

"УТВЕРЖДАЮ"

Заместитель декана физического факультета

МГУ имени М.В. Ломоносова



*Л.А. Федянин*

Профессор Л.А. Федянин

" 18 октября 2016 г.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Физического факультета федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова" о диссертационной работе "Оптические свойства макромолекул белков и ферментов в водных растворах, содержащих металлические ионы"

Диссертация "Оптические свойства макромолекул белков и ферментов в водных растворах, содержащих металлические ионы" выполнена на кафедре молекулярных процессов и экстремальных состояний вещества физического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова. В период подготовки диссертации соискатель Федорова Ксения Вячеславовна была сотрудником кафедры молекулярных процессов и экстремальных состояний вещества. С 2014 по 2016 год для сдачи экзаменов кандидатского минимума была прикреплена в качестве соискателя.

Федорова К.В. окончила физический факультет федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова" в 2009 году по специальности "Физика". Справка о сдаче кандидатских экзаменов выдана в 2016 году федеральным государственным бюджетным образовательным учреждением высшего образования "Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова". Научный руководитель - д.ф.-м.н., профессор кафедры молекулярных процессов и экстремальных состояний вещества физического факультета федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова" Петрова Галина Петровна.

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

Диссертационная работа Федоровой К.В. выполнена на кафедре молекулярных процессов и экстремальных состояний вещества физического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова и посвящена исследованию оптических свойств макромолекул белков и ферментов (альбумина, гамма-глобулина, лизоцима и креатинкиназы) в водных растворах, как чистых, так и содержащих ионы металлов, с различными ионными радиусами, в том числе и токсичных тяжелых металлов.

Целью данной работы являлось 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. В задачу исследования входило определение оптических параметров дипольных кластеров, образующихся при изменении концентрации составляющих компонентов растворов, величин поверхностного заряда макромолекул, ионной силы и температуры растворов, а также особенностей межмолекулярных взаимодействий.

**Актуальность** работы обусловлена высоким интересом к изучению оптических характеристик водных растворов белков и ферментов. В условиях современной жизни особенно интересным представляется изучение влияния на биологические системы (к которым относятся живые организмы) различных отрицательных внешних факторов, среди которых особое внимание следует уделить токсическому 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, что неизбежно отражается на оптических свойствах этих сред.

**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 разработке способов контроля качества органических жидкостей и физических методов диагностики распространенных заболеваний, в том числе онкологических, а также для создания диагностических приборов.

#### **Основные новые результаты диссертационной работы:**

Впервые обнаружено возникновение макромолекулярных дипольных кластеров в растворах таких ферментов как лизоцим и креатинкиназа, содержащих ионы металлов: калия, европия и свинца.

Показано, что в водных растворах лизоцима  $pH$ -зависимости массы кластеров, возникающих в присутствии тяжелых ионов - калия, европия и свинца, а также коэффициентов взаимодействия рассеивающих частиц раствора в присутствии этих ионов имеют экстремумы в области значений  $pH$ , близких к 3-3.5. Этот результат может быть объяснен особенностью распределения зарядов на поверхности молекул лизоцима в водных растворах, связанных с малыми размерами молекул данного фермента. Поведение инкремента показателя преломления, определяемого средней электронной поляризуемостью

молекулы лизоцима, при изменении ионной силы раствора позволяет говорить о возможности полной компенсации суммарного поверхностного заряда на ферменте.

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 размеры кластеров, полученные методами фотонно-корреляционной спектроскопии, совпадают с размерами этих же кластеров, полученных с помощью АСМ.

Впервые экспериментально исследовано влияние температуры на структуру молекулярных агрегатов, формирующихся в белковом растворе, содержащем ионы металлов.

Показана возможность использования метода динамического рассеяния света для наблюдения структурных изменений молекул ферментов в водных растворах.

Впервые показано, что эффективные массы рассеивающих частиц, параметры межмолекулярного взаимодействия, коэффициенты трансляционной диффузии существенно изменяются в случае образцов нативной и модельной сыворотки, соответствующих онкологическим заболеваниям по сравнению с контрольными образцами (сыворотка крови здоровых людей и модельный раствор «здоровая кровь»).

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.

На основании проведенных экспериментов могут быть разработаны методы диагностики и контроля эффективности лечения онкологических заболеваний.

**Личный вклад автора.** 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 двадцати международных конференциях в виде устных и стендовых докладов. Результаты, представленные в диссертационной работе, являются уникальными и получены впервые.

**Апробация работы.** 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. Международная школа для студентов и молодых ученых по оптике, лазерной физике и биофизике Saratov Fall Meeting (SFM'10) (Саратов, Россия, 2016);

3. Восьмой международный научный семинар и Шестая международная научная школа-семинар "Современные методы анализа дифракционных данных и актуальные проблемы рентгеновской оптики" (Великий Новгород, Россия, 2016);
4. Седьмой международный научный семинар и Пятая международная научная школа-семинар "Современные методы анализа дифракционных данных и актуальные проблемы рентгеновской оптики" (Великий Новгород, Россия, 2015);
5. 24<sup>th</sup> Annual Student Conference Week of Doctoral Students 2015 (Прага, Чехия, 2015);
6. 22<sup>nd</sup> International Conference on Advanced Laser Technologies (ALT'14), (Кассис, Франция, 2014);
7. XXI Международной научной конференции «Ломоносов-2014» (Москва, Россия, 2014);
8. Всероссийская школа-конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Материалы и технологии XXI века", (Казань, Россия, 2014);
9. 21<sup>st</sup> International conference on Advanced Laser Technologies (ALT'13) (Будва, Черногория, 2013);
10. 20<sup>th</sup> International Conference on Advanced Laser Technologies (ALT'12), (Тун, Швейцария, 2012);
11. The 8<sup>th</sup> Pacific Symposium on Flow Visualization and Image Processing, (Москва, Россия, 2011);
12. Научная конференция к 300-летию М.В. Ломоносова - "Ломоносовские чтения", (Москва, Россия, 2011);
13. 19<sup>th</sup> International Conference on Advanced Laser Technologies (ALT'11) (Золотые пески, Болгария, 2011);
14. 18<sup>th</sup> International conference Advanced Laser Technologies (ALT'10), (Эгмонд-ан-зее, Нидерланды, 2010);
15. Международная школа для студентов и молодых ученых по оптике, лазерной физике и биофизике Saratov Fall Meeting (SFM'10), (Саратов, Россия, 2010);
16. III Евразийский конгресс по медицинской физике и инженерии "Медицинская физика-2010" (Москва, Россия, 2010);
17. XVII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2010» (Москва, Россия, 2010);
18. Третья ежегодная конференция «Нанотехнологии в онкологии 2010», (Москва, Россия, 2010);
19. International Conference on laser applications in life sciences (LALS-2010), (Оулу, Финляндия, 2010);
20. 17<sup>th</sup> International conference Advanced Laser Technologies (ALT'09), (Анталия, Турция, 2009).

Основные результаты диссертации опубликованы в следующих работах:

Статьи в журналах из списка ВАК:

1. G.P. Petrova, A.V. Boiko, K.V. Fedorova, I.A. Sergeeva, N.V. Sokol, and T.N. Tichonova. «*Optical Properties of Solutions Consisting of Albumin and g-Globulin Molecules in Different Ratio Modeling Blood Serum*». // Laser Physics, 2009, Vol.19, No. 6, pp. 1303-1307.
2. G.P. Petrova, A.V. Boiko, L.N. Rashkovich, K.V. Fedorova and V.P. Khlapov. «*Physical Methods for studying the effect of europium ions on lysozyme solutions*». // Laser Physics, 2009, Vol.19, No. 6, pp. 1308-1311.
3. Петрусевиц 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., Петрусевиц Ю.М., Гурова М.А., Сергеева И.А., Тихонова Т.Н., Федорова К.В., Чужан Солей. «*Физический механизм токсического воздействия тяжелых металлов на белки и ферменты*». // Мед. Физика, 2010, № 2 (46), С. 101–104.

5. Т.Н. Тихонова, Г.П. Петрова, Ю.М. Петрусевич, К.В. Федорова, В.В. Кашин. «Образование дипольных нанокластеров в растворах основных белков сыворотки крови, содержащих ионы европия и калия». // Вестник московского университета. Серия 3. Физика. Астрономия. 2011, № 2, стр. 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. 41 (5). 2011. с.393-395.
7. В.В. Гибизова, К.А. Аненкова, А.Д. Масленникова, К.В.Федорова, И.А. Сергеева, Г.П.Петрова. «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) №16, 2010, 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) №17, 2011, стр. 469-474.
3. G.P. Petrova, M.S. Ivanova, I.A. Sergeeva, T.N. Tichonova, K.V.Fedorova «Diffusion processes in proteins and enzymes water solutions containing toxic heavy metals and visualization of appearing dipole nano structures by atomic force microscopy (AFM)». // PSFVIP-8 (Moscow, Russia, MSU) 21-25 august 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». // Bern Open Publishing: Proceedings of the International Conference on Advanced Laser Technologies 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, Matfyzpress, 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", 24-29 августа 2015 г, с. 229-231
7. Тихонова Т.Н., Федорова К.В. «Взаимодействие фермента лизоцима 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", 22 июня-02 июля 2016 г, 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. I.A. Sergeeva, M.S. Ivanova, K.V. Fedorova, G.P. Petrova, Yu.M. Petrusevich. «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. K.V. Fedorova, I.A. Sergeeva, G.P. Petrova, Yu.M. Petrusevich. «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., Петрусеви́ч Ю.М., Серге́ева 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. Г.П. Петрова, Т.Н. Тихонова, К.В. Федорова, В.В. Кашин. «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. G.P. Petrova, Yu.M. Petrusevich, K.V. Fedorova, I.A. Sergeeva, T.N. Tichonova, Z. Xiaolei. «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. G.P. Petrova, Yu.M. Petrusevich, M.A. Gurova, I.A. Sergeeva, S.E. Sergeev, T.N. Tichonova, K.V. Fedorova, Z. Xiaolei. «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 aan Zee, The Netherlands), 11-16 Sept 2010, Book of abstracts, p.53
10. K.V. Fedorova, M.A. Gurova, Z. Xiaolei, G.P. Petrova, Yu.M. Petrusevich. «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 aan 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. G.P. Petrova, M.S. Ivanova, I.A. Sergeeva, T.N. Tichonova, K.V.Fedorova «Diffusion processes in proteins and enzymes water solutions containing toxic heavy metals and visualization of appearing dipole nano structures by atomic force microscopy (AFM)». // The 8-th Pacific Symposium on Flow Visualization and Image Processing (Moscow, Russia) 21-25 august 2011, Book of abstracts, 2011, p. 52.
14. Макуренков АМ, Петрова ГП, Берловская ЕЕ, Федорова КВ, Папиш ЕА "Возможности оптических и радиоспектроскопических методов для диагностики онкологических заболеваний". // Научная конференция "Ломоносовские чтения-2011" Секция физика. Ноябрь 2011г., 2011, с 119-122.
15. 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
16. 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, место издания Thun, Switzerland, тезисы
17. Petrova G.P., Makurenkov A.M., Sergeeva I.A., Tichonova 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, место издания Thun, Switzerland, тезисы, с. 281
18. 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
19. 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
20. 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

21. Petrova G.P., Sergeeva 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), место издания Cassis, France, тезисы, 2014, с. P 42

22. Prudiyus 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), место издания Cassis, France, тезисы, 2014, с. S2-P20-S2-P20

23. 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;

Все вышеперечисленные работы соответствуют теме диссертации и полностью отражают ее содержание, а сама диссертация соответствует специальности 01.04.05 - оптика.

Диссертация "Оптические свойства макромолекул белков и ферментов в водных растворах, содержащих металлические ионы" Федоровой К.В. удовлетворяет всем требованиям ВАК России и рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.05 - оптика.

Заключение принято на заседании кафедры молекулярных процессов и экстремальных состояний вещества физического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Присутствовало на заседании 16 человек. Результаты голосования: "за" - 16, "против" - 0, "воздержались" - 0. Протокол № 8 от 06 сентября 2016 г.

Зам. заведующего кафедрой  
молекулярных процессов и  
экстремальных состояний вещества  
профессор

с

А.В. Уваров

Ученый секретарь кафедры  
молекулярных процессов и  
экстремальных состояний вещества

л

М.П. Савина

Заключение рассмотрено и утверждено на заседании Ученого совета Отделения экспериментальной и теоретической физики физического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова,

протокол 2 от "13" сентября 2016 г.

Заведующий отделением  
экспериментальной и теоретической  
физики, профессор

Б.И. Садовников

Ученый секретарь отделения  
экспериментальной и теоретической  
физики, доцент

Волков

Б.И. Волков