

На правах рукописи

Федорова Ксения Вячеславовна

**ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МАКРОМОЛЕКУЛ БЕЛКОВ  
И ФЕРМЕНТОВ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ, СОДЕРЖАЩИХ  
МЕТАЛЛИЧЕСКИЕ ИОНЫ**

Специальность 01.04.05 – «Оптика»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата физико-математических наук

Москва – 2016

Работа выполнена на кафедре молекулярных процессов и экстремальных состояний вещества физического факультета Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Научный руководитель: доктор физико-математических наук, профессор  
**Петрова Галина Петровна.**

Официальные оппоненты: **Тучин Валерий Викторович**  
доктор физико-математических наук, профессор,  
Саратовский государственный университет имени  
Н.Г. Чернышевского, заведующий кафедрой оптики  
и биофотоники, г. Саратов;

**Юдин Игорь Кронидович**  
кандидат технических наук, Институт проблем нефти  
и газа РАН, ведущий научный сотрудник, г. Москва.

Ведущая организация: Физический институт имени П.Н. Лебедева РАН,  
г. Москва.

Защита диссертации состоится «01» марта 2017 года в 15 час. 00 мин. на заседании совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д 501.001.45 на базе Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991, Россия, Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 5 (19-й корпус НИИ ядерной физики имени Д.В. Скобельцына МГУ имени М.В.Ломоносова), аудитория 2-15.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова и на сайтах:

[http://istina.msu.ru/media/dissertations/dissertation/2ff/9c1/33923105/Dissertatsiya\\_Fedorovoj.pdf](http://istina.msu.ru/media/dissertations/dissertation/2ff/9c1/33923105/Dissertatsiya_Fedorovoj.pdf)

[http://www.sinp.msu.ru/ru/system/files/dissertations/dissertaciya\\_fedorovoy.pdf](http://www.sinp.msu.ru/ru/system/files/dissertations/dissertaciya_fedorovoy.pdf)

Автореферат разослан « 18 » января 2017 года.

Ученый секретарь  
диссертационного совета Д 501.001.45  
кандидат физико-математических наук

Вохник Ольга Михайловна

## Общая характеристика работы

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, 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. 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**

Влияние 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, посвященных исследованию белков и ферментов, согласно данным научной электронной библиотеки (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, электрофоретический метод 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  $Ca^{2+}$ .
- Метод динамического рассеяния света впервые был использован для изучения структурных изменений молекул ферментов (лизоцима и креатинкиназы) в водных растворах.

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

- Обнаружено отсутствие корреляций между такими параметрами, как масса, коэффициенты межмолекулярного взаимодействия, коэффициенты трансляционной диффузии в исследованных белковых растворах, что 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: ICONO/LAT'2016, "Современные методы анализа дифракционных данных и актуальные проблемы рентгеновской оптики 2016, 2015"; WDS'2015; ALT'2014, 2013, 2012, 2011, 2010, 2009; "Ломоносов-2014, 2010", "Материалы и технологии XXI века - 2014"; PSFVIP-2011; "Ломоносовские чтения 2011"; SFM'10;

"Медицинская физика–2010"; "Нанотехнологии в онкологии 2010"; LALS-2010.

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.

### **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.**

Во **введении** изложено обоснование актуальности темы диссертационной работы; научная новизна и практическая значимость; сформулированы цели и основные задачи исследования, а также сформулированы положения, выносимые на защиту.

**Первая глава** посвящена описанию методов исследований, использованных в работе. Приведены основные положения теории рассеяния света. Освещены основные представления о диффузионных процессах в растворах макромолекул. Приводятся описания методов статического и динамического рассеяния света. Рассматриваются основные положения теории двойного слоя и дзета-потенциала.

**Вторая глава** содержит общие сведения о химическом составе и строении белковых макромолекул, их физических свойствах. Описаны основные особенности строения ферментов – биологических катализаторов. Изложены основные положения теории Дебая-Хюккеля.

**Третья Глава** представляет собой обзор литературных данных, отражающий современные представления о трехкомпонентных растворах полиэлектролитов. Взаимодействие макроионов в растворе, содержащем сильный электролит, было рассмотрено в теории Скэтчарда. Парные взаимодействия в таких растворах описываются вторым вириальным коэффициентом, выражение для которого имеет вид:

$$B = \frac{V_1}{M_2^2} \left( \frac{Z^2}{4m_3} + \frac{\beta_{22}}{2} - \frac{\beta_{23}^2 m_3}{4+2\beta_{33} m_3} \right), \quad (1)$$

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

Представлен обзор литературы, посвященный исследованиям структурных изменений, происходящих в молекулах некоторых ферментов



(лизоцима и креатинкиназы) под воздействием температуры или металлических ионов.

**Глава 4** содержит описание объектов исследования и методику приготовления образцов. Дано описание экспериментальных установок - экспериментальной установки по определению коэффициента рассеяния и коэффициента деполяризации, фотонно-корреляционного спектрометра Photocor complex, прибора «Анализатор частиц и дзета-потенциала ZetasizerNano», а также атомно-силового микроскопа, использованного для наблюдения молекулярных кластеров, образующихся в растворах альбумина. Приведено подробное описание эксперимента, оценки погрешностей и оригинальные результаты исследования водных растворов белков, содержащих ионы металлов, обладающие большими ионными радиусами.

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.

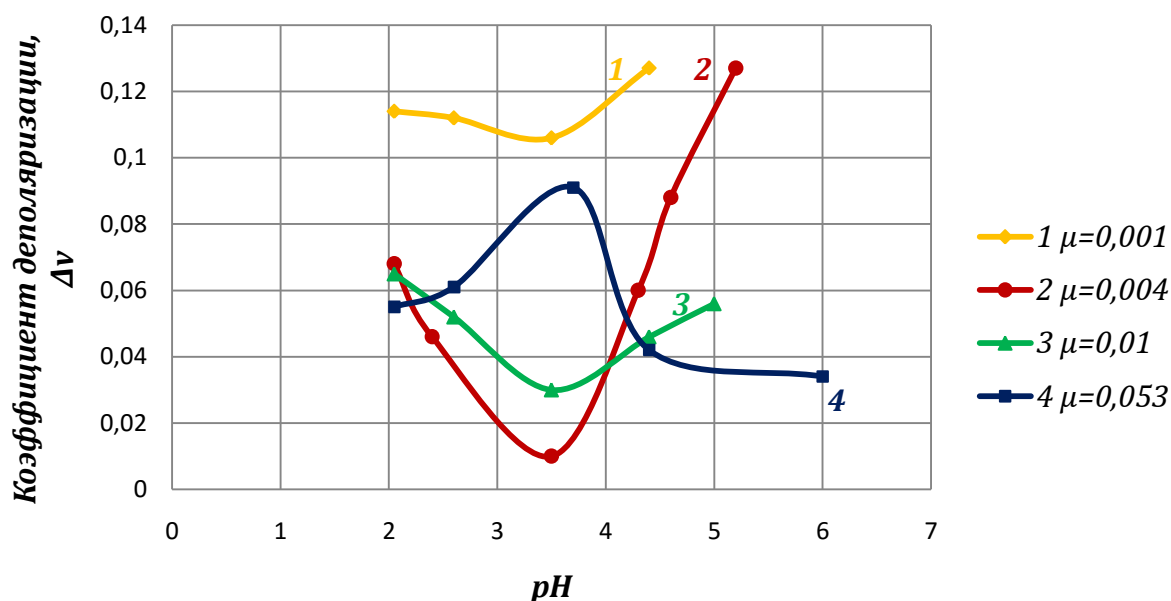


Рис.1. Зависимость коэффициента деполяризации  $\Delta_v$  от pH в водном растворе лизоцима при различных ионных силах  
1.  $\mu = 0,001$  моль/л 2.  $\mu = 0,004$  моль/л 3.  $\mu = 0,01$  моль/л 4.  $\mu = 0,053$  моль/л

В работе была определена зависимость (Рис.1) коэффициента деполяризации рассеянного света  $\Delta_v$  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 поляризации макромолекулы (изменением величины индуцированного дипольного момента при увеличении числа заряженных групп на полюсах макромолекулы).

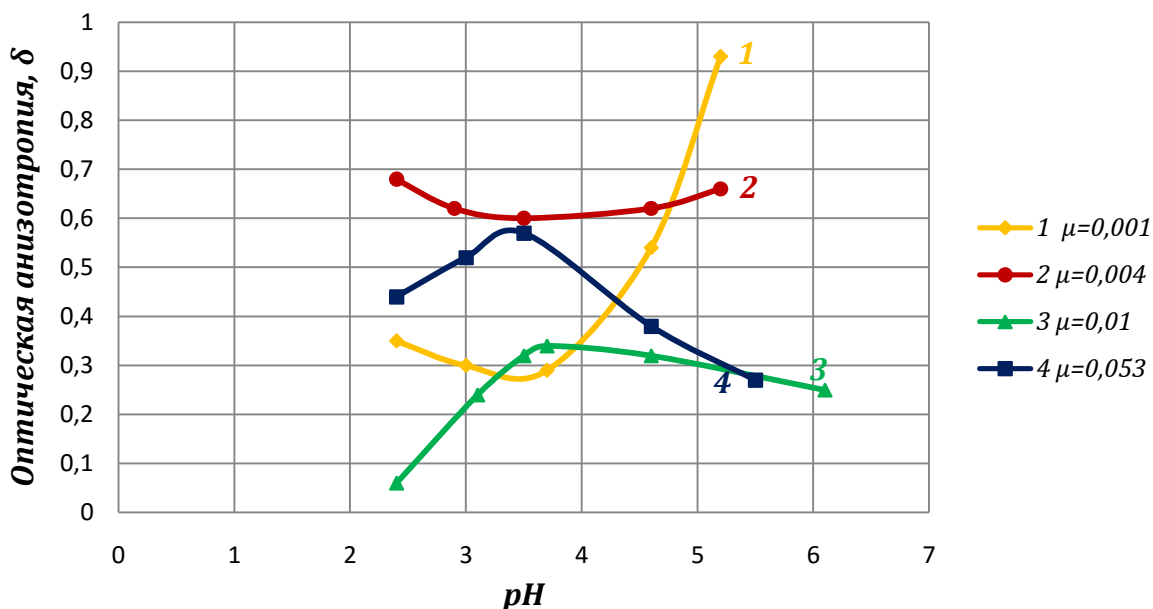


Рис.2. Зависимость оптической анизотропии макромолекул лизоцима в водных растворах:

1.  $\mu = 0,001$  моль/л 2.  $\mu = 0,004$  моль/л 3.  $\mu = 0,01$  моль/л 4.  $\mu = 0,053$  моль/л

На Рис.3 совмещены экспериментальные результаты для pH-зависимости коэффициента взаимодействия в водном растворе лизоцима.

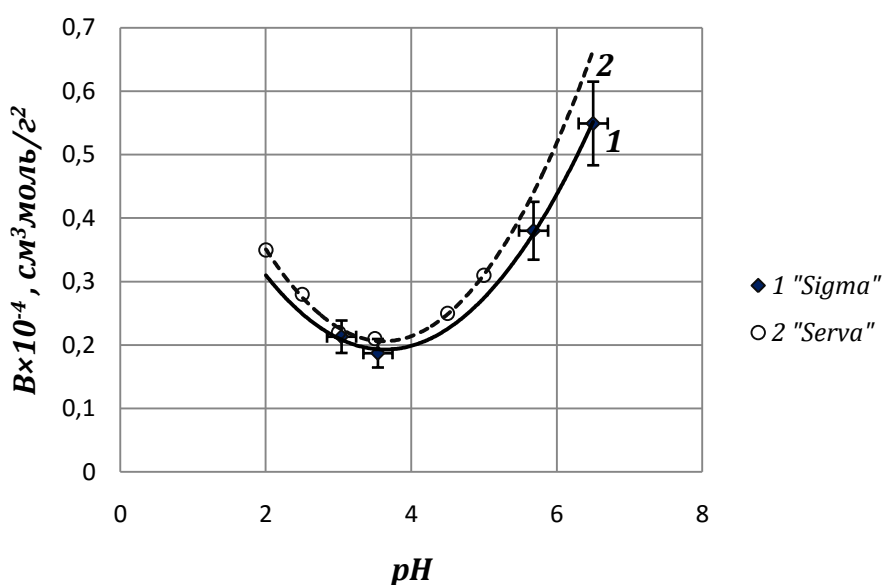


Рис.3. График зависимости второго вириального коэффициента  $B$  от параметра pH для чистых растворов лизоцима.

$pH$ -зависимость вириального коэффициента имеет параболический вид, с минимумом при  $pH$  3.5, что в соответствии с теорией Скэтчарда должно означать, что изоэлектрическая точка лизоцима лежит в кислой области:  $pI$  3.5.

В литературе известна работа, где изоэлектрическая точка ( $pI$ ) лизоцима, измеренная электрофоретическим методом находится в области  $pH \sim 10,5 - 11$ , однако также известно, что в области  $pH$  выше 9.5 лизоцим практически не растворяется в воде.

Поляризационные свойства белковых макромолекул зависят от ионной силы раствора и суммарного заряда на поверхности белковой глобулы существенно нелинейным образом. Для белка лизоцима зависимость параметра  $V(pH)$  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 (1). При этом коэффициент взаимодействия сохраняет нелинейную зависимость с экстремумом при  $pH \sim 3,5$ , что подтверждает ранее обнаруженные закономерности.

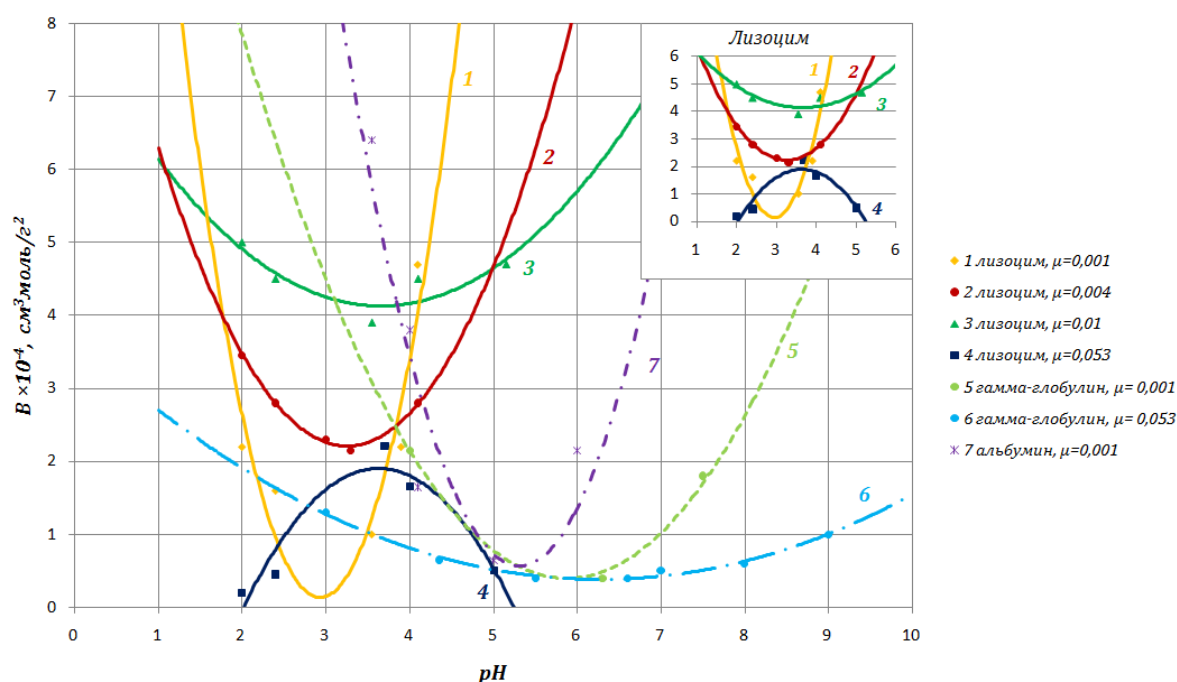


Рис.4 Зависимости второго вириального коэффициента  $V_{02}$  параметра  $pH$ , для водных растворов альбумина,  $\gamma$ -глобулина и лизоцима.

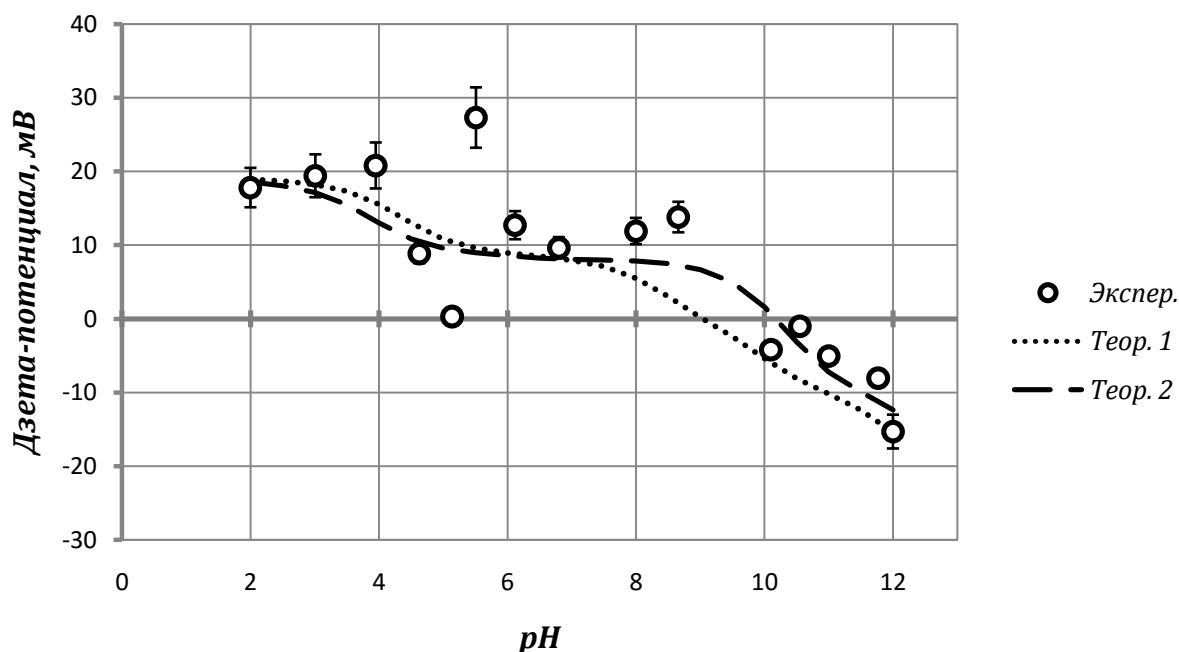
Очевидно, что коэффициент взаимодействия меняется с ростом суммарного заряда на белке по параболическому закону (эффект Доннана) с экстремумом в изоэлектрической точке. Параметр  $\beta_{22}$  обычно незначителен, а третий член в формуле Скэтчарда (1) может принимать достаточно большие значения, так 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.

На *Рис.5* приведены зависимости поверхностного заряда на белке лизоциме от водородного показателя среды  $pH$ , посчитанные с помощью специальных компьютерных программ, и одна – измеренная на установке *Malvern'sZetasizerNano*.

Согласно *Рис.5*, нулевой поверхностный заряд на белке достигается в окрестности  $pH$  10.5, то есть изоэлектрическая точка белка должна находиться в основной области, примерно, в точке 10.3.

Объяснить, почему наблюдается разброс в значениях  $pI$ , полученных различными методами, 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 на *Рис.5*).



*Рис.5.* Зависимости поверхностного заряда на белке лизоциме от водородного показателя среды  $pH$ , полученное с помощью расчетов и измеренные на *ZetasizerNano*.

Так же в работе был исследован процесс образования надмолекулярных соединений в растворах лизоцима, содержащих ионы калия и европия.

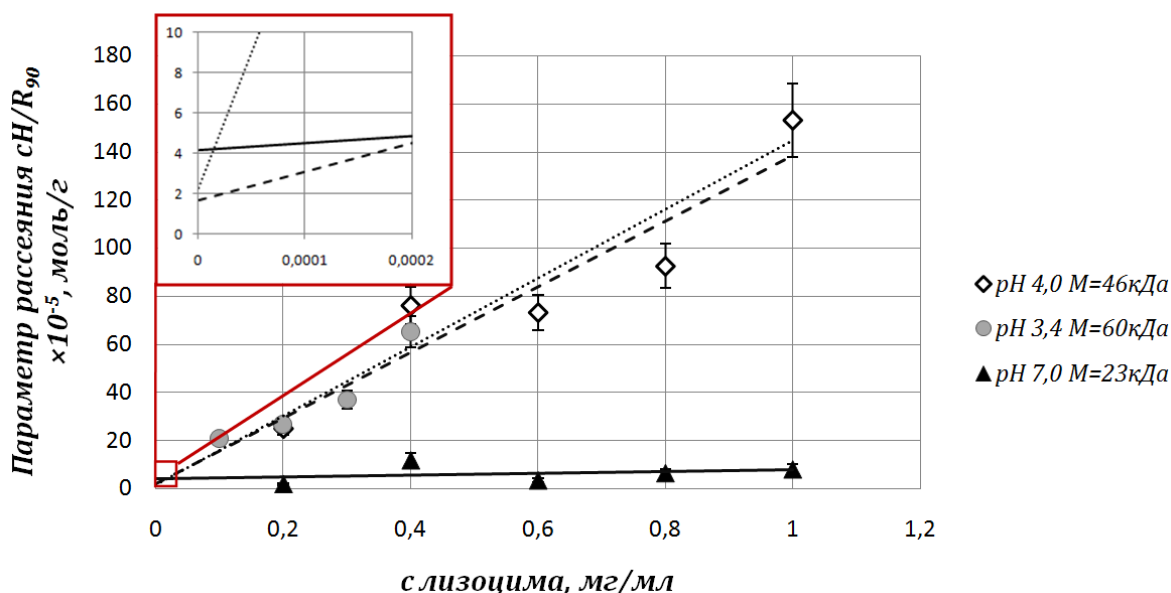


Рис.6. Концентрационные зависимости параметра рассеяния в растворах лизоцима, содержащих KCl.

- ◇ pH=3,4;  $\mu=0,01$  моль/л;  $M=60$  кДа;  $V=0,0143$  см<sup>3</sup> моль/г<sup>2</sup>.
- pH=4,0;  $\mu=0,01$ ; моль/л;  $M=46$  кДа;  $V=0,0140$  см<sup>3</sup> моль/г<sup>2</sup>.
- ▲ pH=7,0;  $\mu=0,01$ ; моль/л;  $M=23$  кДа;  $V=0,0035$  см<sup>3</sup> моль/г<sup>2</sup>.

На Рис.6 представлены концентрационные зависимости параметра рассеяния в водных растворах лизоцима, содержащих хлорид калия, 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.

В водных растворах лизоцима, содержащих хлорид калия, наблюдается увеличение массы рассеивающих частиц в 3-4 раза (причем максимум массы рассеивающих частиц наблюдается в точке pH 3.5), что может объясняться образованием дипольных структур – кластеров.

Рис.7 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 также позволяет делать вывод о том, изоэлектрическая точка лизоцима скорее ближе к pH 3.5 – 4.

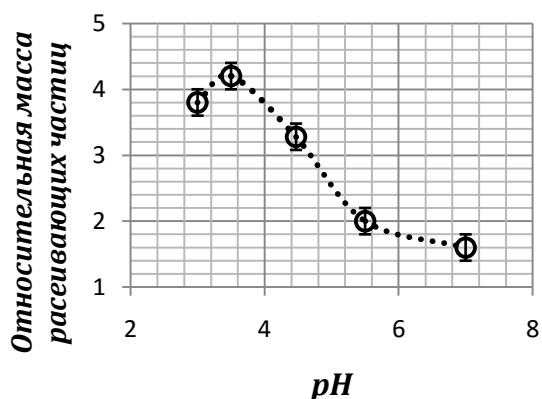


Рис.7. Зависимость приведенной массы  $M/M_0$  рассеивающих частиц в растворе лизоцима с добавлением соли KCl от  $pH$ .

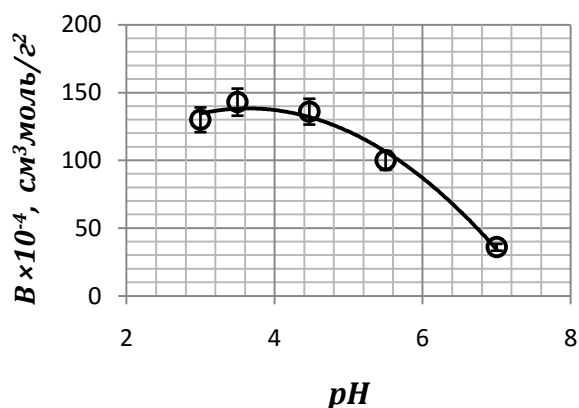


Рис.8. График зависимости второго вириального коэффициента  $B$  от параметра  $pH$  в растворе лизоцима, содержащего KCl

На Рис.8 изображен график зависимости коэффициента межмолекулярного взаимодействия от  $pH$ . Он имеет нелинейный характер с максимумом (в отличие от подобного графика для чистого лизоцима Рис.3) при  $pH$  3.5. Это повторяет результаты, полученные ранее в нашей лаборатории для других белков (альбумина и  $\gamma$ -глобулина).

Также были проведены исследования рассеивающих свойств растворов лизоцима, содержащих соль  $Eu(NO_3)_3$  методом Рэля – Дебая. На Рис.9 представлены концентрационные зависимости параметра рассеяния. Можно видеть, что зависимости линейны и экстраполяции этих зависимостей дают различные величины для  $1/M$  и второго вириального коэффициента.

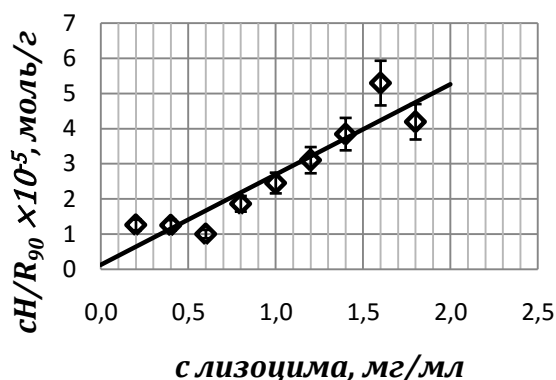
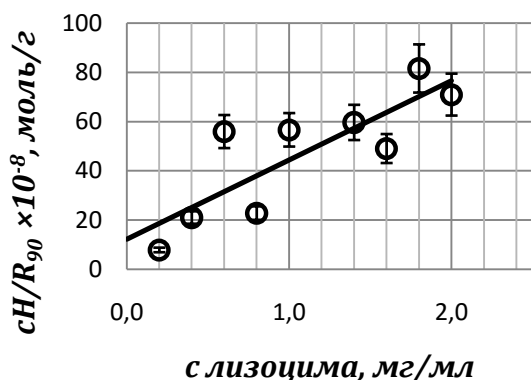


Рис.9. Концентрационные зависимости параметра рассеяния в растворе лизоцима, содержащего  $Eu(NO_3)_3$ .  
слева:  $pH$  7,0;  $\mu=0,01$  моль/л;  $M=88$  кДа; справа:  $pH$  3,4;  $\mu=0,01$  моль/л;  $M=612$  кДа;.

При добавлении ионов  $Eu^{3+}$  масса рассеивающих частиц в растворе значительно увеличивается. Максимум  $M/M_0(pH)$  (Рис.10) также лежит в области  $pH$  3.5. В отличие от предыдущего случая, здесь массы

рассеивающих частиц увеличиваются примерно на два порядка, по сравнению с молекулярной массой лизоцима.

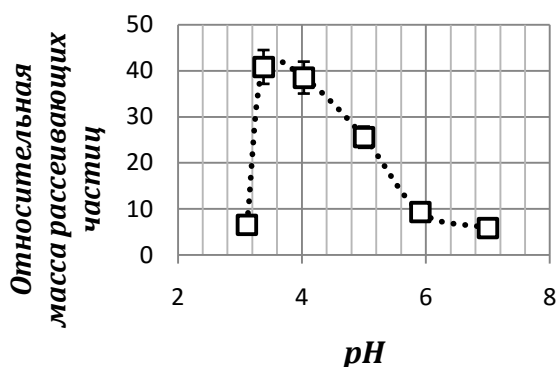


Рис.10. Зависимость приведенной массы  $M/M_0$  рассеивающих частиц в растворе лизоцима с добавлением соли  $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$  от pH.

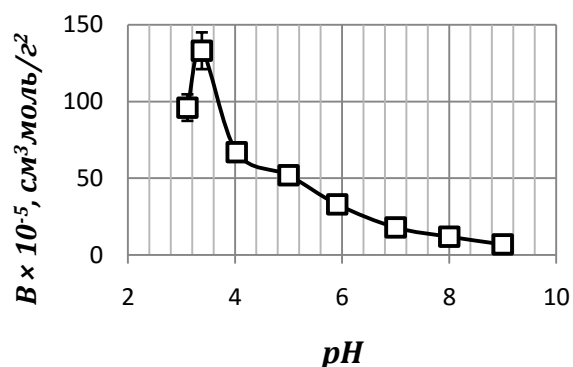


Рис.11. График зависимости второго вириального коэффициента  $B$  от параметра pH в растворе лизоцима, содержащего  $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$ .

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

pH-зависимость коэффициента межмолекулярного взаимодействия (Рис.11) для раствора лизоцима, содержащего ионы трехвалентного европия подобна аналогичной зависимости в случае добавления ионов калия, и имеет резкий максимум в точке  $\text{pH} \sim 3.5$ .

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. 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 с минимумами в окрестности изоэлектрических точек этих белков. При добавлении в белковые растворы гамма-глобулина и альбумина соли  $\text{KCl}$  (Рис.12). pH-зависимости коэффициентов трансляционной диффузии обоих белков (альбумина и  $\gamma$ -глобулина) имеют минимум вблизи их изоэлектрических точек. При увеличении ионной силы зависимости  $D_t$  от pH становились более пологими, значения коэффициентов трансляционной диффузии белков уменьшались, что свидетельствует об образовании нанокластеров белковых молекул.

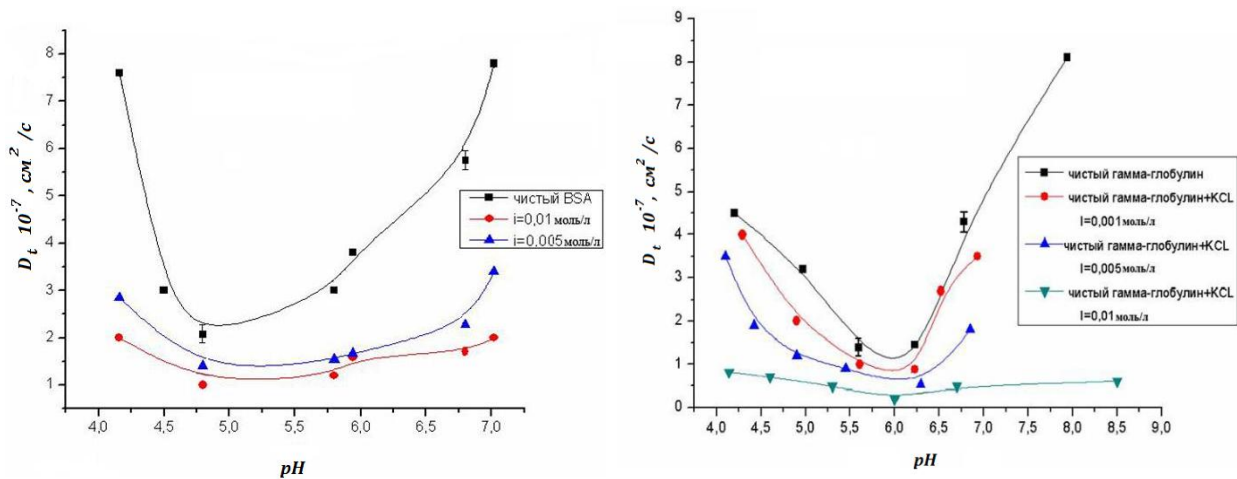


Рис.12. Зависимости коэффициентов трансляционной диффузии альбумина (слева) и гамма-глобулина (справа) от pH при добавлении KCl.

Размеры белковых нанокластеров, полученные с помощью АСМ, совпадают с размерами рассеивающих частиц, полученными с помощью метода фотонно-корреляционной спектроскопии (Рис.13 и 14).

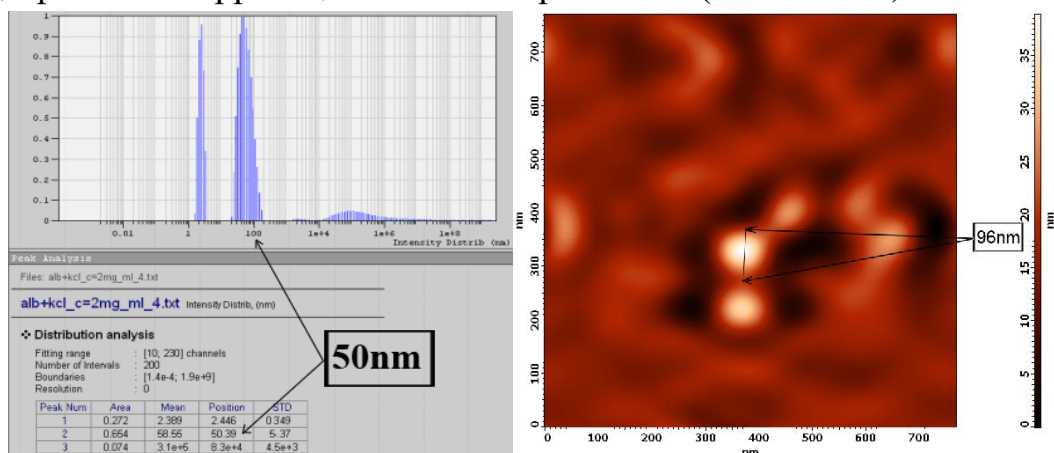


Рис.13. Радиус нанокластеров альбумина, детектируемый спектрографом при добавлении KCl и снимок АСМ.

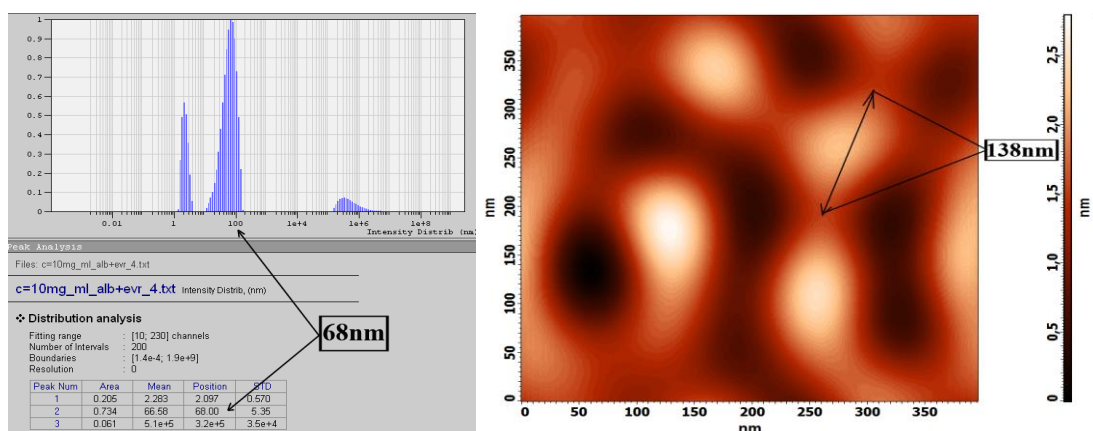


Рис.14. Радиус нанокластеров альбумина, детектируемый спектрографом при добавлении  $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$  и снимок АСМ.



Видно, что при взаимодействии альбумина с  $Eu(NO_3)_3$  частицы получились большего размера, чем при взаимодействии этого же белка с  $KCl$ . Это можно объяснить тем, что  $Eu^{3+}$  является трехвалентным элементом, а  $K^+$  – одновалентным, энергия связи европия больше, чем у калия и за счет этого большее число ионов соли  $Eu(NO_3)_3$  абсорбируется на альбумине, чем ионов соли  $KCl$ .

Методом динамического рассеяния света определялась молекулярная подвижность лизоцима в водных растворах при различных температурах. Для измерений выбирался "жизненный" диапазон температур - от 20 до 40 °С, т.е. температура, при которой лизоцим в норме должен находиться внутри живого организма.

Эксперименты проводились, как в чистом растворе (Рис.15) так и с использованием стабилизирующих добавок (ионов  $Ca^{2+}$  (Рис.17) и  $Na^+$  (Рис.16)) с ионной силой 0,05 моль/л. Согласно литературным источникам, в интервале температур от 20 до 30°C происходит перестройка активного центра лизоцима, что, влияет на размер молекулы.

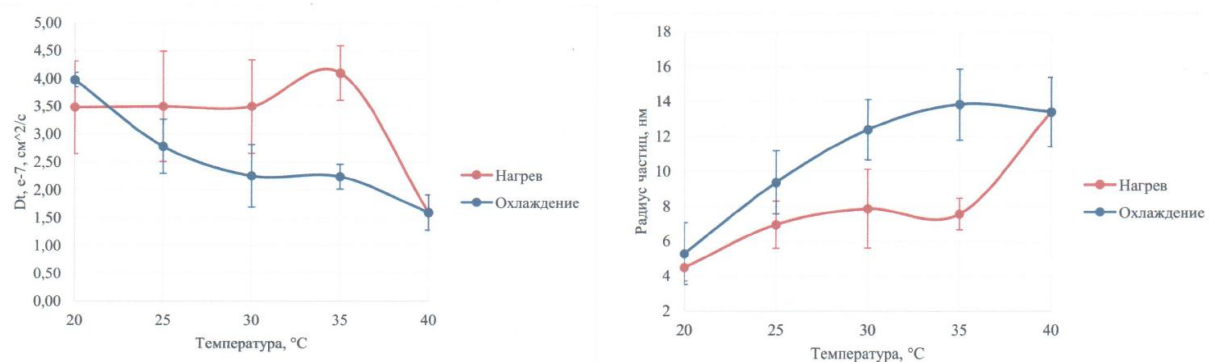


Рис.15 Графики зависимости коэффициента трансляционной диффузии (слева) и радиуса рассеивающих частиц (справа) от температуры для чистого водного раствора лизоцима.

Как можно видеть (Рис.15), коэффициент трансляционной диффузии и радиус рассеивающих частиц зависят от температуры среды нелинейным образом. При температуре около 30°C для температурной зависимости размеров частиц наблюдается максимум, а для зависимости коэффициента трансляционной диффузии при этой температуре находится точка перегиба. Данную особенность графика можно объяснить перестройкой активного центра лизоцима. 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.

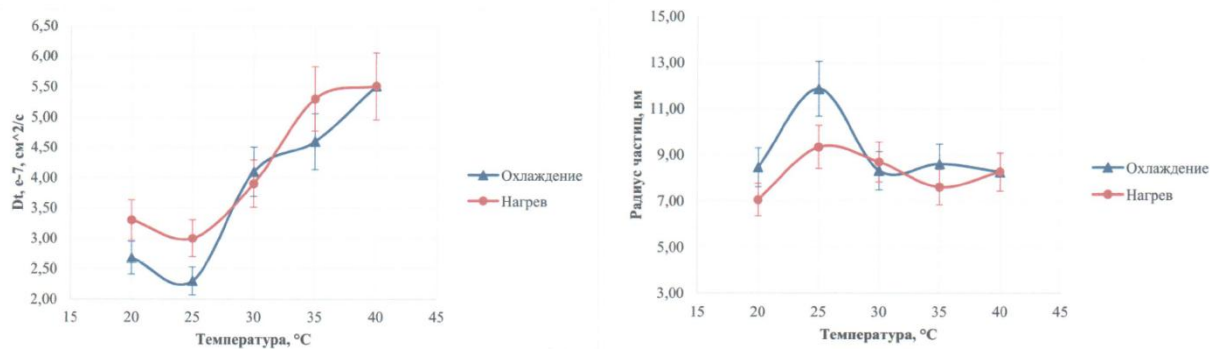


Рис.16. Графики зависимости коэффициента трансляционной диффузии (слева) и радиуса рассеивающих частиц (справа) от температуры для раствора лизоцима в присутствии  $\text{NaCl}$

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

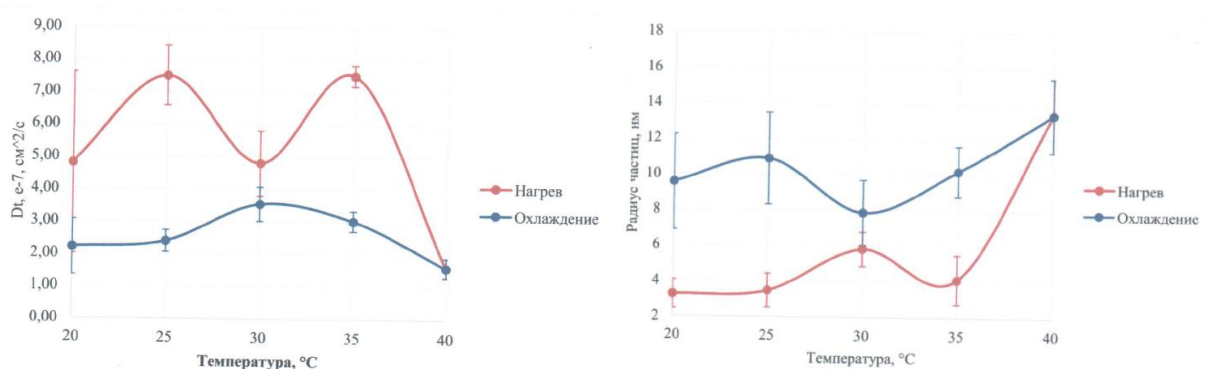
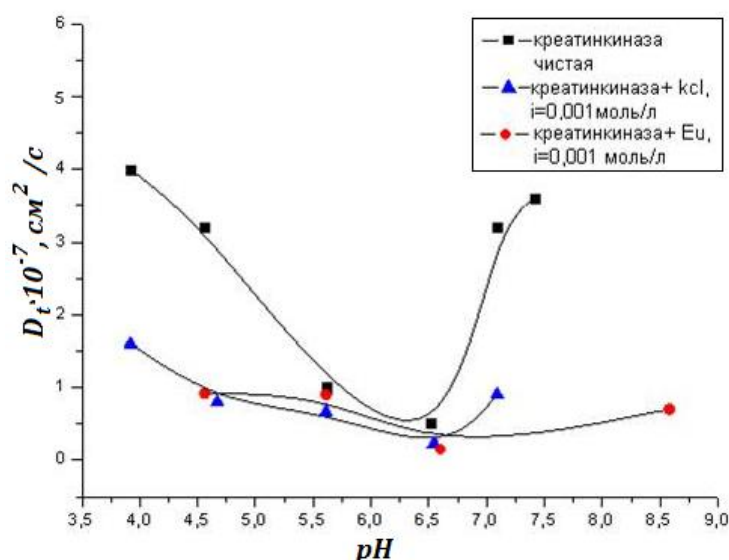


Рис.17. Графики зависимости коэффициента трансляционной диффузии (справа) и радиуса рассеивающих частиц (слева) от температуры для раствора лизоцима в присутствии  $\text{CaCl}_2$

При добавлении в раствор соли  $\text{CaCl}_2$  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, а 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.

Структурные изменения под воздействием металлических ионов также наблюдались в водных растворах креатинкиназы. 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  $pH$  с минимумом в окрестности  $pH$  6.0 – 6.3 (в окрестности изоэлектрической точки креатинкиназы). При добавлении в раствор фермента солей калия и европия (*Рис.18*). Зависимости  $D_t(pH)$  становятся более пологими, без выраженного минимума.



*Рис.18. Зависимость коэффициента трансляционной диффузии  $D_t$  креатинкиназы от показателя  $pH$*

Концентрационная зависимость коэффициента трансляционной диффузии в чистом водном растворе креатинкиназы изображена на *Рис.19 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, что происходит изменение структуры макромолекулы креатинкиназы, которое вызвано образованием димеров и октамеров из мономера молекулы креатинкиназы.

При добавлении в водный раствор креатинкиназы хлорида натрия с ионной силой 0,1 моль/л была получена аналогичная зависимость (*Рис.19 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.

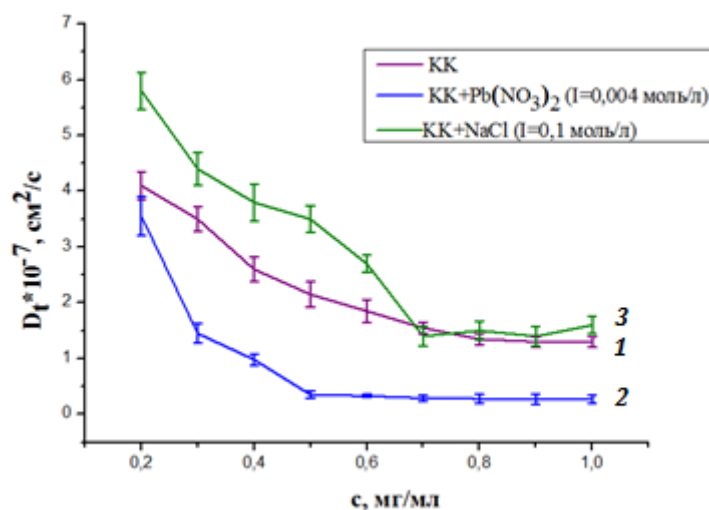


Рис.19. Концентрационная зависимость коэффициента трансляционной диффузии.

Переходные концентрации в чистом 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 (Рис19 кривая 2), можно также 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.

**Глава 5 (приложение)** посвящена использованию методов статического и динамического светорассеяния для диагностики онкологических заболеваний. Дается краткое описание такой сложной внутренней среды организма, как кровь. Приводится методика приготовления модельных растворов сыворотки крови, основанная на результатах биохимических исследований крови здоровых людей и онкобольных.

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

На Рис.20. 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  $B \sim 0$ .

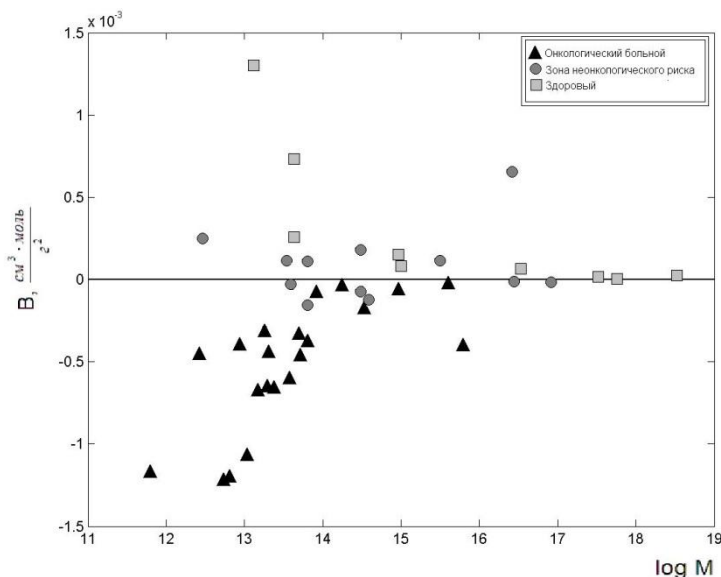


Рис.20. Корреляционный график зависимости коэффициента взаимодействия  $B$  от величины массы рассеивающих частиц в водных растворах сыворотки крови здоровых людей и онкологических пациентов.

При увеличении концентрации белка коэффициент диффузии увеличивается (Рис.21).

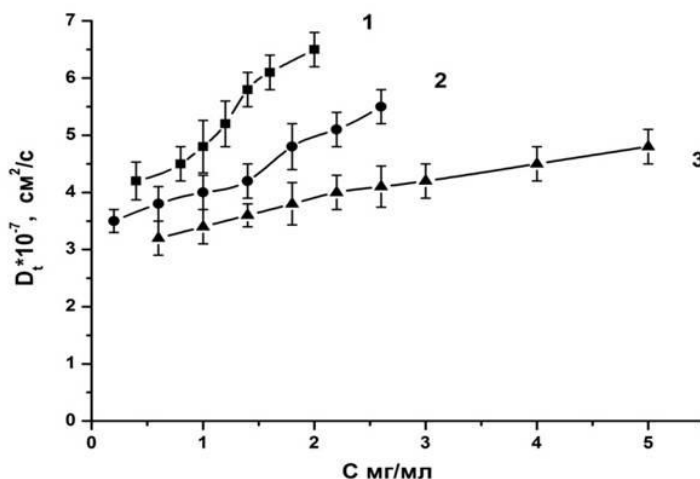


Рис.21. Зависимость коэффициента трансляционной диффузии  $D_t$  от суммарной концентрации белков при рН 7.0 для модельного раствора сыворотки «здоровой» крови (кривая 1), для модельного раствора сыворотки крови «группы риска» (кривая 2), для модельного раствора сыворотки «больной» крови (кривая 3).

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  $\lambda_H$ ,

связанный с гидродинамическими потерями энергии, значительно меньше коэффициента, связанного с электростатическими потерями энергии.

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.22).

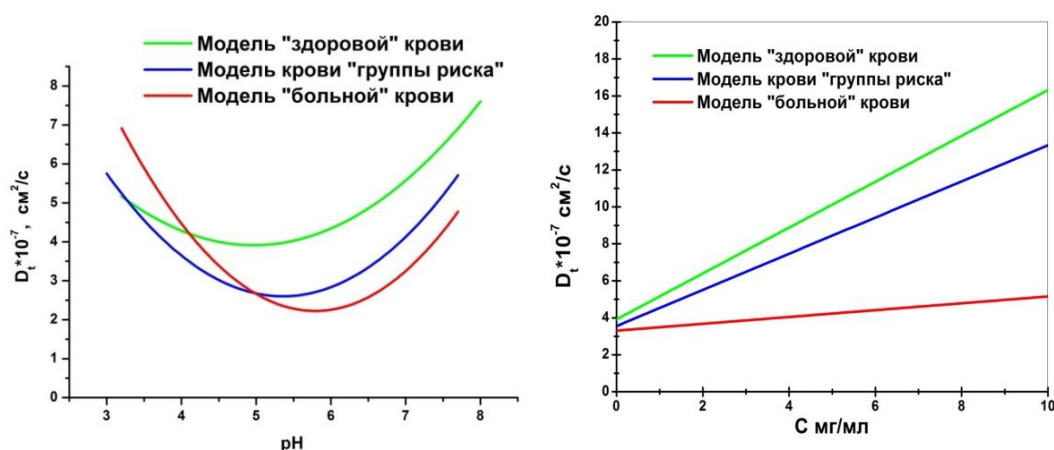


Рис.22. Сравнительный график зависимостей коэффициента трансляционной диффузии  $D_t$  от  $pH$  (слева) и от концентрации  $c$  (справа) для модельных растворов.

В заключении приведены основные результаты и сформулированы выводы диссертационной работы.

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 металлических ионов с большими ионными радиусами – калия, европия – 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.
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  $Ca^{2+}$ ). 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 группе онкологического риска 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, 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. Voiko, 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., Petrushevich 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., Petrushevich 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., Petrushevich 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., Petrushevich 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., Petrushevich 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. Аненкова 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. Аненкова 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. Макуренок 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 2011г. 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;

Подписано к печати 21.12.2016 г.  
Тираж 100 экз. Заказ № 187  
Отпечатано в отделе оперативной печати  
Физического факультета МГУ