

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ Н.Г.ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**


Кафедра оптики и биофотоники

**Исследование оптических свойств гликированного и негликированного
гемоглобина методом спектроскопии комбинационного рассеяния**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 4082 группы
направления 12.03.04 «Биотехнические системы и технологии»
Института физики
Акчуриной Татьяны Александровны

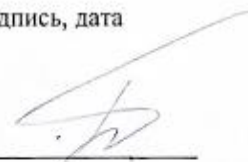
Научный руководитель
зав. кафедрой оптики и биофотоники
д.ф.-м.н., чл.-корр. РАН, профессор



В.В. Тучин

подпись, дата

Зав. Кафедрой оптики и биофотоники
ф.-м.н., чл.-корр. РАН, профессор



В.В. Тучин

подпись, дата

Введение

Цель дипломной работы: исследование спектров комбинационного рассеяния растворов гликированного и негликированного гемоглобина и их смеси для выявления характерных особенностей, позволяющих проводить идентификацию гликированной формы гемоглобина.

Анализ современных тенденций развития новейших методов диагностики и лечения в медицине показывает, что в подавляющем большинстве случаев на первое место сегодня выходят методы, минимизирующие инвазивность.

Этим требованием в полной мере отвечают новейшие лазерные методы диагностики, в том числе, спектроскопия комбинационного рассеяния.

Комбинационное рассеяние (КР) света положило начало целому направлению в спектроскопии молекул и кристаллов — спектроскопии комбинационного рассеяния. Этот метод на сегодняшний день является одним из самых мощных методов исследования молекулярных структур.

Преимущества, связанные со специфической природой метода, делают спектрометрию КРС мощным средством анализа и мониторинга химического состава. Каждое соединение имеет свой уникальный спектр КРС.

Основная часть

Комбинационное рассеяние (КР) - это рассеяние света молекулами вещества с изменением частоты излучения (цвета).

Оно обусловлено неупругими столкновениями фотонов с молекулами (или ионами), в ходе которых они обмениваются энергией. Процесс сопровождается изменением частоты.

Различают следующие виды комбинационного рассеяния:

- 1) спонтанное КР;
- 2) резонансное КР;
- 3) вынужденное КР;
- 4) гиперкомбинационное рассеяние света;
- 5) гигантское КР;
- 6) когерентное антистоксово рассеяние.

Спектроскопия комбинационного рассеяния света (или «рамановская» спектроскопия) - раздел оптической спектроскопии, изучающий взаимодействие монохроматического излучения с веществом, сопровождающееся изменением энергии рассеянного излучения по сравнению с энергией падающего на объект (возбуждающего) излучения. Это лазерная техника, которая обеспечивает быстрый и неинвазивный биохимический анализ без необходимости дополнительных этикеток или маркеров.

Спектроскопия КР широко применяется в биологических исследованиях, начиная с изучения очищенных биологических веществ и кончая исследованиями на уровне отдельных клеток. Данная методика обладает некоторыми характеристиками, делающими ее особенно подходящей для исследования кожи как *in vivo*, так и *in vitro*. Спектроскопия КР дает детальную информацию о молекулярном составе и молекулярных структурах образцов.

Кровь [sanguis (PNA, JNA, BNA)] — жидкая ткань, осуществляющая в организме транспорт химических веществ (в т. ч. кислорода), благодаря

которому происходит интеграция биохимических процессов, протекающих в различных клетках и межклеточных пространствах, в единую систему.

Кровь представляет собой разновидность соединительной ткани и состоит из суспензии форменных элементов (эритроциты, лейкоциты и тромбоциты).

- Эритроциты. Принимают участие в регуляции кислотно - щелочного равновесия и в ряде ферментативных и обменных процессов.
- Лейкоциты – это белые клетки крови. Они выполняют защитную функцию, являясь частью иммунной системы организма.
- Тромбоциты – это кровяные пластинки. Они содержат тромбопластин, являющийся фактором свертывания крови и играющий важную роль в остановке кровотечений.

Эритроциты содержат гемоглобин, который придает им красноватую окраску. Благодаря ему эритроциты участвуют в газообмене: гемоглобин является основным транспортным соединением, участвующим в переносе кислорода и удалении углекислого газа из тканей.

Гемоглобин является сложным железосодержащим глобулярным белком и находится в эритроцитах, способный связывать и обеспечивать перенос кислорода из лёгких в ткани. Различают три вида гемоглобина:

- HbA - гемоглобин, который в основном наблюдается в крови взрослого человека
- HbF - фетальный, который в основном наблюдается в крови плода и детей до трех лет.
- HbP - эмбриональный, который обнаруживается во время раннего эмбриогенеза, с 5 по 18 неделю гестации.

Молекула этого вещества способна вступать в прочную связь не только с кислородом, но и с другими химическими веществами, например, с глюкозой. В этом случае полученное соединение носит название гликозилированный (гликированный) гемоглобин HbA1C. Гликозилированный гемоглобин относится к группе дисгемоглобинов и

образуется в процессе самопроизвольного связывания гемоглобина А с глюкозой, присутствующей в кровотоке.

Глюкоза $C_6H_{12}O_6$ (декстроза) – моносахарид, являющийся универсальным источником энергии для человека. Глюкоза, также называемая сахаром в крови, циркулирует по ней и присоединяется к гемоглобину. Это конечный продукт гидролиза ди – и полисахаридов.

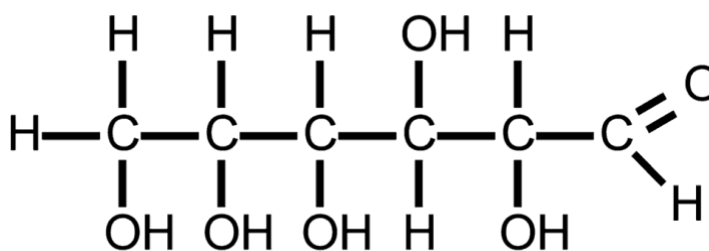


Рис. 1 Структурная формула глюкозы

Гликозилированный гемоглобин образуется в результате неферментативного присоединения глюкозы к N-концевым участкам β -цепей глобина гемоглобина А1 и обозначается как HbA1c. Концентрация HbA1c прямо пропорциональна средней концентрации глюкозы в крови.

Одним из первых применений спектроскопии комбинационного рассеяния было изучение белков. Целью большинства исследований является изучение структуры молекул и изучение функциональных групп, определяющих их биохимическую активность. Из обычного (спонтанного) комбинационного спектра белка можно получить информацию о его структурных характеристиках.

Существуют такие формы гемоглобина

- Оксигемоглобин (HbO₂);
- Дезоксигемоглобин (HbH);
- Карбоксигемоглобин (HbCO);

Следовательно, присоединение и отдача кислорода молекулой гемоглобина сопровождается изменением его структуры, что приводит к изменению спектра поглощения гемоглобина.

Каждая форма гемоглобина характеризуется определенным спектром поглощения, представляющим собой зависимость оптической плотности раствора гемоглобина от длины волны света.

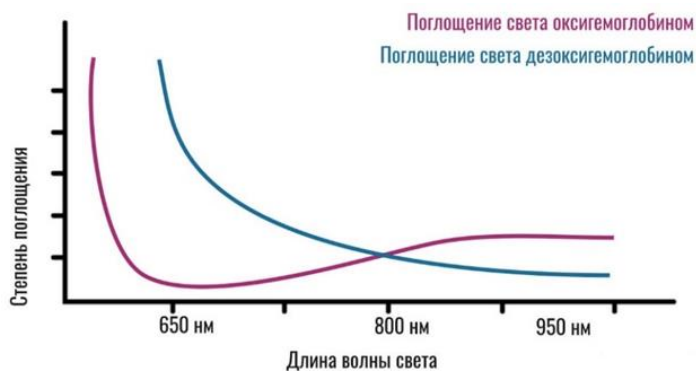


Рис. 2 Спектры поглощения окси- и дезоксигемоглобинов

Эксперименты проводились с растворами гликированного и негликированного гемоглобина и их смеси методом комбинационного рассеяния (КР).

В качестве образцов были взяты 5 видов растворов объемом 1 мл каждый:

1) раствор негликированного гемоглобина (Hb), полученный из лиофилизированного порошка гемоглобина Sigma – ALDRICH и буферного раствора аммония ацетатного $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (1.0 M, Ph 8.1 ± 0.2 , NaN_3 (натрий азид)) с концентрацией 3г/л.

2) раствор гликированного гемоглобина (HbA1c).

Далее, для получения следующих образцов были использованы смеси растворов гликированного (HbA1c) и негликированного (Hb) гемоглобина в пропорциях:

I. 250 мкл гемоглобина (Hb) и 750 мкл гликированного гемоглобина (HbA1c).

II. 500 мкл гемоглобина (Hb) и 500 мкл гликированного гемоглобина (HbA1c).

III. 750 мкл гемоглобина (Hb) и 250 мкл гликированного гемоглобина (HbA1c).

Исследования оптических свойств растворов гликированного (Hb) и негликированного (HbA1c) гемоглобина и их смеси проводились на аппаратном обеспечении, включающего спектрометр OceanOptics QE65000 со спектральным разрешением 10 см^{-1} , диодный лазер с длиной волны 785 нм и энергией 400 МВт, излучающий луч диаметром 5 мм, ручной раманский зонд ($f = 7,5 \text{ мм}$) и компьютер. Схематическая диаграмма портативной системы КР показано на рисунке 3 (а). Детали наконечника с волокнами показаны на рисунке 3 (b).

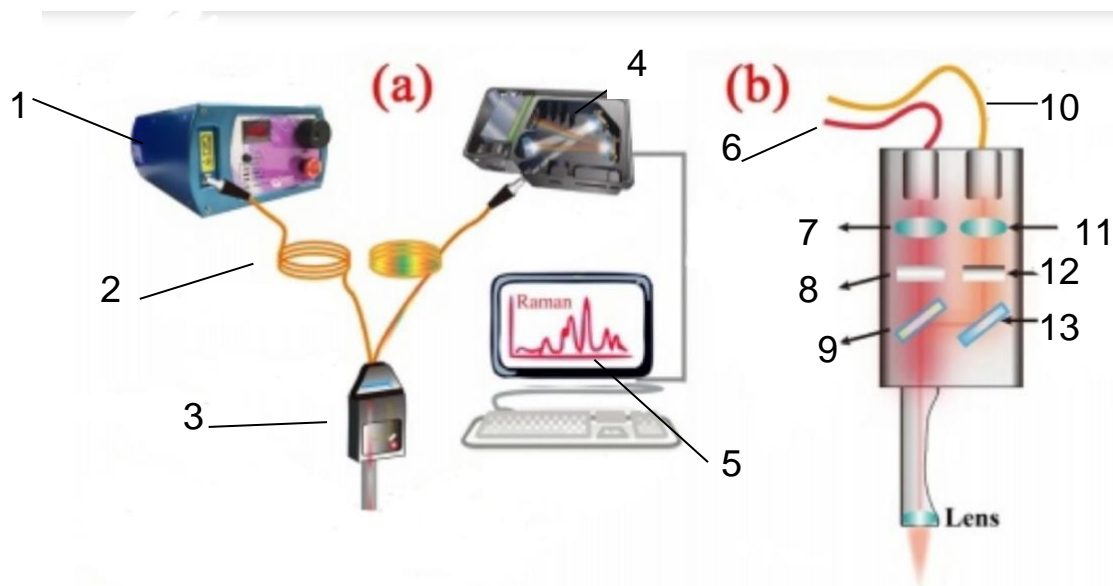


Рис 3. а): 1 – диодный лазер 785 нм, 2 – возбуждающее волокно, 3 – рамановский зонд, 4 – спектрометр QE65000, 5 – компьютер; б): 6 – волокно к лазеру, 7 - коллимирующая линза, 8 – полосовой фильтр, 9 - дихроичное зеркало, 10 – волокно к спектрометру, 11 - фокусирующая линза, 12 - фильтр длинных частот, 13 – зеркало.

Из каждой пробирки поочередно наносили 100 мкл раствора на подложку (в качестве подложки использовали пищевую фольгу) так, чтобы капля была примерно размером с пучок (около 5 мм диаметром). После чего,

подложку помещали под зонд на расстоянии 2,6 см и закрывали от внешних воздействий.

Спектральный сигнал от капли образца, включая разброс КР, был собран зондом и передается на спектрометр через волокно 250 мкм в зонд. Эффективный спектральный диапазон системы составлял 400 до 1800 см⁻¹. Каждое измерение было приобретено в течение 10 с (время интеграции). Для каждого образца измерения проводили 3 раза.

Обработка данных проводилась с помощью программного обеспечения OriginLab и Matlab.

В диапазоне 400 - 1800 см⁻¹ находится большое количество линий, индивидуальных для каждого органического соединения. Это, в основном, область валентных и деформационных колебаний. По наличию или отсутствию конкретных линий в спектре в этом диапазоне можно определить, как само исследуемое вещество, так и его концентрацию в биологическом образце.

На рис. 4 изображен спектр КР гемоглобина до программной обработки.

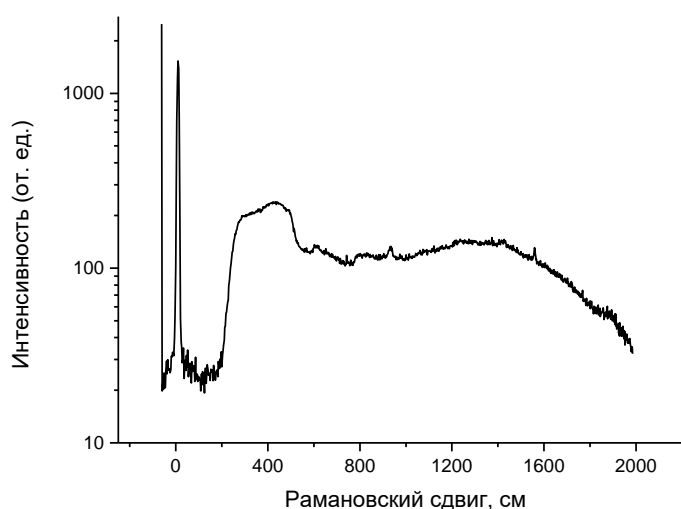


Рис. 4 Спектр КР раствора гемоглобина до программной обработки

На рис. 5 изображены спектры КР растворов гликированного и негликированного гемоглобина, смешанные в различных пропорциях, после программной обработки.

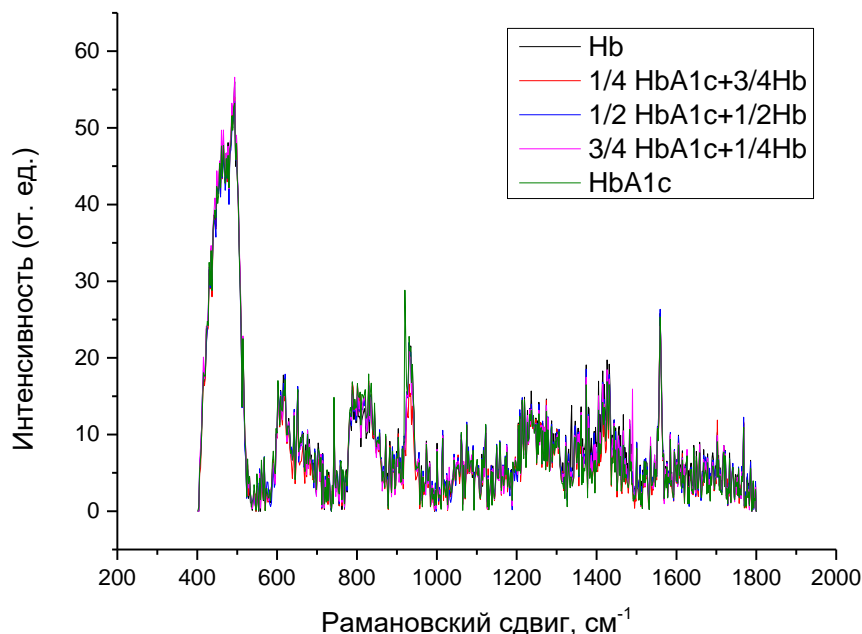


Рис. 5 Спектры КР растворов гликированного и негликированного гемоглобина, смешанные в различных пропорциях, после программной обработки.

На рис. 6 изображен спектр КР растворов гликированного и негликированного гемоглобина в выделенном диапазоне 800 – 825 см⁻¹, где находится большое количество линий, индивидуальных для каждого органического соединения. Здесь наблюдаются наибольшие изменения в диапазоне 810 см⁻¹. Интенсивность растворов на этом участке заметно уменьшается.

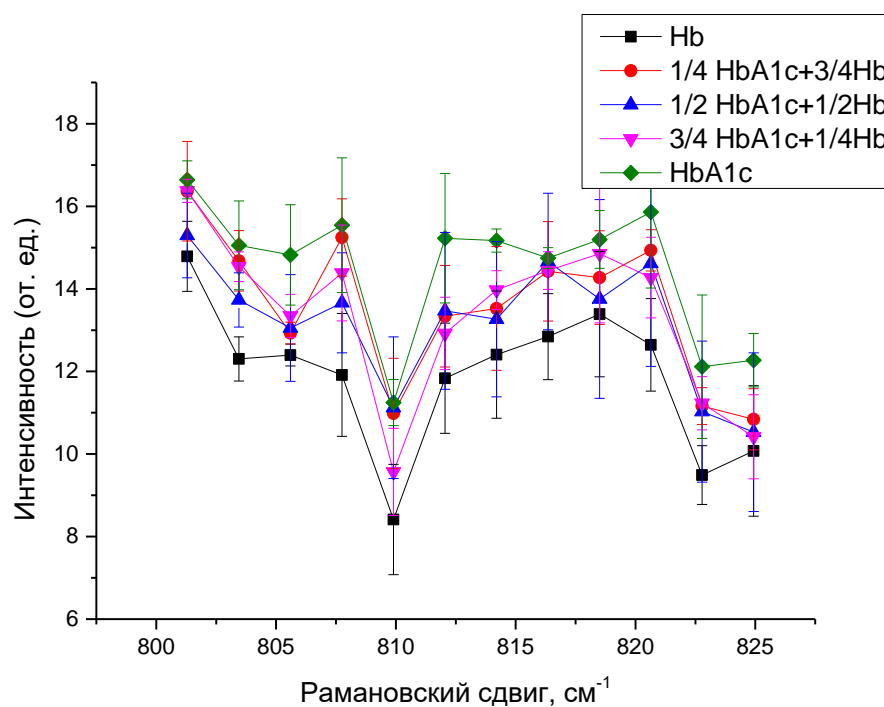


Рис. 6 Выделенный диапазон 800 - 825 см⁻¹ спектра КР растворов гликированного и негликированного гемоглобина.

На рис. 7 изображен спектр КР растворов гликированного и негликированного гемоглобина в выделенном диапазоне 1400 – 1430 см⁻¹. На этом изображении наблюдалось три пика интенсивности в 1405, 1415, 1425 см⁻¹.

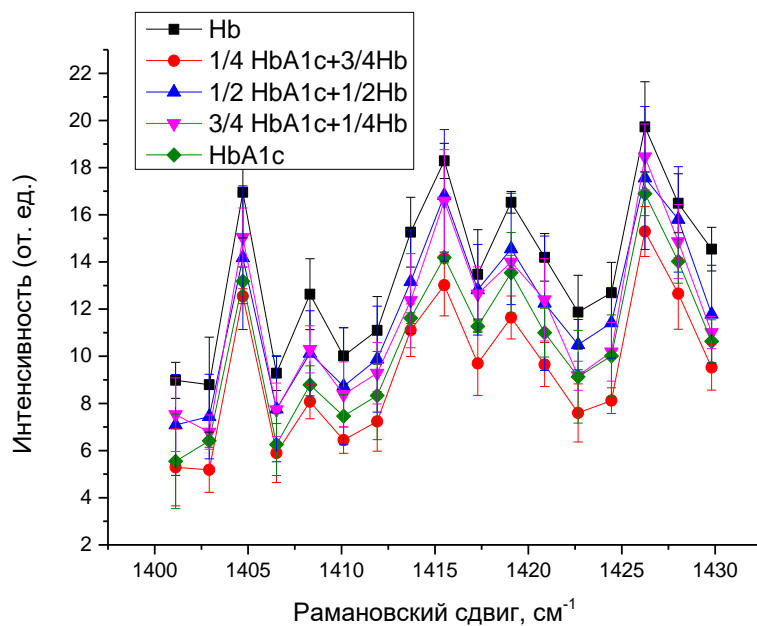


Рис. 7 Выделенный диапазон 1400 - 1430 см⁻¹ спектра КР растворов гликированного и негликированного гемоглобина.

После программной обработки были получены диаграммы интенсивности спектра КР растворов гликированного и негликированного гемоглобина для каждой длины волны в диапазонах 800 – 825 (рис. 8 - 20) и 1400 - 1430 см^{-1} (рис. 21 - 37).

При исследовании можно выявить характерные особенности, позволяющие проводить идентификацию гликированной формы гемоглобина, в диапазоне 800 - 825 см^{-1} . На этом участке видно, что интенсивность раствора гликированного гемоглобина выше, чем у раствора негликированного гемоглобина.

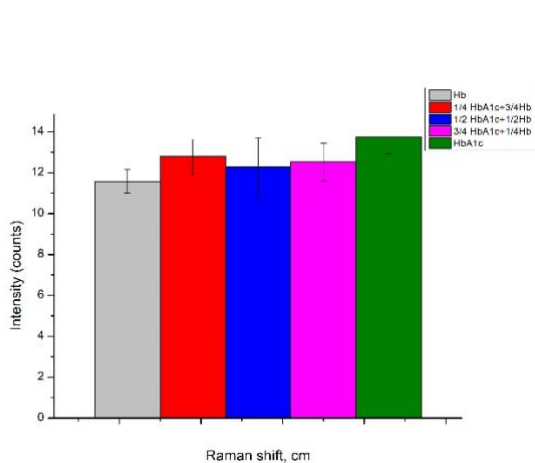


Рис. 8 Интенсивность спектра КР растворов гликированного и негликированного гемоглобина на 800 cm^{-1}

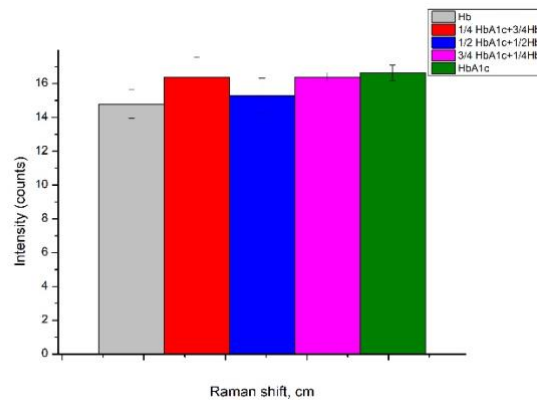


Рис. 9 Интенсивность спектра КР растворов гликированного и негликированного гемоглобина на 801 cm^{-1}

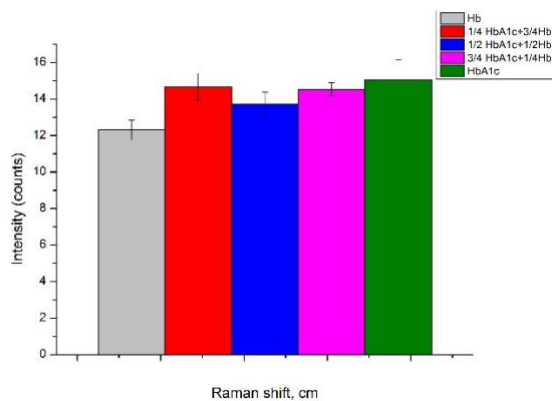


Рис. 10 Интенсивность спектра КР растворов гликированного и негликированного гемоглобина на 803 cm^{-1}

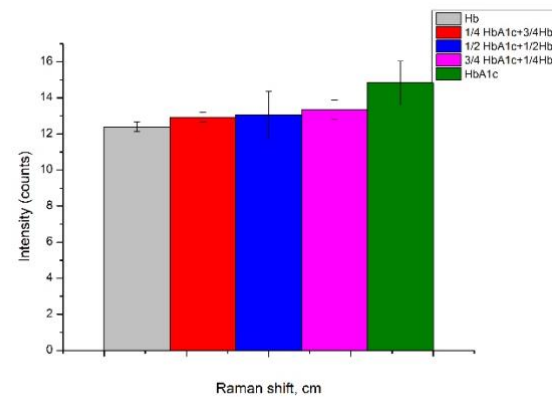


Рис. 11 Интенсивность спектра КР растворов гликированного и негликированного гемоглобина на 805 cm^{-1}

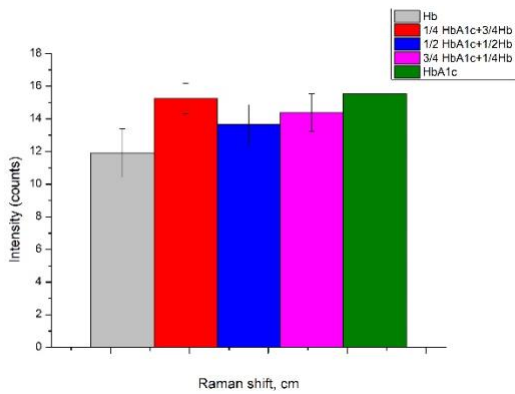


Рис. 12 Интенсивность спектра КР
растворов гликированного и
негликированного гемоглобина на 807-808
 cm^{-1}

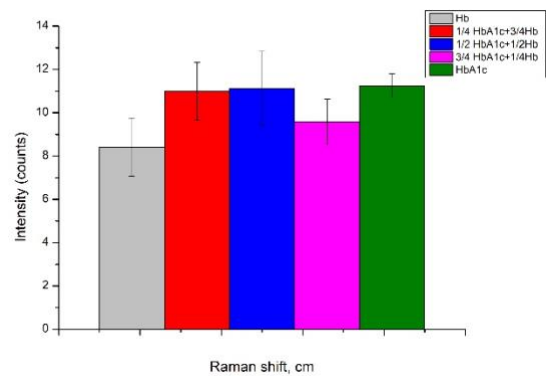


Рис. 13 Интенсивность спектра КР
растворов гликированного и
негликированного гемоглобина на 809-810
 cm^{-1}

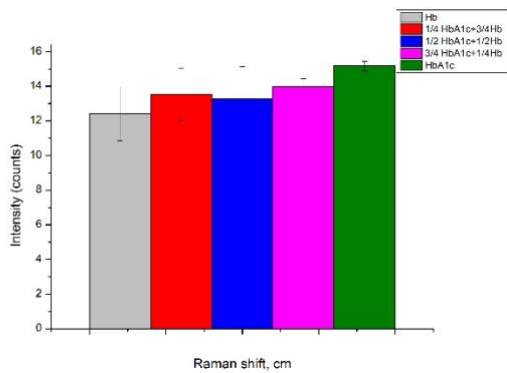


Рис. 14 Интенсивность спектра КР
растворов гликированного и
негликированного гемоглобина на 811-812
 cm^{-1}

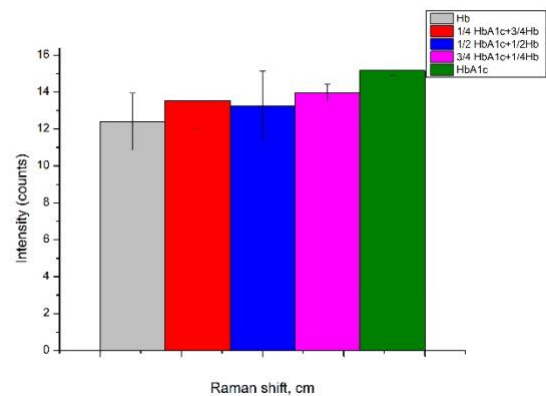


Рис. 15 Интенсивность спектра КР
растворов гликированного и
негликированного гемоглобина на 814 cm^{-1}

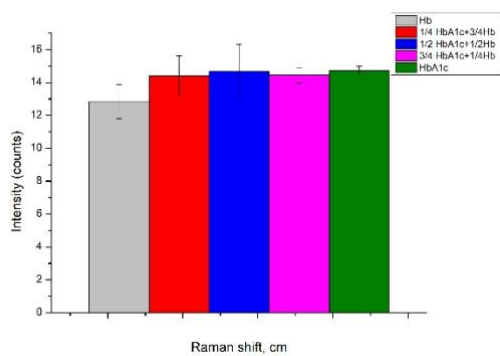


Рис. 16 Интенсивность спектра КР растворов гликированного и негликированного гемоглобина на 816 cm^{-1}

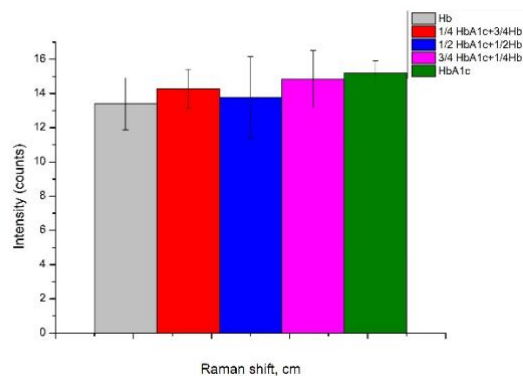


Рис. 17 Интенсивность спектра КР растворов гликированного и негликированного гемоглобина на 818 cm^{-1}

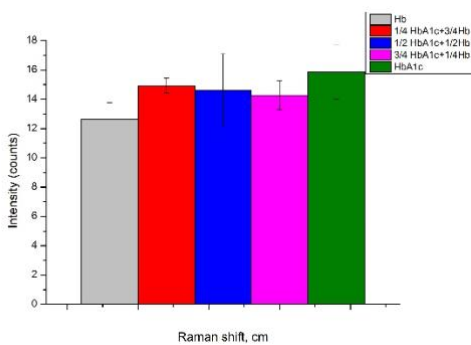


Рис. 18 Интенсивность спектра КР растворов гликированного и негликированного гемоглобина на $820\text{--}821\text{ cm}^{-1}$

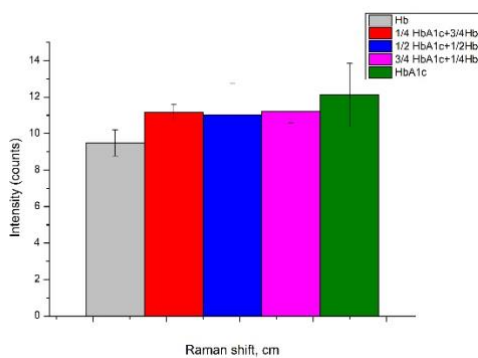


Рис. 19 Интенсивность спектра КР растворов гликированного и негликированного гемоглобина на 822 cm^{-1}

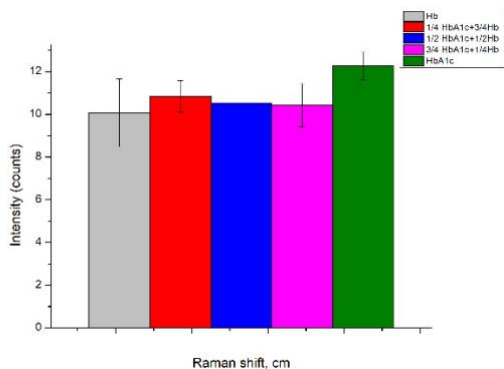


Рис. 20 Интенсивность спектра КР
растворов гликированного и
негликированного гемоглобина на 824-825
 cm^{-1}

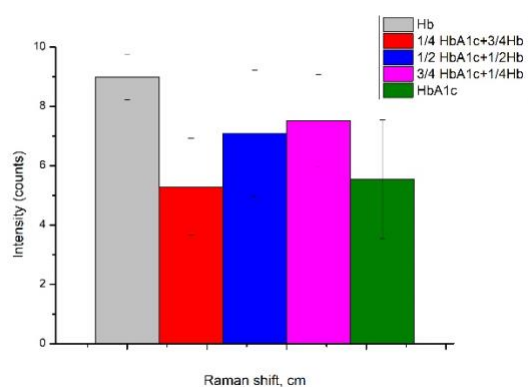


Рис. 21 Интенсивность спектра КР
растворов гликированного и
негликированного гемоглобина на 1400 cm^{-1}

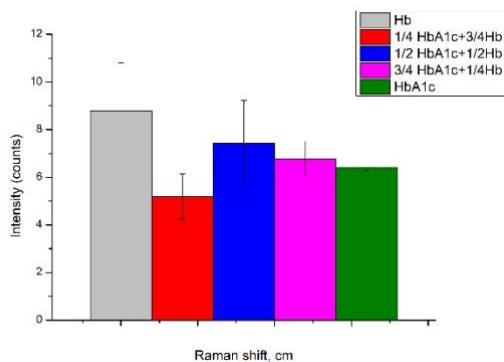


Рис. 22 Интенсивность спектра КР
растворов гликированного и
негликированного гемоглобина на 1402 cm^{-1}

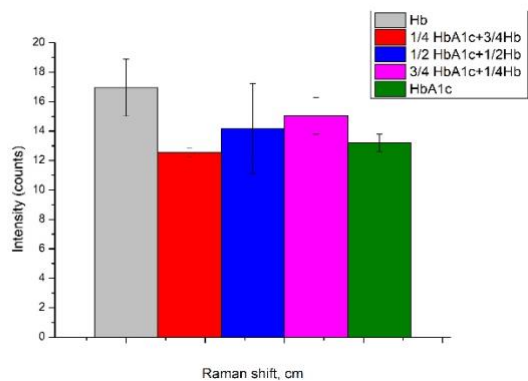


Рис. 23 Интенсивность спектра КР
растворов гликированного и
негликированного гемоглобина на 1404 cm^{-1}

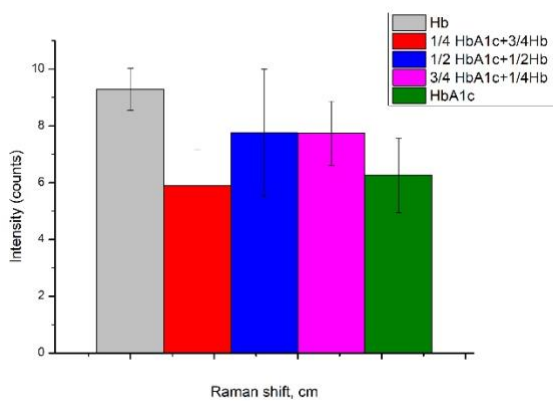


Рис. 24 Интенсивность спектра КР растворов гликированного и негликированного гемоглобина на 1406 см^{-1}

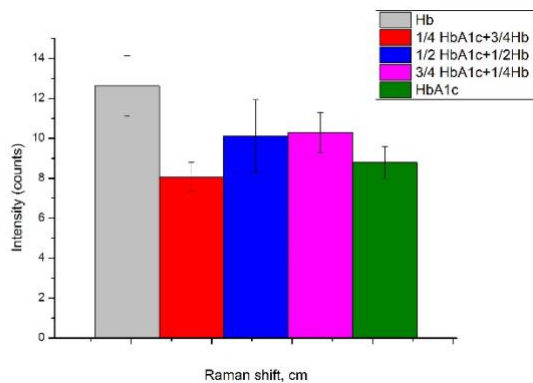


Рис. 25 Интенсивность спектра КР растворов гликированного и негликированного гемоглобина на 1408 см^{-1}

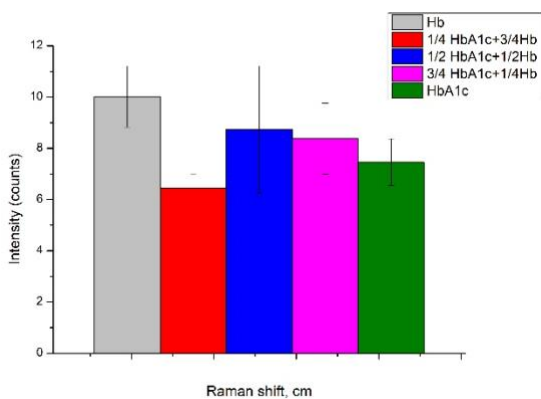


Рис. 26 Интенсивность спектра КР растворов гликированного и негликированного гемоглобина на $1409\text{-}1410\text{ см}^{-1}$

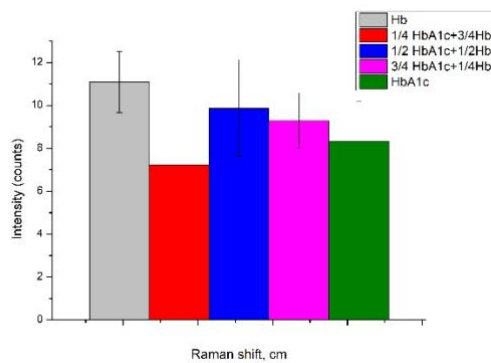


Рис. 27 Интенсивность спектра КР растворов гликированного и негликированного гемоглобина на $1411\text{-}1412\text{ см}^{-1}$

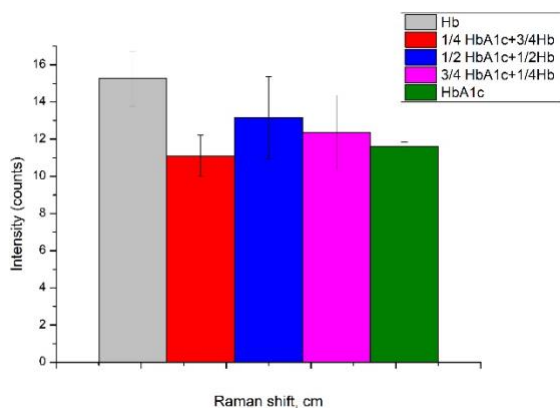


Рис. 28 Интенсивность спектра КР растворов гликированного и негликированного гемоглобина на 1413 см^{-1}

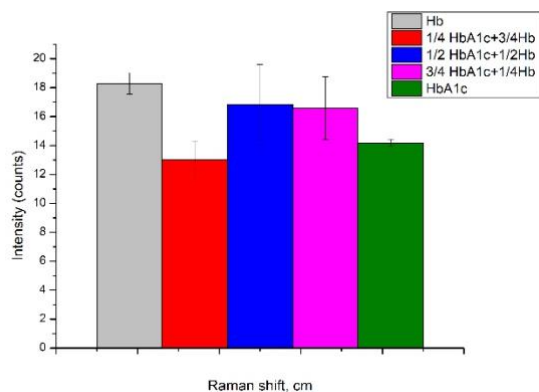


Рис. 29 Интенсивность спектра КР растворов гликированного и негликированного гемоглобина на 1415 см^{-1}

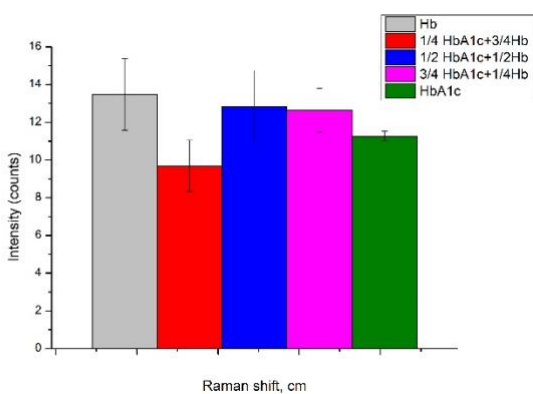


Рис. 30 Интенсивность спектра КР растворов гликированного и негликированного гемоглобина на 1417 см^{-1}

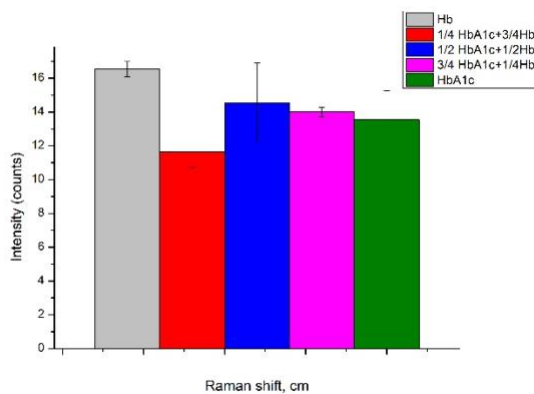


Рис. 31 Интенсивность спектра КР растворов гликированного и негликированного гемоглобина на 1419 см^{-1}

1

1

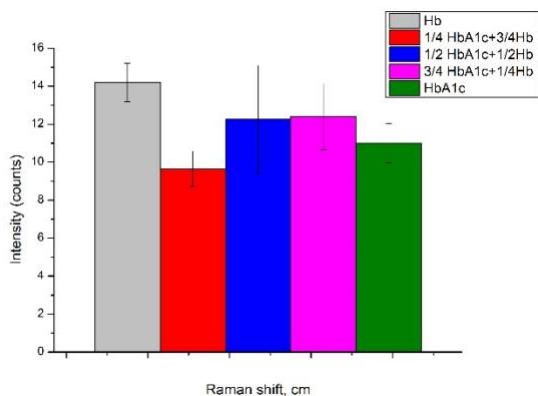


Рис. 32 Интенсивность спектра КР
растворов гликированного и
негликированного гемоглобина на 1420 см⁻¹

1

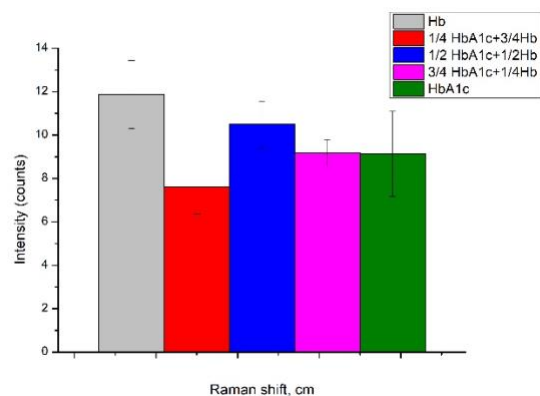


Рис. 33 Интенсивность спектра КР
растворов гликированного и
негликированного гемоглобина на 1422 см⁻¹

1

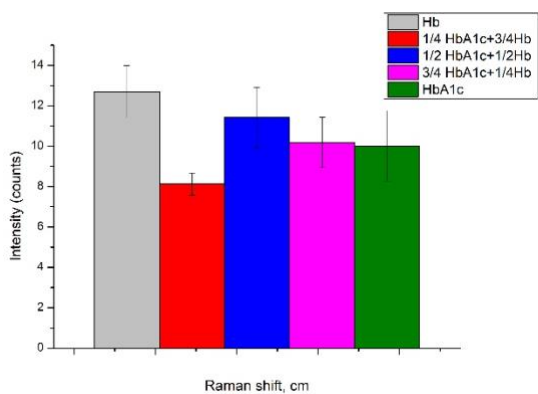


Рис. 34 Интенсивность спектра КР
растворов гликированного и
негликированного гемоглобина на 1424 см⁻¹

1

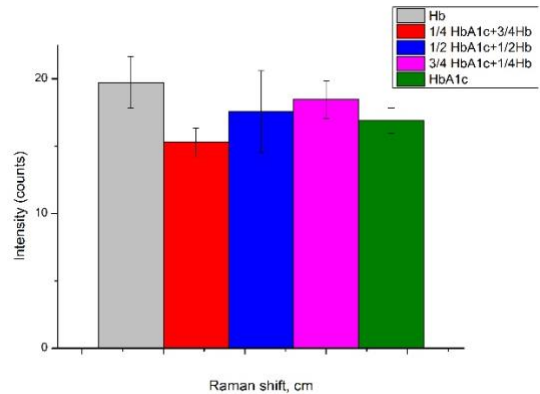


Рис. 35 Интенсивность спектра КР
растворов гликированного и
негликированного гемоглобина на 1426 см⁻¹

1

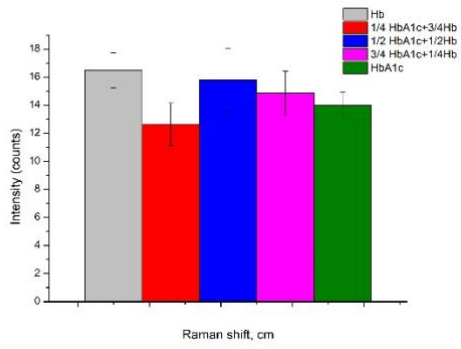


Рис. 36 Интенсивность спектра КР
растворов гликированного и
негликированного гемоглобина на 1428 см⁻¹

1

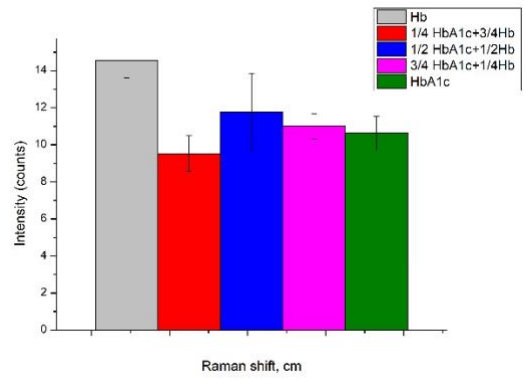


Рис. 37 Интенсивность спектра КР
растворов гликированного и
негликированного гемоглобина на 1430 см⁻¹

1

Заключение

В настоящей работе проведено исследование спектров комбинационного рассеяния (КР) растворов гликированного и негликированного гемоглобина и их смеси для выявления характерных особенностей, позволяющих проводить идентификацию гликированной формы гемоглобина.

Проведенный нами исследования показали, что выявления характерных особенностей, позволяющих проводить идентификацию гликированной формы гемоглобина возможны в диапазоне $800 - 825 \text{ см}^{-1}$.

В выделенном $800 - 825 \text{ см}^{-1}$ спектра КР растворов гликированного и негликированного гемоглобина наибольшие изменения наблюдаются в диапазоне 810 см^{-1} . Исходя из данных диаграмм, высокая интенсивность спектра КР наблюдалась у раствора гликированного гемоглобина именно в этом диапазоне. В диапазоне $1400 - 1430 \text{ см}^{-1}$ спектра КР образцов наблюдалось три пика интенсивности в $1405, 1415, 1425 \text{ см}^{-1}$.

Визуальный анализ полученных рисунков позволяет выявить отличие спектров КРС растворов гликированного и негликированного гемоглобина и их смеси.

Спектроскопия КР — это яркий пример метода, который обретает вторую жизнь с появлением новых технических возможностей. Благодаря различным модификациям КР, которые позволяют значительно усиливать сигнал, появилась возможность исследовать конформацию различных биомолекул в живых клетках и органах, что недоступно другим методам. А это значит, что с помощью КР мы каждый раз получаем принципиально новые знания о живой системе.