших значениях левой части (4.7), это приближение не вносит существенных ошибок в вычисляемую величину  $N_{pi}$ . Даже если мы получим некоторую систематическую ошибку мы все равно сможем верно оценить характер временной зависимости концентрации тех или иных частиц.

На Рис. 4.5 и Рис. 4.6 представлены массивы концентраций частиц в координатах концентрации частиц  $N_p$  - время  $t$  для сферической и цилиндрической модели формы частиц, соответственно. Черными круглыми точками на рисунке показаны концентрации частиц самых малых размеров (~3,2 нм), красными треугольниками – частицы средних размеров (~26 нм), зелеными квадратами – частицы еще более крупных размеров (~145 нм), а синими крестиками – частицы самых больших размеров (~1829 нм). Наименьшим концентрациям соответствуют частицы с наибольшими размерами, в то время как наибольшие концентрации имеют частицы с самыми малыми размерами.

В массивах концентраций (Рис. 4.5 и Рис. 4.6) имеется несколько областей с наибольшей плотностью точек: для сферической модели – три области (от  $10^{-4}$  до  $10^{-1}$ ,  $10^1$  до  $10^2$  и от  $10^5$  до  $10^6$  част/мкм<sup>3</sup>), а для цилиндрической – четыре (от  $10^{-8}$  до  $10^{-6}$ , от  $10^{-3}$  до  $10^{-1}$ ,  $10^1$  до  $10^2$  и от  $10^5$  до  $10^6$  част/мкм<sup>3</sup>). Такие отличия в

количестве выделенных областей определяются видом зависимости форм-фактора частиц от их размера.

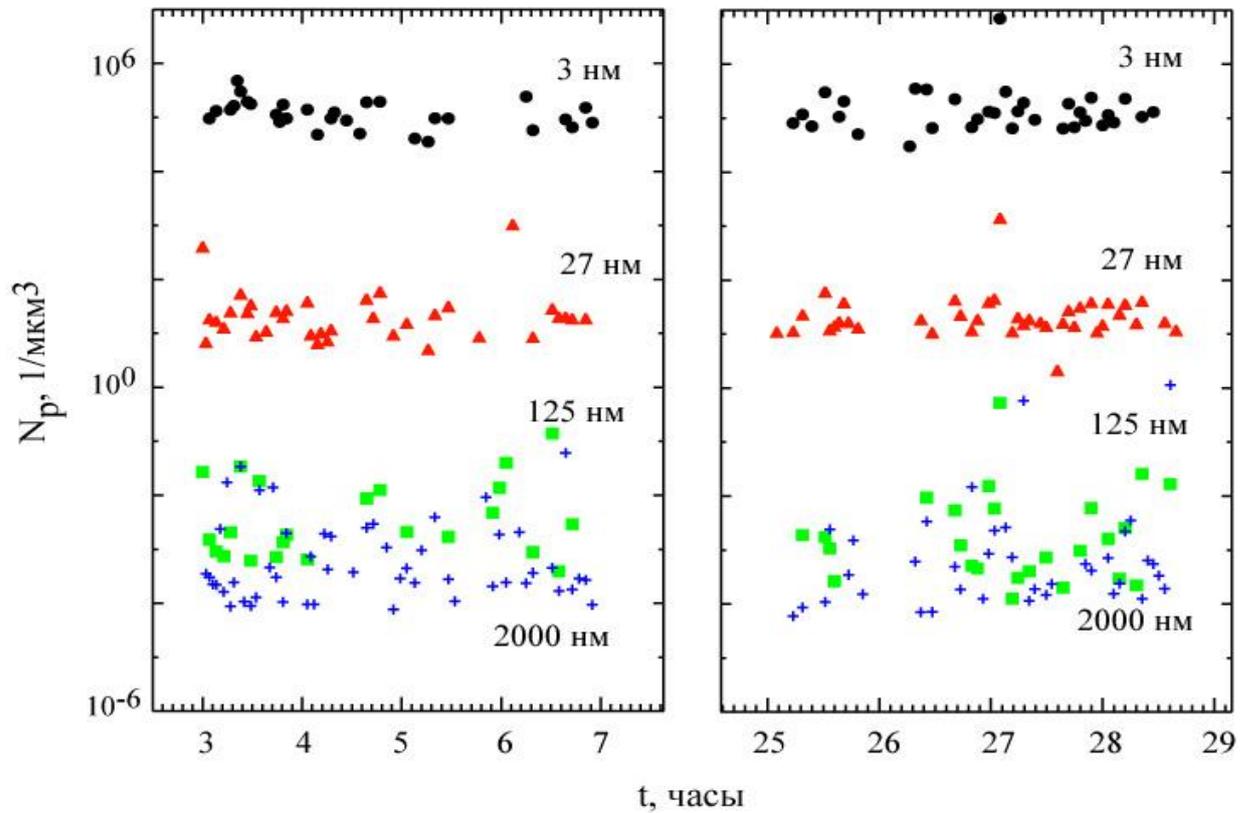


Рис. 4.5. Массив концентраций частиц, полученный для сферической модели их формы

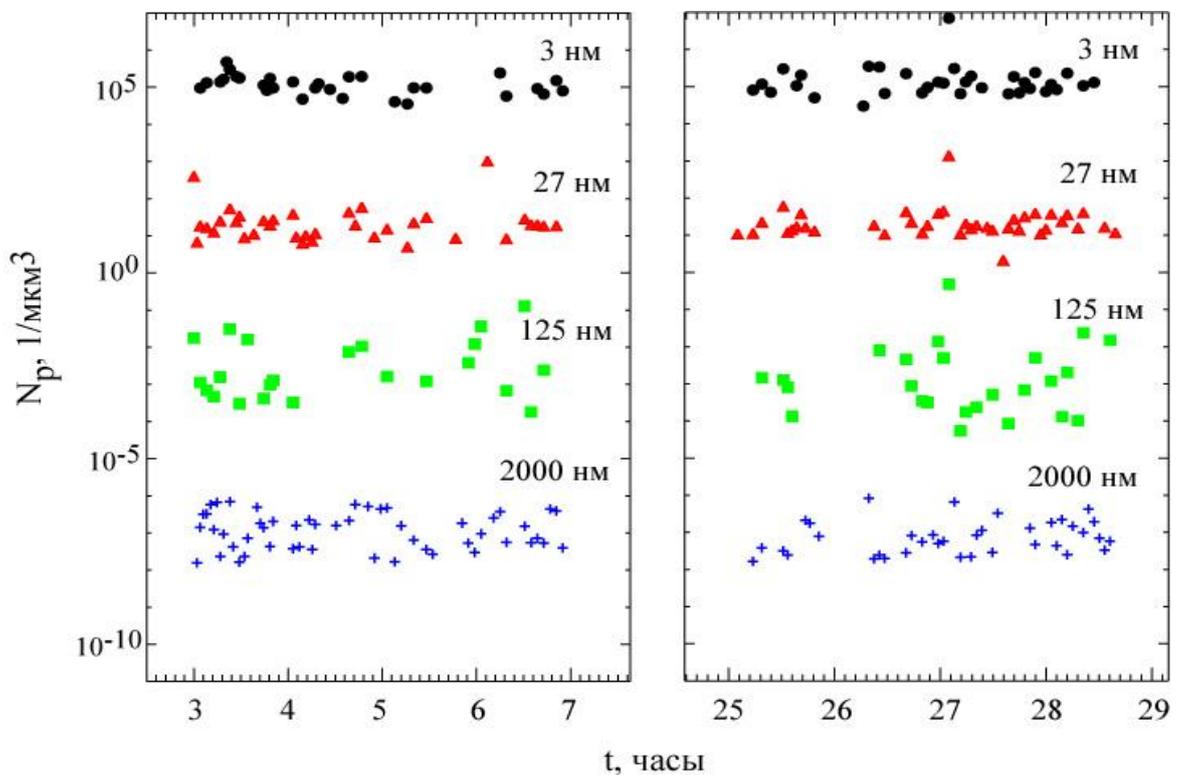
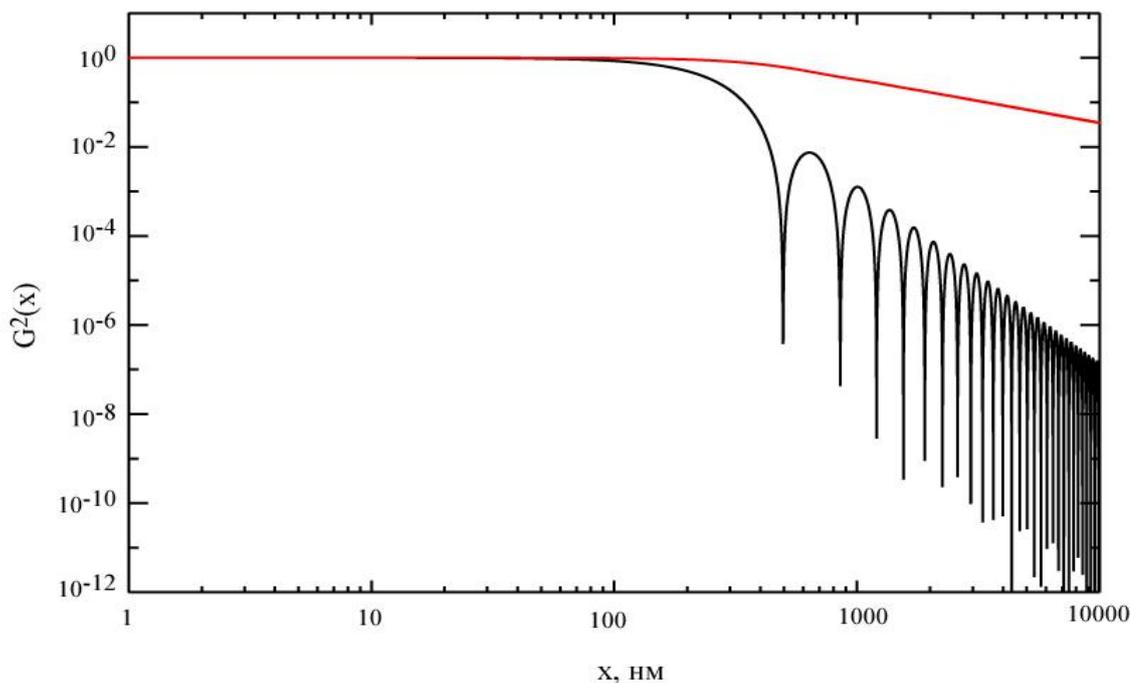


Рис. 4.6. Массив концентраций частиц, полученный для цилиндрической модели их формы

На Рис. 4.7 в двойном логарифмическом масштабе представлены зависимости сферического  $G^2(\theta, r)$  и цилиндрического форм-фактора  $G^2(\theta, l)$  частиц в зависимости от радиуса сферы и длины цилиндра. Видно, что для частиц сферической формы с размерами свыше 300 нм наблюдается резко нелинейная зависимость  $G^2(r)$  от радиуса.



**Рис. 4.7.** Зависимость форм-фактора частиц от  $x$  в двойном логарифмическом масштабе, где  $x$  – радиус сферы, в случае сферического форм-фактора (черная кривая) и длина цилиндра (красная кривая) в случае цилиндрического форм-фактора частиц

#### 4.5. Изменение концентраций частиц на второй день после взятия крови из организма

Проведенная оценка средних концентраций частиц регистрируемых размеров на первый и второй день измерений показала наличие изменений в них. Концентрация частиц малых размеров, как для модели сфер, так и модели цилиндров, увеличилась с  $(3,1 \pm 1,4) \cdot 10^6$  до  $(4,4 \pm 1,5) \cdot 10^6$  частиц/мкм<sup>3</sup>, в то время как концентрация крупных частиц уменьшилась (для цилиндрической модели

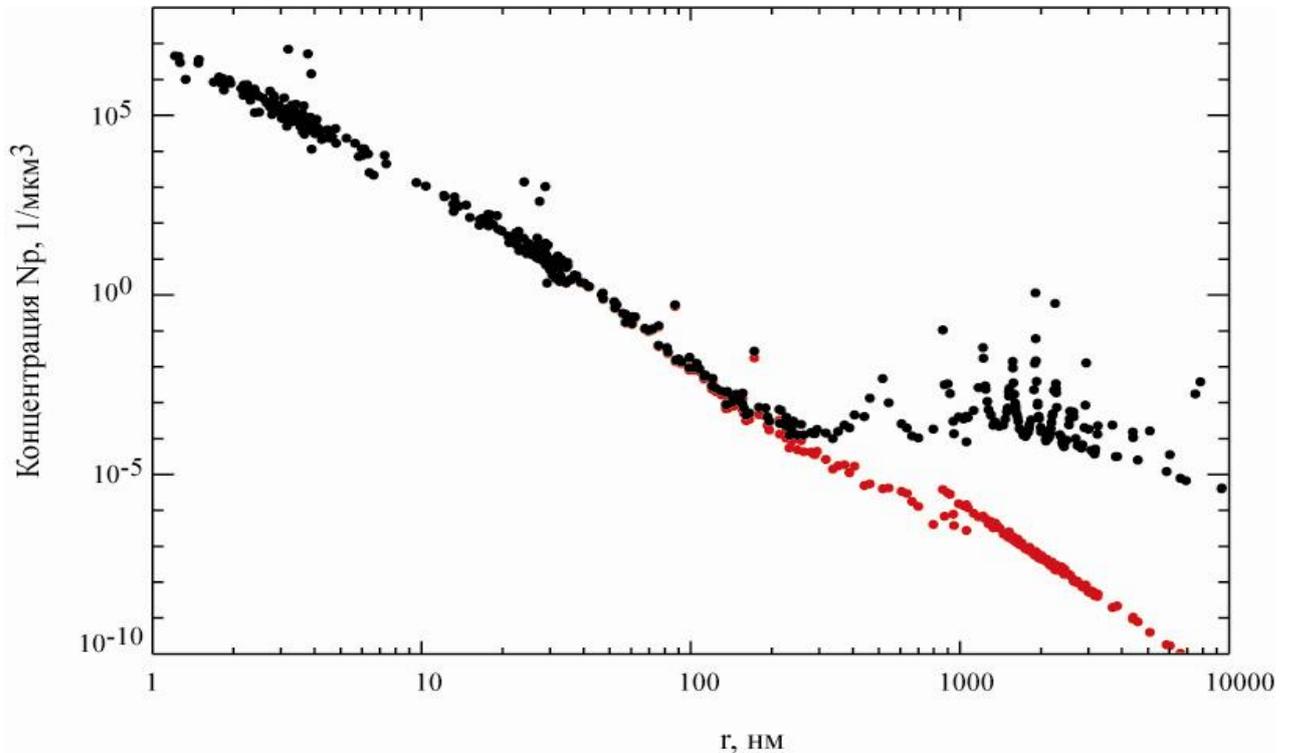
формы частиц) с  $(2,4 \pm 1,9) \cdot 10^{-7}$  до  $(1,08 \pm 0,5) \cdot 10^{-7}$  частиц/мкм<sup>3</sup>. Расчет по сферической модели не показывает уменьшение количества частиц больших размеров. Это может быть связано с тем, что, если реальные размеры частиц, не попадающие в РГД-минимумы (см. Рис. 4.7), тем не менее, из-за нестабильности разложения автокорреляционной функции по экспонентам, регистрируются как находящиеся в области одного из минимумов, то при расчете концентраций частиц мы получаем сильно завышенные значения концентраций. Для цилиндрической модели зависимость форм-фактора  $G^2(l)$  от длины цилиндра в этой области размеров имеет линейный убывающий характер, в результате чего завышенные значения не будут получены, и мы видим уменьшение концентраций частиц на второй день. Если же частицы в действительности имеют форму, близкую к цилиндрической, то, как видно из Рис. 4.7, применение сферического приближения также даст сильно завышенные концентрации.

Уменьшение концентрации крупных частиц (в случае их белковой природы), как уже было сказано выше, может объясняться протеканием процессов их протеолитической деградации с помощью специальных ферментов (например, агрегаты фибрина могут распадаться под воздействием фермента – плазмина, всегда присутствующего в плазме крови в норме). Увеличение концентрации частиц малого размера также связано с протеканием процессов деградации более крупных соединений и может объясняться появлением в плазме крови белковых соединений (пептидов, аминокислот) таких размеров, которые уже зарегистрированы в образце, приводя тем самым к увеличению их числа в единице объема.

#### **4.6. Связь концентраций частиц и их размеров в плазме крови**

Проведенные оценки концентраций частиц, рассчитанных в приближении РГД для сферической и цилиндрической модели их формы, позволили сопоставить эти концентрации размерам частиц. Результатом такого сопоставления явилась диаграмма соответствия концентраций частиц  $N_p$  их

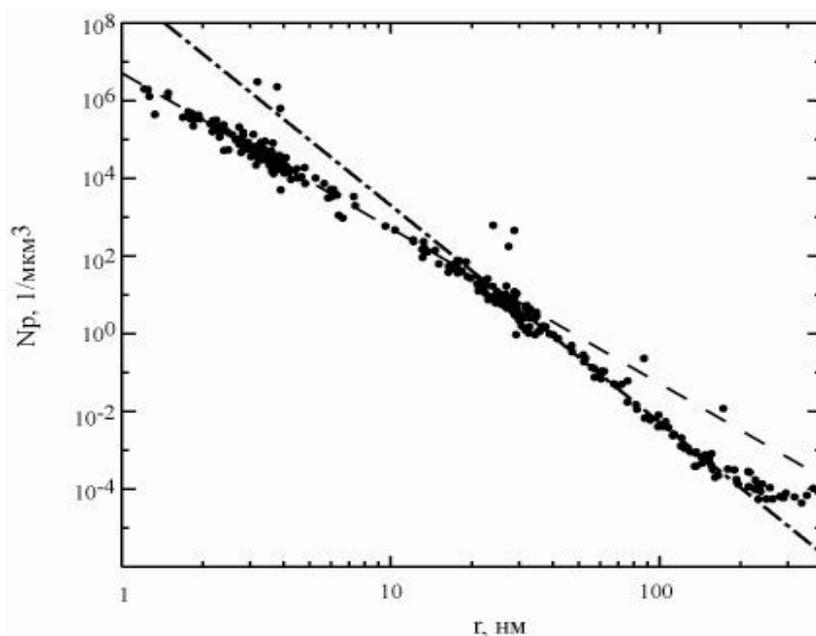
размерам  $r$  в двойном логарифмическом масштабе. Такие диаграммы, полученные для сферической и цилиндрической модели формы частиц, представлены на Рис. 4.8 (донор женского пола, 25 лет).



**Рис. 4.8.** Графики соответствия концентраций частиц их размерам (радиусам или длинам), полученные в приближении сферической модели частиц (черные точки) и цилиндрической модели (красные точки). В диапазоне от 0 до 300 нм точки для обеих моделей совпадают (донор женского пола, 25 лет)

Видно, что в интервале размеров от 1 нм до 300 нм связь между концентрациями частиц и их размерами имеет монотонный убывающий характер, близкий к линейной зависимости, характерный для обеих моделей формы частиц. Для сферической формы частиц в области размеров частиц свыше 300 нм происходит нарушение такой монотонности. Такое нарушение может быть связано с описанным в предыдущем пункте эффектом случайного смещения регистрируемого размера частиц в минимумы  $G^2(\theta, r)$  или с тем, что реальные частицы с такими размерами имеют форму, близкую к цилиндрической. Для цилиндрической модели в этой области размеров связь логарифма концентраций

частиц и их радиусов близка к линейной. Аналогичные диаграммы соответствия, полученные для второго донора (мужчины, 73 лет) представлены в прил. 1, рис. 3 и рис. 4.



**Рис. 4.9.** График соответствия концентраций частиц их размерам в двойном логарифмическом масштабе (диапазон от 1 нм до 300 нм)

Напомним, что значения концентраций частиц были получены в приближении РГД из экспериментальных данных – интенсивности рассеянного света и размеров частиц в образце (4.1). Логарифмирование выражения (4.1) приводит к получению следующей зависимости:

$$\lg N_{p_i} = \left[ -6 \lg r_i - 2 \lg G(\theta, r) + \lg \frac{I_S \cdot A_i \cdot r_i}{I_L} \right] + B, \quad (4.8)$$

Эта зависимость близка к линейной в случае, если слагаемые в квадратных скобках не вносят существенных искажений в линейность. Так, второе слагаемое в области от 1 нм до 100 нм равно единице для обеих моделей формы частиц (Рис. 4.9) и поэтому его можно отнести к постоянному члену  $B$  выражения (4.8). Следовательно, наклон прямой на этом участке определяется первым и третьим слагаемым в квадратных скобках. Коэффициент перед первым слагаемым равен – 6. Из полученной экспериментальной связи концентраций частиц и их размеров

для диапазона размеров от 1 нм до 25 нм было получено значение тангенса, близкое к  $-4$ , а для участка от 25 нм до 200 нм  $-5,59$ . Поскольку связь концентраций частиц  $N_{r_i}$  и их радиусов  $r_i$  линейна в логарифмическом масштабе, то объемная концентрация белков  $C_V \sim r^\mu$ , где  $\mu = -1$  на первом участке радиусов, и  $\mu \approx -2.6$  - на втором.

Заметим, что полученный график соответствия  $N_{r_i}-r_i$  означает, в частности, что при случайном (из-за нестабильности разложения функции корреляции интенсивности рассеянного света по экспонентам) изменении регистрируемого радиуса частиц  $r_i$ , меняется также логарифмическая доля интенсивности  $A_i$ . Причем изменения  $A_i$  происходят таким образом, что получающиеся концентрации оказываются на линии, соединяющие концентрации частиц реальных размеров.

Согласно данным нормальной физиологии, крупные соединения в плазме, такие как фибриноген и агрегаты фибрина, имеют сложную нитеобразную форму. Поэтому представляется, что модель цилиндров является более предпочтительной для описания формы и расчета концентраций этих молекул. Однако в этом диапазоне размеров могут присутствовать более сложные структуры, не соответствующие моделям ни сфер, ни цилиндров. Поэтому окончательный вывод о применении той или иной модели может быть сделан после специального исследования формы частиц крупных размеров другими методами.

#### **4.7. Подтверждение адекватности расчета концентраций в приближении РГД разбавлением плазмы крови**

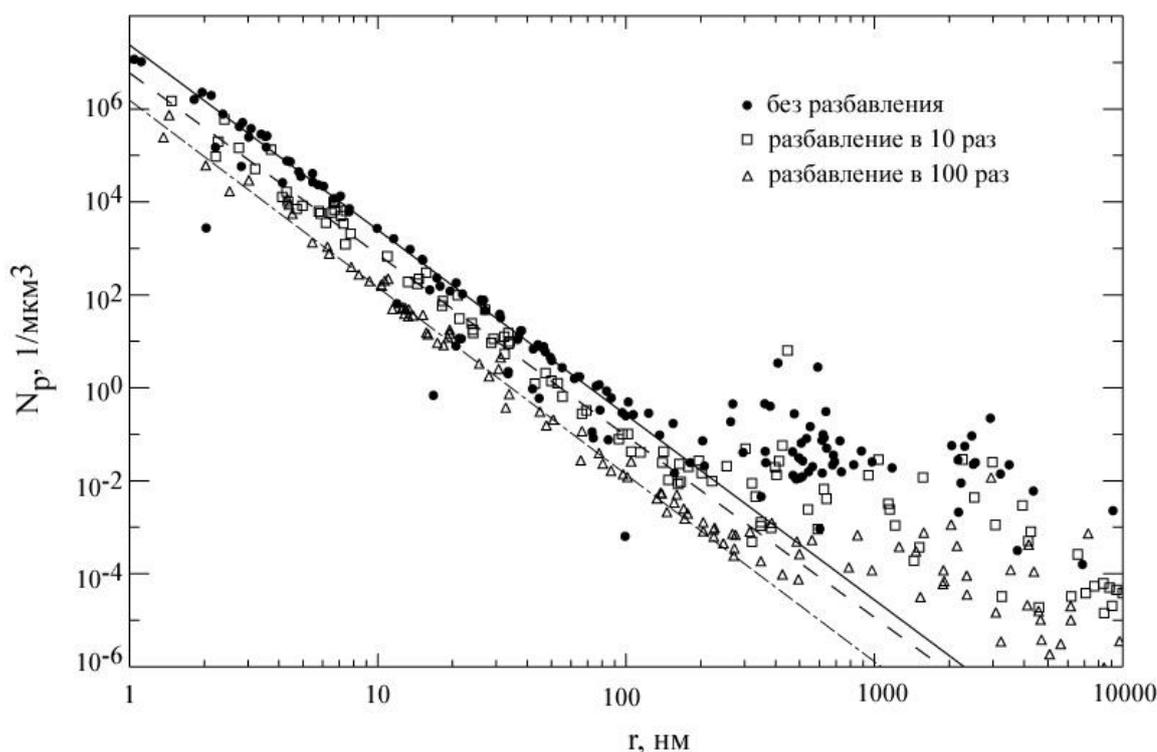
При расчете концентраций частиц в плазме крови нами было использовано приближение РГД, согласно которому рассеяние света происходит независимо на каждой частице и полная интенсивность рассеянного света пропорциональна концентрации присутствующих в жидкости частиц. Приближение независимости рассеяния на отдельных частицах может нарушаться при очень большой 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 очень больших концентрациях частиц неизбежно возникает их взаимодействие, что делает неприменимым соотношение Стокса-Эйнштейна. При общей концентрации белков в плазме крови порядка 7% и сосредоточении основной части белков в самых мелких частицах ( $C_v \sim 1/r$ ) расстояние между их центрами может оказаться порядка 15-20 нм. Поэтому необходимо было проверить применимость наших моделей для плазмы крови.

Для проверки возможности применения приближения РГД для расчета концентраций частиц и формулы Стокса-Эйнштейна для определения их радиусов было исследовано рассеяние света в образцах неразбавленной и разбавленной в 10 и 100 раз плазмы крови. Для этих измерений использовались образцы размороженной плазмы.

Перечисленные проблемы могут возникнуть только для самых мелких частиц. Тогда при наличии взаимодействия мелких частиц в неразбавленной плазме крови или неадекватности приближения РГД для них, при разбавлении график соответствия изменит форму. Поскольку для мелких частиц степень неадекватности уменьшится, а для более крупных частиц, расположенных далеко друг от друга, все останется по-прежнему.

На Рис. 4.10 представлены графики соответствия концентраций частиц их размерам в двойном логарифмическом масштабе для неразбавленного образца плазмы крови (красные точки), для образца плазмы, разбавленной в 10 раз (черные точки) и для образца плазмы крови, разбавленной в 100 раз (синие точки).



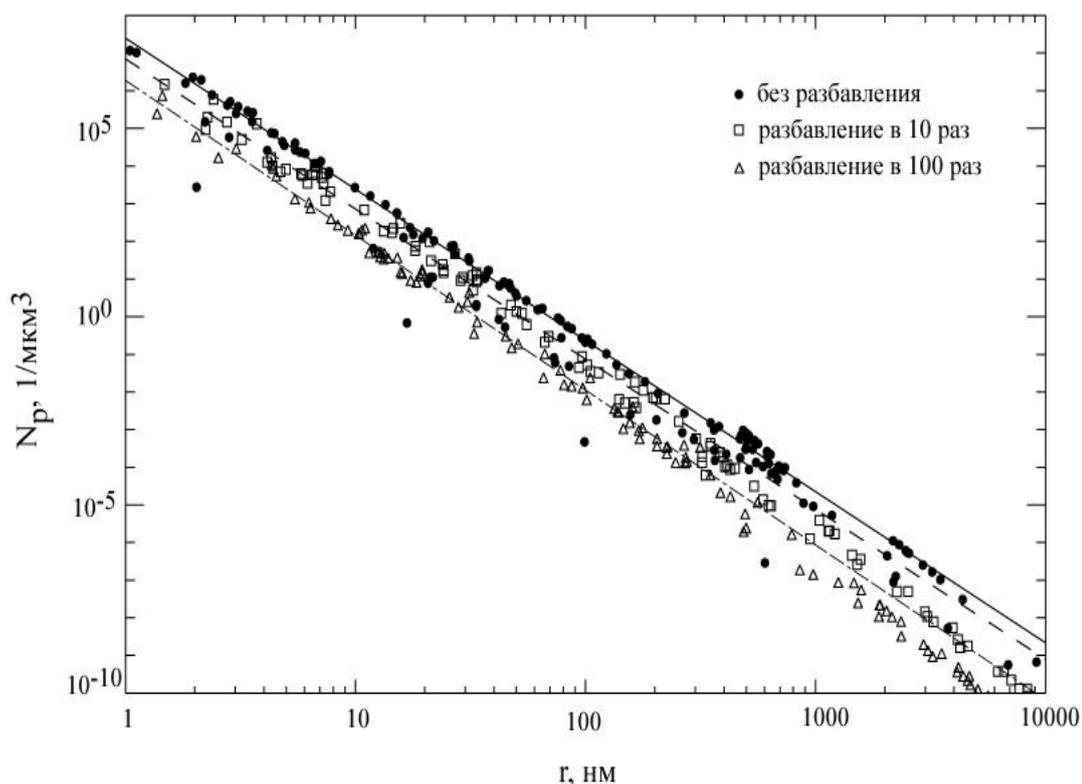
**Рис. 4.10.** Графики соответствия концентраций частиц их радиусам, полученные для образцов неразбавленной (кружки), разбавленной в 10 (квадраты) и 100 раз (треугольники) плазмы крови, полученные в предположении сферической формы частиц

Для всех образцов плазмы крови график соответствия имеет линейный вид в области значений размеров частиц от 1 до 300 нм. Для образца неразбавленной плазмы крови коэффициенты  $a$  и  $b$  были следующими  $a = -3.98 \pm 0.16$ ,  $b = -4.56 \pm 0.17$ ; для образца плазмы крови, разбавленной в 10 раз:  $a = -3.91 \pm 0.07$ ,  $b = -4.92 \pm 0.09$ ; для образца плазмы, разбавленной в 100 раз:  $a = -4.03 \pm 0.05$ ,  $b = -5.89 \pm 0.07$ . Видно, что коэффициент  $a$ , определяющий наклон прямой для полученных зависимостей, отличается незначительно – в пределах погрешностей. Поскольку в области малых размеров частиц не обнаружено искажения линейной формы графика соответствия концентраций частиц их размерам по мере разбавления образцов, то формула Стокса-Эйнштейна для оценки гидродинамических радиусов частиц и формулы приближения РГД для оценки концентраций частиц в неразбавленных образцах плазмы крови адекватны.

Заметим, что 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 0.38, а для образца плазмы крови с разбавлением в 100 раз – уменьшился на 1.33 (при ожидаемом изменении на 2). 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.

Расчет концентраций частиц в предположении их цилиндрической формы [108] позволил получить графики соответствия концентраций частиц их гидродинамическим радиусам, близкие к линейным в двойном логарифмическом масштабе, во всем диапазоне регистрируемых размеров частиц (Рис. 4.11). Такое сохранение линейности может свидетельствовать о том, что реальная форма больших агрегатов белков близка к цилиндрической.



**Рис. 4.11.** Графики соответствия концентраций частиц их длине, полученные для образцов неразбавленной (кружки), разбавленной в 10 (квадраты) и 100 раз (треугольники) плазмы крови, полученные в предположении цилиндрической формы частиц

Таким образом, в этом разделе показано, что формула Стокса-Эйнштейна и приближение РГД применимы для определения размеров и концентраций частиц в неразбавленной плазме крови при исследовании ее методами ДРС. Установлено, что для образцов неразбавленной и разбавленной плазмы крови графики соответствия концентраций частиц их размерам могут быть аппроксимированы прямыми линиями в диапазоне от 1 нм до 300 нм в предположении сферической их формы и в диапазоне от 1 нм до 10000 нм – для цилиндрической формы частиц. Сохранение линейности графика во всем диапазоне регистрируемых размеров свидетельствует о том, что модель цилиндров лучше подходит для описания формы частиц большого размера, чем модель сфер. Особенности, проявившиеся при использовании разных моделей для расчета концентраций, являются предметом отдельного исследования. Результаты исследования соотношения концентраций частиц и их размеров представлены в работе автора [27].

## Заключение к главе 4

В главе 4 приведены результаты исследований временного хода суммарной интенсивности света, рассеянного частицами плазмы крови. Выяснено, что динамика изменения этой величины имеет квазипериодический осциллирующий характер. Такой характер может быть объяснен протекающими в плазме крови процессами деградации белков и агрегации частиц и белков. Схожие колебания интенсивности наблюдались R. Kita et al. [26] при исследовании модельного раствора фибриногена с тромбином. Однако, если авторы [26] наблюдали рост интенсивности рассеянного света с течением времени и объясняли его образованием агрегатов фибрина, то мы регистрировали уменьшение средней величины суммарной интенсивности рассеянного света на 20% на вторые сутки наблюдений в образце плазмы крови. Это объясняется уменьшением концентрации крупных частиц, происходящим в результате распада их на более мелкие частицы, то есть перераспределением материала между группами размеров частиц. Свидетельством такого перераспределения является уменьшение логарифмической доли интенсивности, приходящейся на частицы крупных размеров, и увеличение доли, приходящейся на частицы малых размеров через сутки после начала эксперимента.

Оценки концентраций частиц в приближении РГД из интенсивности рассеянного света также подтвердили предположение о перераспределении материала. Концентрации частиц малых размеров увеличиваются на вторые сутки в 1,5 раза (для сферической и цилиндрической модели формы частиц), а концентрации крупных уменьшаются (для цилиндрической модели формы), что можно также рассматривать, как подтверждение перераспределения материала частиц между группами размеров. Это соответствует изменению гистограммы числа регистраций радиусов частиц на вторые сутки.

Сопоставление концентраций частиц их размерам позволило получить диаграмму соответствия концентраций частиц их размерам в двойном логарифмическом масштабе. В диапазоне размеров от 1 до 300 нм диаграммы соответствия для цилиндрической и сферической формы частиц практически совпадали и связь между логарифмом концентраций и логарифмом размеров оказалась близкой к линейной. В диапазоне размеров свыше 300 нм для сферической модели формы частиц наблюдался большой разброс значений концентраций. Такой разброс может быть связан с эффектом случайного смещения регистрируемого размера частиц в минимумы  $G^2(\theta, r)$  или с тем, что реальные частицы с такими размерами имеют форму, близкую к цилиндрической. Для цилиндрической модели диаграмма соответствия во всем диапазоне регистрируемых размеров имеет вид, близкий к линейному.

Сравнение диаграмм соответствия, полученных для образцов неразбавленной размороженной плазмы крови и этой же плазмы, разбавленной в 10 и 100 раз, показало адекватность применения приближения РГД для расчета концентраций и формулы Стокса-Эйнштейна для определения гидродинамических радиусов частиц из времени корреляции.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе были получены следующие основные результаты:

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 -  $(3\pm 1)$  нм,  $(25\pm 6)$  нм,  $(126\pm 30)$  нм и  $(2000\pm 700)$  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.

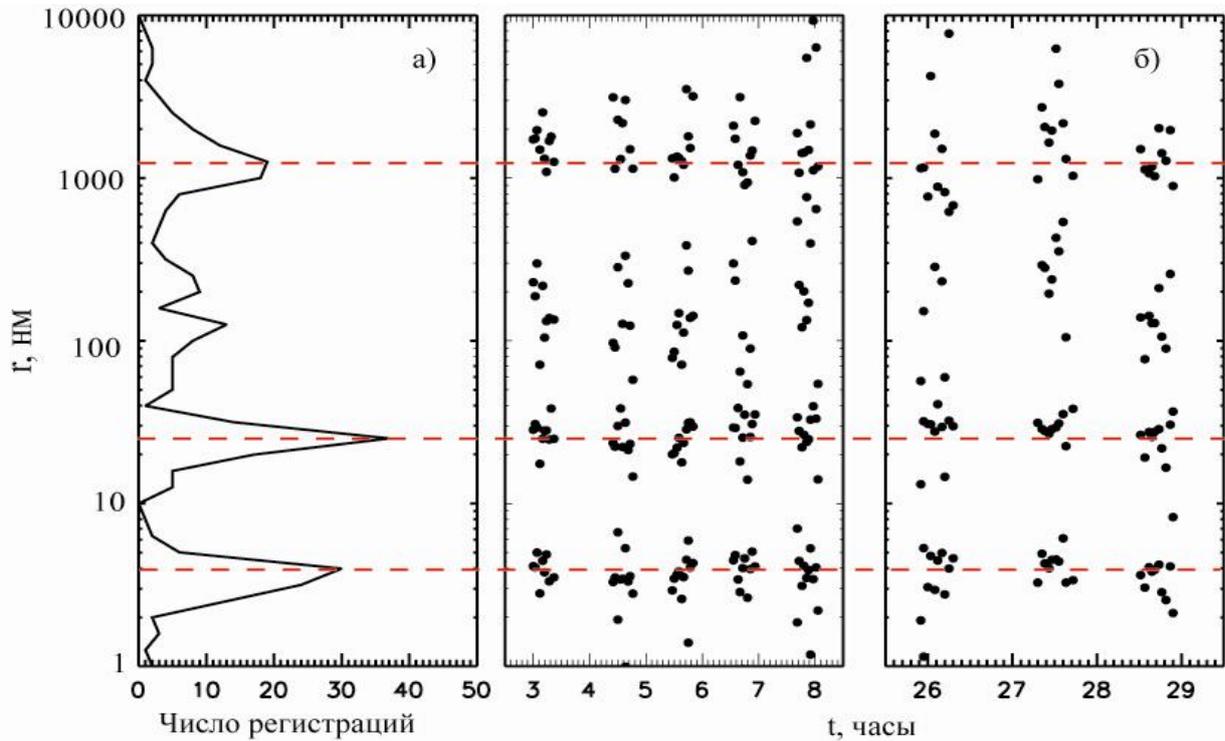
5) Обнаружена связь между концентрациями частиц  $N_p$  и их размерами  $r$ , выражаемая эмпирической формулой:  $\log N_p = a \log r + b$ , где  $a = -3.99\pm 0.09$ . Данное соотношение с указанной величиной  $a$  выполняется для сферической и

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.

б) 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 -  $-3.98 \pm 0.16$ , для разбавленного в 10 раз -  $-3.91 \pm 0.07$ , для разбавленного в 100 раз -  $-4.03 \pm 0.05$ ).

## ПРИЛОЖЕНИЕ 1

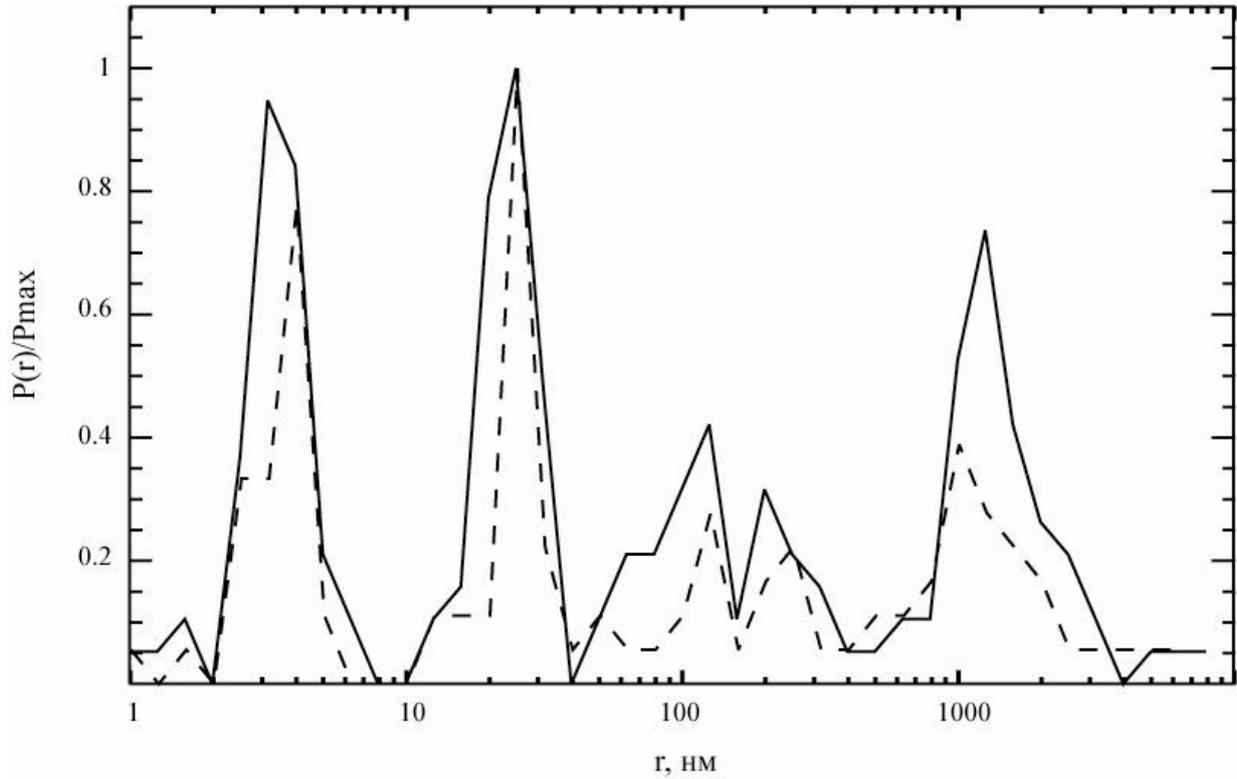
Данные о размерах и концентрациях частиц в плазме крови донора мужского пола  
73 лет



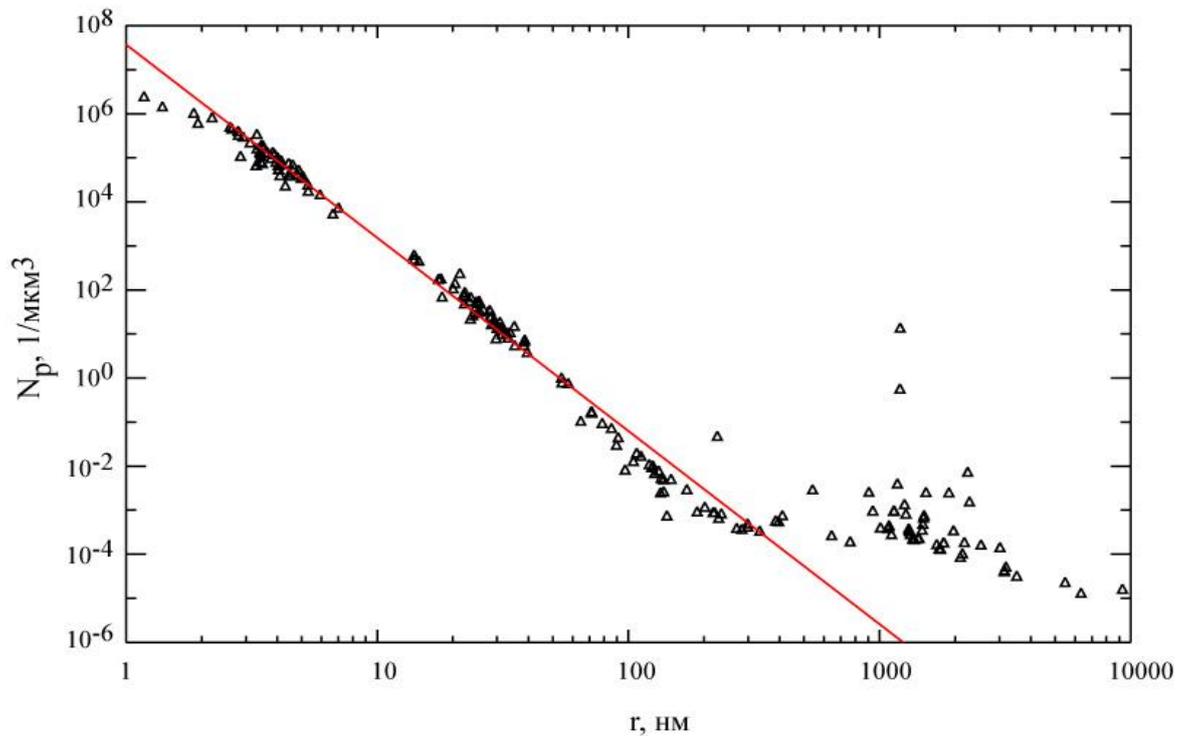
**Рис.1.** а) гистограмма числа регистраций размеров частиц; б) временной ход размеров частиц  
(донор мужского пола, 73 лет)

**Табл. 1.** Величины, характеризующие гистограмму числа регистраций размеров частиц, представленную на рис. 1а

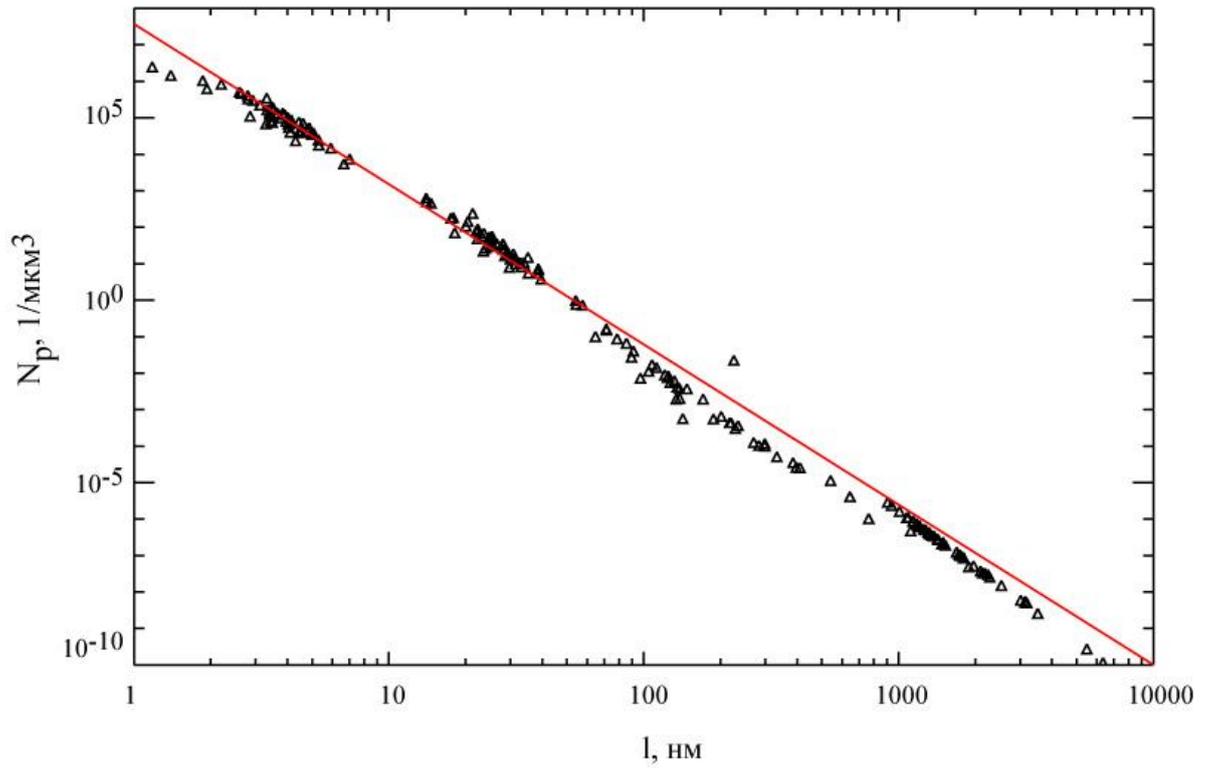
Номер пика	Средний по пику радиус	СКО	Положение максимума пика	Ширина на полувысоте
1	3.0	0.5	4	1
2	26	3	25	5
3	160	55	125	100
4	1310	260	1260	520



**Рис.2.** Нормированные гистограммы числа регистраций размеров частиц, полученные в 4-часовой промежуток времени через 3 и 25 часов после взятия крови из организма



**Рис.3.** График соответствия концентраций частиц их размерам в двойном логарифмическом масштабе, полученный для сферической модели формы частиц



**Рис.4.** График соответствия концентраций частиц их длине в двойном логарифмическом масштабе, полученный для цилиндрической формы

## **БЛАГОДАРНОСТИ**

Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю Л.Л. Чайкову, руководителю отделения Оптики А.В. Масалову, а также сотрудникам лаборатории «Нелинейной оптики и рассеяния света» А.Р. Зарицкому, И.С. Бурханову, С.В. Кривохиже и лаборатории «Рентгеновской астрономии Солнца» А.С. Кириченко.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Петрова Г.П. et al. Метод рэлеевского рассеяния в диагностике онкологических заболеваний. // В сб. науч. тр. Медицинская физика. 2002. P. 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  $\gamma$ -globulin molecules in different ratio modeling blood serum // Laser Phys. 2009. Vol. 19, № 6. P. 1303–1307.
5. Папок 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. P. 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. P. 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. Климов А.Н., Шмелев Г.Е., Носкин В.А. Изменение распределения по размерам липопротеидов плазмы крови человека // Биофизика. 1982. Vol. 27, № 3. P. 458–461.
13. Lawrie A.S. et al. Microparticle sizing by dynamic light scattering in fresh-frozen plasma. // *Vox Sang.* 2009. Vol. 96, № 3. P. 206–212.
14. Smoluchowski M. Zur kinetischen Theorie der Brownschen Molekularbewegung und der Suspensionen // *Ann. Phys.* 1906. Vol. 326, № 14. P. 756–780.
15. Einstein A. Zur Theorie der Brownschen Bewegung // *Ann. Phys.* 1906. Vol. 324, № 2. P. 371–381.
16. Лопатин В.Н. et al. Методы светорассеяния в анализе дисперсных биологических сред. Москва: Физматлит, 2004.
17. Van de Hulst H.C. *Light Scattering by Small Molecules.* New York: Wiley, 1957.
18. Rayleigh J.W.S. No Title // *Proc. R. Soc. London.* 1911. Vol. A84. P. 25.
19. Лебедев А.Д. et al. Лазерная корреляционная спектроскопия в биологии. Киев: Наук. думка, 1987. P. 256.
20. Cummins H.Z., Pike E.R. *Photon correlation and light beating spectroscopy.* New York: Plenum Press, 1974. P. 504.
21. <http://www.photocor.com/download/dynals/dynals-white-paper.htm> [Online].
22. 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.
23. 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.
24. Maslova M.N. et al. Study of the effect of the degradation and aggregation processes on the mean sizes of the blood plasma particles by dynamic light scattering // 5th EMBO Meet. *Adv. life Sci.* Amsterdam: Elsevier, 2013. Vol. 106, № 2. P. 457a – 458a.
25. Маслова М.Н., Зарицкий А.Р., Чайков Л.Л. 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.

26. 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.
27. 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.
28. Pecora, B. J. Berne R. *Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics*. New York: Wiley, 1976.
29. Pecora B.J. *Dynamic light scattering: Applications of Photon Correlation spectroscopy*. New York and London: Plenum Press, 1985.
30. Murphy R. Static and dynamic light scattering of biological macromolecules: what can we learn? // *Curr. Opin. Biotechnol.* 1997. Vol. 8, № 1. P. 25–30.
31. Arzenšek D. *Dynamic light scattering and application to proteins in solutions*. 2010.
32. Ghosh S., Reed W.F. New characteristic signatures from time-dependent static light scattering during polymer depolymerization, with application to proteoglycan subunit degradation // *Biopolymers*. 1995. Vol. 35, № 5. P. 435–450.
33. Burchard W. Static and dynamic light scattering from branched polymers and biopolymers // *Adv. Polym. Sci.* 1983. Vol. 48. P. 1–124.
34. Fishman D.M., Patterson G.D. Light scattering studies of supercoiled and nicked DNA. // *Biopolymers*. 1996. Vol. 38, № 4. P. 535–552.
35. Ahrer K. et al. Analysis of aggregates of human immunoglobulin G using size-exclusion chromatography, static and dynamic light scattering. // *J. Chromatogr. A*. 2003. Vol. 1009, № 1-2. P. 89–96.
36. Jedziniak J.A. et al. On the presence and mechanism of formation of heavy molecular weight aggregates in human normal and cataractous lenses // *Exp. Eye Res.* 1973. Vol. 15, № 2. P. 185–192.
37. Петрова Г.П., Петрусевич Ю.М., Тен Д.И. Образование дипольных комплексов в растворах белков с малой концентрацией ионов тяжелых металлов: диагностика методом лазерного светорассеяния // *Квантовая электроника*. 2002. Vol. 30, № 10. с. 897–901.
38. Calmettes P., Cser L., Rajnavölgyi E. Temperature and pH dependence of immunoglobulin G conformation. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1991. Vol. 291, № 2. P. 277–283.

39. Andries C., Clauwaert J. Photon correlation spectroscopy and light scattering of eye lens proteins at high concentrations. // *Biophys. J. Elsevier*, 1985. Vol. 47, № 5. P. 591–605.
40. Фабелинский И.Л. Молекулярное рассеяние света. Москва: Наука, 1965. 511 с.
41. Smoluchowski M. Molekular-kinetische Theorie der Opaleszenz von Gasen im kritischen Zustande, sowie einiger verwandter Erscheinungen // *Ann. Phys.* 1908. Vol. 25. P. 205–226.
42. Einstein A. Theorie der Opeleszenz von homogenen Flussigkeiten und Flussikeitsgemischen in der Nähe des kritischen Zustandes // *Ann. Phys.* 1910. Vol. 33, № 33. P. 1275.
43. Pecora R. Doppler Shifts in Light Scattering from Pure Liquids and Polymer Solutions // *J. Chem. Phys.* 1964. Vol. 40, № 6. P. 1604.
44. Brillouin L. Diffusion de la lumiere par un corps transparent homogene // *C. R. Seances Acad. Sci.* 1914. Vol. 158, № 1331. P. 34.
45. Brillouin L. Diffusion de la lumiere et des rayons X par un corps transparent: Influence de l'agitation thermique. // *Ann. Phys.* 1922. Vol. 17, № 88. P. 122.
46. Камминс Г., Пайк Э. Спектроскопия оптического смешения и корреляция фотонов. Москва: Мир, 1978. P. 584.
47. Palberg T. et al. Super-heterodyne light scattering on interacting colloidal suspensions: theory and experiment // *Eur. Lett.* 2004. Vol. 66, № 291.
48. Горелик Г.С. О возможности малоинерционного фотометрирования и демодуляционного анализа света // *ДАН СССР.* 1947. Vol. 57, № 1. P. 45–47.
49. Forrester A.T., Gumundsen R.A. Photoelectric mixing of incoherent light // *Phys. Rev.* 1995. Vol. 90, № 6. P. 1961–1700.
50. Clark N.A., Lunachek J.H., Benedek G.B. A study of Brownian Motion Using Light Scattering // *Am. J. Phys.* 1970. Vol. 38, № 6. P. 575–585.
51. Koppel D.E. Analysis of Macromolecular Polydispersity in Intensity Correlation Spectroscopy: The Method of Cumulants // *J. Chem. Phys.* 1972. Vol. 57, № 11. P. 4814.
52. Frisken B.J. Reviziting the method of cumulants for the analysis of dynamic light-scattering data // *Appl. Opt.* 2001. Vol. 40, № 24. P. 4087–4091.

53. Provencher S.W. CONTIN: A general purpose constrained regularization program for inverting noisy linear algebraic and integral equations // *Comput. Phys. Commun.* 1982. Vol. 27, № 3. P. 229–242.
54. Provencher S.W. A constrained regularization method for inverting data represented by linear algebraic or integral equations // *Comput. Phys. Commun.* 1982. Vol. 27, № 3. P. 229–242.
55. Левтов В.А., Реригер С.А., Шадрина Н.Х. Реология крови. Москва: Медицина, 1982, 270 с.
56. Шмидт Р., Тевс Г. Физиология человека. Москва: Мир, 2005.
57. <http://www.polnaja-jenciklopedija.ru/biologiya/sostav-plazmy-krovi.html> [Online].
58. Марри Р. et al. Биохимия человека. Москва: Мир, 2003.
59. Zhou M. et al. An investigation into the human serum “interactome”. // *Electrophoresis.* 2004. Vol. 25, № 9. P. 1289–1298.
60. Atmeh R., Arafa I., Al-Khateeb M. Albumin aggregates: hydrodynamic shape and physico-chemical properties // *Jordan J. Chem.* 2007. Vol. 2, № 2. P. 169–182.
61. Chicea D.A.N., Chicea R., Chicea L.M. HSA Particle size characterization by AFM // *Rom. Reports Phys.* 2013. Vol. 65, № 1. P. 178–185.
62. Kiselev M.A. et al. The Size of a human serum albumin molecule in solution // *Biofizika.* 2000. Vol. 46, № 3. P. 423–427.
63. Hushcha T.O., Luik A.I., Naboka Y.N. Conformation changes of albumin in its interaction with physiologically active compounds as studied by quasi-elastic light scattering spectroscopy and ultrasonic method. // *Talanta.* 2000. Vol. 53, № 1. P. 29–34.
64. Luik A.I. et al. Study of human serum albumin structure by dynamic light scattering: two types of reactions under different pH and interaction with physiologically active compounds // *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 1998. Vol. 54, № 10. P. 1503–1507.
65. Мосолов В.В. Протеолитические ферменты. Москва: Наука, 1971. 404 с.
66. Wasilewska M., Adamczyk Z., Jachimska B. Structure of fibrinogen in electrolyte solutions derived from dynamic light scattering (DLS) and viscosity measurements. // *Langmuir.* American Chemical Society, 2009. Vol. 25, № 6. P. 3698–3704.

67. Березов, Т. Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия: Учебник. 2nd ed. / ed. Дебова С.С. Москва, 1990. 528 с.
68. Brien T.G. Human corticosteroid binding globulin. // *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 1981. Vol. 14. P. 193–212.
69. Scanu A.M., Vitello L., Deganello S. Application of physical methods to the study of serum lipoproteins. // *CRC Crit. Rev. Biochem*. 1974. Vol. 2, № 2. P. 175–196.
70. Austin M.A. et al. Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. // *JAMA*. 1988. Vol. 260, № 13. P. 1917–1921.
71. Austin M.A. et al. Prospective Study of Small LDLs as a Risk Factor for Non Insulin Dependent Diabetes Mellitus in Elderly Men and Women // *Circulation*. Lippincott Williams & Wilkins, 1995. Vol. 92, № 7. P. 1770–1778.
72. Sakurai T. et al. Measurement of lipoprotein particle sizes using dynamic light scattering. // *Ann. Clin. Biochem*. 2010. Vol. 47, № Pt 5. P. 476–481.
73. Davi S.K. Application of a laser self-beat spectroscopic technique to the study of solutions of human plasma lipoproteins // *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2*. The Royal Society of Chemistry, 1974. Vol. 70. P. 700.
74. Wolf P. The Nature and Significance of Platelet Products in Human Plasma // *Br. J. Haematol*. 1967. Vol. 13, № 3. P. 269–288.
75. Rubin O. et al. Pre-analytical and methodological challenges in red blood cell microparticle proteomics // *Talanta*. 2010. Vol. 82. P. 1–8.
76. Yuana Y., Bertina R.M., Osanto S. Pre-Analytical and analytical issues in the analysis of blood microparticles // *Thromb. Haemost.* 2010. Vol. 105, № 3. P. 396–408.
77. Ashcroft B.A. et al. Determination of the size distribution of blood microparticles directly in plasma using atomic force microscopy and microfluidics. // *Biomed. Microdevices*. 2012. Vol. 14, № 4. P. 641–649.
78. Lecompte T., Toussaint-Hacquard M., Devignes J. Anticoagulants drugs direct trombin inhibitors // *Ann. Fr. Anesth. Reanim*. 2009. Vol. 28. P. S3–S7.
79. Hoover-Plow J. Does plasmin have anticoagulant activity? // *Vasc. Health Risk Manag.* 2010. Vol. 6. P. 199–205.
80. Yi J., Kim C., Gelfand C.A. Inhibition of Intrinsic Proteolytic Activities Moderates Preanalytical Variability and Instability of Human Plasma research articles // *J. Proteome Res*. 2007. Vol. 6, № 5. P. 1768–1781.

81. Yi J. et al. Intrinsic Peptidase Activity Causes a Sequential Multi-Step Reaction (SMSR) in Digestion of Human Plasma Peptides research articles // *J. Proteome Res.* 2008. Vol. 7, № 12. P. 5112–5118.
82. Moon H.T. et al. A novel formulation for controlled release of heparin-DOCA conjugate dispersed as nanoparticles in polyurethane film. // *Biomaterials.* 2001. Vol. 22, № 3. P. 281–289.
83. Mulloy B. et al. N.m.r. and molecular-modelling studies of the solution conformation of heparin. // *Biochem. J.* Portland Press Ltd., 1993. Vol. 293 (Pt 3). P. 849–858.
84. Fluhr H. et al. The molecular charge and size of heparins determine their impact on the decidualization of human endometrial stromal cells. // *Mol. Hum. Reprod.* 2011. Vol. 17, № 6. P. 354–359.
85. Chuang C.-K. et al. Effects of Anticoagulants in Amino Acid Analysis: Comparisons of Heparin, EDTA, and Sodium Citrate in Vacutainer Tubes for Plasma Preparation // *Clin. Chem.* 1998. Vol. 44, № 5. P. 1052–1056.
86. Sharma M., Luthra-Guptasarma M. Degradation of proteins upon storage at near-neutral pH: indications of a proteolytic/gelatinolytic activity associated with aggregates. // *Biochim. Biophys. Acta.* Elsevier B.V., 2009. Vol. 1790, № 10. P. 1282–1294.
87. Roberts C.J. Non-Native Protein Aggregation Kinetics // *Biotechnol. Bioeng.* 2007. Vol. 98, № 5. P. 927–938.
88. Weiss W.F., Young T.M., Roberts C.J. Principles, Approaches, and Challenges for Predicting Protein Aggregation Rates and Shelf Life. 2009. Vol. 98, № 4. P. 1246–1277.
89. Panyukov Y. et al. The study of amorphous aggregation of tobacco mosaic virus coat protein by dynamic light scattering. // *Biophys. Chem.* 2007. Vol. 127, № 1-2. P. 9–18.
90. Schüler J. et al. Thermally induced aggregation of human transferrin receptor studied by light-scattering techniques. // *Biophys. J.* 1999. Vol. 77, № 2. P. 1117–1125.
91. Bettelheim F.A. et al. The mode of chaperoning of dithiothreitol-denatured alpha-lactalbumin by alpha-crystallin. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999. Vol. 261, № 2. P. 292–297.

92. Militello V. et al. Aggregation kinetics of bovine serum albumin studied by FTIR spectroscopy and light scattering. // *Biophys. Chem.* 2004. Vol. 107, № 2. P. 175–187.
93. Shiraki K. et al. Biophysical effect of amino acids on the prevention of protein aggregation. // *J. Biochem.* 2002. Vol. 132, № 4. P. 591–595.
94. Reddy K R.C. et al. L-Arginine increases the solubility of unfolded species of hen egg white lysozyme. // *Protein Sci.* 2005. Vol. 14, № 4. P. 929–935.
95. Arakawa T., Tsumoto K. The effects of arginine on refolding of aggregated proteins: not facilitate refolding, but suppress aggregation. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. Vol. 304, № 1. P. 148–152.
96. Artemova N.V. et al. Acceleration of protein aggregation by amphiphilic peptides: Transformation of supramolecular structure of the aggregates // *Biotechnol. Prog.* 2011. Vol. 27, № 2. P. 359–368.
97. Artemova N.V. et al. Opioid peptides derived from food proteins suppress aggregation and promote reactivation of partly unfolded stressed proteins. // *Peptides.* 2010. Vol. 31. P. 332– 338.
98. Leal M.C. et al. Cerebral proteolysis of amyloid- $\beta$  peptide: relevance of insulin-degrading enzyme in Alzheimer's disease // *Medicina (B. Aires).* 2009. Vol. 69. P. 466–472.
99. Krysmann M.J. et al. Self-assembly of Peptide nanotubes in an organic solvent. // *Langmuir.* American Chemical Society, 2008. Vol. 24, № 15. P. 8158–8162.
100. Castelletto V., Hamley I.W., Harris P.J.F. Self-assembly in aqueous solution of a modified amyloid beta peptide fragment. // *Biophys. Chem.* 2008. Vol. 138, № 1-2. P. 29–35.
101. Stefani M., Dobson C.M. Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. // *J. Mol. Med. (Berl).* 2003. Vol. 81. P. 678–699.
102. Sunde M., Blake C. The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and X-ray diffraction. // *Adv. Protein Chem.* 1997. Vol. 50. P. 123–159.
103. <http://www.izon.com/products/comparative-technologies/> [Online].
104. Boren, K.F. and Hafmen P.R. *Absorption and Scattering of Light by Small Particles.* New York: Wiley, 1983.

105. <http://pssnicomp.com/applications/proteins/proteins-multi-angle-dls-helps-measure-protein-aggregation/> [Online].
106. Маслова М.Н., Бурханов И.С. 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.
107. 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.
108. Neugebauer T. Berechnung der Lichtzerstreuung von Fadenkettenlösungen // Ann. Phys. 1943. Vol. 42, № 7-8. P. 509–533.
109. Barber P.W., Wang D.S. Rayleigh-Gans-Debye applicability to scattering by nonspherical particles // Appl. Opt. 1979. Vol. 18, № 7. P. 797–803.