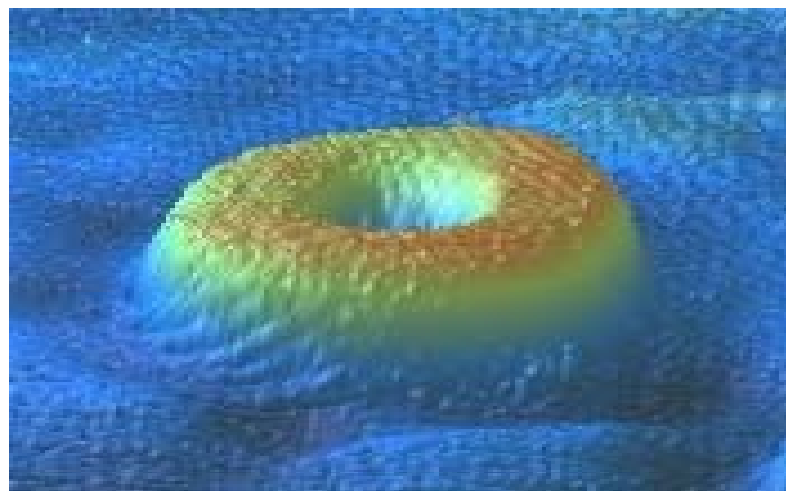


Нанотехнологии. Персонализированная медицина.

Максимов Г.В.

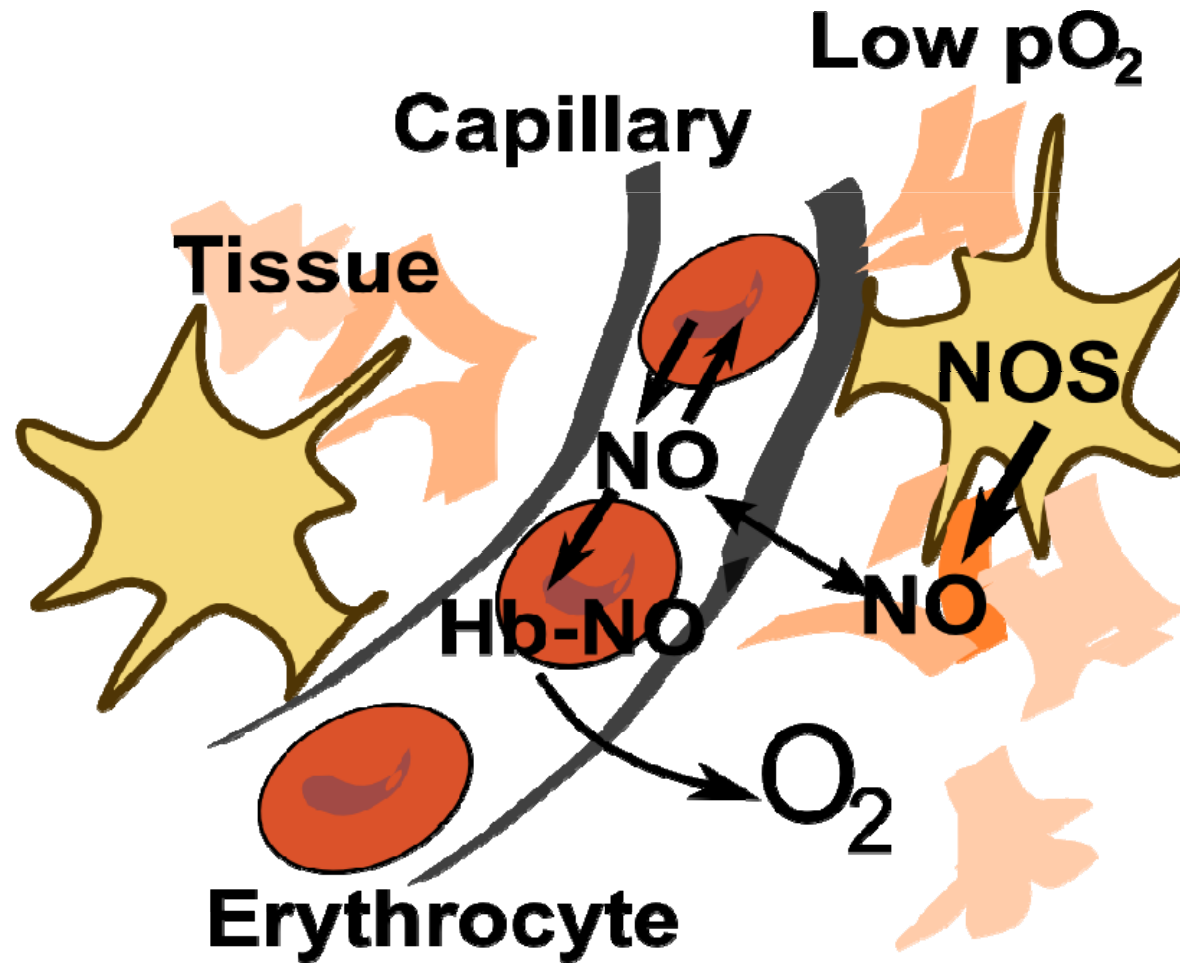
Лекция 1. Нанобиотехнологии клеток крови

В первой лекции будут рассмотрены некоторые направления современных исследований молекулярно-клеточных процессов гипоксии, обусловленных изменениями морфологии и объема клетки, состояния плазматической мембраны и цитоскелета, перераспределением и изменением конформации гемоглобина эритроцита. Отдельно будут рассмотрены механизмы межклеточной сигнализации в крови в норме (проживание человека в условиях высокогорья, космический полет, экологические стресс факторы) и при патологии (гипертония, ишемия и синдромы роста).



Нервы и эритроциты

Перераспределение O_2
в кровеносном сосуде



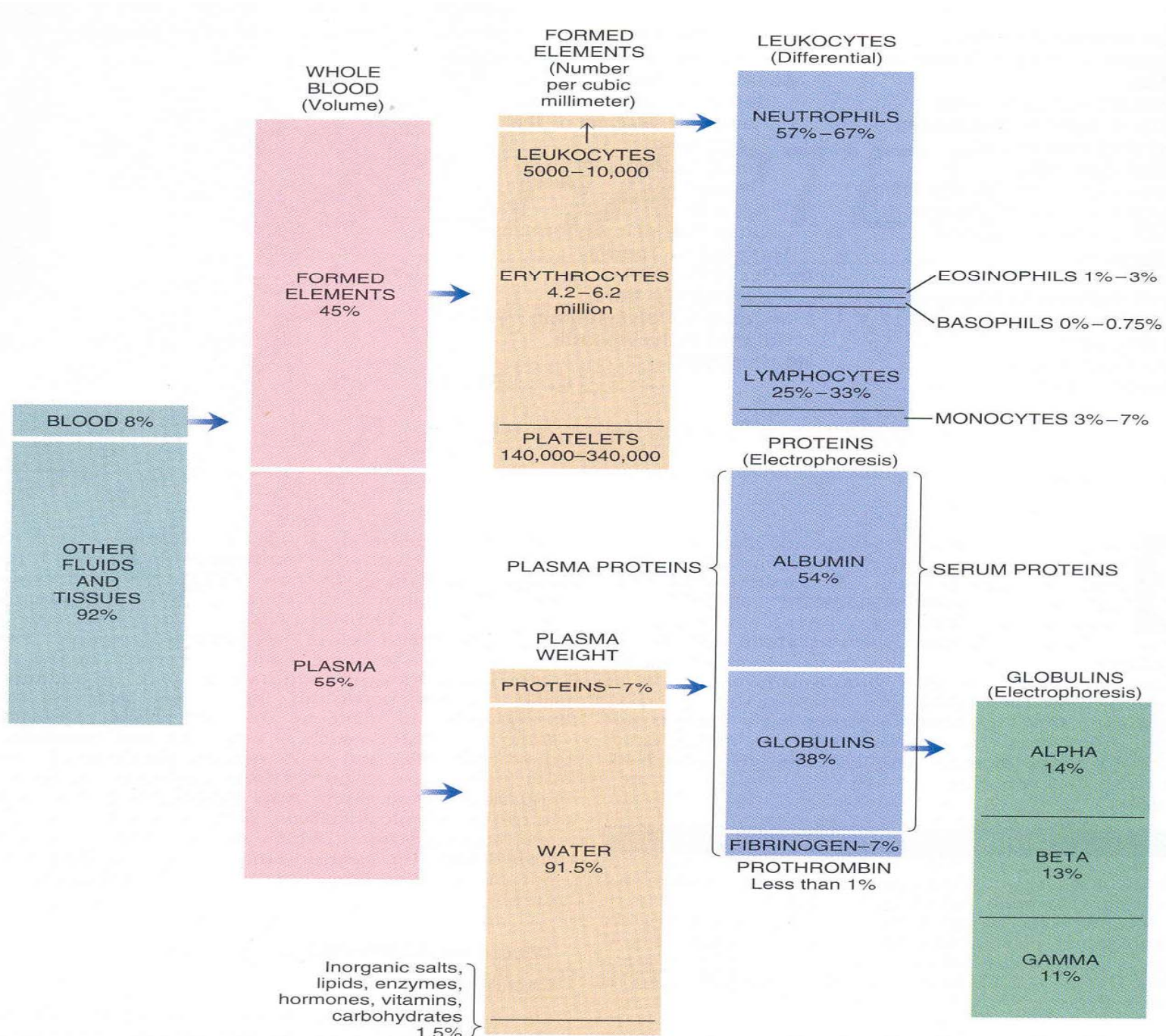


FIGURE 13–1. Composition of blood in the normal adult. (Redrawn from Jacob SW, Francone CA: *Elements of Anatomy and Physiology*, ed 2. Philadelphia, WB Saunders, 1989, p 164.)

ФУНКЦИИ КРОВИ

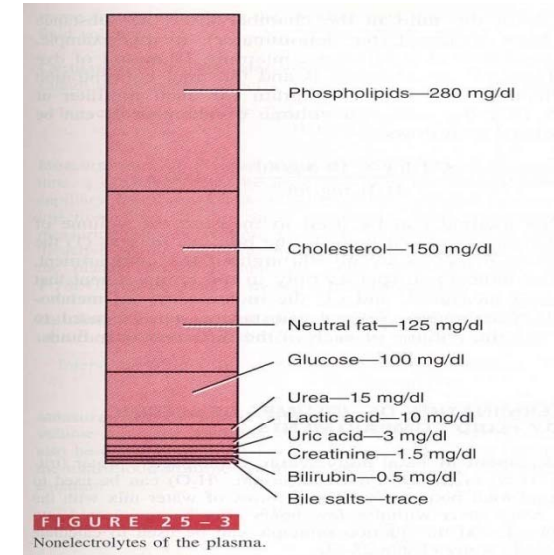
1. Транспортная

- а) дыхательная
- б) питательная
- в) регуляторная
- г) экскреторная

2. Защитная

3. Гомеостатическая

APPROXIMATE SOLUTE COMPOSITION OF KEY FLUID COMPARTMENTS				
SOLUTE	PLASMA	PROTEIN-FREE PLASMA	INTERSTITIUM	CELL
Na ⁺ (mM)	142	153	145	15
K ⁺ (mM)	4.4	4.7	4.5	120
Ca ²⁺ (mM)	1.2 (ionized) 2.5 (total)*	1.3 (ionized)	1.2 (ionized)	0.0001 (ionized)
Mg ²⁺ (mM)	0.6 (ionized) 0.9 (total)*	0.6 (ionized)	0.55 (ionized)	1 (ionized) 18 (total)
Cl ⁻ (mM)	102	110	116	20
HCO ₃ ⁻ (mM)	22†	24	25	15
H ₂ PO ₄ ⁻ and HPO ₄ ²⁻ (mM)	0.7 (ionized) 1.4 (total)‡	0.75 (ionized)	0.8 (ionized)	0.7 (free)
Proteins	7 g/dl 1 mmole/liter 14 meq/liter	—	1 g/dl	30 g/dl
Glucose (mM)	5.5	5.9	5.9	Very low
pH	7.4	7.4	7.4	~7.2
Osmolality (mosmole/kg H ₂ O)	291	290	290	290



ГЕМАТОКРИТ И ГЕМАТОКРИТНОЕ ЧИСЛО



У мужчин: 44–48 %

У женщин: 41–45 %

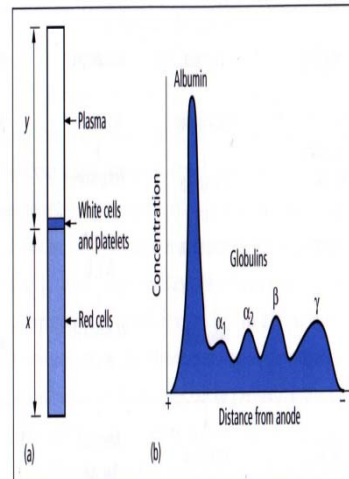


Fig. 13.1 (a) Fluid and cellular constituents of a sample of blood as seen after centrifugation. The fraction occupied by the red cells ($x/(x+y)$) is the haematocrit. (b) Separation of serum proteins by electrophoresis.

Blood Chapter 13

БУФЕРНЫЕ СИСТЕМЫ КРОВИ

1. Фосфатный буфер

$$pH = pK_d + \log \frac{[HPO_4^{=}]}{[H_2PO_4^-]}; pK_d = 6,8$$

2. Бикарбонатный буфер

$$pH = pK_d + \log \frac{[HCO_3^-]}{[H_2CO_3]}; pK_d = 3,7$$

но, H₂CO₃ расщепляется: H₂CO₃ ⇌ CO₂ + H₂O, поэтому:

$$pH = pK_d + \log \frac{[HCO_3^-]}{[CO_2]}; pK_d = 6,1 \rightarrow$$

$$pH = pK_d + \log \frac{[HCO_3^-]}{0,03 \times pCO_2} = 6,1 + \log \frac{24 \text{ mmol}}{0,03 \times 40} \left[\frac{20}{1} \right]$$

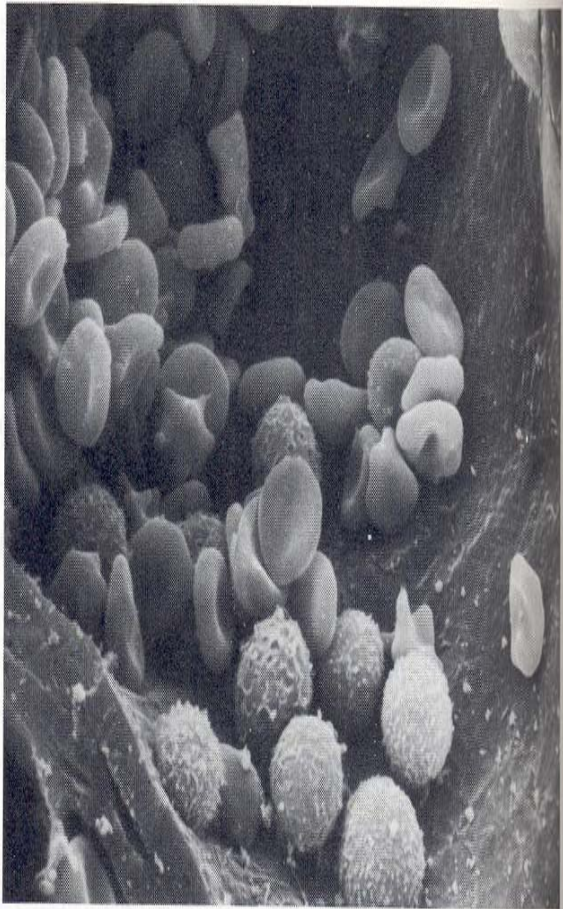
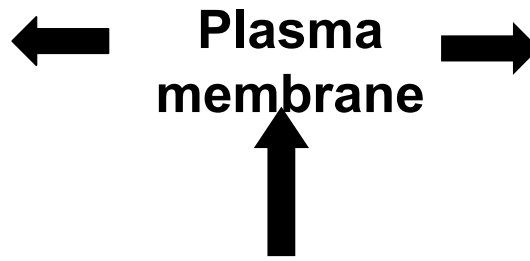
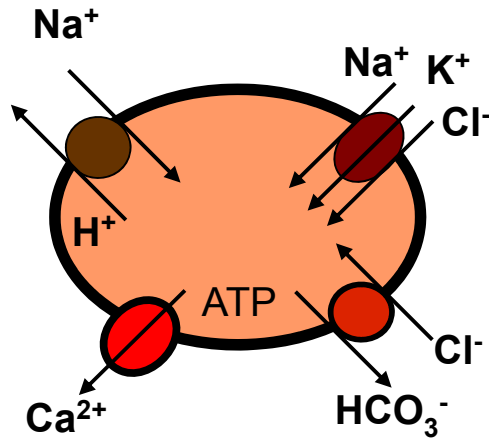


Figure 29-14 BLOOD CELLS.

Erythrocytes (red blood cells) are the most numerous. In mammals, they do not have nuclei or mitochondria and are seen as biconcave disks, magnified about 2,250 times in this scanning electron micrograph. Leukocytes (white blood

Показатель	Женщины	Мужчины
Концентрация гемоглобина (Hb), г/л крови	120-160	140-180
Гематокрит (фракция)	0,37-0,47	0,40-0,54
Число эритроцитов, $10^{12}/л$ крови = $10^6/мкл$ крови	4,2-5,4	4,6-5,9
Средняя концентрация Hb в эритроцитах, г/л эритроцитов	320-360	
Средняя Hb-масса одного эритроцита, пг=10^{-12}г	27-32	
Средний объем 1 эритроцита (MCV), фл=10^{-15}л	80-100	
Доля ретикулоцитов, %	0,5-2	

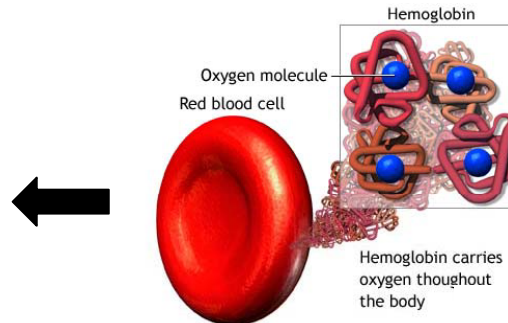
Membrane proteins
 Regulation of RBC volume, shape and pH
 Na⁺/H⁺-exchanger;
 Na⁺/K⁺/Cl⁻-co-transporter
 Ca²⁺-ATPase
 HCO₃⁻/Cl⁻-exchanger



Erythrocyte pathology as a cellular level of hypoxia



Hemoglobin



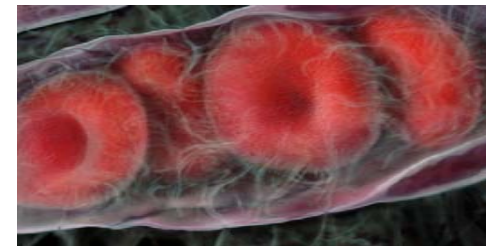
Alterations of Hb conformation and its affinity to O₂

Lipids: membrane fluidity
 RBC deformation provides their orientation to the streamlines in veins and arteries



RBC flowing in an arteriole.
 Picture from: Schmid-Schönbein, H., et al., 1980

RBC deformation provides their squeezing through capillaries

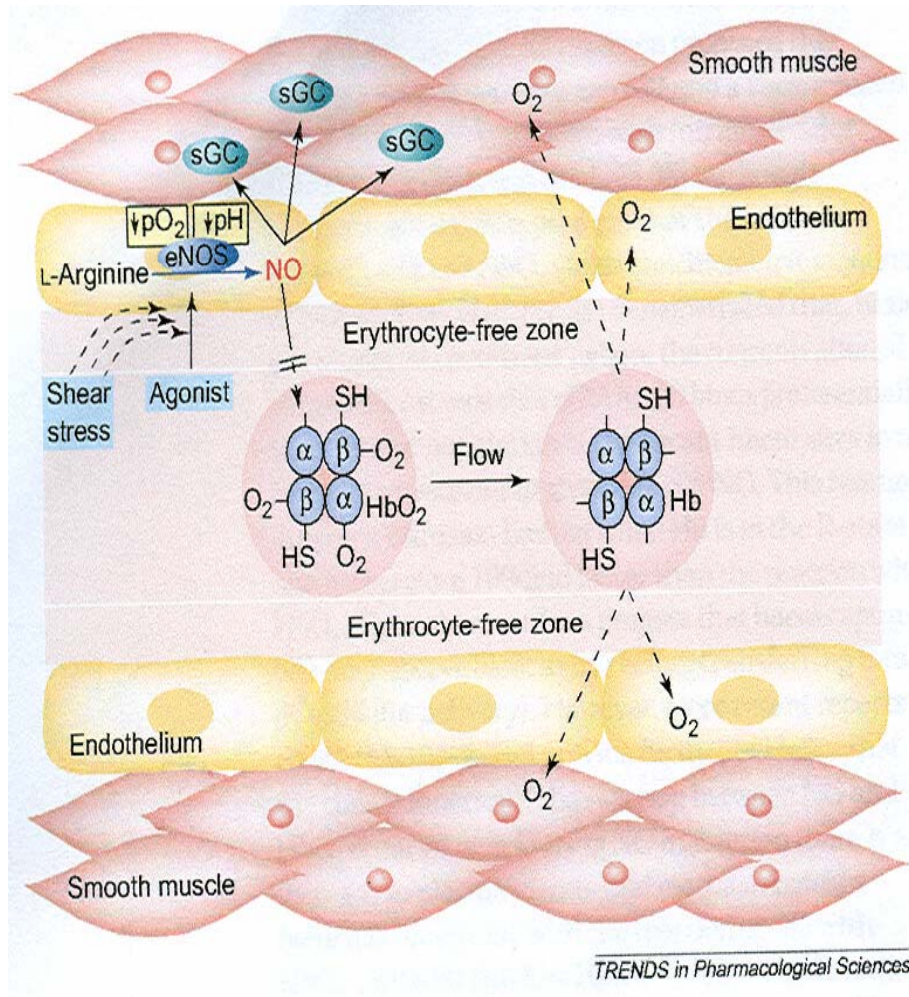


RBC in a capillary

Genetic modifications

Effect of external modulators (2,3-DPG, nitric oxide NO, pH)

Что является причиной клеточной гипоксии в норме и при патологии?



Нарушения гемодинамики:

- Дисфункция сердца
- Изменения сосудов

Клеточная патология – нарушения переноса O₂ эритроцитами:

- Снижение проницаемости плазматической мембраны эритроцита для O₂
- Изменение сродства гемоглобина к O₂
- Изменение проницаемости плазматической мембраны эритроцита для ионов натрия, калия, кальция и протонов
- Изменение активности антиокислительной системы

Цель

оценка состояния эритроцитов при различных сердечнососудистых заболеваниях и гипоксии

Основные направления исследования:

- оценка вязкости плазматической мембраны эритроцита;
- оценка способности гемоглобина связывать и отдавать O_2
- оценка содержания комплексов гемоглобина (Hb) с оксидом азота (NO)
- оценка проницаемости плазматической мембраны эритроцита для ионов Ca, K, and H
- оценка изменений формы и объема эритроцитов
- оценка антиокислительного статуса крови

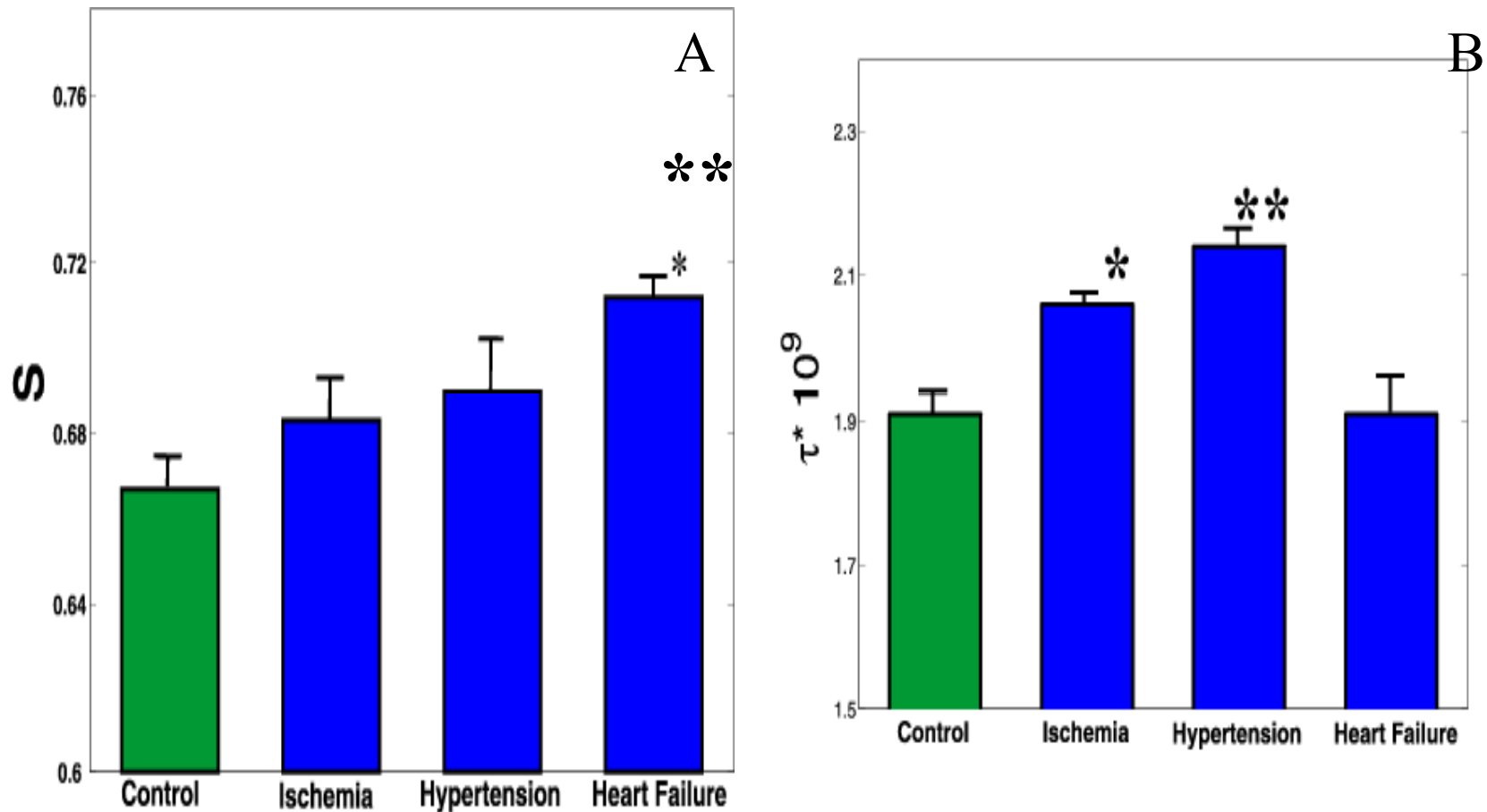
Исследуемые группы

- больные ишемической болезнью сердца
- больные гипертонией
- больные с недостаточностью кровообращения
- доноры в условиях высокогорной гипоксии
- КОСМОНАВТЫ

Методы исследования

- Метод электронного парамагнитного резонанса(ЭПР): для оценки вязкости плазматической мембраны с помощью зондов (5-doxylstearinic (5-DS) and 16-doxylstearinic acids (16-DS))
- Спектроскопия комбинационного рассеяния (КР): для регистрации изменений конформации порфирина и содержания комплексов гемоглобина (d-Hb, ox-Hb и Hb-NO)
- Электронная и интерференционная микроскопия: исследование объема и формы эритроцита
- Селективная потенциометрия: регистрация изменений содержания ионов K, Ca и pH
- Спектральные биохимические методы регистрации активности супероксиддисмутазы, гемоксидазы, каталазы, уровня церулоплазмينا и тиолов

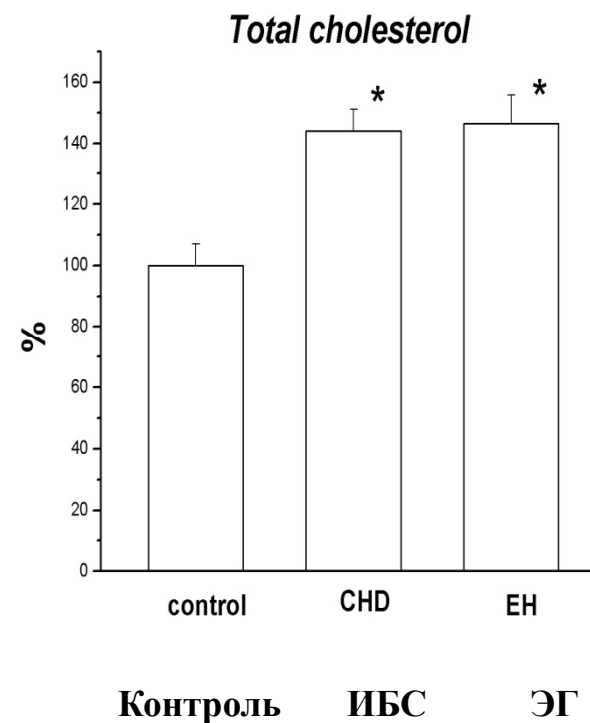
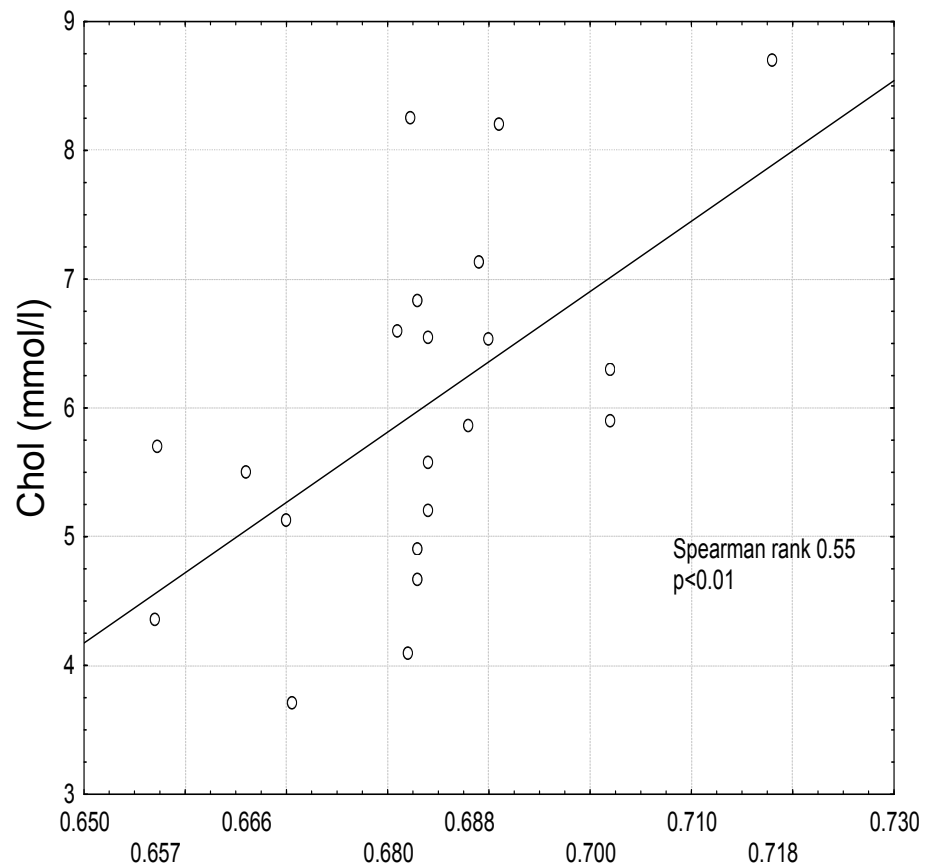
Вязкость мембраны эритроцита при различной сердечно-сосудистой патологии



сердечно-сосудистая патология увеличивает вязкость
плазматической мембраны эритроцита

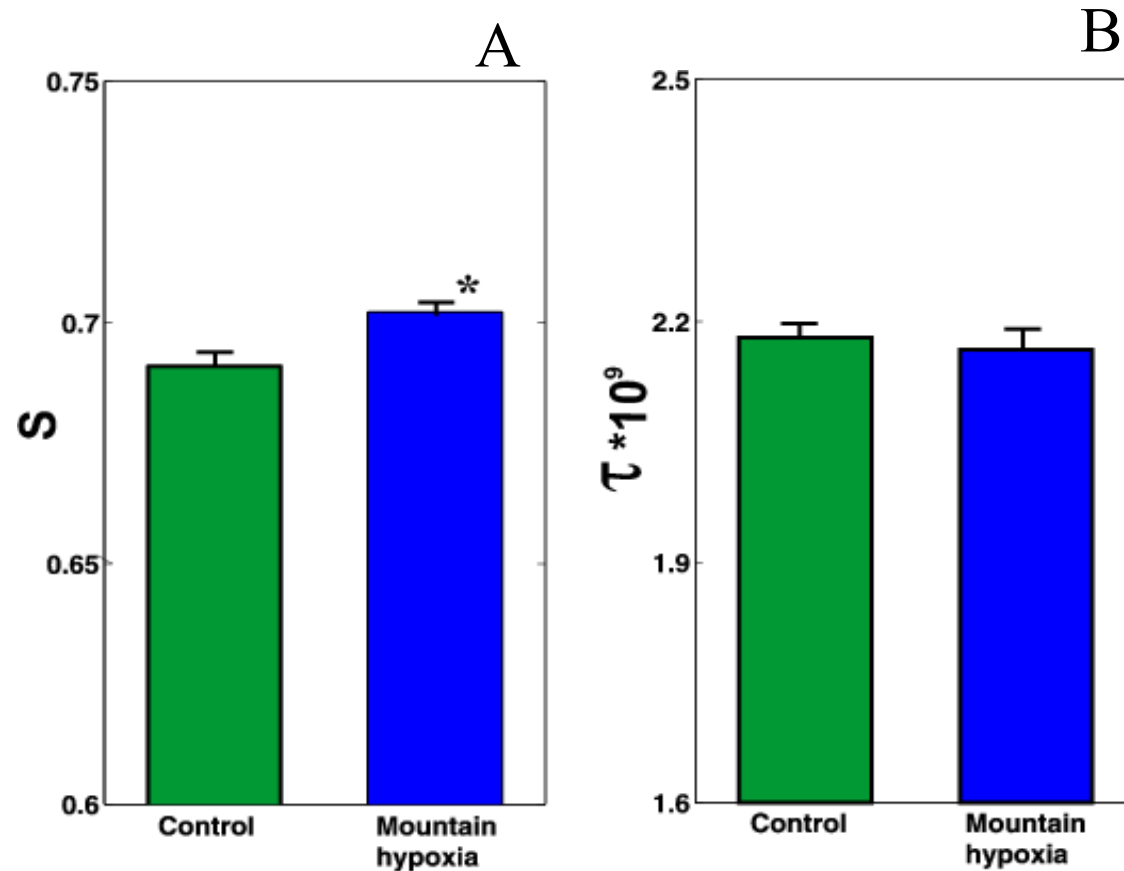
(O.V. Rodnenkov, et.al. *International Journal Pathophysiology*, v. 11./4, 2005)

Зависимость между вязкостью мембраны эритроцита и содержанием холестерина в плазме крови человека при ИБС и гипертонии



* Увеличение содержания холестерина сопровождается увеличением вязкости мембраны в областях близких к ее поверхности

Вязкость мембраны эритроцита людей , проживающих в условиях высокогорья

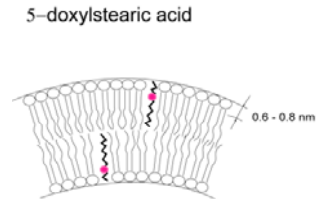
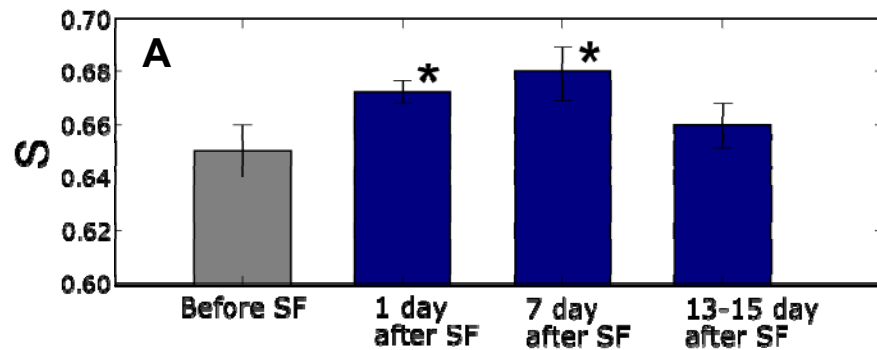


Гипоксия высокогорья сопровождается увеличением вязкости мембраны в
областях близких к ее поверхности
(O.V. Rodnenkov, et.al. *International Journal Pathophysiology*, v.11./4,2005)

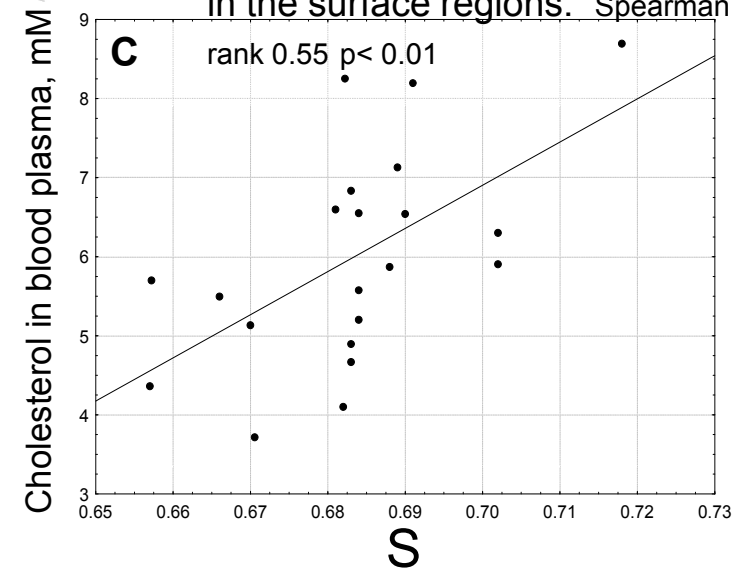
Состояние вязкости мембраны эритроцита человека при длительном космическом полете

A. Fluidity of erythrocyte plasma membrane in the surface regions is decreased after SF.

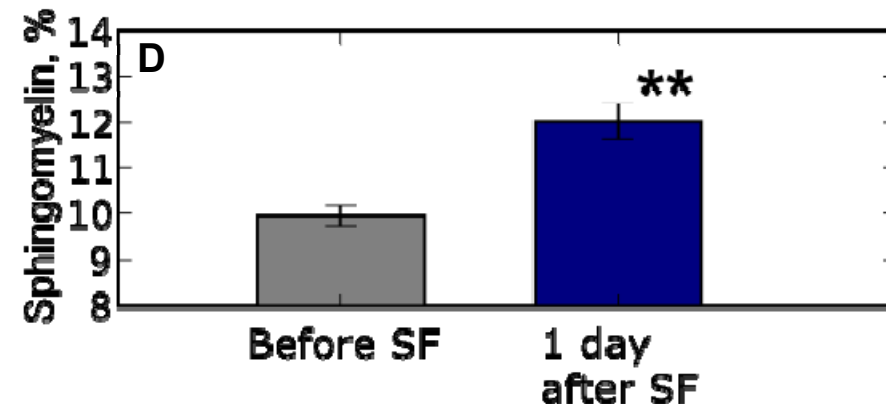
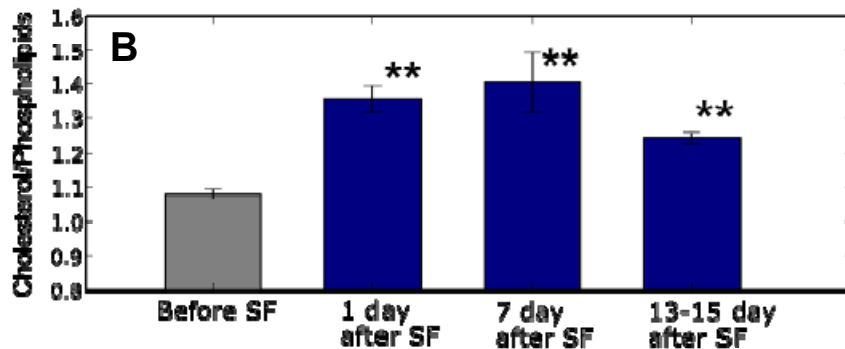
* $p < 0.05$

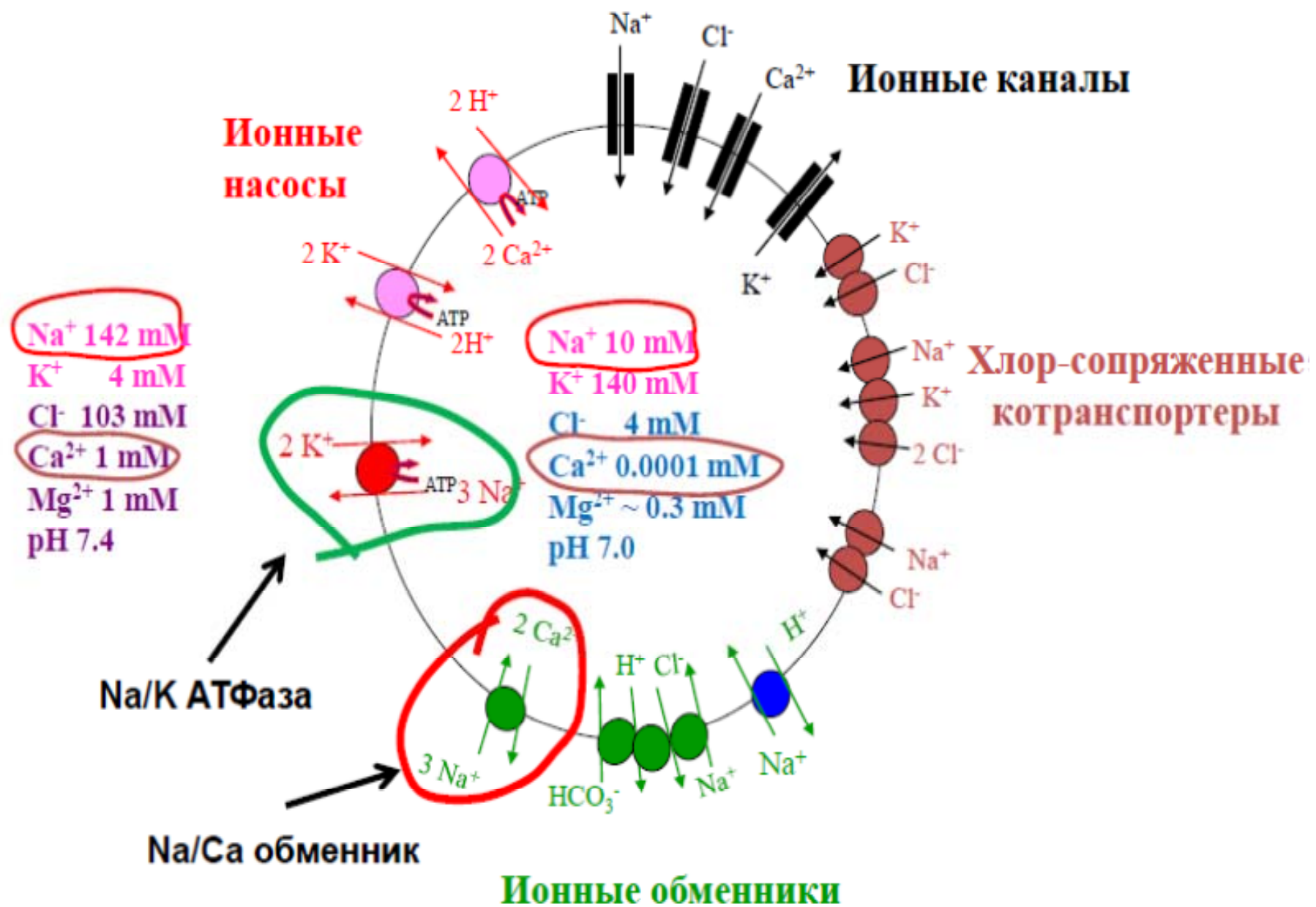


C. Correlation between cholesterol amount in blood plasma and fluidity of erythrocyte plasma membrane in the surface regions. Spearman

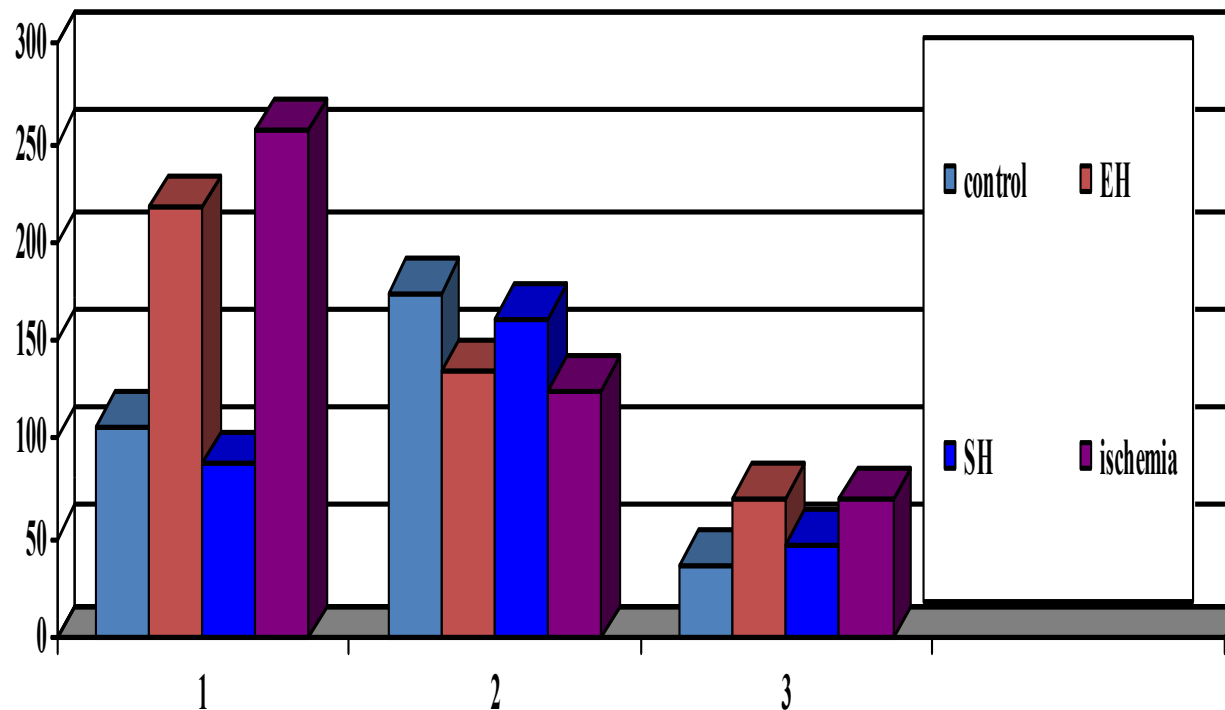


B, D. The relative content of cholesterol and sphingomyelin in plasma membrane of erythrocytes is increased after SF. ** $p < 0.01$



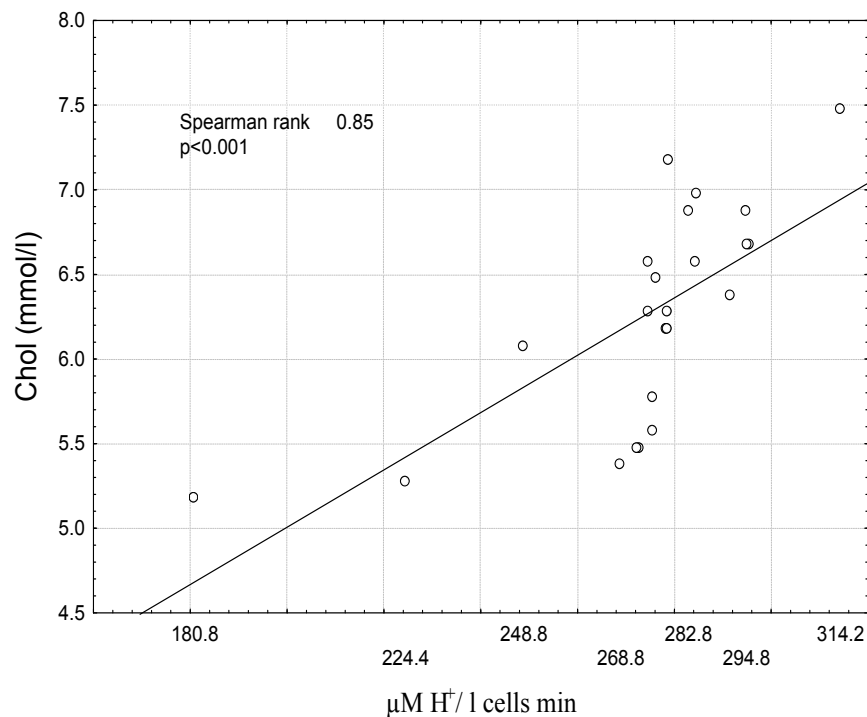


Изменения активности Na^+/H^+ -обмена (1), Ca^{2+} -АТФазы (2) и Ca^{2+} зависимых K^+ каналов (3) при первичной (EH) гипертонии, вторичной гипертонии (SH) и ИБС

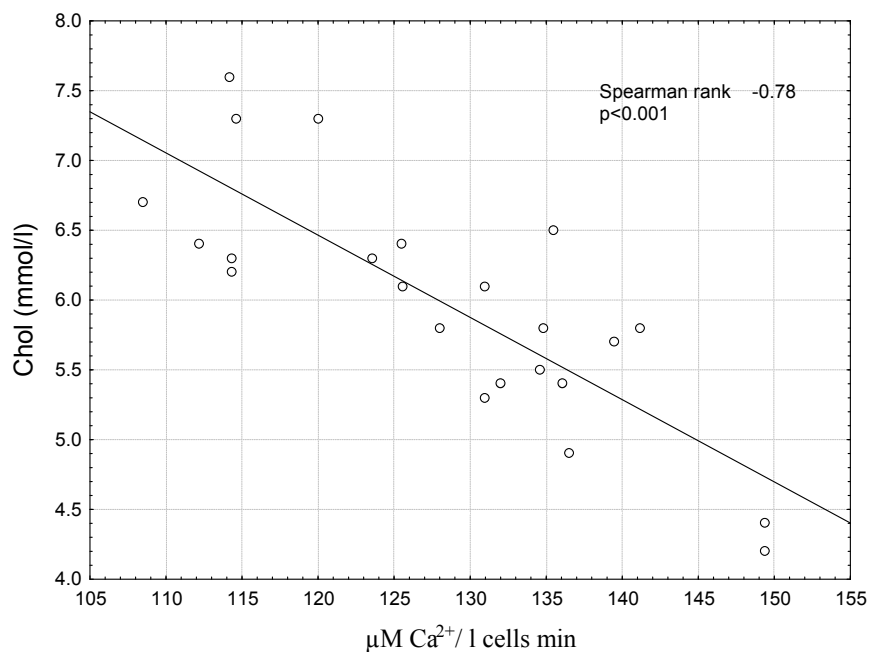
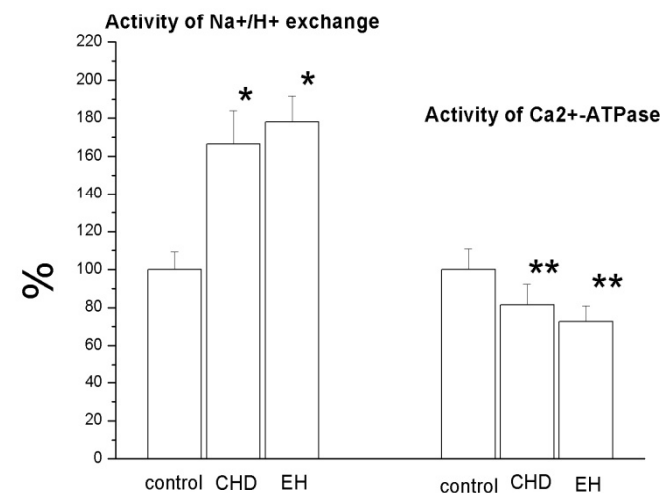


*Гипертония и ИБС увеличивает активность Na^+/H^+ -обмена и проницаемости Ca^{2+} зависимых K^+ -каналов и снижает активность Ca^{2+} -АТФазы
(Maksimova et.al., Cardiology, vol.5pp.45-45, 1999)*

Зависимость между активностью Na^+/H^+ -обмена, Ca^{2+} -АТФазы эритроцитов и содержанием холестерина в плазме крови больных

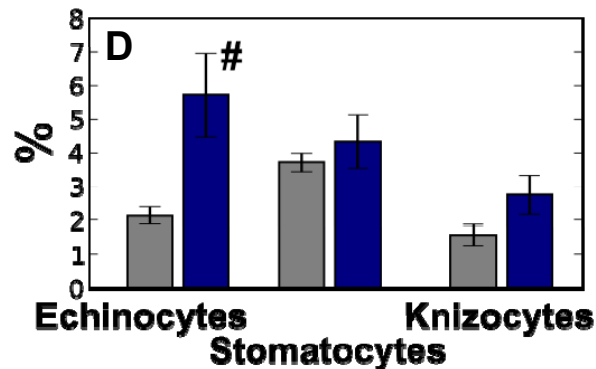
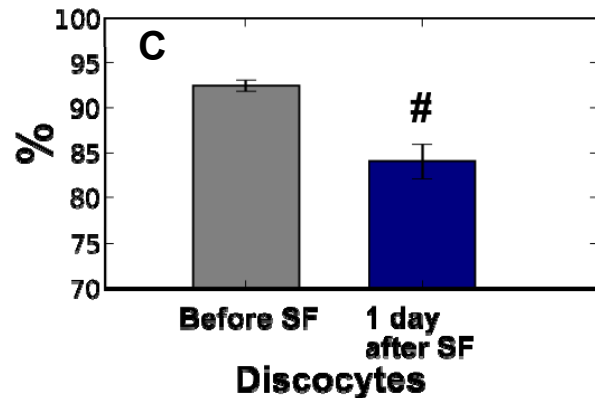
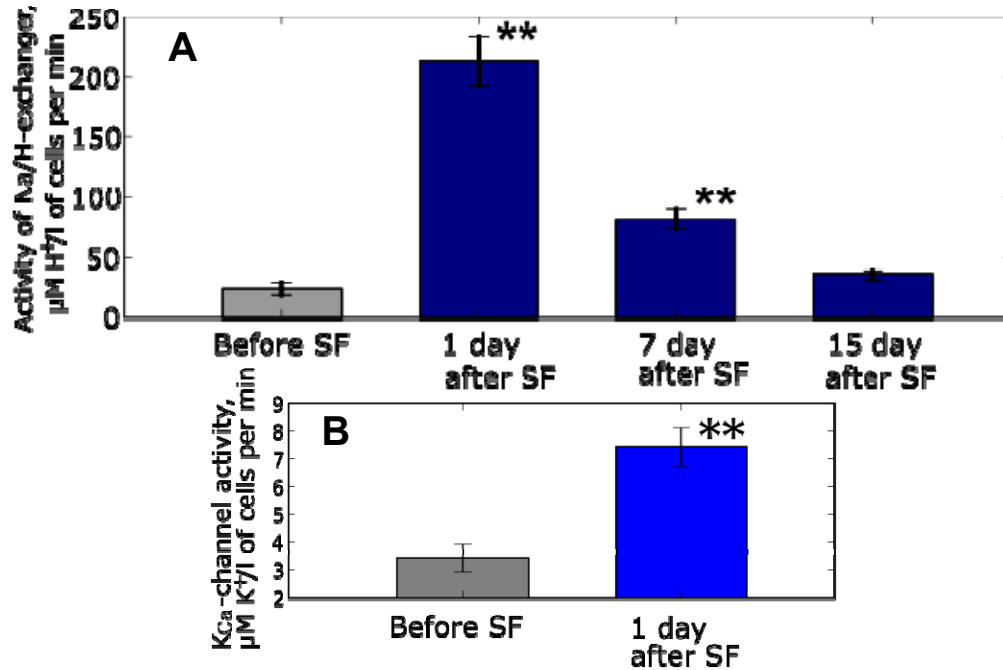


➤ увеличение холестерина в плазме при ИБС сопровождается активацией Na^+/H^+ -обмена и инактивацией Ca^{2+} - АТФазы

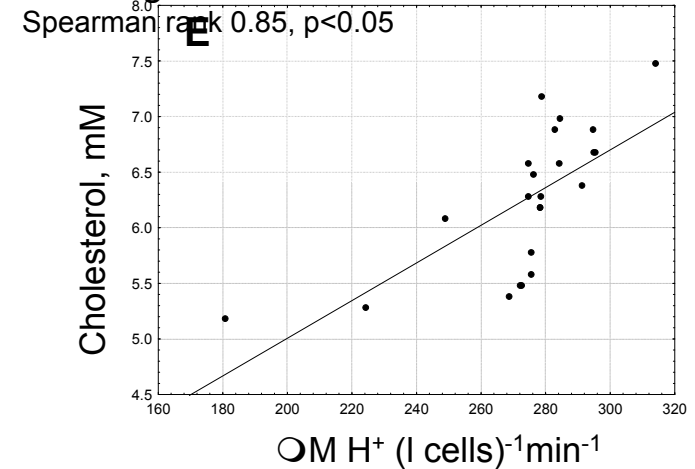


Воздействие длительного космического полета на транспорт ионов и морфологию эритроцитов человека

Activity of Na^+/H^+ -exchanger (A) and K_{Ca} -channel (B) is increased after SF. ** $p < 0.01$.



E. Correlations between cholesterol content and activity of Na^+/H^+ -exchanger.

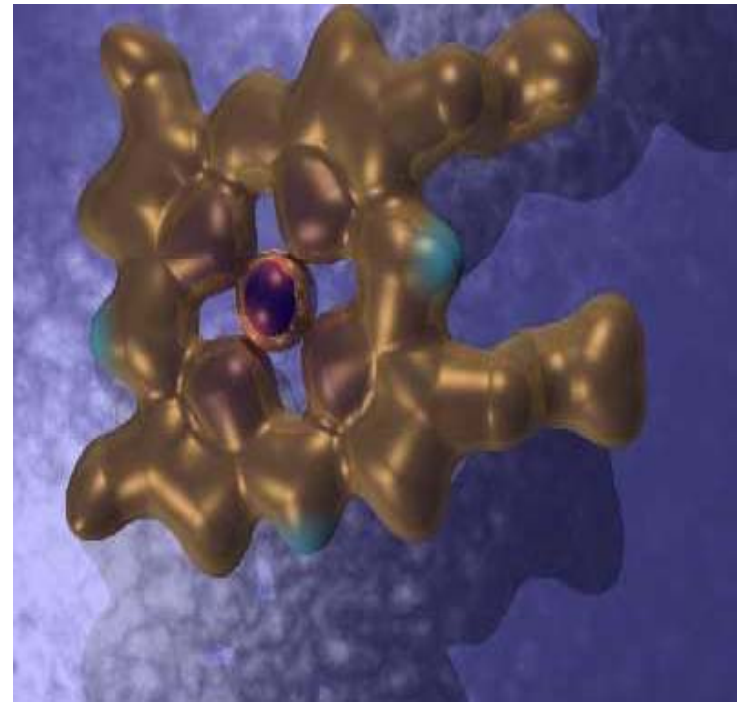
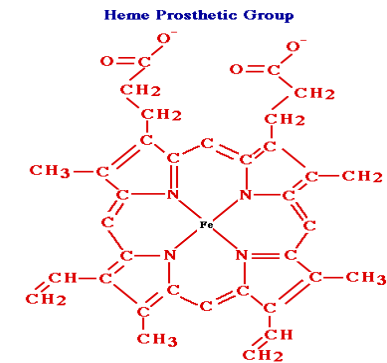


Amount of discocytes (C) is decreased and amount of echinocytes is increased (D) after SF. Grey bars – before SF, blue bars – after SF. # $p < 0.02$

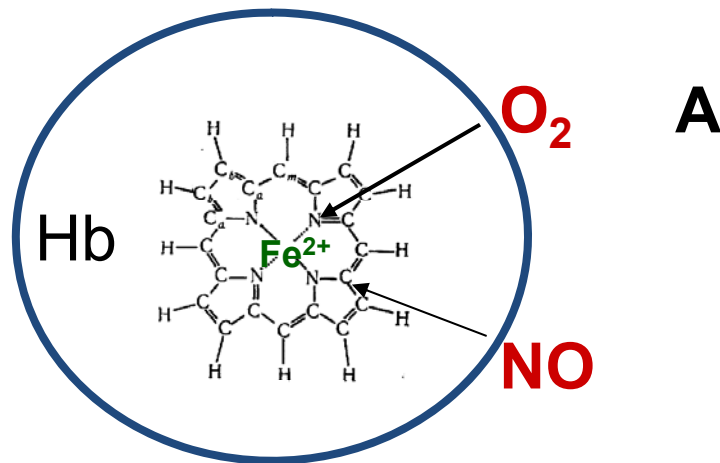
Строение гемоглобина

В состав гемоглобина входит:

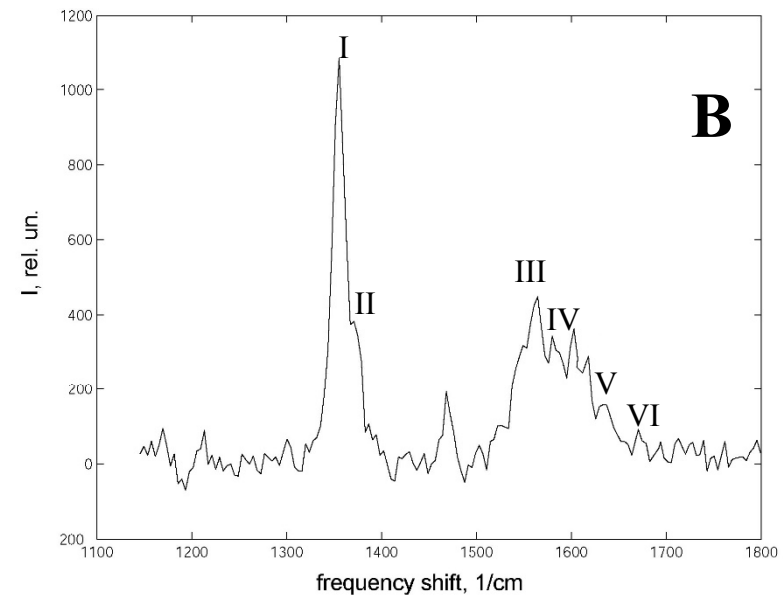
1. ГЛОБИН - 2 пары полипептидных цепей (α , β , γ , δ)



Спектроскопия комбинационного рассеяния: исследование изменений конформации гемопорфирина гемоглобина



I_{1355}/I_{1564} – свидетельствует о способности *d*-Hb связывать O₂ и NO;
 I_{1375}/I_{1580} – свидетельствует о способности *ox*-Hb отдавать O₂



A: Гемопорфирин гемоглобина и лиганды: O₂ and NO.

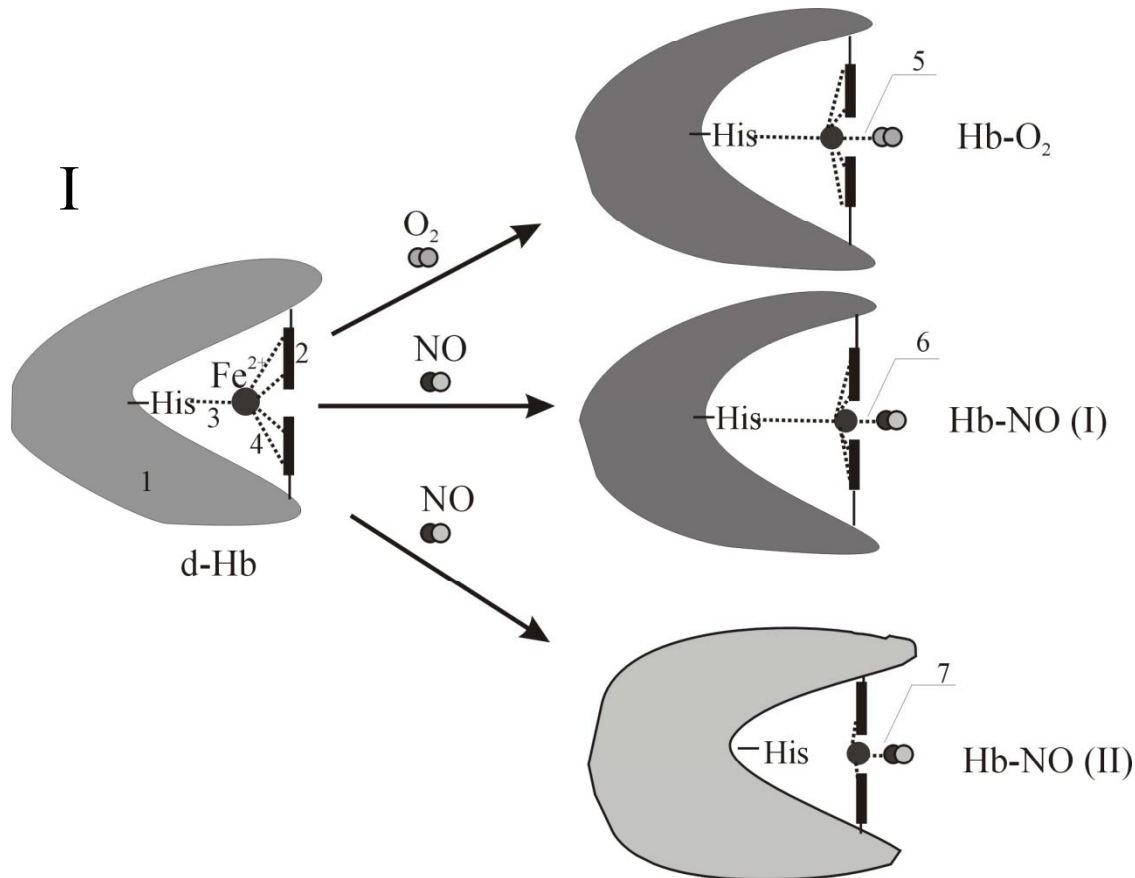
B: Спектр комбинационного рассеяния гемопорфирина в крови

Полосы I, III (1355 and 1564 cm^{-1}) соответствуют связям *d*-Hb;

Полосы II, IV (1375 and 1580 cm^{-1}) – *ox*-Hb;

Полосы V, VI (1626 and 1668 cm^{-1}) соответствуют комплексам Hb-NO

Спектроскопия комбинационного рассеяния: исследование содержания комплексов «гемопорфирин- лиганд»



Содержание комплекса окс-Нб определяют по соотношению полос I_{1375}/I_{1355}

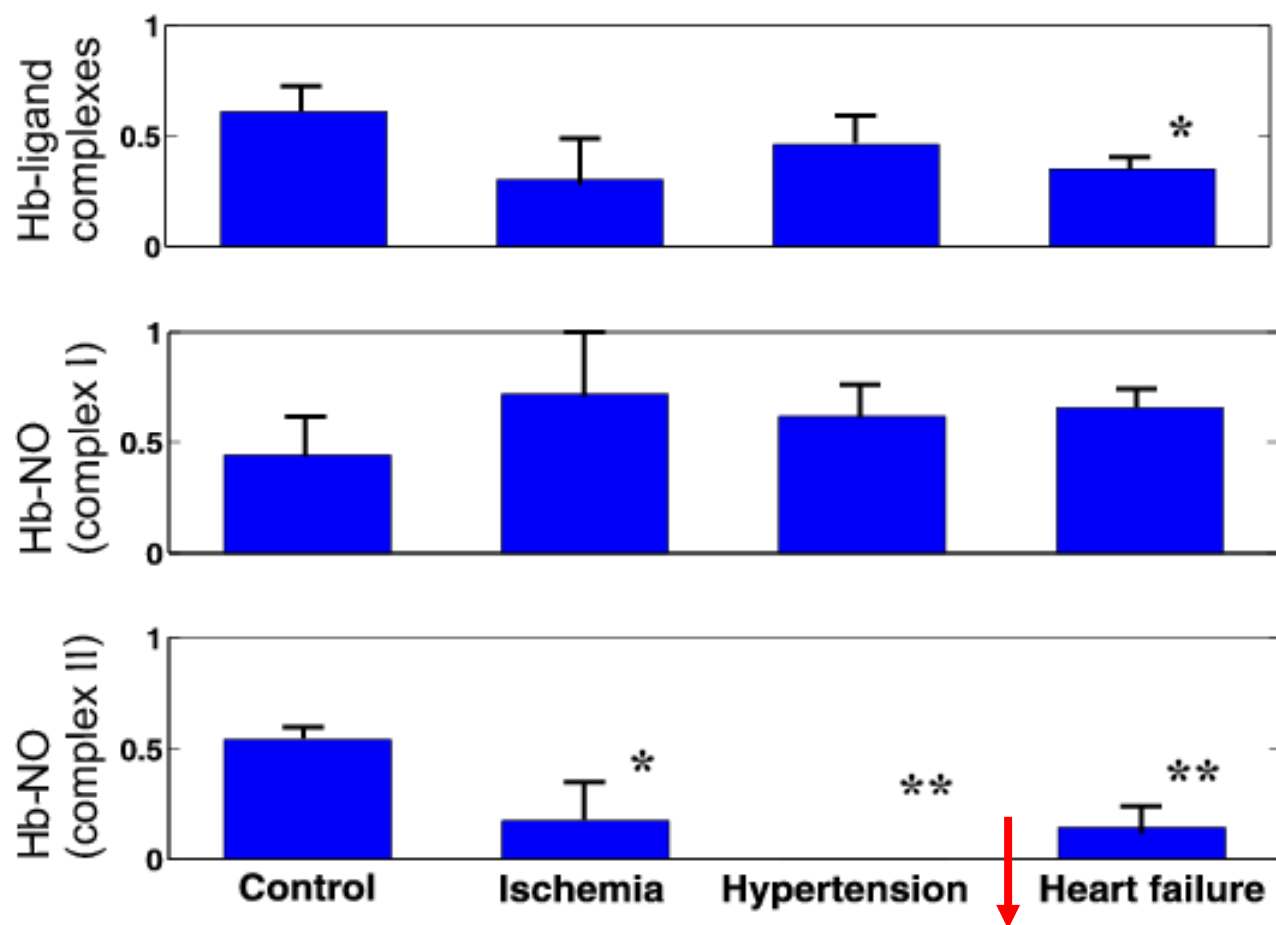
Комплекс с оксидом азота без нарушения связи между белком и гемопорфирином (I_{1626}/I_{1580})

Комплекс Нб с оксидом азота при разрушении связи между белком и гемопорфирином, регулирует способность Нб отдавать O₂ (I_{1668}/I_{1580})

Комплексы гемоглобина с O₂ и NO:

1 – глобин, 2 – порфириновый макроцикл, 3-7 – связи между атомом Fe и глобином, порфирин, O₂ и NO в комплексах I и II

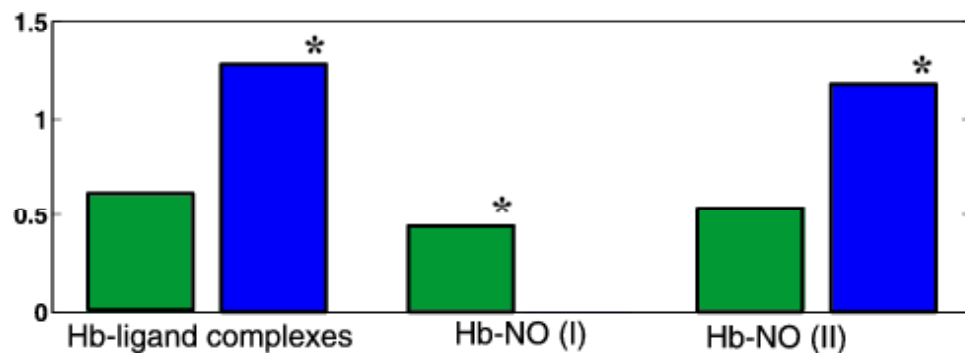
Изменения содержания комплексов гемоглобина при сердечно-сосудистой патологии



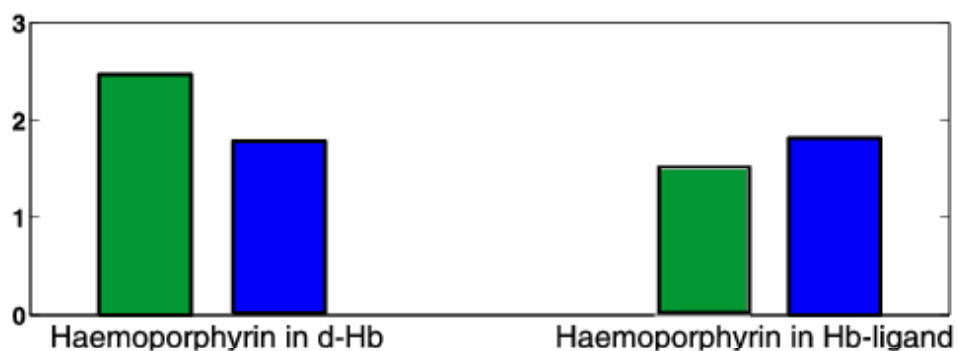
При ИБС, гипертонии и недостаточности кровообращения уменьшается содержание комплексов Hb-NO (II), что снижает сброс O_2

(O.V. Rodnenkov, et. al. *International Journal Pathophysiology*, v.11./4, 2005)

Изменения содержания комплексов гемоглобина эритроцитов людей, проживающих в условиях высокогорья



Адаптация, приводящая к насыщению Hb O₂ и стимуляции сброса O₂



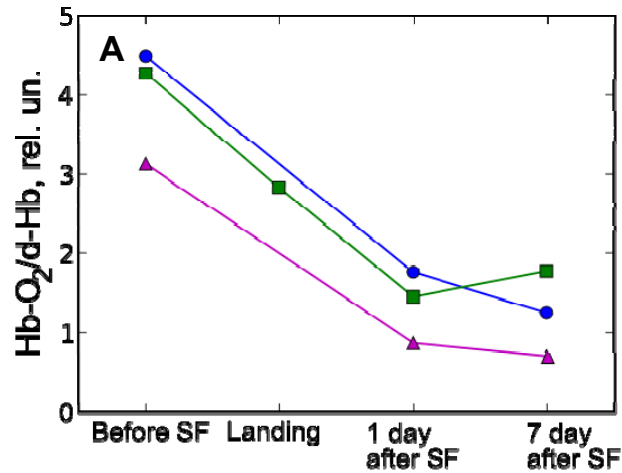
■ Control
■ Mountain hypoxia

Горная гипоксия увеличивает содержание комплексов ox-Hb и Hb-NO (II), что усиливает обмен O₂.

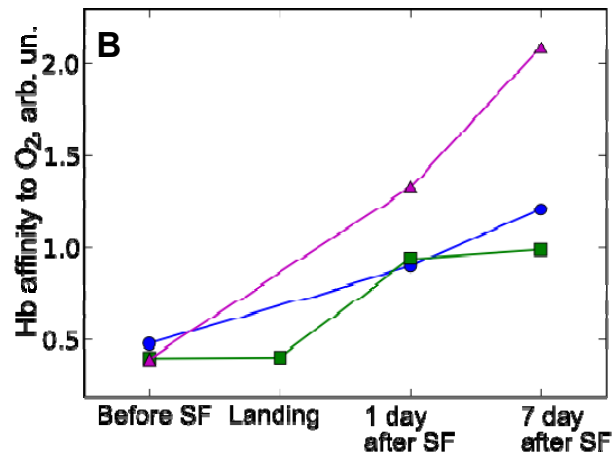
(O.V. Rodnenkov, et.al. *International Journal Pathophysiology*, v.11./4,2005)

Воздействие длительного космического полета на свойства гемоглобина эритроцитов человека

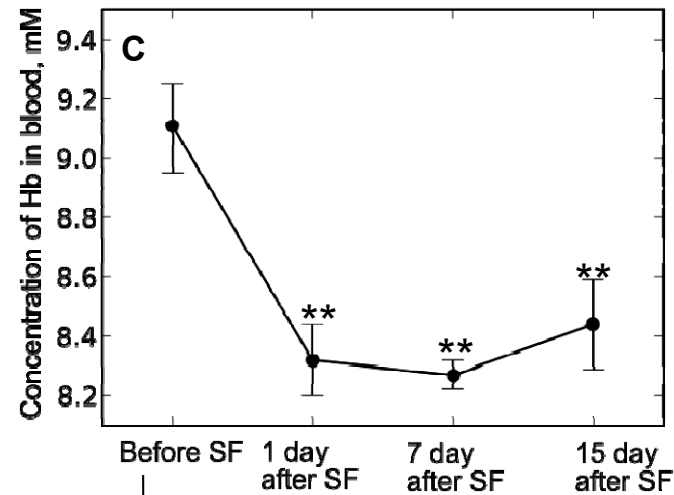
A. Amount of Hb-O₂ is decreased after SF. Colors indicate results for astronauts from three different ISS.



B. Affinity of Hb to O₂ is increased after SF. Colors indicate results for astronauts from three different ISS.



C. Total amount of Hb is decreased after SF. ** p<0.01



Decreased amount of O₂ in tissues

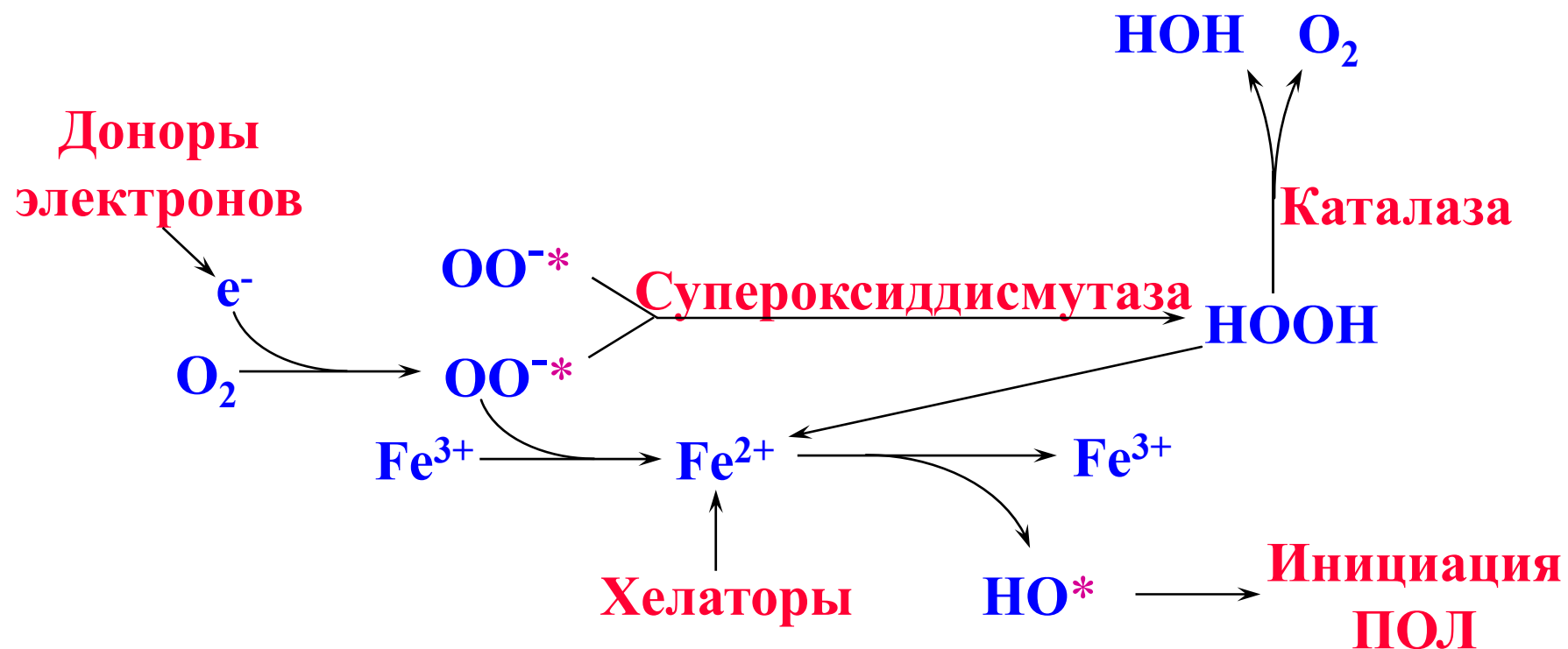
Worsening of O₂ release from erythrocytes in tissue capillaries

Tissue hypoxia

БЕЛКИ ПЛАЗМЫ

БЕЛКИ	КОНЦЕНТРАЦИЯ В ПЛАЗМЕ, г/л	ОСНОВНЫЕ ФУНКЦИИ
АЛЬБУМИН	35–40	Онкотическое давление, транспорт Ca^{2+} , жирных кислот и других липофильных веществ
α_1-глобулины	3–6	Транспорт липидов, тироксина, гормонов коры надпочечников. Ингибитор трипсина и химотрипсина
α_2-глобулины	4–9	Ингибитор плазмина. Связывание свободного гемоглобина
β-глобулины	6–11	Транспорт липидов, железа. Белки системы комплемента
γ-глобулины	13–17	Циркулирующие антитела
Фибриноген	30	Свертывание крови, агрегация тромбоцитов
Протромбин	1	Свертывание крови

Антиоксидантная система плазмы крови

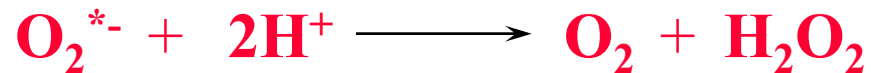


Антиоксиданты могут предотвращать цепное окисление липидов, реагируя с водорастворимыми радикалами или их предшественниками; мы назовем их **антиоксидантами водной фазы (АВФ)**. **Супероксиддисмутаза, каталаза и хелаторы ионов железа, а также карнозин относятся к классу АВФ.**

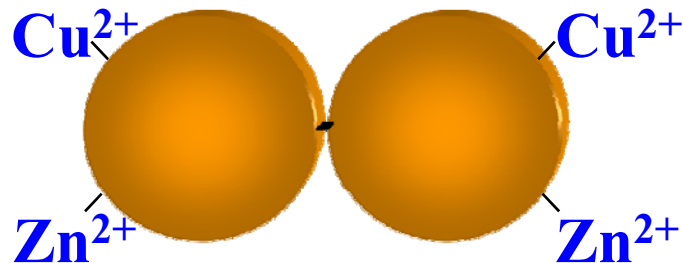
Супероксиддисмутаза

Супероксиддисмутаза (**СОД**) - единственный известный в настоящее время **фермент**, субстратом которого являются **свободные радикалы**.

Она **катализирует** следующую реакцию:

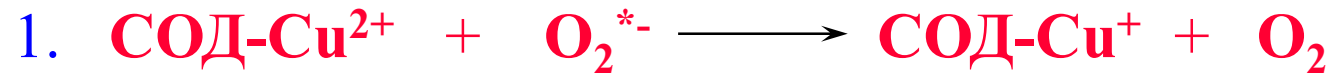


Фермент, обнаруженный **МакКордом** и **Фридовичем** имеет молекулярную массу 32 кД и состоит из **двух субъединиц**, каждая из которых содержит по одному атому **Си** и одному атому **Zn**:



Дисмутация O_2^{*-} супероксиддисмутазой

Реакция катализируемая СОД состоит из двух стадий и заключается в переносе электрона с одного супероксидного радикала на другой. Промежуточным акцептором этого электрона служит атом меди, входящий в активный центр СОД:



Zn^{2+} не участвует в каталитическом цикле, хотя и входит в активный центр. Ионы металлов защищают молекулу СОД от воздействий различных протеаз.

Деактивация перекиси водорода

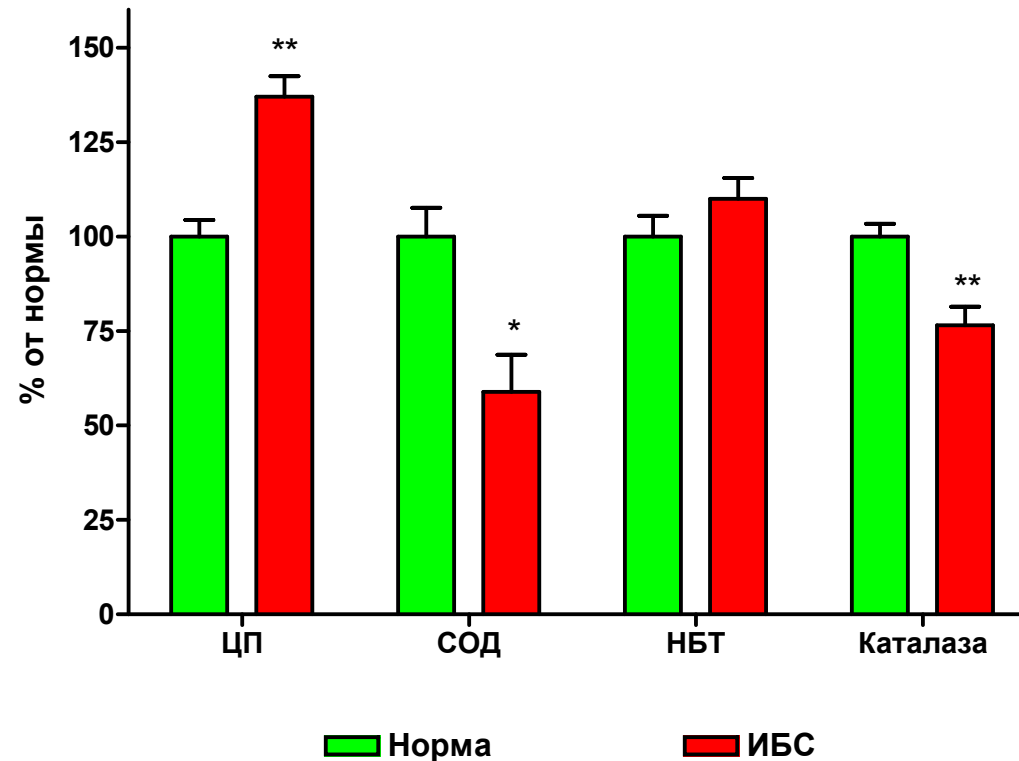
Перекись водорода (H_2O_2) - основной источник самых токсичных радикалов в живых системах - **НО*** радикалов.

Следовательно, снижение уровня H_2O_2 приведет к снижению концентрации **НО*** радикалов.

Удаление H_2O_2 осуществляют два класса ферментов:

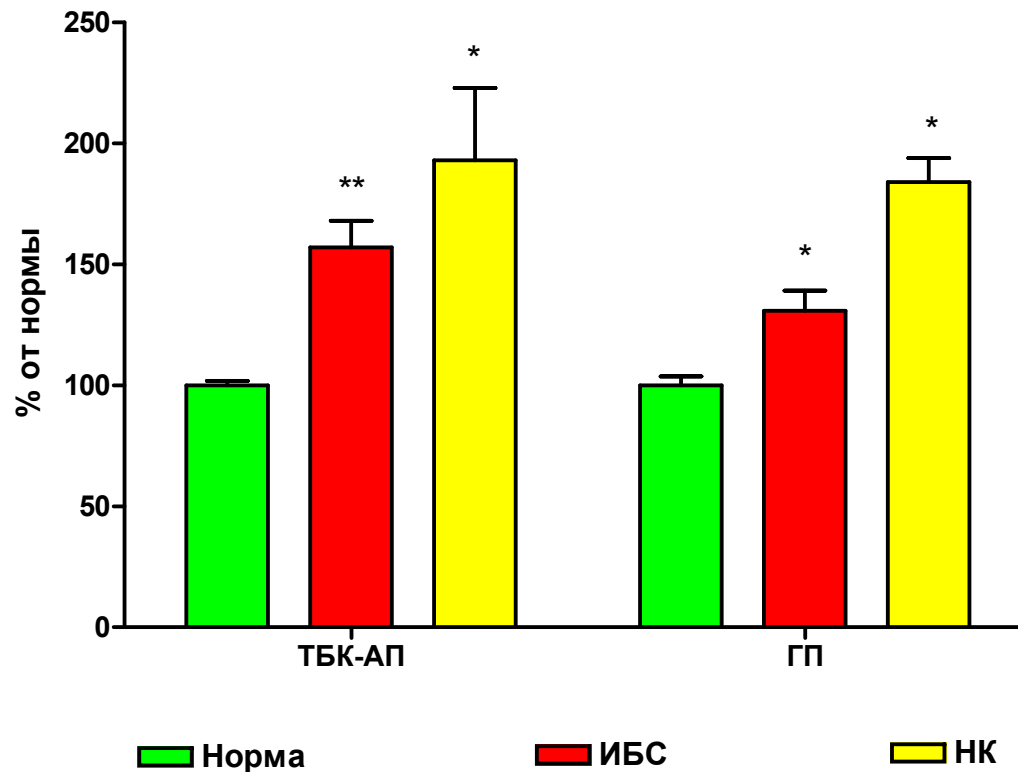


Антиоксидантный статус крови у больных с ишемической болезнью сердца (ИБС)



Супероксиддисмутаза и церулоплазмин ответственны как за утилизацию супероксид анион-радикала, так и регулируют содержание металлов переменной валентности (меди и железа), каталаза и небелковые тиолы принимают участие в утилизации перекиси водорода

Продукты окисления липидов в плазме крови больных с ишемической болезнью сердца (ИБС) и нарушением кровообращения (НК)



Уровни ТБК-активных продуктов и гидроперекисей липидов являются маркерами наличия окислительного стресса.

Акцепторы радикалов

В качестве системы защиты организма от повреждающего действия радикалов кислорода могут выступать **низкомолекулярные вещества**, имеющие высокую константу скорости взаимодействия с этими радикалами:

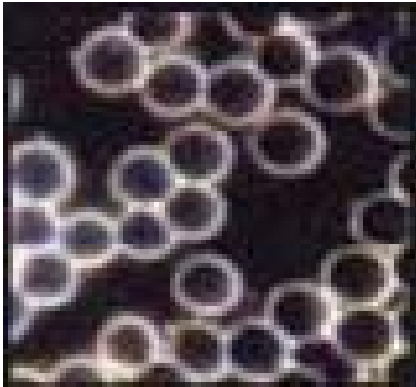
- Аскорбиновая кислота (витамин С)
- Сульфгидрильные соединения (глутатион, цистеин)
- Одно- и многоатомные спирты (этанол, рибоза, глюкоза)
- Мочевая кислота
- а – токоферол
- каротиноиды

Хелаторы ионов металлов

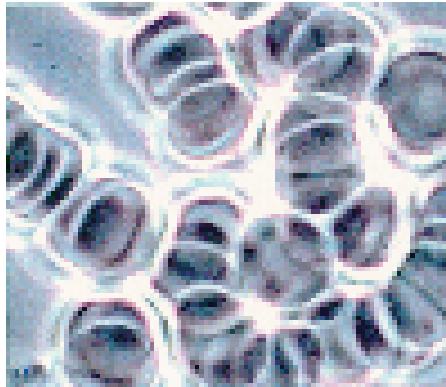
Основной механизм образования HO^* радикалов - это восстановление H_2O_2 ионами Fe^{2+} . Поэтому связывание железа комплексообразователями должно привести к снижению концентрации этих радикалов. Среди таких соединений наиболее известны:

- ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота)
- Десферал
- Карнозин

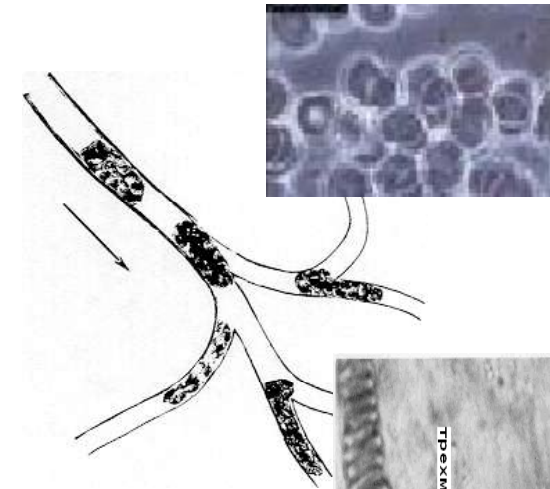
“Заиливание” крови



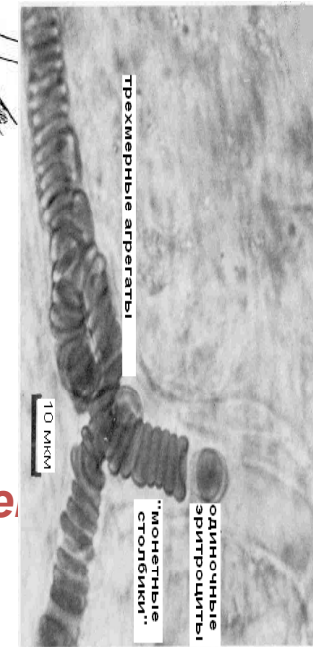
ОТДЕЛЬНЫЕ
ЭРИТРОЦИТЫ



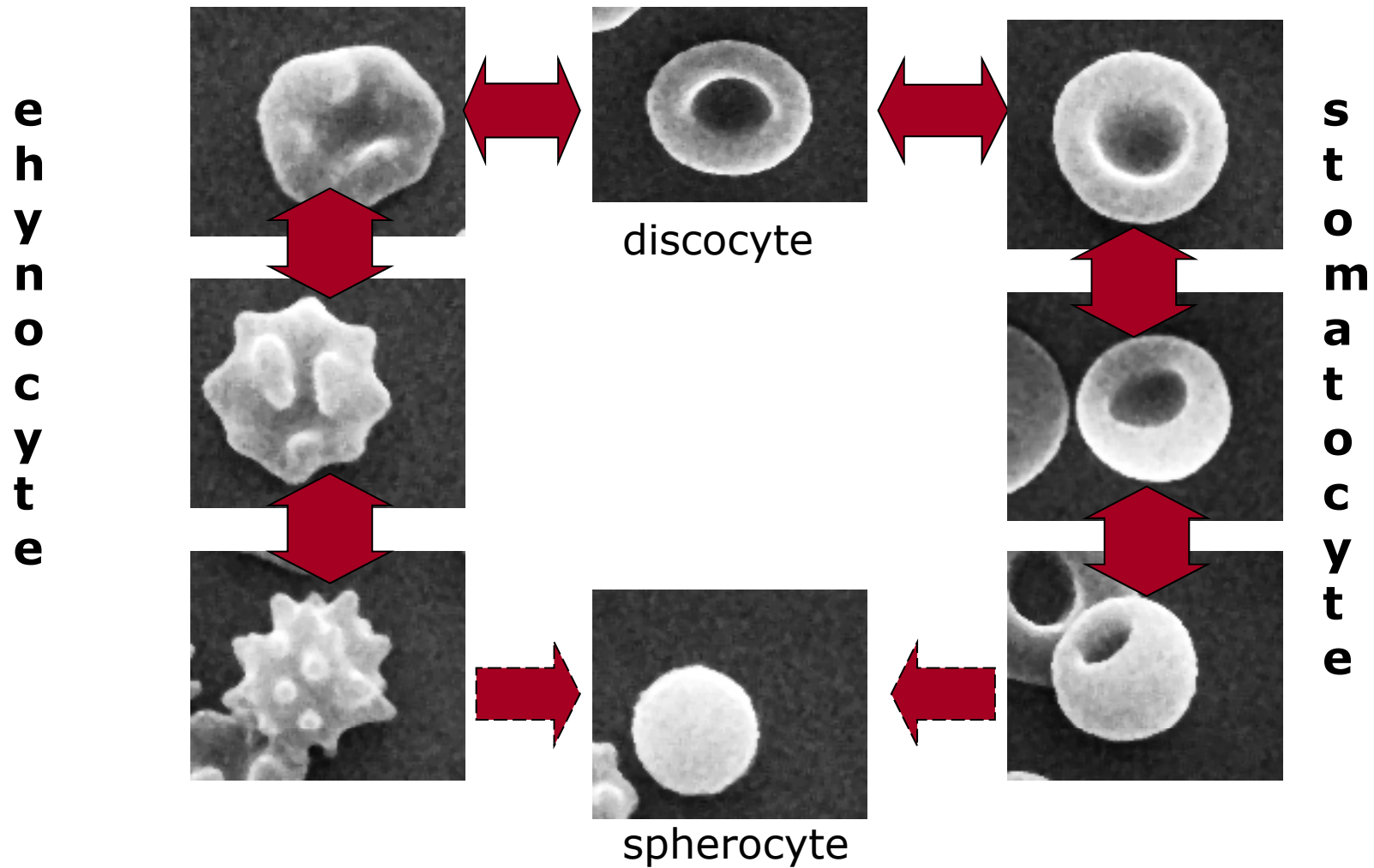
АГРЕГАЦИЯ



"BLOOD SLUDGE"
= “заиливание крови”
феномен



Типичные формы эритроцита



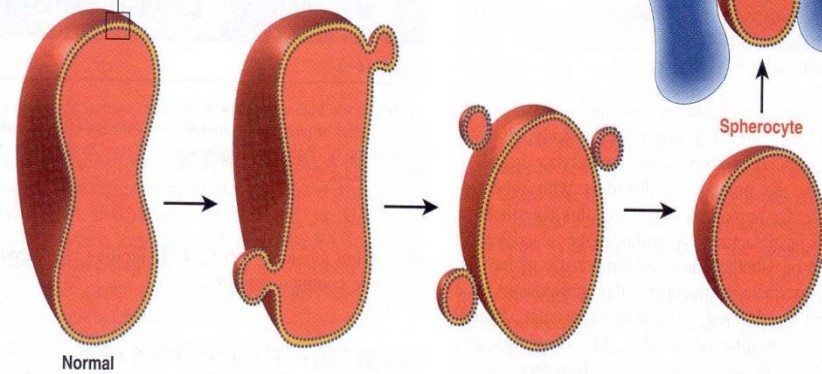
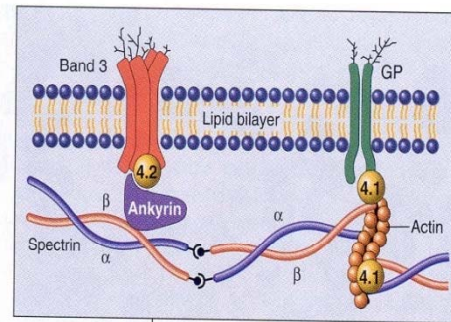
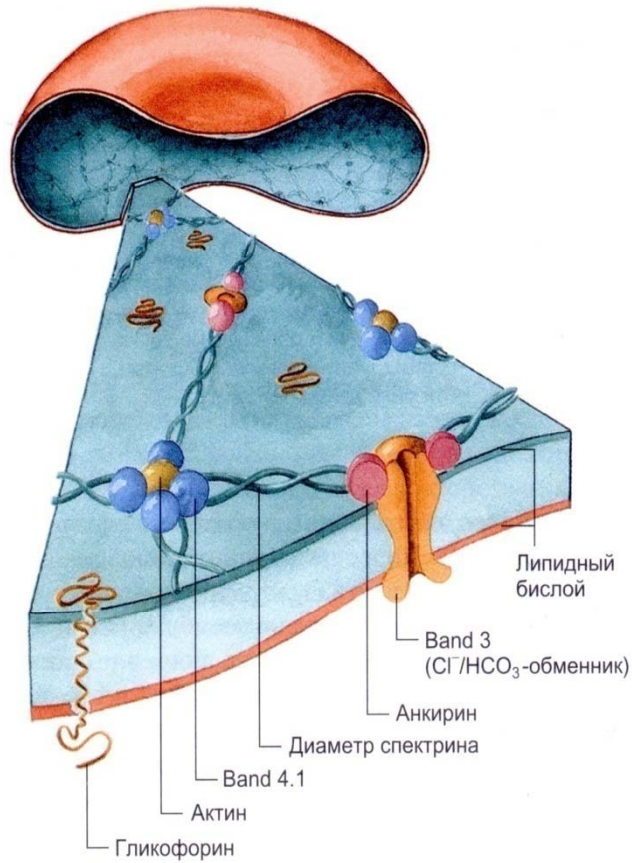
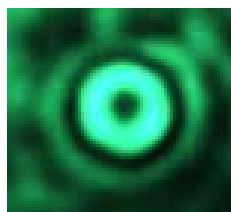


Figure 14-4

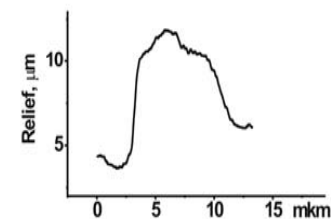
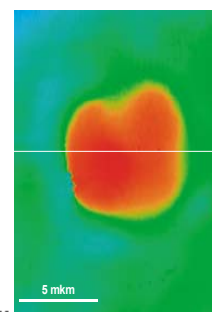
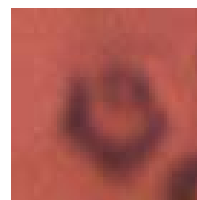
Schematic representation of the red cell membrane cytoskeleton and the effects of alterations in the cytoskeletal proteins on the shape of red cells. With mutations that affect the integrity of the membrane cytoskeleton, the normal biconcave erythrocyte loses membrane fragments. To accommodate the loss of surface area, the cell adopts a spherical shape. Such spherocytic cells are less deformable than normal and are therefore trapped in the splenic cords, where they are phagocytosed by macrophages.

Исследование структуры цитоплазмы эритроцита с помощью интерференционной микроскопии

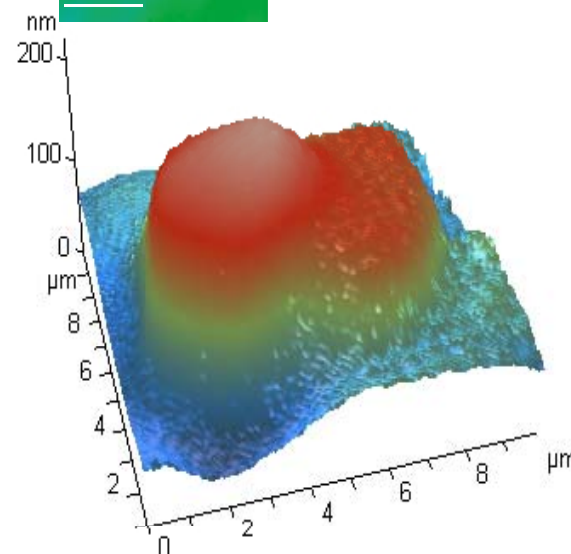
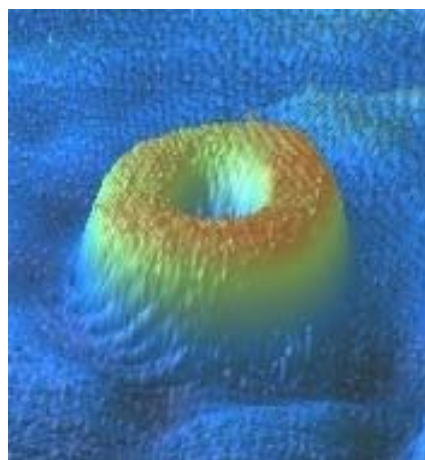
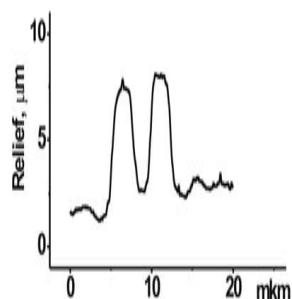
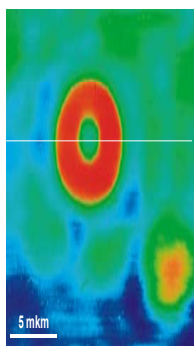
Оптическое изображение, интерференционное изображение, фазовый профиль дискоцита (A) и сфероцита (B)



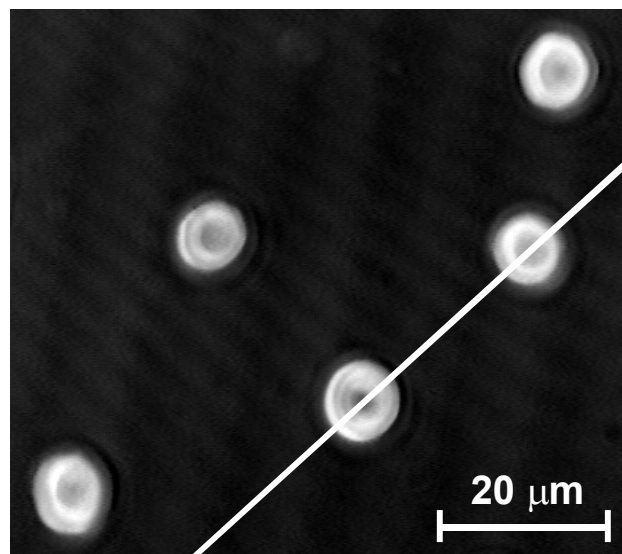
A



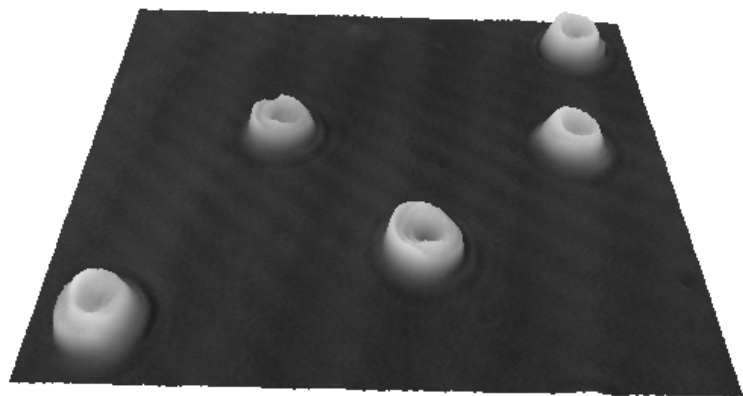
B



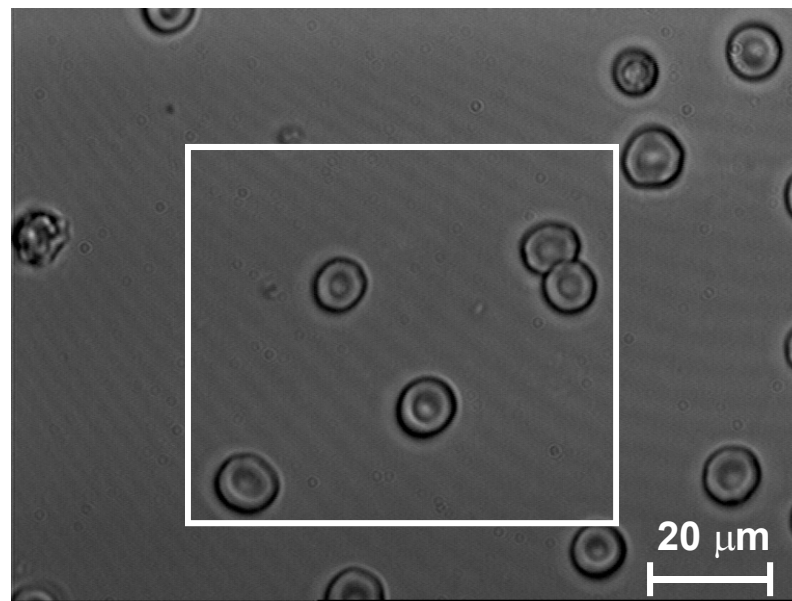
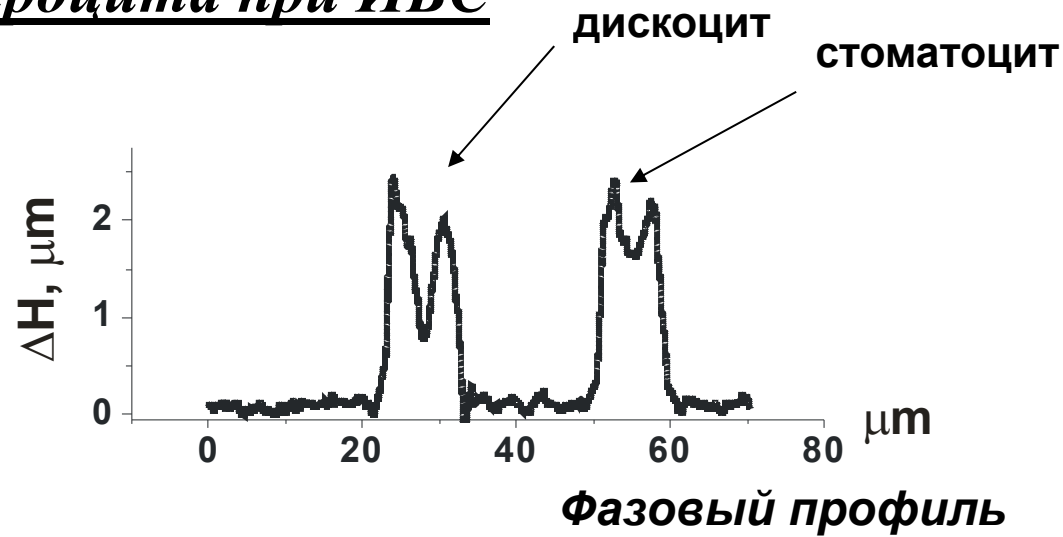
Интерферометрия эритроцита при ИБС



Фазовое изображение

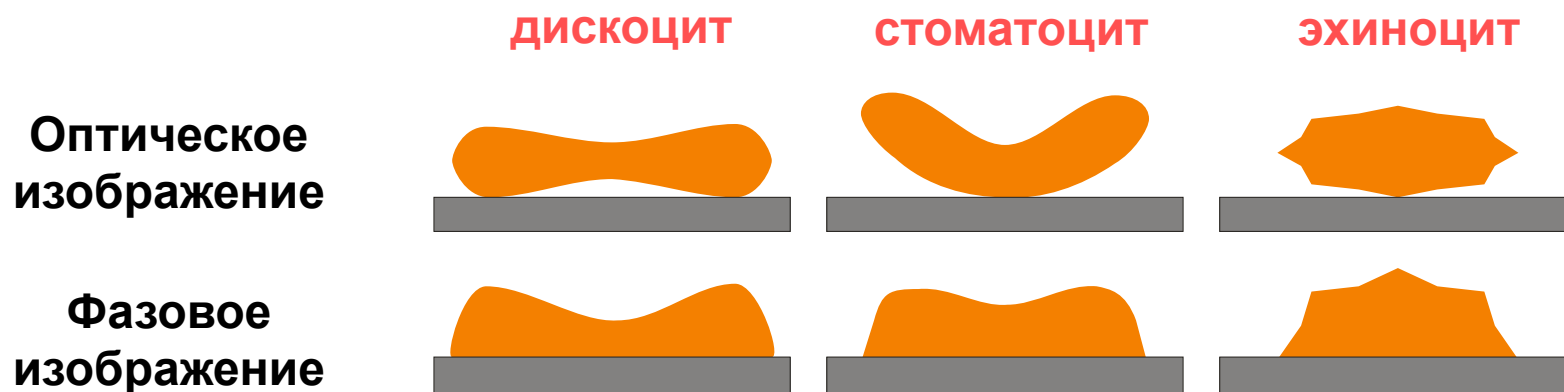


3D-изображение



Реальное оптическое изображение

Различные формы эритроцита при ИБС

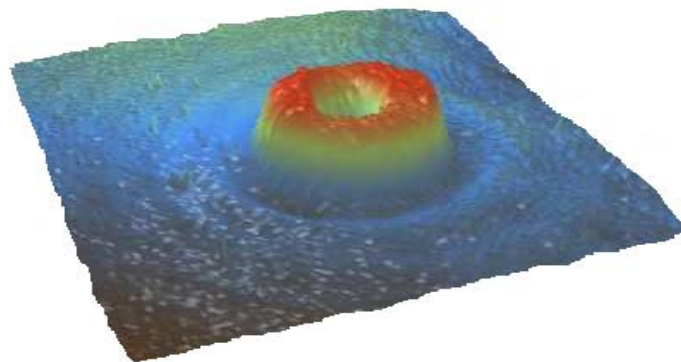


Erythrocyte shape	Control, %	CHD, %
Discocyte	91	78
Echinocyte	6	9
Stomatocyte	3	13

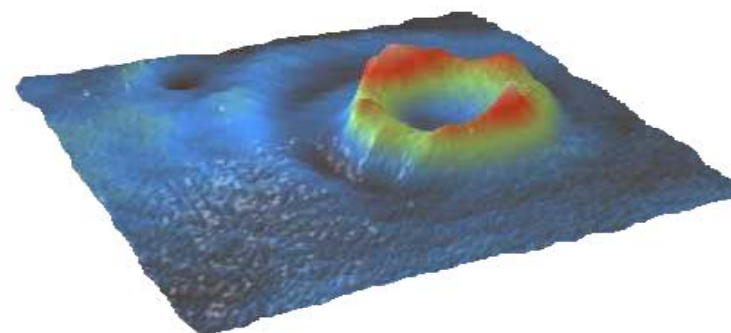
При ИБС обнаружено снижение числа дискоцитов и увеличение стоматоцитов и эхиноцитов

Распределение цитоплазмы в эритроците в норме (А)
и при недостаточности кровообращения (Б)

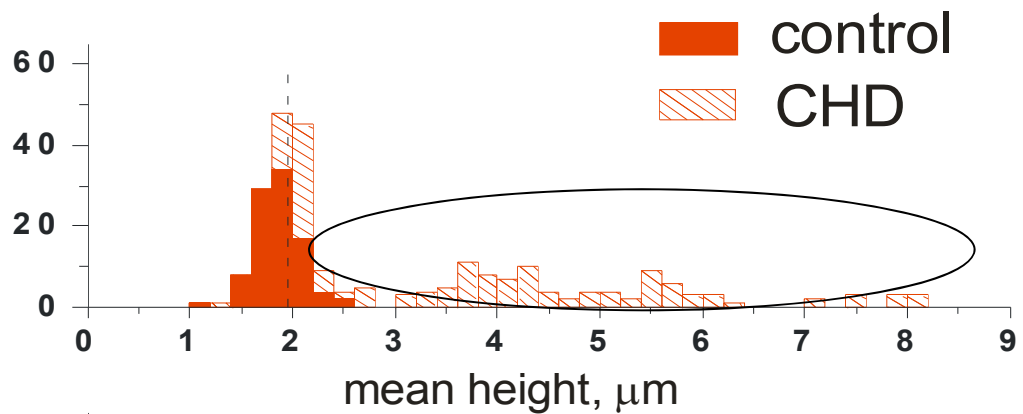
А



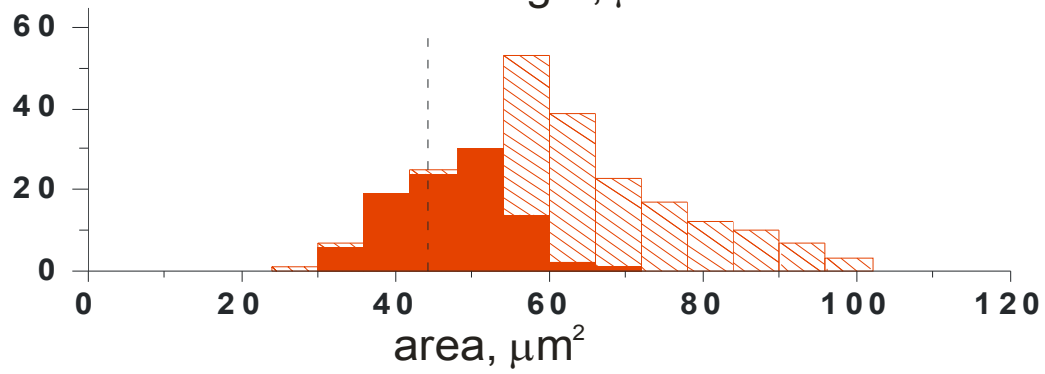
Б



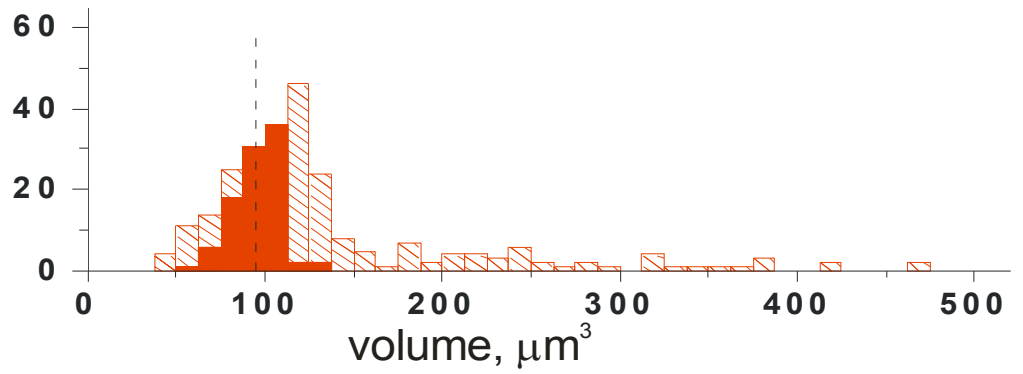
Гистограмма распределения высоты, площади и объема эритроцитов при ИБС



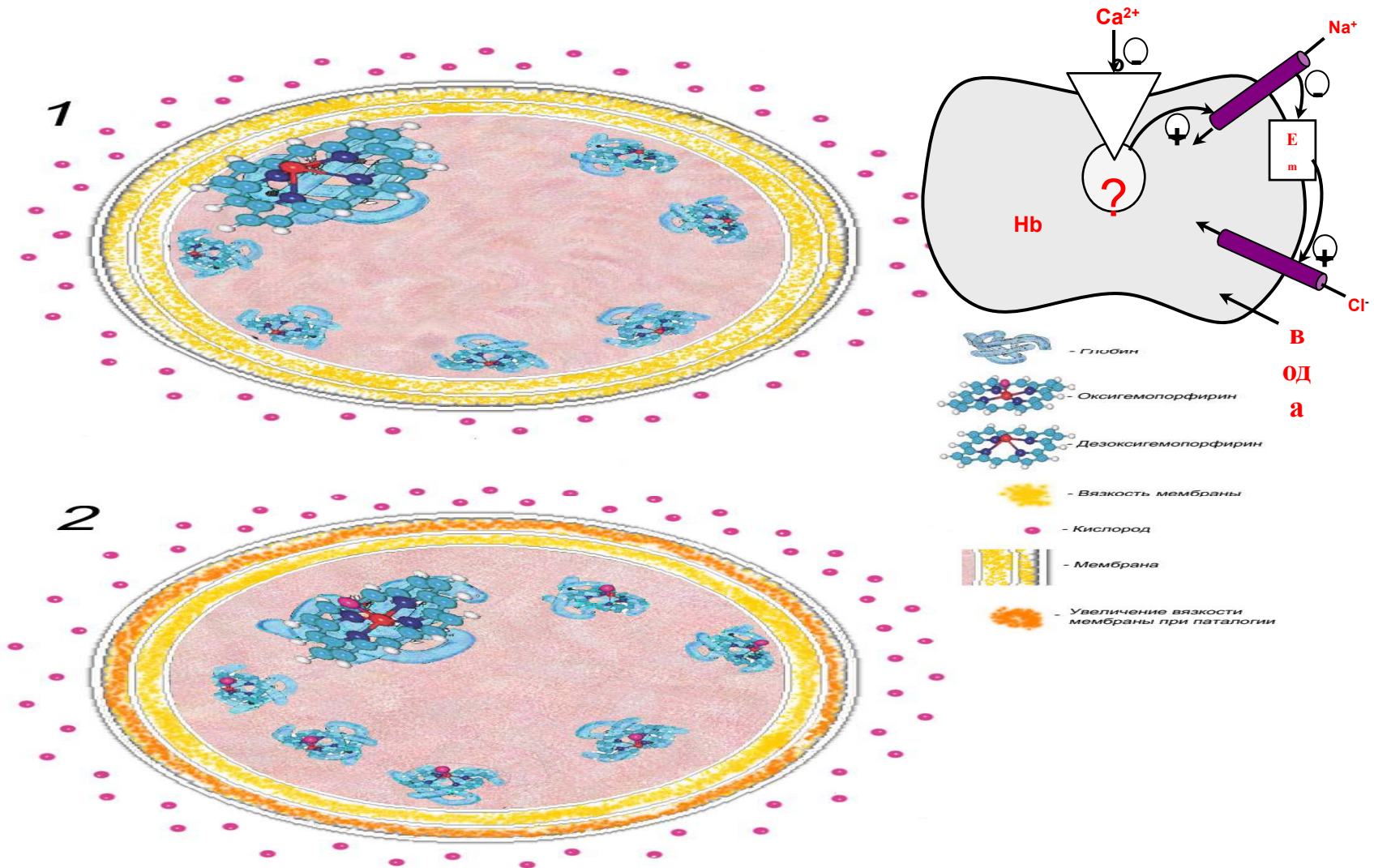
Дополнительные пики на гистограмме соответствуют увеличению уровня агрегации клеток



Увеличение площади эритроцита



Возможные механизмы регуляции состояния эритроцита

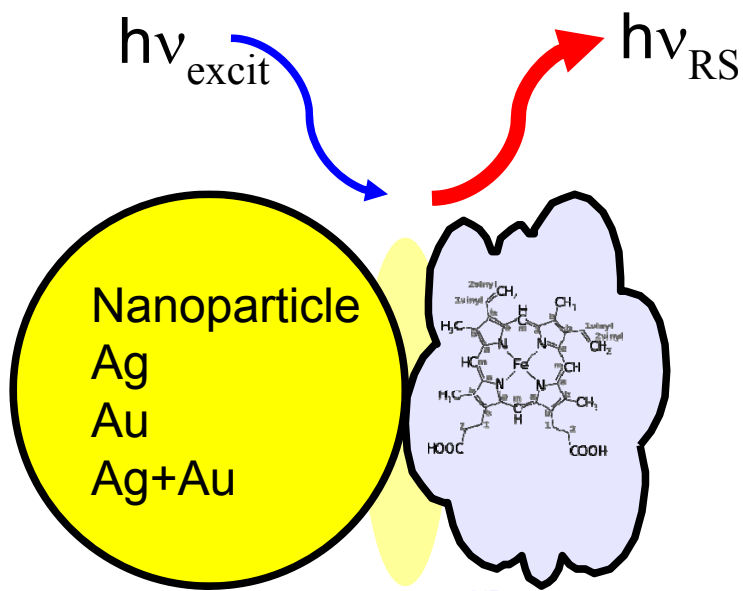


Выводы

- Гипоксия при сердечно-сосудистой патологии сопровождается увеличением вязкости плазматической мембраны, активности Na^+/H^+ -обмена, Ca^{2+} зависимых K^+ -каналов, а также снижением активности Ca^{2+} -АТФазы и числа комплексов Hb-NO, регулирующих сброс O_2
- Гипоксия в условия высокогорья сопровождается увеличением вязкости плазматической мембраны и увеличением числа комплексов Hb-NO, регулирующих сброс O_2

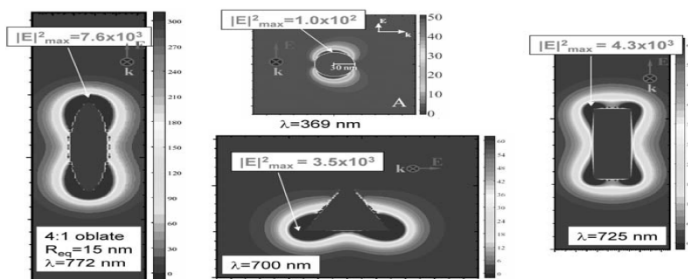
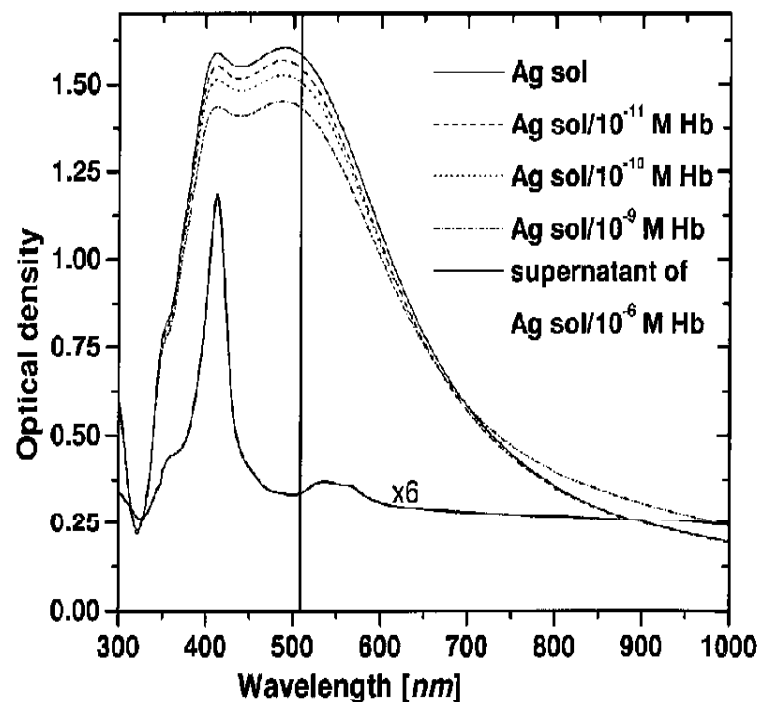
**Использование наночастиц
для исследования
конформаций примембранного
гемоглобина в нативном
эритроците**

Спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния для исследования конформации гемопорфирина гемоглобина (Surface Enhanced Raman Spectroscopy, SERS, ГКР)



плазмонно-резонансное усиление КР на расстоянии <15-20 нм от НЧ

[Moskovitz, 1985; Wokaun et al., 1983]



Усиление падающего излучения на НЧ разной формы. НЧ получены восстановлением нитрата серебра гидросиламингидрохлоридом при щелочном рН и комнатной температуре.

Спектроскопия ГКР

Наночастицы и наноструктурированные поверхности (НЧ и НСП)

Специфические сенсоры

К поверхности “пришиты” определенные молекулы, спектр ГКР которых зависит от окружения, или молекулы, избирательно присоединяющие интересующее вещество

Пример: НЧ-“рН-метр”,
НСП-“глюкозомер”

Усилители сигнала КР от исследуемых молекул

Обнаружение вещества в субмикромольных концентрациях

Исследование изменения конформации и свойств молекул при низких концентрациях, **В ОПРЕДЕЛЕННЫХ КОМПАРТМЕНТАХ КЛЕТКИ!**

Модификация поверхности НЧ для стабильности, улучшения сорбции молекул и проникновения в клетку

И
Требования к веществам, модифицирующим поверхность: **отсутствие спектров КР**, нетоксичность

Задача

Исследование конформации и свойств молекул в клетке на примере кислород-связывающих свойств примемембранного гемоглобина эритроцита

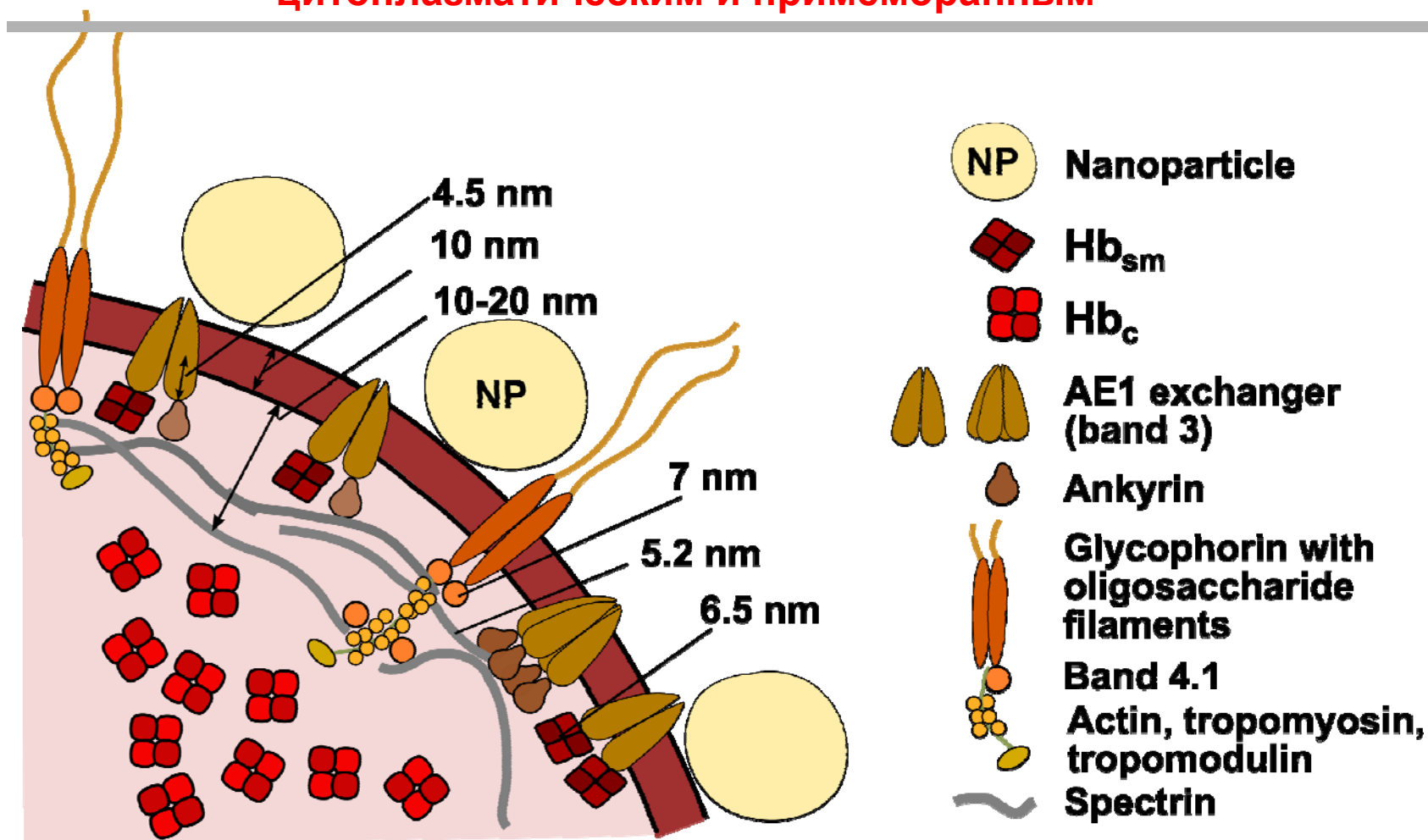
Требования:

1. Специфичность – усиление сигнала КР от нужных молекул;
2. Высокая повторяемость результатов: стабильность НЧ или НСП (фактора усиления), отсутствие вариабельности гетерогенности НЧ по форме, размерам и т.д.
3. Нетоксичность;
4. Устойчивость НЧ в физиологических растворах

Анализ спектров ГКР:

Структура и интенсивность спектра, а также соотношение интенсивностей выбранных полос; фактор усиления

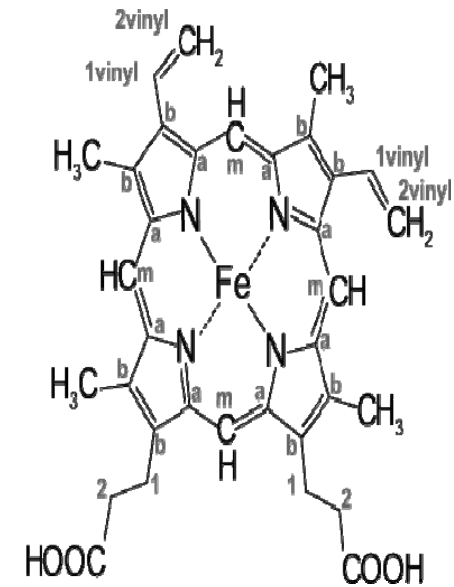
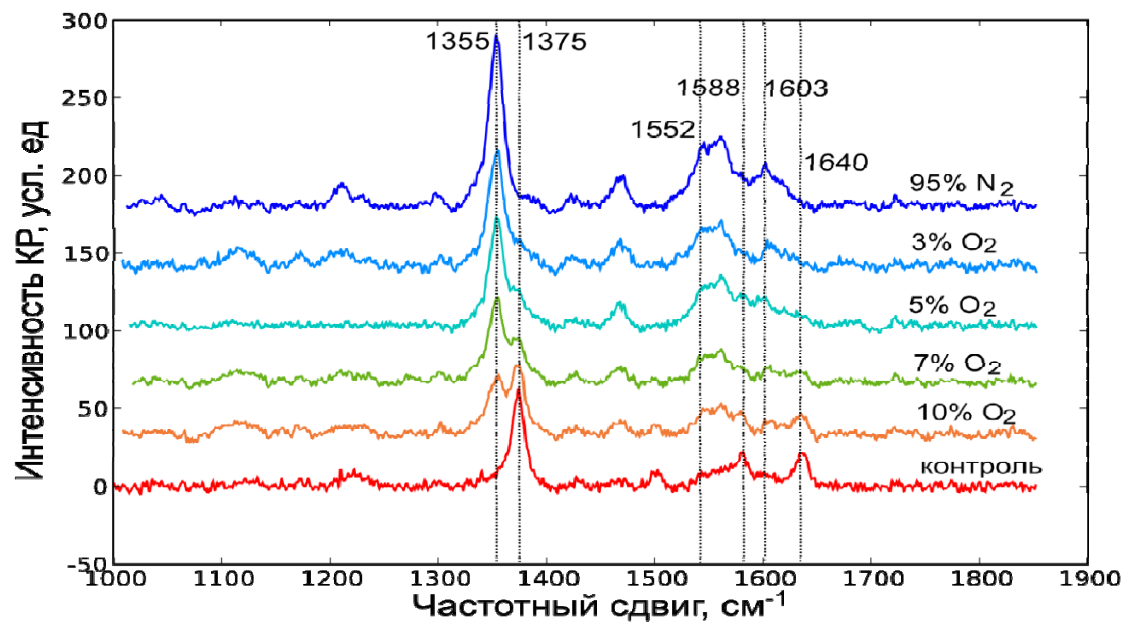
Объект Участок эритроцита с плазматической мембраной и трансмембранными белками, наночастицами Ag, цитоскелетом и двумя типами гемоглобина: цитоплазматическим и примембранным



Brazhe, Abdali, Brazhe, Luneva, Bryzgalova, Parshina, Sosnovtseva, Maksimov. *Biophys.J.*, 2009

Спектры КР эритроцита при разном парциальном давлении O_2

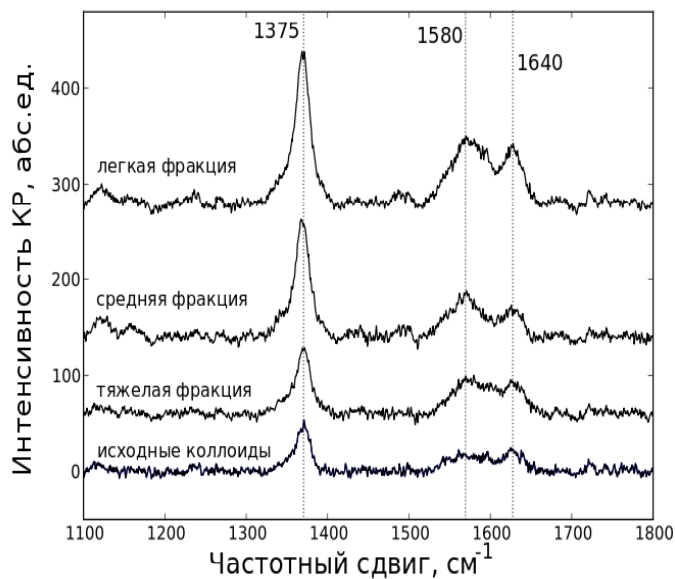
Вертикальными пунктирными прямыми показаны положения полос 1375 см^{-1} и 1355 см^{-1} , соответствующих колебаниям связей C_aC_b , C_aN , C_aNC_a (симметричные колебания полуколец пиррола чувствительны к степени окисления железа и наличию шестого лиганда) в о-Гб и д-Гб. Интенсивность полос КР нормирована на сумму интенсивностей полос о-Гб и д-Гб. Спектры получены при использовании лазера длиной волны - 473 нм .



Приготовление наночастиц серебра (НЧС)

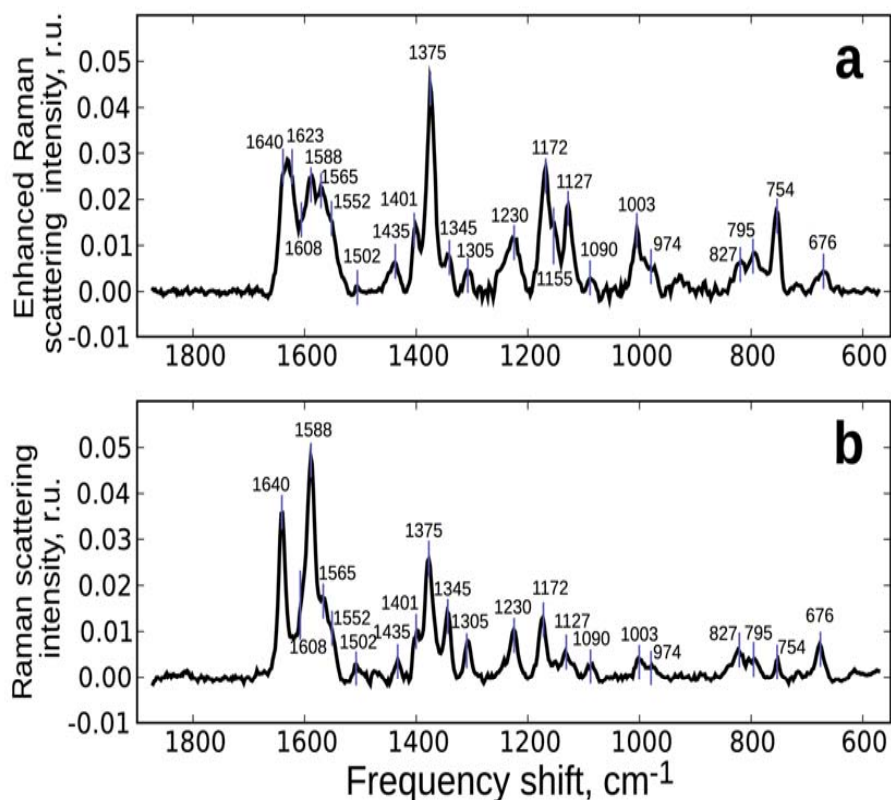


НЧС получены восстановлением нитрата серебра гидросиламингидрохлоридом при щелочном рН и комнатной температуре. Фотография пробирок с коллоидными растворами серебра. Слева направо: исходные коллоиды, тяжелая фракция коллоидов, средняя фракция коллоидов, легкая фракция коллоидов



Спектры ГКР Гб_М эритроцитов, полученные при использовании исходных коллоидов и коллоидов разных фракций. Разведение крови в 10000 раз, объемное соотношение суспензии эритроцитов:НЧС=3:2. Отмечены полосы 1355 см⁻¹ (д-Гб) и 1375 см⁻¹ (о-Гб).

Спектр КР (разведение в 10^2 , а) и ГКР эритроцитов (разведение в 10^4 , б)



Фактор усиления:

$$K.У. = (I_{ГКР} / I_{КР}) \cdot (C_{КР} / C_{ГКР}),$$

где $I_{ГКР}$ и $I_{КР}$ - интенсивности выбранной полосы в спектрах ГКР и КР, соответственно, $C_{КР}$ и $C_{ГКР}$ - концентрации аналита в экспериментах КР и ГКР [Wang et al., 2003].

Величина фактора усиления может достигать $10^{14} - 10^{15}$, что позволяет детектировать единичные молекулы [Wang et al., 2003].

$$K.У. \cdot \text{Лазер } 532 \text{ нм} : 10^5$$

$$K.У. \cdot \text{Лазер } 473 \text{ нм} : 10^7$$

(при условии, что ГКР получено от каждой молекулы Гб_{МС})

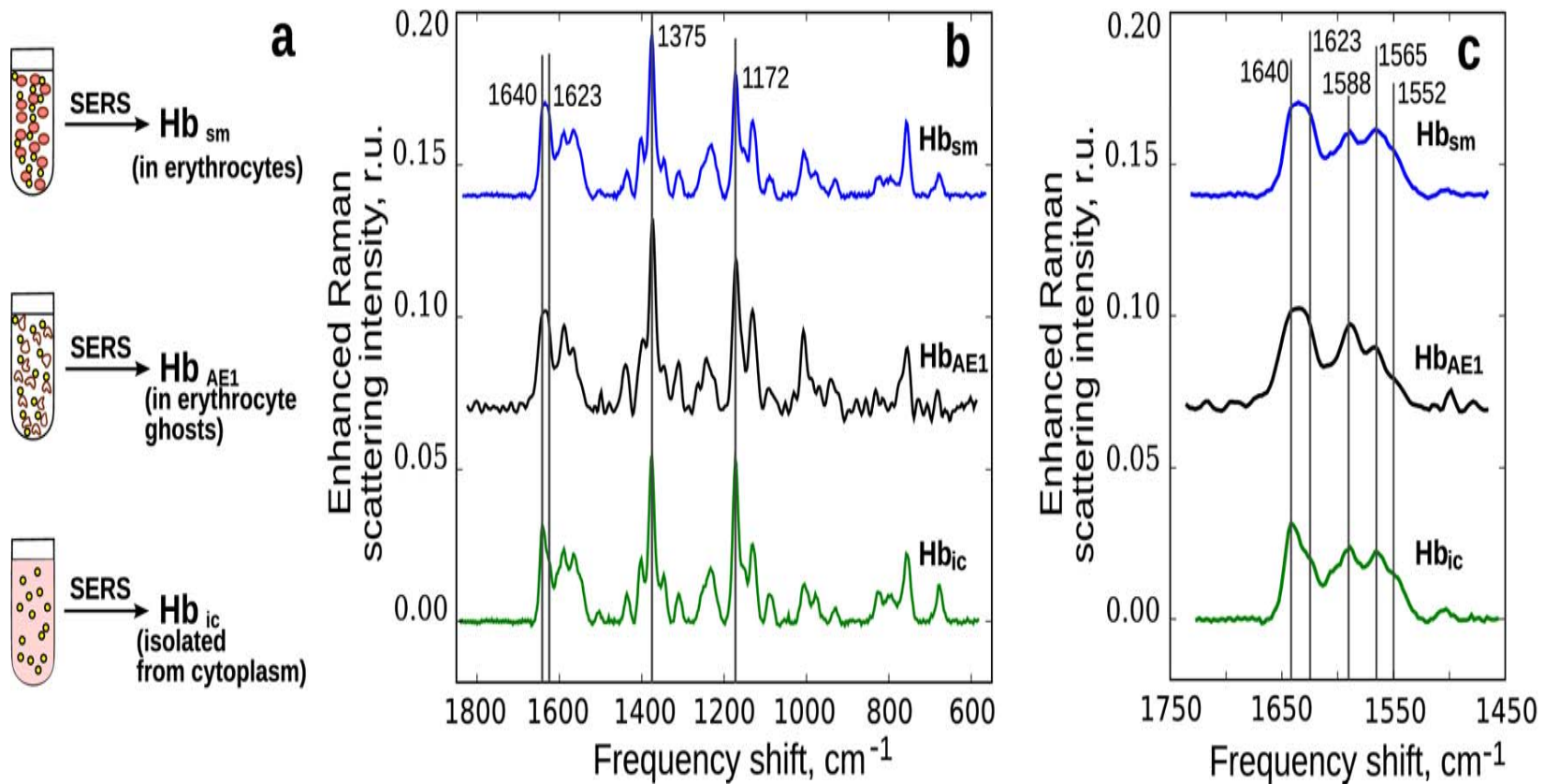
Особенности спектров ГКР:

Спектр ГКР \neq усиленный спектр КР: спектры ГКР практически никогда не являются точной копией спектров КР [Moskovits et al., 1985].

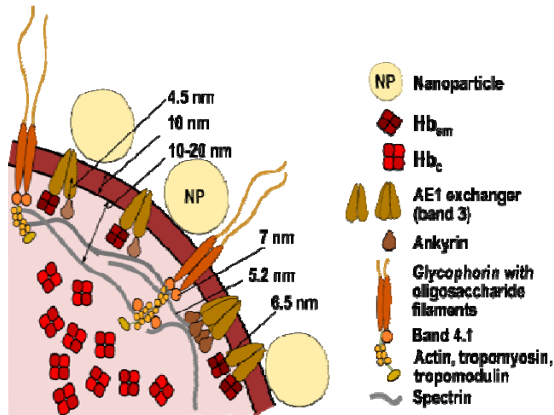
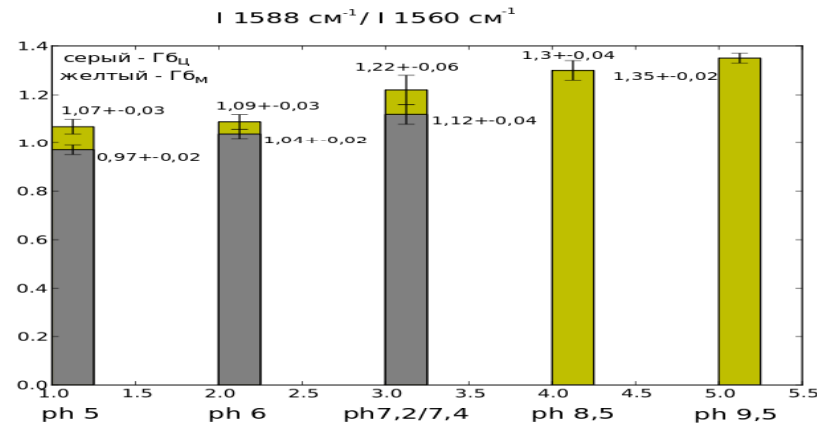
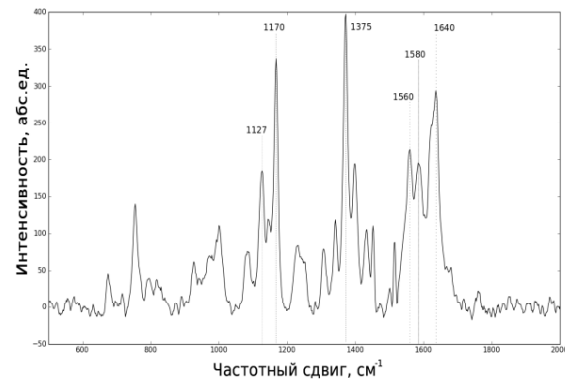
1. **Усиление в низкочастотной области больше, чем в высокочастотной;**
2. **Усиление полосы в спектре ГКР зависит от ориентации связей молекулы по отношению к НЧ, т.е. как молекула/клетка сорбировались на НЧ;**
3. **При взаимодействии с НЧ изменяется симметрия молекулы и в спектре ГКР появляются асимметричные колебания (для центрально-симметричных молекул)**

Спектры ГРП эритроцитов (синий цвет),
гемоглобина, связанного на мембране теней эритроцитов (черный цвет) и
изолированного цитоплазматического гемоглобина (зеленый цвет)

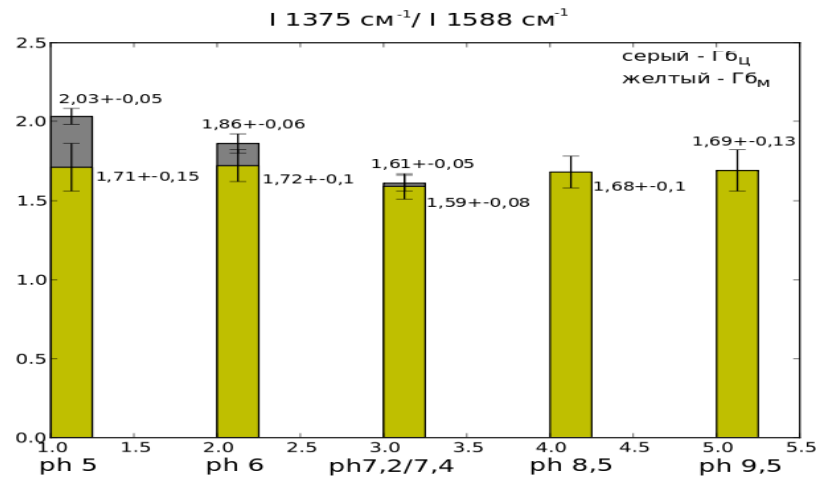
Спектр ГРП эритроцита обусловлен «примембранным» гемоглобином!



Зависимость конформации гемопорфирина приемембранного гемоглобина ($\Gamma\text{б}_M$) и гемоглобина цитоплазмы ($\Gamma\text{б}_C$) от экстраклеточного pH

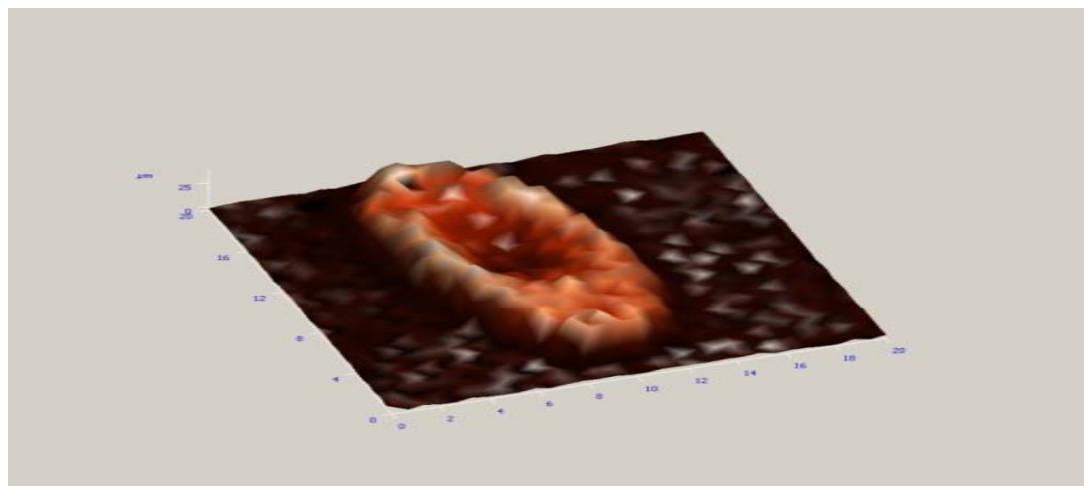
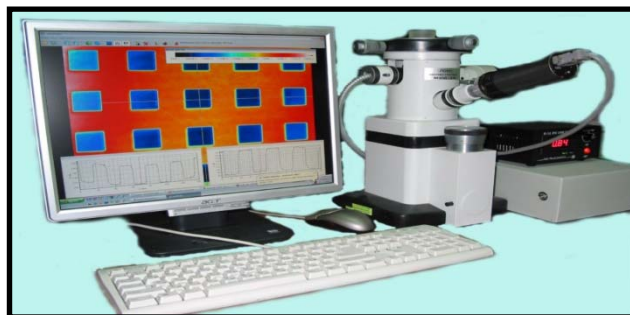
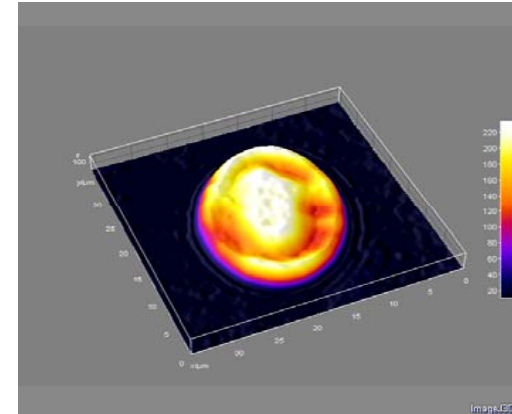
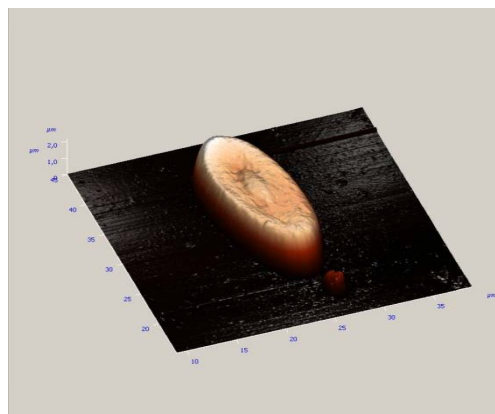


связывание и сброс O_2



Задача 1. Диагностика на отдельной клетке

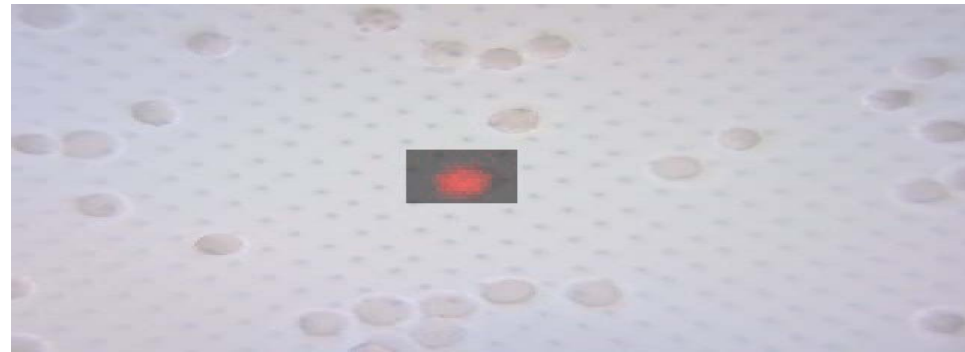
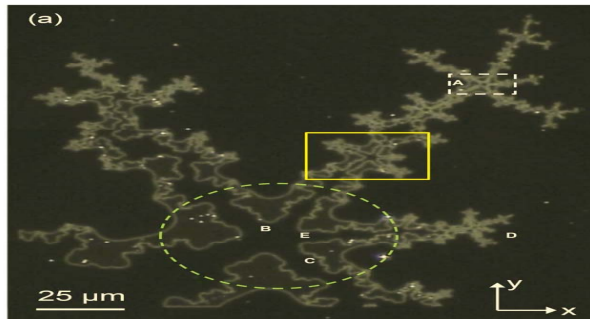
Ядерный эритроцит: АСМ (а), ЛИМ (б), КР-микроскопия (в)



Совместно с Всероссийским научно-исследовательским институтом оптико-физических измерений, Москва и компанией НТ-МДТ, Зеленоград, Москва, РФ

Задача 2. Использование для ГКР наноструктурированной подложки

геометрия подложки определяет фактор сигнала в заданной области спектра (расстояние между элементами, 7-8 мкм, высота элемента, 300 нм, диаметр сферы, 30 нм)



подложка Au: 50 нм толщина, НЧЗ с диаметром 100 нм.
(электроннолучевая литография)

Beermann et al., J.Opt.Soc. Am.B,
2009

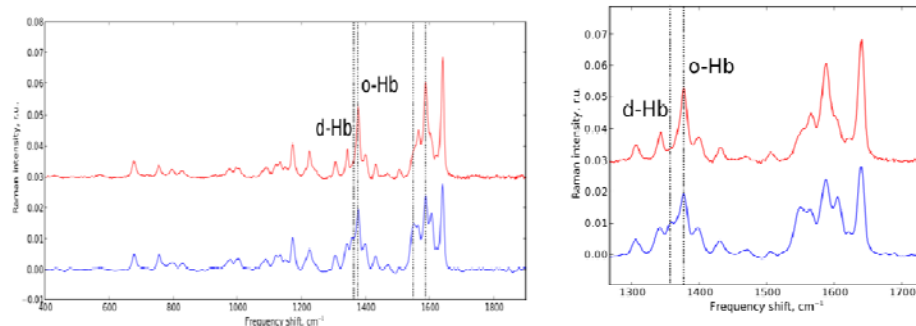
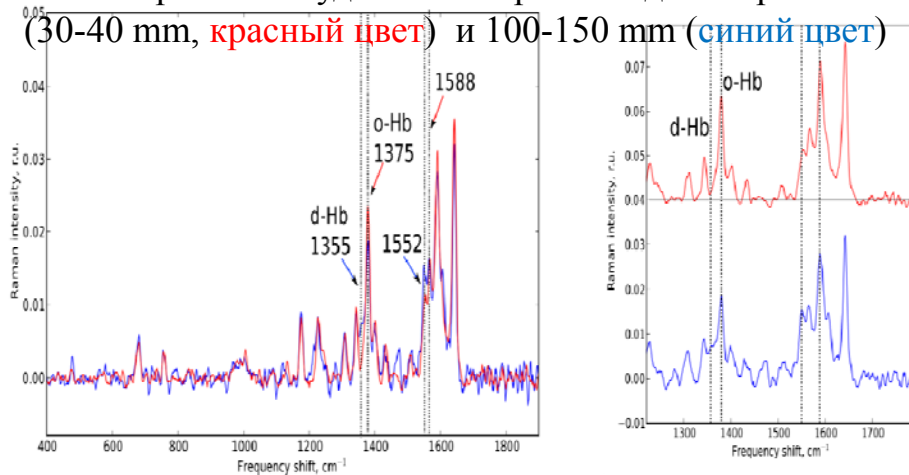
Совместно с факультетом наук о материалах МГУ им. Ломоносова,
Москва, РФ



Задача 3. КР спектроскопия сосудов целого организма

КР спектроскопия сосудов мозжечка мозга (А) и соединительной ткани кишечника (Б) крысы

А. Спектры КР сосудов мозга крысы с диаметром (30-40 mm, **красный цвет**) и 100-150 mm (**синий цвет**)



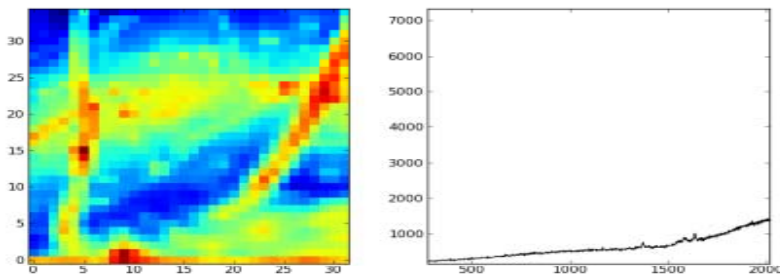
Полосы 1355 и 1375 cm^{-1} спектра КР зависят только от содержания д-Нб и о-Нб, соответственно
Полосы 1552 и 1588 cm^{-1} зависят как от содержания д-Нб и о-Нб, так и способности Нб связывать и сбрасывать O_2

Регистрация: диаметр участка 2.5 μ ; время накопления 40 с

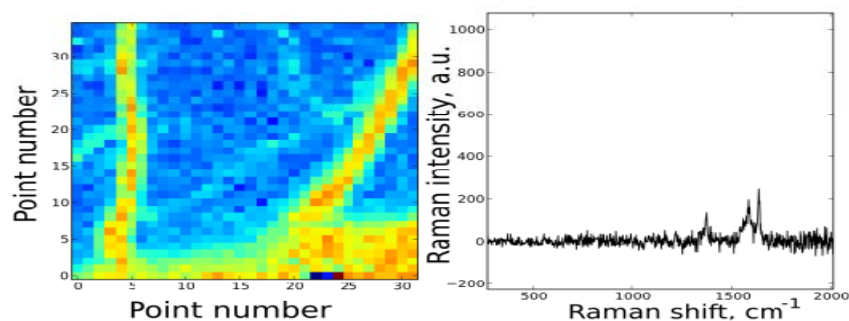
Совместно с медицинским факультетом университета в Копенгагене, Дания

Б. артериолы (**красный цвет**) и вены (**синий цвет**)

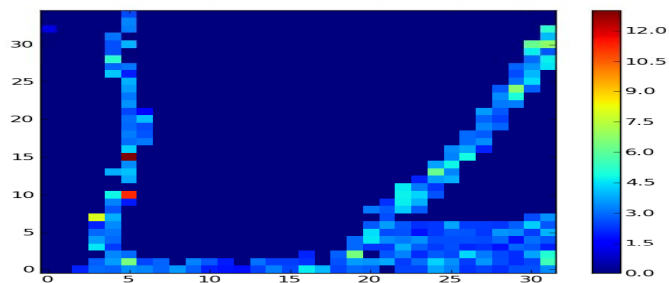
Визуализация сосудов с помощью КР спектроскопии гемопорфирина



Изображение получено при отсутствии коррекции каждой точки с базовой линией. Интенсивность в каждой точке равна сумме интенсивностей всего спектра. Объектив 5; Диаметр окна (step size) 10 μm . Время накопления- 15 с; число -31.



Изображение получено при коррекции каждой точки к базовой линии. Интенсивность в каждой точке равна сумме интенсивностей всего спектра. Объектив 5; Диаметр окна (step size) 10 μm . Время накопления- 15 с; число -31.



Изображение получено при коррекции базовой линии и нормировке на содержание о-Нв. Интенсивность в каждой точке эквивалентно соотношению полос КР спектра $(I_{1365}-I_{1380})/(I_{1350}-I_{1360})$