

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ имени М.В.ЛОМОНОСОВА»**

**ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
КАФЕДРА МОЛЕКУЛЯРНЫХ ПРОЦЕССОВ И ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ СОСТОЯНИЙ ВЕЩЕСТВА**

На правах рукописи
УДК 535.36:53.082.5:
612.398.1:577.32

Федорова Ксения Вячеславовна

**Оптические свойства макромолекул белков и
ферментов в водных растворах, содержащих
металлические ионы**

Специальность:
01.04.05–оптика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель
д.ф.-м.н., проф. Петрова Г.П.

Москва – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	5
Глава 1. Экспериментальные оптические методы исследования жидкостей и растворов.....	13
1.1 Метод интегрального светорассеяния.....	13
Основные положения теории рассеяния света.....	13
Анизотропия рассеяния.....	15
Теория Рэля-Дебая. Определение молекулярного веса рассеивающих частиц.....	17
1.2 Метод динамического светорассеяния.....	20
Общие представления о диффузионных процессах в жидкостях.....	20
Процесс диффузии в растворах макромолекул.....	22
Теоретические основы метода динамического рассеяния.....	28
Принцип работы коррелятора.....	31
Определение коэффициента трансляционной диффузии с помощью корреляционных функций.....	33
1.3 Основные положения теории дзета-потенциала.....	36
Электрокинетический потенциал.....	37
Глава 2. Основные свойства белковых молекул.....	41
2.1. Состав и строение белков.....	41
2.2. Поведение белковых молекул в растворе. Теория Дебая-Хюккеля.....	47
Глава 3. Особенности взаимодействия молекул биополимеров в трехкомпонентной системе (литературный обзор).....	51

3.1. Поведение коэффициента межмолекулярного взаимодействия в трехкомпонентных растворах. Теория Скэтчарда.....	51
3.2. Исследования рассеивающих свойств растворов белков, содержащих малые ионы.	53
3.3 Структурные температурные переходы лизоцима.....	60
3.4 Структурные переходы креатинкиназы.	64
3.5. Эффект Хофмейстера	67
Специфический ионный эффект в биологических структурах	69
3.6. Практические применения методов рассеяния света.....	72
Глава 4. Экспериментальное исследование водных растворов белков и ферментов оптическими методами	76
4.1 Объекты исследования и подготовка образцов.	76
4.2 Определение инкремента показателя преломления среды.....	79
4.3 Описание экспериментальных установок.	81
Экспериментальная установка по определению коэффициента рассеяния и коэффициента деполяризации.	81
Экспериментальная установка Photocor complex.	83
Анализатор размеров частиц и дзета-потенциала Zetasizer Nano.	87
Атомно-силовой микроскоп.....	91
4.4 Исследование оптических свойств молекул лизоцима при изменении внешних параметров (ионной силы, концентрации, температуры, кислотности).....	94
Оптическая анизотропия.	94
Измерение коэффициента межмолекулярного взаимодействия и массы рассеивающих частиц.....	98
Изоэлектрическая точка лизоцима.	100

Взаимодействие лизоцима с металлическими ионами, обладающими большими ионными радиусами и тяжелыми металлами.	104
Исследование белковых нанокластеров с помощью АСМ.....	108
Физическая модель образования нанокластеров.	112
Структурные изменение ферментов под воздействием металлических ионов.	113
4.5 Краткие выводы главы 4.	119
Глава 5. (Приложение). Применение методов рассеяния света для разработки и создания оптических методов диагностики онкозаболеваний....	121
5.1 Сыворотка крови и создание модельных растворов сыворотки крови.	121
5.2 Способы диагностики онкологических заболеваний, основанные на методе светорассеяния.	124
5.3 Краткие выводы главы 5.	129
Заключение	130
Список публикаций по результатам диссертации:	133
Литература	137
Благодарности	146

ВВЕДЕНИЕ

Динамические свойства оптически анизотропных макромолекул, к которым относятся белки и ферменты, а также межмолекулярные взаимодействия между ними в растворах играют чрезвычайно важную роль в функционировании различных биосистем.

Макромолекулы белков и их водные растворы являются уникальными для исследования с помощью оптических методов, поскольку масса белковой молекулы строго определена для каждого вида белка, при этом поверхность белковой молекулы имеет определенную величину заряда, которую можно изменять путем изменения *pH* раствора.

Динамические параметры молекул белков – различные времена корреляции и трансляционные движения, а также параметры переноса определяются такими статическими характеристиками молекул, как поверхностный заряд, молекулярная масса, форма молекул и характер межмолекулярного взаимодействия. Аномально высокое значение дипольного момента молекул белков (более сотен единиц Дебая) связано с тем, что их суммарный поверхностный заряд может достигать больших величин (как положительных, так и отрицательных).

Статические параметры макромолекул можно эффективно определять с помощью метода рэлеевского светорассеяния. Результаты немногочисленных экспериментов, проведенных до последнего времени методом светорассеяния, неоднозначны.

Так как изменение тензора электронной поляризуемости молекулы белка в водных растворах связано с взаимодействием ее поверхностных групп с молекулами окружающей воды, то большой интерес представляет исследование поляризационных свойств молекул.

Как было показано в некоторых работах [1-8], поляризационные характеристики молекул альбумина, гамма-глобулина, фибриногена в водных

растворах существенно зависят от поверхностного заряда макромолекулы белка. Поверхностный заряд молекулы определяется концентрацией свободных ионов водорода в растворе и достигает минимального значения - нуля - в так называемой изоэлектрической точке.

В условиях современной жизни особенно интересным представляется изучение неизбежного влияния на биологические системы (к которым относятся живые организмы) различных отрицательных факторов и токсических воздействий, среди которых особое внимание следует уделить воздействию тяжелых металлов.

Известно, что развитие патологических процессов в организме, таких как сердечно-сосудистые и онкологические заболевания, сопровождается изменениями ряда молекулярных параметров в клетках, тканях, а также в сыворотке крови [9-10]. Поэтому исследование поведения белковых макромолекул в растворах является очень важным для понимания процессов, происходящих в живых организмах.

Наиболее прямыми и эффективными методами исследования этих процессов являются оптические методы (неразрушающие и неинвазивные), в том числе методы статического и динамического рассеяния света, а также методы непосредственной визуализации размеров и форм макромолекул и их агрегатов - атомная силовая микроскопия.

При развитии различных патологий в организме оптические параметры белковых молекул, такие как суммарный поверхностный заряд, оптическая анизотропия, параметры тензора поляризуемости, коэффициенты межмолекулярного взаимодействия, коэффициенты трансляционной и вращательной диффузии, могут значительно изменяться.

Во многих растворах и биологических жидкостях, входящих в состав живых организмов, присутствуют соли различных металлов. Металлы и их соединения необходимы для нормальной жизнедеятельности организма, но многие из них при превышении допустимой концентрации могут оказаться токсичными и создать угрозу для здоровья.

Степень разработанности темы

Влияния внешних факторов на белки и ферменты, как на основные составные элементы живой природы, представляет собой одну из наиболее актуальных проблем физики конденсированного состояния вещества, а также экологии и медицины.

Результаты, посвященные исследованию свойств водных растворов макромолекул, в том числе ферментов, приведены в трудах отечественных и зарубежных авторов. В литературных источниках различными методами исследуется их структура (конформация цепи), рассматриваются результаты исследования их основных свойств, активности и т.д. Анализ количества публикаций об исследовании белков и ферментов по научной электронной библиотеке (НЭБ) позволяет выявить следующие тенденции:

- при высокой общей научно-исследовательской активности число публикаций биофизической направленности, основанных на использовании оптических методов незначительно;
- оптические исследования свойств растворов белков и ферментов составляют менее 10% от общей исследовательской активности.

Это позволяет считать данную тему перспективной для исследования.

Цель диссертационной работы

Целью данной работы является исследование с помощью оптических методов молекулярно-динамических процессов, происходящих в водных растворах белков и ферментов при воздействии различных факторов (температуры, pH , концентрации металлических ионов и т.д.) и выявление процессов, приводящих, в частности, к отравлению организма токсичными соединениями.

Электростатические взаимодействия ионов тяжелых металлов с биологическими макромолекулами, такими как ферменты, приводят к агрегации белков, аномалии молекулярной подвижности заряженных

биополимеров и аномальной сорбции металлических ионов на поверхности белковых макромолекул.

В задачу исследования входит определение оптических параметров дипольных кластеров, образующихся при изменении концентрации составляющих компонентов растворов (главным образом, ряда ферментов), величин поверхностного заряда макромолекул (pH среды), ионной силы и температуры, а также характера межмолекулярного взаимодействия. Эти данные необходимы для понимания физического механизма токсического воздействия тяжелых металлов на живые системы.

Исходя из общей цели, в диссертации ставился ряд задач:

- Исследование воздействия ионов металлов, обладающих различными ионными радиусами на макромолекулы ферментов в водных растворах с помощью оптических методов при изменении параметров среды.
- Выявление механизма и последствий токсического влияния тяжелых металлов на белки и ферменты.
- Исследование структурных изменений ферментов при воздействии на них малых концентраций металлических ионов.

В качестве практического приложения ставились задачи:

- Исследовать модельные и нативные растворы сыворотки крови с помощью динамического и статического рассеяния света и найти диагностические критерии для разработки методов экспресс-диагностики распространенных заболеваний.
- Проанализировать и сравнить результаты, полученные различными оптическими методами

Научная новизна диссертации обусловлена рядом экспериментальных результатов, впервые полученных в данной работе:

- Впервые обнаружено и детально исследовано возникновение макромолекулярных кластеров в растворах таких ферментов, как лизоцим

и креатинкиназа, содержащих ионы металлов: калия, натрия, европия и свинца.

- Впервые экспериментально исследовано влияние температуры на структуру молекулярных агрегатов, формирующихся в белковом растворе, содержащем ионы металлов.
- С помощью метода динамического рассеяния света выявлены структурные изменения молекул ферментов в водных растворах.

Научная и практическая значимость

Изученное в работе поведение биополимерных макромолекул в растворах и их взаимодействие с ионами различных солей позволяет установить молекулярный механизм патологических изменений в биологических объектах, связанный с токсическим действием тяжелых металлов на живые объекты.

Материалы диссертации могут быть использованы в экологии и медицине при разработках способов контроля качества органических жидкостей и физических методов диагностики распространенных заболеваний, в том числе онкологических, а также для создания диагностических приборов.

Теоретической и методологической основой исследования послужили труды отечественных и зарубежных авторов по изучению поведения основных белков сыворотки крови при изменении внешних параметров (pH , температуры, концентрации, ионной силы, и т.д.). В диссертационной работе использованы экспериментальные методы – статического и динамического светорассеяния, метод двойного слоя и доплеровского смещения скорости и методы атомной силовой микроскопии – АСМ. Проведено сравнение полученных результатов и их анализ.

Положения, выносимые на защиту:

- Оптические методы (динамического и статического рассеяния света) позволяют обнаруживать и детально исследовать процесс возникновения макромолекулярных кластеров в водных растворах ферментов, таких как лизоцим и креатинкиназа, содержащих ионы металлов: калия, европия и свинца.

- Впервые экспериментально исследовано влияние температуры на структуру молекулярных агрегатов, формирующихся в водных растворах лизоцима, содержащих ионы Na^+ и Ca^+ .
- Метод динамического рассеяния света может быть использован для наблюдения структурных изменений молекул ферментов в водных растворах.

В качестве практического приложения проведены исследования модельных и нативных систем – растворов сыворотки крови здоровых людей и пациентов с различными патологиями:

- Отсутствие корреляций между такими параметрами, как масса, коэффициенты межмолекулярного взаимодействия, коэффициенты трансляционной диффузии и интенсивность рассеянного света в исследованных белковых растворах, позволяет использовать их, как диагностические параметры.
- Эффективные массы рассеивающих частиц, параметры межмолекулярного взаимодействия, коэффициенты трансляционной диффузии существенно отличаются для растворов сыворотки крови онкологических больных по сравнению с контрольными образцами.
- Результаты проведенных экспериментов могут быть использованы для разработки методов диагностики и контроля эффективности лечения распространенных заболеваний, в том числе онкологических.

Личный вклад диссертанта

Все вошедшие в диссертационную работу оригинальные данные получены лично автором, либо при его непосредственном участии. Автором осуществлялось планирование и проведение экспериментов, обработка экспериментальных результатов, их анализ. Совместно с руководителем д.ф.-м.н., проф. Петровой Г.П. проходило обсуждение и обобщение полученных результатов.

Достоверность и обоснованность результатов, полученных в диссертационной работе, подтверждается их соответствием

экспериментальным результатам, полученным с помощью других методов; а также соответствием экспериментально полученных результатов данным, приведенным в работах других авторов. Результаты получены на основе многократно повторенных экспериментов, проведенных на современном научном оборудовании. Результаты исследований были апробированы и представлены более чем на пятнадцати международных конференциях в виде устных и стендовых докладов. Результаты, представленные в диссертационной работе, являются уникальными и получены впервые.

Апробация работы и публикации

Результаты диссертационной работы докладывались на следующих конференциях, семинарах, съездах и школах:

1. The International Conference on Coherent and Nonlinear Optics/ International Conference on Lasers, Applications and Technologies (ICONO/LAT'2016), (Минск, Беларусь, 2016);
2. Восьмой международный научный семинар и Шестая международная научная школа-семинар "Современные методы анализа дифракционных данных и актуальные проблемы рентгеновской оптики" (Великий Новгород, Россия, 2016);
3. Седьмой международный научный семинар и Пятая международная научная школа-семинар "Современные методы анализа дифракционных данных и актуальные проблемы рентгеновской оптики" (Великий Новгород, Россия, 2015);
4. 24th Annual Student Conference Week of Doctoral Students 2015 (Прага, Чехия, 2015);
5. 22nd International Conference on Advanced Laser Technologies (ALT'14), (Кассис, Франция, 2014),
6. XXI Международной научной конференции «Ломоносов-2014» (Москва, Россия, 2014),
7. Всероссийская школа-конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Материалы и технологии XXI века", (Казань, Россия, 2014);
8. 21st International conference on Advanced Laser Technologies (ALT'13) (Будва, Черногория, 2013);

9. 20th International Conference on Advanced Laser Technologies (ALT'12), (Тун, Швейцария, 2012);
10. The 8th Pacific Symposium on Flow Visualization and Image Processing, (Москва, Россия, 2011);
11. Научная конференция к 300-летию М.В. Ломоносова - "Ломоносовские чтения", (Москва, Россия, 2011);
12. 19th International Conference on Advanced Laser Technologies (ALT'11) (Золотые пески, Болгария, 2011);
13. 18th International conference Advanced Laser Technologies (ALT'10), (Эгмонд-ан-зии, Нидерланды, 2010);
14. Международная школа для студентов и молодых ученых по оптике, лазерной физике и биофизике Saratov Fall Meeting (SFM'10), (Саратов, Россия, 2010);
15. III Евразийский конгресс по медицинской физике и инженерии "Медицинская физика–2010" (Москва, Россия, 2010);
16. XVII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2010» (Москва, Россия, 2010).
17. Третья ежегодная конференция «Нанотехнологии в онкологии 2010», (Москва, Россия, 2010);
18. International Conference on laser applications in life sciences (LALS-2010), (Оулу, Финляндия, 2010);
19. 17th International conference Advanced Laser Technologies (ALT'09), (Анталия, Турция, 2009).

Основные результаты диссертационной работы опубликованы в 36 научных работах, из которых 7 – статьи в рецензируемых научных журналах из перечня ВАК России, 7 – статьи в сборниках и 22 – тезисы.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, 5 глав, заключения и списка цитируемой литературы из 132 наименований. Работа изложена на 146 страницах машинописного текста и включает 68 рисунков и 5 таблиц.

ГЛАВА 1. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ОПТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЖИДКОСТЕЙ И РАСТВОРОВ.

Детальное изучение свойств рассеянного света позволяет получить сведения о структуре молекул и молекулярных систем, о природе межмолекулярных и внутримолекулярных сил, а также производить качественный и количественный анализ различных соединений.

1.1 МЕТОД ИНТЕГРАЛЬНОГО СВЕТОРАССЕЯНИЯ

В экспериментах по статическому рассеянию света наблюдается усредненная по времени интенсивность рассеяния света раствором. Анализ угловых и концентрационных зависимостей позволяет получить информацию о размерах рассеивающих центров, их молекулярной массе и коэффициенте межмолекулярного взаимодействия.

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ ТЕОРИИ РАССЕЯНИЯ СВЕТА

При прохождении линейной плоско-поляризованной волны через рассеивающий объем, содержащий раствор макромолекул, амплитуда поля рассеянной волны может быть записана следующим образом:

$$E = \sum_i A_i(t) e^{iqr_i(t)} e^{-i\omega_0 t} \quad (1.1)$$

где вектор $|q| = |k_0 - k_s| = 2|k_0| \sin \frac{\theta}{2} = \frac{4\pi n_0}{\lambda_0} \sin \frac{\theta}{2}$, $|k_0| \approx |k_s|$ – волновые векторы падающего и рассеянного сигналов соответственно, θ – угол рассеяния, n_0 – показатель преломления среды.

При изменении структуры i -ой рассеивающей частицы или ее ориентации (если частица анизотропна) амплитуда рассеяния A_i будет изменяться со временем. Средняя интенсивность может быть записана следующим образом:

$$J_s = \langle |E_s|^2 \rangle = \langle \sum_i \sum_j A_i A_j e^{iq(r_i - r_j)} \rangle \quad (1.2)$$

Рассеянный световой сигнал обычно можно считать стационарным гауссовым случайным процессом. Кроме того, предположим сначала, что положения рассеивателей в разбавленном растворе не коррелированы [12 – 14].

Рассеяние света в чистой (оптически "пустой") жидкости обуславливается флуктуациями плотности в объемах, малых по сравнению с кубом длины световой волны. В растворах к этому добавляется рассеяние на флуктуациях концентрации растворенного вещества в объеме того же порядка. В этом случае интенсивность избыточного рассеяния определяется разностью между интенсивностью рассеяния раствора и растворителя. Характер рассеяния зависит от соотношения между длиной волны и размерами рассеивающей частицы. Если линейные размеры $l \leq \lambda/20$, то рассеяние называется рэлеевским.

Рассмотрим случай малых изотропных молекул $l \leq \lambda/20$ [14 – 16]. Такие молекулы можно рассматривать как точечные дипольные излучатели с дипольным моментом $p = \alpha E$, а избыточная интенсивность рассеяния определяется поляризуемостью α , которая характеризует способность элементов объема смещаться под действием падающей волны. Вычисления приводят к следующему результату для общей интенсивности рассеяния в случае неполяризованного падающего света:

$$J = \frac{16\pi^4}{\lambda_0^4 r^2} \alpha^2 N_0 \Omega J_0 P(\theta), \quad P(\theta) = \frac{1}{2}(1 + \cos \theta). \quad (1.3)$$

Здесь λ_0 и J_0 – длина и интенсивность падающей волны, r и θ – расстояние и угол до точки наблюдения, N_0 число молекул в элементе объема Ω .

Обычно удобнее пользоваться приведенной интенсивностью рассеяния R_θ , не зависящей от произвола в выборе J_0 , r и θ , которая называется рэлеевским коэффициентом рассеяния:

$$R_\theta = \frac{Jr^2}{J_0\Omega} = \frac{16\pi^2}{\lambda_0^4} \alpha^2 N_0 P(\theta). \quad (1.4)$$

Дальнейший расчет устанавливает связь между R_θ и концентрацией раствора c :

$$R_\theta = cHMP(\theta), \quad H = \frac{2\pi^2 n_0^2}{\lambda_0^4 N_A} \left(\frac{dn}{dc} \right)^2, \quad (1.5)$$

где M – молекулярная масса растворенного вещества, H – оптическая постоянная раствора, $\frac{dn}{dc}$ – инкремент показателя преломления раствора, n_0 – показатель преломления растворителя.

Функция $P(\theta)$ в общем случае определяется поляризацией света, размерами, формой и анизотропией рассеивающих молекул. В нашем случае $P(0^\circ) = 1$, $P(90^\circ) = 1/2$ для неполяризованного и $P(\theta) = 1$ для поляризованного падающего света.

АНИЗОТРОПИЯ РАССЕЯНИЯ

В случае неизотропных молекул наблюдается рассеяние света на флуктуациях анизотропии. Величина поляризации характеризуется тензором 2-го ранга, которому соответствует эллипсоид поляризуемости с осями $\{\alpha_{xx}, \alpha_{yy}, \alpha_{zz}\}$ [14-16].

Компоненты индуцированного дипольного момента при этом определяются соотношением:

$$p_i = \alpha_{ix}E_x + \alpha_{iy}E_y + \alpha_{iz}E_z \quad (1.6)$$

Выбором системы координат тензор поляризуемости приводится к диагональному виду. Форма эллипсоида поляризуемости отражает структуру электронных оболочек молекулы. Анизотропия поляризуемости молекулы определяется выражением:

$$\gamma^2 = \frac{1}{2} \left[(\alpha_{xx} - \alpha_{yy})^2 + (\alpha_{yy} - \alpha_{zz})^2 + (\alpha_{zz} - \alpha_{xx})^2 \right] \quad (1.7)$$

Для высоко симметричных молекул эллипсоид поляризуемости имеет вид шара, а $\gamma = 0$.

Анизотропия молекул проявляется в деполяризации рассеянного света. Если поле падающей волны E_{z0} поляризовано по оси z , то в случае

анизотропной среды, индуцированные дипольные моменты p не совпадают по направлению с E_{z0} , поэтому в рассеянном излучении появятся E_{xx} и E_{zz} составляющие электрического поля рассеянного света. Пусть V и H – компоненты R_θ , соответствующие вертикальной и горизонтальной составляющим рассеянного света. Индекс v , h или u будет указывать состояние поляризации в падающем пучке. Различают три коэффициента деполяризации [12-13].

$$\left\{ \begin{array}{l} \Delta_v = \frac{H_v}{V_v}; \\ \Delta_h = \frac{H_h}{V_h}; \\ \Delta_u = \frac{H_u}{V_u} = \frac{H_v + H_h}{V_v + V_h} = \frac{1 + \Delta_h}{1 + 1/\Delta_v} \end{array} \right. \quad (1.8)$$

Можно показать [16], что в каждом случае

- а) для малых изотропных молекул $\Delta_u = \Delta_v = 0$;
- б) для малых анизотропных молекул $0 < \Delta_v < 1, \Delta_h = 1, \Delta_u = \frac{2\Delta_v}{1 + \Delta_v}$;
- в) для больших изотропных молекул $\Delta_v = 0, \Delta_h \rightarrow \infty, \Delta_u > 0$;
- г) для больших анизотропных молекул $0 < \Delta_v < 1, \Delta_h > 1, 0 < \Delta_u < 1$.

Отсюда видно, что информацию об анизотропии частиц несет лишь коэффициент Δ_v , тогда как Δ_u обусловлен их размерами.

Коэффициент деполяризации можно связать с анизотропией тензора поляризуемости. Для вертикально поляризованного падающего света:

$$\Delta_v = \frac{3\gamma^2}{45\alpha^2 + 4\gamma^2} \quad (1.9)$$

Кроме того, из соотношения Лорентц-Лоренца можно получить среднюю поляризуемость

$$\alpha = \frac{1}{3}(\alpha_{xx} + \alpha_{yy} + \alpha_{zz}) = \frac{n_0 M}{2\pi N_A} \left(\frac{dn}{dc} \right). \quad (1.10)$$

Если предположить, что рассеивающие молекулы имеют только две различные компоненты тензора поляризуемости, то последние выражения

позволяют рассчитать значения анизотропии тензора поляризуемости и его компонент [17].

Для малых анизотропных частиц функция $P(\theta)$ принимает вид:

$$P(\theta) = \frac{6+6\Delta_u}{2(6-7\Delta_u)} \left[1 + \frac{1-\Delta_u}{1+\Delta_u} \cos^2 \theta \right] \quad (1.11)$$

Очевидно, что в случае изотропных молекул ($\alpha_{xx} = \alpha_{yy} = \alpha_{zz}$) эта формула переходит в (1.3).

В опытах по светорассеянию обычно наибольший интерес представляет $P(90^\circ)$:

а) для вертикально поляризованного пучка:

$$P_v(90^\circ) = \left[\frac{3+3\Delta_v}{3-4\Delta_v} \right], R_v(90^\circ) = cHM \left[\frac{3+3\Delta_v}{3-4\Delta_v} \right]; \quad (1.12)$$

б) для естественного света:

$$P_u(90^\circ) = \frac{1}{2} \left[\frac{6+6\Delta_u}{6-7\Delta_u} \right], R_u(90^\circ) = cHM \frac{1}{2} \left[\frac{6+6\Delta_u}{6-7\Delta_u} \right]. \quad (1.13)$$

Множитель в квадратных скобках носит название фактора Кабанна [18].

ТЕОРИЯ РЭЛЕЯ-ДЕБАЯ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО ВЕСА РАССЕЙВАЮЩИХ ЧАСТИЦ

Уравнение рассеяния (1.5) позволяет, в принципе, определить молекулярную массу малых невзаимодействующих частиц:

$$M = \left(\frac{cHK}{R_{90}} \right)^{-1}, \quad (1.14)$$

здесь K – фактор Кабанна. Однако в большинстве полимерных растворов сказывается влияние межмолекулярных взаимодействий.

На основе термодинамических соображений Эйнштейн получил более общее выражение для R_{90} [19]. Рассматривая рассеяние на флуктуациях диэлектрической проницаемости, обусловленных флуктуациями ΔN числа рассеивающих частиц в элементарных объемах, малых по сравнению с λ^3 , но содержащих еще достаточное число молекул, он пришел к выражению:

$$R_{90} = \frac{2\pi^2 c n_0^2 (dn/dc)^2}{\lambda_0^4 N_A \frac{1}{RT} \frac{\partial \Pi}{\partial c}}, \quad (1.15)$$

где Π – осмотическое давление раствора. Это же выражение было получено Дебаем [20 – 21].

Зависимость коэффициента рассеяния от $\left(\frac{\partial \Pi}{\partial c}\right)$ имеет понятный физический смысл: разность осмотических давлений в соседних областях препятствует развитию флуктуаций концентрации в растворе, таким образом, чем больше $\left(\frac{\partial \Pi}{\partial c}\right)$, тем меньше развиты флуктуации, тем меньше коэффициент рассеяния.

Для идеальных растворов, в которых скомпенсированы межмолекулярные взаимодействия, выполняется закон Вант-Гоффа

$$\Pi = \frac{cRT}{M}. \quad (1.16)$$

С учетом этого выражения (1.15) сводится к (1.4).

Осмотическое давление раствора как функцию концентрации можно представить в виде степенного ряда:

$$\Pi = RT(Ac + Bc^2 + \dots), \quad (1.17)$$

где A , B и т.д. – вириальные коэффициенты раствора, $A = 1/M$. Отсюда

получаем окончательное выражение:

$$\left(\frac{cHK}{R_{90}}\right) = \frac{1}{M} + 2Bc + \dots. \quad (1.18)$$

Полученная зависимость R_{90} от c делает невозможным определение M путем измерения R_{90} при одной концентрации. Необходимо провести измерения для нескольких c и экстраполировать результаты к $c = 0$. Таким образом, получаем:

$$M = \left(\frac{cHK}{R_{90}}\right)_{c \rightarrow 0}^{-1}. \quad (1.19)$$

Оптическая постоянная раствора H можно найти путем рефрактометрических измерений $\left(\frac{dn}{dc}\right)$ (1.5). Экстраполяцию выполняют

графически, откладывая $\frac{cHK}{R_{90}}$ как функцию c . Наклон прямой позволяет вычислить коэффициент B .

Напомним, что второй вириальный коэффициент характеризует степень неидеальности раствора и учитывает парные межмолекулярные взаимодействия в растворе [15]. Термодинамическая теория растворов макромолекул дает следующее выражение для B :

$$B = \frac{\nu_0 N_A}{2M^2}, \quad (1.20)$$

где ν_0 – исключенный объем, т.е. объем, из которого молекула вытесняет все остальные.

Искривление прямых, выражающих зависимость $\frac{cHK}{R_{90}}$ от c , возникает из-за мультиплетных взаимодействий, которые описываются третьим вириальным коэффициентом в (1.17) [22].

Парциальное разложение осмотического давления строго применимо, вообще говоря, лишь для растворов нейтральных частиц, потенциал притяжения между которыми является Ван-дер-Ваальсовым и спадает как r^{-6} . Белковые же молекулы в растворах при всех значениях pH , кроме изоэлектрической точки, являются заряженными. Потенциал взаимодействия между ними является кулоновским и спадает как r^{-1} . Тем не менее, вокруг макроиона, согласно теории Дебая-Хюккеля, образуется атмосфера противоионов, экранирующая кулоновское взаимодействие. И если рассматривать разбавленные растворы ($c < 5\%$), в которых дебаевский радиус экранировки $r_D < d$, d – среднее расстояние между макроионами растворенного вещества, то изложенная выше теория оказывается применима к белковым растворам. При этом из-за отталкивания одноименно заряженных макроионов будет расти исключенный объем, и B , соответственно, будет иметь большие значения, чем для раствора нейтральных молекул. Следовательно, можно ожидать определенной зависимости B от заряда на белке Z и ионной силы раствора μ .

1.2 МЕТОД ДИНАМИЧЕСКОГО СВЕТОРАССЕЯНИЯ

Информацию о характере теплового молекулярного движения в жидких средах различной природы и, в частности, в растворах биополимеров, можно получить с помощью метода фотонной корреляционной спектроскопии.

ОБЩИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ДИФФУЗИОННЫХ ПРОЦЕССАХ В ЖИДКОСТЯХ.

Диффузия (от латинского *diffusio* – распространение, растекание, рассеивание) – перенос частиц разной природы, обусловленный хаотическим тепловым движением молекул (атомов) в однокомпонентных или многокомпонентных газовых либо конденсированных средах. Такой перенос осуществляется при наличии градиента концентрации частиц или при его отсутствии; в последнем случае процесс называется самодиффузией.

Главной характеристикой диффузии служит плотность диффузионного потока. J – количество вещества, переносимого в единицу времени через единицу площади поверхности, перпендикулярной направлению переноса. Если рассматривается диффузия в многокомпонентной системе, где отсутствуют градиенты температуры, давления, электрического потенциала и др., то поток каждого компонента определяется градиентами химических потенциалов μ_i всех компонентов системы [23]:

$$J_i = -\sum_j L_{ij} \frac{\partial \mu_j}{\partial x}, \quad (1.21)$$

где L_{ij} – учитывает связи между потоками.

В большинстве практических случаев вместо химического потенциала применяется концентрация c . Прямая замена μ на c становится некорректной в случае больших концентраций, так как химический потенциал связан с концентрацией по логарифмическому закону. Если не рассматривать такие случаи, то вышеприведённую формулу для одномерной диффузии можно заменить на следующую:

$$J_i = -D_i \frac{\partial c_i}{\partial x}, \quad (1.22)$$

где J_i – поток частиц i – го сорта через единицу поверхности за одну секунду, D – коэффициент диффузии ($\frac{m^2}{c}$); c_i – концентрация частиц, знак "минус" указывает на направление потока от больших концентраций к меньшим.

Уравнение (1.22) показывает, что плотность потока вещества J пропорциональна коэффициенту диффузии D и градиенту концентрации, и называется первым законом Фика. Второй закон Фика связывает пространственное и временное изменения концентрации:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2}. \quad (1.23)$$

Диффузионное движение в среде каждой частицы характеризуют среднеквадратичным смещением L^2 от исходного положения за время t . Для трехмерного пространства справедливо первое соотношение Эйнштейна:

$$L^2 = 6Dt. \quad (1.24)$$

В жидкости диффузия осуществляется перескоками частиц из одного устойчивого положения в другое, расстояние между ними имеет порядок межмолекулярного. Для таких перескоков необходимы наличие вакансий и достаточный запас энергии для преодоления потенциального барьера (энергия активации диффузии Q_D). После перескока каждая частица оказывается в новом энергетически выгодном положении, а выделяющаяся энергия рассеивается в среде. При этом коэффициент диффузии пропорционален $\exp\left(-\frac{Q_D}{NkT}\right)$, что соответствует формуле Аррениуса.

А. Эйнштейн связал коэффициент диффузии с коэффициентом трения. В его работах, по изучению броуновского движения частиц, изучалось влияние силы, действующей на взвешенные частицы со стороны молекул растворителя. Коэффициент трения ε определяется соотношением $F = \varepsilon v$, где v – скорость потока частиц, вызванного силой F . Конвективный поток $j_{\text{конв}} = vn = n\left(\frac{F}{\varepsilon}\right)$. Диффузионный поток $j_{\text{диф}} = -D \frac{\partial n}{\partial x}$. В стационарных условиях $j_{\text{конв}} + j_{\text{диф}} = 0$, следовательно, $nF = D \frac{\partial n}{\partial x} \varepsilon$. Для растворённых частиц осмотическое давление может быть определено в идеальном газовом

приближении $p_{\text{осм}}V = \frac{m}{M}RT$ или $p_{\text{осм}} = nkT$. Дифференцируя последнее выражение по x , получим соотношение $\frac{\partial p}{\partial x} = kT \frac{\partial n}{\partial x}$, в котором $\frac{\partial p}{\partial x}$ имеет размерность силы, приходящейся на единицу объема.

Заменяя эту величину на nF , получим $nF = kT \frac{\partial n}{\partial x}$. Приравнявая $nF = D \frac{\partial n}{\partial x} \varepsilon$ и $nF = kT \frac{\partial n}{\partial x}$, получим второе соотношение Эйнштейна:

$$D = \frac{kT}{\varepsilon} \quad (1.25)$$

Используя формулу Стокса для силы сопротивления, испытываемой макроскопическим шариком (частицей) $F = 6\pi\eta r_h v$, где η – это вязкость жидкости, r_h – гидродинамический радиус частицы, получаем выражение:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r_h}, \quad (1.26)$$

называемое формулой Стокса — Эйнштейна [24].

ПРОЦЕСС ДИФФУЗИИ В РАСТВОРАХ МАКРОМОЛЕКУЛ.

Важной особенностью макроионов является наличие на их поверхности большого числа заряженных центров, которые могут нести как положительный, так и отрицательный заряд. Электростатические взаимодействия существенно влияют на броуновскую динамику в растворах. При электростатическом взаимодействии макромолекул с растворителем возникают эффекты диэлектрического трения и электровязкости, которые существенно снижают трансляционную подвижность макромолекул. Интересной особенностью является то, что данные эффекты могут быть существенны даже для случая малого или даже нулевого поверхностного заряда, если число положительно и отрицательно заряженных групп на поверхности макромолекулы велико. Это объясняется тем, что дипольный момент макромолекул может быть достаточно большим и составлять несколько сотен Дебай [25].

В основе эффекта диэлектрического трения лежит идея о дополнительных потерях энергии движущейся макромолекулой за счет

переориентации дипольных молекул среды в поле макромолекулы. При движении макромолекулы электрическое поле в каждой точке среды меняется как по величине, так и по направлению. Диполи среды стремятся ориентироваться по направлению поля, отвечающему минимуму их энергии в поле. Энергия необходимая для переориентации диполей, поступает от движущейся макромолекулы, которая таким образом, испытывает, кроме обычного, вязкого трения, дополнительное, диэлектрическое.

Эффект электровязкости заключается в том, что электрическое поле макромолекулы также приводит к изменению давления в её окрестности. Такое изменение давление, которое носит название электрострикции, приводит к изменению (увеличению) вязкости среды в окрестности макромолекулы.

Последовательное рассмотрение влияния диэлектрического трения на подвижность молекул было проведено Хаббардом и Онзагером на основе уравнений сплошной среды, в которых учитывается вклад электростатических взаимодействий заряженной частицы с окружающим диэлектриком. В дальнейшем уравнения Хаббарда и Онзагера были обобщены с учетом неоднородности среды вызванной электрострикцией.

Электростатические взаимодействия между молекулами также влияют на подвижность макромолекул. Рассмотрим данное явление более подробно. Рассматривая броуновское движение в растворах макромолекул, силы, действующие между броуновскими частицами, принято подразделять на короткодействующие и далекодействующие. К далекодействующим относят гидродинамические и электростатические силы. Короткодействующие силы обусловлены взаимодействиями Ван-дер-Ваальса. Гидродинамические силы взаимодействия возникают за счет передачи импульса или момента импульса от одной частицы к другой через среду, которая возмущается движением броуновской частицы. Возмущение среды при этом описывается гидродинамически. Электростатические силы связаны с наличием

кулоновских, заряд-дипольных, диполь-дипольных и других более низких порядков взаимодействий между частицами [25].

При анализе влияния межмолекулярных взаимодействий удобно иметь дело с коэффициентом самодиффузии D . Различают коротковременный и долговременный коэффициент диффузии [25]. И тот и другой коэффициенты описывают зависимость от времени среднего квадрата смещения (для поступательного движения) на разных масштабах времени:

$$\langle [\Delta \vec{R}(t)]^2 \rangle = 6D(t)t \quad (1.27)$$

$$\text{где } D(t) = \begin{cases} D_s & \text{для } \tau_B \ll t \ll \tau_I \\ D_L & \text{для } t \gg \tau_I \end{cases} \quad (1.28)$$

$\tau_B \cong \frac{m}{\varepsilon}$, τ_I – время, за которое частица диффундирует на расстояние порядка своего радиуса $D_0 \tau_I \cong R^2$, D_0 – коэффициент диффузии в предельно разбавленных растворах.

В линейном приближении по концентрации при отсутствии дальнедействующих электростатических сил:

$$D_s = D_0 [1 + \lambda_H \Phi] \quad (1.29)$$

$$D_L = D_0 [1 + (\lambda_H + \lambda_S) \Phi] \quad (1.30)$$

Здесь $\Phi = \left(\frac{4\pi}{3}\right) nR^3$ – объемная доля броуновских частиц.

Как следует из соотношений, подвижность частиц падает с ростом концентрации. Между тем, при наличии в системе электростатических взаимодействий гидродинамические взаимодействия практически незаметны на фоне последних [25]. Действительно, для зарядов и дипольных моментов макромолекул, средняя энергия электростатического взаимодействия между молекулами становится сравнимой с тепловой уже при объемных концентрациях порядка нескольких процентов.

Вычисления, проведенные для коротковременного коэффициента для заряженных частиц, показали, что D_s для заряженных броуновских частиц сначала возрастает с увеличением концентрации, а затем начинает уменьшаться. Концентрация, отвечающая максимуму, зависит от дебаевского

радиуса, характеризующего растворитель, в котором двигаются броуновские частицы, и составляет несколько объемных процентов.

В линейном приближении по концентрации выражение для D_L в растворе броуновских частиц с электростатическим взаимодействием имеет вид:

$$D_L = D_0(1 + \lambda_H\Phi + \lambda_S\Phi), \quad (1.31)$$

здесь коэффициент $\lambda_H < 0$ отвечает гидродинамическим и короткодействующим силам. Для коэффициента λ_S было получено соотношение:

$$\lambda_S = + \frac{\beta^2}{32\pi^2 R^3} \int d\vec{r} d\vec{r}_0 g(r) \frac{\vec{F}_S(\vec{r})\vec{F}_S(\vec{r}_0)}{|\vec{r}-\vec{r}_0|}, \quad (1.32)$$

где $\beta = (kT)^{-1}$, $g(r)$ – парная корреляционная функция броуновских частиц, $\vec{F}_S(\vec{r})$ – дальнодействующая составляющая силы межчастичных взаимодействий, которые предполагаются парными. Например, для частиц с экранированным кулоновским взаимодействием дальнодействующие силы определяются как:

$$\vec{F}_S(\vec{r}) = -\vec{\nabla}U(\vec{r}) \quad (1.33)$$

$$U(\vec{r}) = \frac{q^2}{\epsilon r(1+\chi_D 2R)} \exp\{-\chi_D(r-2R)\}, \quad (1.34)$$

где χ_D – обратный дебаевский радиус:

$$\chi_D^2 = \frac{8\pi\mu}{\epsilon kT}, \quad (1.35)$$

μ – ионная сила раствора. Подставляя в соотношение (1.32) и проводя вычисления, получаем:

$$\lambda_S = + \frac{[\beta U(2R)]^2}{\chi_D R}. \quad (1.36)$$

Здесь мы замечаем, что в отличие от короткодействующих и гидродинамических взаимодействий, снижающих подвижность частиц с увеличением концентрации, дальнодействующие приводят к увеличению подвижности с ростом концентрации (т.е. $\lambda_S > 0$) независимо от знака макромолекул. Данная теория была предложена Джеймсом и Эвансом [25].

Коэффициент трансляционной диффузии D_t макромолекул в растворе может быть связан с разложением по концентрации в соответствии с уравнением Дебая:

$$D_t = \frac{d\Pi}{dc} \frac{M}{N_A} \frac{1}{f} = D_0(1 + k_d c), \quad (1.37)$$

где Π – осмотическое давление, $D_0 = \frac{kT}{f_0}$, $f = f_0(1 + k_f c)$ – коэффициент трения.

С учётом вириального разложения осмотического давления по степеням концентрации c , можем записать:

$$(1 + 2BMc) \frac{RT}{M} = \frac{N_A}{M} f D_0 (1 + k_d c). \quad (1.38)$$

Сокращая и подставляя выражения для f и D_0 , получаем:

$$1 + 2BMc = (1 + k_f c)(1 + k_d c) \quad (1.39)$$

$$1 + 2BMc = 1 + k_f c + k_d c + k_f k_d c^2 \quad (1.40)$$

$$k_d = 2BM - k_f, \quad (1.41)$$

где член $k_f k_d c^2 \rightarrow 0$ ввиду малости c , а $k_f = \frac{1}{c} \left(\frac{f - f_0}{f_0} \right)$.

Окончательно получаем:

$$k_d = 2BM - \frac{1}{c} \left(\frac{f - f_0}{f_0} \right). \quad (1.42)$$

С другой стороны, по определению характеристической вязкости $[\eta]$ белковых растворов можно записать:

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta - \eta_0}{c \eta_0} = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{f - f_0}{c f_0} = [f]. \quad (1.43)$$

Обозначенная здесь величина $[f]$, которая может быть названа характеристическим трением, сопоставима с полученным выше коэффициентом k_f в случае предельного перехода к нулевой концентрации.

Таким образом:

$$k_f = [f] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{f - f_0}{c f_0}, \quad (1.44)$$

откуда:

$$k_d^0 = 2BM - [\eta]. \quad (1.45)$$

Тогда коэффициент трансляционной диффузии растворов биополимеров можно записать в виде:

$$D_t = D_0\{1 + (2BM - [\eta])c\}. \quad (1.46)$$

Таким образом, коэффициент трансляционной диффузии связан со вторым вириальным коэффициентом линейным образом [26].

Динамическое рассеяние света является мощным методом для изучения поступательного, вращательного и внутримолекулярного движения макромолекул и частиц в растворах. Так как эти динамические свойства связаны со структурными свойствами, такими как форма и размер молекул, то спектроскопию рассеянного света можно также косвенно использовать для измерения структурных характеристик и изменений в них, которые происходят при изменении состояния раствора [27].

Хаотическое броуновское движение дисперсных частиц вызывает микроскопические флуктуации их локальной концентрации. Эти флуктуации приводят к локальным неоднородностям показателя преломления среды. При прохождении лазерного луча через такую среду часть света будет рассеяна на этих неоднородностях. Флуктуации интенсивности рассеянного света будут соответствовать флуктуациям локальной концентрации дисперсных частиц.

Коэффициент диффузии частиц обратно пропорционален характерному времени релаксации флуктуаций интенсивности рассеянного света. Это характерное время, в свою очередь, есть время затухания экспоненциальной временной корреляционной функции рассеянного света, которая измеряется с помощью цифрового коррелятора.

Размер частиц рассчитывается по формуле Стокса-Эйнштейна, которая связывает размер частиц с их коэффициентом диффузии и вязкостью жидкости [27].

В методе корреляции фотонов используется цифровой метод нахождения автокорреляционной функции фотоэлектронов. Измеряется мгновенная интенсивность излучения, которая преобразуется в мгновенное значение фототока на выходе фоторегистрирующего прибора. Поэтому основной задачей является извлечение информации о корреляционной функции поля излучения из корреляционной функции фототока [28].

Аналитический сигнал это часть комплексного оптического поля, соответствующая положительным частотам.

$$E(r, t) = \int_0^{\infty} E(r, \omega) e^{-i\omega t} d\omega. \quad (1.47)$$

Фототок может быть определен как $i(t) = \sigma E^*(t)E(t)$, где σ – квантовая эффективность фотокатода. Считаем, что фотодетектор имеет точечные размеры. Если поле состоит из двух компонент с частотами ω_1 и ω_2 , то фототок может быть представлен формулой:

$$i(t) = \sigma[|E_1|^2 + |E_2|^2 + 2\text{Re}(E_1^* E_2 e^{i(\omega_1 - \omega_2)t})] + \text{дробовой шум} \quad (1.48)$$

Дробовой шум связан с квантовым характером регистрации света. Таким образом, фототок складывается из постоянной составляющей, составляющей с разностными частотами («биение» сигнала) и дробового шума. Поскольку детектор квадратичный, вероятность фотоэмиссии электрона за единицу времени $\sim \sigma E^*(t)E(t)$, совместная вероятность фотоэмиссии в моменты t и $(t + \tau)$ определяется как $\sigma E^*(t)E(t)E^*(t + \tau)E(t + \tau)$.

Для стационарных полей эта вероятность будет зависеть только от τ . Вероятность реализации совокупности фотоотсчетов равна произведению вероятностей в моменты времени τ , так как акты реализации фотонов независимы.

Нормированная автокорреляционная функция интенсивности, определяющая спектр биений имеет вид:

$$g^{(2)}(\tau) = \frac{\langle E^*(t)E(t)E^*(t+\tau)E(t+\tau) \rangle}{\langle E^*E \rangle^2}. \quad (1.49)$$

Корреляционная функция фототока $G_i(\tau)$ равна $\langle i(0)i(\tau) \rangle + e\langle i \rangle \delta(\tau)$, где e – заряд, протекающий за один фотоотсчет, второе слагаемое определяет т.н. дробовой шум, определяемый квантовой природой фотоэлектронов.

$$G_i(\tau) = e\langle i \rangle \delta(\tau) + \langle i \rangle^2 g^{(2)}(\tau) \quad (1.50)$$

$\langle i \rangle = e\sigma \langle I \rangle$, при этом $\langle I(t) \rangle = \langle E^*(t)E(t) \rangle$ – усредненная интенсивность оптического сигнала. В момент времени $\tau = 0$ в $i(0)$ и в $i(\tau)$ дает вклад один и тот же отсчет.

Нормированная автокорреляционная функция сигнала равна:

$$g^{(1)}(t) = \frac{\langle E^*(t)E(t+\tau) \rangle}{\langle E^*E \rangle} \quad (1.51)$$

и связана с $g^{(2)}(t)$ соотношением Зигерта:

$$g^{(2)}(t) = 1 + |g^{(1)}(t)|^2 \quad (1.52)$$

Поэтому можно переписать выражение (1.50):

$$G_i(\tau) = e\langle i \rangle \delta(\tau) + \langle i \rangle^2 \left(1 + |g^{(1)}(\tau)|^2 \right) = e\langle i \rangle \delta(\tau) + \langle i \rangle^2 + \langle i \rangle^2 |g^{(1)}(\tau)|^2 \quad (1.53)$$

Спектр мощности фототока $P_i(\omega)$ определяется по теореме Винера-Хинчина с помощью $G_i(\tau)$:

$$P_i(\omega) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} G_i(\tau) e^{i\omega\tau} d\tau \quad (1.54)$$

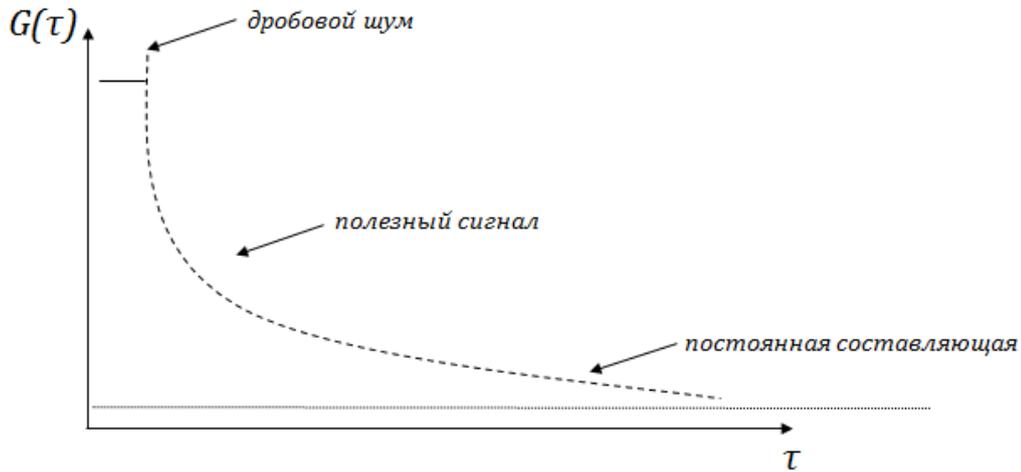


Рис.1.1. График зависимости корреляционной функции от времени.

Корреляционная функция фотоэлектронов, измеряемая цифровым коррелятором, и спектр фототока связаны Фурье-преобразованием:

$$P_i(\omega) = \langle i \rangle^2 \frac{\delta(\omega)}{2\pi} + \frac{e\langle i \rangle}{2\pi} + \frac{\langle i \rangle^2}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} |g^{(1)}(\tau)|^2 e^{i\omega\tau} d\tau, \quad \omega \geq 0. \quad (1.55)$$

В спектре (1.55) первое слагаемое – постоянная составляющая, второе – дробовой шум и третье – спектр биений. Для $\omega < 0$ $P_i = 0$.

Спектр биений имеет форму лоренциана с полушириной $2\Delta\omega_D$ и расположен на частоте $\omega = 0$:

$$I(\omega) = \frac{2\Delta\omega_D/\pi}{[\omega^2 + (2\Delta\omega_D)^2]} \quad (1.56)$$

Дробовой шум связан с квантовыми характеристиками регистрации света.

Задача оптимизации эксперимента состоит в увеличении соотношения

$$\Delta = \frac{\text{полученный сигнал}}{\text{дробовой шум}} \quad (1.57)$$

Так как $G(\tau)$ спадает за время τ_c , спектр флуктуаций интенсивности сосредоточен в полосе $\Delta\omega = \frac{1}{\tau_c}$. Δ определяется как число фотоотсчетов за время корреляции регистрируемого поля $\Delta = \frac{\langle i \rangle}{e} \tau_c$, τ_c не определяется, если $\Delta \ll 1$. $\langle i \rangle \sim \frac{e}{\tau_c}$ характеризует минимальную интенсивность излучения для определения спектра с наименьшей погрешностью.

В методе гомодинирования (самобиений) измеряется спектр флуктуаций интенсивности. При этом используется квадрат интенсивности исследуемого сигнала. Исследуемый сигнал, попадающий на фотодетектор, вызывает на выходе флуктуации фототока, соответствующие флуктуациям интенсивности оптического поля. Спектр фототока – результат фотобиений всевозможных пар спектральных компонентов оптического спектра [23].

В методе гетеродинирования регистрируется произведение исследуемого рассеянного сигнала (с шумом) и когерентного сигнала гетеродина с относительно низким уровнем шума. Тогда спектр мощности фототока определяется как:

$$P_i(\omega \geq 0) = \frac{e i_h}{\pi} + i_h^2 \delta(\omega) + i_h \langle i_s \rangle \frac{2\Delta\omega_D/\pi}{[(\omega - |\omega_0 - \omega_h|)^2 + \Delta\omega_D^2]}. \quad (1.58)$$

ПРИНЦИП РАБОТЫ КОРРЕЛЯТОРА.

Рассмотрим сигнал, поступающий на вход коррелятора. Счетчик фотонов в фотодетекторе трансформирует сигнал от одного фотона в электрический сигнал, присваивая «1», если фотон зарегистрирован в данном временном интервале, и «0», если не зарегистрирован. Временной интервал τ для отдельного отсчета интенсивности выбирается настолько малым, чтобы в среднем на детектор попадало не больше одного фотона. Этот сигнал в виде

импульса лавинного фототока преобразуется к стандартному виду (прямоугольный импульс) и поступает в цифровой коррелятор.

Коррелятор состоит из регистра сдвига и многоканального цифрового накопителя. На *Рис.1.2* представлена схема формирования корреляционной функции на корреляторе. При помощи регистра сдвига полученная выборка последовательно сдвигается с разными временными задержками. Интенсивность в каждой ячейке умножается на интенсивность для ячейки, сдвинутой на τ . Такая процедура повторяется для времени задержки 2τ , потом для 3τ и т.д. В результате для каждого сдвига получается набор перемноженных интенсивностей с разными временными задержками $\tau_i = n\tau$ ($n = 1$ для первого сдвига, $n = 2$ для второго и т.д.). Для каждого времени задержки $\tau_i = n\tau$, полученные перемноженные интенсивности усредняются, и в результате получается корреляционная функция:

$$g^2(t) = \frac{\langle I(t)I(t+\tau_i) \rangle}{\langle I(t) \rangle \langle I(t+\tau_i) \rangle} \quad (1.59)$$

В используемом корреляторе шкала задержек является логарифмической. Из коррелятора корреляционная функция передается на компьютер.

Малым временам задержки соответствуют сильные корреляции, т.к. за время порядка τ скорость движущихся рассеивающих частиц не успевает сильно измениться. Большим временным задержкам – слабые корреляции, т.к. за большое время скорости рассеивателей «потеряли память» о прошлых состояниях.

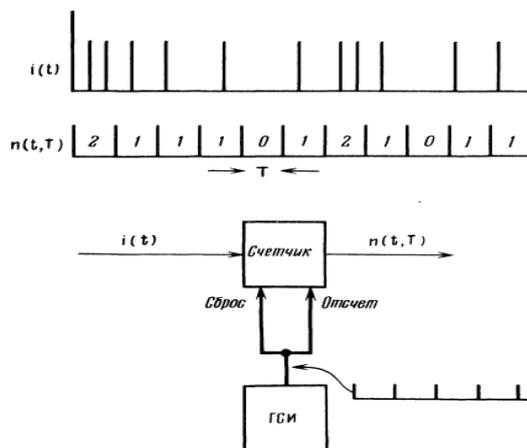


Рис.1.2. Схема счета фотонов.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЭФФИЦИЕНТА ТРАНСЛЯЦИОННОЙ ДИФФУЗИИ С ПОМОЩЬЮ КОРРЕЛЯЦИОННЫХ ФУНКЦИЙ.

Рассмотрим процесс рассеяния поляризованного света макромолекулами в фотонно-корреляционном эксперименте (Рис.1.3). Луч лазера фокусируется в малом объеме раствора, содержащего макромолекулы или частицы, находящиеся в растворе. Большая часть света проходит через образец, однако малая часть, примерно 10^{-6} от интенсивности падающего луча, рассеивается вокруг прямого направления пучка. При гетеродинном методе, небольшое количество не рассеянного лазерного излучения смешивается с рассеянным светом на катоде фотоумножителя, представляющего из себя детекторную систему, которая используется для собирания и счета числа фотонов, рассеянных в течение заданного интервала времени в малом телесном угле вокруг угла рассеяния. При динамическом светорассеянии, излучение детектируется под постоянным углом. Так как рассеивающие частицы движутся за счет теплового движения, то результирующее число фотонов, зафиксированное при данном угле рассеяния, изменяется со временем случайным образом. Диффузное движение частиц в растворе увеличивает флуктуации интенсивности рассеянного света в микросекундном временном интервале [27].

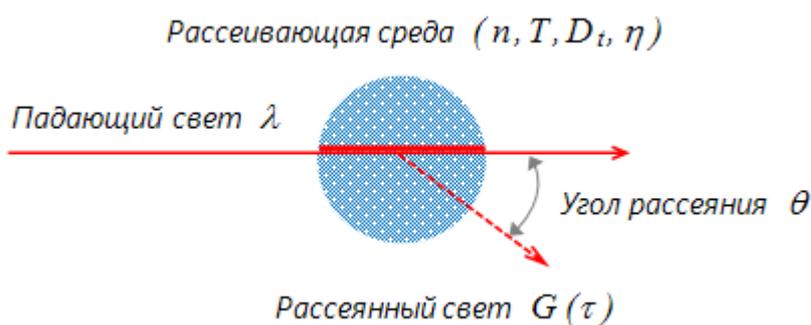


Рис.1.3. Схема процесса рассеяния света.

Временная автокорреляционная функция согласно определению имеет следующий вид:

$$G(\tau) = \langle I(0) * I(t - \tau) \rangle = \lim_{t_m \rightarrow \infty} \frac{1}{t_m} \int_0^{t_m} I(t)I(t - \tau)dt, \quad (1.60)$$

где интенсивность I имеет различные значения во времена t и $(t - \tau)$. t_m – это время интегрирования (время накопления корреляционной функции). Соответствующий метод определения $G(\tau)$ называется методом корреляции фотонов [27-28].

В соответствии с гипотезой Онзагера, релаксация микроскопических флуктуаций концентрации к равновесному состоянию может быть описана первым законом Фика (1.23). Заменяя в уравнении (1.23) концентрацию частиц на корреляционную функцию $G(t)$ и решив полученное уравнение, получим, что корреляционная функция интенсивности рассеянного света имеет вид (Рис.1.4):

$$G(\tau) = a \exp\left(-\frac{2\tau}{t_c}\right) + b, \quad (1.61)$$

где в соответствии с решением уравнения диффузии обратное время корреляции равно:

$$\frac{1}{t_c} = D_t q^2 \quad (1.62)$$

Волновой вектор флуктуаций концентрации описывается выражением:

$$q = \left(\frac{4\pi n}{\lambda}\right) \sin \frac{\theta}{2}, \quad (1.63)$$

где n – показатель преломления жидкости, в которой взвешены дисперсные частицы, λ – длина волны лазерного излучения и θ – угол рассеяния.

Таким образом, автокорреляционная функция интенсивности экспоненциально затухает во времени, и характерное время релаксации однозначно связано с D_t . Константы t_c , a и b в (1.61) могут быть найдены путем аппроксимации измеренной корреляционной функции теоретической экспоненциальной функцией [27].

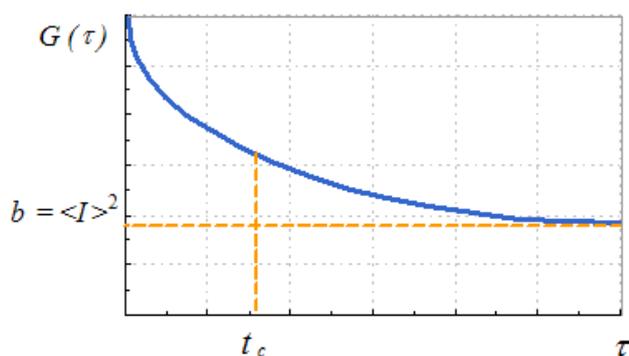


Рис.1.4. Автокорреляционная функция рассеянного света.

Нормированная автокорреляционная функция сигнала определяется следующим образом [23]:

$$g^{(1)}(\tau) = \frac{G^{(1)}(\tau)}{G^{(1)}(0)} = e^{-D_t q^2 \tau}. \quad (1.64)$$

Оптический спектр, который соответствует рассеянному излучению:

$$I(\omega) = \frac{1}{2\pi} \int G^{(1)}(\tau) e^{i\omega\tau} d\tau = a \frac{1}{\pi} \left[\frac{D_t q^2}{(\omega - \omega_0)^2 + (D_t q^2)^2} \right] \quad (1.65)$$

– нормированный лоренцовский спектр (максимум спектра находится на частоте падающего света ω_0). Спектр света, рассеянного на взвешенных в жидкости и находящихся в броуновском движении макромолекулах, уширяется за счет различных фазовых сдвигов. Полуширина спектра рассеянного света Γ определяется формулой

$$\Gamma = D_t q^2. \quad (1.66)$$

Если форма частиц известна или задана, их размер может быть рассчитан с использованием соответствующей формулы. Например, для сферических частиц можно использовать формулу Стокса-Эйнштейна (1.26).

В случае полидисперсных растворов, когда размеры частиц различаются, спектр фототока представляет собой непрерывное множество (интеграл) лоренцовых кривых с разными полуширинами. Следовательно, для нахождения распределения частиц по размерам (коэффициентам диффузии) необходимо решать обратную спектральную задачу в виде интегрального уравнения с лоренцовым ядром.

$$g^{(1)}(t) = \int P(\Gamma) e^{-\Gamma t} d\Gamma \quad (1.67)$$

Интегральное уравнение (1.67) формирует основной принцип обработки данных в методе фотонно-корреляционной спектроскопии. Это уравнение относительно $P(\Gamma)$ – интегральное уравнение Фредгольма первого рода, известное в математике как некорректно поставленная задача, то есть задача с принципиально отсутствующим алгоритмом нахождения точного решения. В связи с этим разрабатываются различные приближенные методы решения, многие из которых дают весьма хорошие результаты [23].

1.3 ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ ТЕОРИИ ДЗЕТА-ПОТЕНЦИАЛА.

Электрокинетическими явлениями называют перемещение одной фазы относительно другой в электрическом поле и возникновение разности потенциалов при течении жидкости через пористые материалы.[29, 30].

Эти явления были названы электрокинетическими, так как в них обнаруживалась связь между скоростью протекания (кинетикой) и электрическим полем. Выделяют четыре различных электрокинетических эффекта в зависимости от того, каким образом организуется движение:

- Электроосмос – явление перемещения жидкой дисперсионной среды относительно неподвижной дисперсной фазы под действием электрического поля.
- Электрофорез – явление перемещения дисперсной фазы относительно жидкой дисперсионной среды под действием электрического поля.
- Потенциал течения – явление возникновения разности потенциалов при движении дисперсионной среды относительно неподвижной дисперсной фазы.
- Потенциал оседания (седиментации) – явление возникновения разности потенциалов при движении дисперсной фазы относительно неподвижной дисперсионной среды.

Причиной электрокинетических явлений является наличие на границе раздела фаз двойного электрического слоя.

ЭЛЕКТРОКИНЕТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ.

Согласно современным представлениям о строении двойного электрического слоя [29 – 31], полное падение общего поверхностного потенциала φ складывается из падения адсорбционного потенциала φ_a в плотной части двойного электрического слоя и падения потенциала диффузного слоя φ_d в его диффузной части. Потенциал φ снижается по мере удаления от поверхности. Причем в адсорбционном слое наблюдается линейное уменьшение φ .

Нарушение линейной зависимости происходит на границе между адсорбционным и диффузным слоями противоионов (линия АА Рис.1.5). В диффузном слое φ снижается по экспоненте.

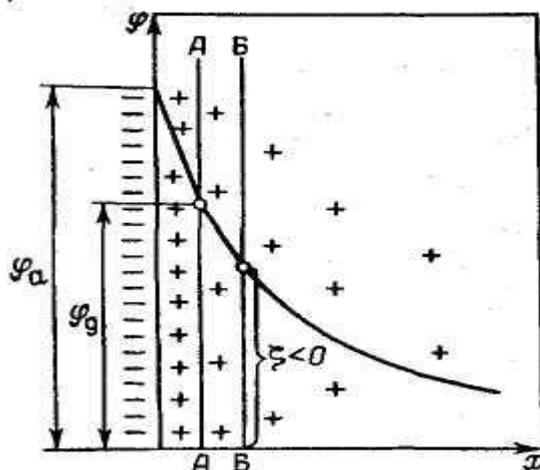


Рис.1.5. Современная модель строения двойного электрического слоя.

Не существует прямых методов измерения потенциалов на границе адсорбционного слоя [31]. Однако, можно измерить другую близкую величину – электрокинетический потенциал ξ (дзета-потенциал). Величина электрокинетического потенциала является менее определенной, но измеряемой экспериментально. Дзета-потенциал определяют как потенциал границы скольжения (линия ВВ Рис.1.5.) фаз при их относительном передвижении в электрическом поле. Положение границы скольжения в области двойного электрического слоя неизвестно. Полагают, что граница скольжения проходит либо на расстоянии порядка толщины плотной части

двойного электрического слоя, и в этом случае $\xi = \varphi_d$; либо смещена в жидкую фазу, тогда $\xi < \varphi_d$; где φ_d - потенциал на границе плотная часть двойного электрического слоя – диффузная часть двойного электрического слоя [29,31].

Часто в первом приближении принимают $\xi = \varphi_d$, поскольку теоретические закономерности, предсказанные для φ_d , хорошо подтверждаются на опыте в отношении ξ -потенциала [29,31].

Электрокинетический потенциал является важнейшим параметром коллоидной системы и ее двойного электрического слоя, поскольку он не зависит от параметров системы, в которой находится рассеивающие частицы, однозначно характеризует электрические свойства данной границы раздела и определяется экспериментально из электрокинетических явлений, связанных с относительным перемещением фаз.

С помощью любого электрокинетического явления можно определить знак заряда рассеивающей частицы, а также вычислить величину потенциала, возникающего на границе скольжения – электрокинетического потенциала. Скорость, как электрофореза, так и электроосмоса, при постоянной разности потенциалов пропорциональна величине ξ . Поэтому, определяя скорость перемещения заряженных частиц или скорость перемещения жидкости, можно вычислить величину электрокинетического потенциала [29-31].

При наложении электрического поля происходит разрыв двойного электрического слоя по плоскости скольжения. Электрическая сила, действующая на частицу при наложении внешнего электрического поля, вызывающая движение заряженной частицы к противоположно заряженному электроду, уравнивается силой трения возникающей в жидкости. При этом скорость перемещения коллоидной частицы в электрическом поле будет зависеть от свойств дисперсионной среды (вязкости η , диэлектрической проницаемости ε), от строения двойного электрического слоя коллоидной частицы (величины электрокинетического потенциала ξ) и от напряженности внешнего электрического поля H .

Линейная скорость движения дисперсной фазы U , отнесенная к единице напряженности электрического поля H , называется электрофоретической подвижностью U_0 :

$$U_0 = \frac{U}{H} \quad (1.68)$$

Электрокинетический потенциал связан с электрофоретической подвижностью, уравнением Гельмгольца – Смолуховского:

$$\xi = \frac{\eta}{\varepsilon\varepsilon_0} U_0 = \frac{\eta U}{\varepsilon\varepsilon_0 H} \quad (1.69)$$

где ξ – величина электрокинетического потенциала; η – вязкость среды; ε – диэлектрическая проницаемость среды; ε_0 – электрическая константа; U – линейная скорость движения границы коллоидный раствор – боковая жидкость; H – напряженность электрического поля.

Линейную скорость движения границы коллоидный раствор – боковая жидкость рассчитывают как отношение смещения границы раздела за время электрофореза:

$$U = \frac{h}{t}, \quad (1.70)$$

где h – смещение границы коллоидный раствор – боковая жидкость за время электрофореза; t – время электрофореза.

Напряженность электрического поля (градиент потенциала) рассчитывают как отношение приложенной разности потенциалов к расстоянию между электродами:

$$H = \frac{E}{l} \quad (1.71)$$

где E – приложенная разность потенциалов; l – расстояние между электродами.

Тогда уравнение Гельмгольца – Смолуховского для электрофореза примет вид:

$$\xi = \frac{U\eta}{\varepsilon\varepsilon_0 H} = \frac{h\eta l}{t\varepsilon\varepsilon_0 E} \quad (1.72)$$

Наиболее важным фактором, который влияет на дзета-потенциал, является значение pH среды. Зависимость дзета-потенциала от значений pH

является кривой принимающей положительные значения при более низких значениях pH и отрицательные значения при высоких значениях pH среды. Значение pH среды, при котором дзета-потенциал имеет нулевое значение, называется изоэлектрической точкой. Типичная зависимость дзета-потенциала от pH представлена на *Рис.1.6*.

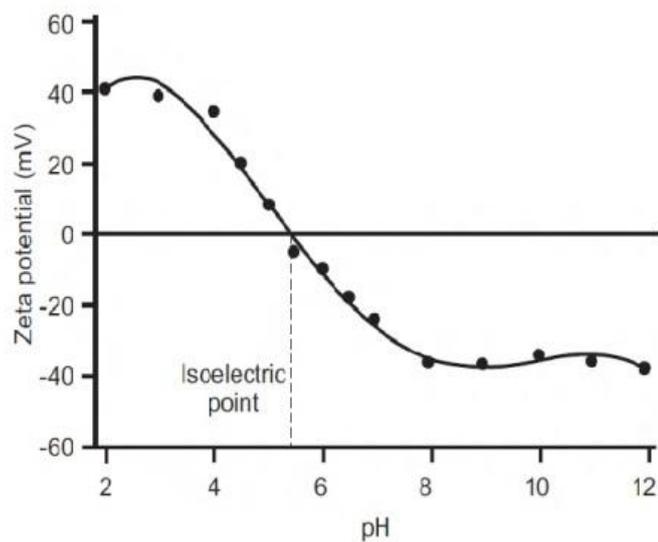


Рис.1.6. Зависимость дзета-потенциала от pH среды.

ГЛАВА 2. ОСНОВНЫЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВЫХ МОЛЕКУЛ.

2.1. СОСТАВ И СТРОЕНИЕ БЕЛКОВ.

Белковые молекулы представляют собой биополимеры, молекулярная масса которых может варьироваться от 5000 до многих миллионов единиц. Молекула белка состоит из одной или более полипептидных цепей.

Основой для изучения структуры белковой молекулы являются знания о количестве каждого из аминокислотных остатков, последовательности их расположения в каждой из пептидных цепей, а также о пространственном строении молекулы, обусловленном складыванием или свертыванием полипептидных цепей и их положением по отношению друг к другу. Биологические, химические и физические свойства белка определяются его структурой в целом. В значительной степени они зависят от наличия в молекуле небелковых частиц, более или менее связанных с полипептидными цепями.

Все белки во всех организмах, независимо от их функции и биологической активности, построены из одного и того же набора 20 стандартных аминокислот, каждая из которых в отдельности не обладает никакой биологической активностью [32].

Аминокислотами называются вещества, содержащие, по крайней мере, одну карбоксильную группу и одну аминогруппу (*Рис.2.1а*). Аминокислоты могут быть гидрофильными или гидрофобными, основными, кислыми или нейтральными и содержать различные атомы (*C, H, O, S, N*). Более точно строение аминокислоты выражается формулой биполярного иона (*Рис.2.1б*).

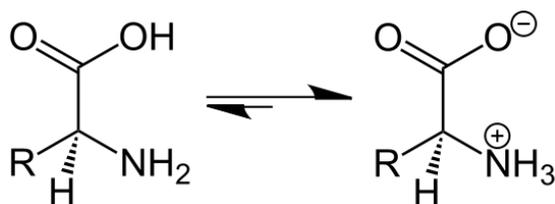


Рис.2.1 Аминокислота в нормальной форме и в виде биполярного иона [33].

Основа белковой молекулы – полипептидная цепь, образованная путем поликонденсации аминокислот. Звенья цепи располагаются так, что конец одной аминокислоты связан с началом другой пептидной связью, которая образуется в результате выделения молекулы воды из карбоксильной группы одной аминокислоты и аминогруппы другой. Число и характер чередования звеньев определяет первичную структуру молекулы [34].

За счет образования внутрицепочечных водородных связей полипептидная цепь обладает тенденцией к сворачиванию и образованию вторичной структуры в виде жесткой спиральной конформации цепи (α -спираль). R-группы аминокислот направлены наружу от спирального остова, поэтому могут возникать избирательные взаимодействия между гидрофобными боковыми звеньями или разноименно заряженными группами удаленных звеньев. Они приводят к изгибу (складыванию) цепи, причем вблизи складок α -спиральная структура нарушается. Такая упаковка носит название третичной структуры.

Первые три уровня характерны для структурной организации всех белковых молекул. Четвертый уровень (четвертичная структура) встречается при образовании единых белковых комплексов, состоящих из нескольких полипептидных цепей, каждая из которых в отдельности может и не обладать никакой активностью.

Изложенная схема, предложенная Линдерштрем-Лангом [35], отвечает строению компактных, плотноупакованных макромолекул, относящихся к классу глобулярных белков (Рис.2.2). Второй основной класс по конформации

составляют фибриллярные белки, в которых полипептидные цепи, располагаясь параллельно друг другу, образуют длинные волокна (фибриллы) или слои.



Рис.2.2 Разные способы изображения трёхмерной структуры белка на примере лизоцима. Слева — «стержневая» модель, с изображением всех атомов и связей между ними; цветами показаны элементы. В середине — мотив укладки. Справа — контактная поверхность белка, построенная с учётом Ван-дер-Ваальсовых радиусов атомов; цветами показаны особенности активности участков(по данным “Brookhaven National Laboratory”).

Для белков также используется понятие конформации белковой молекулы – определенное, но не застывшее, не неизменное взаимное расположение частей молекулы. Так как конформация белковой молекулы формируется при участии слабых типов связей, то она является подвижной, и белок может изменять свою структуру. В зависимости от условий внешней среды молекула может существовать в разных конформационных состояниях, которые легко переходят друг в друга. Энергетически выгодным для реальных условий являются только одно или несколько конформационных состояний, между которыми существует равновесие. Переходы из одного конформационного состояния в другое обеспечивают функционирование белковой молекулы. Это обратимые конформационные изменения (встречаются в организме, например, при проведении нервного импульса, при переносе кислорода гемоглобином). При изменении конформации часть слабых связей разрушается, и образуются новые связи слабого типа.

Ферменты (энзимы) представляют собой высокоспециализированный класс белков, основной функцией которых является ускорение химических реакций в клетках живых организмов. Реагенты в реакции, катализируемой

ферментами, называются субстратами, а получающиеся вещества – продуктами. Ферменты специфичны к субстратам. Ферментативная активность может регулироваться активаторами, повышающими скорость реакции, и ингибиторами, понижающими скорость реакции. По химической природе все ферменты являются простыми или сложными (в состав которых, наряду с белковым компонентом – апоферментом – входит и небелковая часть – кофермент) белками, как правило, с глобулярной структурой и большой молекулярной массой (240-4500 кДа). Недавно было обнаружено, что некоторые РНК обладают каталитической активностью [36]. Как и все белки, они чувствительны к действию высоких температур, излучению, солям тяжелых металлов, концентрированных кислот и щелочей.

В общих чертах структура ферментов достаточно похожа. В них можно выделить две области, выполняющие различные функции: активный и аллостерический центры. Активный центр представляет собой комбинацию аминокислотных остатков (например, у лизоцима их около 20 [37]), обеспечивающую непосредственное связывание субстрата и осуществляющую катализ. После окончания катализа и высвобождения продукта реакции, активный центр становится вакантным и может снова связывать другие молекулы субстрата. В активном центре выделяют два участка: якорный и каталитический [38]. Чтобы катализировать реакцию, фермент должен связаться с одним или несколькими субстратами. Белковая цепь фермента сворачивается таким образом, что на поверхности глобулы образуется щель, где связываются субстраты. Эта область называется сайтом связывания субстрата. Аллостерический центр – это центр регуляции активности фермента. Активаторами могут выступать ионы двухвалентных и, реже, одновалентных металлов, кислоты, аминокислоты, витамины и пр. Следует отметить также, что металлы часто выступают в роли аллостерических модуляторов (эффекторов). Взаимодействуя с аллостерическим центром, подобный эффектор способствует образованию наиболее выгодной пространственной конфигурации фермента.

Лизоцим (мурамидаза) – антибактериальный агент, фермент класса гидролаз – белок с молекулярной массой около 14 400 [37]. Единственная полипептидная цепь состоит из 129 аминокислотных остатков и свернута в компактную глобулу (30 ~ 30 ~ 45 Å). Дипольный момент лизоцима – 130 Д [39]. Трёхмерная конформация полипептидной цепи поддерживается 4 дисульфидными (–S – S –) связями. (В лизоциме молока человека их 3, яичного белка гуся – 2, в лизоциме фага Т4 их нет; чем больше дисульфидных групп, тем лизоцим более устойчив, но менее активен). Глобула лизоцима состоит из двух частей, разделённых щелью; в одной части большинство аминокислот (лейцин, изолейцин, триптофан и др.) содержат гидрофобные группы, в другой – преобладают аминокислоты (лизин, аргинин, аспарагиновая кислота и др.) с полярными группами. Полярность окружения влияет на ионизацию двух карбоксильных групп (–COOH), расположенных на поверхности щели молекулы с разных сторон. Лизоцим способен проникать через бактериальную стенку и вызывать разрушение (лизис) бактериальной клетки.

Креатинкиназа (КК) – это фермент, катализирующий из АТФ и креатина высокоэнергетическое соединение креатинфосфат, и обеспечивает энергией мышечное сокращение.

Для изучения физических свойств и структуры фермента проводили эксперименты с креатинкиназой, взятой из мышцы кролика. В 1962 году Дэнсом и Уотсом было предположено, что активная форма креатинкиназы – это димер [40].

Креатинкиназа играет очень важную роль в организме человека. Она выполняет ряд функций, например, таких как запас и транспорт энергии, регуляция метаболизма [41].

Молекула креатинкиназы – димер, состоящий из субъединиц двух типов: М (от англ. *muscle* – мышца) и В (от англ. *brain* – мозг). Из этих субъединиц образуются 3 изофермента – ВВ, МВ, ММ. Изофермент ВВ находится преимущественно в головном мозге, ММ – в скелетных мышцах и МВ – в

сердечной мышце. Молекулярные массы всех трех изоферментов практически одинаковы (81 000 – 83 000), однако их электрофоретическая подвижность, аминокислотный состав и антигенные свойства различны [42, 43].

Повышение активности общей креатинкиназы наблюдается при повреждении любых вышеперечисленных клеток и поэтому не является специфичным. Наиболее часто значительное увеличение активности данного фермента отмечается при остром инфаркте миокарда.

Определение креатинкиназы, и особенно MB–фракции, широко используется для ранней диагностики инфаркта миокарда.

Ферменты участвуют в осуществлении всех процессов обмена веществ и энергии, в реализации генетической информации. Переваривание и усвоение пищевых веществ, синтез и распад белков, нуклеиновых кислот, жиров, углеводов и других соединений в клетках и тканях организмов – все эти процессы невозможны без участия ферментов.

2.2. ПОВЕДЕНИЕ БЕЛКОВЫХ МОЛЕКУЛ В РАСТВОРЕ. ТЕОРИЯ ДЕБАЯ-ХЮККЕЛЯ.

Рассмотрим простейшую модель раствора электролита.

Ионы в ней будем рассматривать как твердые шарики, погруженные в сплошную среду с диэлектрической проницаемостью ϵ и взаимодействующие друг с другом по закону Кулона. Один изолированный ион с зарядом Ze (Z – валентность иона, e – заряд электрона) создает на расстоянии r в чистой воде электрический потенциал:

$$\varphi(r) = \frac{Ze}{\epsilon r} \quad (2.1)$$

Поскольку раствор в целом является электрически нейтральным, то около каждой заряженной группы на поверхности белковой молекулы должен находиться противоположно заряженный ион. Согласно теории Дебая-Хюккеля [44, 45], исходящей из классической статистической механики и электростатики, каждая молекула оказывается окруженной атмосферой противоионов, что приводит к частичной экранировке кулоновских взаимодействий. Т.о., в среде, содержащей ионы противоположного знака потенциал $\varphi(r)$ имеет вид:

$$\varphi(r) = \frac{1}{\epsilon r} e^{-kr} \quad (2.2)$$

Суммарный заряд на молекуле белка определяется концентрацией свободных протонов в растворе, которую обычно характеризуют величиной pH :

$$pH = -lg [H^+] \quad (2.3)$$

Вообще говоря, группы на поверхности белковой молекулы взаимодействуют сложным образом, и их ионизация происходит не независимо. Для анализа связи pH раствора с суммарным зарядом на белке составляется уравнение для идентичных групп [46]:

$$pH = pK + lg \frac{\alpha}{1-\alpha} - \frac{1}{2,3kT} \frac{\partial W}{\partial \bar{z}} \quad (2.4)$$

Здесь pK – константа ионизации, $pK = \frac{a_A a_B}{a_{AB}}$, где $a_i = \gamma c_i$ – активность вещества i , γ – коэффициент активности, α – доля ионизованных групп, W – полная электростатическая свободная энергия, заимствованная из теории Дебая-Хюккеля, или работа по перемещению всех зарядов на поверхность сферы радиуса b и сообщению ей равномерно распределенного заряда:

$$W = \frac{z^2 q^2}{2\varepsilon} \left(\frac{1}{b} - \frac{\chi}{1+\chi a} \right) = kT \bar{z}^2 \omega; \quad \omega = \frac{e^2}{2\varepsilon kT} \left(\frac{1}{b} - \frac{\chi}{1+\chi a} \right); \quad (2.5)$$

a – расстояние предельного сближения белковой молекулы и иона (часто полагают $a \sim b = 2.5 \text{ \AA}$). Получаем:

$$pH = pK + \lg \frac{\alpha}{1-\alpha} - 0.868 \omega \bar{Z} \quad (2.6)$$

Величина pK зависит от взаимодействия данной группы с остальными, и, следовательно, от среднего суммарного заряда Z . Таким образом, уравнение (2.6) выражает нелинейную зависимость величины Z от pH . Полученное уравнение основывается на некоторых допущениях, поэтому не совсем точно согласуется с экспериментом [46, 47]. Во-первых, форму молекул только приближенно можно считать сферической. Во-вторых, распределение заряда вблизи поверхности молекулы нельзя считать равномерным. Наконец, добавление любого электролита в раствор белка приводит к поляризации молекул, поэтому локальная диэлектрическая проницаемость не имеет постоянного по объему значения

Значение pH меняется при добавлении в раствор кислоты или щелочи, при этом в среде появляется либо избыток, либо недостаток протонов по сравнению с чистой водой. Кислота служит донором протонов, щелочь – акцептором. Концентрация водородных ионов в чистой воде составляет $\sim 10^{-7}$ моль/л, т.е. для нейтральной среды $pH = 7$, для кислой $pH < 7$, для основной $pH > 7$ [48]. Для каждого белка существует определенное значение pH , при котором молекула в целом электронейтральна –

так называемая изоэлектрическая точка (pI). При значениях $pH > pI$ белок будет обладать отрицательным суммарным зарядом, при $pH < pI$ – положительным.

Буферной смесью называется раствор, pH которого лишь слабо меняется при добавлении кислоты или щелочи (в небольших пределах). Обычно буферные смеси получают, добавляя к раствору слабой кислоты соль этой же кислоты.

Все аминокислоты в растворах существуют в виде анионов, катионов биполярных ионов и смеси этих форм. Преобладание какой-либо из них зависит от pH раствора, однако при любом pH все аминокислоты ведут себя как сильные электролиты. Различные формы аминокислот присутствуют в растворе в виде ионных солей. Растворы всех аминокислот обладают буферными свойствами, причем их буферная емкость максимальна, когда pH равно значениям pK , кислотных групп (2.4). Значения pK_i для основных групп, а также значения pH , которые соответствуют изоэлектрической точке pI значительно отличаются у различных групп аминокислот.

Можно сделать следующие выводы: растворы макромолекул белка – полиэлектролиты. Распределение заряда на поверхности белка зависит как от pH растворителя, так и от распределения и природы полярных гидратированных остатков, а также их буферных свойств. Понятно, что при увеличении ионной силы раствора

$$\mu = \frac{1}{2} \sum z_i^2 c_i, \quad (2.7)$$

где z_i – валентность ионов солей i -ого вида, а c_i – концентрация соответствующих ионов, происходит экранировка кулоновских взаимодействий между заряженными участками макромолекул из-за появления вокруг них атмосферы сравнительно небольших противоионов. Атмосфера противоионов, в общем случае, описывается так называемым дебаевским радиусом экранирования:

$$\alpha^2 = \frac{4\pi q^2 \mu}{\varepsilon kT}, \quad (2.8)$$

где ε – диэлектрическая проницаемость раствора, а q – заряд электрона.

Параметр κ^2 имеет геометрический смысл обратной величины эффективного радиуса ионной атмосферы, за пределами которой кулоновские взаимодействия полностью экранируются. Ионная сила характеризует общее число ионных зарядов в единице объема независимо от их знаков.

На практике суммарный заряд макромолекул в зависимости от pH определяют, обычно, титрованием белков [22, 49] или же электрофоретическими методами [47].

ГЛАВА 3. ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МОЛЕКУЛ БИОПОЛИМЕРОВ В ТРЕХКОМПОНЕНТНОЙ СИСТЕМЕ (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР).

3.1. ПОВЕДЕНИЕ КОЭФФИЦИЕНТА МЕЖМОЛЕКУЛЯРНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В ТРЕХКОМПОНЕНТНЫХ РАСТВОРАХ. ТЕОРИЯ СКЭТЧАРДА.

Взаимодействие макроионов в растворе, содержащем кроме низкомолекулярного растворителя еще и третью компоненту – сильный электролит, было рассмотрено в теории Скэтчарда [22, 50 – 54]. Согласно Скэтчарду, парные взаимодействия в таких растворах описываются вторым вириальным коэффициентом в разложении для свободной энергии, выражение для которого имеет вид:

$$B = \frac{V_1}{M_2^2} \left(\frac{z^2}{4m_3} + \frac{\beta_{22}}{2} - \frac{\beta_{23}^2 m_3}{4+2\beta_{33}m_3} \right) \quad (3.1)$$

здесь V_1 – удельный объем растворителя, M_2 – масса макроиона, m_3 – концентрация ионов соли. Параметры β_{ij} характеризуют эффект исключенного объема и взаимодействие между парами ионов (индекс 2 – макромолекула белка, 3 – ион соли).

Очевидно, что коэффициент взаимодействия меняется с ростом суммарного заряда на белке по параболическому закону (эффект Доннана) с минимумом в изоэлектрической точке [44 – 45]. Параметр β_{22} обычно незначителен, а третий член в (3.1) может принимать достаточно большие значения, так что при существенной концентрации соли в растворе B может стать отрицательным [4, 7]. При возрастании ионной силы (m_3) вокруг заряженной молекулы белка в растворе возникает облако противоионов, экранирующее кулоновские взаимодействия; коэффициент B уменьшается и стремится к величине, характерной для полностью незаряженных молекул и

определяемой Ван-дер-Ваальсовыми силами, однако параболический вид зависимости $B(pH)$ сохраняется.

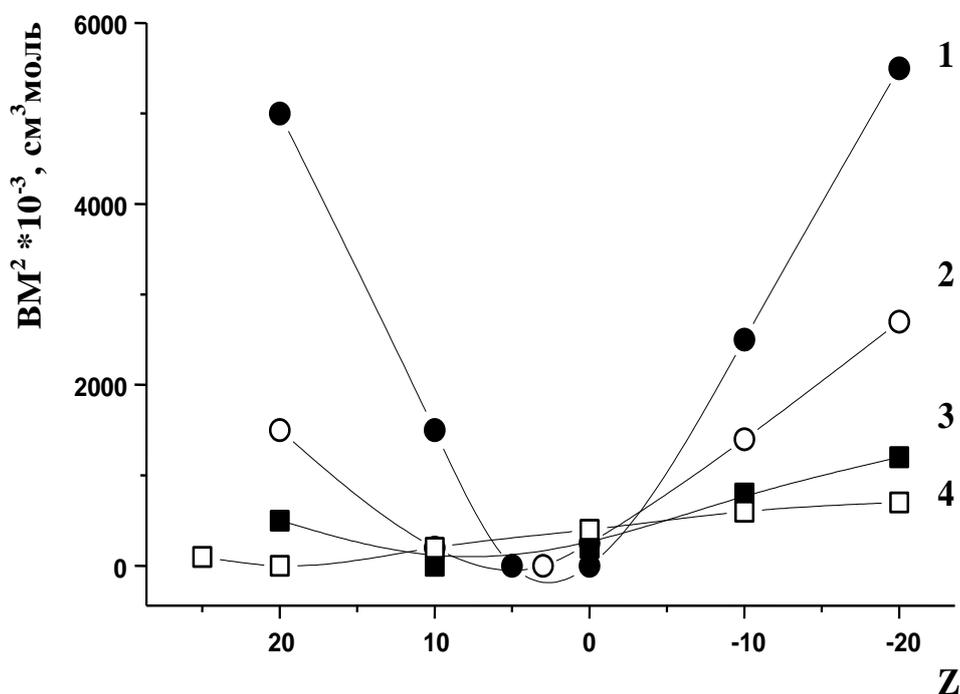


Рис.3.1. Зависимость параметра B от $pH(Z)$ для раствора сывороточного альбумина в присутствии соли $NaCl$ при различных ионных силах: 1 – $\mu=0,003$, 2 – $\mu=0,01$, 3 – $\mu=0,033$, 4 – $\mu=0,183$ моль/л [22].

На Рис.3.1 приведен вид графиков $B(pH)$ для раствора человеческого сывороточного альбумина в присутствии соли $NaCl$. С увеличением концентрации соли наблюдается смещение минимума кривых от изоэлектрической точки в сторону меньших pH (положительных Z). Это явление было объяснено в работе Эдсолла и др. [22] более сильным химическим сродством ионов Cl^- с поверхностью белка. По смещению минимума кривых $B(Z)$ в этой работе приближенно оценивалось изменение эффективного значения величины изоэлектрической точки pI , соответствующей поверхностному заряду $Z = 0$, и число мест сильного связывания ионов Cl^- на поверхности белка (смещение на 1 единицу pH соответствует изменению заряда на 5–6 единиц).

3.2. ИССЛЕДОВАНИЯ РАССЕЙВАЮЩИХ СВОЙСТВ РАСТВОРОВ БЕЛКОВ, СОДЕРЖАЩИХ МАЛЫЕ ИОНЫ.

Среди немногочисленных работ, относящихся к исследованиям рэлеевского рассеяния в растворах белков, основополагающей является работа Эдсолла и др. [22]. В этой работе были исследованы водные растворы бычьего сывороточного альбумина в присутствии солей $NaCl$ и $CaCl$ при различных величинах поверхностного заряда белка. Были получены зависимости параметра межмолекулярного взаимодействия от величины суммарного заряда на белке (Рис.3.1). B изменяется нелинейно с минимумом в изоэлектрической точке, что хорошо согласуется с теорией Скэтчарда, при этом оказалось, что масса белка не зависит от величин заряда и ионной силы. Следует отметить, что в данной работе не учитывались поляризационные свойства макромолекул белка, т.е. фактор Кабанна полагался равным единице.

В серии работ, проведенных в нашей лаборатории за последние несколько лет [2 – 8, 55 – 60], были исследованы растворы сывороточного и яичного альбуминов, гемоглобина, γ -глобулина, лизоцима, пепсин и липоксидазы. При этом было показано, что поляризационные свойства белковых макромолекул зависят от ионной силы раствора и суммарного заряда на поверхности белковой глобулы существенно нелинейным образом.

Особое внимание следует обратить на результаты, полученные для липоксидазы и лизоцима [4-8]. Как показали опыты, липоксидаза плохо растворяется в воде и имеет высокие значения интенсивности поляризованной компоненты рассеяния. При низких значениях ионной силы ($\mu < 0,001$ моль/л) без добавления соли были получены отрицательные значения B и величины массы до 32×10^6 г/моль. Увеличение концентрации ионов соли $NaCl$ до 75000 молекул на одну молекулу белка ($\mu = 0,1$ моль/л) позволило определить значение собственной массы липоксидазы и получить положительные значения второго вириального коэффициента. Найденная в результате молекулярная

масса 97000 г/моль в пределах ошибки совпадает с табличными значениями [44 – 45].

Для белка лизоцима зависимость параметра $B(pH)$ также меняет знак при увеличении ионной силы. С увеличением ионной силы, определяемой концентрацией соли, зависимости $B(pH)$ становятся более пологими, что также согласуется с данными работы [22].

Основной вклад в интенсивность рассеяния света в растворах макромолекул дает рассеяние на флуктуациях концентрации, которые, как показывают эксперименты, резко возрастают при перезарядке молекул с изменением водородного показателя среды. При этом, очевидно, должны изменяться и поляризационные характеристики растворов, связанные с флуктуациями ориентации анизотропных молекул. В работах [2 – 4] были проведены измерения коэффициентов деполяризации при различных величинах pH и различных ионных силах.

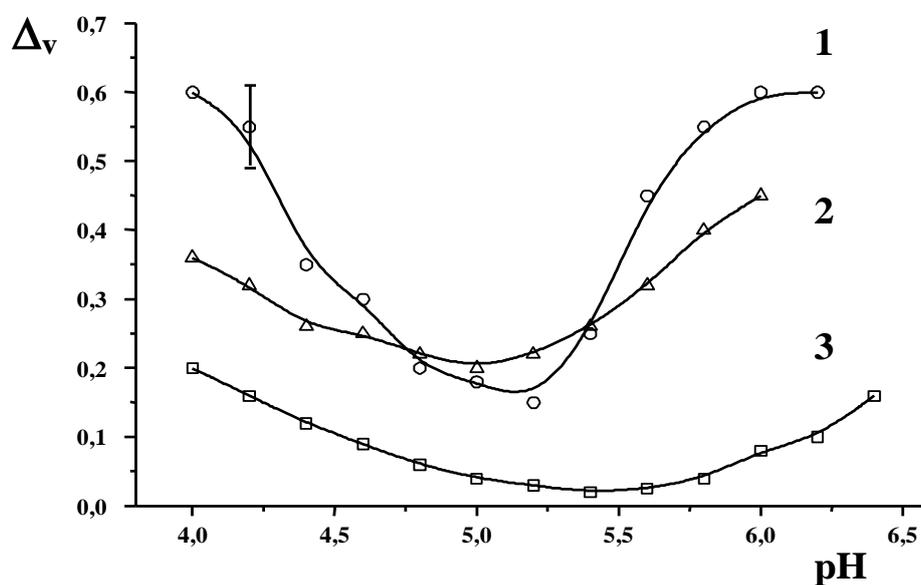


Рис.3.2. Зависимость коэффициента деполяризации Δ_v от pH для растворов гемоглобина при различных концентрациях $NaCl$:
1 – $\mu=0,001$, 2 – $\mu=0,005$, 3 – $\mu=0,05$ моль/л [4].

На Рис.3.2 представлены некоторые из полученных зависимостей. Как можно видеть, зависимости $\Delta_v(pH)$ имеют существенно нелинейный характер с

экстремумом в окрестности изоэлектрической точки белка. Этот экспериментально обнаруженный факт был положен в основу простого и эффективного метода определения изоэлектрической точки белков, не требующего большого количества вещества [61]. При возрастании ионной силы исследованных растворов, определяемой концентрацией соли $NaCl$, характер зависимостей $\Delta_v(pH)$ несколько изменяется, кривые становятся более пологими.

Из экспериментально определенных значений коэффициента деполяризации и электронной поляризуемости α для некоторых белков были рассчитаны величины компонент тензора поляризуемости и оптической анизотропии (1.7, 1.9, 1.10) при различных значениях водородного показателя раствора (Рис.3.3, 3.4). На полученных графиках также четко выражен экстремум, который совпадает с соответствующей изоэлектрической точкой.

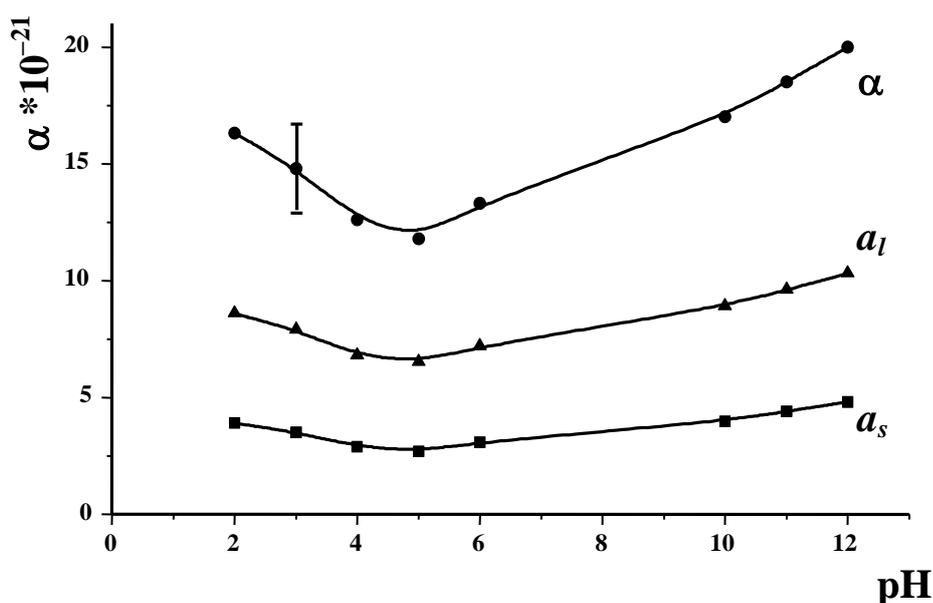


Рис.3.3. Зависимость средней поляризуемости α и компонент тензора поляризуемости макромолекулы сывороточного альбумина от pH раствора в отсутствие соли [2].

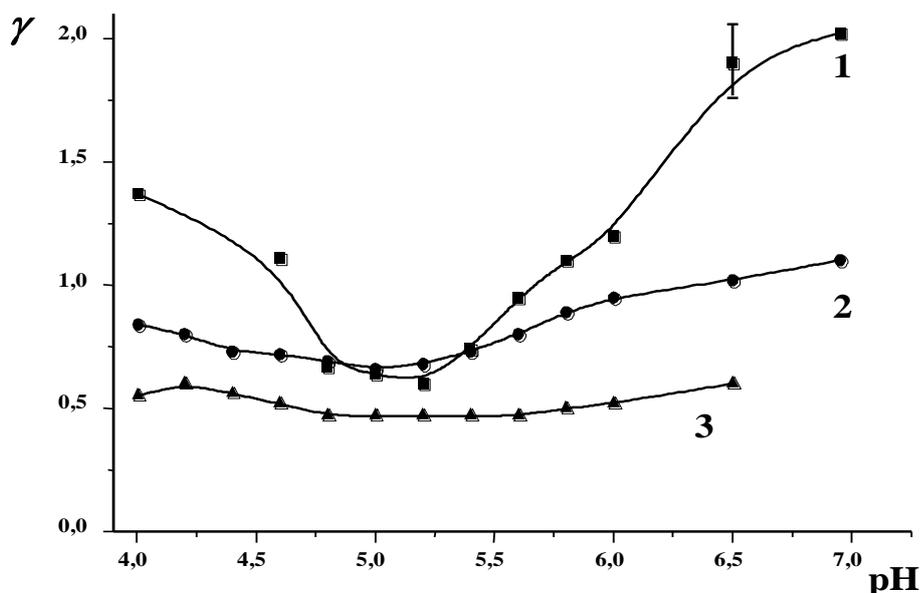


Рис.3.4. Зависимость оптической анизотропии γ макромолекулы гемоглобина от pH при различных ионных силах: 1 – $\mu=0,001$, 2 – $\mu=0,005$, 3 – $\mu=0,05$ моль/л.

Как было показано в работах [62 – 69], характер зависимости $B(pH)$ резко изменяется в присутствии соли тяжелого щелочного металла (Рис.3.5, 3.6). Наблюдаются экстремумы кривых $B(pH)$, но вместо минимума в области изоэлектрической точки B имеет максимальную величину, причем с ростом ионной силы раствора происходит рост максимума B и смещение его в сторону отрицательных значений Z (больших pH).

На основании полученных данных было сделано предположение [62 – 69], что подобное явление может быть связано с размерами малых ионов, присутствующих в системе. Ионы, обладающие большими ионными радиусами прочнее связываются с поверхностными группами белка. Поэтому при увеличении ионной силы минимум зависимостей $B = f(pH)$ сдвигается в сторону меньших pH , соответствующих большему положительному заряду на белке, аналогично тому, что наблюдалось в работе Эдсолла [22].

Сравнивая относительную энергию взаимодействия заряженного иона и дипольной молекулы воды с тепловой энергией, можно сделать вывод, что ионы щелочных металлов, обладающих значительной массой и большими ионными радиусами (например, для рубидия Rb^+ и цезия $Cs^+ \sim 1,47$ и $\sim 1,67 \text{ \AA}$

соответственно), будут также сравнительно слабо удерживать гидратную оболочку. Это должно привести к тому, что процессы адсорбции тяжелых ионов Rb^+ и Cs^+ и легкого Na^+ на поверхности белка будут существенно различаться. Эффект смещения, который наблюдался в [2, 7, 63], был объяснен адсорбцией ионов Cs^+ на белке.

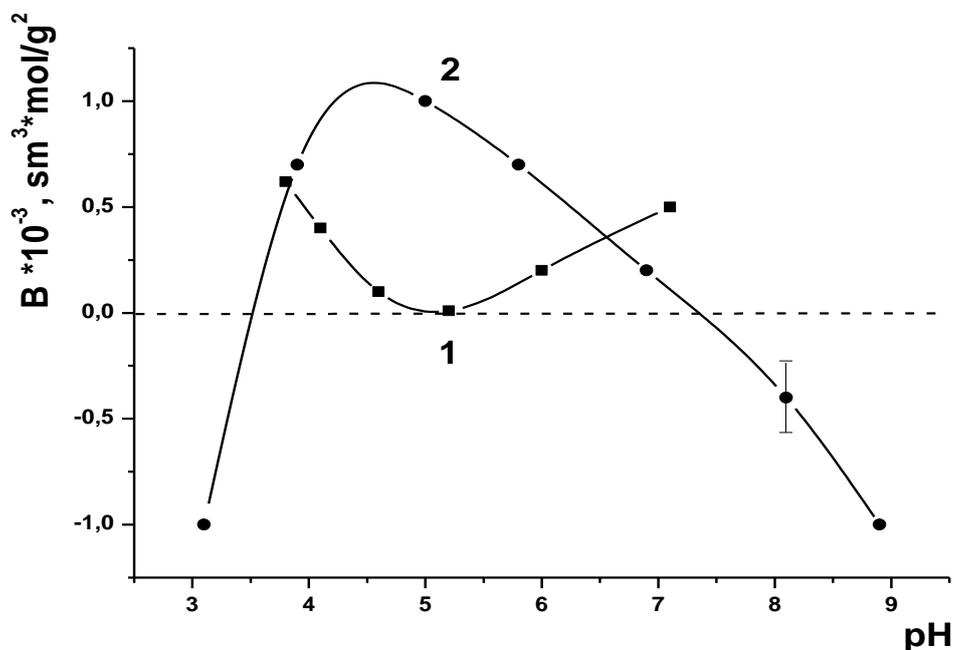


Рис.3.5. Зависимость параметра B от $pH(Z)$ для раствора сывороточного альбумина: 1 – в чистой воде, 2 – в присутствии соли $CsCl$ при ионной силе $\mu=0,1$ моль/л.

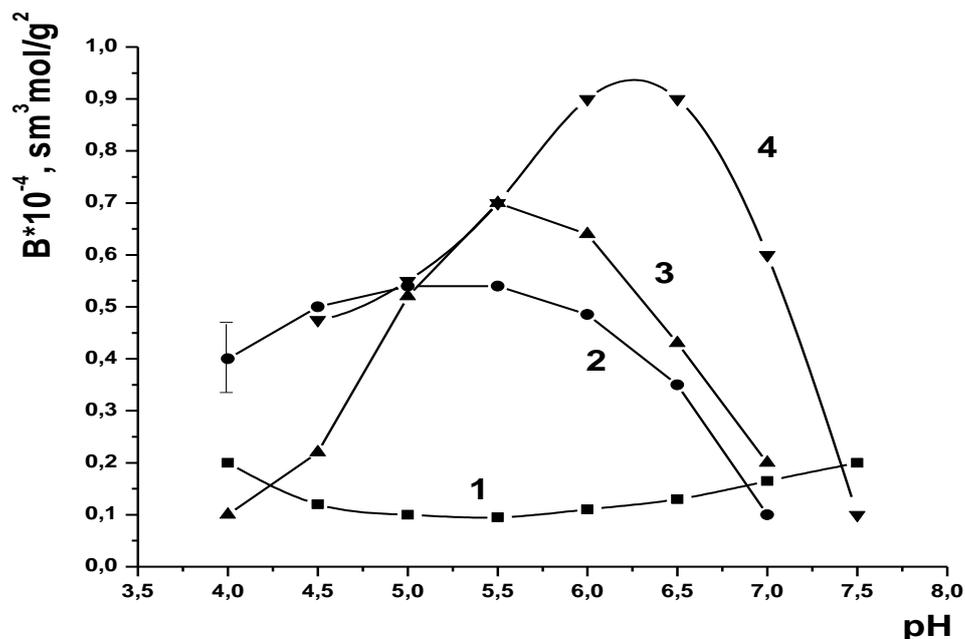


Рис.3.6. Зависимость параметра B от $pH(Z)$ для водного раствора яичного альбумина в присутствии соли $CsCl$ при различных ионных силах: 2 – $\mu=0,01$, 3 – $\mu=0,1$, 4 – $\mu=0,2$, кривая 1 получена для белка в растворе $NaCl$, $\mu=0,1$ моль/л.

Если при одинаковых ионных силах в растворах [альбумин + вода + $NaCl$] и [альбумин + вода + $CsCl$] одинаковое количество ионов хлора присоединяется к белку, то можно приблизительно оценить число посадочных мест на белке для ионов Cs^+ . В растворе с $NaCl$ ($\mu = 0,1$ моль/л) сдвиг экстремума $B = f(Z)$ происходит в сторону положительных значений Z [22] ($\Delta(pH) \sim 0,5$), а в растворе с $CsCl$ для той же ионной силы экстремум зависимостей $B(pH)$ сдвигается в сторону отрицательных Z ($\Delta(pH) \sim 0,6$). В этом случае наблюдается смещение экстремума порядка 1 pH что соответствует общему изменению заряда (по модулю), равному примерно 5–6 единицам, и положение экстремума $B = f(Z)$ будет соответствовать фактическому заряду белка $Z^* = 0$.

Исследования водных растворов различных белков с помощью метода светорассеяния [1 – 8, 22] показывают, что масса белковых макромолекул M в растворе с изменением поверхностного заряда на белке Z остается практически постоянной. Из экспериментальных данных в работах [2, 63 – 65] были рассчитаны массы рассеивающих частиц. Характерно, что в присутствии ионов тяжелого щелочного металла (Рис.3.7 – 3.9) масса рассеивающих частиц не остается постоянной, а резко возрастает в области изоэлектрической точки, соответствующей фактическому заряду $Z^* = 0$, причем максимум значений M увеличивается с ростом ионной силы. Для сывороточного альбумина этот максимум достигал 60 молекулярных масс [8, 70].

Обнаруженное явление было объяснено преобладанием сил диполь-дипольного взаимодействия между макромолекулами белков в растворе по сравнению с силами кулоновского отталкивания и образованием макромолекулярных комплексов – кластеров.

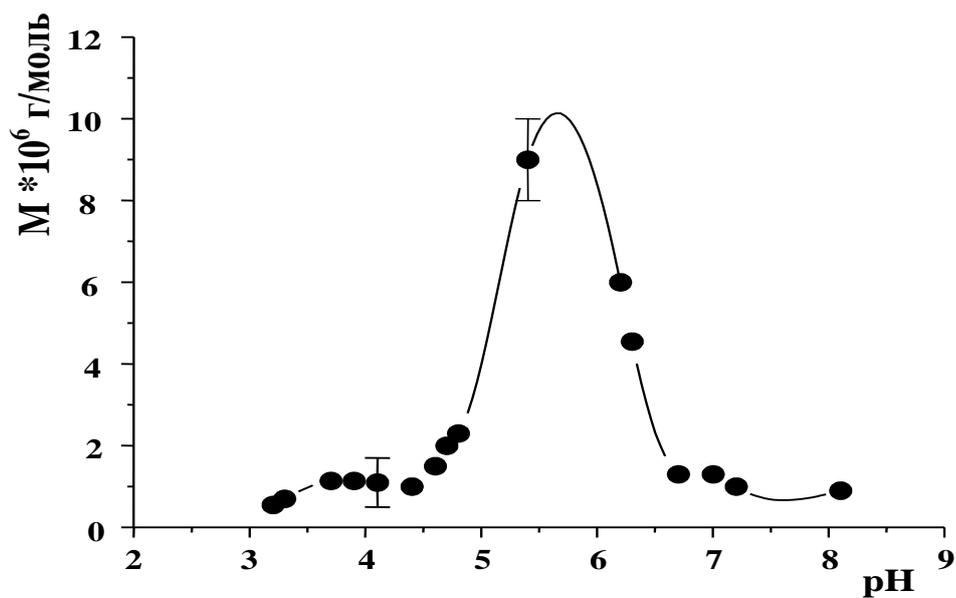


Рис.3.7. Рост массы рассеивающих частиц $M(\text{pH})$ в водном растворе сывороточного альбумина в присутствии соли RbCl , $\mu=0,01$ моль/л.

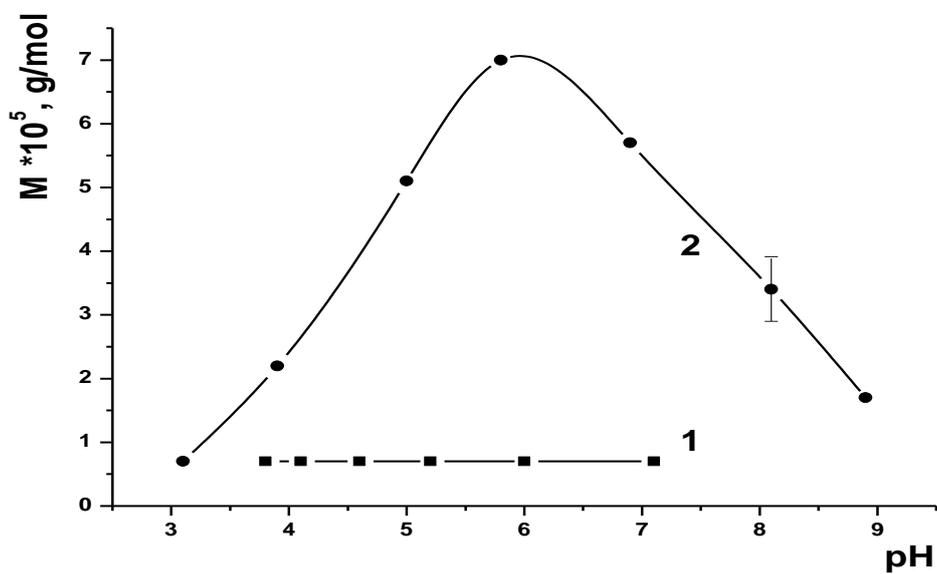


Рис.3.8. Зависимость массы рассеивающих частиц M от pH (Z) для раствора сывороточного альбумина в чистой воде (1) и в присутствии соли CsCl при ионной силе $\mu=0,1$ моль/л (2).

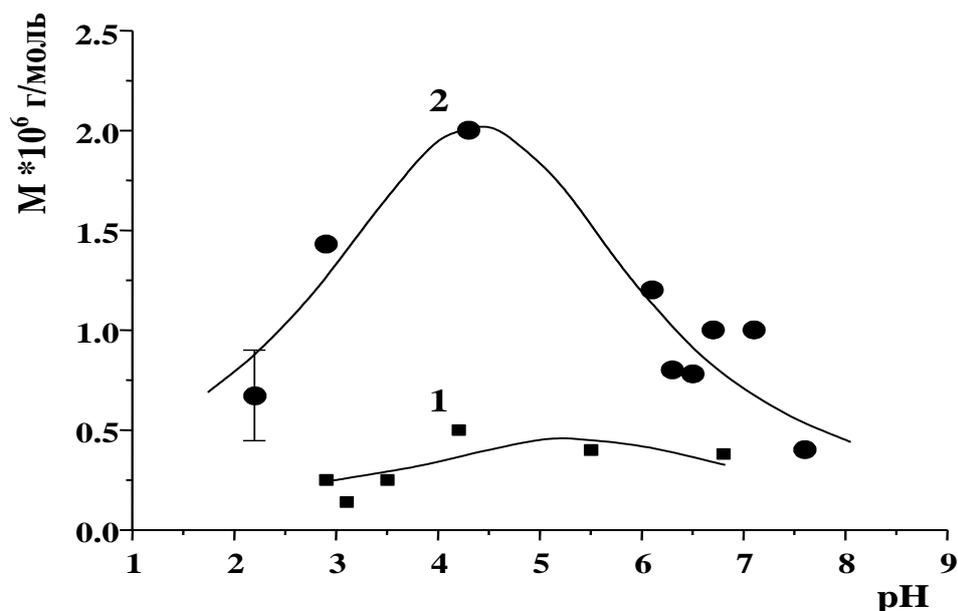


Рис.3.9. Рост массы рассеивающих частиц $M(pH)$ в водном растворе яичного альбумина в присутствии соли $CsCl$: 1 – $\mu=0,1$, 2 – $\mu=0,2$ моль/л.

3.3 СТРУКТУРНЫЕ ТЕМПЕРАТУРНЫЕ ПЕРЕХОДЫ ЛИЗОЦИМА.

С помощью ^{13}C -ядерно-магнитной резонансной спектроскопии было показано, что при температуре в интервале $20 - 30^\circ C$ происходит температурно-зависимый конформационный переход лизоцима, и главная причина структурного изменения лежит в окрестности участков D и E на одной стороне щели молекулы фермента [71].

На Рис.3.10 показаны зависимости Аррениуса. Удобнее преобразовать значения и получить градусы Цельсия. Точка $3,2 \times 10^3 K^{-1}$ соответствует температуре $39,5^\circ C$, $3,3 - 30^\circ C$, $3,4 - 21^\circ C$, $3,5 - 12^\circ C$. Таким образом, на графике pH 6.2 мы видим четко обозначенный излом в районе температуры $25^\circ C$, который соответствует конформационному переходу. При повышении температуры выше $25^\circ C$ эффективность связывания растворенных лизоцим-фрагментов субстрата заметно уменьшается – в 2 – 3 раза при переходе от $20^\circ C$ к $40^\circ C$ [72].

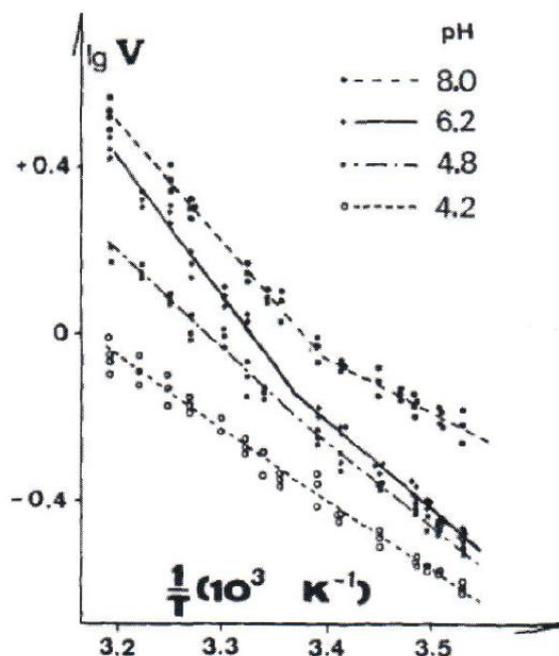


Рис.3.10. Зависимости Аррениуса для лизоцима при различных рН.

Другой эксперимент был также проведен методом ядерно-магнитной резонансной спектроскопии, однако в нем исследовались непосредственно полученные спектры. Специфические изменения в химических сдвигах ароматических соединений, а также различия в химических сдвигах в различных регионах лизоцима указывают, что конформационные изменения в интервале температур 20 – 30°C происходят около участков *D* и *E* активного центра [73].

Рис.3.11. демонстрирует множество изменений, произошедших в области алифатических связей. График различия спектров показывает нам картину различий химических сдвигов, единственной причиной которых может являться перестройка значительного числа аминокислотных остатков в молекуле. Из графиков очевидно, что при температурно-зависимом структурном изменении в интервале 20 – 30°C происходит значительное число малых изменений, а не несколько крупных.

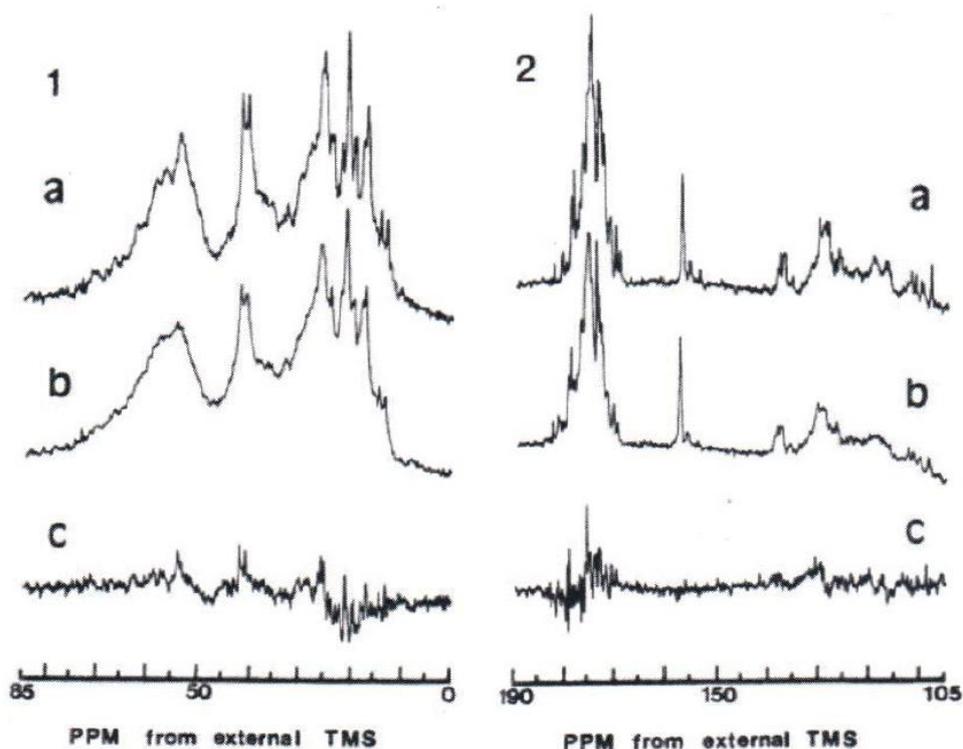


Рис.3.11. Спектр, получаемый в результате ^{13}C -ЯМР лизоцима а) 30°C , 53000 измерений, б) 20°C , 70000 измерений, в) Разница спектров, полученная методом Фурье-анализа.

Методом инактивации лизоцима под действием ультразвука были найдены несколько температурных переходов, один из которых произошёл при температуре около 27°C [72]. Ультразвуковой метод изучения конформационных переходов в активном центре фермента в ряде случаев очень удобен. Основным его преимуществом является то, что он не связан с введением в ферментативную систему дополнительного эффектора, который может существенно изменять свойства активного центра фермента, в том числе его конформацию.

Суть метода состоит в следующем. Под действием кавитационного ультразвука в водном растворе образуются свободные радикалы (в основном гидроксильные и гидропероксильные), при попадании которых в активный центр фермента обычно происходит его инактивация вследствие деструкции какой-либо функциональной группы активного центра. Следовательно, скорость инактивации фермента ультразвуком зависит от доступности данной функциональной группы для свободных радикалов из среды. В свою очередь, доступность функциональной группы может меняться при конформационных

переходах активного центра фермента, вызываемых внешними факторами. Изучая зависимость скорости инактивации фермента под действием ультразвука при изменении внешних факторов, можно выявить характер конформационных переходов активного центра.

В случае лизоцима осуществляется подряд три конформационных перехода при температурах 31°C, 52°C и 71°C (Рис.3.12).

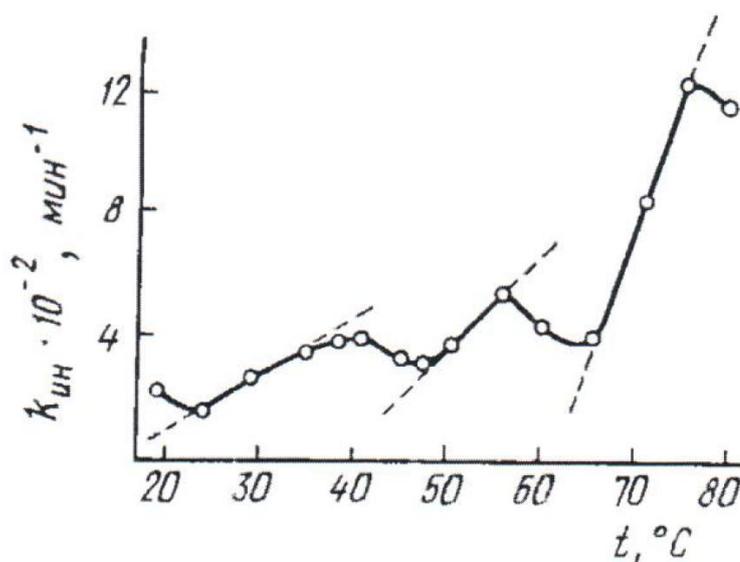


Рис.3.12. Зависимость константы скорости инактивации лизоцима под действием ультразвука от температуры. Условия: концентрация лизоцима $8,7 \times 10^{-7} \text{ M}$; pH 7,0; частота ультразвука 880 кГц, интенсивность 2 Вт/см^2 [72].

Другой эксперимент по исследовании конформационных переходов лизоцима в растворе был произведен методом инактивации лизоцима под действием ультразвука. При дальнейшем повышении температуры в лизоциме начинают образовываться неактивные кластеры [74].

В работе [75] изучался механизм взаимодействия ионов серебра и лизоцима. Использовались методы флуоресцентной спектроскопии, УФ и видимые спектры поглощения, а так же анализ активности фермента. Для изучения взаимодействия небольших молекул серебра и белка лизоцима были измерены спектры излучения флуоресценции в моделируемых физиологических условиях ($T = 297 \text{ K}$, pH 5.5). Лизоцим обладает внутренней флуоресценцией, главным образом из-за наличия в составе триптофана (*Trp*), тирозина (*Tyr*), и фенилаланина (*Phe*). Среди них *Trp* играет наиболее важную

роль в собственной флуоресценции лизоцима. В соответствии с полученными данными, интенсивность флуоресценции лизоцима уменьшалась при увеличении концентрации ионов серебра. Кроме того было показано, что ионы серебра могут самопроизвольно связываться с лизоцимом через водородные связи и Ван-дер-Ваальсово взаимодействие. В молекуле лизоцима есть большой карман, который дает возможность ионам серебра проникать в активный центр. Данные, полученные с помощью УФ и видимых спектров поглощения показали, что структура лизоцима становится более рыхлой в присутствии ионов серебра. Активность лизоцима ингибируется ионами серебра, как показал анализ активности фермента. Ионы серебра связываются с лизоцимом в активном центре, что приводит к снижению активности лизоцима. Белок может выполнять определенную роль в организме только при условии, что его структура строго фиксирована. В этой работе было показано, что ионы серебра могут нарушать структуру и тем самым нормальное функционирование фермента в организме.

3.4 СТРУКТУРНЫЕ ПЕРЕХОДЫ КРЕАТИНКИНАЗЫ.

В книге [76] был замечен интересный факт об особенности креатинкиназы. Необычность этого фермента состоит в том, что при увеличении концентрации в водном растворе креатинкиназа из мономеров превращается в димеры, а потом и в октамеры. Критическая концентрация, при которой мономеры фермента объединяются в димеры, равна 0,55 мг/мл [76]. Этот результат был получен методом динамического светорассеяния для мышечной креатинкиназы. Авторы проводили свои исследования в буфере *GdnHCl*.

В работе [77] с помощью метода динамического светорассеяния изучался фермент *Chaetopterus variopedatus mitochondrial creatinekinase (CvMtCK)*. Авторами были получены зависимость степени октамеризации от

концентрации раствора, зависимость гидродинамического радиуса от степени октамеризации (Рис.3.14 и Рис.3.13).

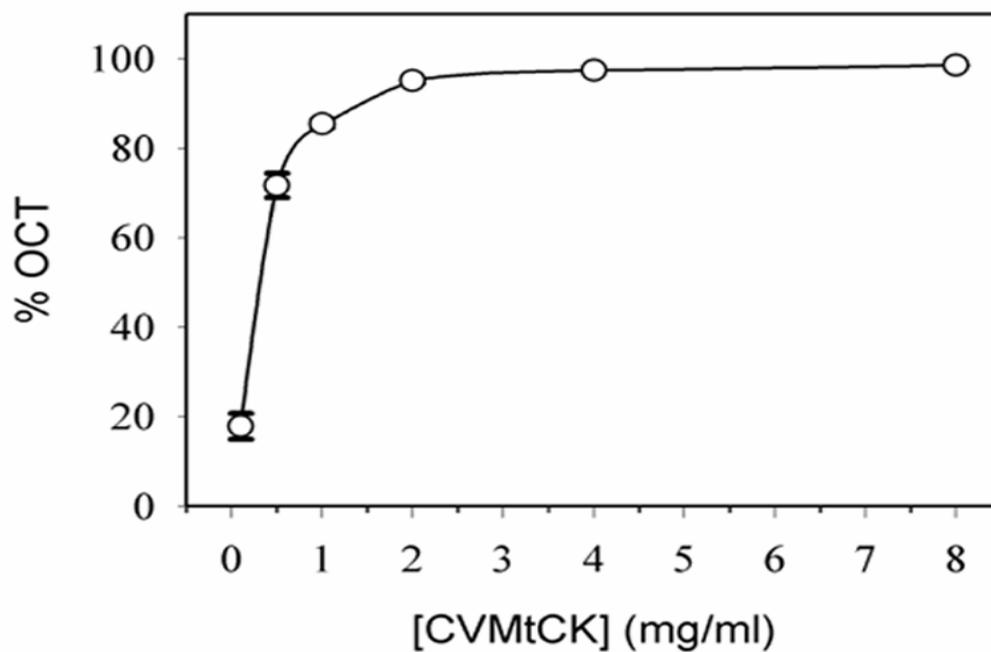


Рис.3.13. Зависимость степени октамеризации от концентрации [77].

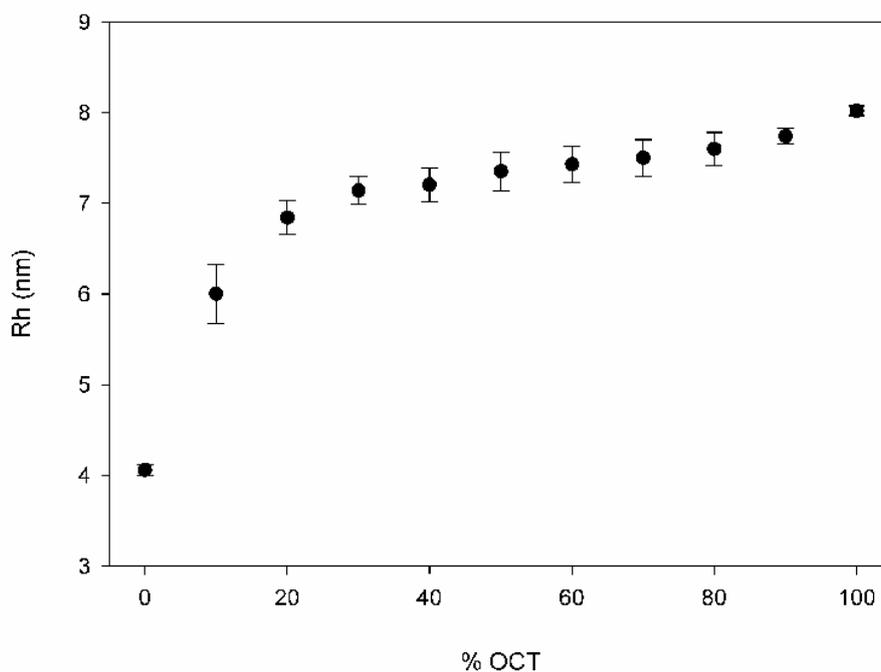


Рис.3.14. Зависимость гидродинамического радиуса от степени октамеризации [77].

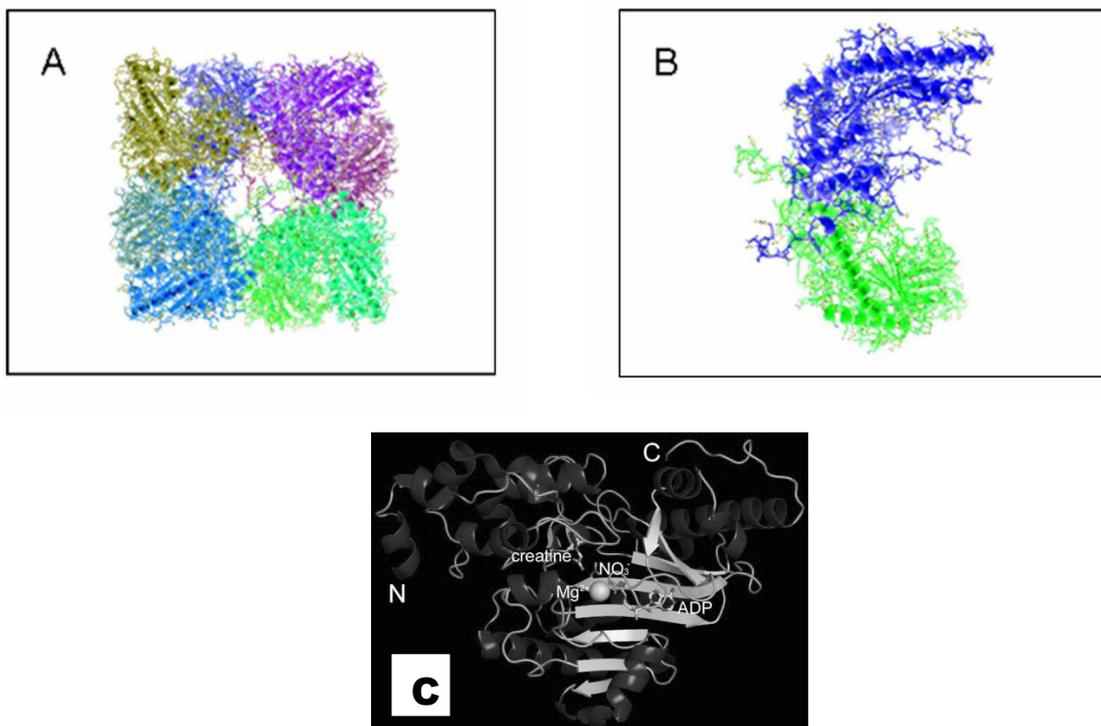


Рис.3.15. А – октамер креатинкиназы, В – димер креатинкиназы, С-мономер креатинкиназы

Структурные формы молекулы креатинкиназы представлены на Рис.3.15. Гидродинамический радиус димера – 4 нм, октамера – 8 нм. [77].

Общим для всех рассмотренных работ является тот факт, что молекулы креатинкиназы в воде обладают разным строением в зависимости от концентрации фермента в растворе и свойств растворителя.

В работе [78] изучалась структура креатинкиназы методом электронной микроскопии. В ней было показано, что конечная структура молекулы креатинкиназы – это октамер.

На Рис.3.16 показаны изображения октамера креатинкиназы четырьмя методами электронной микроскопии. Общей особенностью этих изображений является то, что октамер имеет ось симметрии 4-го порядка, проходящую через центр молекулы. Октамер представляет собой молекулу размером $10 \times 10 \times 8,4$ нм.

В 1962 году Дэнсом и Уотсом было предположено, что активная форма креатинкиназы – это димер [79].

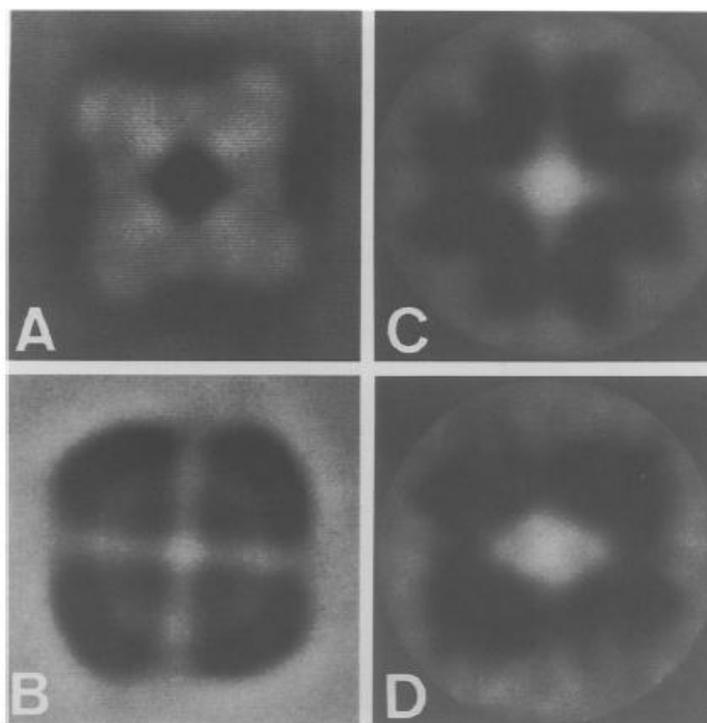
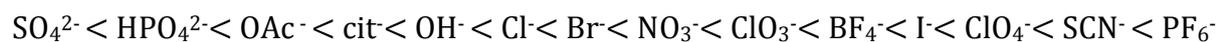
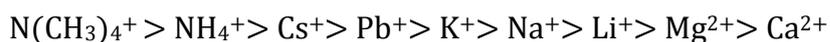


Рис.3.16. А – вид с торца отрицательно окрашенных октамеров креатинкиназы, В – изображение октамеров методом поворотного затемнения, С – встроенные в лед октамеры, D – изображение октамеров креатинкиназы методом “голых” сеток для криоэлектронной микроскопии

3.5. ЭФФЕКТ ХОФМЕЙСТЕРА

Взаимодействие ионов с макромолекулами изучается уже в течение нескольких веков. Одно из самых интересных открытий было сделано во второй половине XIX века Францем Хофмейстером, который изучал растворимость в воде белков, содержащихся в куриных яйцах, в присутствии различных ионов. Он установил, что результат взаимодействия зависит не только от заряда и размера иона, но и от того, что это непосредственно за ион. По силе действия ионов на макромолекулы были составлены ряды, получившие название рядов Хофмейстера, или лиотропных рядов [80-82]:



Чем правее ион находится в этом ряду, тем сильнее он увеличивает гидрофобные взаимодействия, и растворимость неполярных молекул становится меньше (это также называют высаливанием). Чем ион левее, тем гидрофобные взаимодействия становятся слабее, и увеличивается

растворимость полярных молекул. Эффект высаливания широко используется, например, при очистке белков с помощью осаждения сульфата аммония. Особенно интересным является тот факт, что при значениях pH раствора меньше изоэлектрической точки pI белка (точка, в которой суммарный заряд белка равен нулю) ряд меняет направление на противоположное. Этот экспериментальный факт был известен практически со времён опубликования Хофмейстером своей работы в 1888 году, однако до сих пор учёным не удаётся построить модель, полностью объясняющую его. За этим явлением стоят очень сложные физические процессы, не совсем вписывающиеся в классические электростатические теории и модели двойного слоя, которые считают исследуемые молекулы твёрдыми шариками, а учитываемые параметры ионов ограничиваются их зарядами и размерами. В работах [83] и [84] было показано насколько важно учитывать также и потенциал ионической дисперсии, действующий между ионами и молекулами белка. На концентрациях выше биологических зачастую пренебрегают специфичными неэлектростатическими силами, которые включают в себя ионические поляризуемости (они несколько отличаются от поляризуемости окружающих их молекул воды) и абсорбционные частоты. Помимо этого, важную роль играет электронная плотность, ответственная за гидратацию (собственная энергия дисперсии и свободная энергия сольватации) ионов. На границе раздела вода – воздух также наблюдаются изменения в энергии ионической сольватации при приближении ионов к поверхности раздела неоднородной формы, состоящей из молекул воды и растворённых газов. Учёные разработали количественную теоретическую модель, которая учитывает изменения гидратации и абсорбции через неэлектростатические силы и значения дисперсии. Проведённые ими численные моделирования показали, что силы между двумя глобулярными белками с постоянными зарядами, взаимодействующими с рядом ионов, без учёта ионической дисперсии практически не меняются при изменении ионных радиусов. Главным выводом этих работ была недопустимость игнорирования неэлектростатических сил и электродинамических ионных эффектов, которые в

настоящее время учитываться могут только количественно. Перед учёными стоит важная и крайне сложная задача в разработке строгой нелинейной электродинамической модели, учитывающей вышеприведённые эффекты.

К настоящему времени экспериментально установлено, что эффект Хофмейстера находит свое отражение в таких свойствах растворов, как снижение температур кристаллизации, активность компонентов растворов, pH буферных растворов, поверхностное натяжение, осмотическое давление, растворимость, электрофоретическая подвижность, вириальные коэффициенты растворов биомолекул [82, 85 – 88] и т.д.

СПЕЦИФИЧЕСКИЙ ИОННЫЙ ЭФФЕКТ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СТРУКТУРАХ

Эффект Хофмейстера был обнаружен при изучении биологических структур и исследователи до сих пор находят в них его новые проявления [89]. Специфический ионный эффект представляет особый интерес при исследовании живых систем. В самом деле, соли играют огромную роль в пищеварении, нервной системе, свойствах крови [81]. Ионы солей играют важнейшую роль в определении свойств морской воды, присутствуют во всех живых организмах и участвуют во многих биологических процессах. Присутствие соли изменяет растворимость, денатурацию, деполимеризацию и диссоциацию белков и влияет на кинетику ферментов [90]. На сегодняшний день изучение влияния различных солей на растворимость и осаждаемость белков в водных растворах до сих пор остается актуальным объектом для исследований.

В одной из экспериментальных работ, посвященной влиянию ионов на оседание частиц дисперсной фазы (белков) в жидкости под действием центробежной силы, отмечается два эффекта, связанные с добавлением соли [91]. Первичное влияние соли связано с изменением поверхностного заряда белка. А именно, при увеличении заряда увеличивается напряженность поля вокруг белка, что приводит к уменьшению скорости оседания. Вторичный эффект представляет собой эффект Хофмейстера: если ионы имеют различные

коэффициенты седиментации, то лимитирующее значение скорости осаждения зависит от вида иона соли.

Растворимость белка характеризуется концентрацией, выше которой существует равновесная смесь растворенного и агрегированного белка. Механизм влияния соли на осаждаемость белков в соляных растворах является весьма тривиальным. Добавление соли приводит к увеличению поверхностного натяжения раствора, и компактная структура становится энергетически более выгодной, потому что она соответствует меньшей межфазной границе белок/раствор. В одной из работ эффект Хофмейстера в изменении растворимости белков объясняется с помощью кинетической модели, согласно которой соли вызывают асимметрию стохастических флуктуаций свободной энергии у реагентов и активированного комплекса, вызванной присутствием данной соли [90]. Амплитуда таких флуктуаций оказывается пропорциональной концентрации соли. При низкой концентрации поведение системы определяют электростатические взаимодействия, в то время как при повышении концентрации становятся все значимыми электронные донорно-акцепторные силы. Анализ модели показал, что, несмотря на большое разнообразие сил, действующих в системе (электростатические, Лифшиц – Ван-дер-Ваальсовы, структурные и др.), по-видимому, ответственными за эффект Хофмейстера являются электронные донорно-акцепторные взаимодействия, обеспечивающие явление гидратации.

Исследование влияние солей на вторичную структуру биомолекул показало, что присутствие соли изменяет их структуру, снижая спиральность пептидных молекул в последовательности Хофмейстера [92]. Уже не в первый раз было отмечено, что специфический ионный эффект определяется комплексными взаимодействиями между ионами, пептидами и молекулами воды.

Объяснить эффект Хофмейстера в белковых растворах также можно исходя из концепции космотропных (стабилизируют структуру воды и в белковом растворе вызывают денатурацию белков, что приводит к их

осаждению) и хаотропных (дестабилизируют структуру воды и вызывают растворение белков) ионов [93]. В общем случае белки имеют как гидрофобные, так и гидрофильные составляющие. Если гидрофобная часть достаточно велика, она может стать полностью обезвоженной, окружив себя парообразной пленкой в которую могут адсорбироваться хаотропные ионы. Этот процесс будет стимулировать сольватацию протеинов, но в то же время будет разрушать их третичную структуру, вызывая денатурацию. С другой стороны, космотропные ионы будут содействовать осаждению белка, оказывая двойное действие. Космотропные ионы адсорбируют воду, которая, в противном случае, будет растворять гидрофобные части белка. Они также экранируют электростатическое отталкивание, позволяя заряженным белкам прийти в соприкосновение и склеиться в результате Ван-дер-Ваальсовых и гидрофобных взаимодействий. Это ведет к образованию больших белковых кластеров, которые не могут быть растворены в воде и выпадают в осадок [88].

Измерения электрофоретической подвижности молекул лизоцима [94] показали, что изменение pH или концентрации раствора может привести к обращению последовательности Хофмайстера. В случае увеличения водородного показателя изменение последовательности связывается с изменением заряда на поверхности белка при переходе через изоэлектрическую точку. Тогда заряд белка из отрицательного становится положительным, что приводит к адсорбции анионов на его поверхности. Такой же эффект (изменение последовательности анионов для модуля электрофоретической подвижности белков) вызывает увеличение концентрации соли. В этом случае обращение серии связывается с изменением поверхностного заряда белка и энергии взаимодействия между белками, вызванным специфической адсорбцией ионов. Например, более поляризуемый ион при низких концентрациях сильнее понижает поверхностный заряд белка и обеспечивает более высокий поверхностный заряд другого знака при высоких концентрациях.

Специфический ионный эффект проявляется в активности и стабильности буферных растворов ферментов при добавлении в них ионных жидкостей [95] и определяет величину их ферментативной производительности. При этом, влияние ионов неорганических солей на стабильность ферментов носит общий характер, а их эффект на активность зависит от вида фермента. Уменьшение активности и стабильности ферментов, вызванное наличием катионов ионных жидкостей, может относиться к:

- 1) Сильным парным ионным взаимодействиям с космотропными частями поверхности молекулы фермента, согласно модели Коллинза [93].
- 2) Сильным гидрофобным взаимодействиям с внутренними гидрофобными частями молекулы фермента, ведущим к разрушению естественной структуры фермента.

Также, специфическое влияние ионных жидкостей может быть связано с влиянием их катионов и анионов на pH раствора, конформации активного центра и каталитический механизм фермента в соответствии с серией Хофмейстера.

3.6. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДОВ РАССЕЯНИЯ СВЕТА.

Одним из наиболее практических применения метода ДРС является его использование при выращивании белковых кристаллов, так как он позволяет быстро и легко определять насколько раствор дисперсен, т.е. есть ли в нём только мономеры белка, или же в растворе появляются димеры, тримеры и т.д. Также можно оценивать стабильность раствора, а главное – понять, как изменения экспериментальных условий влияют на агрегацию молекул, что позволяет правильно подобрать концентрацию кристаллизующего агента. Метод динамического рассеяния света представляется особенно удобным благодаря тому, что он не разрушает образец, и в продаже существует множество готовых экспериментальных установок, с которыми легко обращаться. В работе [96] определялся коэффициент межмолекулярного

взаимодействия B в растворе с изменяемой концентрацией агента. B можно найти с помощью вычисления коэффициента трансляционной диффузии. Экспериментально и теоретически было установлено, что определённым значениям B соответствуют условия, наиболее подходящие для роста кристаллов, которые назвали «кристаллизационной ячейкой».

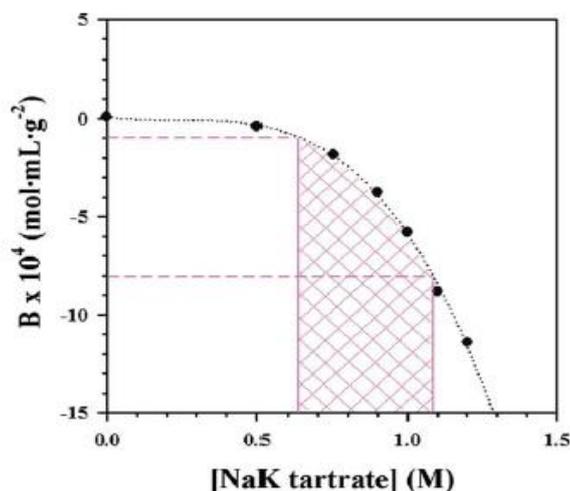


Рис.3.17. «Кристаллизационная ячейка», заштрихованной области соответствуют наиболее подходящие концентрации агента (тартата NaK).

Метод хорошо дополняется другими оптическими методами исследования микро- и наночастиц, например, видео- и ультрамикроскопией, что было реализовано в одном устройстве в работе [97]. Было выяснено, что при исследовании образца с помощью тонколистовой иллюминации возможно обнаружение кластеров размером значительно меньше предельного (300 нм) разрешения обычных микроскопов. С помощью комбинации листовой и проходящей иллюминации возможно одновременно наблюдать как кристаллы белка, так и микроскопические агрегаты.

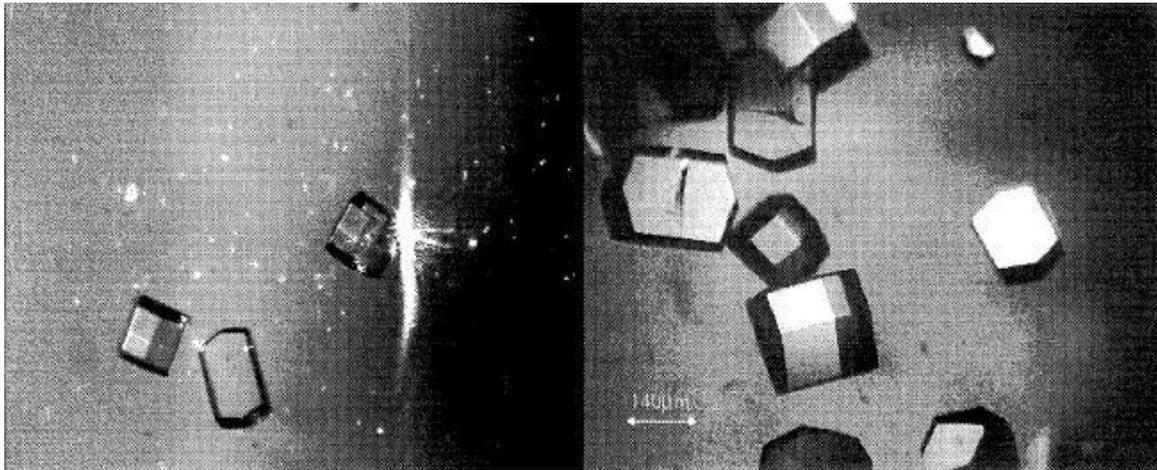


Рис.3.18. Кристаллы лизоцима, визуализированные с помощью комбинации листовой и проходящей иллюминации (слева) и использовании только проходящего излучения (справа).

В работе [98] методом ДРС были исследованы изменения, происходящие в зараженных малярийным паразитом эритроцитах, и было показано, что возникновение и прогрессирование патологических состояний можно четко наблюдать с помощью методов рассеяния.

Фотонно-корреляционная спектроскопия используется более трех десятилетий для изучения глазных тканей. От *in-vitro* экспериментов по изучению катарактогенеза подход был расширен до качественного изучения *in-vivo* всех глазных тканей от роговицы и сетчатки до сосудистой оболочки глаза, что является очень сложной для метода задачей в силу ограничений по мощности источника света и времени экспозиции, но в то же время удобным методом для выявления патологий на ранних стадиях [99].

Для увеличения эффективности метода широко используются волоконные оптические системы, с помощью которых можно пользоваться источниками излучения мощностью всего 2 мВт, что на порядок меньше, чем в обычных системах ДРС, а также делать установки более компактными [100]. Особенно удобными или даже незаменимыми подобные конструкции оказываются для изучения объектов необычной формы и рассеивающих объемов, недоступных для обычных систем, так как через волокно можно передавать как рассеиваемый, так и рассеянный свет, что позволяет легко проводить измерения под любым углом рассеяния. Полученные при этом

измерения размера молекул лизоцима с низкой концентрацией раствора отлично согласовались с табличными значениями.

В качестве источника излучения в методе ДРС обычно используют высококогерентный источник, например, лазер, однако в работе [101] было показано что можно использовать также и низкокогерентный источник света (в данном случае суперлюминисцентный диод с частотой 833,6 нм и шириной спектральной линии 16.2 нм), при этом для увеличения чувствительности был использован интерферометр Маха-Цендера и конфокальная оптическая система. Эта установка оказалась способной обнаруживать частицы размером порядка 10 нм. Работы в этом направлении показывают, что возможно уменьшение размеров и энергопотребления инструментов для ДРС, которые в будущем, возможно, станут полностью портативными.

ГЛАВА 4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ БЕЛКОВ И ФЕРМЕНТОВ ОПТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Проведение экспериментов включало в себя несколько этапов: измерение инкремента показателя преломления исследуемых растворов, подготовка и юстировка установки, отбор кювет, подготовка исследуемых растворов (приготовление и измерение pH растворов, приготовление растворов белков, растворов солей металлов), непосредственные измерения. Для контроля и проверки достоверности полученных результатов, а также проверки некоторых данных использовались несколько оптических методов: статическое и динамическое рассеяние света, методы двойного слоя и доплеровского смещения скорости, метод атомной силовой микроскопии. Результаты получены на основе многократно повторенных экспериментов, проведенных на современном научном оборудовании.

4.1 ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ.

В работе были исследованы следующие белки (препараты "Sigma" и "Serva"): лизоцим куриного белка, креатинкиназа, бычий сывороточный альбумин (БСА), γ -глобулин. В Таб.1 приведены соответствующие молекулярные веса и значения изоэлектрических точек [15, 34, 44]. Сопутствующими солями являлись соли свинца [$Pb(NO_3)_2$], кальция [$CaCl_2$], калия [KCl], европия [$Eu(NO_3)_3$]. Для изменения pH среды применялись соляная кислота HCl и щёлочь KOH , а для изменения ионной силы – соль $NaCl$.

	Молекулярная масса, г/моль	Изоэлектрическая точка, pH
Лизоцим куриного белка	14 400	10.5
Креатинкиназа	81 000	6.1

	Молекулярная масса, г/моль	Изоэлектрическая точка, pH
Бычий сывороточный альбумин	68 000	4.9
γ-глобулин	160 000	6.0

Таб.1. Характеристики исследуемых белков[15, 34, 44].

Металлы играют важную роль в функционировании различных биосистем, в том числе в организме человека. [52, 102 – 105]. В Таб.2 приведены некоторые физико-химические свойства исследуемых металлов – указаны характерные величины, такие как атомная масса, радиус атома, средний радиус иона в растворе и молярная масса исследуемой соли.

	Натрий (Na)	Калий (K)	Кальций (Ca)	Свинец (Pb)	Европий (Eu)
Атомная масса, а.е.	22,99	39,10	40,08	207,20	151,96
Атомный радиус, Å	1,90	2,35	1,97	1,75	1,99
Ионный радиус, Å	(+1e) 0,97	(+1e) 1,33	(+2e) 0,99	(+1e) 1,3	(+3e) 0,95
Масса исследуемой соли, г/моль	58,44	74,55	111,08	331,20	337,98

Таб.2. Физические параметры металлических ионов и их солей. [106, 107]

Исследуемые растворы готовились в лабораторных условиях непосредственно перед проведением эксперимента. Навески производились на электронных аналитических весах "Adventureg", позволяющих проводить измерения с точностью до 0,1 мг. Растворы готовились в кюветах "Clinicon" объемом ~ 3 мл с использованием фабричной медицинской воды для инъекций (фирмы Микроген и ОАО "Новосибхимфарм").

Для измерения значений водородного показателя среды применялся pH-метр MettlerToledo-MP220, который позволяет измерить pH с точностью до 0,01 единиц.

pH-метр калибровался с помощью трех технических буферных растворов: 4,01, 7,00 и 9,21 единиц.

При многократных измерениях разброс значений pH до и после проведения эксперимента составлял менее единицы (от 0,5 до 0,8 единиц), что связано с возможными отклонениями pH при добавлении в раствор дополнительных количеств белка. Таким образом, случайная ошибка составляла $\sim 10\%$.

Из соображений удобства и во избежание повреждения локальной структуры белка концентрированными реактивами (кислотой, щелочью или растворами тяжелых металлов) приготовление исследуемых систем проводилось в несколько этапов:

1. готовился первичный раствор белка с концентрацией $c = 25 \text{ мг/см}^3$, химическая посуда – пластиковая кювета объемом 2 мл;
2. готовился раствор соли с необходимым значением ионной силы в соответствии со следующим соотношением:

$$\mu = \frac{1}{2} \sum (z_i^+ n^c + z_i^- n^a),$$

где z и n – заряды и парциальные концентрации присутствующих в растворе катионов и анионов, химическая посуда – ампула объемом 5 мл из-под фабричной медицинской воды для инъекций;

3. путем добавления малого количества слабых растворов HCl или KOH изменялась концентрация свободных протонов в растворителе (вода или раствор соли) до заданного значения pH , химическая посуда – стеклянная ампула объемом 5 мл из-под фабричной медицинской воды для инъекций;
4. готовилась конечная система путем добавления 10 мкл [сист.1] в [сист.3], $c = 0,2 \text{ мг/см}^3$.

Все кюветы из-под фабричной медицинской воды для инъекций особым образом отбирались: контролировалась их цилиндричность, которая определялась с помощью микрометра, и чистота.

4.2 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНКРЕМЕНТА ПОКАЗАТЕЛЯ ПРЕЛОМЛЕНИЯ СРЕДЫ.

Как показано в работе [108], величина инкремента показателя преломления dn/dc является константой для системы белок – растворитель при концентрациях порядка 1 – 5 %. В литературе [34] приведены данные для нейтральных растворов различных белков, в том числе тех, которые использовались в настоящей работе. Для всех известных белков эти данные совпадают до долей процента.

В нашей работе для определения инкремента показателя преломления использовался интерферометр *ИТР-2*. Принцип его действия основан на дифракции от двойной щели. На пути лучей помещена двухкамерная кювета, камера которой заполняется следующим образом: справа – чистый растворитель, слева – исследуемое вещество. Измеряя смещение интерференционных полос, наблюдаемых в окуляр, определяют разность показателя преломления растворов по формуле:

$$\Delta n = \frac{N\lambda}{2L \cdot 15}$$

где $N/15$ – количество полос, на которое сместилась интерференционная картина, L – длина кюветы, λ – длина волны света. В экспериментах использовались кюветы длиной $L = 20, 10, 5$ мм.

По тангенсу угла наклона прямой $n(c)$ определяется значение инкремента показателя преломления.

Прибор позволяет измерять значения dn/dc с точностью до 1 %. С учетом манипуляций при разбавлении (2 %), ошибки при взвешивании (2 %), получаем итоговую ошибку 3 %.

Для измерения величины $dn/dc(pH)$ в камеру *ИТР-2* наливали исследуемое вещество с заданной ионной силой и концентрацией, а затем известными порциями добавляли *HCl* и *KOH*.

Значения величин dn/dc для раствора лизоцима при различных значениях pH и μ приведены на графике *Рис.4.1*. Из графика видно, что зависимость $dn/dc(pH)$ при увеличении ионной силы раствора сначала увеличивается, затем начинает уменьшаться, при этом знак этой зависимости меняется. Это свидетельствует об изменении поверхностного заряда в связи с образованием вокруг заряженных центров на поверхности макромолекулы облака противоионов [45].

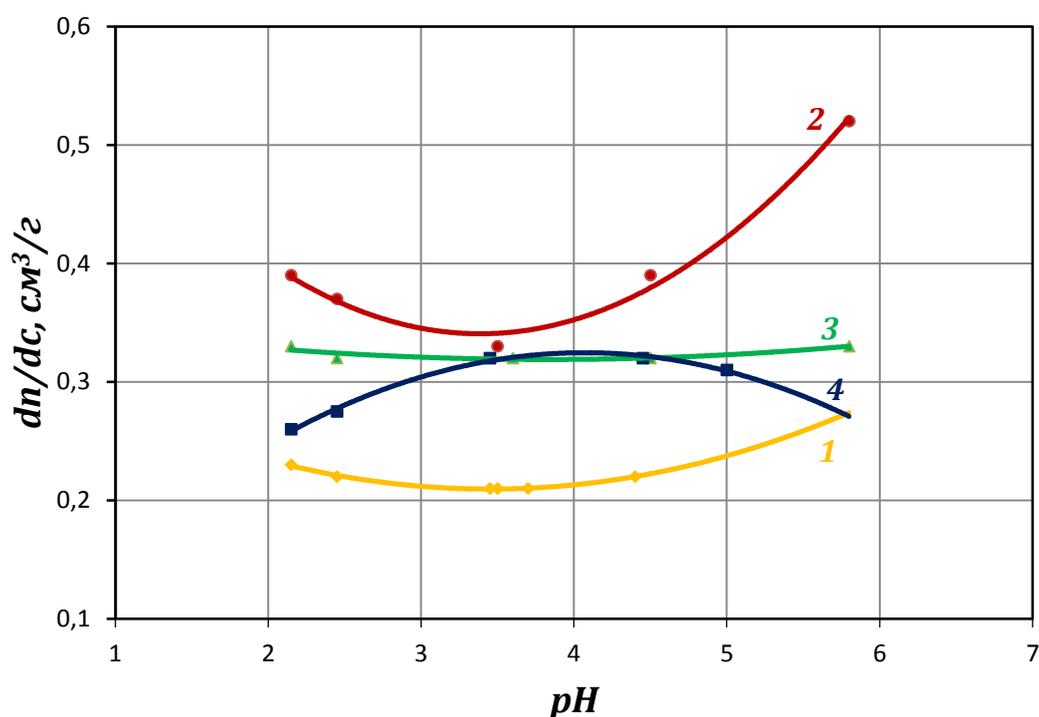


Рис.4.1. Изменение инкремента показателя преломления от pH в водном растворе лизоцима
 1. $\mu = 0,001$ моль/л 2. $\mu = 0,004$ моль/л 3. $\mu = 0,01$ моль/л 4. $\mu = 0,053$ моль/л.

Минимум кривых первоначально смещается в сторону меньших pH , затем, при увеличении ионной силы, возвращается в прежнее положение. При дальнейшем увеличении μ , минимум постепенно переходит в максимум.

Таким образом, можно утверждать, о возможности полной компенсации суммарного поверхностного заряда на белке.

4.3 ОПИСАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ УСТАНОВОК.

В работе использовались методы динамического и статического рассеяния света. Они позволяют без воздействия на локальную структуру белка в водном растворе определять такие важные параметры частиц в растворе, как масса рассеивающих частиц, вириальный коэффициент, коэффициент трансляционной диффузии, размер частиц. Для проверки достоверности полученных результатов, использовались: анализатор размеров частиц и дзета-потенциала *Zetasizer Nano* и атомно-силовой микроскоп *ACM Solver P47*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ УСТАНОВКА ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ КОЭФФИЦИЕНТА РАССЕЯНИЯ И КОЭФФИЦИЕНТА ДЕПОЛЯРИЗАЦИИ.

Для определения массы рассеивающих частиц и вириального коэффициента использовалась установка, схема которой приведена на *Рис.4.2*.

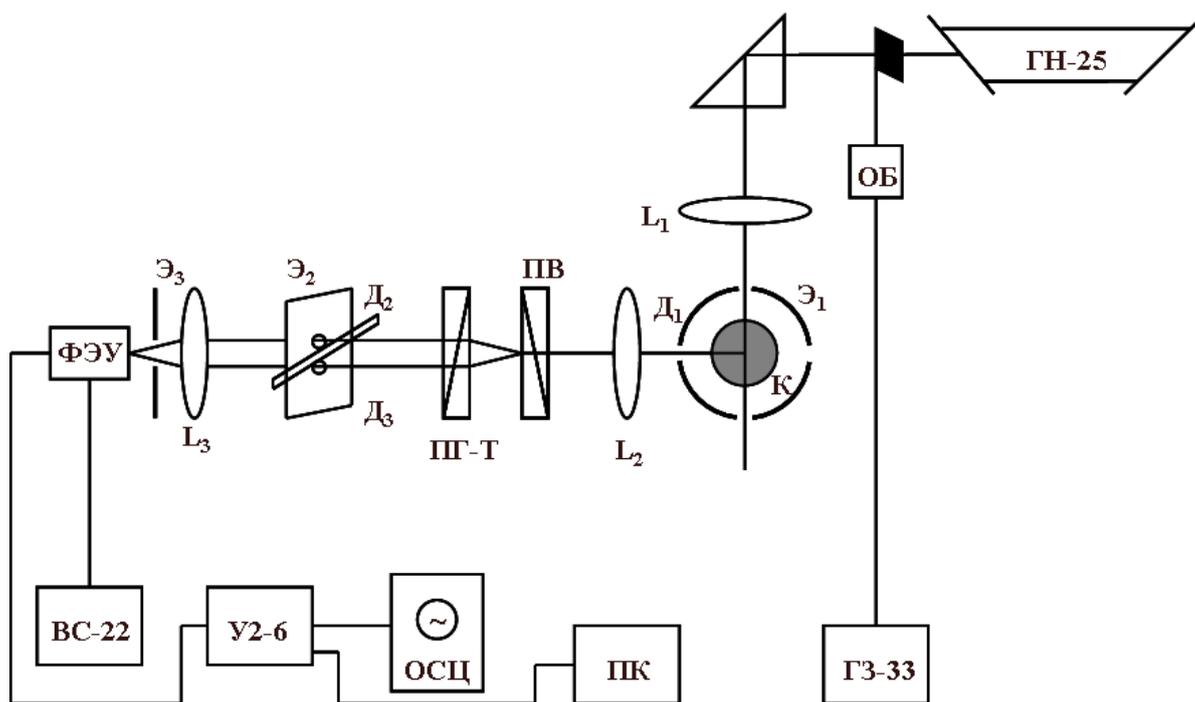


Рис.4.2. Схема установки для исследования рэлеевского рассеяния света в растворах.

Об. - объектив, L_1, L_2, L_3 - линзы, $\mathcal{E}_1, \mathcal{E}_2, \mathcal{E}_3$ - экраны (\mathcal{E}_1 - экран с кюветой,

\mathcal{E}_2 - экран с флажком), $D_1 - D_4$ - диафрагмы, K - кювета с раствором,

ПВ - призма Волластона, ПГ-Т - призма Глана-Томсона, ВС-22 - блок питания ФЭУ,

У2-6 - резонансный усилитель, ЦВ - цифровой вольтметр, ГЗ-33 - звуковой генератор.

Вертикально поляризованный пучок света от гелий-неонового лазера ($\lambda = 6328 \text{ нм}$, $W = 25 \text{ мВт}$,) через призму подается на цилиндрическую стеклянную кювету с исследуемым раствором. Падающий луч модулируется электромеханическим прерывателем с частотой $\sim 70 \text{ Гц}$, что позволяет разделить полезный сигнал и фоновую засветку. Свет, рассеянный под 90° , регистрируется фотоэлектронным умножителем, сигнал с которого поступает на резонансный усилитель У2-6 и отображается на экране осциллографа. Оптическая система, состоящая из призмы Волластона, поляроида и ряда диафрагм ($D1$, $D2$, $D3$), позволяет разделить поляризованную и деполаризованную компоненты рассеянного излучения (I_{\parallel} и I_{\perp} соответственно) и измерять их интенсивности независимо и с большей точностью чем в [108].

В процессе эксперимента снимаются зависимости I_{\parallel} и I_{\perp} от концентрации белка. Усиленный сигнал подаётся на компьютер и оцифровывается с помощью аналого-цифрового преобразователя (его роль выполняет звуковая карта "Creative SoundBlaster 16"). Обработка результатов проводится в автоматическом режиме непосредственно в течение эксперимента. Программа позволяет наблюдать временную развертку сигнала на мониторе, быстро делать выборку измеряемых интенсивностей, и оценивать результаты для данных значений интенсивности и параметров раствора. Программа производит экстраполяцию рабочих зависимостей параметра рассеяния $\frac{cHK}{R_{90}}(c)$ методом наименьших квадратов, рассчитывает ошибки эксперимента и выводит результаты в виде графиков и таблиц.

Для корректного измерения коэффициентов рассеяния исследуемых растворов нужно учитывать различие в показателях преломления эталонной жидкости n_k и растворителя n .

В качестве калибровочной жидкости использовался бензол, обеспыленный с помощью многократной перегонки и помещенный в стеклянную запаянную кювету. Согласно литературным данным [13, 14],

коэффициент рассеяния бензола равен $R_b = 12,64 \cdot 10^{-6} \text{ см}^{-1}$ при длине волны 6328 Å.

Для пары бензол – вода поправочный множитель $n^2/n_k^2 = 0,785$.

Калибровка по бензолу позволяет перейти от относительных интенсивностей рассеянного света к коэффициентам рассеяния:

$$R_{90} = \frac{I - I_B}{I_6 - I_\Phi} \cdot 10^{-5} [\text{см}^{-1}],$$

где I_Φ , – интенсивность фоновой засветки, I_B , I_6 – интенсивности рассеянного света для воды и бензола соответственно.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ УСТАНОВКА PHOTOCOR COMPLEX.

Исследования проводились на спектрографе динамического рассеяния света *Photocor Complex*, в которой использовался диодный лазер с длиной волны 650 нм и мощностью 25 мВт. Система счета фотонов построена на лавинном фотодиоде *Perkin Elmer*. В качестве анализатора фототока использовался цифровой коррелятор фирмы ООО "Фотокор".

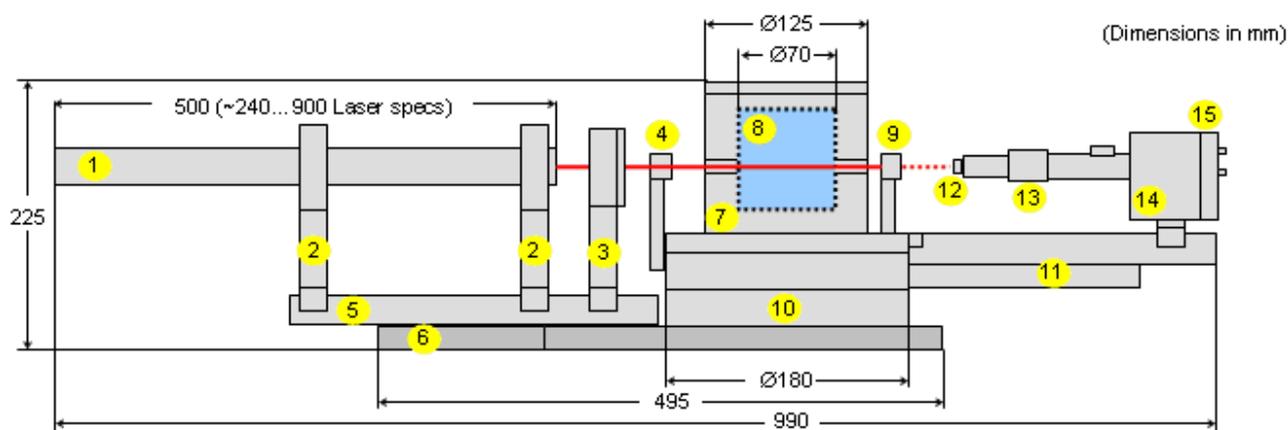


Рис.4.3. Схема оптического блока спектрометра

1. Лазер
2. Держатели лазера
3. Фокусирующая оптика
4. Атенюатор падающего света
5. Оптическая скамья лазера
6. Основание
7. Термостат
8. Держатель кювет
9. Поворотное устройство с шаговым двигателем
10. Атенюатор прошедшего света
11. Консоль поворотного устройства
12. Апертурная диафрагма
13. Приемная оптика системы счета фотонов
14. Система счета фотонов
15. Усилитель-дискриминатор

Photocor Complex – прибор для измерения размеров частиц, коэффициентов диффузии и молекулярной массы. Спектрометр позволяет проводить измерения методами статического и динамического рассеяния света в широком диапазоне углов рассеяния [109]. Схема установки представлена на *Рис.4.3*.

В работе прибора, использующего метод динамического рассеяния света, важнейшим является способ измерения спектра рассеянного света. Пока не существует оптических анализаторов спектра с достаточной разрешающей способностью, которые позволяли бы измерять узкие спектры флуктуаций рассеянного света [109].

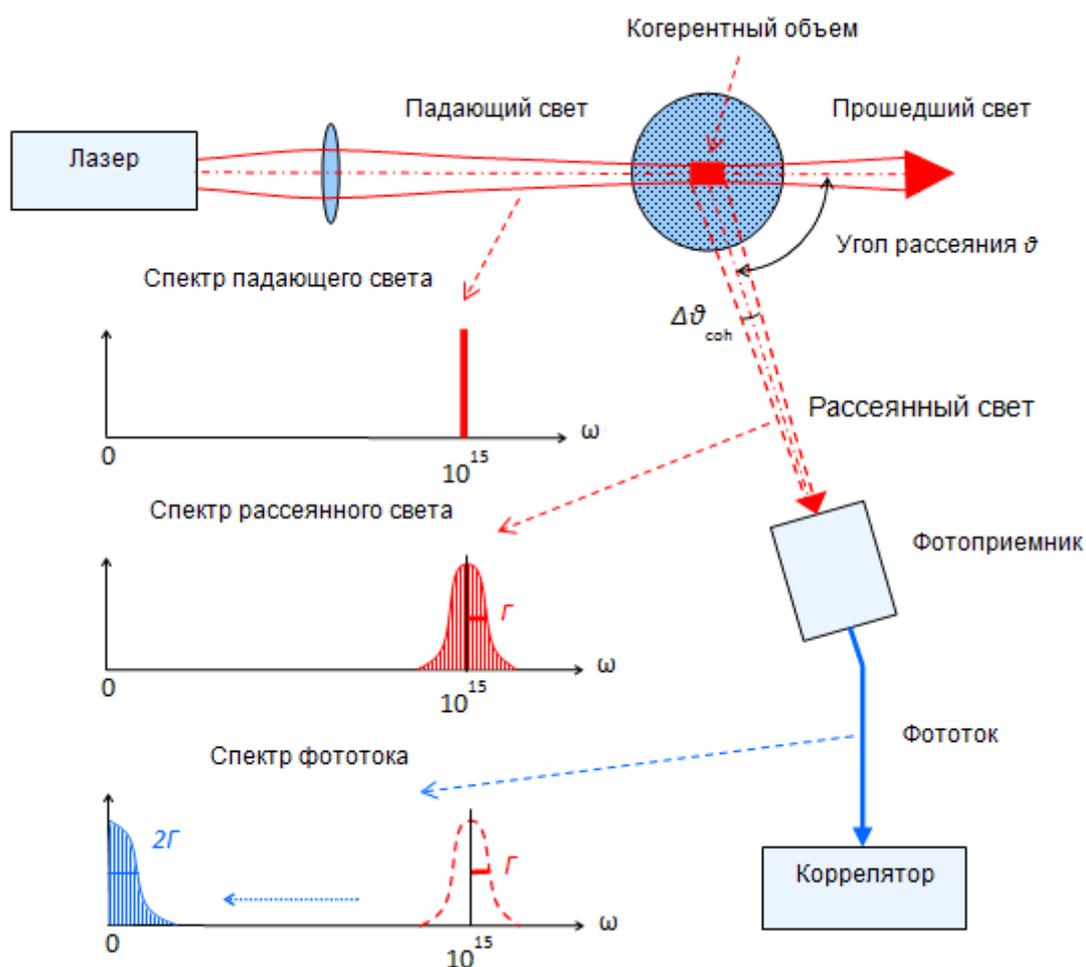


Рис.4.4. Принципиальная схема работы прибора динамического рассеяния света для измерения размеров частиц (в режиме квадратичного детектирования) [109].

Кювета с исследуемым образцом помещается в кюветное отделение анализатора. Свет, проходя через раствор, рассеивается на белковых молекулах

и частицах, находящихся в растворе. Рассеянный под углом 90° свет регистрируется лавинным фотодиодом *Perkin Elmer*, сигнал с выхода которого поступает на усилитель-дискриминатор, а с выхода усилителя-дискриминатора на вход коррелятора. Коррелятор накапливает корреляционную функцию флуктуаций интенсивности рассеянного света. По завершении выбранного времени измерения, корреляционная функция передается в компьютер. Программное обеспечение *PhotocorFC* позволяет наблюдать изменение сигнала на мониторе, оценивать результаты для текущих значений интенсивности и параметров раствора.

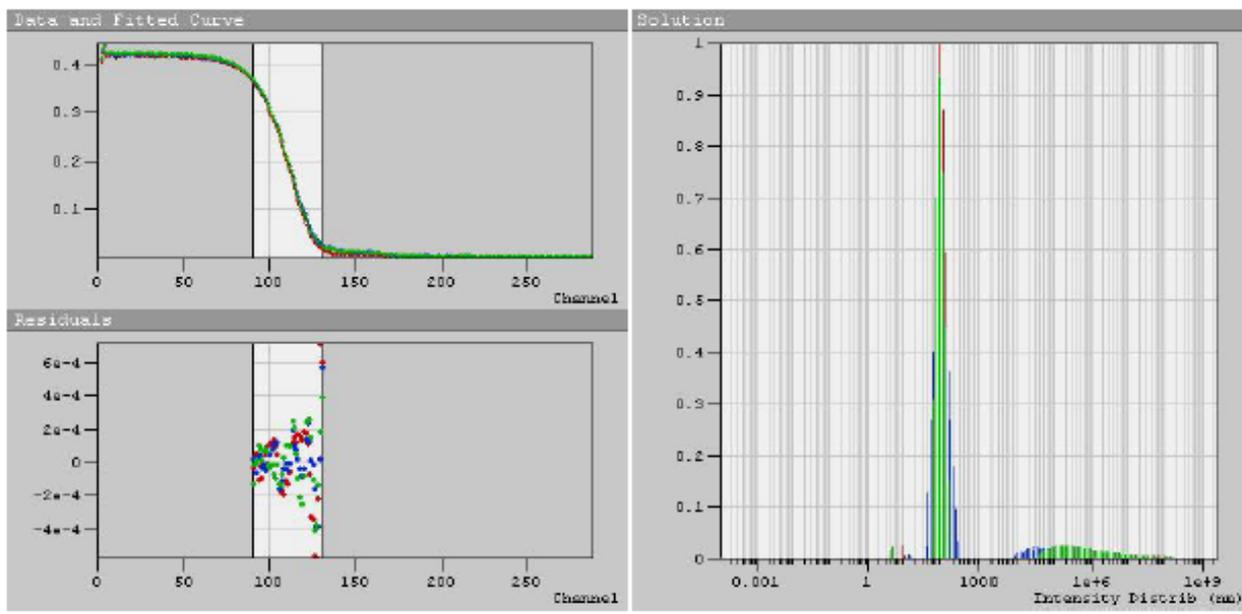
Результатом измерений является корреляционная функция второго порядка. Для расчета характерного времени релаксации флуктуаций и последующего вычисления коэффициента диффузии и размеров частиц, необходимо найти исходную корреляционную функцию первого порядка, то есть решить обратную задачу рассеяния.

Решение обратной задачи тривиально лишь для монодисперсного случая, когда рассеяние происходит на частицах одного размера. В случае полидисперсного распределения частиц по размерам обратная задача становится некорректной. Некорректные задачи имеют неединственное решение. Для решения таких задач используются специальные методы регуляризации.

Результаты экспериментов обрабатывались с помощью специальной коммерческой программы, разработанной специально для обработки результатов экспериментов по динамическому рассеянию света – *DynaLS*, использующей метод регуляризации Тихонова. Данная программа позволяет получать коэффициенты трансляционной диффузии, гидродинамические радиусы рассеивающих частиц, оценивать ошибки измерения искомых величин [109, 110].

Для обработки результатов использовался алгоритм разложения корреляционной функции по экспонентам. В этом случае результат

представляется в виде распределения интенсивности рассеянного света по характерным временам корреляции частиц (Рис.4.5).



File: c=50ml-500ml-H2O-1-10-10sec.txt

❖ Distribution analysis

Fitting range : [90; 130] channels
 Number of Intervals : 200
 Boundaries : [1.4e-4; 1.9e+9]
 Resolution : 0

Peak Num	Area	Mean	Position	STD
1	0.005	7.911	8.194	1.537
2	0.918	91.96	92.16	28.89
3	0.078	7.1e+5	2.4e+5	7.8e+5

χ^2 : 8.9e-5

File: c=50ml-500ml-H2O-2-10-10sec.txt

❖ Distribution analysis

Fitting range : [90; 130] channels
 Number of Intervals : 200
 Boundaries : [1.4e-4; 1.9e+9]
 Resolution : 0

Peak Num	Area	Mean	Position	STD
1	0.001	12.67	12.90	1.803
2	0.874	101.3	92.16	47.27
3	0.125	7.3e+5	5.3e+4	1.4e+6

χ^2 : 5.7e-5

Рис.4.5. Вид отчета DynaLS - распределения интенсивности рассеянного света по размерам частиц (гидродинамическим радиусам).

АНАЛИЗАТОР РАЗМЕРОВ ЧАСТИЦ И ДЗЕТА-ПОТЕНЦИАЛА *ZETASIZER NANO*.

Измерения дзета-потенциала растворов белков проводились на установке "Анализатор размеров частиц и дзета-потенциала *Zetasizer Nano*", представленной на *Рис.4.6*. Лазер является источником света для освещения частиц в образце. Для измерения дзета-потенциала падающий луч делится на два луча. Опорный луч необходим для модуляции в эффекте Доплера. Лазерный луч проходит через центр ячейки с образцом, и рассеянный сигнал регистрируется под углом 17° . Когда на ячейку подается напряжение, движение частиц в измеряемом объеме приводит к флуктуациям интенсивности света с частотой пропорциональной скорости частиц. Детектор передает информацию на цифровой сигнальный процессор. Эта информация затем передается на компьютер, где с помощью программы *Zetasizer Nano* [29] производится создание частотного спектра, из которого рассчитывается электрофоретическая подвижность и дзета-потенциал. Интенсивность рассеянного света должна быть в пределах определенного диапазона, чтобы детектор мог успешно её измерить. Чтобы избежать перегрузки детектора, используется аттенуатор для снижения интенсивности лазерного излучения и, следовательно, снижения интенсивности рассеянного света.

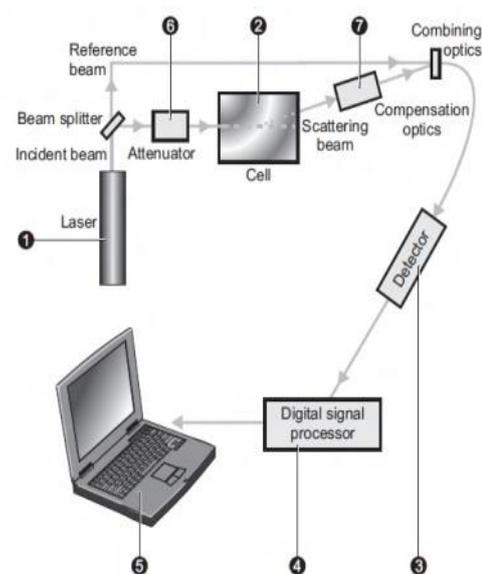


Рис.4.6. Анализатор размеров частиц и дзета-потенциала Malvern's *Zetasizer Nano*.

Электрофоретическая подвижность измеряется электрофоретическим методом и с помощью измерения скорости частиц методом лазерного доплеровского измерения скорости (*LDV*).

Уравнение Генри имеет вид:

$$U_E = \frac{2\varepsilon\xi f(ka)}{3\eta} \quad (4.1)$$

ξ – дзета-потенциал, U_E – электрофоретическая подвижность, ε – диэлектрическая проницаемость, η – вязкость, $f(ka)$ – функция Генри.

Величина $\frac{1}{k}$ – дебаевский радиус экранировки – это расстояние от поверхности заряженной частицы, на котором электрическое поле от частицы перестает влиять на распределение свободных ионов в растворе. Дебаевский радиус экранировки часто воспринимается как мера "толщины" двойного электрического слоя. Параметр a относится к радиусу частиц и, следовательно, ka является мерой отношения радиуса частицы к длине Дебая (или двойной толщины слоя).

Дебаевский радиус экранировки может быть вычислен с помощью следующего выражения:

$$\frac{1}{k} = \left(\frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r k_B T}{2000 e^2 \mu N_A} \right)^{\frac{1}{2}}$$

где ε_0 – диэлектрическая постоянная, ε_r – относительная диэлектрическая проницаемость, k_B – постоянная Больцмана, T – температура, e – заряд электрона, μ – ионная сила, N_A – постоянная Авогадро.

Член $f(ka)$ в уравнении Генри известен как функция Генри, и для сферы определяется следующим образом:

Если $ka > 1$

$$f(ka) = \frac{3}{2} - \frac{9}{ka} + \frac{75}{2\kappa^2 a^2} - \frac{330}{\kappa^3 a^3}$$

Если $ka < 1$

$$f(ka) = 1 + \frac{(ka)^2}{16} - \frac{5(ka)^3}{48} - \frac{(ka)^4}{96} + \frac{(ka)^5}{96} - \left[\frac{(ka)^4}{8} - \frac{(ka)^6}{96} \right] e^{ka} \int_{\infty}^{ka} \frac{e^{-t}}{t} dt$$

Предельные случаи функции Генри схематически представлены на *Рис.4.7*. В условиях, когда Дебаевский радиус экранировки мал по сравнению с радиусом частиц, функция Генри сводится к пределу Смолуховского $f(ka) = 1.5$. Для условий, где радиус частицы мал по сравнению с длиной Дебая, функция Генри сводится к пределу Хюккеля $f(ka) = 1$.

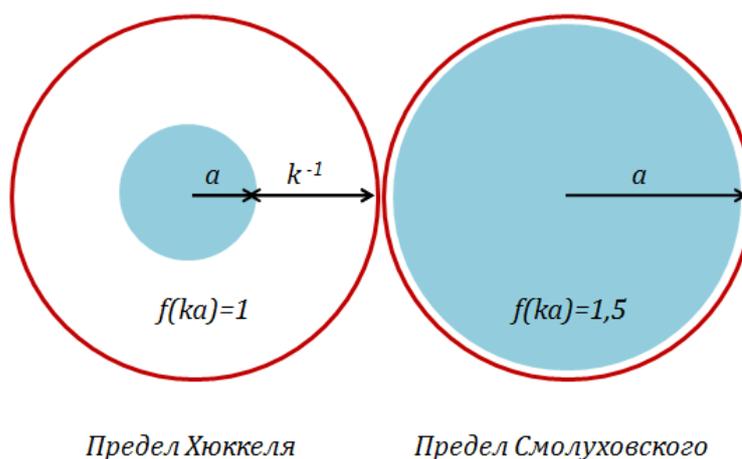


Рис.4.7. Приближения функции Генри.

Предел Смолуховского $f(ka) = 1.5$ подходит для более крупных частиц. Для малых частиц (таких как белки) с низкой диэлектрической проницаемостью среды (или низкой ионной силой), используется приближение Хюккеля.

Измерение электрофоретической подвижности осуществляется следующим образом: ячейка с электродами, представленная на *Рис.4.8*, на любой из двух электродов, которой прикладывается потенциал. Частицы движутся к электроду противоположного заряда, их скорость измеряется и выражается в единицах поля, как их подвижность. Измерительные электроды в ячейке расположены на расстоянии 2 мм друг от друга в непосредственной близости от зоны измерения.

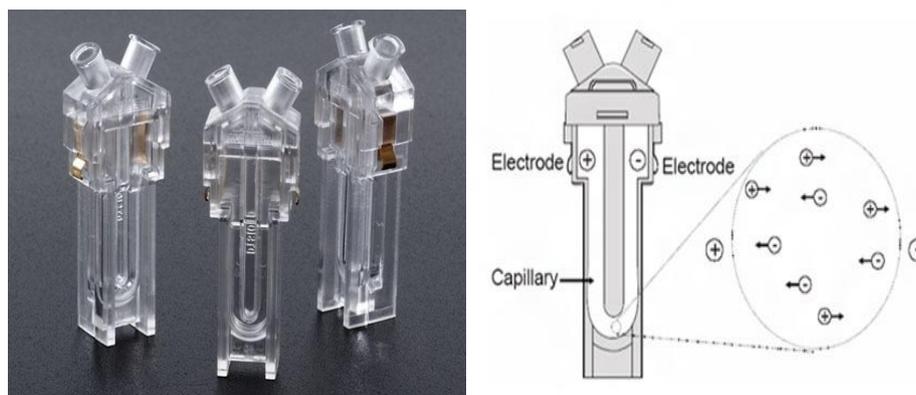


Рис.4.8. Универсальная ячейка, используемая в приборе Malvern's Zetasizer Nano.

Лазерное доплеровское измерение скорости – метод, используемый для измерения скорости движение заряженных частиц в электрическом поле, который использует эффект Доплера. Если лазерный луч проходит через образец, скорости частиц, которых имеют нулевую скорость, то рассеянный свет имеет ту же частоту (F_1), что и падающий лазерный (F_1). Если, однако, частицы перемещаются, то рассеянный свет будет иметь частоту (F_2) большую, чем частота падающего луча. Таким образом, свет, рассеянный от движущейся частицы испытывает сдвиг частоты (Рис.4.9).

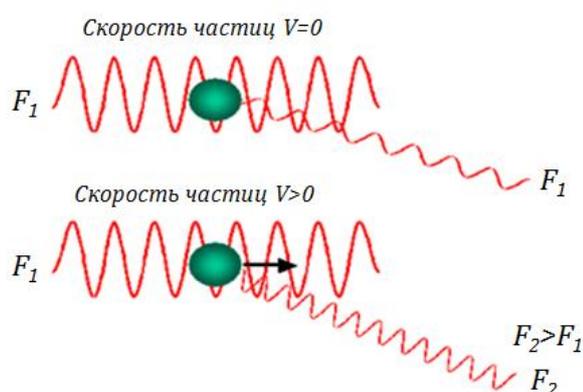


Рис.4.9. Схема показывает, что частота рассеянного света (F_1) будет такой же, как и падающего лазерного луча (F_1) для стационарных частиц, но будет другой (F_2), если частицы движутся.

Сдвиг частоты, который испытывает рассеянный луч, равен:

$$\Delta f = \frac{2V \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)}{\lambda}$$

где V – скорость частицы, θ – угол рассеяния, λ – длина волны лазера.

Анализ доплеровского сдвига в приборах *Zetasizer Nano* серии проводится с помощью методики фазового анализа рассеянного света (*PALS*). Вместо того чтобы измерять сдвиг частоты, измеряется разность фаз. Фаза, по определению, является произведением частоты на время, поэтому с помощью методики *PALS* можно измерять образцы с низкой подвижностью, например, образцы с высокой вязкостью растворителя [29].

АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОП.

Атомно-силовой микроскоп (*АСМ*, англ. *AFM – atomic-force microscope*) – сканирующий зондовый микроскоп высокого разрешения, принцип работы которого основан на взаимодействии зонда кантилевера с поверхностью исследуемого образца.

Для наблюдения структуры растворов использовался атомно-силовой микроскоп *АСМ Solver P47*, схема, которого приведена на *Рис.4.10*.

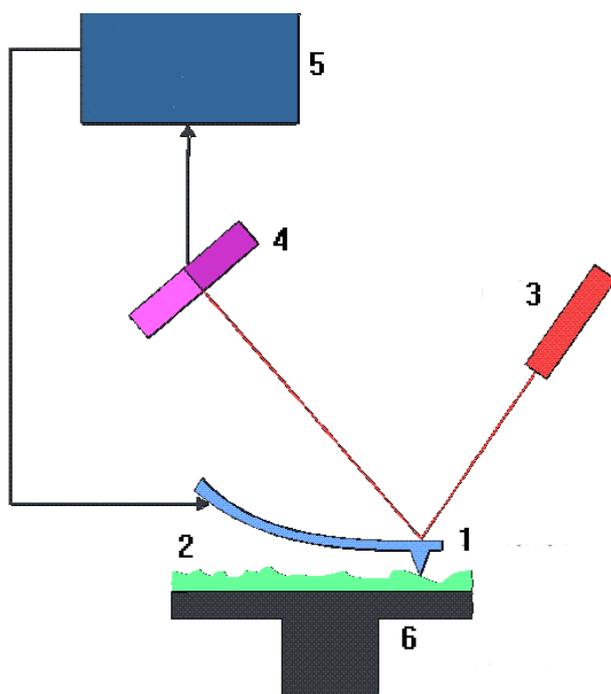


Рис.4.10. Схема установки для исследования размеров белковых нанокластеров. Кантилевер и игла (1); поверхность образца (2); лазер (3); фотодиод (4); детектор (5); PZT сканнер (6).

Кантилевер – это наиболее распространенный датчик силового взаимодействия в атомно-силовой микроскопии. Любую информацию о

поверхности атомно-силовой микроскоп получает благодаря механическим отклонениям балки кантилевера, которые регистрируются оптической системой. В процессе сканирования исследуемой поверхности межатомные силы взаимодействия кончика иглы и поверхности образца вызывают смещение иглы и, соответственно, изгиб кантилевера [111].

Луч лазера направляется на кантилевер и отражается от него для измерения изгиба кантилевера. Отраженный лазерный луч детектируется позиционно-чувствительным (двухсекционным) фотоприемником. Выходной сигнал с двухсекционного фотоприемника подается на компьютер для обработки данных, отражающих рельеф поверхности образца с атомарным разрешением. Используемые в настоящее время позиционно-чувствительные фотодетекторы являются четырехсекционными и позволяют измерять не только продольные, но также и торсионные изгибы кантилевера.

Кантилевер может изгибаться не только под действием непосредственно контактных сил, но также и под действием сил, действующих на расстоянии – относительно короткодействующих Ван-дер-Ваальсовых и более далекодействующих электрических и магнитных сил. В процессе сканирования кантилевер может совершать колебания. Колебания могут происходить в непосредственном контакте иглы с поверхностью образца, без касания поверхности образца в процессе колебаний и с частичным касанием поверхности (с прерывистым контактом). Сканирование может осуществляться в несколько проходов, каждый новый проход может давать дополнительную информацию относительно исследуемого образца.

При использовании контактных методик кантилевер изгибается под действием сил отталкивания, действующих на зонд [112]. Сила отталкивания F действующая на зонд связана с величиной отклонения кантилевера x законом Гука:

$$F = -kx,$$

где k является жесткостью кантилевера.

В зависимости от расстояния зонд–образец при сканировании различают три метода работы атомно-силового микроскопа. 1) контактный, 2) бесконтактный, 3) полуконтактный, который является промежуточным между контактным и бесконтактным.

В данной работе эксперимент был проведен с помощью полуконтактного режима. Прежде всего, при использовании этого метода давление кантилевера на поверхность образца существенно меньше, что позволяет работать с более мягкими и легко разрушающимися материалами, такими как полимеры и биоматериалы. Полуконтактный метод также более чувствителен к различным взаимодействиям с поверхностью, что дает возможность исследовать ряд характеристик поверхности – распределение вязкости и упругости, электрических и магнитных доменов. Но существуют свои трудности при использовании данного метода – необходимо умело подготовить образцы перед их сканированием, чтобы они были хорошо зафиксированы на подложке. Для этого чаще всего используется некоторый фиксатор биологических объектов (чаще всего биологический клей). Из-за того, что фиксатор имеет мягкую структуру, возможен дрейф зонда – его смещение относительно образца. При этом приходится несколько раз настраиваться на исследуемый участок.

Программа обработки *Nova* позволяет обрабатывать полученное изображение с помощью различных фильтраций. Изображения, полученные в эксперименте, были обработаны с помощью Фурье-фильтра. Программа *Nova* также позволяет по изображению определить поперечное сечение частицы, ее диаметр с точностью до десятых нанометра. Измерения проводились в нанометровом диапазоне. Ошибка измерений могла составлять 10-15 нм (допустимая погрешность игры по паспорту).

4.4 ИССЛЕДОВАНИЕ ОПТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МОЛЕКУЛ ЛИЗОЦИМА ПРИ ИЗМЕНЕНИИ ВНЕШНИХ ПАРАМЕТРОВ (ИОННОЙ СИЛЫ, КОНЦЕНТРАЦИИ, ТЕМПЕРАТУРЫ, КИСЛОТНОСТИ).

Основной вклад в интенсивность рассеяния света в растворах макромолекул дает рассеяние на флуктуациях концентрации, которые, как показывают эксперименты, резко возрастают при перезарядке молекул с изменением водородного показателя среды. При этом, очевидно, должны изменяться и поляризационные характеристики растворов, связанные с флуктуациями ориентации анизотропных молекул.

ОПТИЧЕСКАЯ АНИЗОТРОПИЯ.

Экспериментальная установка (*Рис.4.2*) позволяет измерять коэффициент деполяризации рассеянного света. Для его определения из интенсивности вертикально и горизонтально поляризованных составляющих рассеянного излучения необходимо вычитать соответствующие величины для растворителя. Таким образом из формулы (1.8) можно определить величину Δ_v . Ошибка в определении Δ_v обусловлена, в основном, разбросом экспериментальных точек при линейной экстраполяции зависимости $\Delta_v(c)$.

На *Рис.4.11* приведены примеры такой экстраполяции. Возможные источники ошибок при определении Δ_v указаны в работе [113]. Большинство из них связаны с несовершенством оптической установки. В нашем случае перед каждым измерением производилось сравнение измеренного и табличного значений Δ_v для бензола. При необходимости производилась юстировка системы до их совпадения. К неустранимым относится вторичное рассеяние, сильно увеличивающее деполяризованную компоненту. Для того, чтобы нивелировать эту ошибку, проводилась экстраполяция $\Delta_v(c)$ к нулевой концентрации.

Относительная ошибка измерения Δ_v составляла 9 – 14% для различных *pH*.

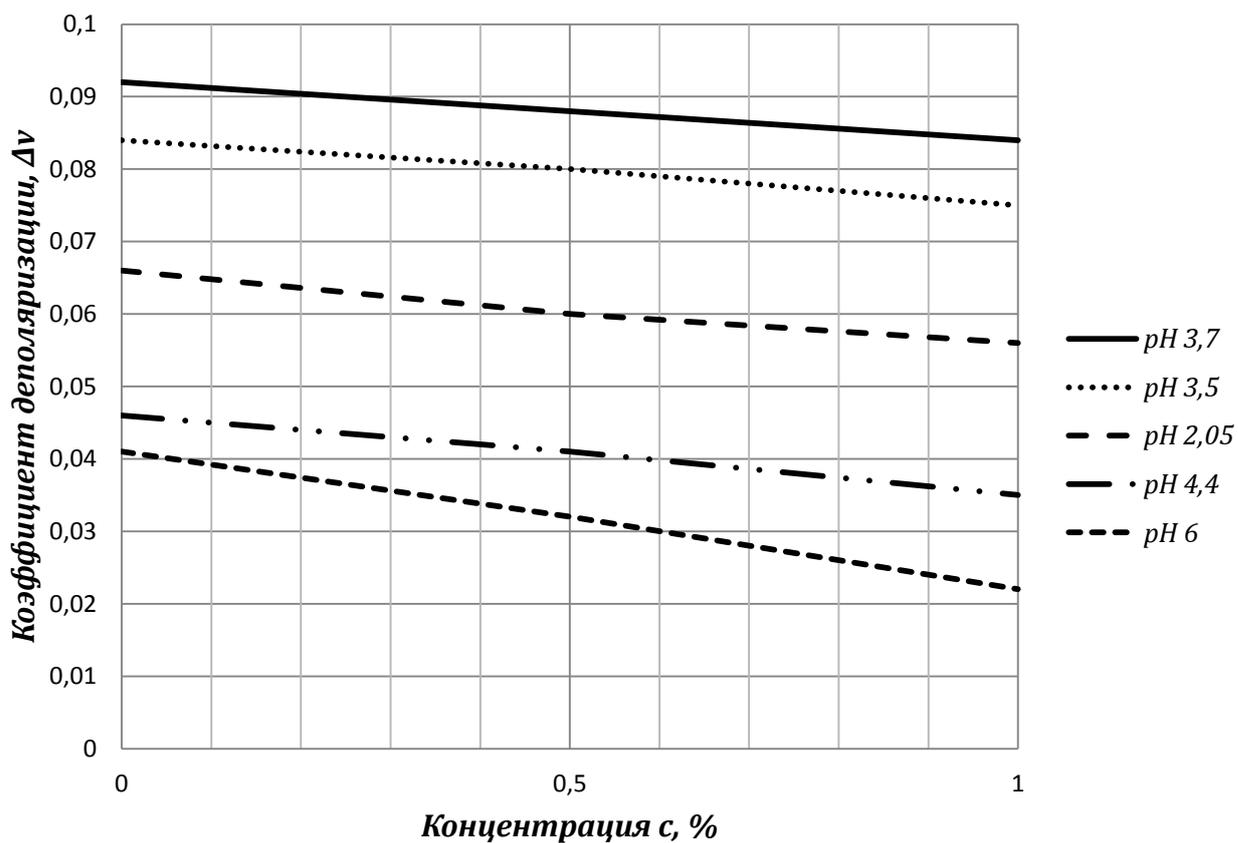


Рис.4.11. Линейная экстраполяция к $c = 0$ коэффициента деполаризации для лизоцима при $\mu = 0,053$ моль/л.

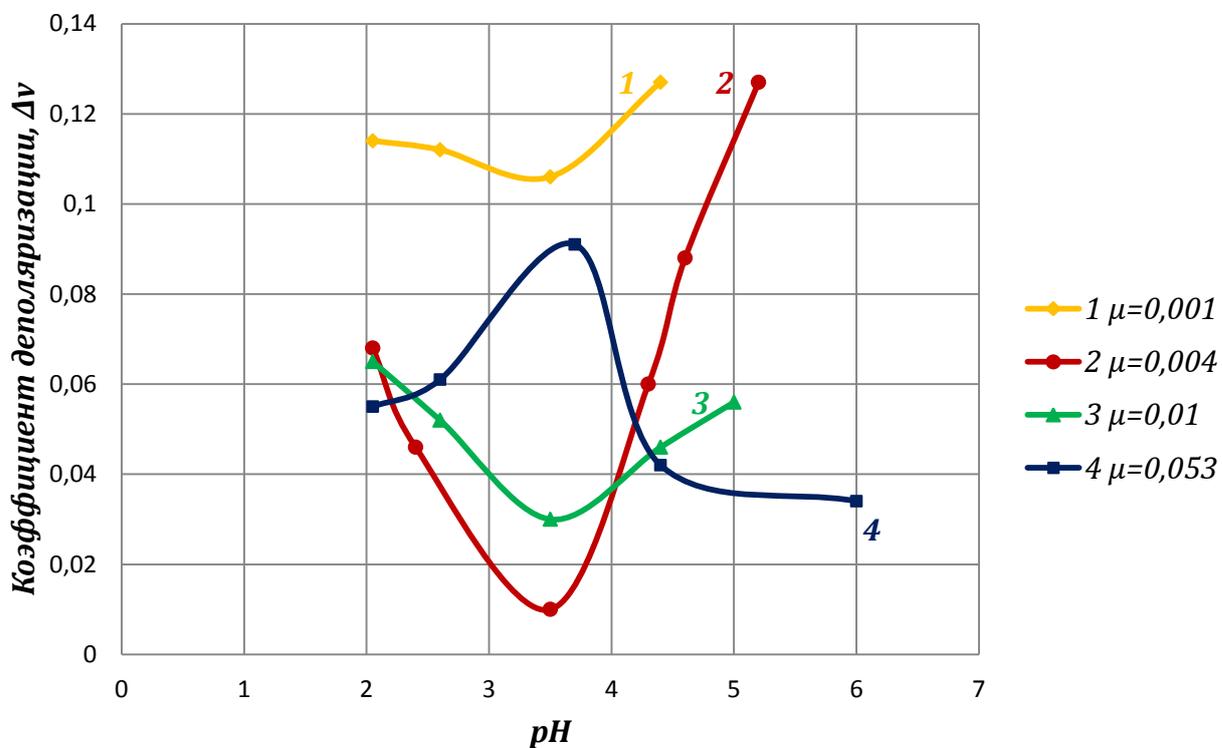


Рис.4.12. Зависимость коэффициента деполаризации Δ_v от pH в водном растворе лизоцима при различных ионных силах
 1. $\mu = 0,001$ моль/л 2. $\mu = 0,004$ моль/л 3. $\mu = 0,01$ моль/л 4. $\mu = 0,053$ моль/л

На *Рис.4.12* приведена зависимость коэффициента деполаризации Δ_v от pH раствора лизоцима при различных ионных силах. Как можно видеть, экстремумы этих кривых находятся в области значений pH 3.5 – 4. При увеличении ионной силы раствора величина $\Delta_v(pH)$ первоначально увеличивается до $\mu = 0,005$ моль/л, затем уменьшается, причем при $\mu = 0,01$ моль/л, ее производная $\frac{\partial \Delta_v}{\partial pH}$ меняет свой знак. Вероятнее всего, это связано с изменением флуктуации ориентации макромолекул вследствие "включения" противоионами заряженных групп на полюсах макромолекулы.

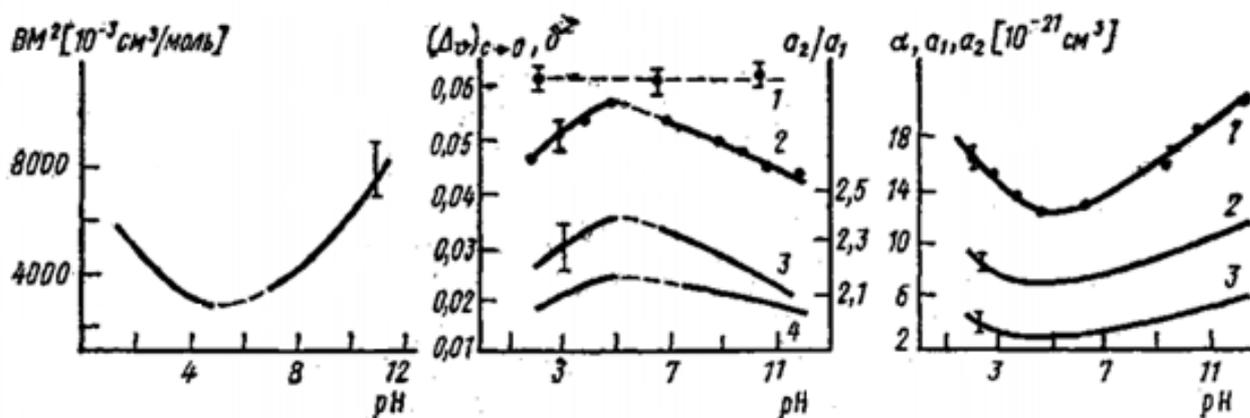


Рис.4.13. Зависимость VM^2 от pH в водном растворе лизоцима (слева). Зависимость коэффициента деполаризации Δ_v для чистой воды (1) и альбумина в водном растворе при $c \rightarrow 0$ (2), отношения компонент тензора поляризуемости a_2/a_3 (3) и оптической анизотропии молекулы альбумина δ^2 (4) от pH (в центре). Зависимости эффективной электронной поляризуемости α (1) и компонент тензора поляризуемости a_2 (2) и a_3 (3) молекулы альбумина от pH в водном растворе (справа).

На *Рис.4.13* (в центре) [2] изображен график зависимости коэффициента деполаризации Δ_v от pH для раствора альбумина. Из этого графика видно, что экстремум зависимости $\Delta_v(pH)$ находится в изоэлектрической точке альбумина (pI 4.9). Эта зависимость была экспериментально подтверждена измерениями на нашей установке. Сопоставляя графики на *Рис.4.12* и *4.13* видим, что $\frac{\partial \Delta_v}{\partial pH}$ совпадает при малой ионной силе с $\frac{\partial \Delta_v}{\partial pH}$ для лизоцима, при большой ионной силе, знак этих производных различен. Возможно это связано с перераспределением плотности заряженных групп по поверхности белка, при увеличении концентрации катионов.

Проведено также сравнение коэффициентов деполаризации для альбумина, гамма-глобулина и лизоцима при одинаковых значениях кислотности, ионной силы и концентрации раствора. Из значения величины Δ_v по формуле $\delta = \sqrt{\frac{10\Delta_v}{3-4\Delta_v}}$ можно получить значение оптической анизотропии макромолекул. На *Рис.4.14* изображены зависимость оптической анизотропии δ лизоцима от *pH* при различных ионных силах. Оценки анизотропии поляризуемости совпадают с оценками из данных по методу двойного лучепреломления. Эти зависимости очень сильно отличаются друг от друга при различных ионных силах μ , что может свидетельствовать о перезарядки молекул лизоцима при возрастании концентрации противоионов.

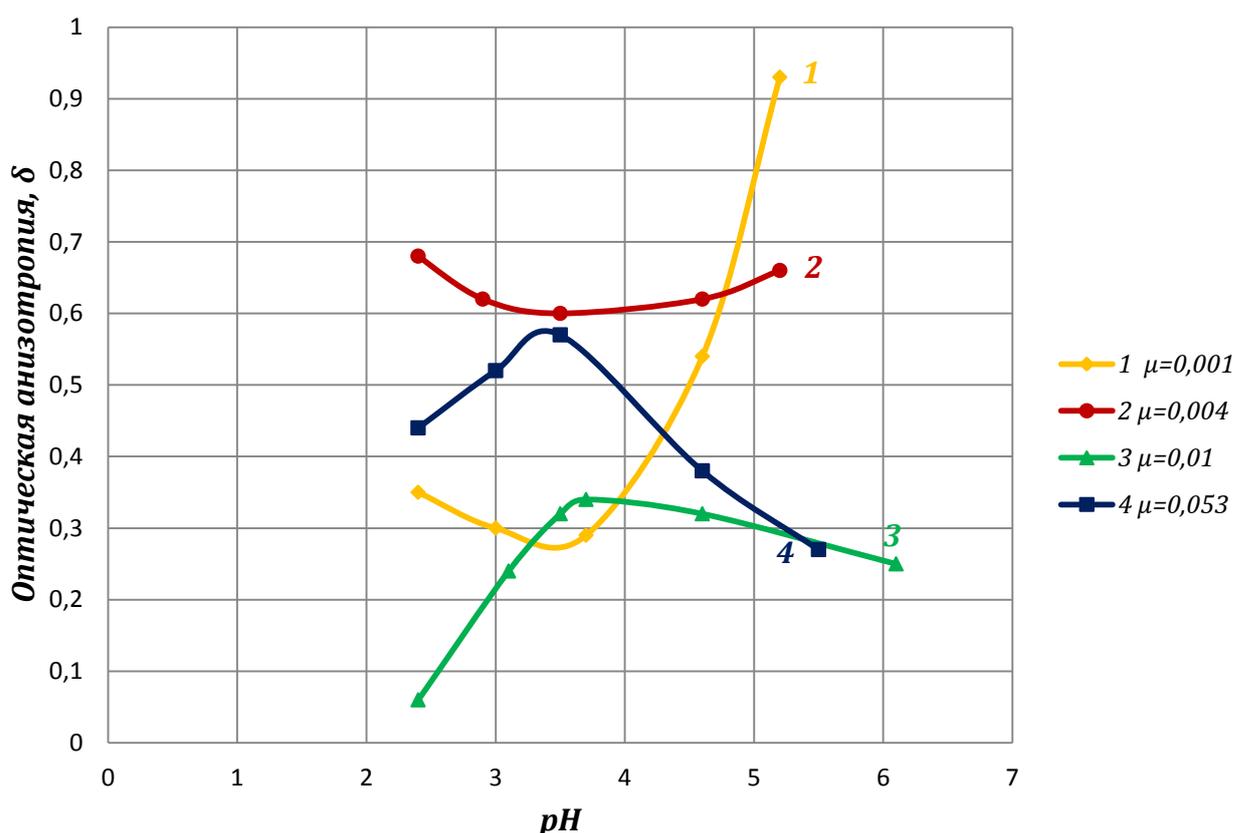


Рис.4.14. Зависимость оптической анизотропии макромолекул лизоцима в водных растворах:
 1. $\mu = 0,001$ моль/л 2. $\mu = 0,004$ моль/л 3. $\mu = 0,01$ моль/л 4. $\mu = 0,053$ моль/л

ИЗМЕРЕНИЕ КОЭФФИЦИЕНТА МЕЖМОЛЕКУЛЯРНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ И МАССЫ РАССЕИВАЮЩИХ ЧАСТИЦ.

Для определения второго вириального коэффициента необходимо определить коэффициент рассеяния (1.18) при нескольких концентрациях. Таким образом, получая зависимость параметра раствора от концентрации белка в растворе и экстраполируя её к нулевой концентрации можно рассчитать массу макромолекул, а по наклону этой прямой – коэффициент межмолекулярного взаимодействия.

Точность определения коэффициента рассеяния зависит от ошибок при нахождении каждой величины, входящей в это выражение. Каждое отдельное измерение величины c^{HK}/R_{90} требует особого внимания к возможным источникам ошибок $\delta c, \delta M, \delta K, \delta R$. Оценки этих величин: δc 2 – 4 %, δM до 6 %, δK до 3 %, δR до 8 %. Ошибки в определении B зависят также от разброса экспериментальных точек линейной экстраполяции.

Учитывая вышесказанное, оценка погрешности измерения второго вириального коэффициента в каждом отдельном случае различна и может достигать больших значений (15 – 17 %). В подавляющем же большинстве случаев результирующая средняя относительная ошибка в определении $1/M$ и B составила 10 – 12 % [45].

Методом интегрального светорассеяния Рэля-Дебая были исследованы статические свойства макромолекул белка лизоцима при изменении ряда параметров растворов, а именно концентрации компонентов, pH и ионной силы раствора.

В литературе известна работа, где изоэлектрическая точка (pI) лизоцима, измеренная электрофоретическим методом $\sim 10,5 - 11$ [34, 114].

На *Рис.4.15* совмещены результаты, полученные для pH зависимости коэффициента взаимодействия в чистых водных растворах лизоцима, полученные в нашей лаборатории (препараты разных фирм "Serva" (кривая 2) и

"Sigma" (кривая 1) исследовались в разное время). Можно видеть, что в области интересующих нас значений pH , эти данные практически совпадают. pH -зависимость вириального коэффициента имеет параболический вид, с минимумом при pH 3.5, что в соответствии с теорией Скэтчарда означает, что изоэлектрическая точка лизоцима лежит в кислой области: pI 3.5.

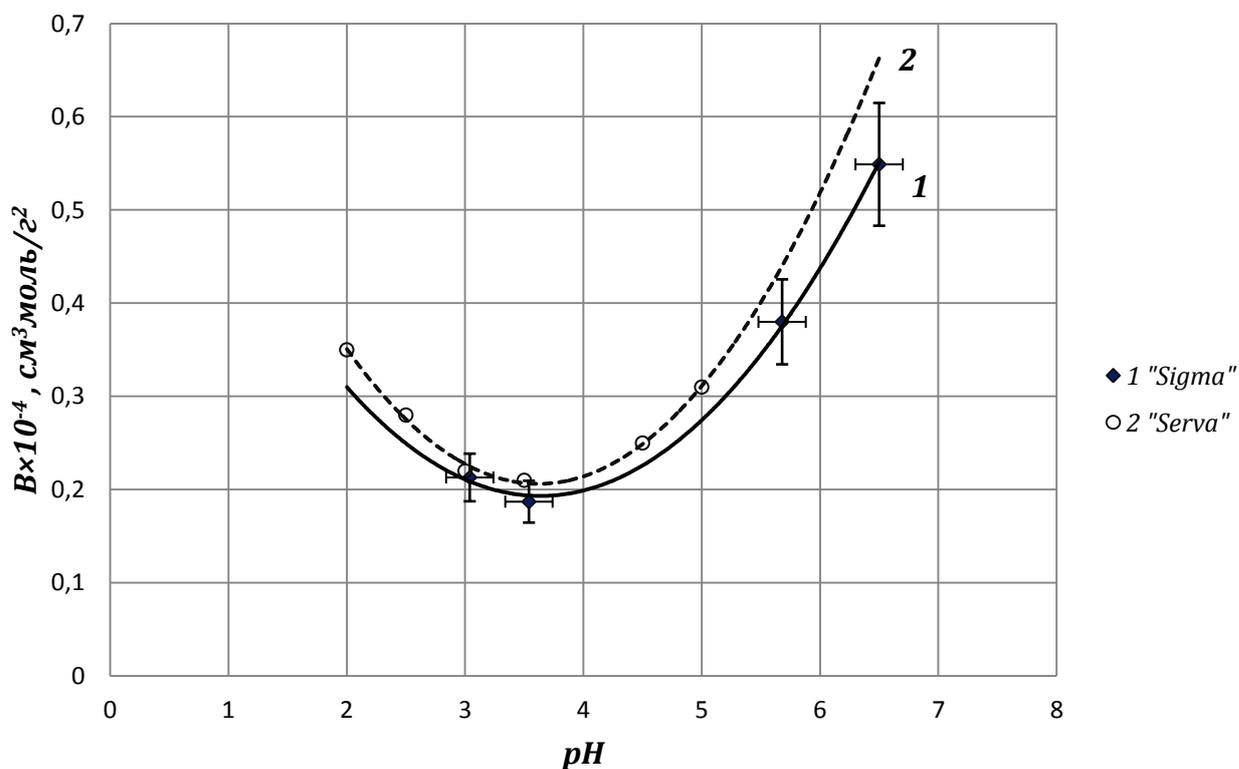


Рис.4.15. График зависимости второго вириального коэффициента B от параметра pH .

Из-за низкой растворимости лизоцима [115] в области pH больше 9.5, рассмотреть этот диапазон pH щелочной области не удалось (Рис.4.16). Отмеченная в работе [115] низкая растворимость лизоцима при $pH > 9.5$ хорошо согласуется с нашими результатами - при pH 9.5 – 12 белок в растворе выпадает в осадок.

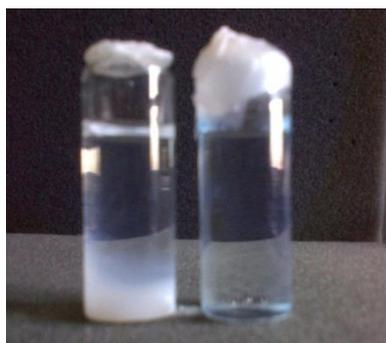


Рис.4.16. Растворимость лизоцима при добавлении щелочи KOH : pH 10,5 (слева), pH 7,0 (справа).

В чистом водном растворе лизоцима массы рассеивающих частиц не изменяются в зависимости от pH .

На *Рис.4.17* приведены концентрационные зависимости параметра рассеяния sH/R_{90} для раствора лизоцима при различных pH без добавления солей. Можно видеть, эти зависимости линейны и для всех pH экстраполяции приводят к одной точке на оси ординат, следовательно масса рассеивающих частиц не зависит от pH и совпадает с табличным значением молекулярной массы лизоцима (14 400 а.е.м. [37]).

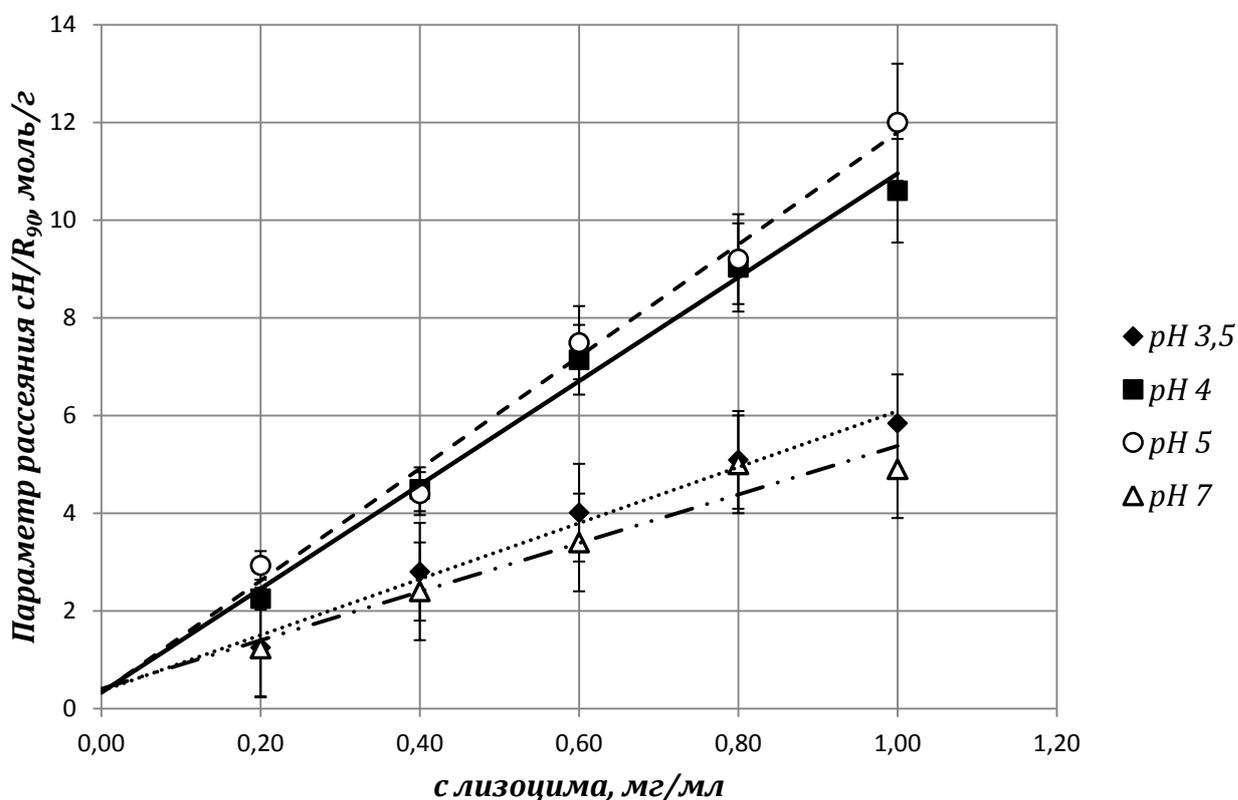


Рис.4.17. Концентрационные зависимости параметра рассеяния в чистых растворах лизоцима при разных pH .

ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ ТОЧКА ЛИЗОЦИМА.

Особый интерес вызывает исследование изоэлектрической точки лизоцима.

Поляризационные свойства белковых макромолекул зависят от ионной силы раствора и суммарного заряда на поверхности белковой глобулы существенно нелинейным образом.

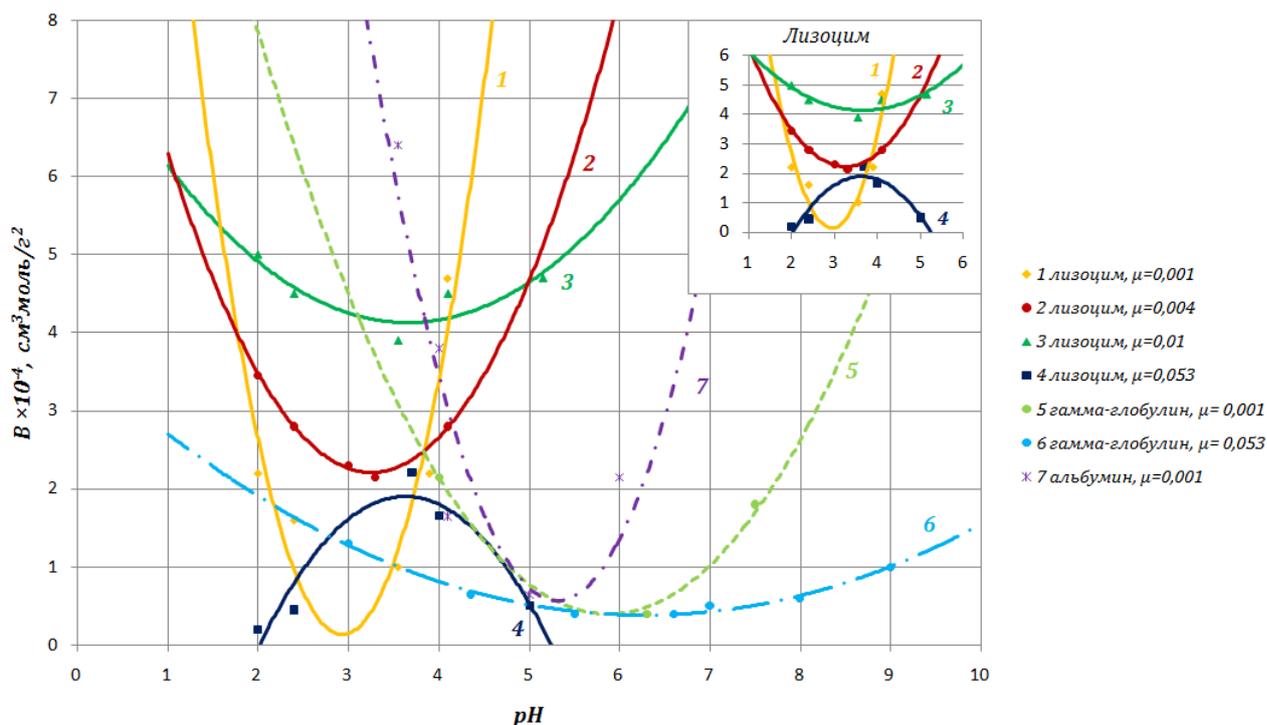


Рис.4.18. Зависимости второго вириального коэффициента B от параметра pH , для водных растворов альбумина, γ -глобулина и лизоцима.

Для белка лизоцима зависимость параметра $B(pH)$ [67] также меняет знак при увеличении ионной силы. Это указывает на сильные взаимодействия между ионами электролита и молекулами белка и характеризуется ростом (по модулю) третьего члена формулы Скэтчарда. При этом коэффициент взаимодействия сохраняет нелинейную зависимость с экстремумом при $pH \sim 3,5$, что подтверждает ранее обнаруженные закономерности [4-8, 22].

Очевидно, что коэффициент взаимодействия меняется с ростом суммарного заряда на белке по параболическому закону (эффект Доннана) с экстремумом в изоэлектрической точке. Параметр β_{22} обычно незначителен, а третий член в формуле Скэтчарда может принимать достаточно большие значения, так что при существенной концентрации соли в растворе B может стать отрицательным. При возрастании ионной силы (m_3) вокруг заряженной молекулы белка в растворе возникает облако противоионов, экранирующее кулоновские взаимодействия; коэффициент B уменьшается и стремится к величине, характерной для полностью незаряженных молекул и определяемой

Ван-дер-Ваальсовыми силами, однако параболический вид зависимости $B(pH)$ сохраняется.

С увеличением ионной силы, определяемой концентрацией соли ($NaCl$), зависимости $B(pH)$ становятся более пологими, что хорошо согласуется с ранее полученными результатами [4, – 7, 22].

В работе Эдсолла и др. [22] было обнаружено явление смещение минимума кривых от изоэлектрической точки в сторону меньших pH (положительных Z) с увеличением концентрации соли. Это явление было объяснено более сильным химическим сродством ионов Cl^- с поверхностью белка. По смещению минимума кривых $B(Z)$ в работе [22] приближенно оценивалось изменение эффективного значения величины изоэлектрической точки pI , соответствующей поверхностному заряду $Z = 0$, и число мест сильного связывания ионов Cl^- на поверхности белка (смещение на 1 pH соответствует изменению заряда на 5– 6 единиц).

Длина белка: **129** аминокислот(ы)
 Эмпирическая формула: **$C_{610}H_{954}N_{192}O_{184}S_{10}$**

Молекулярная масса: **14241.95** Да
 (с учетом естественного содержания изотопов)

Изоэлектрическая точка: **$pI = 10.18$**

Состав:

аминокислота	количество	%
A	12	9.31
C	8	6.21
G	13	10.08
V	6	4.66
L	8	6.21
I	6	4.66
M	2	1.56
S	10	7.76
T	7	5.43
F	3	2.33
Y	3	2.33
W	6	4.66
D	8	6.21
E	1	0.78
N	13	10.08
Q	3	2.33
H	1	0.78
K	6	4.66
R	11	8.53
P	2	1.56

Рис.4.19. Пример обработки аминокислотной последовательности компьютерной программой [116].

Однако в случае с лизоцимом – размер молекулы которого, значительно меньше размера молекулы альбумина – наблюдается обратная зависимость с увеличением концентрации соли: смещение экстремума кривых от pH 3.5 (отрицательного Z) в сторону больших pH .

Компьютерные программы [116] позволяют примерно определить изоэлектрическую точку белка по аминокислотным остаткам, входящим в его состав.

Наименование фермента	Аминокислотные остатки			
	всего	нейтральные	основные	кислые
Лизоцим из куриного яйца	129	38	17	37
Рибонуклеаза из поджелудочной железы быка	124	36	18	27
Цитохром с из плесневого гриба	107	45	18	21

Таб.3. Аминокислотные остатки в составе некоторых белков [34].

В Таб.3 указано число нейтральных, основных и кислых аминокислотных остатков в составе лизоцима [34]. От соотношения тех и других зависит положение изоэлектрической точки. Если в составе белка (пептида) преобладают боковые радикалы, содержащие аниогенные группы (способные в водной среде отдавать протоны с возникновением отрицательного заряда), то его pI находится в кислой среде, где избыток протонов будет подавлять диссоциацию этих групп. Если в составе белка (пептида) преобладают боковые радикалы, содержащие катиогенные группы (способные присоединять протоны с появлением положительного заряда), то его pI находится в щелочной среде, так как протонирование этих групп будет затруднено при низкой концентрации ионов водорода в растворе. Из общих соображений ясно, что так как в составе лизоцима больше кислых аминокислотных остатков (аниогенные группы), то его изоэлектрическая точка должна лежать в кислой области. На Рис.4.20 приведены зависимости поверхностного заряда на белке лизоцим от водородного показателя среды pH , посчитанные с помощью программ [116], и одна – измеренная на установке *Malvern's Zetasizer Nano*.

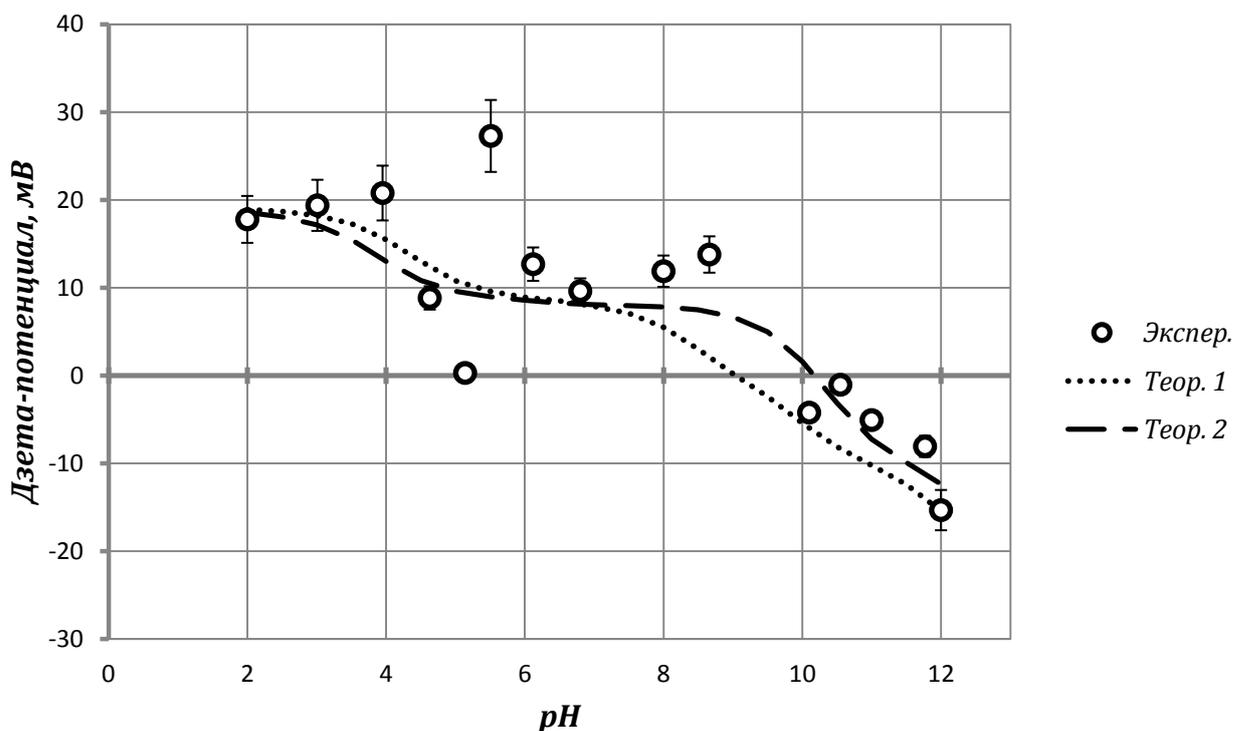


Рис.4.20. Зависимости поверхностного заряда на белке лизоцим от водородного показателя среды pH

Согласно Рис.4.20, видно, что нулевой поверхностный заряд на белке достигается при pH 10.5, то есть изоэлектрическая точка белка лежит в основной области и, примерно, равна 10.3, что хорошо согласуется с литературными данными [34, 117].

Объяснить почему наблюдается разброс в значениях pI и поведение лизоцима не согласуется с теорией Скэтчарда пока не удастся. Возможно, это связано с тем, что поверхность молекулы лизоцима слишком мала, заряд на поверхности слишком нестабилен (этим объясняется широкий разброс точек на экспериментальной кривой).

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЛИЗОЦИМА С МЕТАЛЛИЧЕСКИМИ ИОНАМИ, ОБЛАДАЮЩИМИ БОЛЬШИМИ ИОННЫМИ РАДИУСАМИ И ТЯЖЕЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ.

Для сравнения были проведены исследования водных растворов лизоцима, содержащих хлорид калия [119, 120].

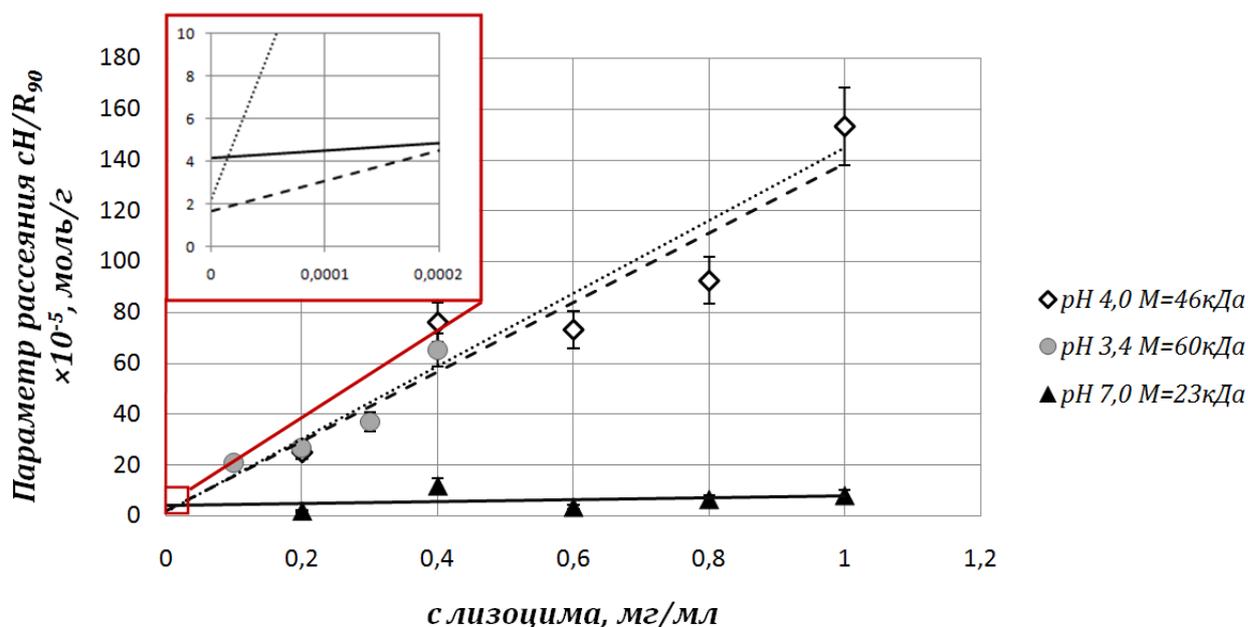


Рис.4.21(а,б,в). Концентрационные зависимости параметра рассеяния в растворах лизоцима, содержащих KCl.

а) $pH=3,4$; $\mu=0,01$ моль/л; $M=60$ кДа; $V=0,0143$ см³ моль/г².

б) $pH=4,0$; $\mu=0,01$ моль/л; $M=46$ кДа; $V=0,0140$ см³ моль/г².

в) $pH=7,0$; $\mu=0,01$ моль/л; $M=23$ кДа; $V=0,0035$ см³ моль/г².

На Рис.4.21 представлены концентрационные зависимости параметра рассеяния при различных pH .

Из сравнения можно видеть, что экстраполяции этих зависимостей к нулевой концентрации существенно отличаются друг от друга. Получаемые значения $1/M$ сильно различаются для различных pH , как и значения второго вириального коэффициента, определяемые наклоном графиков.

При приближении pH к изоэлектрической точки наблюдается увеличение массы рассеивающих частиц в 3 – 4 раза, что объясняется образованием диполь-дипольных структур – кластеров.

В водных растворах лизоцима, содержащих хлорид калия, наблюдается увеличение массы рассеивающих частиц. Это может быть объяснено частичной ионной адсорбцией ионов калия на заряженных молекулах белка. Увеличение масс в несколько раз также объясняется образованием дипольных структур – кластеров.

Рис.4.22 показывает зависимость приведенной массы M/M_0 , где M – масса рассеивающих частиц, а M_0 – табличное значение молекулярной массы лизоцима. Эта зависимость тоже имеет нелинейный характер с максимумом вблизи точки pH 3.5, что так же позволяет делать вывод о том, изоэлектрическая точка лизоцима скорее ближе к pH 3.5 – 4.

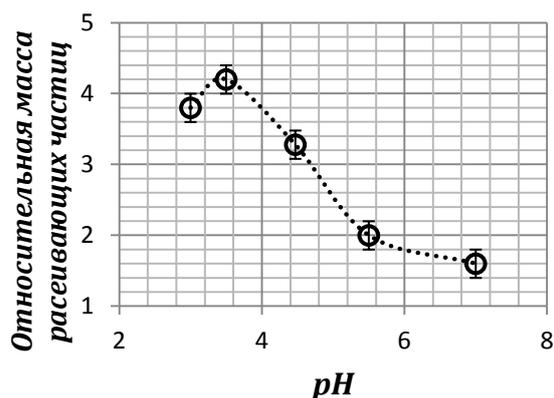


Рис.4.22. Зависимость приведенной массы M/M_0 рассеивающих частиц в растворе лизоцима с добавлением соли KCl от pH .

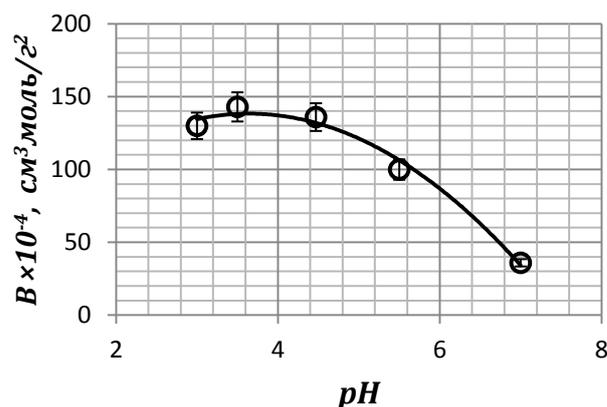


Рис.4.23. График зависимости второго вириального коэффициента B от параметра pH в растворе лизоцима, содержащего KCl

На Рис.4.23 изображен график зависимости коэффициента межмолекулярного взаимодействия от pH . Он имеет нелинейный характер с максимумом (в отличие от подобного графика для чистого лизоцима Рис.4.15) при pH 3.5. Это повторяет результаты, полученные ранее в нашей лаборатории для других белков (альбумина и γ -глобулина) [118.].

Так же были проведены исследования рассеивающих свойств растворов лизоцима, содержащих соль $Eu(NO_3)_3$ методом Рэлея – Дебая (Рис.4.24 а,б). показывает концентрационные зависимости параметра рассеяния. Можно видеть, что зависимости линейны и экстраполяции этих зависимостей дают различные величины для $1/M$ и второго вириального коэффициента.

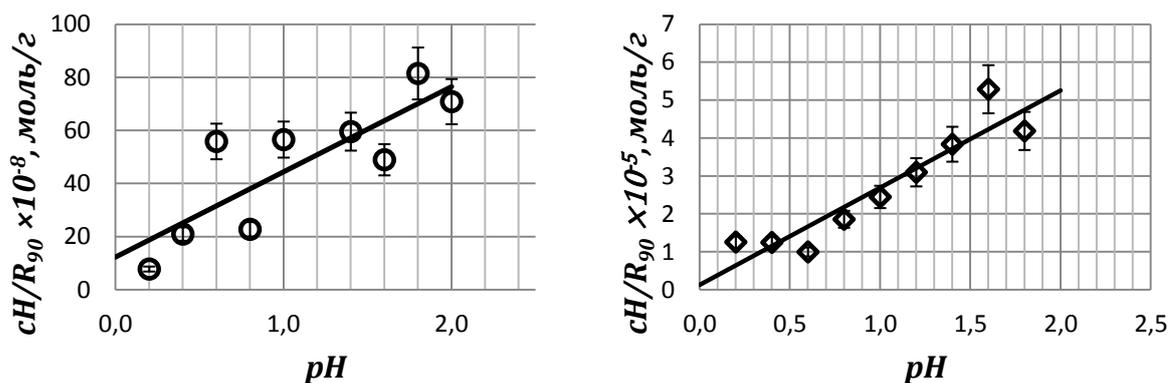


Рис.4.24. Концентрационные зависимости параметра рассеяния в растворе лизоцима, содержащего $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$.
слева: $\text{pH } 7,0$; $\mu=0,01$ моль/л; $M=88$ кД; справа: $\text{pH } 3,4$; $\mu=0,01$ моль/л; $M=612$ кДа;.

При добавлении ионов Eu^{3+} масса рассеивающих частиц в растворе также увеличивается. Максимум $M/M_0(\text{pH})$ (Рис.4.25) тоже лежит в области $\text{pH } 3,5$. В отличие от предыдущего случая, здесь массы рассеивающих частиц увеличиваются примерно на два порядка, по сравнению с молекулярной массой лизоцима.

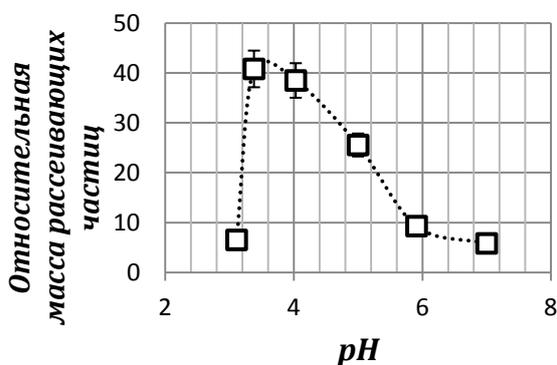


Рис.4.25. Зависимость приведенной массы M/M_0 рассеивающих частиц в растворе лизоцима с добавлением соли $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$ от pH .

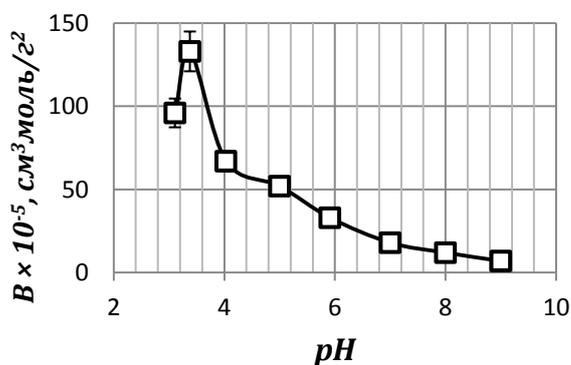


Рис.4.26. График зависимости второго вириального коэффициента B от параметра pH в растворе лизоцима, содержащего $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$.

Такая особенность взаимодействия белка лизоцима с ионами трехвалентного европия, связана с тем, что молекула лизоцима значительно меньше других глобулярных белков (таких как альбумин и γ -глобулин, активно исследуемых в нашей лаборатории) и по всей вероятности, имеет очень неравномерное распределение заряда.

pH -зависимость коэффициента межмолекулярного взаимодействия (Рис.4.26) для раствора лизоцима, содержащего ионы трехвалентного европия подобна аналогичной зависимости в случае добавления ионов калия, и имеет резкий максимум в точке $pH \sim 3.5$.

Чтобы наглядно показать образование дипольных наноструктур (кластеров) растворы белков исследовались с помощью электронной микроскопии (ПЭМ). По-видимому, из-за очень маленького размера лизоцима, получить хорошие снимки для него не удалось.

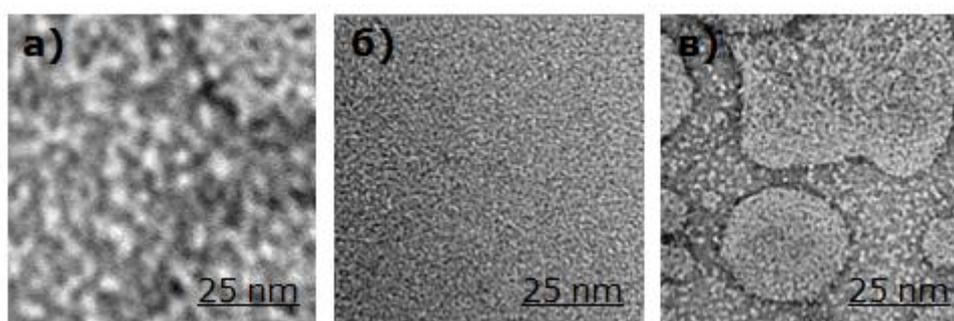


Рис.4.27: Снимки образцов, полученные с помощью ПЭМ. а) чистый раствор лизоцима; б) чистый раствор соли; в) при добавлении солей свинца в раствор лизоцима

ИССЛЕДОВАНИЕ БЕЛКОВЫХ НАНОКЛАСТЕРОВ С ПОМОЩЬЮ АСМ.

Для сравнения были исследованы водные растворы альбумина и гамма-глобулина, содержащие легкие и тяжелые ионы, методом фотонно-корреляционной спектроскопии, и результаты сравнивались с данными, полученными с помощью атомно-силовой микроскопии [119 – 122]. По результатам экспериментов, проведенных с помощью фотонно-корреляционного спектрометра, были получены нелинейные зависимости коэффициента трансляционной диффузии D_t альбумина и гамма-глобулина от показателя pH . Аналогичный эффект наблюдался при добавлении в белковые растворы гамма-глобулина и альбумина соли KCl (Рис.4.28).

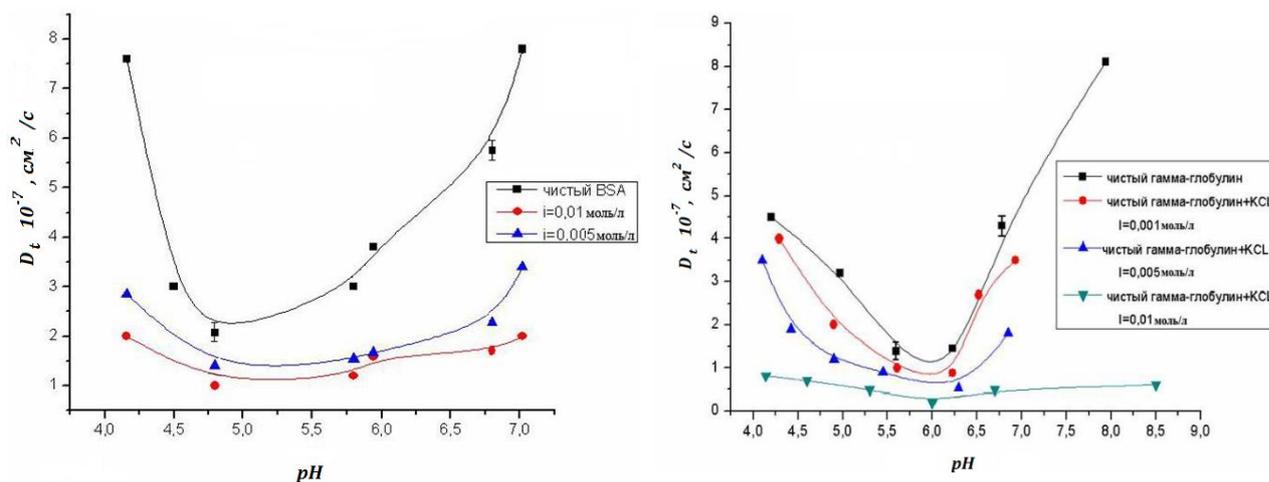


Рис.4.28. Зависимости коэффициентов трансляционной диффузии альбумина (слева) и гамма-глобулина (справа) от pH при добавлении KCl.

Коэффициенты трансляционной диффузии обоих белков (альбумина и γ -глобулина) имеют минимум вблизи их изоэлектрических точек. При этом при увеличении ионной силы зависимость D_t от pH становится более полой, значение коэффициента трансляционной диффузии белков уменьшается, что свидетельствует об образовании нанокластеров белковых молекул.

Размеры белковых нанокластеров, полученные с помощью АСМ, совпадают с размерами рассеивающих частиц, полученными с помощью метода фотонно-корреляционной спектроскопии, и составляют в диаметре около 100 нм (Рис.4.29).

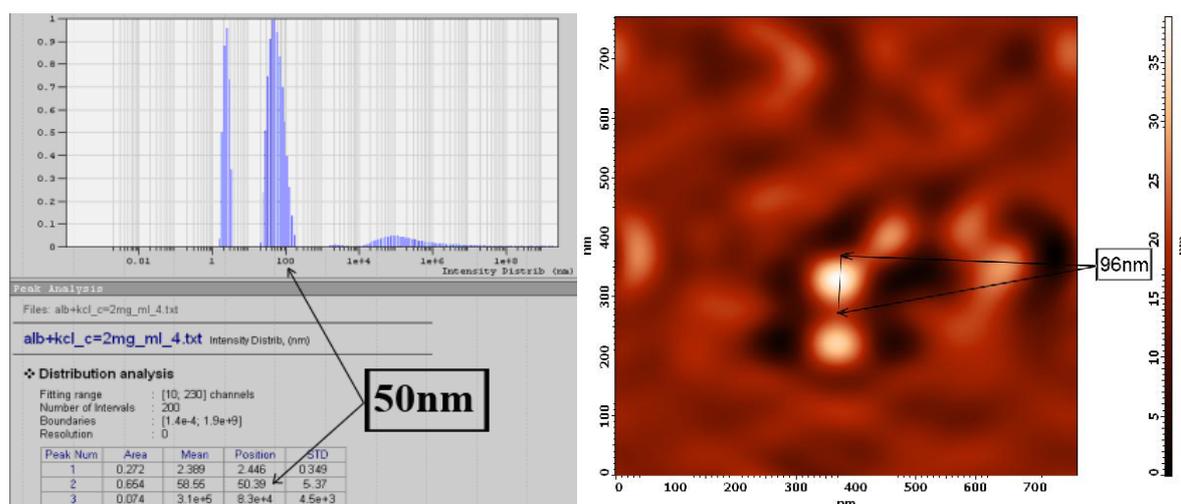


Рис.4.29. Радиус нанокластеров альбумина, детектируемый спектрографом при добавлении KCl и снимок АСМ.

При добавлении ионов европия к белковым растворам альбумина образуются частицы с радиусом около 68 нм (Рис.4.30).

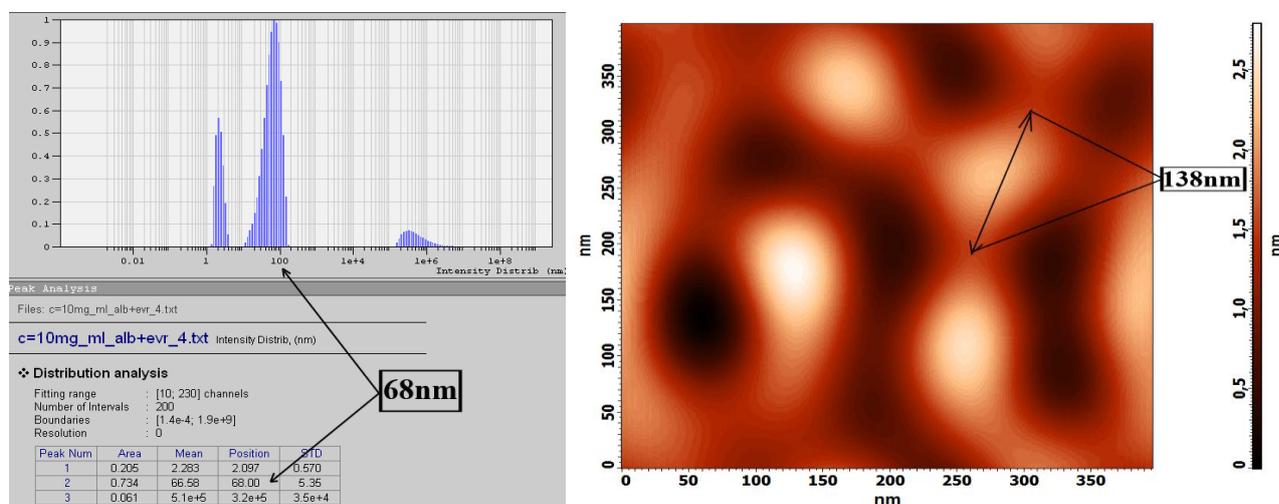


Рис.4.30. Радиус нанокластеров альбумина, детектируемый спектрографом при добавлении $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$ и снимок АСМ.

Видно, что при взаимодействии альбумина с $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$ частицы получились большего размера, чем при взаимодействии этого же белка с KCl . Это можно объяснить тем, что Eu является трехвалентным элементом, а K – одновалентным, энергия связи европия больше, чем у калия и за счет этого большее число ионов соли $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$ абсорбируется на альбумине, чем ионов соли KCl .

Также была измерена зависимость интенсивности рассеяния белкового раствора альбумина в чистом водном растворе и при добавлении соли $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$ от pH . (Рис.4.31). Данный график наглядно показывает сильный рост интенсивности рассеяния альбумина при добавлении ионов европия по сравнению с интенсивностью рассеяния альбумина без соли, что говорит о том, что массы рассеивающих частиц также сильно увеличились (1.5).

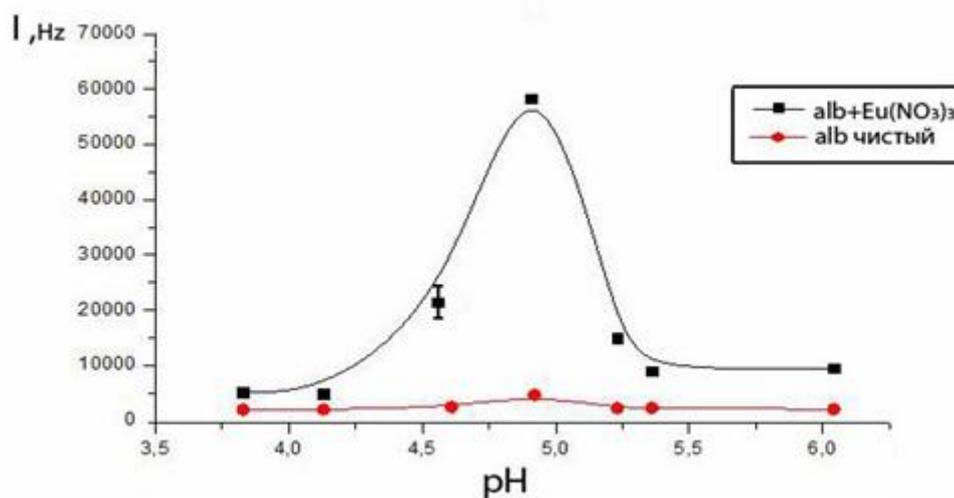


Рис.4.31. График зависимости интенсивности рассеяния альбумина от pH при добавлении $Eu(NO_3)_3$

Далее приведены 3D изображения белковых растворов, содержащих соли KCl (Рис.4.32а) и $Eu(NO_3)_3$ (Рис.4.32б) с ионной силой $\mu=0,01$ моль/л.

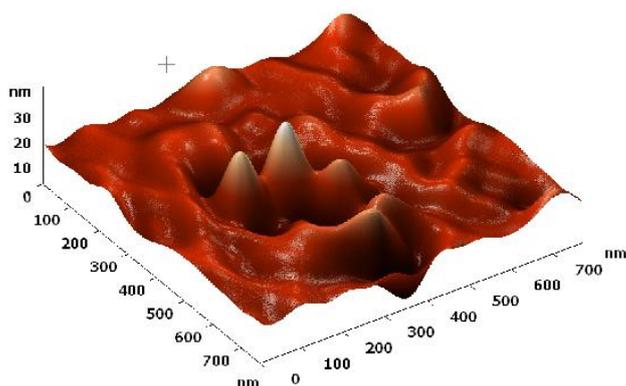


Рис.4.32а. 3D-изображение частиц альбумина, отснятого на АСМ при добавлении KCl .

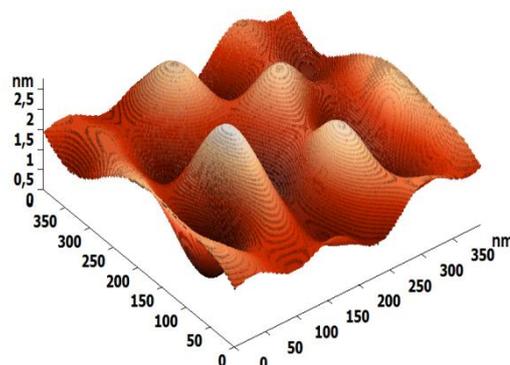


Рис.4.32 б. 3D-изображение частиц альбумина, отснятого на АСМ при добавлении $Eu(NO_3)_3$.

Размеры белковых нанокластеров, полученные с помощью АСМ, хорошо совпадают с размерами этих же частиц, полученные с помощью метода фотонно-корреляционной спектроскопии [119 – 122].

Как было замечено ранее, размер кластеров, образующихся в водном растворе альбумина, содержащем $Eu(NO_3)_3$ увеличился, т.к. соль трехвалентного европия является более тяжелой, энергия связи этой соли имеет

большее значение, и, соответственно, большее число ионов данной соли абсорбируется на белковую молекулу.

На *Рис.4.32б* видно, что высота белкового кластера имеет сравнительно небольшую высоту – около 3 нм. Это связано с тем, что на подложку осели не отдельные молекулы, а целый белковый слой, молекулы в этом слое плотно лежат и за счет этого игла кантилевера не может глубоко опуститься, чтобы просканировать всю высоту белковой молекулы.

Водные растворы, содержащие альбумин и ионы калия и европия, помещались в ультразвуковую мешалку, а затем исследовались на спектрометре *Photacor*. Оказалось, что процесс кластерообразования обратим: под действием ультразвука кластеры разрушаются, причем эффективная масса рассеивающих частиц приближается к величине молекулярной массы молекулы альбумина. Образцы держались в ультразвуковой мешалке 5 минут. Большее время воздействия ультразвука на молекулы белка, может привести к "разбиванию" белковой молекулы до аминокислот.

ФИЗИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ОБРАЗОВАНИЯ НАНОКЛАСТЕРОВ.

Чтобы объяснить процесс кластерообразования необходимо описать особенности процесса абсорбции ионов металлов с различными ионными радиусами на поверхность белка и изменение характера межмолекулярного взаимодействия в растворах белков при наличии ионов металлов [122].

Взаимодействие иона с поверхностью белка происходит, как правило, с участием их гидратных оболочек. Если энергия связи иона с дипольной молекулой воды E_{pq} , которая зависит от ионного радиуса, меньше тепловой энергии kT , то на поверхности ионов вода не будет удерживаться:

$$E_{pq} = \frac{q^2 p_w^2}{12\pi\epsilon r_0^4} \frac{1}{kT}$$

Взаимодействуя с поверхностью белка непосредственно, ион металла с большим ионным радиусом более прочно связывается с отрицательно заряженной группой на белке и может образовывать кулоновский комплекс на

макромолекуле белка с общей гидратной оболочкой. В этом случае металлические ионы полностью компенсируют локальный поверхностный заряд белковой молекулы.

Сближению макромолекул альбумина препятствует кулоновское отталкивание, энергия которого в случае сильно заряженных молекул E_{qq} обычно больше kT :

$$E_{qq} = \frac{q^2}{\epsilon l}$$

Эффективное уменьшение поверхностного заряда белка, происходящее в результате прочного связывания ионов тяжелого металла на поверхности макромолекулы, может привести к тому, что основным видом взаимодействия между макромолекулами станет диполь-дипольное, поскольку белки имеют аномально высокие значения дипольных моментов:

$$E_{pp} = \frac{p^4}{6\pi\epsilon kTl^6}$$

Очевидно, что поверхностный заряд макромолекулы будет быстро убывать с увеличением концентрации ионов тяжелых металлов. В этом случае характер взаимодействия белковых макромолекул определяется конкуренцией сил диполь-дипольного притяжения и сил кулоновского отталкивания. Если эффективный поверхностный заряд стремится к нулю, что наблюдается в области изоэлектрической точки, то белковые макромолекулы могут сблизиться на предельно малые расстояния. Это значит, что создаются такие условия (минимум свободной энергии), что молекулам энергетически выгоднее объединиться в комплексы -кластеры.

СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ МЕТАЛЛИЧЕСКИХ ИОНОВ.

Методом динамического рассеяния света определялась молекулярная подвижность лизоцима в водных растворах при различных температурах [125]. Для измерений выбирался "жизненный" диапазон температур - от 20 до 40 °С, что соответствует температуре, необходимой для нормального развития

куриного яйца, т.е. температура, при которой лизоцим в норме должен находится внутри живого организма.

Эксперименты проводились, как в чистом растворе (Рис.4.33), так и с использованием стабилизирующих добавок (ионов Ca^{2+} (Рис.4.35) и Na^+ (Рис.4.34)) с ионной силой 0,05 моль/л. При этом концентрация лизоцима во всех случаях составляла 1 мг/мл. Был найден интервал температур, в котором происходит изменение структуры самой молекулы лизоцима. Согласно теоретическим источникам, в интервале температур от 20 до 30°C происходит перестройка активного центра лизоцима, что, видимо, влияет на размер молекулы.

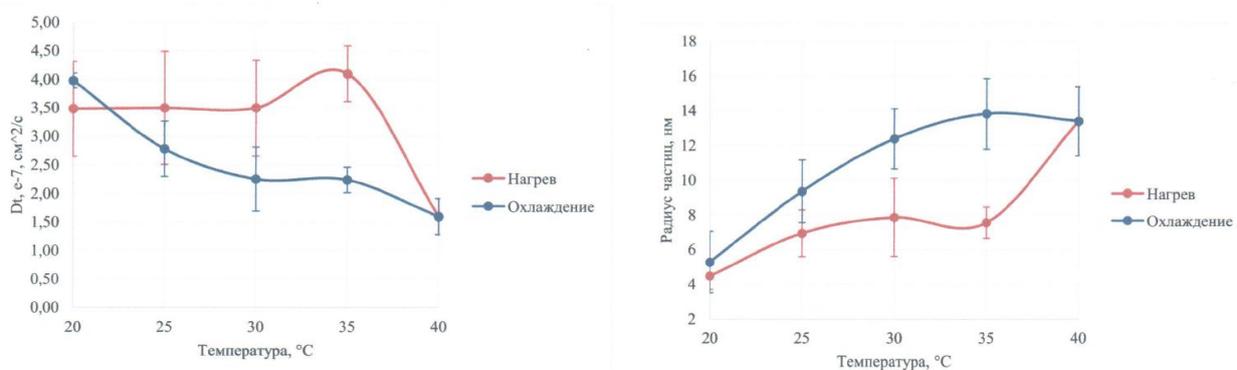


Рис.4.33 Графики зависимости коэффициента трансляционной диффузии (справа) и радиуса рассеивающих частиц (слева) от температуры для чистого одного раствора.

Как можно видеть (Рис.4.33), коэффициент трансляционной диффузии и радиус рассеивающих частиц зависят от температуры среды нелинейным образом. При температуре около 30°C для графика размера частиц наблюдается максимум, а для графика коэффициента трансляционной диффузии в этой точке находится точка перегиба. Данную особенность графика можно объяснить перестройкой активного центра лизоцима.

Также из графика видно, что явление гистерезиса на данном интервале температур выражено слабо, однако можно с высокой долей уверенности утверждать, что процесс образования кластеров при нагреве раствора, обладает некоторой инертностью по отношению к изменению температуры.

Также исследовалось влияние солей натрия и кальция на стабилизацию структуры лизоцима.

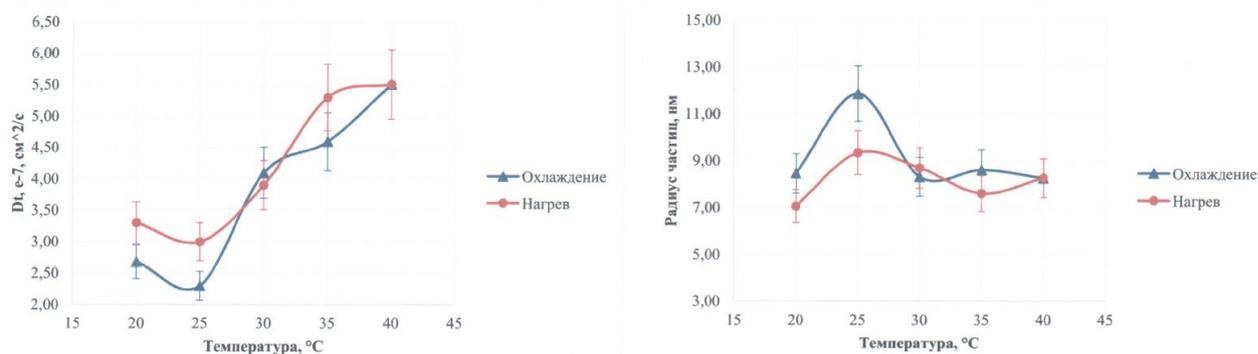


Рис.4.34. Графики зависимости коэффициента трансляционной диффузии (справа) и радиуса рассеивающих частиц (слева) от температуры для раствора лизоцима в присутствии NaCl

Как видно из графиков зависимости радиуса молекул лизоцима от температуры в чистом растворе и в присутствии NaCl, наличие в растворе ионов натрия практически не влияет на перестройку активного центра фермента, однако при дальнейшем повышении температуры в растворе образования кластеров не происходит.

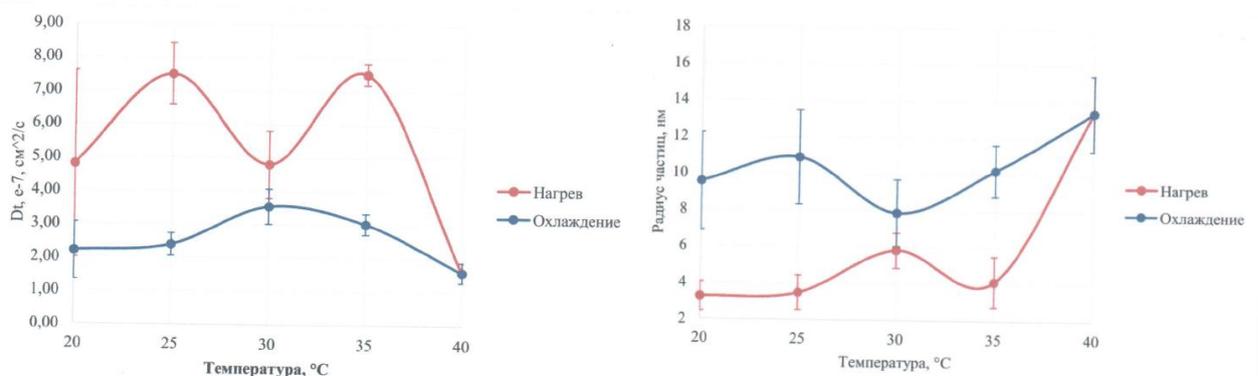


Рис.4.35. Графики зависимости коэффициента трансляционной диффузии (справа) и радиуса рассеивающих частиц (слева) от температуры для раствора лизоцима в присутствии CaCl

При добавлении в раствор соли CaCl₂ наблюдается иная картина. Здесь явление гистерезиса является более выраженным, чем в предыдущих случаях. При нагреве не происходит перестройки активного центра фермента, однако ионы кальция не предотвращают температурную агрегацию молекул лизоцима. При охлаждении ситуация несколько отличается. Сначала происходит

уменьшение размера рассеивающих частиц, почти безынерционное, но затем их увеличение, связанное с перестройкой активного центра. Из этого следует, что ионы кальция при нагревании стабилизируют активный центр, но при охлаждении этот эффект пропадает.

Поскольку коэффициент трансляционной диффузии зависит не только от размера рассеивающих частиц, но и от температуры раствора, и от коэффициента преломления (который также зависит от температуры), графики зависимости коэффициента трансляционной диффузии от температуры становятся малоинформативными, и мы можем определять наличие либо отсутствие структурных изменений только по графику зависимости размера рассеивающих частиц от температуры.

Определим необходимое для предотвращения структурных изменений количество молекул соли на одну молекулу лизоцима. Концентрация лизоцима в наших экспериментах составила 10 мг/мл. Молярная масса лизоцима 14 400 г/моль, т. е. 10 мг/мл ~ 0,7 моль/мл. Из этого следует, что для стабилизации структуры молекулы лизоцима достаточно одной молекулы металла, которая, вероятнее всего, присоединяется к аллостерическому центру лизоцима, действуя в качестве эффектора.

Структурные изменения под воздействием металлических ионов также наблюдались в водных растворах креатинкиназы [123, 124]. В качестве объекта исследования использовалась креатинкиназа из сердца свиньи.

По результатам экспериментов, проведенных с помощью фотонно-корреляционного спектрометра, была получена нелинейная зависимость коэффициента трансляционной диффузии D_t креатинкиназы от показателя pH . Аналогичный эффект наблюдается при добавлении в раствор фермента солей калия и европия (Рис.4.36).

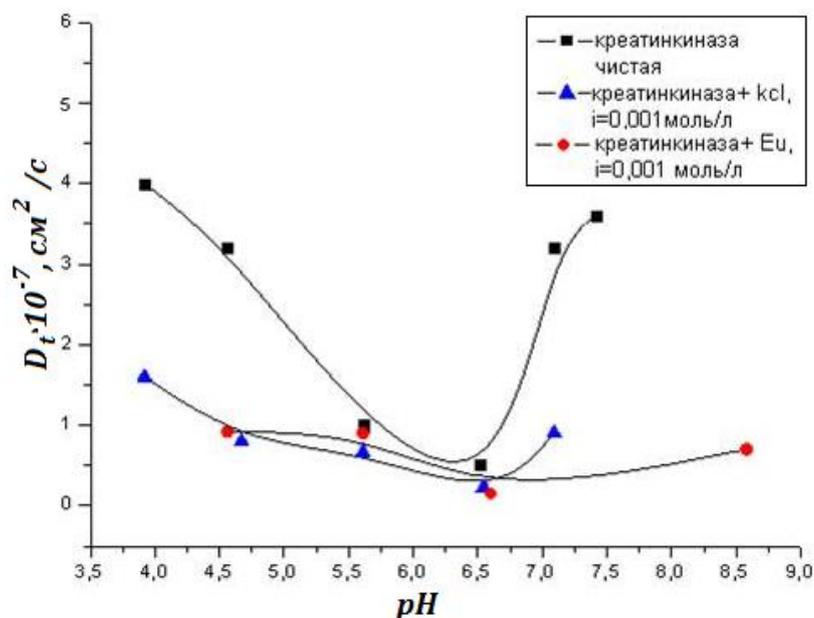


Рис.4.36. Зависимость коэффициента трансляционной диффузии D_t креатинкиназы от показателя pH

Концентрационная зависимость коэффициента трансляционной диффузии в чистом водном растворе изображена на Рис.4.38 кривая 1. Полученную кривую условно можно разделить на 3 участка (0,1–0,5 мг/мл – крутое убывание прямой; 0,5–0,8 мг/мл – пологое убывание прямой; 0,8–1 мг/мл – прямая постоянна), каждый из которых соответствует определенному состоянию молекул фермента. Это доказывает изменение структуры макромолекулы креатинкиназы. Возможно, оно вызвано образованием димеров и октамеров из мономера молекулы креатинкиназы.

Результаты, полученные в данной работе, хорошо согласуются с результатами, приведенными в книге [76].

При добавлении в водный раствор креатинкиназы хлорида натрия с ионной силой 0,1 моль/л была получена аналогичная зависимость (Рис.4.38 кривая 3) На этой кривой можно также отметить 3 участка, соответствующие структурному изменению макромолекулы креатинкиназы ($c=0,1-0,5$ мг/мл, $c=0,5-0,7$ мг/мл, $c=0,7-1$ мг/мл). Характер зависимости сохраняется, однако, концентрация перехода из димера в октамер отличается от переходной концентрации в чистом водном растворе креатинкиназы.

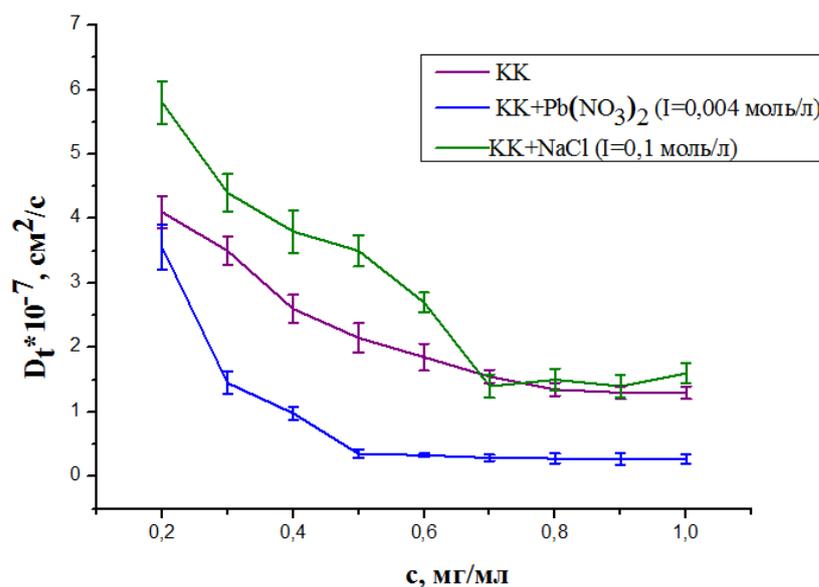


Рис.4.37. Концентрационная зависимость коэффициента трансляционной диффузии

Переходные концентрации в водном растворе и с добавлением соли *NaCl* равны соответственно $c=0,8$ мг/мл, $c=0,7$ мг/мл. Нейтральные соли в небольших концентрациях повышают растворимость даже тех белков, которые нерастворимы в чистой воде. Это объясняется тем, что ионы солей, взаимодействуя с противоположно заряженными группами молекул белков, разрушают солевые мостики между молекулами белков. Повышение концентрации солей (увеличение ионной силы раствора) оказывает обратное действие.

При добавлении в раствор креатинкиназы динитрата свинца (Рис.4.37. кривая 2), можно также как и раньше отметить 3 отрезка, соответствующие определенной структуре макромолекулы креатинкиназы. На концентрациях $c=0,1-0,3$ мг/мл молекула пребывает в состоянии мономера, на $c=0,3-0,5$ мг/мл – димера, а $c>0,5$ мг/мл – октамера.

На Рис.4.38 представлены зависимости коэффициентов трансляционной диффузии рассеивающих частиц от концентрации водного раствора креатинкиназы при добавлении динитрата свинца с разной ионной силой. Можно сказать, что при разных ионных силах характер зависимости коэффициента трансляционной диффузии от концентрации остается неизменным (Рис.4.38), отличаются лишь значения коэффициента

трансляционной диффузии. Это может объясняться увеличением размеров рассеивающих частиц. Вероятно, данный результат может быть связан ионной адсорбцией ионов свинца на поверхности молекул креатинкиназы.

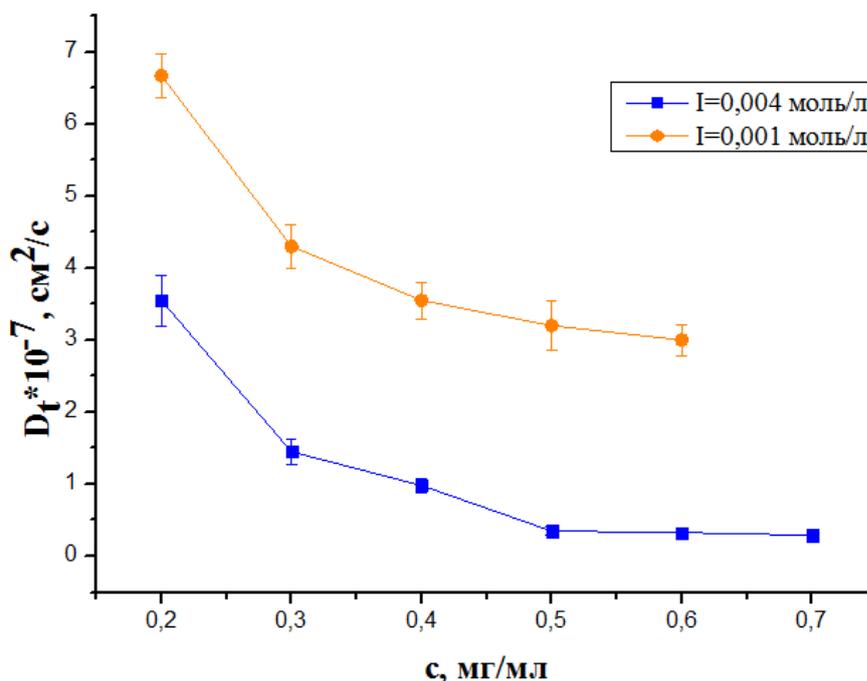


Рис.4.38. Сравнение экспериментальных зависимостей коэффициента трансляционной диффузии от концентрации креатинкиназы в водном растворе с добавлением $Pb(NO_3)_2$ с разными ионными силами.

4.5 КРАТКИЕ ВЫВОДЫ ГЛАВЫ 4.

В работе проведены экспериментальные исследования молекулярно-динамических процессов, происходящих в жидких системах оптически анизотропных заряженных макромолекул белков (лизоцима и креатинкиназы, бычьего сывороточного альбумина и гамма-глобулина).

Поведение инкремента показателя преломления, связанного со средней электронной поляризуемостью молекулы лизоцима, при изменении ионной силы раствора позволяет говорить о возможности полной компенсации суммарного поверхностного заряда на ферменте.

Показано, что в водных растворах фермента лизоцима экстремумы pH зависимостей массы кластеров, коэффициентов взаимодействия и коэффициентов деполяризации и оптическая анизотропия рассеивающих

частиц раствора находятся в области значений pH , близких к 3-3.5, что, может быть объяснено особенностью распределения зарядов на поверхности молекул лизоцима в водных растворах, связанных с очень маленькими размерами молекул данного фермента.

Методом динамического рассеяния света и с помощью методов электронной и зондовой микроскопии проведены исследования явления агрегации макромолекул в водных растворах основных белков сыворотки крови - альбумина и гамма-глобулина, содержащих ионы калия и европия, при изменении различных параметров среды, таких как концентрация макромолекул, водородный показатель раствора, концентрация солей. Показана обратимость образования кластеров.

Показано, что методика АСМ является неинвазивной для исследования белковых молекул, т.к. размеры кластеров, полученные методами фотонно-корреляционной спектроскопии, совпадают с размерами этих же кластеров, полученных с помощью АСМ.

С помощью методов светорассеяния впервые обнаружено и детально исследовано явление возникновения макромолекулярных кластеров в водных растворах таких ферментов как лизоцим и креатинкиназа, содержащих ионы металлов с различными ионными радиусами.

Показано, что методы светорассеяния могут быть применены для наблюдения и исследования конформационных изменений в структуре ферментов. Сделано предположение о влиянии температуры на структуру макромолекул лизоцима в водных растворах.

Результаты экспериментов с растворами биополимеров имеют большое значение для понимания механизмов молекулярных процессов, происходящих при воздействии соединений тяжелых металлов на биологические системы.

ГЛАВА 5. (ПРИЛОЖЕНИЕ). ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ РАССЕЯНИЯ СВЕТА ДЛЯ РАЗРАБОТКИ И СОЗДАНИЯ ОПТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ ОНКОЗАБОЛЕВАНИЙ.

В настоящее время активно разрабатываются оптические приборы для целей медицинской диагностики и экологического мониторинга. Успешная разработка новых физических методов медицинской диагностики распространенных заболеваний зависит от понимания молекулярных механизмов лежащих в основе данного заболевания. Необходимо использовать методику многопараметрического молекулярного анализа раствора белков - плазмы крови или лимфы с целью экспресс диагностики распространенных заболеваний, включая онкологические. Используемые диагностические параметры обладают высоким значением корреляции с опознаваемым патологическим состоянием и малым значением взаимной корреляции. Это позволяет проводить диагностику заболевания на ранних стадиях, когда традиционные методы не применимы. Кроме того, данная методика позволяет производить надежный контроль индивидуального лечения пациента и прежде всего при использовании таких физических источников облучения как лазерное, ультразвуковое, радиочастотное и ионизирующее излучение.

Работа проводилась в несколько этапов. Создавались модели сыворотки крови больных, здоровых и так называемой зоны неонкологического риска. Исследовались нативные образцы сыворотки крови.

5.1 СЫВОРОТКА КРОВИ И СОЗДАНИЕ МОДЕЛЬНЫХ РАСТВОРОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ.

Кровь – это подвижная внутренняя среда организма, образованная жидкой соединительной тканью, и состоящая из плазмы и взвешенных в ней

форменных элементов (лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов). [126] Количество, состав крови, а также ее физико-химические свойства у здорового человека относительно постоянны: они могут подвергаться небольшим колебаниям, но быстро выравниваются. Это постоянство состава и свойств крови является необходимым условием жизнедеятельности всех организмов и их частей.

На плазму приходится 52 – 61% всего объема крови, клетки крови составляют соответственно 40 – 45%. Плазма представляет собой однородную, мутноватую, а иногда и почти прозрачную, желтоватую жидкость с pH 7.34 – 7.43, и состоит из воды, органических соединений и неорганических солей. 90 – 92% плазмы составляет вода, 7 – 8% - белки, 0,1% - глюкоза и 0,9% - соли [127].

В 100 *мл* плазмы содержится около 7 г белка, в том числе 5 г альбумина и 2 г глобулинов, другие белки представлены в очень малых количествах [128].

Как уже было замечено, плазма – это жидкая составляющая крови, отделенная от клеток крови, которые оседают при центрифугировании. Важнейшей составной частью плазмы крови являются белки, среди которых особое место принадлежит фибриногену, а свободная от фибриногена плазма называется сывороткой. Сыворотки получают либо путем естественного свертывания плазмы (нативные сыворотки), либо путем осаждения фибриногена ионами кальция. В наших исследованиях использовались нативные сыворотки крови.

Условно все пациенты, чьи образцы крови исследовались в данной работе, были разделены на три группы: "онкологическая" или "больная" кровь - образцы полученные от пациентов с диагностированными и подтвержденными онкологическими заболеваниями различной этимологии и стадий; "неонкологическая" кровь – образцы полученные от пациентов с хроническими заболеваниями неонкологической природы; и "здоровая" кровь – образцы,

полученные от контрольной группы. Сравнительные измерения показали, что для здоровых людей и пациентов с онкологическими заболеваниями основные оптические параметры сыворотки крови различаются, следовательно, могут быть использованы для диагностики [129, 130].

Основываясь на результатах биохимических исследований крови здоровых людей и онкобольных, были получены соотношения альбумина и гамма-глобулина в водных растворах, которые могут быть использованы в качестве модельных систем нативных образцов сыворотки крови здоровых людей и людей с онкологией [131].

Для приготовления модельных растворов в работе использовались растворимые белки – бычий сывороточный альбумин и γ -глобулин фирмы «Sigma».

В работе проводилось исследование оптических свойств чистых водных растворов альбумина и γ -глобулина, а также их смесей при различных массовых соотношениях:

	Альбумин, мг	Гамма-глобулин, мг
Модельный раствор сыворотки «здоровой» крови	5,5	1,6
Модельный раствор сыворотки крови «группы риска»	3,5	3,5
Модельный раствор сыворотки «больной» крови	1,6	5,5

Таб.4. Массовые соотношения белков в модельных растворах.

Исследуемые системы готовились в лабораторных условиях непосредственно перед проведением эксперимента. Взвешивания белков проводилось на аналитических весах «Adventureg», позволяющих проводить измерения с точностью до 0,1 мг. Растворы готовились в медицинских ампулах емкостью 5 мл с использованием фабричной медицинской воды для инъекций (фирмы Микроген и ОАО «Новосибхимфарм»).

Исходный раствор готовится из соотношения 7,1 мг белка или их смеси (исходя из того, что в «здоровой» крови 5,5 мг альбумина, 1,6 мг γ -глобулина, а остальные белки заменяются водой – 2,9 мг) на 190 мкл воды, т.е. получался 5% раствор. Приготовленный таким образом раствор добавляется с помощью дозатора (по 12 мкл) в пробирку, содержащую 3 мл воды, с заданным *pH* (более подробно в п.4.1).

5.2 СПОСОБЫ ДИАГНОСТИКИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ, ОСНОВАННЫЕ НА МЕТОДЕ СВЕТОРАССЕЯНИЯ.

Ранняя диагностика играет решающую роль в успешном лечении распространенных заболеваний, в том числе и онкологических, и сердечно-сосудистых. Современные методы и аппаратура не способны обеспечить массовую профилактическую диагностику заболеваний на ранних стадиях их развития у большинства жителей нашей страны. В связи с этим, создание простых, недорогих, но эффективных диагностических методов остается актуальной проблемой современной науки. Разработка новых физических методов диагностики распространенных заболеваний зависит от понимания молекулярных механизмов, лежащих в основе данных заболеваний.

На протяжении десятка лет в нашей научной группе разрабатываются диагностические методики, основанные на светорассеянии [9, 11, 12, 129 – 132].

Преимущества данных методов очевидна: малые объемы проб, быстрота регистрации, простота подготовки образцов для исследования, высокая чувствительность.

Метод рассеяния лазерного излучения дает возможность определения массы рассеивающих частиц в водном растворе, параметров межмолекулярного взаимодействия, коэффициентов трансляционной диффузии и гидродинамических радиусов рассеивающих частиц. В результате оказывается, что все перечисленные выше параметры существенно изменяются в случае онкологических заболеваний по сравнению с контрольными образцами (сыворотка крови здоровых людей).

На *Рис.5.1* представлен корреляционный график зависимости коэффициента взаимодействия B от величины массы рассеивающих частиц в водных растворах нативной сыворотки крови здоровых людей и онкологических пациентов. Как можно видеть, наблюдается четкое пространственное разделение точек, относящихся к случаям онкобольных и здоровых людей. Результаты, соответствующие группе риска, локализуются вблизи линии, соответствующей $B \sim 0$.

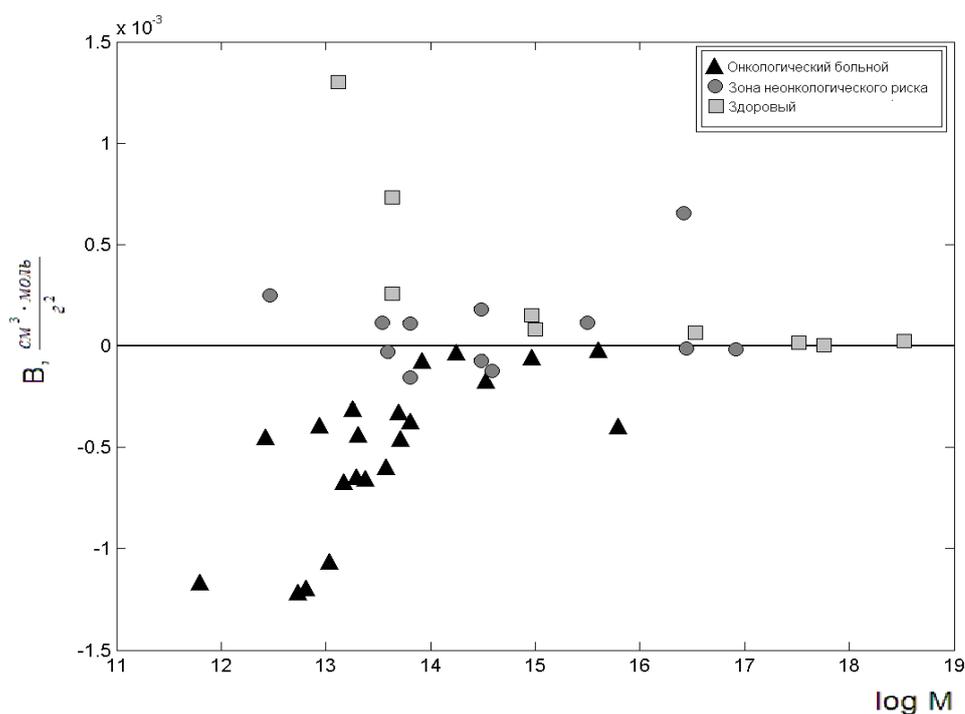


Рис.5.1. Корреляционный график зависимости коэффициента взаимодействия B от величины массы рассеивающих частиц в водных растворах сыворотки крови здоровых людей и онкологических пациентов.

Наиболее вероятно, что появление онкологического заболевания или предрасположенности к нему является результатом изменения поверхностного заряда на молекулах белков. С уменьшением заряда кулоновские силы отталкивания между молекулами белков слабеют, а силы притяжения между ними начинают превалировать. Это приводит к изменению величины и знака коэффициента взаимодействия и к образованию комплексов молекул, обладающих массой большей, чем у отдельных молекул белков. Этот вывод был подтвержден с помощью исследования модельных систем – растворов смесей

белков взятых в различных пропорциях. Были исследованы водные растворы некоторых белков при малых ионных силах и в широком диапазоне изменений pH . Исследования показали, что знак параметра B зависит от соотношения концентраций альбумина и γ -глобулина [131] (Рис.5.2). При увеличении содержания γ -глобулина в растворе по сравнению с альбумином концентрационные зависимости параметра рассеяния становятся отрицательными.

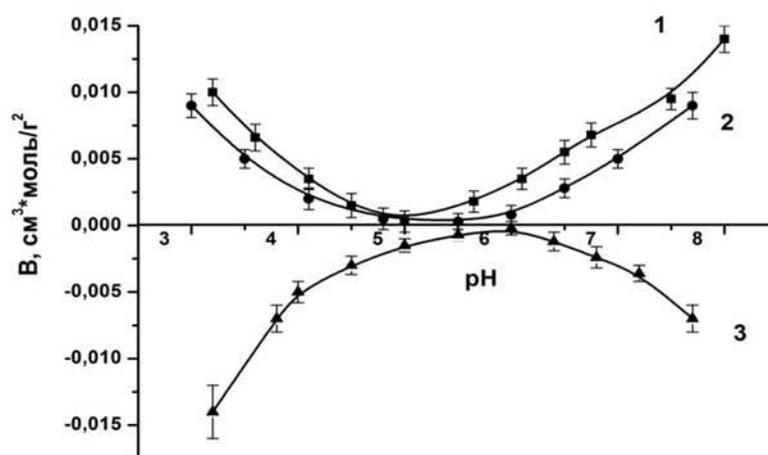


Рис.5.2. Зависимость второго вириального коэффициента B от pH : для модельного раствора сыворотки «здоровой» крови (кривая 1), для модельного раствора крови сыворотки «группы риска» (кривая 2), для модельного раствора сыворотки «больной» (кривая 3)

Отсутствие корреляций между такими параметрами, как масса рассеивающих частиц, коэффициент межмолекулярного взаимодействия и интенсивность рассеянного света позволяет использовать их как диагностические параметры. Очевидно, что наиболее значимым диагностическим параметром является коэффициент межмолекулярного взаимодействия – его знак и величина B .

Исследования динамических свойств заряженных макромолекул в водных растворах показывают, что динамические параметры рассеивающих частиц также существенно зависят от заряда на поверхности белка (1.46) и могут быть использованы для диагностики.

Методом динамического рассеяния света были получены зависимости коэффициентов трансляционной диффузии D_t рассеивающих частиц от значений pH и от концентрации белков в исследуемых растворах (см. п.5.1).

При увеличении концентрации белка коэффициент диффузии увеличивается (Рис.5.3). Такое anomальное увеличение коэффициента диффузии при увеличении концентрации объясняется на основе теории, предложенной Джеймсом и Эвансом $D_t = D_0(1 - \lambda_H c + \lambda_S c)$, где коэффициент λ_H , связанный с гидродинамическими потерями энергии, значительно меньше коэффициента, связанного с электростатическими потерями энергии.

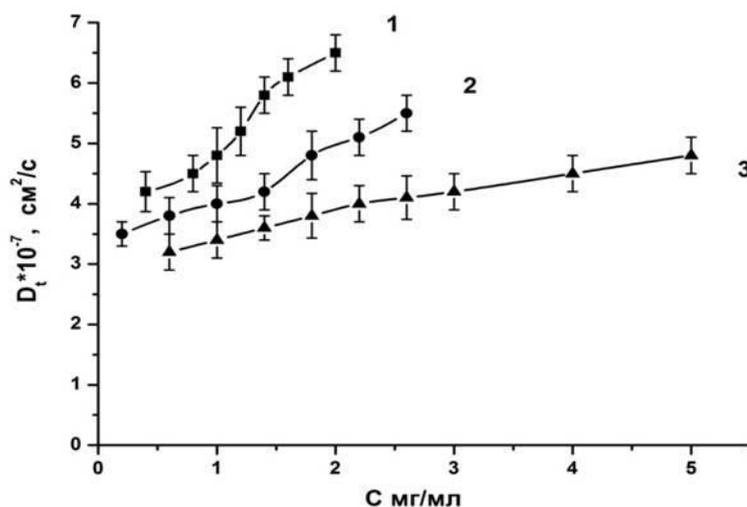


Рис.5.3. Зависимость коэффициента трансляционной диффузии D_t от суммарной концентрации белков при pH 7.0 для модельного раствора сыворотки «здоровой» крови (кривая 1), для модельного раствора сыворотки крови «группы риска» (кривая 2), для модельного раствора сыворотки «больной» крови (кривая 3).

Графики зависимостей $D_t(c)$ для модельных растворов имеют разный наклон. Это связано с тем, что наклон концентрационных зависимостей коэффициента трансляционной диффузии для модельного раствора сыворотки «здоровой» крови определяется наклоном зависимости $D_t(c)$ для водного раствора альбумина (в модельном растворе сыворотки «здоровой» крови преобладает альбумин). Наклон концентрационных зависимостей коэффициента трансляционной диффузии для модельного раствора сыворотки «больной» крови определяет гамма-глобулин.

По результатам проведенных экспериментов было установлено, что зависимости коэффициента трансляционной диффузии от поверхностного заряда макромолекул и концентрации раствора существенно различаются для модельных растворов сыворотки крови «здорового» и «больного» человека, в частности графики зависимости $D_t(pH)$ различаются положением минимума коэффициента трансляционной диффузии, а графики зависимости $D_t(c)$ – тангенсами угла наклона (Рис.5.4).

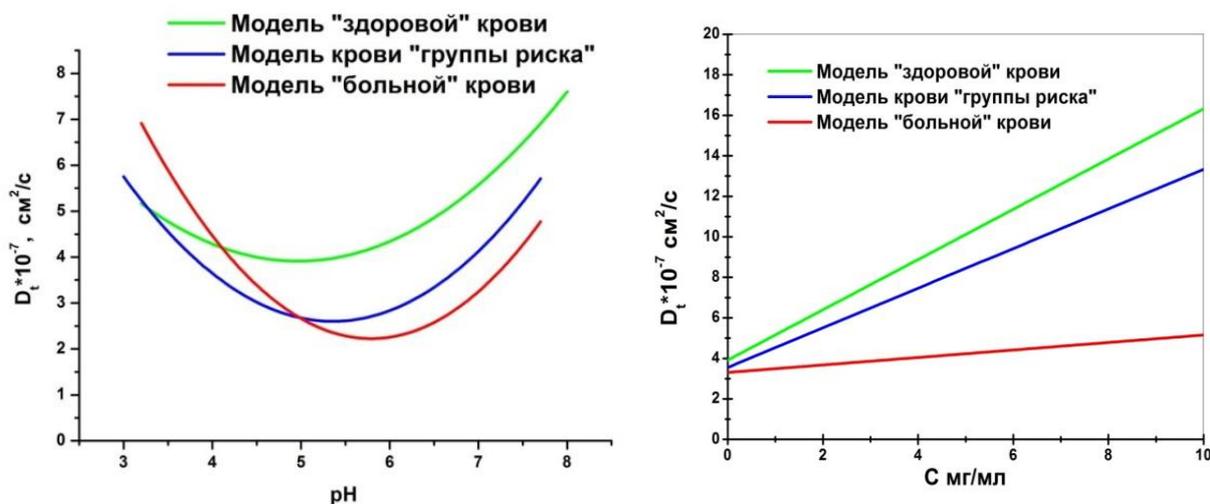


Рис.5.4. Сравнительный график зависимостей коэффициента трансляционной диффузии D_t от pH (слева) и от концентрации c (справа) для модельных растворов

Значения угловых коэффициентов для модельных растворов приведены в Таб.5.

Модельный раствор сыворотки крови	Значение углового коэффициента
«здоровой» крови	0,7-1,5
«группы риска»	0,3-0,9
«больной» крови	0,1-0,5

Таб.5. Диапазон изменения угловых коэффициентов для зависимостей $D_t(c)$ для модельных растворов

5.3 КРАТКИЕ ВЫВОДЫ ГЛАВЫ 5.

Изучение особенностей поведения коэффициента межмолекулярного взаимодействия и коэффициента трансляционной диффузии, а также сравнение экспериментальных данных с теориями Скетчарда и Джеймса-Эванса, показывают, что методы статического и динамического рассеяния света, применимы для исследования сыворотки крови, и могут рассматриваться как перспективные методы диагностики распространенных заболеваний, в том числе онкологических.

Особенности взаимодействия белков с тяжелыми металлами могут быть использованы для разработки оптических приборов, основанных на физических методах светорассеяния, с целью мониторинга загрязнения окружающей среды тяжелыми токсичными металлами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В диссертационной работе с помощью оптических методов проведено экспериментальное исследование молекулярно-динамических процессов, происходящих в водных растворах оптически анизотропных заряженных макромолекул белков и ферментов при воздействии различных факторов (температуры, pH , концентрации металлических ионов и т.д.). Выявлены механизмы и последствия процессов, приводящих к отравлению живых организмов ионами токсичных металлов. В работе также исследована и подтверждена возможность применения метода фотонно-корреляционной спектроскопии для исследования конформационных изменений ферментов при воздействии на них малых концентраций металлических ионов.

В качестве практического применения были исследованы модельные и нативные растворы сыворотки крови, и разработаны диагностические критерии для создания методов диагностики распространенных заболеваний.

Выводы:

1. Впервые обнаружено возникновение макромолекулярных дипольных кластеров в растворах таких ферментов как лизоцим и креатинкиназа, содержащих ионы металлов: калия, европия и свинца.
2. Поведение инкремента показателя преломления, связанного со средней электронной поляризуемостью молекулы лизоцима, при изменении ионной силы раствора позволяет говорить о возможности полной компенсации суммарного поверхностного заряда на ферменте.
3. Показано, что в водных растворах фермента лизоцима экстремумы pH зависимостей массы кластеров, коэффициентов взаимодействия рассеивающих частиц раствора в присутствии тяжелых ионов – калия, европия и свинца – находятся в области значений pH , близких к 3-3.5, что,

может быть объяснено особенностью распределения зарядов на поверхности молекул лизоцима в водных растворах, связанных с малыми размерами молекул данного фермента.

4. Показано, что коэффициент деполяризации и оптическая анизотропия лизоцима изменяются нелинейным образом с экстремумом при pH , близких к 3–3.5. Знак зависимостей с ростом ионной силы плавно переходит в противоположенный.
5. Методом динамического рассеяния света и с помощью методов электронной и зондовой микроскопии проведены исследования явления агрегации макромолекул в водных растворах основных белков сыворотки крови – альбумина и гамма-глобулина, содержащих ионы калия и европия, при изменении различных параметров среды, таких как концентрация макромолекул, водородный показатель раствора, концентрация солей. Показана обратимость процесса образования кластеров.
6. Показано, что размеры кластеров, полученные методами фотонно-корреляционной спектроскопии, совпадают с размерами этих же кластеров, полученных с помощью АСМ.
7. Впервые с помощью метода динамического рассеяния света экспериментально исследовано влияние температуры на структуру молекулярных агрегатов, формирующихся в водном растворе лизоцима, содержащем ионы металлов (Na и Ca). Показана возможность использования метода динамического рассеяния света для наблюдения структурных изменений молекул ферментов в водных растворах.
8. Впервые показано, что эффективные массы рассеивающих частиц, параметры межмолекулярного взаимодействия, коэффициенты трансляционной диффузии существенно изменяются в случае образцов нативной и модельной сыворотки крови, соответствующих онкологическим заболеваниям по сравнению с контрольными образцами (сыворотка крови здоровых людей и модельный раствор «здоровая кровь»).

9. Обнаружено отсутствие корреляции между такими параметрами, как масса частиц, коэффициент межмолекулярного взаимодействия, коэффициент трансляционной диффузии и интенсивность рассеянного света, поэтому их можно использовать как диагностические параметры, которые могут быть использованы для разработки методов диагностики и контроля эффективности лечения онкологических заболеваний.

Систематические исследования молекулярных механизмов патологических изменений в биологических объектах могут быть использованы для предотвращения отрицательных последствий антропогенной деятельности различного рода.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ДИССЕРТАЦИИ:

Статьи в журналах из списка ВАК:

1. Petrova G.P., Boiko A.V., Fedorova K.V., Sergeeva I.A., Sokol N.V., Tichonova T.N. *Optical Properties of Solutions Consisting of Albumin and g-Globulin Molecules in Different Ratio Modeling Blood Serum*. // Laser Physics. – 2009. – Vol.19, No. 6. – P. 1303-1307.
2. Petrova G.P., Boiko A.V., Rashkovich L.N., Fedorova K.V., Khlapov V.P. *Physical Methods for studying the effect of europium ions on lysozyme solutions*. // Laser Physics. – 2009. – Vol.19, No. 6. – P. 1308-1311.
3. Петрусевич Ю.М., Петрова Г.П., Берловская Е.Е., Макуренок А.М., Сергеева И.А., Федорова К.В. *Диагностика онкологических заболеваний методами ЯМР, ЭПР и светорассеяния*. // Мед.физика. – 2009 – № 4 (44) – С. 73–79.
4. Петрова Г.П., Петрусевич Ю.М., Гурова М.А., Сергеева И.А., Тихонова Т.Н., Федорова К.В., Чжан Сяoley. *Физический механизм токсического воздействия тяжелых металлов на белки и ферменты*. // Мед.физика. – 2010. – № 2 (46). – С. 101–104.
5. Тихонова Т.Н., Петрова Г.П., Петрусевич Ю.М., Федорова К.В., Кашин В.В. *Образование дипольных нанокластеров в растворах основных белков сыворотки крови, содержащих ионы европия и калия*. // Вестник МГУ, Сер.3 Физ. Астр. – 2011. – № 2. – С. 82-87.
6. Аненкова К.А., Сергеева И.А., Петрова Г.П., Федорова К.В., Осминкина Л.А., Тимошенко В.Ю. *Взаимодействия наночастиц кремния с молекулами бычьего сывороточного альбумином в водных растворах*. // Квантовая электроника. – 2011. – 41 (5). С. 393-395.
7. Гибизова В.В., Аненкова К.А., Масленникова А.Д., Федорова К.В., Сергеева И.А., Петрова Г.П. *Определение фундаментальных физических параметров белков сыворотки крови для развития методов диагностики злокачественных новообразований*. // Альманах клинической медицины. – 2016. – Т. 44, № 2. – С. 158–164.

Статьи в сборниках:

1. Петрова Г.П., Петрусевич Ю.М., Сергеева И.А., Сергеев С.Е., Федорова К.В., Тихонова Т.Н. *Механизм токсического воздействия тяжелых ионов и ионов калия на организм человека*. // Физические проблемы экологии (Экологическая физика) – 2010. – №16. – С. 230-236.
2. Федорова К.В., Тихонова Т.Н., Петрова Г.П., Петрусевич Ю.М., Папиш Е.А. *Воздействие ионов европия на ферменты – лизоцим и креатинкиназу - в водных растворах*. // Физические проблемы экологии (Экологическая физика) – 2011. – №17. – С. 469-474.
3. Petrova G.P., Ivanova M.S., Sergeeva I.A., Tichonova T.N., Fedorova K.V. *Diffusion processes in proteins and enzymes water solutions containing toxic heavy metals and visualization of appearing dipole nanostructures by atomic force microscopy (AFM)*. // Book of abstr. PSFVIP-8. – 2011. – Proc. 8PSFVIP-117.
4. Gibizova V.V., Zhang X., Sergeeva I.A., Petrova G.P., Fedorova K.V. *Photon-correlation spectroscopy in albumin water solutions containing gadolinium ions*. // Proceedings of the International Conference on Advanced Laser Technologies. – Bern: Bern Open Publishing – 2012. – № 1.

5. Гибизова В.В., Комарова А.В., Сергеева И.А., Федорова К.В., Петрова Г.П. *Interactions Between Biomarkers and Main Blood Proteins*. // WDS'13 Proceedings of Contributed Papers: Part III – Physics. – Prague: Matfyzpress, 2013. – P. 177-179
6. Тихонова Т.Н., Федорова К.В. *Отравление основных белков сыворотки крови ионами калия, изученное методами рассеяния света и АСМ*. // Сборник материалов Седьмого международного научного семинара и Пятой международной научной школы-семинара "Современные методы анализа дифракционных данных и актуальные проблемы рентгеновской оптики". – Великий Новгород: ЗАО "Новгородский технопарк" – 2015. С. 229-231
7. Тихонова Т.Н., Федорова К.В. *Взаимодействие фермента люциферазы с солями калия и европия*. // Сборник материалов Восьмого международного научного семинара и Шестой международной научной школы-семинара "Современные методы анализа дифракционных данных и актуальные проблемы рентгеновской оптики". – Великий Новгород: ЗАО "Новгородский технопарк" – 2015. С. 232-235.

Тезисы докладов:

1. Бойко А.В., Федорова К.В., Хлапов В.П. *«Изменение оптических характеристик белков сыворотки крови при онкологических заболеваниях»*. // Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых по фундаментальным наукам «Ломоносов-2006», Физический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова, Сборник тезисов, том 1, стр. 226. (доклад отмечен как лучший на подсекции).
2. Anna V. Boiko, Galina P. Petrova, Ksenya V. Fedorova, Vyacheslav P. Khlapov. *«Physical Methods for studying the effect of europium ions on lysozyme solutions»*. // International conference Advanced Laser Technologies ALT-08 (Siofok, Hungary), 13-18 Sep., 2008, Book of abstracts.
3. Федорова К.В. *«Взаимодействие молекул белка лизоцима с ионами металлов, обладающими различными ионными радиусами»*. // Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых по фундаментальным наукам «Ломоносов-2009», Физический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова, Сборник тезисов. 15 апреля 2009 г. (Доклад отмечен жюри как один из лучших на подсекции).
4. Sergeeva I.A., Ivanova M.S., Fedorova K.V., Petrova G.P., Petrusovich Yu.M.. *Dynamic light scattering studies of collagen solutions containing metal ions with different ionic radii*. // 17-th International conference ALT-09 (Antalia, Turkey), 26 Sept – 01 Oct., 2009, Book of abstracts.
5. Fedorova K.V., Sergeeva I.A., Petrova G.P., Petrusovich Yu.M. *Effect of the ions with different ionic radius on lysozyme in water solutions*. // 17-th International conference ALT-09 (Antalia, Turkey), 26 Sept – 01 Oct., 2009, Book of abstracts.
6. Петрова Г.П., Петрусевич Ю.М., Сергеева И.А., Тихонова Т.Н., Федорова К.В. *Образование дипольных нанокластеров в растворах белков и ферментов, содержащих малые концентрации токсичных тяжелых металлов*. // III Евразийский конгресс по медицинской физике и инженерии «Медицинская физика - 2010» 21-25 июня 2010 г. Сборник материалов. Том 1. стр. 326-327.
7. Петрова Г.П., Тихонова Т.Н., Федорова К.В., Кашин В.В. *Отравление белков и ферментов ионами калия, изученное методами рассеяния света и АСМ*. // III Евразийский конгресс по медицинской физике и инженерии «Медицинская физика - 2010» 21-25 июня 2010 г. Сборник материалов. Том 5. с. 120-122.

8. Petrova G.P., Petrusevich Yu.M., Fedorova K.V., Sergeeva I.A., Tichonova T.N., Xiaolei Z. *Physical Mechanism of "poisoning" the proteins and enzymes by heavy metals.* // International Conference on laser applications in life sciences LALS-2010 (Oulu, Finland) June 2010, Book of abstracts, p.140
9. Petrova G.P., Petrusevich Yu.M., Gurova M.A., Sergeeva I.A., Sergeev S.E., Tichonova T.N., Fedorova K.V., Xiaolei Z. *Mechanism of heavy metal ions toxic influence on proteins and enzymes studying by different laser optical methods.* // 18-th International conference Advanced Laser Technologies ALT-10 (Egmond ann Zee, The Netherlands), 11-16 Sept 2010, Book of abstracts, p.53
10. Fedorova K.V., Gurova M.A., Xiaolei Z., Petrova G.P., Petrusevich Yu.M.. *Static and dynamic light scattering in investigation of interaction charge macromolecules enzymes and some metals.* // 18-th International conference Advanced Laser Technologies ALT-10 (Egmond ann Zee, The Netherlands), 11-16 Sept 2010, Book of abstracts, p.160
11. Анненкова К. А., Гибизова В.В., Федорова К.В. *Исследование взаимодействия молекул альбумина с наночастицами золота и кремния в водных растворах с помощью метода фотонно-корреляционной спектроскопии.* // Конференция «Нанотехнологии в онкологии 2010», Москва, 30 октября 2010 г., Сборник тезисов докладов, стр. 83.
12. Анненкова К. А., Федорова К.В., Гибизова В.В. *Исследование взаимодействия молекул альбумина с наночастицами золота и кремния в водных растворах с помощью метода фотонно-корреляционной спектроскопии.* // Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых по фундаментальным наукам «Ломоносов-2010», Физический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова, Секция физика. Сборник тезисов. 15 апреля 2010 г. Т.1. стр 202. (Доклад отмечен жюри как один из лучших на подсекции).
13. Макуренков А.М., Петрова Г.П., Берловская Е.Е., Федорова К.В., Папиш Е.А. *Возможности оптических и радиоспектроскопических методов для диагностики онкологических заболеваний.* // Научная конференции "Ломоносовские чтения-2011" Секция физика. Ноябрь 2011 г. с 119-122.
14. Petrova G.P., Gurova M.A., Sergeeva I.A., Tichonova T.N., Fedorova K.V., Xiaolei Z. *Poisonous effect of low concentration of heavy metal ions on some enzymes in the solutions*// Book of Abstracts of 19th International Conference on Advanced Laser Technologies (ALT'11), Golden Sands, Bulgaria, 2011 с. 108
15. Fedorova K.V., Gurova M.A., Zhang Xiaolei, Petrova G.P. *Light scattering in investigation of interaction charge macromolecules enzymes and some metals.* // Book of Abstracts of 20th International Conference on Advanced Laser Technologies (ALT'12), Thun, Switzerland, 2012.
16. Petrova G.P., Makurenkov A.M., Sergeeva I.A., Tikhonova T.N., Fedorova K.V., Gibizova V.V. *Laser optical methods in investigations of toxic metal ions influence on proteins and enzymes* // Book of Abstracts of 20th International Conference on Advanced Laser Technologies (ALT'12), Thun, Switzerland, 2012, с. 281
17. Fedorova K.V., Gurova M.A., Zhang Xiaolei, Petrova G.P. *Light scattering in investigation of interaction charge macromolecules enzymes and some metals* // Book of abstracts of the 21th International Conference on Advanced Laser Technologies ALT'13, 2013, с. 25
18. Егоров П.Г., Аненкова К.А., Федорова К.В. *Структурные изменения креатинкиназы в водных растворах* // Сборник Тезисов Всероссийской школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Материалы и технологии XXI века", 11–12 декабря 2014, место издания Казань: Изд-во Казанского федерального университета, тезисы 2014, с. 231

19. Егоров П.Г., Аненкова К.А., Федорова К.В. *Особенности поведения креатинкиназы в водных растворах* // XXI Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных по фундаментальным наукам "Ломоносов-2014". Секция "Физика". Сборник тезисов, серия Секция "Физика", место издания Физический факультет МГУ Москва, тезисы, 2014, с. 110-111
20. Petrova G.P., Sergeeva I.A., Fedorova K.V. *Toxic influence of heavy metal ions on living organisms investigated by different laser optical methods* // Book of Abstracts of 22th International Conference on Advanced Laser Technologies (ALT'14), Cassis, France, тезисы, 2014, с. P 42
21. Prudyvus M.I., Fedorova K.V., Petrova G.P. *Behavior of aqueous lysozyme solution when it's heated* // Book of Abstracts of 22th International Conference on Advanced Laser Technologies (ALT'14), Cassis, France, тезисы, 2014, с. S2-P20-S2-P20
22. K.V. Fedorova, G.P. Petrova. *Electrostatic interaction in biopolymer water solutions investigated by Laser light scattering* // Book of abstracts of The International Conference on Coherent and Nonlinear Optics/ International Conference on Lasers, Applications and Technologies (ICONO/LAT'2016), место издания Минск, Беларусь, 2016;

ЛИТЕРАТУРА

1. Debye P. Light scattering in solutions. // *Journal Appl. Phys.* – 1944 – № 15. – P.338-349.
2. Петрова Г.П., Петрусевич Ю.М., Ширкова И.И., Ревокатов О.П. Взаимодействие сывороточного альбумина с водой при различных концентрациях водородных ионов по данным рэлеевского рассеяния // *Вестник МГУ, Сер. Физ. Астр.* – 1987. – Т.28, №2 – С.59-63.
3. Petrova G.P., Petrusevich Yu.M., Borisov B.A. Anisotropic Polarisability and Diffusion of Proteins in Water Solution Studied by Laser Light Scattering // *SPIE.* – 1990. – Vol.1403 – P.387-389.
4. Petrusevich Yu.M., Petrova G.P. Electrostatic Interaction in Biopolymer Solutions Investigated by NMR and Laser Light Scattering // *SPIE* – 1993. – Vol.1884. – P.70-76.
5. Petrova G.P., Petrusevich Yu.M. Anomalous Depolarization of Light Scattering in Charged Macromolecules Solutions // *Laser Applications in Life Sciences, LAIS-94, 5 International Conference, Minsk, Belarus* – 1994. – Program and Technical Digest, P1.38. – P.117.
6. Петрова Г.П., Петрусевич Ю.М. Электростатические взаимодействия в растворах биополимеров по данным рэлеевского рассеяния света // *Вестник МГУ, Сер. Физ. Астр.* – 1994. – Т.35, №3. – С.45-50.
7. Петрова Г.П. Молекулярная подвижность и межмолекулярные взаимодействия в оптически анизотропных жидких системах: дис. докт. физ.-мат. наук – М, 1999, 216 с.
8. Petrova G.P., Boiko A.V., Rashkovich L.N., Fedorova K.V., Khlapov V.P. Physical Methods for studying the effect of europium ions on lysozyme solutions // *Laser Physics* – 2009. – том 19, № 6. – P. 1308-1311.
9. Petrusevich Yu.M., Petrova G.P. The method of lights scattering measurement in tumor diagnostics // *SPIE* – 1996. – Vol.2728. – P.2-9.
10. Petrova G.P., Petrusevich Yu.M., Evseevicheva A.N. Scattering of laser radiation as a method for diagnosing of widespread diseases including oncology // *SPIE* – 1996. – Vol. 2965. – P.55-58.
11. Petrova G.P., Petrusevich Yu.M., Alexeev S.G., Ivanov A.V. The method of light scattering in the investigation of plasma blood proteins. // *LALS-96 Book of abstr.* – Jena. – 1996. – P.2-7.
12. Волькенштейн М.В. Молекулярная оптика. // М.Л.: ГИТТЛ, 1951. – 744 с.
13. Фабелинский И.Л. Молекулярное рассеяние света. // М.: Наука, 1965. – 511 с.
14. Эскин В.Е. Рассеяние света растворами полимеров. // М.: Наука, 1973. – 350 с.

15. Цветков В.Н., Эскин В.Е., Френкель С.Я. Структура макромолекул в растворах. //М.: Наука, 1964. – 720 с.
16. Левшин Л.В., Салецкий А.М. Оптические методы исследования молекулярных систем. // М.: Изд. Московского университета, 1994. – 320 с.
17. Вукс М.Ф. Электрические и оптические свойства молекул и конденсированных сред // Л.: Изд-во ЛГУ, 1984. – 334 с.
18. Cabannes J. La Diffusion Moleculaire de La Lumiere // Paris: Presses Universitaires, 1929.
19. Эйнштейн А. Собрание научных трудов // М.: Наука, 1966.
20. Дебай П. Избранные труды // Москва, 1987, С.363.
21. Дебай П. Определение молекулярного веса методом рассеяния света // Л.: Наука, 1987
22. Edsall J.T. et al. Light Scattering in Solutions of Serum Albumin: effects of charge and ionic strength // J. of American Chem. Soc. – 1950. – V.72. – P.4641.
23. Петрова Г. П. Оптические спектральные методы исследования жидкостей и растворов. Часть 2. Учебное пособие по спецкурсу кафедры молекулярной физики”// М: Физический факультет МГУ, 2009. –84 с.
24. Благодоров Л. А. Явления переноса в простых жидкостях. // М: Физический факультет МГУ, 2008. – 50 с.
25. Бриллиантов В. Н., Ревокатов О. П. Молекулярная динамика неупорядоченных сред. // М: Издательство МГУ, 1996. – 158 с.
26. Петрова Г.П., Петрусевич Ю.М. Сильные электростатические взаимодействия заряженных биополимеров в водных растворах. // Биомедицинская радиоэлектроника. – 2000. – №3 – С. 41-47.
27. Pecora R. Dynamic light scattering from macromolecules. // SPIE Proc. – 1984. – Vol.1884
28. Камминс Г.З., Пайк Е.Р. Спектроскопия оптического смещения и корреляция фотонов. // М.: Мир, 1978. 584 с.
29. Официальный сайт приборов «Malvern» // Официальный сайт приборов «Malvern» [Электронный ресурс] – <http://www.malvern.com/ru/>
30. Глинка Н.Л. Общая химия. 24-е изд. // Л.: Химия, 1985. – 702с.
31. Михеева Е.В., Пикула Н.П. Физическая и коллоидная химия: Учебное пособие для студентов ИГНД очного и заочного обучения. // Томск: Изд-во ТПУ, 2009. – 267 с.
32. Ленинджер А.Л. Основы биохимии, т.1, М.: Мир, 1985. – 369.
33. Ю собственная работа, CC0,<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=18204452>
34. Нейрат Г., Бейли К. Белки // М.Л.: Изд. ИЛ, 1958. – Т. 1-3.
35. Ленинджер А. “Биохимия” // Мир, 1987. – Т. 1-3.

36. Hurwitz J. The discovery of RNA Polymerase. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – Т.280, №52. – P. 42477-42485.
37. Тюкавина Н.А., Бауков Ю.А. Биоорганическая химия // М.: Дрофа, 2004. – 416 с.
38. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия // М.: Медицина, 1990. – 704 с.
39. Bonincontro A., Cinelli S., Onori G. Dielectric behavior of lysozyme and ferricytochrome-c in water/ethylene-glycol solutions // *Biophysical journal*. – 2004. – 86, № 2. P. 1118-1123.
40. Eppenberger, Hans M. I-Ia. A brief summary of the history of the detection of creatine kinase isoenzymes. // *Molecular and Cellular Biochemistry*. – 1994. v. 133/134, P. 9-11.
41. Teixeira Ana Maria, Borges Grasiely F. Creatine kinase: structure and function. // *Brazilian Journal of Biomotricity*. – 2012. – v. 6, n. 2. P. 53-65.
42. Под ред. Е.С. Северина Биохимия: Учеб. для вузов, 2003.
43. Большая Медицинская Энциклопедия (БМЭ), онлайн версия. 3-е издание, под редакцией Петровского Б.В. [Электронный ресурс] – <http://бмэ.орг>
44. Tanford Ch. Physical Chemistry of Macromolecules // Willey, NewYork, 1961.
45. Тенфорд Ч. Физическая химия полимеров // М.: Изд. Химия, 1965. – 772 с.
46. Мартин Р. Введение в биофизическую химию // М. Мир, 1966. – 429 с.
47. BierJ. Electrophoresis // N.Y., 1968.
48. Дэвид Р. Введение в биофизику// М.: Мир, 1982. – 207 с.
49. Steinhard J., Zaiser E.M. // *Adv. ProteinChem.*, V.10. P.152
50. Scatchard G.J., Batchelder A.C., Brown A. Osmotic equilibrium in solution of serum albumin and sodium chloride // *J. Am. Chem. Soc.* – 1946. – 68. – P.2315-2323.
51. Scatchard G. J. The attraction of protein for small molecules and ions // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 1949. – V.51. – P.2315.
52. Реми Г. Курс неорганической химии. // М.: ИЛ, 1963. – 922 с.
53. Популярная медицинская энциклопедия // М.: Советская энциклопедия, 1966. –1040 с.
54. Perrin D.D. Dissociation constants of inorganic acids and bases // London, Butterworths, 1969.
55. Petrova G.P., Petrusevich Yu.M. , Electrostatic interactions in biopolymer solutions studied by Rayleigh light scattering // *Mos. Univ. Phys. Bul.* – 1994.– 49. – P.41-46.
56. Petrova G.P., Petrusevich Yu.M. Anomalous Depolarization of Light Scattering in Dilute Solutions of Blood Proteins // *European Biomedical Optics Week BIOS EUROPE '95, Barcelona, Spain, 1995.* – N.2629-09,
57. Petrova G.P., Petrusevich Yu.M. Optical Parameters of Blood Serum Aqueous Solutions // *European Biomedical Optics Week BIOS EUROPE '95, Barcelona, Spain, 1995.* – N.2628-08,

58. Петрусевич Ю.М, Петрова Г.П. Сильные электростатические взаимодействия в растворах заряженных биополимеров // Всероссийский съезд биофизиков, Август 1999, Москва, Тезисы докладов. – Т.1. – С.71.
59. Тен Д.И. Процессы агрегации макромолекул белков в водных растворах, содержащих ионы тяжелых металлов: дис. канд. физ.-мат. наук – М, 2003, 100 с.
60. Сяолэй Ч., Петрова Г.П., Петрусевич Ю.М., Сергеева И.А. Исследование молекулярной подвижности макромолекул пепсина методом фотонной корреляционной спектроскопии. // Вестник МГУ, Сер. Физ. Астр. – 2012. – № 1. – С. 73–78.
61. Пат. 1578597 РФ Способ определения изоэлектрической точки белка / Петрова Г.П., Петрусевич Ю.М. А.с. 15.03.1990.
62. Петрова Г.П., Петрусевич Ю.М., Евсеевичева А.Н., Берловский О.А., Пашков А.Ю. Образование молекулярных комплексов – кластеров в водных растворах белков при взаимодействии с ионами тяжелых щелочных металлов // М.: Физический ф-т МГУ, Препринт. – 1997. – N.4. – С. 1- 10.
63. Petrova G.P., Petrusevich Yu.M., Evseevicheva A.N. Molecular Clusters in Water Protein Solutions in The Presence of Heavy Metal Ions. // General Physiology and Biophysics. – 1998. – V.17(2). – P. 97-104.
64. Petrusevich Yu.M., Petrova G.P., Evseevicheva A.N. Instability of proteins in the solution at the presence of toxic heavy metals // Ecology of Cities. Int. Conf. Proceedings. – 1998. – P.304-313.
65. Петрова Г.П., Петрусевич Ю.М., Евсеевичева А.Н. Роль тяжелых металлов в образовании белковых кластеров в водных растворах // Вестник МГУ, Сер. Физ. Астр. – 1998. – № 4. – С.71-76.
66. Сергеева И.А., Сокол Н.В., Иванова М.С., Петрова Г.П., Петрусевич Ю.М. Молекулярная подвижность частиц в растворах белков, содержащих ионы металлов с различными ионными радиусами // Вестник МГУ, Сер. Физ. Астр. – 2009. – № 4. – С. 85-88.
67. Петрова Г.П., Петрусевич Ю.М., Гурова М.А., Сергеева И.А., Тихонова Т.Н., Федорова К.В., Чжан С.. Физический механизм токсического воздействия тяжелых металлов на белки и ферменты. // Медицинская физика. – 2010. – № 2(46). – С. 101-104
68. Petrova G.P. and all. Environment monitoring. // edit. E.O. Ekundayo. Croatia: InTech, 2011. – 530 с.
69. Масленникова А.Д., Сергеева И.А., Петрова Г.П. Влияние ионов тяжелых металлов на молекулярно-динамические характеристики молекул коллагена в водных растворах. // Вестник МГУ, Сер. Физ. Астр. – 2013. – № 2. –С. 61-65.

70. Петрова Г.П., Петрусевич Ю.М., Евсеевичева А.Н. “Физические методы мониторинга токсических тяжелых металлов” // II Всероссийская научная конференция: Физические проблемы экологии, Москва, 1999, Тезисы докладов, Т.1
71. Saint-Blancard J., Clochard A., Cozzone P., Berthou J., Jolles P. The temperature-dependent structural transition of lysozyme. // North-Holland Biomedical Press, Elsevier, 1977.
72. Клёсов А.А. Ферментативный катализ. М.: Изд-во Московского Университета, 1980. – 263 с.
73. Cozzone P. J., Opella S. J., Jardetzky O., Berthou J., Jolles P. Detection of new temperature-dependent conformational transition in lysozyme by carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. // PNAS. – 1975. – vol. 72, № 5. – P. 2095-2098.
74. Kudou M., Shiraki K., Fujiwara S., Imanaka T., Takagi M. Prevention of thermal inactivation and aggregation of lysozyme by polyamines. // European journal on biochemistry. – 2003. – vol. 270. – P. 4547-4554.
75. Qianqian Wu, Hao Zhang, Tao Sun, Bin Zhang, Rutao Liu. Probing the toxic mechanism of Ag⁺ with lysozyme. // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2015. – 151. – P.124–130
76. Olivier Marcillat, Hortense Mazon, Christian Vial. Creatinekinase. // Nova, 2006.
77. Hoffman Gregg G. Octamer formation and stability in amitochondrial creatinekinase from aprotostomein vertebrate. // The Florida State University, College of arts and sciences, 2005.
78. Shnyder Thomas, Rojo Manuel, Furter Rolf, Wallimann Theo. The structure of mitochondrial creatinekinase and its membrane binding properties. // Molecular and Cellular Biochemistry. – 1994. – 133/134. – P. 115-123.
79. Eppenberger, Hans M. I-la. A brief summary of the history of the detection of creatinekinase isoenzymes. // Molecular and Cellular Biochemistry. – 1994. – v. 133/134. – P. 9-11.
80. Hofmeister F. Zur lehre der wirkung der salze. Zweite mittheilung. // Arch. Exp. Pathol. Pharmakol. – 1888. – 24. – P. 247 –260.
81. Kunz W. Specific ion effects in colloidal and biological systems // Curr Opin Colloid Interface Sci. – 2010. – V. 15. – P. 34-39.
82. Kunz W. Specific Ion Effects. // World Scientific Publishing, 2010. P. 325
83. Bostrom M., Tavares F.W., Finet S., Skouri-Panet F., Tardieu A., Ninham B.W. Why forces between proteins follow different Hofmeister series for pH above and below pI. // Biophysical Chemistry. – 2005. – 117. – P. 217-224.
84. Bostrom M., Williams D.R.M., Ninham B.W. Why the properties of proteins in salt solutions follow a Hofmeister series // Current Opinion in Colloid and Interface Science. – 2004. – 9. – P 48-52.

85. . Zavitsas A.A. Properties of water solutions of electrolytes and nonelectrolytes. // J. Phys. Chem. B. – 2001. – V. 105. – P. 7805–7817.
86. Hosoda H., Mori H., Sogoshi N. et al. Refractive indices of water and aqueous electrolyte solutions under high magnetic fields // J. Phys. Chem. A. – 2004. – V. 108. – P.1461-1464.
87. Schleich T., Von Hippel P. H. Specific ion effects on the solution conformation of poly-L-proline. // Biopolymers. – 1969. – V. 7. – P. 861-877.
88. Dos Santos A.P., Diehl A., Levin Y. Surface tensions, surface potentials, and the Hofmeister series of electrolyte solutions. // Langmuir. – 2010. – V. 26. – P. 10778-10783.
89. Kunz W. Specific ion effects in liquids, in biological systems, and at interfaces. // PureAppl. Chem. – 2006. – V. 78. – P. 1611-1617.
90. Neagu A., Neagu M., Der A. Fluctuations and the Hofmeister effect. // Biophysical Journal. – 2001. – V. 81. – P. 1285-1294.
91. Pedersen.O. // J. Phys. Chem. – 1958. – V. 62. – P. 1282-290.
92. Kalcher I., Horinek D., Netz R.R. et al. // J. Phys.: Condens. Matter. – 2009. – V. 21. – P.424108-424118.
93. Collins K.D. // Biophysical Journal. – 1997. – V. 72. – P. 65-76.
94. SalisA., CugiaF., ParsonsD.F. et al // Phys. Chem. Chem. Phys. – 2012. – V. 14. – P. 4343-4346.
95. Lai J.-Q., LiZ., Lu Y.-H. et al. //Green Chem. – 2011. – V.13. – P. 1860-1868.
96. Wilson W.W. Light scattering as a diagnostic for protein crystal growth – A practical approach // Journal of Structural Biology. – 2003. – 142. – P. 56-65.
97. Wessel Th., Ricka J. Micro-volume Dynamic Light Scattering and simultaneous Video Microscopic Observation for Screening of Protein Crystal Growth. // Biometrical Systems and Technologies. – 1998. – Vol. II. – P. 299-305.
98. Park Y.K., Diez-Silva M., Fu D., Popescu G., Choi W., Barman I., Suresh S., Feld M.S. Static and dynamic lightscattering of healthy and malaria-parasite invaded red blood cells. // Journal of Biomedical Optics. – 2010. – Vol. 15(2).
99. Rovati L. Photon correlation spectroscopy in ophthalmology // Advanced Photon Counting Techniques. – 2011. – Vol. V.
100. Ishii K., Nakamura S., Sato Y. High-sensitivity low-coherence dynamic light scattering and particle sizing for nanoparticles. // Optical Measurement Systems for Industrial Inspection. – 2011. – Vol. VII.
101. Software for Particle Size Distribution Analysis in Photon Correlation Spectroscopy // [Электронный ресурс] – <http://www.softscientific.com/science/WhitePapers/dynals1/dynals100.htm>

102. Краткий справочник физико-химических величин” // под ред. Мищенко К.П., Равделя А.А., Л., Химия, 1974. – 200 с.
103. Досон Р., Эллиот Д. и др. Справочник биохимика. // М.: Мир, 1991. – 544 с.
104. Суворов А.В., Никольский А.Б. “Общая химия” // М.: Высшая школа, 1995. – 624 с.
105. Лидин Р.А. “Справочник по общей и неорганической химии” // М.: Просвещение, 1997. – 256 с.
106. The periodic table by Webelements. // [Электронный ресурс] – <https://www.webelements.com>
107. Wieser M.E., Holden N., Coplen T.B., Böhlke J.K., Berglund M., Brand W.A., De Bièvre P., Gröning M., Loss R.D., Meija J., Hirata T., Prohaska T., Schoenberg R., O’Connor G., Walczyk T., Yoneda S., Zhu X.K.. Atomic weights of the elements 2011 (IUPAC Technical Report) // Pure and Applied Chemistry. – 2013. – Vol. 85, no. 5. – P. 1047-1078.
108. Эскин В.Е. Рассеяние света растворами полимеров и свойства макромолекул. // Л.: Наука, 1986. – 288 с.
109. Официальный сайт ООО Фотокор // [Электронный ресурс] – <http://www.photocor.ru>
110. Software for Particle Size Distribution Analysis in Photon Correlation Spectroscopy // [Электронный ресурс] – <http://www.photocor.ru/download/dynals/dynals-white-paper.htm>
111. Официальный сайт Интегра СПЕКТРА // [Электронный ресурс] – <http://www.ntmdt.ru>
112. Ландау Л.Д., Лившиц Е.М. Теория упругости. // М.: Наука, 1987. – 246 с.
113. Geiduschek E.P. // j. Polymer Sci. – 1954. – 13. – 408.
114. Alderton G., Ward W.H., Fevold H. L. Isolation of lysozyme from egg white. // J. Biol. Chem. –1945. – 157. – P.43.
115. Wetter L. R., Deutsch H. F. Immunological studies on egg white proteins IV. Immunochemical and physical studies of lysozyme. // J. Biol. Chem. – 1951. – 192. – P.237-242.
116. Клименков В., Широкая А., Авдей А. Анализ последовательности белка // [Электронный ресурс] – <http://vitalonic.narod.ru/biochem/index.html>
117. Rezwani Kuroschi, Meier Lorenz P., Gauckler Ludwig J. // A Prediction Method for the Isoelectric Point of Binary Protein Mixtures of Bovine Serum Albumin and Lysozyme Adsorbed on Colloidal Titania and Alumina Particles. // Langmuir. – 2005. –21. – P.3493-3497.
118. 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. – 32, № 10. – С.1-5.

119. Тихонова Т.Н., Петрова Г.П., Петрусевич Ю.М., Федорова К.В., Кашин В.В. Образование дипольных нанокластеров в растворах основных белков сыворотки крови, содержащих ионы европия и калия // Вестник МГУ, Сер. Физ. Астр. – 2011. – №2. – С.45-50.
120. Тихонова Т.Н., Федорова К.В. Отравление основных белков сыворотки крови ионами калия, изученное методами рассеяния света и АСМ. // Сборник материалов Седьмого международного научного семинара и Пятой международной научной школы-семинара "Современные методы анализа дифракционных данных и актуальные проблемы рентгеновской оптики". – 2015. – С. 229-231.
121. Тихонова Т.Н., Федорова К.В. Взаимодействие фермента люциферазы с солями калия и европия. // Сборник материалов Седьмого международного научного семинара и Пятой международной научной школы-семинара "Современные методы анализа дифракционных данных и актуальные проблемы рентгеновской оптики". – 2016. – С. 232-235.
122. Бойко А.В., Гаркуша Е.В., Петрова Г.П., Петрусевич Ю.М., Плешкова М.С., Рыжиков Б.Д., Сокол Н.В., Тен Д.И. Структурные фазовые переходы в растворах белков, содержащих ионы легких и тяжелых металлов. // М.: изд-во Московского Университета, 2005. 45 с.
123. Егоров П.Г., Аненкова К.А., Федорова К.В. Структурные изменения креатинкиназы в водных растворах // Сборник Тезисов Всероссийской школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Материалы и технологии XXI века", 11–12 декабря 2014, место издания Казань: Изд-во Казанского федерального университета, тезисы 2014, С. 231
124. Егоров П.Г., Аненкова К.А., Федорова К.В. Особенности поведения креатинкиназы в водных растворах // XXI Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных по фундаментальным наукам "Ломоносов-2014". Секция "Физика". Сборник тезисов, серия Секция "Физика", место издания Физический факультет МГУ Москва, тезисы, 2014, С. 110-111
125. Prudvius M.I., Fedorova K.V., Petrova G.P. Behavior of aqueous lysozyme solution when it's heated // Book of Abstracts of 22th International Conference on Advanced Laser Technologies (ALT'14), Cassis, France, book of abstracts, 2014, P. S2-P20-S2-P20
126. Кровь. // Большая медицинская энциклопедия. / гл. ред. Б. В. Петровский. – 3-е изд. – М.: Советская энциклопедия, 1980. – Т. 12.
127. Шмидт Р. Тевс Г. Физиология человека. // М.: Мир, 2005. – 314 с.
128. Марри Р., Греннер Д. и др. Биохимия человека. т.2. // М.: Мир, 1993, 384 с.

129. Гибизова В.В., Аненкова К.А., Масленникова А.Д., Федорова К.В., Сергеева И.А., Петрова Г.П. Определение фундаментальных физических параметров белков сыворотки крови для развития методов диагностики злокачественных новообразований. // Альманах клинической медицины. – 2016. – Т. 44, № 2. – С. 158-164.
130. Петрусевич Ю.М., Петрова Г.П., Берловская Е.Е., Макуренок А.М., Сергеева И.А., Федорова К.В. Диагностика онкологических заболеваний методами ЯМР, ЭПР и светорассеяния. // Мед. физика. – 2009. – № 4 (44). – С. 73-79.
131. Petrova G. P., Voiko A. V. and all. Optical properties of solution consisting of albumin and γ – globulin molecules in different ratio modeling blood serum. // Laser Physics. – 2009. – №6. – 1303-1307.
132. Патент № 2408280. Устройство для диагностики. Петрова Г.П., Петрусевич Ю.М., Сысоев Н.Н., Корнилова А.А., Ким Санг Ра, Иванов А.В., Певгов В.Г. – 2011.

БЛАГОДАРНОСТИ

В заключение автор выражает глубочайшую признательность научному руководителю профессору Галине Петровне Петровой за предоставление интересной темы и постоянное внимание к работе и безграничное терпение. Также автор выражает свою признательность сотрудникам кафедры радиохимии химического факультета МГУ за предоставленное оборудование.

Эта работа не была бы возможна без поддержки со стороны РФФИ (проекты №12-02-00434-а, 12-02-31333 мол_а, 16-32-00847 мол_а).

Автор также благодарен друзьям, коллегам и своей семье, которые поддерживали и направляли его на долгом пути написания этой диссертации.