

УДК 535.36:53.088:612.11:612.398.1

## СООТНОШЕНИЕ РАЗМЕРОВ И КОНЦЕНТРАЦИЙ ЧАСТИЦ В НЕРАЗБАВЛЕННОЙ И РАЗБАВЛЕННОЙ ПЛАЗМЕ КРОВИ ПО ДАННЫМ СВЕТОРАССЕЯНИЯ

М. Н. Кириченко, А. В. Масалов, Л. Л. Чайков, А. Р. Зарицкий

*В работе представлены результаты исследования влияния разбавления на концентрации и размеры частиц в плазме крови, получаемые с помощью методов динамического рассеяния света. Установлено, что связь между концентрациями и радиусами частиц имеет линейный характер в двойном логарифмическом масштабе как для неразбавленных, так и для разбавленных в 10 и 100 раз образцов размороженной плазмы крови в области размеров частиц от 1 до 300 нм для сферической модели их формы. Это указывает на применимость теории Ми и её приближений и формулы Стокса–Эйнштейна для описания светорассеяния в неразбавленной плазме. Показано, что применение модели цилиндрической формы частиц расширяет диапазон линейной связи между концентрациями и размерами частиц до размеров в 10000 нм.*

**Ключевые слова:** частицы плазмы крови, распределение интенсивности рассеянного света по размерам частиц, соответствие концентраций частиц их радиусам.

Исследования плазмы и сыворотки крови важны с точки зрения как фундаментальных проблем биологии человека, так и диагностики заболеваний [1–4]. Методы светорассеяния (динамического и статического) успешно применяются для исследования этих биологических жидкостей. Одним из важнейших параметров, определяемых с помощью метода динамического рассеяния света (ДРС), является гидродинамический радиус белков, агрегатов и везикулярных частиц, который может изменяться при различных заболеваниях. Не менее важной с этой точки зрения является концентрация частиц в плазме крови. Исследованию сыворотки крови с помощью методов светорассеяния посвящено заметное количество работ, в то время как плазма крови исследована

в меньшей степени [5, 6]. Имеющиеся в литературе работы в основном посвящены исследованию либо модельных растворов [7–9], либо разбавленных образцов [10]. Работ, посвященных определению концентрации частиц в неразбавленных образцах плазмы, нами не обнаружено. Это связано, по-видимому, с опасениями, что применимость модели Стокса–Эйнштейна для оценки гидродинамических радиусов, а также теории Ми или приближения Рэля–Ганса–Дебая (РГД) для расчета концентраций может нарушаться в случае образцов с высокой концентрацией белка. Практический же интерес чаще всего представляют именно неразбавленные образцы 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]:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r_i}, \quad (1)$$

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

В ходе ранее выполненных измерений было обнаружено, что получаемые методом ДРС распределения интенсивности по размерам частиц в образцах неразбавленной плазмы крови нестабильны от измерения к измерению [16]. При накоплении функции корреляции в течение длительного времени (более 300 сек) такая нестабильность не исчезала. Поэтому мы накапливали большое число функций корреляции, измеренных за времена 100–200 секунд, и набирали массив распределений интенсивности по размерам частиц. Этот массив подвергался статистической обработке. При определении концентраций частиц  $N_p$  различных размеров оказалось, что связь между концентрациями  $N_p$  и гидродинамическими радиусами частиц  $r$  (в диапазоне от 1 до 300 нм) в двойном логарифмическом масштабе линейна:

$$\log N_p = a \log r + b, \quad (2)$$

где коэффициент, определяющий наклон прямой  $a = -3.99 \pm 0.09$ , а коэффициент, определяющий смещение по оси ординат  $b = -5.77 \pm 0.19$ .

Объемная доля материала частиц (белка) связана с концентрацией частиц  $N_p$  следующим соотношением:  $C_v = 4/3\pi r^3 N_p$ , 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% [17] 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.

**Цель настоящей работы** – проверить применимость соотношения Стокса–Эйнштейна и приближения РГД для исследования размеров и концентраций частиц неразбавленной плазмы крови.

Для этого были определены размеры различных частиц плазмы крови, проведены оценки их концентраций и исследованы соответствия между ними в разбавленных и неразбавленных образцах. При наличии взаимодействий между частицами малых размеров в больших концентрациях, связь между концентрациями частиц, рассчитанными в приближении РГД, и их размерами, определенными по формуле Стокса–Эйнштейна, может искажаться. Поэтому для проверки возможных искажений указанного соответствия проводилось сравнение графиков соответствия  $N_p - r$  для образцов неразбавленной и разбавленной в 10 и 100 раз размороженной плазмы крови. Если в неразбавленной плазме крови имеются упомянутые искажения, то они будут проявляться только для малых частиц, у которых концентрация наибольшая. Для частиц больших размеров, концентрация которых значительно меньше, такие искажения наблюдаться не будут. Тогда при разбавлении плазмы крови вид связи концентраций частиц и их радиусов будет меняться в области малых размеров частиц и оставаться неизменным в области больших частиц с малыми концентрациями, то есть форма графика должна измениться. Если же форма графика останется неизменной, то это будет означать, что приближение РГД и формула Стокса–Эйнштейна адекватны для неразбавленной плазмы крови или их искажения малосущественны.

*Результаты и их обсуждение.* Гидродинамические радиусы частиц определялись методами ДРС путем разложения с помощью программы DynaLS [18] по временам релаксации функций корреляции, полученных на установке, описанной в [19, 20]. Абсолютная интенсивность рассеяния света определялась путем сравнения полной интен-

сивности рассеяния в плазме крови с рассеянием в толуоле, коэффициент рассеяния которого принимался равным  $R_T = 1.2 \cdot 10^{-5} \text{ см}^{-1}$ . Концентрации частиц определялись из абсолютной интенсивности рассеяния и распределений интенсивности по размерам частиц по формуле приближения РГД [21] для модели сферической формы частиц с относительной разностью показателей преломления  $(n_1 - n_2)/n_2 = 0.013$ , где  $n_1$  – показатель преломления частиц,  $n_2$  – показатель преломления дисперсионной среды. Значения радиусов частиц и распределения интенсивности были получены под различными углами рассеяния (30, 40, 60, 90°).

На рис. 1 представлены графики соответствия концентраций частиц их размерам в двойном логарифмическом масштабе для образца неразбавленной плазмы крови (кружки), для образца плазмы, разбавленной в 10 раз (квадраты) и для образца плазмы крови, разбавленной в 100 раз (треугольники).

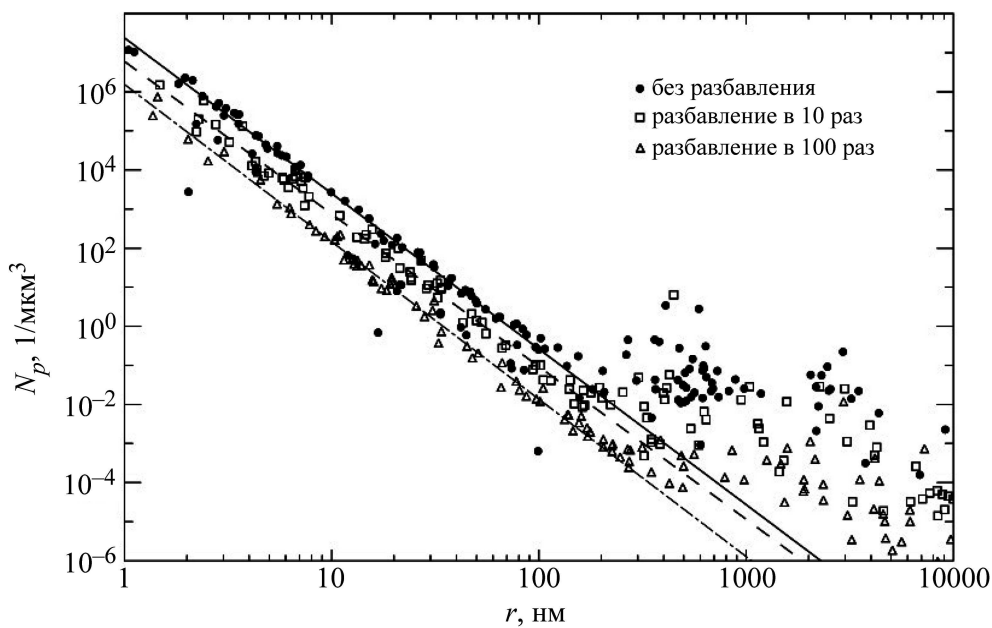


Рис. 1: Графики соответствия концентраций частиц их радиусам, полученные для образцов неразбавленной (кружки), разбавленной в 10 (квадраты) и 100 раз (треугольники) плазмы крови, полученные в предположении сферической формы частиц.

Для всех образцов плазмы крови графики соответствия концентраций частиц их размерам имеют вид, близкий к линейному, в области размеров 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 можно заключить, что 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.

В области размеров от 300 нм до 10000 нм наблюдается нарушение линейности соответствия концентраций частиц их размерам для всех исследованных образцов (рис. 1). Такое нарушение может быть связано с тем, что реальные частицы с такими гидродинамическими радиусами имеют форму, отличную от сферы, или с тем, что реальные размеры, не попадающие в РГД минимумы, тем не менее могут быть зарегистрированы как находящиеся в области одного из минимумов из-за нестабильности разложения автокорреляционной функции по экспонентам.

Расчет концентраций частиц в предположении их цилиндрической формы [22] позволил получить графики соответствия концентраций частиц их гидродинамическим радиусам, близкие к линейным в двойном логарифмическом масштабе, во всем диапазоне регистрируемых размеров частиц (рис. 2). Такое сохранение линейности может свидетельствовать о том, что реальная форма больших агрегатов белков близка к цилиндрической.

Таким образом, в настоящей работе 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 до 300 нм в предположении сферической их формы и в диапазоне от 1 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.

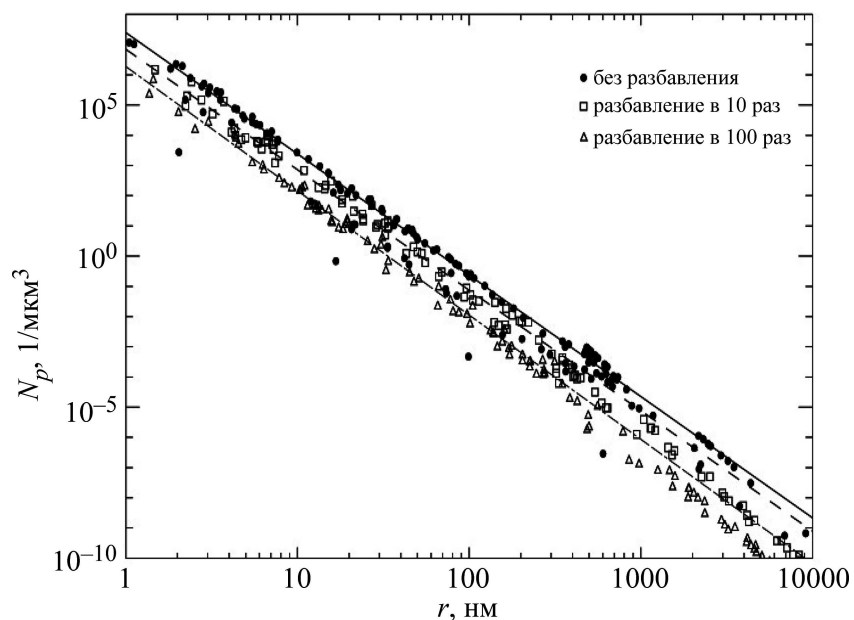


Рис. 2: Графики соответствия концентраций частиц их размерам (длине цилиндров), полученные для образцов неразбавленной (кружки), разбавленной в 10 (квадраты) и 100 раз (треугольники) плазмы крови, полученные в предположении цилиндрической формы частиц.

Полученные результаты могут быть использованы при исследовании многокомпонентных образцов с большой концентрацией белков или иного вещества с помощью методов ДРС и для разработки диагностических методик в медицинской практике.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

- [1] Ю. П. Ковальчук, Л. А. Носкин, С. Б. Ланда и др., Клинико-лабораторный консилиум, № 7, 21 (2005).
- [2] О. Н. Здраевская, В. А. Дюк, С. Б. Ланда и др., Клиническая лабораторная диагностика, № 5, 21 (2006).
- [3] Y. M. Petrushevich and G. P. Petrova, Proc. SPIE **2728**(2), 2 (1996).
- [4] S. G. Alekseev, A. V. Ivanov, S. V. Sviridov, et al., Proc. SPIE **5973**, 597301 (2005).
- [5] A. S. Lawrie, A. Albanyan, R. A. Cardigan, et al., Vox Sang. **96**(3), 206 (2009).
- [6] X.-H. Zheng, C. Cui, X.-X. Zhou, et al., Chin. J. Cancer, **32**(12), 667 (2013).
- [7] M. Muler and W. Burchard, Int. J. Biol. Macromol. **3**, 71 (1981).
- [8] P. Wiltzius, G. Dietler, W. Kanzig, Biopolymers **21**, 2205 (1982).
- [9] R. Kita, A. Takahashi, M. Kaibara, Biomacromolecules **3**, 1013 (2002).
- [10] Y. V. Ivanov, A. R. Karimov, L. N. Pyatnitsky, et al., J. Russ. Laser Res. **26**(5), 363 (2005).
- [11] В. Н. Лопатин, А. В. Приезжаев, А. Д. Апонасенко и др., *Методы светорассеяния в анализе дисперсных биологических сред* (Москва, Физматлит, 2004).
- [12] H. C. Van de Hulst, *Light Scattering by Small Molecules* (New York, Wiley, 1957).
- [13] J. W. S. Rayleigh, Proc. R. Soc. London **A84**, 25 (1911).
- [14] M. Smoluchowski, Ann. Phys. **326**(14), 756 (1906).
- [15] A. Einstein, Ann. Phys. **324**(2), 371 (1906).
- [16] М. Н. Маслова, И. С. Бурханов, “Статистический анализ данных, получаемых для образцов плазмы крови методами динамического рассеяния света,” в: тезисы *XXI Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых “Ломоносов-2014”* (МГУ, Москва, 2014), с. 13. [http://lomonosov-msu.ru/archive/Lomonosov\\_2014/2471/2471.pdf](http://lomonosov-msu.ru/archive/Lomonosov_2014/2471/2471.pdf)
- [17] В. Марри, Р. Греннер, Д. Мейес, П. Родуэлл, *Биохимия человека* (Москва, Мир, 2003); R. K. Murray, D. K. Granner, P. A. Mayer, V. W. Rodwell, *Harper's Biochemistry* (Norwalk/San Mateo, Appleton and Lange, 1988).
- [18] <http://www.photocor.com/download/dynals/dynals-white-paper.htm>.
- [19] К. В. Коваленко, С. В. Кривохижа, А. В. Масалов, Л. Л. Чайков, Краткие сообщения по физике ФИАН **36**(4), 3 (2009).
- [20] Н. Ф. Бункин, А. В. Шкирин, И. С. Бурханов и др., Квантовая электроника **44**(11), 1022 (2014).

- [21] И. С. Бурханов, Л. Л. Чайков, Н. А. Булычев и др., Краткие сообщения по физике ФИАН **41**(10), 38 (2014).
- [22] T. Neugebauer, Ann. Phys. **42**(7-8), 509 (1943).

Поступила в редакцию 30 января 2015 г.