

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

ИМЕНИ М. В. ЛОМОНОСОВА

Физический факультет

На правах рукописи

Чжан Сяолэй

**Фотонная корреляционная спектроскопия
молекулярного рассеяния света в белковых растворах
при воздействии различных внешних факторов**

Специальность 01.04.05 – оптика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата физико-математических наук

Москва

2012

Работа выполнена на кафедре молекулярной физики физического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

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

Официальные оппоненты: доктор физико-математических наук,
профессор Фадеев Виктор Владимирович
(физический факультет МГУ имени М.В.
Ломоносова)
доктор физико-математических наук,
Иванов Андрей Валентинович (Российский
онкологический научный центр имени Н.Н.
Блохина РАМН)

Ведущая организация: Институт проблем нефти и газа РАН

Защита диссертации состоится «15» Февраля 2012 г. в 16-30 часов на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 501.001.45 при МГУ имени М. В. Ломоносова по адресу: Россия, 119991, г. Москва, Ленинские горы, дом 1, стр. 5 (19 корпус НИИ ядерной физики имени Д.В. Скобельцына МГУ имени М.В. Ломоносова), ауд. 2-15.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИИ ядерной физики имени Д.В. Скобельцына МГУ имени М. В. Ломоносова.

Автореферат разослан «13» Января 2012г.

Ученый секретарь совета по защите
докторских и кандидатских диссертаций
Д 501.001.45 при МГУ имени М.В. Ломоносова
кандидат физико-математических наук

Вохник О.М.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

Белки представляют собой асимметричные заряженные частицы, состоящих из одной или нескольких полипептидных цепей. Как известно, они обладают большими дипольными моментами (например, для сывороточного альбумина дипольный момент составляет 480 единиц Дебая) и большими молекулярными массами (они могут составлять от 500 до миллионов единиц Да). Белки играют решающую роль практически во всех биологических процессах, и выполняют различные функции, такие, как ферментативный катализ, транспорт и накопление, координированное движение, механическую опору, иммунную защиту, генерирование и передачу нервных импульсов, регуляцию роста и дифференцировки клеток.

Металлы являются одним из необходимых элементов для участия в жизнедеятельности биосистем. Однако некоторые металлы с точки зрения безопасности считаются токсичными для организма. При попадании даже в небольших дозах в питьевую воду, кровь, и другие биологические жидкости они способны нарушить нормальное состояние физиологических процессов. Особенно нужно отметить, что в последние годы большое количество химических средств, содержащих различные ионы металлов, используется для медицины.

В последнее время было обнаружено, что при наличии ионов металлов, особенно тяжелых, в водных растворах молекулы белков способны к образованию кластеров. Причем физико-химические свойства растворов влияют на размеры и молекулярную подвижность этих белковых кластеров. Этот процесс с точки зрения медицины часто является признаком многих заболеваний в организме человека.

В качестве примера, молекулы гадотериновой кислоты и гадодиамида обладают гадолиний-содержащими хелатными структурами, которые используются при магнитно-резонансной томографии. За последние два десятилетия, они считались безопасными и эффективными для медицинской визуализации. Но современные результаты свидетельствуют о наличии гадолиния в коже и мягких тканях у больных с почечной недостаточностью, даже с текущим гемодиализом. Нефрогенный системный фиброз (НСФ), который был описан в 1997 г, является недавно открытым редким заболеванием неизвестной этиологии, которое поражает пациентов с почечной недостаточностью. Развитие НСФ стали непосредственно связывать с воздействием гадолиний-содержащих магнитно-резонансных контрастных средств в 2006 г.

Учитывая вышеперечисленные факты, с точки зрения экспериментальной молекулярной оптики и спектроскопии, актуальность данной работы связана с изучением характера молекулярного движения и межмолекулярного взаимодействия в водных растворах биологических макромолекул при воздействии различных внешних факторов (pH , концентрация макромолекул, температура, ионы металлов, гадолиний-содержащие хелатные комплексы)

Для исследования молекулярной подвижности дисперсных частиц в водных растворах широко используется информативный оптический метод – фотонная корреляционная спектроскопия молекулярного рассеяния света, который также называют динамическим рассеянием света (ДРС).

Цели диссертационной работы

Исследование особенностей оптических свойств и молекулярно-динамических процессов, проходящих в растворах биологических макромолекул при воздействии различных параметров среды (pH , температура, концентрация биологических макромолекул, ионная сила) методом фотонной корреляционной спектроскопии.

Исходя из общей цели, в диссертации ставился ряд практических задач:

1. Сравнение особенностей молекулярной подвижности макромолекул коллагена и пепсина в чистом водном растворе при изменении pH ;
2. Исследование экспериментального явления – возникновения белковых кластеров в растворах пепсина, содержащих различные ионы металлов: калий, кобальт, свинец, цинк, цезий и рубидий;
3. Исследование изменений молекулярной подвижности макромолекул пепсина в чистом водном растворе в зависимости от изменения температуры при различных концентрациях;
4. Изучение изменений динамических параметров сывороточного альбумина при воздействии гадолиний-содержащих хелатных комплексов (гадотериновая кислота и гадодиамид).

Защищаемые положения

1. На основании данных работ по методу фотонной корреляционной спектроскопии молекулярного рассеяния света было получено, что коэффициент межмолекулярного взаимодействия имеет минимальное значение при pH 1,6 в чистом водном растворе пепсина; причем эффективная масса пепсина ($M_{эфф}=35\ 000$ Да) от pH не зависит. Впервые была определена изоэлектрическая точка пепсина pI 1,6 по зависимости коэффициента межмолекулярного взаимодействия от показателя раствора pH .
2. Метод фотонной корреляционной спектроскопии молекулярного рассеяния света позволяет наблюдать образование белковых дипольных кластеров в водных растворах молекул пепсина, содержащих такие ионы металлов, как калий, кобальт, свинец, цинк, цезий и рубидий.
3. Обнаружено, что в области температур 298-320 К в чистом водном растворе молекул пепсина при нагревании наблюдается увеличение

подвижности молекул с выходом на насыщение.

4. Впервые выявлен физический механизм токсического воздействия ионов гадолиния, входящего в хелатную структуру гадодиамида, на сывороточный альбумин.

Научная новизна диссертации определяется рядом новых экспериментальных результатов, полученных в данной работе с помощью метода фотонной корреляционной спектроскопии:

1. Методом фотонной корреляционной спектроскопии проведено исследование оптических свойств водных растворов коллагена и пепсина при изменении ряда параметров среды, таких как концентрация макромолекул, pH и температура.
2. Впервые определена изоэлектрическая точка макромолекул пепсина – pI 1,6 методом фотонной корреляционной спектроскопии. Для определения изоэлектрической точки пепсина исследовалась зависимость коэффициента межмолекулярного взаимодействия от pH раствора. Экстремум этой зависимости наблюдается при значении pH 1,6, где суммарный заряд на поверхности пепсина имеет нулевое значение.
3. Впервые оптическим методом (ДРС) обнаружено и детально исследовано образование дипольных кластеров молекул пепсина при воздействии различных ионов металлов (калия, кобальта, свинца, цинка, цезия и рубидия).
4. Впервые выявлен физический механизм токсического воздействия ионов гадолиния, входящего в хелатную структуру гадодиамида, на сывороточный альбумин.

Практическая значимость

Полученные с помощью метода фотонной корреляционной спектроскопии результаты способствуют развитию представлений об оптических и молекулярно-динамических процессах, происходящих в белковых

растворах, содержащих различные ионы металлов, а также вносят вклад в понимание природы межмолекулярных взаимодействий.

Изученное в работе поведение биологических макромолекул в растворах и их взаимодействие с ионами различных солей позволяет установить молекулярный механизм патологических изменений в биологических объектах, связанный с токсическим воздействием ионов металлов на живые объекты. Материалы диссертации могут быть использованы при разработках способов контроля качества органических жидкостей и оптических методов диагностики различных заболеваний, а также для создания диагностических приборов.

Апробация работы

Основные результаты работы были доложены на конференциях: Международные конференции студентов, аспирантов и молодых ученых по фундаментальным наукам «Ломоносов-2008, 2011» (Москва, 2008, 2011), The XII International Conference on Laser Application in Life Science (Finland, 2010), III Евразийский конгресс по медицинской физике и инженерии «Медицинская физика – 2010» (Москва 2010), 7th meeting: “NMR in Heterogeneous Systems” (Saint Petersburg, 2010), The 18th International Conference on Advanced Laser Technologies ALT'10 (The Netherlands, 2010), 19th International Conference on Advanced Laser Technologies – ALT'11 (Bulgaria, 2011), Научная конференция «Ломоносовские чтения – 2011» (Москва, 2011).

Публикация

По материалам диссертационной работы имеется 14 публикаций, в числе которых 5 статей в российских и международных научных журналах.

Личный вклад автора

Все результаты данной диссертационной работы получены автором лично или при его непосредственном участии.

Достоверность результатов

Достоверность полученных научных результатов обеспечивается достаточным уровнем строгости разработанных физико-математических моделей, использованием в экспериментах апробированных методик измерения, высокоточной цифровой аппаратуры, компьютерных методов анализа и обработки экспериментальных данных, а также согласованностью результатов теоретического анализа с результатами экспериментальных исследований автора и других исследователей.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, 5 глав, заключения, и списка литературы, содержащего 100 наименований. Объем работы составляет 121 страницу, включая 45 рисунков и 5 таблиц.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении дана общая характеристика диссертационной работы. Обоснована актуальность темы, сформулированы цель и задачи исследования, изложены научная новизна и практическая ценность полученных результатов.

Первая глава содержит общие сведения о химическом составе и строении белковых макромолекул, и их физических свойствах.

Изложены основные положения теории Дебая-Хюккеля, описывающей поведение полиэлектролитов в растворе в свете простейшей модели твердых сфер, погруженных в сплошную среду и взаимодействующих по закону Кулона. Согласно этой теории, каждая молекула оказывается окруженной атмосферой противоионов, что приводит к частичной экранировке кулоновских взаимодействий.

Введены понятия ионной силы, водородного показателя среды и изоэлектрической точки, определена связь водородного показателя с поверхностным зарядом макромолекулы.

Представлены все виды связей, которые возникают внутри атомов одной молекулы и атомов разных молекул. Кроме того, особое внимание уделено межмолекулярным взаимодействиям (слабые взаимодействия) – индукционным, ориентационным и дисперсионным взаимодействиям.

Во второй главе описываются основы рассеяния света макромолекул. Изложены общие понятия рассеяния света и основные положения теории Рэлеевского рассеяния света на флуктуациях концентрации растворенного вещества. Освещены особенности влияния анизотропии рассеивающих частиц на деполяризацию рассеянного света и ослабление света в растворах.

Рассеяние называется рэлеевским, если линейные размеры рассеивающих частиц меньше, чем $\lambda/20$, где λ – длина световой волны.

Согласно теории Рэля-Дебая, для угла рассеяния $\theta = 90^\circ$, рэлеевский коэффициент рассеяния может быть представлен как:

$$R_{90} = \frac{I_{90} r^2}{I_0 V} = c H M K(\Delta_V)$$

где $K(\Delta_V) = \frac{3+3\Delta_V}{3-4\Delta_V}$ – фактор Кабанна, Δ_V – коэффициент деполяризации.

Величина $H = \frac{4\pi^2 n_0^2 \left(\frac{\partial n}{\partial c}\right)^2}{\lambda^4 N_A}$ называется оптической постоянной раствора, $\frac{\partial n}{\partial c}$ – инкремент показателя преломления.

Если положения рассеивающих центров коррелированы, то при конечных концентрациях всегда будет существовать межмолекулярное взаимодействие. Согласно теории Дебая, интенсивность рассеянного света можно выразить через флуктуации концентрации частиц, которые зависят от химического потенциала. В этом случае для разбавленных растворов макромолекул имеет место соотношение:

$$\frac{c H K}{R_{90}} = \frac{1}{M} + 2 B c + \dots$$

Метод дает возможность прямого определения молекулярной массы M , для чего необходимо измерить R_{90} при нескольких концентрациях, и экстраполировать полученную зависимость $\frac{c H K}{R_{90}} = f(c)$ к концентрации $c=0$. Наклон этой прямой, равный $2B$, позволяет вычислить второй вириальный коэффициент B , который характеризует степень отклонения поведения раствора от идеального и служит мерой межмолекулярного взаимодействия в растворе.

При такой экстраполяции молекулярная масса равна:

$$M = \left[\frac{c H}{R_{90}} \right]_{c \rightarrow 0}^{-1}$$

В третьей главе описывается метод фотонной корреляционной спектроскопии, позволяющий определить коэффициент трансляционной диффузии D_t дисперсных частиц в жидкости путем анализа спектра флуктуаций интенсивности рассеянного света. Хаотическое броуновское

движение частиц раствора вызывает микроскопические флуктуации их локальной концентрации. При прохождении лазерного луча через такую среду часть света будет рассеяна на этих неоднородностях. Флуктуации интенсивности рассеянного света будут соответствовать флуктуациям локальной концентрации частиц. Временная автокорреляционная функция, согласно определению, имеет следующий вид:

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

В соответствии с гипотезой Онзагера, релаксация микроскопических флуктуаций концентрации к равновесному состоянию может быть описана первым законом Фика (уравнением диффузии): $\frac{\partial c(r,t)}{\partial t} = -D_t \nabla_c(r,t)$. Отсюда видно, что $G(\tau)$ экспоненциально затухает во времени, и характерное время релаксации однозначно связано с D_t . Таким образом, корреляционная функция интенсивности рассеянного света имеет вид:

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

В соответствии с решением уравнения диффузии, обратное время корреляции равно: $\frac{1}{t_c} = D_t q^2$, где $q = \left(\frac{4\pi n}{\lambda}\right) \sin\left(\frac{\vartheta}{2}\right)$ – волновой вектор рассеянного света.

Коэффициент трансляционной диффузии заряженных молекул может отличаться от D нейтральных молекул согласно формуле:

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

где M – масса частиц, B – коэффициент межмолекулярного взаимодействия. $[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta - \eta_0}{c\eta}$ – характеристическая вязкость. Для сферических незаряженных частиц, согласно закону Стокса-Эйнштейна: $D = \frac{kT}{6\pi\eta R}$, где R – радиус частицы, T – температура.

Глава четвертая содержит литературный обзор, посвященный современным результатам по исследованию трехкомпонентных растворов макромолекул. Глава состоит из трех разделов.

В первом разделе изложена теория Скэтчарта, в которой рассмотрено взаимодействие макроионов в растворе, содержащем кроме низкомолекулярного растворителя еще и третью компоненту – сильный электролит. Согласно Скэтчарту, парные взаимодействия в таких растворах описываются вторым вириальным коэффициентом в разложении для свободной энергии, выражение для которого имеет вид:

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

где V_1 – удельный объем растворителя, Z – заряд макроиона, M_2 – его масса, m_3 – концентрация ионов соли, параметры β_{22} , β_{23} , β_{33} определяются, соответственно, взаимодействием между макроионами, взаимодействием между макроионами и ионами соли и взаимодействием только между ионами соли.

Второй раздел посвящен результатам работ по изучению особенностей белковых растворов, содержащих ионы металлов с различными ионными радиусами с помощью оптических методов и атомной силовой микроскопии (АСМ).

В третьем разделе изложены результаты работ по изучению водных растворов белков при воздействии некоторых синтетических полимеров с помощью оптических методов.

Глава пятая содержит подробное описание экспериментов и результаты исследования водных растворов белков при воздействии различных внешних факторов методом фотонной корреляционной спектроскопии. Она включает в себя несколько параграфов.

Объекты исследования и подготовка образцов:

В работе были исследованы следующие белки (на базе препаратов “*Serva*” и “*Sigma*”): коллаген первого типа из коровьей кожи, пепсин из слизистой оболочки желудка свиньи, бычий сывороточный альбумин (БСА). сопутствующими добавками послужили различные соли металлов ($[Pb(CH_3COO) \cdot 3H_2O]$, $[Eu(NO_3)_3 \cdot 5H_2O]$, $ZnCl_2$, KCl , $RbCl$, $CsCl$, $CoCl$, $FeCl_3$) и гадолиний-содержащие хелатные комплексы (гадотериновая кислота, гадодамирид). Приведены краткие описания биохимических и физико-химических свойств исследуемых веществ и их соединений. Для регулирования *pH* среды применялись слабые растворы соляной *HCL* или уксусной кислоты CH_3COOH , и щелочи *KOH*. Подробно изложены методика и условия приготовления исследуемых систем с заданными параметрами.

Описание экспериментальной установки

Представлена схема спектрометра *Photocor Complex* (рис. 1), основанного на методе фотонной корреляционной спектроскопии. Подробно изложены технические характеристики отдельных агрегатов спектрометра. Кроме того, описаны программное обеспечение работы *Photocor Complex* и методики обработки экспериментальных данных (метода обратных задач), с помощью которых осуществляется управление процессом измерения и обработка результатов измерения.

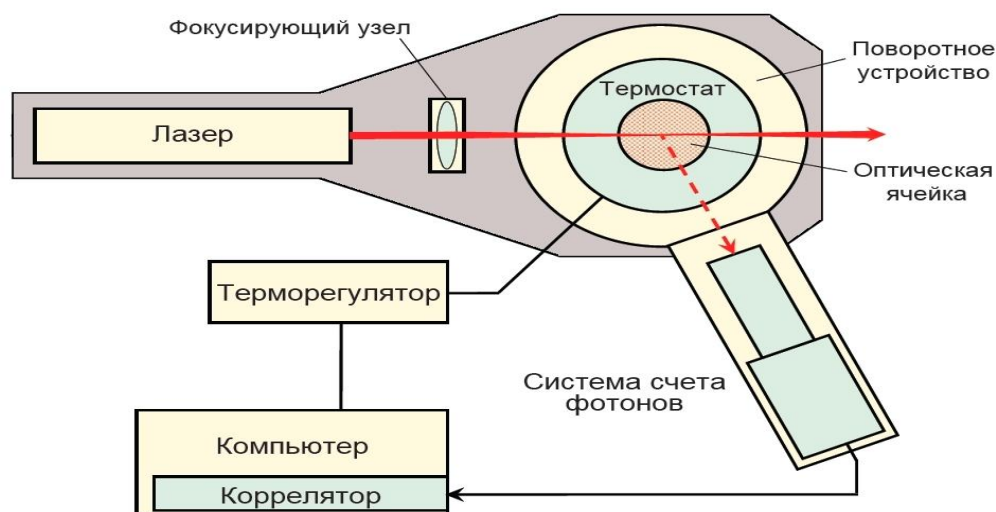


Рис. 1. Схема спектрометра *Photocor Complex*.

В данной работе спектрометр работает в гомодинном режиме. Источником света в установке служит диодный лазер с длиной волны 647 нм. Рассеянный под углом 90° свет регистрируется ФЭУ. Необходимая температура в термостате поддерживается терморегулятором, управляемого с помощью компьютера.

Результаты и обсуждения

В дальнейших разделах представлены основные результаты исследования белковых растворов при воздействии различных внешних факторов, полученные методом фотонной корреляционной спектроскопии.

На рисунке 2 показана зависимость $V(pH)$ для пепсина, имеющего минимум вблизи pH 1,6. Согласно теории Скэтчарда, коэффициент V изменяется с ростом суммарного заряда на макромолекуле по параболическому закону $\sim Z^2$ (эффект Доннана) с минимумом в изоэлектрической точке ($Z=0$). Поскольку изоэлектрическая точка пепсина находится в очень кислой среде (pI 1,6), основные эксперименты в данной работе проводились только при $pH \geq 1,6$.

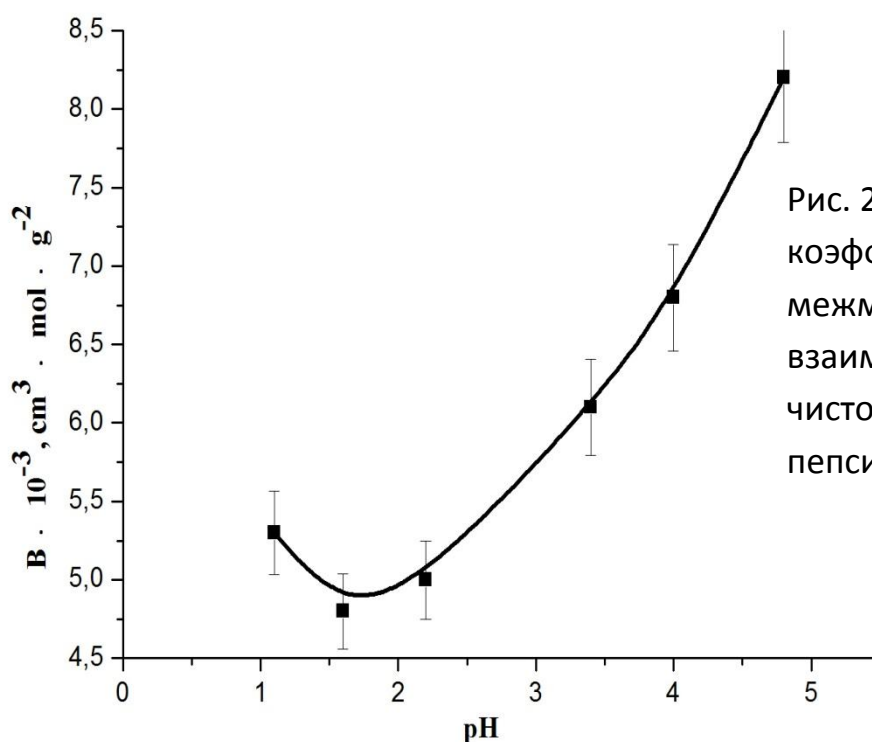


Рис. 2. Зависимость коэффициента межмолекулярного взаимодействия V от pH в чистом водном растворе пепсина.

В соответствии с формулой $D_t = D_0\{1 + (2BM - [\eta])c\}$, коэффициент D_t зависит от коэффициента межмолекулярного взаимодействия B , эффективной массы M , характеристической вязкости $[\eta]$ и концентрации молекул. По результатам эксперимента, молекулярная масса пепсина почти не изменяется в зависимости от pH . Согласно литературным данным, характеристическая вязкость в чистом водном растворе пепсина составляет $[\eta] = 7 \text{ см}^3/\text{г}$. Коэффициент межмолекулярного взаимодействия B и коэффициент трансляционной диффузии D_t должны быть связаны линейной зависимостью.

На рисунке 3 (кривая 1) представлена зависимость коэффициента трансляционной диффузии от pH для чистого водного раствора пепсина при $pH \geq 1,6$. Минимальное значение D_t было обнаружено при pH 1,6. С ростом заряда на поверхности молекул пепсина коэффициент D_t увеличивается.

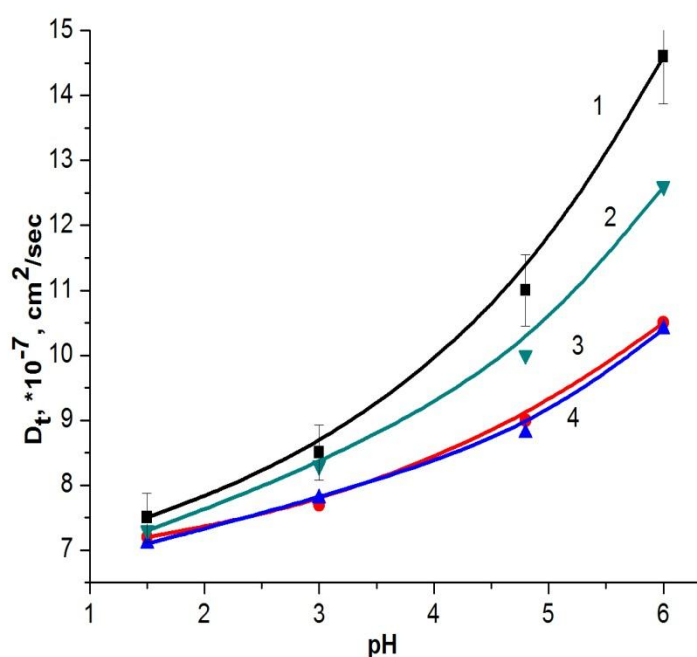


Рис. 3. Зависимость коэффициента трансляционной диффузии от pH . Кривая 1: для чистого водного раствора пепсина, кривая 2-4: для водных растворов пепсина с добавлением ионов калия при $T=298 \text{ К}$ (кривая 2 – 1×10^{-4} моль/л, кривая 3 – 1×10^{-3} моль/л, кривая 4 – 1×10^{-2} моль/л)

В отличие от зависимости $D_t(pH)$ для водного раствора пепсина (рис. 3, кривая 1), зависимость $D_t(pH)$ для растворов коллагена (рис. 4) существенно отличается. Т.е. вблизи изоэлектрической точки (pI 5,8) коэффициент D_t имеет максимальное значение, а не минимальное. Этот эффект связан с

характеристической вязкостью – величина $[\eta]$ коллагена ($1150 \text{ см}^3/\text{г}$) в 164 раза превышает значение $[\eta]$ для пепсина ($7 \text{ см}^3/\text{г}$). В связи с этим, при увеличении суммарного заряда на поверхности молекул модуль $|2BM - [\eta]|$ уменьшается, соответственно, коэффициент D_t тоже уменьшается.

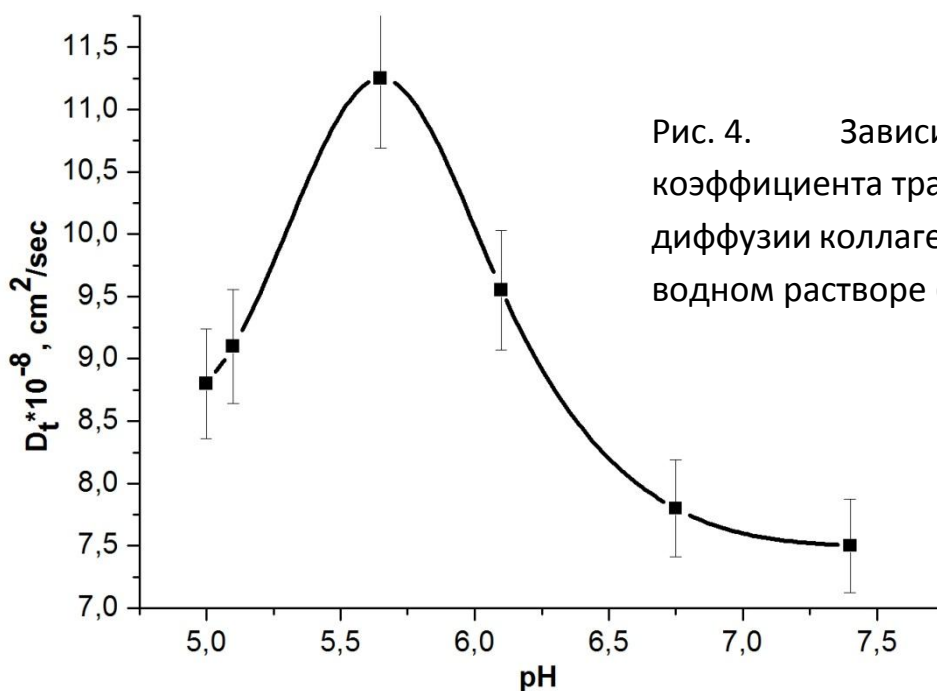


Рис. 4. Зависимость коэффициента трансляционной диффузии коллагена от pH в чистом водном растворе ($T=298 \text{ К}$).

Для водных растворов пепсина с добавлением соли *KCl* наблюдается уменьшение коэффициентов трансляционной диффузии (рис. 3, кривые 2-4) по сравнению с зависимостью $D_t(\text{pH})$ для чистого водного раствора пепсина (рис. 3, кривая 1). Этот эффект связан с образованием белковых дипольных кластеров при добавлении ионов калия с большим ионным радиусом ($1,3 \text{ \AA}$). При этом положительно заряженные ионы металла прочно связываются с отрицательными группами на поверхности молекул пепсина. Между молекулами возникают силы диполь-дипольного притяжения вместо кулоновского отталкивания. Вблизи изоэлектрической точки коэффициент трансляционной диффузии имеет минимальное значение. При этом, с ростом ионной силы раствора коэффициент трансляционной диффузии уменьшается.

Кроме того, сравнительные эксперименты были проведены для растворов пепсина при наличии различных ионов металлов вблизи изоэлектрической точки (рис. 5). Обнаружено, что коэффициент D_t уменьшается и максимальное падение D_t (почти в два раза) наблюдается при добавлении ионов свинца.

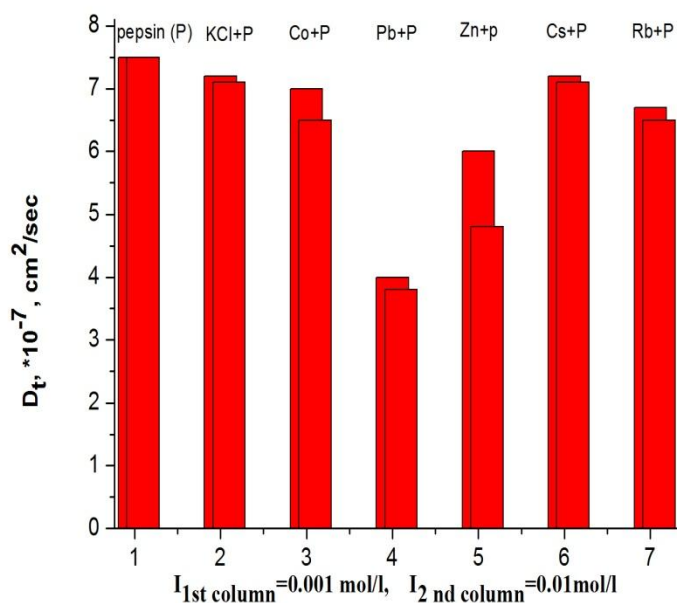


Рис. 5. Сравнительные величины коэффициентов трансляционной диффузии для чистого водного раствора пепсина (1) и с добавлением различных солей – калия (2), кобальта (3), свинца (4), цинка (5), цезия (6) и рубидия (7) (рН 1,6, $I_{1\text{столбец}}=0,001$ моль/л, $I_{2\text{столбец}}=0,01$ моль/л). $T=298$ К.

На рисунке 6 показана температурная зависимость коэффициента трансляционной диффузии для чистого водного раствора пепсина. Коэффициент D_t с ростом температуры в диапазоне $T=298-320$ К достигает максимума (с выходом на насыщение), причем, чем меньше концентрации пепсина, тем быстрее достигается максимум коэффициента трансляционной диффузии при увеличении температуры. Максимум коэффициента трансляционной диффузии при различных концентрациях пепсина имеет одно и то же значение ($D_t = 1,9 \times 10^{-6} \text{ см}^2/\text{сек}$). Кроме того, кривые зависимости $D_t = f(T)$ не изменяются при концентрации пепсина выше 10 мг/мл.

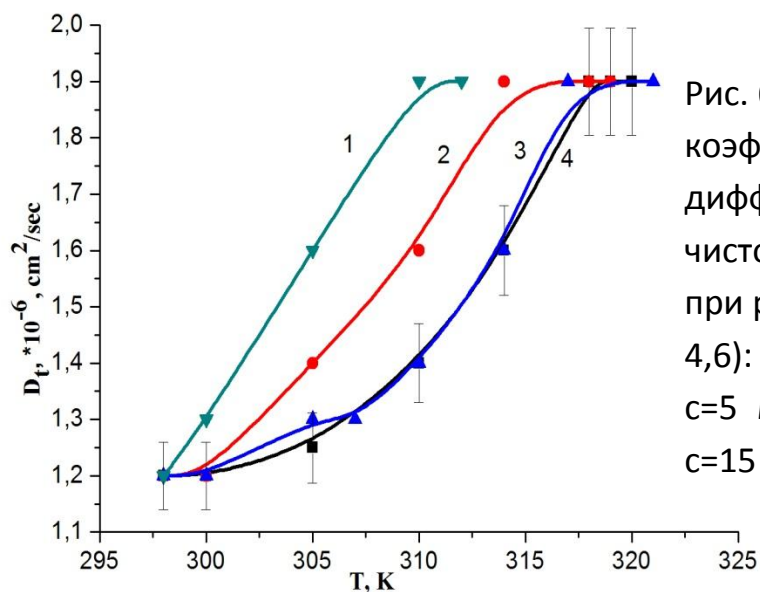


Рис. 6. Зависимость коэффициента трансляционной диффузии D_t от температуры для чистого водного раствора пепсина при различных концентрациях (pH 4,6): кривая 1 – $c=2,8$ мг/мл; 2 – $c=5$ мг/мл; 3 – $c=10$ мг/мл; 4 – $c=15$ мг/мл.

При исследовании динамических параметров молекул альбумина в чистом водном растворе и в растворах с добавлением гадотериновой кислоты и хлорида железа получены нелинейные зависимости $D_t(pH)$ с минимумом вблизи изоэлектрической точки pH 4,8 (рис. 7). Видно, что эти зависимости $D_t(pH)$ схожи по характеру и по значению.

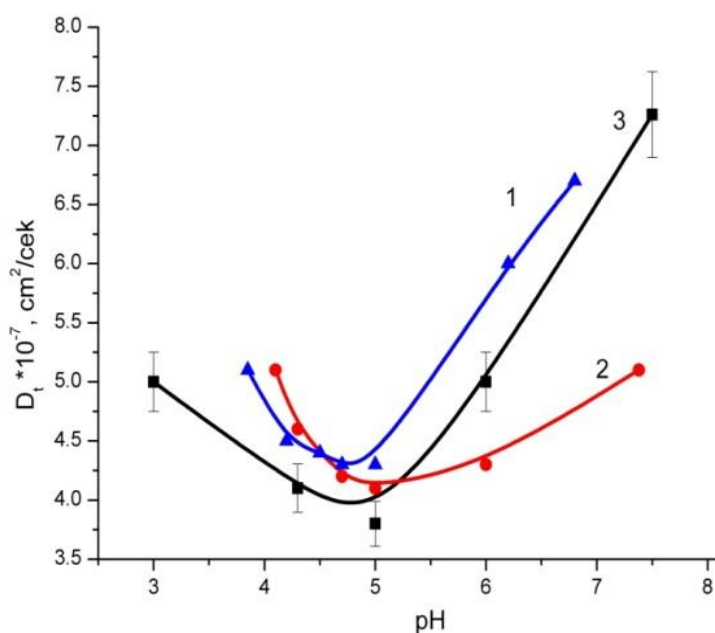


Рис. 7. Зависимость коэффициент трансляционной диффузии от показателя pH для чистого водного раствора альбумина (кривая 1), с добавлением гадотериновой кислоты ($I=0,05$ ммоль/мл) (кривая 2), с добавлением соли хлорида железа $FeCl_3$ ($I=0,004$ моль/л) (кривая 3).

Однако при воздействии гадолиний-содержащих хелатных комплексов гадодиамида на молекулы альбумина, коэффициенты трансляционной диффузии резко падают (рис. 8). Причем с ростом концентрации гадодиамида коэффициент D_t уменьшается.

Это может быть связано с тем, что в растворе гадодиамида существует определенное количество свободных ионов гадолиния, при воздействии которого на альбумин образуются белковые кластеры.

Как было показано ранее в нашей лаборатории, наличие в растворе ионов с большим ионным радиусом приводит к образованию макромолекулярных комплексов. Ионный радиус Gd^{3+} гораздо больше, чем у ионов Fe^{3+} : $R_{Gd^{3+}}=0,938 \text{ \AA}$ (близок по величине к радиусу трехвалентного иона европия $R_{Eu^{3+}}=0,95 \text{ \AA}$), $R_{Fe^{3+}}=0,64 \text{ \AA}$. Крупные рассеивающие частицы обладают меньшей подвижностью и большим гидродинамическим радиусом. Это и является причиной, почему коэффициент трансляционной диффузии при добавлении ионов железа (рис. 7, кривая 3) больше коэффициента трансляционной диффузии при воздействии свободных ионов гадолиния на молекулы альбумина (рис. 8).

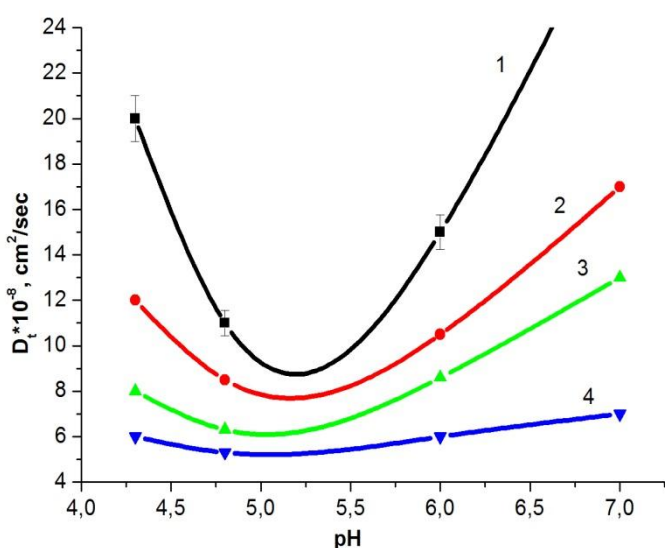


Рис. 8. Зависимость коэффициента трансляционной диффузии от pH для водных растворов БСА ($c=1$ мг/мл) при воздействии гадодиамида. Кривая 1 – концентрация гадодиамида $\mu=0,002$ ммоль/мл; Кривая 2 – $\mu=0,01$ ммоль/мл; Кривая 3 – $\mu=0,05$ ммоль/мл; Кривая 4 – $\mu=0,1$ ммоль/мл. $T=298$ К.

В отличие от гадодиамида, ионы гадолиния из структуры гадотериновой кислоты более прочно связаны со своими хелатными комплексами.

Основные результаты и выводы:

1. С помощью метода фотонной корреляционной спектроскопии получено, что pH – зависимость коэффициента межмолекулярного взаимодействия B для водных растворов пепсина имеет экстремум при pH 1,6. Из этого следует, что изоэлектрическая точка данного типа пепсина равна 1,6.
2. Выявлено, что коэффициент трансляционной диффузии уменьшается вблизи изоэлектрической точки пепсина в водных растворах, содержащих ионы калия, кобальта, свинца, цинка, цезия и рубидия, с ростом ионной силы раствора. Наиболее заметное падение коэффициента трансляционной диффузии пепсина наблюдается вблизи изоэлектрической точки при добавлении ионов свинца, что связано с образованием белковых дипольных кластеров.
3. Впервые показано, что наиболее токсическое воздействие на макромолекулы пепсина оказывают ионы свинца.
4. Оптическим методом (ДРС) обнаружено, что в области температур 298-320 К в чистом водном растворе пепсина при нагревании наблюдается увеличение коэффициента трансляционной диффузии с выходом на насыщение – максимальное значение $D_t = 1,9 \times 10^{-6}$ см²/сек.
5. Оптическим методом (ДРС) обнаружено образование дипольных кластеров альбумина в водных растворах, содержащих гадолиний-содержащие хелатные комплексы гадодиамида. С ростом концентрации гадодиамида коэффициент трансляционной диффузии уменьшается. Это может быть связано с тем, что в растворе гадодиамида существуют определенное количество свободных ионов гадолиния.
6. Впервые показано, что использование гадодиамида для улучшения контраста визуализации при исследованиях с помощью МРТ не является безопасным для организма. Существует риск возникновения ряда заболеваний, что является важным выводом для медицины.

Результаты диссертационной работы изложены в следующих публикациях:

Статьи:

1. I.A. Perfil'eva, G.P.Petrova, Y.M.Petrusevich, A.V.Boiko, M.S.Ivanova, **Zh. Xiaolei** "Dynamic properties of collagen molecules in water and salt solutions" // Int. Conf. Advanced Laser Technologies "ALT-07", Proc. SPIE, 2008, 7022, 70220W-1.
2. Г.П. Петрова, Ю.М. Петрусевич, И.А. Перфильева, М.С. Иванова, **Чжан Сяолэй** «Молекулярная подвижность в растворах коллагена, содержащих ионы с различными ионными радиусами» // вестник МГУ, Сер. 3. Физика. Астрономия. 2008. №4. С. 68-70. (Moscow State University Phys. Bull. 2008. Vol. 63. №4. P. 296-298).
3. Г.П. Петрова, Ю.М. Петрусевич, М.А.Гурова, И.А. Перфильева, Т.Н. Тихонова, К.В. Федрова, **Чжан Сяолэй** «Физический механизм токсического воздействия тяжелых металлов на белки и ферменты» // Мед. Физика, 2010, №2 (46), С. 101-104.
4. **Сяолэй. Чжан**, Г.П. Петрова, Ю.М. Петрусевич, И.А. Сергеева «Изменение динамических параметров сывороточного альбумина при воздействии гадотериновой кислоты» // Мед. Физика, 2011, №3. С. 65-71.
5. **Сяолэй Чжан**, Г.П. Петрова, Ю.М. Петрусевич, И.А. Сергеева «Исследование молекулярной подвижности фермента пепсина методом фотонной корреляционной спектроскопии» // Вестник МГУ. Физика. Астрономия. 2012. №1.

Тезисы докладов:

6. Г.П. Петрова, Ю.М. Петрусевич, И.А. Перфильева, М.С. Иванова, **Чжан Сяолэй** «Молекулярная подвижность в растворах коллагена, содержащих ионы металлов с различными ионными радиусами» // Международная конференция студентов, аспирантов, и молодых ученых по фундаментальным наукам «Ломоносов-2008», Физический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Апрель 2008, Сборник тезисов докладов, С. 111-112.
7. G.P.Petrova, Y.M.Petrusevich, K.V. Fedrova, I.A. Sergeeva, T.N. Tikhonova, **Zh. Xiaolei** «Physical mechanism of "poisoning" the proteins and enzymes by heavy metals» // The XII International Conference on Laser Application in Life Science, (Oulu, Finland) June 2010, Book of abstracts, P. 140.

8. **Чжан Сяолэй**, Г.П. Петрова, Ю.М. Петрусеви́ч «Метод рассеяния света в определении ферментативных кластеров, образующихся при воздействии тяжелых металлов» // III Евразийский конгресс по медицинской физике и инженерии «Медицинская физика – 2010», Июнь 2010, Сборник тезисов докладов, Том 3, С. 148-150.
9. Yurii M. Petrusevich, Galina P. Petrova, Alexander M. Makurenkov, Helen E. Berlovskaya, **Zhang Xiaolei** «Formation of Protein and Enzyme Clusters in Solutions Induced by Small Concentrations of Heavy Metals Ions» // 7th meeting: “NMR in Heterogeneous Systems”, June 28 – 28 July 2010, P. 24.
10. G.P. Petrova, Yu.M. Petrusevich, M.A. Gurova, I.A. Sergeeva, S.E. Sergeev, T.N. Tichonova, K.V. Fedorova, **Zhang Xiaolei** «Mechanism of heavy metal ions toxic influence on proteins and enzymes studying by different laser optical methods» // The 18th International Conference on Advanced Laser Technologies ALT'10 (Egmond ann Zee, The Netherlands) , 11-16 Sept 2010, Book of abstracts, P. 53
11. 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» // The 18th International Conference on Advanced Laser Technologies ALT'10 (Egmond ann Zee, The Netherlands) , 11-16 Sept 2010, Book of abstracts, P. 160
12. **Чжан Сяолэй**, Ю.М. Петрусеви́ч, Г.П. Петрова «Исследование молекулярной подвижности в растворах пепсина методом динамического рассеяния света» // Международная конференция студентов, аспирантов, и молодых ученых по фундаментальным наукам «Ломоносов-2011», Физический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова. Апрель 2011, Сборник тезисов докладов, С. 177.
13. G. Petrova, M. Gurova, I. Sergeeva, T.Tichonova, K. Fedorova, **Z. Xiaolei** «Poisonous effect of low concentration of heavy metal ions on some enzymes in the solutions» // 19th International Conference on Advanced Laser Technologies – ALT'11 (Golden Sands, Bulgaria), 3-8 September 2011, Book of abstracts, P. 108.
14. **Чжан Сяолэй**, Петрова Г.П. «Особенности молекулярной подвижности фермента пепсина в водных растворах при воздействии различных внешних факторов» // Сб. расширенных тезисов Ломоносовские чтения. Секция физики. (Ноябрь, 2011) С. 122-124.

Подписано в печать 07.01.2012 г.
Формат 60x90/16. Заказ 1507. Тираж 100 экз. Усл.-печ. л. 1,2.
Печать офсетная. Бумага для множительных аппаратов.
Отпечатано в ООО "ФЭД+", Москва, Ленинский пр. 42, тел. 774-26-96