

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

КАФЕДРА МОЛЕКУЛЯРНЫХ ПРОЦЕССОВ И ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ СОСТОЯНИЙ ВЕЩЕСТВА



На правах рукописи

Гибизова Виктория Валерьевна

**ОСОБЕННОСТИ РАССЕЯНИЯ СВЕТА В РАСТВОРАХ
ГЛОБУЛЯРНЫХ БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ С
МЕТАЛЛОСОДЕРЖАЩИМИ СОЕДИНЕНИЯМИ**

01.04.05 – оптика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель
доктор физико-математических наук,
профессор, Г.П. Петрова

Москва 2017

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	4
Литературный обзор	15
Глава 1. Теоретические основы исследования.....	27
1.1 Взаимодействия молекул в растворах белков	27
1.1.1 Электролиты.....	27
1.1.2 Ионный показатель раствора.....	29
1.1.3 Виды взаимодействий белковых макромолекул	30
1.2 Теоретическая основа исследования	30
1.2.1 Основы метода динамического рассеяния света.....	30
1.2.2 Основы статического метода светорассеяния	33
1.2.3 Теория Рэлея-Дебая.....	35
1.2.4 Теория молекулярной адсорбции Ленгмюра.....	37
1.2.5 Теория ионной адсорбции	39
1.3 Флуоресцентная спектроскопия.....	40
1.3.1 Основные понятия люминесцентной спектроскопии.....	41
1.3.2 Основные характеристики и свойства флюоресценции.....	43
1.4 ИК-спектроскопия	46
Глава 2. Экспериментальное оборудование.....	50
2.1 Экспериментальная установка « <i>Photocor Complex</i> ».....	50
2.2 Оптическая установка Bruker IFS 66v/S.....	52
2.3 Флуориметр и фотометр.....	54
Глава 3. Исследуемые вещества	61
3.1 Альбумин	61
3.2 γ -глобулин	63
3.3 Сыворотка крови.....	64
3.4 Металлы и их роль в организме человека.....	69
3.5 Наночастицы золота	70

3.5.1	Хлорид железа III.....	71
3.5.2	Железосодержащий препарат.....	73
	Глава 4. Экспериментальные результаты	76
4.0	Калибровочные измерения	76
4.1	Эксперименты с наночастицами золота	77
4.1.1	Растворы глобулярных белков (БСА и γ -глобулин) при добавлении НЧ золота 79	
4.1.2	Модельные растворы сыворотки крови с НЧ золота.....	81
4.1.3	Нативные растворы сыворотки крови с НЧ золота.....	83
4.1.4	Качественный анализ спектра	87
4.2	Растворы альбумина, содержащие хлорид железа III.....	89
4.2.1	Приготовление исследуемых растворов	89
4.2.2	Экспериментальные результаты, полученные методом ДРС	89
4.2.3	Экспериментальные результаты, полученные методом статического рассеяния света	91
4.2.4	Экспериментальные результаты, полученные методом флуоресценции	93
4.3	Растворы γ -глобулина, содержащие хлорид железа III	95
4.3.1	Приготовление образцов.....	95
4.3.2	Экспериментальные результаты, полученные методом ДРС	96
4.4	Растворы, содержащие препарат «Мальтофер»	101
4.4.1	Основные результаты экспериментов	102
	Обсуждение результатов экспериментов.....	111
	Выводы:	116
	Заключение	118
	Список публикаций по результатам диссертации:	119
	Список литературы	124
	Благодарности.....	1

ВВЕДЕНИЕ

Данная работа посвящена исследованию оптических параметров в различных жидких системах, а именно в разбавленных растворах оптически анизотропных макромолекул, включая жизненно важные белки. К исследуемым оптическим системам относятся, в том числе трехкомпонентные растворы, содержащие белковые молекулы и соли различных металлов, а также разнообразные наночастицы (НЧ). Оптические методы, такие как методы светорассеяния – статического и динамического, являются невозмущающими (неинвазивными) и не вносят искажения в исследуемые системы. Одним из методов, используемых в данной работе, является метод рассеяния света, предложенный Дебаем [1]. Он позволяет получить непосредственно величины массы частиц раствора и коэффициентов межмолекулярного взаимодействия (прямой метод). Второй оптический метод более сложный, так как является методом второго порядка, также основан на явлении рассеяния света, так называемый метод оптического смешения или метод фотонной корреляционной спектроскопии, предложенный Форрестером, Гудмунсеном, Джонсоном в 1955 г. [2] и обоснованный Гореликом [3]. В этом методе решается обратная задача нахождения таких параметров рассеивающих частиц, как их подвижность (коэффициент трансляционной диффузии) и гидродинамический радиус. Оба эти метода были использованы для следующих систем: основные белки сыворотки крови (альбумин и γ -глобулин), модельные и разбавленные растворы нативных образцов сыворотки крови человека при добавлении в них хлорида железа III, железосодержащего препарата «Мальтофер», а также НЧ золота.

Дополнительно в работе использовался метод флуоресцентной спектроскопии, который является высокочувствительным аналитическим инструментом исследований с широким диапазоном применения в различных научных областях, например, в химии, биохимии, биофизики, биотехнологии, генетики, медицинской

диагностики. Явление флуоресценции было открыто Гершелем в 1845 году [4]. Стоксом впервые было предложено использовать флуоресценцию в качестве аналитического инструмента исследований в 1864 году. В 1919 году Штерн и Фольмер описали процесс тушения флуоресценции [5], а в 1924 году С. И. Вавилов определил квантовый выход флуоресценции [6].

Для подтверждения результатов в работе использовался также метод ИК-спектроскопии, который был заложен в работах Уильяма Гершеля, обнаружившего «инфракрасное излучение» [7], в 1814 г. Йозеф фон Фраунгофер построил первый спектроскоп. В 1905 г. Альберт Эйнштейн объяснил явления фотоэффекта [8]. Современная спектроскопия началась с изобретения лазера в 1958 году.

Макромолекулы белков представляют особый интерес для исследования с помощью методов молекулярной оптики, поскольку их размеры и масса известны для каждого вида белка, при этом поверхность белковой макромолекулы обладает зарядом и имеет большой дипольный момент (порядка нескольких сот Дебай).

Благодаря этим особенностям, существует сильное электростатическое взаимодействие между молекулами полярного растворителя (например, водой) и заряженными поверхностными группами белка, что, в свою очередь, влияет на характер броуновской динамики молекул [9].

В настоящее время актуальной проблемой является изучение белков – составного элемента живой природы. Многообразие белков связано с разнообразием их строения, что позволяет им выполнять в живом организме множество различных функций, как структурных, так и метаболических. В виде водных растворов белки присутствуют в крови и лимфе живых организмов. Функциональные характеристики белков определяются их динамическими свойствами, которые, в свою очередь, зависят от многих факторов – размера и формы макромолекул, характера межмолекулярного взаимодействия, суммарного поверхностного заряда белка, ионной силы раствора. Кроме того, белки являются очень благоприятным объектом

исследования, так как сохраняют в водных растворах постоянные массу и заряд.

Молекулы белков несут на своей поверхности электрический заряд; изменяя концентрацию свободных протонов в растворе, т.е. величину pH среды, можно варьировать знак и величину этого заряда. При определенном значении pH молекула электронейтральна, это изоэлектрическая точка молекулы. Изменение поверхностного заряда белка влияет на оптические свойства и параметры межмолекулярного взаимодействия. Большое число заряженных групп на поверхности макромолекулы обуславливает также наличие большого дипольного момента белка.

При развитии различных патологических изменений в организме параметры белковых молекул, такие, как суммарный заряд, коэффициент взаимодействия могут существенным образом изменяться. Эффективным методом исследования межмолекулярных взаимодействий макромолекул в растворах, а также определения их молекулярного веса и формы является метод интегрального рэлеевского рассеяния света. Метод динамического рассеяния света, основанный на фотонной корреляционной спектроскопии, позволяет изучать броуновское движение макромолекул в растворах, при этом определяется коэффициент трансляционной диффузии частиц и эффективный динамический радиус макромолекул или комплексов молекул.

Многие металлы необходимы для нормальной жизнедеятельности человеческого организма. Тем не менее, превышение допустимой концентрации некоторых из них создает угрозу здоровью человека. Особенно опасны тяжелые металлы. Попадая в организм человека даже в малых концентрациях, они способны нарушить нормальное течение физиологических процессов. Частично это связано с их биологической активностью. Многие тяжелые металлы проявляют комплексообразующие свойства.

Ранее в нашей лаборатории было показано, что при наличии ионов тяжелых металлов в водных растворах белков сыворотки крови (альбумина и γ -глобулина) образуются дипольные белковые кластеры [10].

Железо – наиболее распространенный химический элемент в природе и один из наиболее необходимых микроэлементов для человека, также может быть отнесен к тяжелым металлам. Важным свойством железа является то, что оно входит в состав крови. Этот элемент принимает участие в процессах кровотока, дыхания, иммунобиологических процессах, а также входит в состав многих ферментов. Поэтому актуальным является изучение взаимодействия белковых молекул с солями железа.

В ходе работы также было оценено влияние хлорида железа III и медицинского препарата «Мальтофер» на основные белки сыворотки крови – альбумин и γ -глобулин, а также на модельные растворы сыворотки крови методами светорассеяния.

Золото относится к тяжелым металлам, в связи с чем, важно исследовать, как взаимодействуют молекулы белков с НЧ золота в водных растворах. Золотые НЧ с плазмонным резонансом (ПР) являются объектами интенсивного исследования в современной нанобиотехнологии. Большинство приложений основано на комбинировании двух принципов: (1) синтез конъюгатов, включающий синтез НЧ и функционализацию их поверхности различными молекулами для обеспечения коллоидной стабильности, биосовместимости и необходимой функции (молекулярное распознавание, эндоцитоз, фототермолиз и т.п.); (2) возбуждение ПР в видимой и ближней ИК области для получения уникальных оптических свойств [11].

Возрастающий интерес науки и техники к объектам, имеющим наноразмеры, связан с тем, что они могут иметь совершенно новые свойства. Актуальность данной работы связана с широким использованием НЧ золота в различных отраслях

медицины [12]. Также, несмотря на все преимущества наноматериалов, необходимым условием их применения является проверка степени их токсичности по отношению к живому организму. Были проведены исследования, которые выявили наличие негативного эффекта вещества на наноуровне, хотя на молекулярном уровне этого не наблюдалось. Анализ распределения золотых НЧ в структурных зонах лимфатических узлов экспериментальных животных показывает, что НЧ золота размером 1-3 нм не были зарегистрированы с помощью темнопольной микроскопии, а НЧ золота размерами от 15 до 50 нм были обнаружены в виде конгломератов в цитоплазме макрофагов и лимфоцитов, преимущественно в мантийной зоне лимфоидных фолликулов [13]. Например, в статье [14] при длительном введении золотых НЧ наблюдались морфологические изменения в печени, зависящие и от размера НЧ, и от длительности их введения. Патологические изменения носили, однако, обратимый характер, так как через 14 дней после окончания эксперимента восстанавливалась структура органа.

Оценка влияния различных НЧ, биомаркеров и зондов на основные белки сыворотки крови человека является одной из перспективных областей в современных нанобиотехнологии и медицине. На данный момент активно развиваются методы лечения, диагностики, а также лекарства, основанные на различных НЧ, биомаркерах и зондах, которые доставляются к пораженной области посредством крови. Основными составляющими сыворотки крови человека являются глобулярные белки – альбумин и γ -глобулин. Присутствие различных веществ в том или ином количестве будет оказывать влияние на поведение данных белков, также как и изменение некоторых параметров (концентрации, температуры, pH среды).

Актуальность работы заключается в том, что в ней показана перспективность использования неинвазивных оптических методов, а именно, методов рассеяния света, для оценки влияния различных соединений на белки крови, как важнейшей

системы живого организма.

Целью данной диссертации являлось исследование оптических свойств и молекулярно-динамических процессов, происходящих в растворах биологических макромолекул (альбумина и γ -глобулина), при воздействии различных металлосодержащих соединений, при изменении pH , концентрации белков и ионной силы.

В данной работе были поставлены следующие **задачи**:

- изучить с помощью рэлеевского рассеяния света поведение систем, составленных из смеси основных белков сыворотки крови – сывороточного альбумина и γ -глобулина в водном растворе, которые могут служить моделями сыворотки крови, при изменении внешних параметров среды;
- сравнить результаты, полученные на модельных системах сыворотки крови, с данными по исследованию разбавленных растворов нативных образцов сыворотки крови здоровых и больных пациентов;
- изучить поведение вышеуказанных систем при добавлении хлорида железа, железосодержащего препарата «Мальтофер», а также НЧ золота.

В связи с поставленной целью **объектами исследования** являлись: альбумин, γ -глобулин, сыворотка крови человека, хлорид железа III, препарат «Мальтофер», НЧ золота. **Предметом исследования** было изучение этих систем при изменении различных внешних параметров среды (pH , концентрации, ионной силы) с помощью оптических методов.

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

- При помощи метода фотонной корреляционной спектроскопии измерены концентрационные зависимости коэффициента трансляционной диффузии для водных растворов белков альбумина и γ -глобулина, в том числе для модельных

растворов сыворотки крови человека при добавлении железосодержащих препаратов.

- С помощью метода динамического светорассеяния обнаружено, что концентрационные зависимости коэффициента трансляционной диффузии для водных растворов белка γ -глобулина при добавлении хлорида железа III не изменяются.

- Впервые методом статического рассеяния света показано, что добавление хлорида железа III к водному раствору альбумина приводит к изменению массы рассеивающих частиц при практически неизменной величине гидродинамического радиуса.

- Обнаружено, что при добавлении в растворы белков альбумина и γ -глобулина препарата «Мальтофер» подвижность рассеивающих частиц уменьшается. В случае γ -глобулина уменьшение подвижности и относительный рост массы выражены слабее, чем в случае альбумина.

- Методом статического рассеяния света, выявлено, что концентрационные зависимости параметра рассеяния для разбавленных растворов нативных образцов сыворотки крови онкобольных при добавлении НЧ золота изменяют наклон с отрицательного на положительный. Знак второго вириального коэффициента меняется на обратный.

- Обнаружено, что добавление НЧ золота, стабилизированных ПЭГ, в растворы альбумина, а также в растворы модельных систем сыворотки крови не оказывает влияние на альбумин.

- Обнаружено, что добавление НЧ золота, стабилизированных ПЭГ, в водные растворы белка γ -глобулина приводит к уменьшению коэффициента трансляционной диффузии.

Научная и практическая значимость

Основные результаты, полученные в диссертации, позволяют расширить знания о процессах, происходящих с белковыми макромолекулами при добавлении веществ, содержащих металлы (НЧ золота, хлорид железа III, железосодержащий препарат).

Результаты исследования могут быть использованы при изучении патологических процессов, происходящих в организме человека при заболеваниях, отражающихся на свойствах основных белков сыворотки крови живого организма.

Теоретической и методологической основой исследования послужили труды отечественных и зарубежных учёных по исследованию поведения основных белков сыворотки крови при изменении внешних параметров (температуры, pH , концентрации, ионной силы, при соединении их с другими веществами и т.д.). В диссертационной работе использованы экспериментальные методы – динамического и статического светорассеяния. Проведено анализ и сравнение полученных результатов с данными методов флуоресцентной спектроскопии и ИК-спектроскопии.

Положения, выносимые на защиту

1. Оптические методы – статического и динамического светорассеяния являются весьма информативными для изучения параметров рассеивающих частиц в белковых растворах, содержащих различные соединения (хлорид железа III, железосодержащий препарат «Мальтофер», а также НЧ золота). Эти методы также могут быть использованы для оценки степени влияния различных веществ на белковые системы.

2. Железосодержащие препараты слабо реагируют с основными белками сыворотки крови (альбумином и γ -глобулином), как в чистых растворах, так и в составе модельных систем сыворотки крови.

3. Наблюдаемое увеличение массы рассеивающих частиц в растворах альбумина, содержащих хлорид железа, при неизменном гидродинамическом радиусе, связано с адсорбцией ионов, образовавшихся в результате взаимодействия хлорида железа III с водой, на молекулах альбумина.

4. Концентрационные зависимости параметра рассеяния для нативных образцов сыворотки крови онкобольных при добавлении НЧ золота изменяют наклон с отрицательного на положительный, т.е. знак второго вириального коэффициента (коэффициента межмолекулярного взаимодействия) меняется на обратный.

Личный вклад диссертанта

Все вошедшие в диссертационную работу оригинальные данные получены лично автором, либо при его непосредственном участии. Автором осуществлялись планирование и проведение эксперимента, обработка экспериментальных результатов, их анализ. Совместно с руководителем д.ф.-м.н., проф. Петровой Г.П. проходило обсуждение, обобщение и интерпретация полученных результатов, а также подготовка публикаций и докладов для представления материалов диссертации на конференциях.

Достоверность и обоснованность результатов, полученных в диссертационной работе, подтверждается их соответствием экспериментальным результатам, полученным с помощью других методов, а также соответствием экспериментально полученных результатов с данными, приведенными в работах других авторов. Все эксперименты проводились на современном научном оборудовании. Результаты исследований были апробированы и представлены более чем на десяти международных конференциях в виде устных и стендовых докладов. Результаты, представленные в диссертационной работе, являются уникальными и получены впервые.

Апробация работы и публикации

Результаты, представленные в диссертационной работе, докладывались на следующих национальных и международных конференциях, симпозиумах и школах: XX International School for Young Scientists and Students on Optics, Laser Physics & Biophotonics III (Саратов, Россия, 2016), 24th Annual Student Conference Week of Doctoral Students 2015 (Прага, Чехия, 2015); 22th International Conference on Advanced Laser Technologies (ALT'14), (Кассис, Франция, 2014), XXI Международной научной конференции «Ломоносов-2014» (Москва, Россия, 2014), Всероссийская школа-конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Материалы и технологии XXI века", (Казань, Россия, 2014); International conference on Advanced Laser Technologies (ALT'13) (Будва, Черногория, 2013); 22nd Annual Conference of Doctoral Students – WDS 2013 (Прага, Чехия, 2013); ICONO/LAT'13 Conference, (Москва, Россия, 2013); 20th International Conference on Advanced Laser Technologies (ALT'12), (Тун, Швейцария, 2012); Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых по фундаментальным наукам "Ломоносов-2012" (Москва, Россия, 2012); 19th International Conference on Advanced Laser Technologies (ALT'11) (Золотые пески, Болгария, 2011); XVIII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных Ломоносов-2011, (Москва, Россия, 2011); XIV International School for Young Scientists and Students on Optics, Laser Physics & Biophotonics III (Саратов, Россия, 2010), Евразийский конгресс по медицинской физике и инженерии "Медицинская физика–2010" (Москва, Россия, 2010); XVII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2010» (Москва, Россия, 2010).

Основные результаты диссертационной работы опубликованы в 25 научных работах, из которых 11 статей и 14 тезисов.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, литературного обзора, 4 глав, заключения и 110 библиографических ссылок. Работа

написана на 135 страницах машинописного текста и включает 54 рисунков и 12 таблиц. Первая глава посвящена методам исследования изучаемых систем: методам статического и динамического рассеяния света, а также ИК-спектроскопии и методу флуоресцентной спектроскопии. Во второй главе описываются экспериментальные установки, используемые для определения оптических параметров исследуемых систем. Третья глава включает в себя описание исследуемых веществ и их основные свойства. В четвертой главе представлены основные экспериментальные результаты, полученные в данной работе. В заключение приведены основные результаты и выводы, а также список работ, опубликованных по теме диссертации.

Литературный обзор

Железо

В организме взрослого человека содержится 3-4 г железа, из которых около 3,5 мг содержится в плазме крови. Гемоглобин составляет примерно 68 % железа всего организма, ферритин – 27 %, миоглобин – 4 %, трансферрин – 0.1 %. На долю всех содержащих железо ферментов приходится всего 0.6 % железа, имеющегося в организме. Источниками железа при биосинтезе железосодержащих белков служат железо пищи и железо, освобождающееся при постоянном распаде эритроцитов в клетках печени и селезёнки [15].

Считается, что оптимальная интенсивность поступления железа составляет 10-20 мг/сутки. Дефицит железа может возникнуть, если поступление этого элемента в организм будет менее 1 мг/сутки. Порог токсичности железа для человека составляет 200 мг/сутки. Избыточное поступление в организм трехвалентного железа приводит к депонированию железа в плазме крови и тканях [15].

В нейтральной или щелочной средах железо находится в окисленном состоянии – Fe^{3+} , образуя крупные, легко агрегирующие комплексы с OH^- , другими анионами и водой. Железо легко диссоциирует и восстанавливается при низких значениях pH . Процесс восстановления и окисления железа обеспечивает его перераспределение между макромолекулами в организме. Ионы железа обладают высоким сродством ко многим соединениям и образуют с ними хелатные комплексы, изменяя свойства и функции этих соединений, в связи с этим транспорт и хранение железа в организме осуществляется с помощью особых белков. В клетках запас железа обеспечивает белок ферритин, а транспорт железа в крови осуществляет белок трансферрин [15].

Резервное железо запасается, главным образом, в печени, селезенке и костном

мозге, где хранится в белках ферритине и гемосидерине. Часть ферритина присутствует в плазме, а его концентрация служит надежным индикатором состояния запасов железа в организме. Железо осуществляет свою биологическую функцию, главным образом, в составе других биологически активных соединений (гемоглобин, миоглобин, железосодержащие ферменты), которые выполняют четыре основные функции:

- 1 транспорт электронов;
- 2 транспорт и депонирование кислорода;
- 3 участие в формировании активных центров окислительно-восстановительных ферментов;
- 4 транспорт и депонирование железа [16].

Обмен железа в организме человека достаточно экономичен. Постоянно происходит обмен между сохраняемым железом и активно метаболизируемым железом (рис. 1, рис. 2).

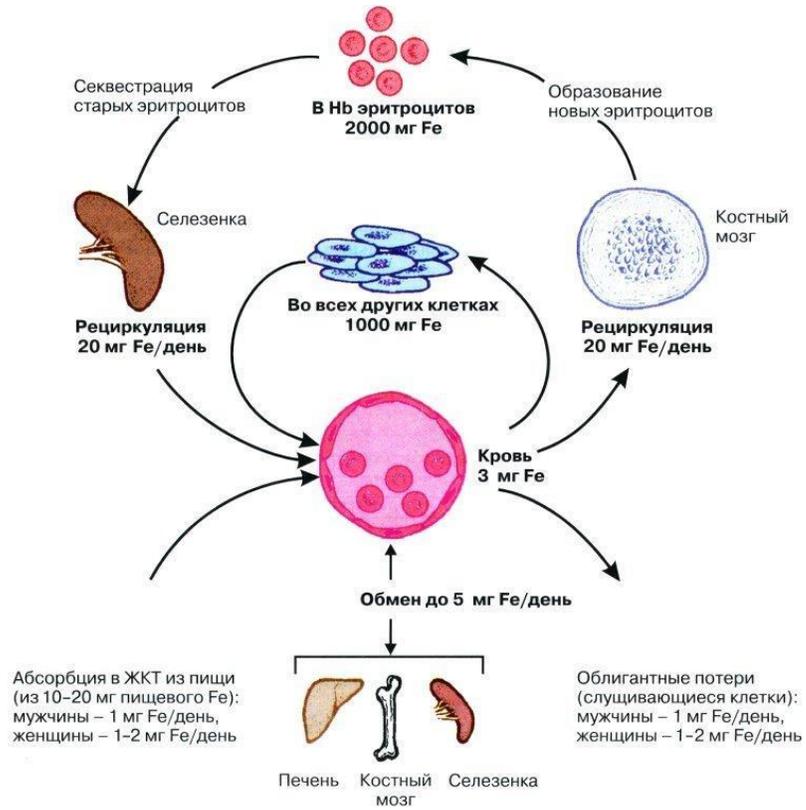


Рисунок 1. Обмен железа в организме взрослого человека [17]

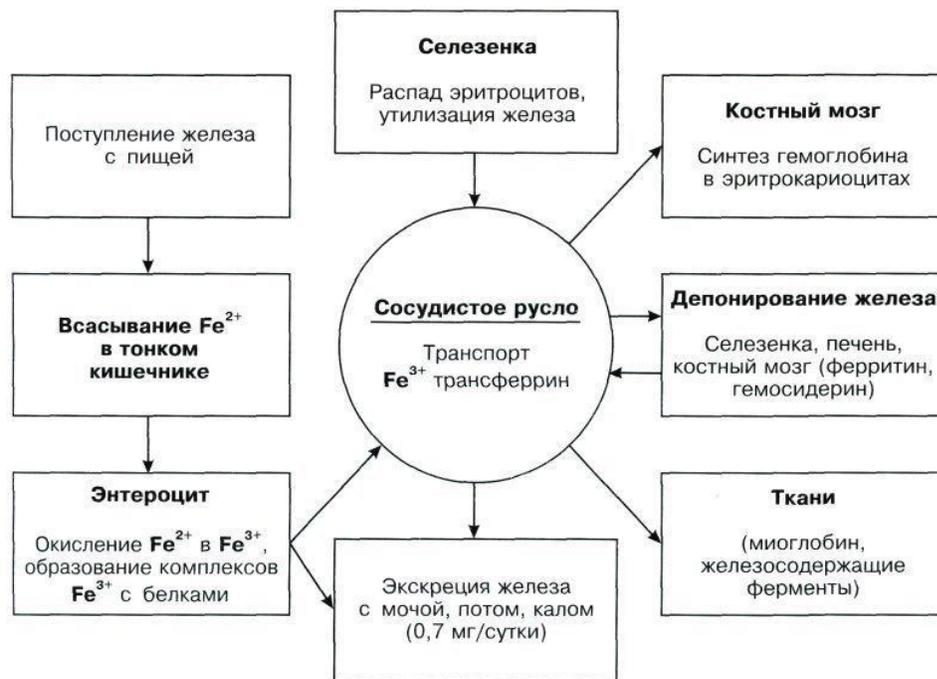


Рисунок 2. Упрощенная схема метаболизма железа в организме

В организме человека происходит постоянное перераспределение железа. В количественном отношении наибольшее значение имеет метаболический цикл: плазма→красный костный мозг→эритроциты→плазма. Кроме того, функционируют циклы: плазма→ферритин, гемосидерин→плазма и плазма→миоглобин, железосодержащие ферменты→плазма. Все эти три цикла связаны между собой через железо плазмы (трансферрин), которое регулирует распределение этого элемента в организме [16].

Организм человека хорошо сохраняет железо. После того как эритроциты, прожив 120 суток, погибают, железо возвращается в резерв костного мозга для образования новых эритроцитов. За счет распада гемоглобина в сутки высвобождается около 21-24 г железа, что во много раз превышает поступление железа из пищеварительного тракта (1-1.5 г/сут). Более 95% железа поступает в плазму из системы мононуклеарных фагоцитов, которые поглощают путем фагоцитоза более 10^{11} старых эритроцитов в сутки. Железо, поступившее в клетки мононуклеарных фагоцитов, либо быстро возвращается в циркуляцию в виде ферритина, либо откладывается про запас. Промежуточный обмен железа, в первую очередь, связан с процессами синтеза и распада гемоглобина, где центральную роль играет система мононуклеарных фагоцитов.

Таким образом, концентрация железа в сыворотке зависит от резорбции в желудочно-кишечном тракте, накопления в кишечнике, печени, селезенке и костном мозге, от синтеза и распада гемоглобина и его потери организмом. Оптимальным для здоровья пациента является состояние, при котором запасы железа в организме достаточны, но не избыточны [16].

Согласно современным представлениям, наиболее адекватными тестами для оценки метаболизма железа в организме являются определение уровня железа, трансферрина, насыщения трансферрина железом, ферритина, содержания растворимых трансферриновых рецепторов в сыворотке [17].

В литературе практически отсутствуют статьи по исследованию взаимодействия солей железа с сывороточными белками. Имеется, однако, несколько работ, например, [18], в которой исследовалось взаимодействие бычьего сывороточного альбумина (БСА) и НЧ железа с размером порядка 5 нм. Было обнаружено, что НЧ железа с положительными зарядами комбинируются с группой $-\text{COO}^-$ белка. Они взаимодействуют друг с другом посредством электростатических сил и, таким образом, формируют совокупности более крупных частиц. В работе были получены спектры света, рассеянного НЧ железа и смесью из НЧ железа и БСА, которые показывают, что интенсивность света, рассеянного НЧ железа, очень мала. Однако когда НЧ смешивают с БСА, интенсивность рассеянного света значительно повышается в диапазоне длин волн 300-600 нм и достигает максимума при 451 нм, даже при малой концентрации БСА (около 0.1 мкг/мл).

В ряде других работ исследовались водные растворы БСА [19, 20]. Американской группой ученых из университета штата Огайо определялись коэффициенты трансляционной диффузии БСА в интервале концентраций 0-200 мг/мл, с помощью лазерного квазиупругого светорассеяния. Диффузия белка была изучена в системах, pH которых составлял 7.4 [19]. В данной статье было обнаружено, что при увеличении концентрации БСА, коэффициент трансляционной диффузии уменьшался незначительно.

Изменение конформации белка в зависимости от pH исследовала группа ученых из университета Туниса [20]. В работе изучалось поведение гидродинамического радиуса под влиянием pH при угле рассеяния $\theta=173^\circ$. Показано, что гидродинамический радиус белка является постоянным в широком диапазоне pH (R_h изменяется от 38 до 44 Å). Эти значения близки к упомянутым результатам, полученным в исследованиях [21]. Увеличение размера белка при $pH < 3$ свидетельствует о денатурации БСА [20].

В статье [22] доказывается, что свободный от гема БСА обладает одним специфичным сайтом связывания с Fe^{3+} . Связывание ионов Fe^{3+} с БСА приводит к тушению флуоресценции триптофана у БСА. Временная зависимость тушения флуоресценции БСА ионами Fe^{2+} не вызвана конформационным изменением белка БСА, а вызвана окислением Fe^{2+} кислородом до Fe^{3+} в аэробных условиях, ускоряется этот процесс при взаимодействии БСА с Fe^{3+} и замедляется в анаэробных условиях. Авторы предполагают, что БСА может принимать участие в транспортировке железа, не связанной с трансферрином.

Ранее рассматривалось взаимодействие БСА с другими металлами, например, в работе [23] рассмотрено взаимодействие БСА с европием. Было получено, что европий может быть использован как флуоресцентный зонд для определения числа связанных и свободных ионов европия III в белковом растворе. Используя модель Скэтчарда можно корректно определить число и тип сайтов связывания, а также значения констант комплексообразования. Т. Н. Тихонова численно рассчитала модель ступенчатого связывания альбумина с лигандами (ионами европия III), на основе которой выводится модифицированное уравнение Штерна-Фольмера, а также исследовала локальное распределение ионов европия III по сайтам связывания альбумина. В работе было показано, что происходит неравномерное распределение ионов европия III по сайтам связывания из-за конформационных изменений белка [23]. Авторами статьи [24] было изучено влияние катионов свинца на БСА методом флуоресцентной спектроскопии. Было получено, что при концентрациях Pb^{2+} меньших предельно допустимых, не наблюдается агрегации БСА, но в тушение его флуоресценции вносят вклад ионы свинца [24].

В статье [25] было рассмотрено взаимодействие между комплексом железа (Fe(III)-DFX) и человеческим сывороточным альбумином (ЧСА) различными методами, в частности методом флуоресценции, спектроскопии кругового дихроизма (КД). В результате было определено количество центров связывания,

измерена интенсивность флуоресценции в присутствии комплекса железа. В итоге получено, что интенсивность флуоресценции ЧСА падает в присутствии железа при изменении температуры, что объясняется образованием комплекса ЧСА-(Fe(III)-DFX). Количественные данные анализа КД спектров показали значительные изменения вторичной структуры ЧСА в присутствии комплекса Fe(III)-DFX в водном растворе с уменьшением содержания α -спиралей и повышением β -поворотных структур. В данной работе [25] также получено, что у белка есть один центр связывания для данного комплекса железа.

В статье [26] рассмотрено взаимодействие ЧСА, белка, который играет основную роль в распределении основных ионов переходных металлов в организме человека, и различных металлов. ЧСА является важным физиологическим переносчиком ионов таких металлов, как Cu^{2+} и Zn^{2+} в крови. Обнаружено, что белок имеет четыре центра связывания металлов, причем каждый из них подходит строго под определенный металл.

В статье [27] изучено влияние моно- и бис-клатрохелатов Fe(II) на флуоресценцию белков (БСА, β -лактоглобулин, лизоцим и инсулин). Выявлено, что данный клеточный комплекс не оказывает значительного влияния на флуоресцентные свойства β -лактоглобулина, лизоцима и инсулина. В то же время, связывание моноклатрохелатов с БСА приводит к существенному тушению флуоресценции белка. Этот результат объясняется формированием супрамолекулярных БСА-клатрохелат комплексов, из-за передачи энергии возбуждения от остатка триптофана клеточному комплексу или / и в изменения ближайшего окружения триптофанового остатка, вызванного либо связыванием клатрохелатом или из-за изменения конформации БСА. Влияние бис-клатрохелата Fe (II) на флуоресценцию БСА значительно слабее по сравнению с его моноклатрохелатными аналогами, в следствии его большего размера.

В статье [28] рассматривается процесс образования дипольных нанокластеров при взаимодействии альбумина и γ -глобулина с ионами европия и калия. Исследования проводились методом фотонной корреляционной спектроскопии и атомно-силовой микроскопии (АСМ). В ходе работы были получены коэффициенты трансляционной диффузии, а также эффективные радиусы рассеивающих частиц в растворах при изменении pH и концентрации солей. Авторами [28] показано, что добавление соли $\text{Eu}_3(\text{NO}_3)_3$ вызывает увеличение размера белка примерно в 20 раз, что было подтверждено при помощи АСМ.

Авторами статьи [29] выявлено образование дипольных кластеров в водных растворах белка альбумина при добавлении металла – гадолиния (входящего в хелатный комплекс гадодиамида). При увеличении концентрации гадодиамида коэффициент диффузии уменьшается. Данное явление может быть связано с тем, что в растворе гадодиамида существует определенное количество свободных ионов гадолиния. В работе [30] методом статического светорассеяния показано, что существует взаимодействие между белками (альбумином и γ -глобулином) и гадопентетовой кислотой, что приводит к изменению знака коэффициента межмолекулярного взаимодействия – B , т.е. к смене наклона экспериментальной кривой на противоположный. Одной из возможных причин данного явления может быть изменение конформации белка из-за добавления гадопентетовой кислоты, также изменяется молекулярная масса рассеивающих частиц.

Наночастицы золота

В современном мире большой интерес вызывают нанообъекты, в особенности различные НЧ, в частности, НЧ золота. НЧ золота применяются в биологии и медицине в таких направлениях, как биосенсорика, визуализация и фототермолиз раковых клеток, направленная доставка лекарственных веществ в клетку [31]. Например, прикрепленную антителами к раковой клетке золотую НЧ можно нагреть

лазерным излучением до температуры выше 100 °С, уничтожив при этом саму клетку. Нагрев также может заставить открыться капсулу с противораковым препаратом, который будет доставлен точно к месту назначения [32].

Интересное применение нашли НЧ золота в виде “золотой пули” – лекарства, селективно поражающего только злокачественные клетки, и оставляющего нетронутыми здоровые клетки организма. Этот метод уже оправдал себя в борьбе с рядом заболеваний, затрагивающих различные компоненты крови [33].

В работе [34] ученые исследовали НЧ золота, используемые для ранней диагностики рака печени. Они окружили НЧ золота (размером от 10 до 50 нм) двумя полиэлектролитными оболочками толщиной 1 нм. Покрытия придают НЧ электрический заряд, который увеличивает вероятность того, что они будут поглощены раковыми клетками. Наличие НЧ золота в злокачественных клетках определяется с помощью рентгеновского анализа. В результате лабораторных исследований оказалось, что НЧ золота составили около 0.0006 процента от объема клетки, но имели достаточную массу, чтобы их можно было визуализировать с помощью специальной аппаратуры. Данный метод позволяет обнаружить опухоль размером порядка нескольких миллиметров, а существующие в настоящее время методы диагностики (УЗИ, КТ и ЯМР сканирование), позволяют выявить опухоли размером не менее 5 см в диаметре.

Рядом авторов [35] были проведены исследования взаимодействия белков – альбумина, фибриногена, γ -глобулина, гистона, и инсулина с так называемыми поверхностно-функционализированными (п.ф.) золотыми НЧ (с размером от 5 до 100 нм). Было обнаружено, что п.ф. НЧ золота связываются с поверхностью белков, а степень связывания зависит от размера частиц и исходной структуры белка.

В работе [36] было показано, что на начальных стадиях агрегации НЧ золота с биополимерами, спектры рассеяния являются более чувствительным тестом для выявления степени агрегации, по сравнению со спектрами поглощения. В связи с

этим спектры поглощения можно применять для аналитического определения биополимеров, инициирующих агрегацию НЧ золота.

В работе [37] было исследовано взаимодействие БСА с НЧ золота, полученными с помощью метода лазерной абляции в жидкости. Авторы [37] делают вывод о возникновении ассоциатов НЧ золота с молекулами БСА на основе смещения полосы поверхностного ПР на 5-6 нм. По данным [37] размер ассоциатов превышает размер исследуемых НЧ золота и БСА примерно в 10 раз, при этом НЧ золота имеют размеры ~ 3 нм, т.е. размеры исследуемых НЧ и белка альбумина были практически одинаковыми.

В статье [38] исследовалась адсорбция желатина и γ -глобулина на золотых НЧ с размером 15 и 34 нм. Авторы предполагают, что формируется адсорбционный полимерный слой на НЧ золота с размером 34 нм. Добавление γ -глобулина в раствор приводит к изменению среднего гидродинамического размера частиц от $d_g \approx 35$ нм до $d_1 = d_g + 2s \approx 45-46$ нм, что соответствует средней толщине адсорбированного слоя $s = (45-35)/2 \approx 5$ нм. Аналогичный результат получился и для золотых НЧ с размером 15 нм.

В работе [39] авторы считают, что статическое рассеяние света позволяет проводить мониторинг агрегации полимеров и НЧ золота разных размеров, также рассматриваются оптические свойства и биомедицинские приложения наноструктур, основанных на золотых биоконъюгатах.

Сравнительно недавно в работах [10, 40] было обнаружено новое явление – образование макромолекулярных кластеров в водных растворах белков при наличии солей тяжелых щелочных металлов RbCl и CsCl. Поведение белков в растворах определяется сильным электростатическим взаимодействием между зарядами на поверхности макромолекул. Однако оказалось, что при определенных условиях (когда силы заряд-зарядового взаимодействия экранируются ионами тяжелых металлов) в таких системах, как и в термотропных жидких кристаллах,

существенную роль начинают играть диполь-дипольные взаимодействия, что приводит к изменениям как статических, так и динамических параметров молекул.

В связи с вышеперечисленными научными результатами особый интерес представляет изучение влияния различных НЧ золота, на свойства белков сыворотки крови – альбумина и γ -глобулина в водных растворах.

Методом динамического светорассеяния были изучены водные растворы белка альбумина при добавлении НЧ кремния (NPSi) [41]. Авторы изменяли значение pH растворов. В результате авторы получили две составляющие для коэффициентов трансляционной диффузии частиц. Одна из них соответствует подвижности макромолекулы альбумина, другая – исследованным НЧ кремния. Не было обнаружено какой-либо компоненты, указывающей на возникновение агрегатов НЧ кремния с белком в изученных растворах.

В работе [42] с помощью метода динамического светорассеяния исследовались водные растворы белка альбумина и НЧ алмаза. В результате адсорбции альбумина на НЧ алмаза образуются частицы больших размеров. В работе получены концентрационные зависимости среднего гидродинамического радиуса образовавшихся частиц. Обнаружено, что карбоксилирование поверхности НЧ алмаза и предварительное покрытие их альбумином приводит к снижению адсорбции молекул белка на поверхности НЧ и уменьшению их среднего гидродинамического радиуса.

Методами статического и динамического светорассеяния были исследованы модельные растворы сыворотки крови [43]. Исследования модельных систем сыворотки крови показали, что для «здоровых» пациентов зависимость параметра рассеяния имеет положительный наклон, а для «больных» – отрицательный. 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 модельных растворах сыворотки крови «здоровых» пациентов с добавлением хлорида цезия знак коэффициента межмолекулярного взаимодействия не меняется (положительный наклон сохраняется), а в модельных образцах сыворотки крови «больных» пациентов он меняется на противоположный (отрицательный наклон становится положительным). Значение эффективной массы рассеивающих частиц в модельных растворах «больных» пациентов значительно больше значения массы для модельных растворов «здоровых», что, вероятно, связано с агрегацией молекул γ -глобулина при воздействии ионов цезия в первом случае.

Глава 1. Теоретические основы исследования

1.1 Взаимодействия молекул в растворах белков

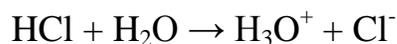
1.1.1 Электролиты

Сильными считаются электролиты [44], которые в водных растворах полностью или почти полностью распадаются на ионы. К ним относятся соединения с ионной связью (соли) и соединения с ковалентной полярной связью.

При растворении в воде соединений с ионной связью под действием полярных молекул воды происходит их распад на гидратированные ионы противоположного знака, т.е. диссоциация:



При растворении в воде соединений с полярной ковалентной связью (HCl, HI, HNO₃) под действием диполей воды происходит ионизация ковалентной полярной связи и последующая диссоциация. Процесс диссоциации хлороводородной кислоты в водном растворе представляется уравнением:



Гидратированный ион водорода (H⁺·aq) принято записывать в виде иона оксония H₃O⁺. В водных растворах сильных электролитов гидратированные ионы электростатически взаимодействуют друг с другом (притягиваются и отталкиваются), создавая, так называемую, ионную атмосферу. Ионная атмосфера определенным образом влияет на подвижность ионов в растворе и на характер их взаимодействия. Влияние ионной атмосферы на ход химических реакций учитывается вычислением ионной силы раствора и заменой концентрации ионов их активностью.

В основе теории взаимодействия электролитов Дебая-Хюккеля [45, 46, 47] лежат следующие постулаты:

1) электролит полностью диссоциирует в разбавленных растворах ($c=5 \cdot 10^{-4}$ М – область Дебая)

2) вокруг каждого иона создается оболочка из ионов противоположного знака. Каждый ион сольватирован. Такое окружение называют ионной атмосферой.

В растворе наблюдается следующее: вблизи каждого иона в большей степени находятся ионы противоположного знака из-за электростатического притяжения между положительным и отрицательным ионами. Вследствие этого получаем, что суммарный заряд центрального иона равен суммарному заряду атмосферы противоионов. Плотность данной атмосферы характеризуется параметром α , который определяется через общую концентрацию ионов в растворе (1):

$$\alpha^2 = \frac{4\pi e^2 \mu}{\epsilon_0 \epsilon kT} \quad (1)$$

Мерой электростатического взаимодействия ионов в растворе является ионная сила раствора – μ , равная полусумме произведений молярных концентраций всех присутствующих в растворе ионов на квадраты их зарядов (2):

$$\mu = 0,5 \sum_i C_i \cdot Z_i^2 \quad (2)$$

где: C_i – молярная концентрация i -го иона, Z_i – заряд i -го иона [48].

На величину электростатического взаимодействия ионов в растворе не влияют электронейтральные молекулы (неэлектролиты или слабые электролиты), поэтому их не учитывают при вычислении ионной силы раствора.

Для бинарных электролитов с однозарядными ионами (NaCl, HCl, HI, HNO₃) ионная сила раствора равна молярной концентрации этого электролита, т. е. $\mu(\text{NaCl}) = C(\text{NaCl})$. В случае бинарных электролитов с двухзарядными ионами (FeSO₄, MgSO₄) ионная сила раствора в четыре раза больше концентрации этого

электролита, т.е. $\mu(\text{FeSO}_4) = 4C(\text{FeSO}_4)$. Для трехионных электролитов (K_2SO_4 , MgCl_2) ионная сила раствора в три раза больше концентрации этого электролита, т.е. $\mu(\text{K}_2\text{SO}_4) = 3C(\text{K}_2\text{SO}_4)$.

Для раствора, содержащего несколько сильных электролитов, ионная сила равна сумме ионных сил, создаваемых каждым из них.

1.1.2 Ионный показатель раствора

Заряд молекулы белка зависит от концентрации свободных ионов водорода (протона). Значение pH определяется следующей формулой (3):

$$pH = \log \frac{1}{H^+} = -\log H^+ \quad (3)$$

Водородный показатель pH характеризует концентрацию свободных ионов водорода в воде, т.е. представляет собой логарифм концентрации ионов водорода, взятый с обратным знаком. Для чистой воды pH составляет 7, для щелочного раствора $pH > 7$, для кислого раствора $pH < 7$. Основание является акцептором протона, а кислота служит донором протона. При смещении pH в растворе изменяется концентрация ионов H^+ . При снижении pH ниже изоэлектрической точки ионы H^+ присоединяются к отрицательно заряженным группам глутаминовой и аспарагиновой кислот и нейтрализуют их. Заряд белка при этом становится положительным, а при увеличении pH в растворе выше изоэлектрической точки концентрация ионов H^+ снижается и положительно заряженные группы белка (NH_3^+ -группы) теряют протоны, их заряд исчезает. Суммарный заряд белка становится отрицательным [49].

В организме человека pH поддерживается на относительно постоянном уровне. В крови величина pH обычно меняется в диапазоне 7.35-7.45. Это соответствует изменению концентрации водородных ионов не более чем на 30%.

1.1.3 Виды взаимодействий белковых макромолекул

В таблице 1 приведены краткие характеристики типов связей (ионной, ковалентной, комплексообразующей, водородной и межмолекулярного взаимодействия) [50].

Химическая связь	I. Ионная связь	600-1000	↑	↑
	II. Ковалентная связь (одинарная)			
Межмолекулярное взаимодействие	а) полярная	150-600	↑	↑
	б) неполярная	100-400		
	III. Комплексообразование			
	а) сильное	150-400		
	б) слабое	<40		
IV. Водородная связь	5-25 до 40	↓	↓	
V. Межмолекулярное взаимодействие				
а) ориентационное	0-15			
б) индукционное	0-2			
в) дисперсионное	0-20 до 60			

Таблица 1. Характеристика различных типов связей

1.2 Теоретическая основа исследования

1.2.1 Основы метода динамического рассеяния света

Для измерения размеров рассеивающих частиц – гидродинамических радиусов (R_h) и коэффициентов трансляционной диффузии (D_t) используется метод динамического рассеяния света (ДРС) [51]. Данный метод позволяет определить коэффициент диффузии дисперсных частиц в жидкости путем анализа характерного времени флуктуаций интенсивности рассеянного света. Далее, из коэффициента диффузии рассчитывается радиус частиц.

В методе корреляций фотонов сигнал анализируется во временной области. Анализ в этой области позволяет найти автокорреляционную функцию фототока. Цифровой метод нахождения автокорреляционной функции фотоэлектронов используется в данном методе.

Фототок складывается из постоянной составляющей, составляющей с разностными частотами («биение» сигнала) и дробового шума (рис. 3).

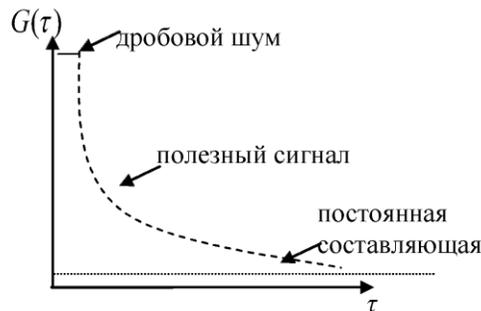


Рисунок 3. Автокорреляционная функция рассеянного света

Коррелятор состоит из регистра сдвига и многоканального цифрового накопителя.

- 1) Сигнал, выходящий из фотодетектора, представляет собой последовательность импульсов тока ФЭУ.
- 2) Измерение чисел фотоотсчетов — пересчитывание электрических импульсов за время выборки T .
- 3) Обработка сигнала.

Сигнал непрерывно проходит через регистр сдвига. После каждого интервала задержки новая выборка сигнала поступает в первую ячейку регистра, содержимое других ячеек смещается на одну ячейку, содержимое последней — стирается.

За время сдвига содержимое первой ячейки умножается на отсчеты, хранящиеся в других ячейках, и записывается в соответствующий канал накопителя.

При многократном повторении – в накопителе создается автокорреляционная функция.

Хаотическое броуновское движение дисперсных частиц в жидкости вызывает микроскопические флуктуации их локальной концентрации, которые приводят к локальным неоднородностям показателя преломления среды. Часть света будет рассеяна на этих неоднородностях при прохождении лазерного луча через такую среду. Флуктуации интенсивности рассеянного света соответствуют флуктуациям локальной концентрации дисперсных частиц. Информация о коэффициенте диффузии частиц содержится в зависящей от времени корреляционной функции флуктуаций интенсивности:

$$G_{12}(\tau) = \langle I_1(t)I_2(t + \tau) \rangle, \quad (4)$$

где τ – время задержки, а угловые скобки – усреднение интенсивности по времени t . Автокорреляционная функция описывает связь между сигналом в момент времени t и этим же сигналом в момент времени: $t + \tau$:

$$G_{11}(\tau) = \langle I_1(t)I_1(t + \tau) \rangle. \quad (5)$$

Алгоритм корреляции состоит в перемножении сигнала с сигналом, который был задержан по времени, а затем интегрировании этого произведения.

Спектр рассеянного света расширяется в зависимости от различных изменений фазы. Половина ширины спектра рассеянного света определяется формулой:

$$\Gamma = D_t q^2, \quad (6)$$

где D_t – это линейный коэффициент диффузии броуновских частиц, а q – это модуль вектора рассеянной волны,

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2}, \quad (7)$$

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

Для монодисперсной задержки коэффициент диффузии связан с гидродинамическим радиусом частицы R_h формулой Стокса-Эйнштейна:

$$D_t = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h}, \quad (8)$$

где k_B – константа Больцмана, T – абсолютная температура, η – вязкость растворителя.

1.2.2 Основы статического метода светорассеяния

Детальное изучение свойств рассеянного света позволяет получить сведения о структуре молекул и молекулярных систем, о природе межмолекулярных и внутримолекулярных сил, а также производить качественный и количественный анализ различных соединений [52].

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

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

$$E_s = \sum_i A_i(t) e^{i\vec{q} \cdot \vec{r}_i(t)} e^{-i\omega_0 t}, \quad (9)$$

где \vec{q} – волновой вектор рассеяния, A_i – амплитуда. $|\vec{q}| = \left| \vec{k}_0 - \vec{k}_s \right| = 2 \left| \vec{k}_0 \right| \sin \frac{\theta}{2} = \frac{4\pi n_0}{\lambda_0} \sin \frac{\theta}{2}$, n_0 – показатель преломления среды, так как частоты падающего и рассеянного света близки, то $\left| \vec{k}_0 \right| \approx \left| \vec{k}_s \right|$ – волновые векторы падающего и рассеянного сигналов соответственно, θ – угол рассеяния, i – рассеивающий элемент в объеме, а λ_0 – длина волны падающего света в вакууме [51, 53].

При изменении структуры i -ой рассеивающей частицы или ее ориентации (если частица анизотропна) амплитуда рассеяния A_i будет изменяться со временем. Поскольку $r_i = r_i(t)$, то изменяется фазовый множитель e^{iqr_i} .

Из формулы (6) можно определить следующие величины, которые можно измерить экспериментально [51]:

1. Средняя интенсивность:

$$I_s = \langle |E_s|^2 \rangle = \langle \sum_i \sum_j A_i A_j e^{i\vec{q} \cdot (\vec{r}_i - \vec{r}_j)} \rangle. \quad (10)$$

2. Автокорреляционная функция сигнала:

$$G^{(1)}(\tau) = \langle E_s^*(t) E_s(t + \tau) \rangle. \quad (11)$$

3. Оптический спектр

$$I(\omega) = \frac{1}{2\pi} \int G^{(1)}(\tau) e^{i\omega\tau} d\tau. \quad (12)$$

4. Автокорреляционная функция интенсивности

$$G^{(2)}(\tau) = \langle E_s^*(t) E_s(t) E_s^*(t + \tau) E_s(t + \tau) \rangle. \quad (13)$$

Рассеянный световой сигнал обычно можно считать стационарным гауссовым случайным процессом. Кроме того, предположим сначала, что положения рассеивателей в разбавленном растворе не коррелированы [54, 55, 56].

1.2.3 Теория Рэлея-Дебая.

Молекулярную массу малых не взаимодействующих частиц позволяет определить уравнение рассеяния [57]:

$$M = \left(\frac{cHK}{R_{90}} \right)^{-1}, \quad (14)$$

здесь K – фактор Кабанна, c – концентрация, H – оптическая постоянная раствора, R_{90} – рэлеевское отношение для света, рассеянного под углом 90° . Однако в большинстве полимерных растворов сказывается влияние межмолекулярных взаимодействий.

Эйнштейн, используя термодинамику, получил более общее выражение для R_{90} [58]. Рассматривая рассеяние на флуктуациях диэлектрической проницаемости, обусловленных флуктуациями ΔN числа рассеивающих частиц в элементарных объемах, малых по сравнению с λ^3 , но содержащих еще достаточное число молекул, он пришел к выражению:

$$R_{90} = \frac{2\pi^2 n_0^2 \left(\frac{dn}{dc} \right)^2}{\lambda_0^4 N_A \frac{1}{RT} \frac{\partial \Pi}{\partial c}}, \quad (15)$$

где Π – осмотическое давление раствора. Дебаем было выведено такое же выражение [59, 60].

Физический смысл зависимости коэффициента рассеяния от $\left(\frac{\partial \Pi}{\partial c} \right)$ заключается в следующем: разность осмотических давлений в соседних областях препятствует развитию флуктуаций концентрации в растворе, т.о. чем больше $\left(\frac{\partial \Pi}{\partial c} \right)$, тем меньше развиты флуктуации и меньше коэффициент рассеяния.

В случае скомпенсированных межмолекулярных взаимодействий для идеальных растворов выполняется закон Вант-Гоффа:

$$\Pi = \frac{cRT}{M}. \quad (16)$$

Для неидеальных растворов осмотическое давление представимо в виде степенного ряда концентрации:

$$\Pi = RT(Ac + Bc^2 + Cc^3 + \dots), \quad (17)$$

где A , B , C и т.д. – вириальные коэффициенты раствора, $A = \frac{1}{M}$. Отсюда получаем окончательное выражение для разбавленных растворов макромолекул получаем:

$$\left(\frac{cHK}{R_{90}}\right) = \frac{1}{M} + 2Bc + \dots \quad (18)$$

С помощью полученной зависимости R_{90} от c нельзя определить M путем измерения R_{90} при одной концентрации. Необходимо провести измерения для нескольких c и экстраполировать результаты к $c=0$. Т.о., получаем:

$$M = \left(\frac{cHK}{R_{90}}\right)_{c \rightarrow 0}^{-1}. \quad (19)$$

Оптическая постоянная раствора – H находится путем рефрактометрических измерений $\frac{dn}{dc}$ (для биологических молекул составляет $0,19 \text{ см}^3/\text{г}$), т.к.

$$H = \frac{2\pi^2 n_0^2}{\lambda_0^4 N_A} \left(\frac{dn}{dc}\right)^2, \quad (20)$$

где n_0 – показатель преломления растворителя, N_A – постоянная Авогадро, λ_0 – длина падающей волны.

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

Напомним, что второй вириальный коэффициент характеризует степень неидеальности раствора и учитывает парные межмолекулярные взаимодействия в растворе [61]. Термодинамическая теория растворов макромолекул дает следующее выражение для B :

$$B = \frac{v_0 N_A}{2M^2}, \quad (21)$$

где v_0 – исключенный объем, т.е. объем, из которого молекула вытесняет все остальные. Для сферических рассеивающих частиц:

$$B = \frac{4v}{M}, \quad (22)$$

где v – удельный объем ($\text{см}^3/\text{г}$) [51].

Отметим также, что мультиплетные взаимодействия, описываемые третьим вириальным коэффициентом, проявляются в искривлении прямых, выражающих зависимость $\frac{cHK}{R_{90}}$ от c .

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

1.2.4 Теория молекулярной адсорбции Ленгмюра

Адсорбция — процесс концентрирования газообразного или растворенного

вещества на границе раздела фаз. Различают адсорбцию газа на твердом теле, адсорбцию растворенного вещества на границе раствор – газ и, наконец, адсорбцию растворенного вещества на границе твердое тело – раствор. Явление адсорбции представляет интерес для коллоидных систем, имеющих большую площадь поверхности.

Существует несколько теорий физической адсорбции, одна из которых теория мономолекулярной адсорбции. Она была предложена в 1915 г. американским ученым Ленгмюром, но, как отмечал сам Ленгмюр, им были использованы представления об адсорбционных силах, впервые выдвинутые русским ученым Л. Г. Гурвичем.

При разработке теории Ленгмюр исходил из следующих положений [62]

1. Адсорбция является локализованной и вызывается силами, близкими к химическим.

2. Адсорбция молекул адсорбтива происходит на активных центрах, которые находятся на поверхности адсорбента. Например, пики и возвышения, имеющиеся на любой, даже самой гладкой поверхности могут являться такими центрами.

Около таких пиков и выступов за счет большой ненасыщенности силового поля могут удерживаться налетающие молекулы газа, причем центр тем более активен, чем ненасыщеннее молекулы адсорбента на его поверхности.

Принято, что активные центры занимают лишь малую часть поверхности адсорбента. Это подтверждается тем, что количество яда, отравляющего катализатор, обычно, значительно меньше количества, нужного для покрытия ядом всей адсорбционной поверхности.

3. Вследствие малого радиуса действия адсорбционных сил, имеющих природу, близкую к химической, и способности их к насыщению каждый активный центр, адсорбируя молекулу адсорбтива, становится уже неспособным к дальнейшей

адсорбции. В результате этого на поверхности адсорбента может образоваться только мономолекулярный слой адсорбтива.

4. В течение определенного промежутка времени активные центры могут удерживать адсорбированные молекулы. Спустя некоторое время, из-за флуктуации кинетической энергии, молекулы отрываются от поверхности адсорбента и переходят в газовую фазу. Активные центры могут адсорбировать новые молекулы взамен этих, которые, в свою очередь, десорбируются и т.д.

5. Силы взаимодействия между адсорбированными молекулами Ленгмюр не учитывал. Иначе говоря, согласно Ленгмюру, время пребывания молекул газа на активных центрах не зависит от того, заняты молекулами газа соседние активные центры или нет [62].

1.2.5 Теория ионной адсорбции

Ионная Адсорбция может проходить по двум механизмам:

1. Обменная адсорбция. При этом вместо ионов, адсорбируемых из раствора твёрдой фазой, из твёрдой фазы выделяется эквивалентное количество ионов того же знака. Примером такой адсорбции является адсорбция ионов солей ионитами.

Иониты – это высокомолекулярные соединения, при диссоциации выделяющие в воду большое количество одноатомных ионов и высокомолекулярный ион противоположного знака. По типу выделяемых ионов они делятся на 2 класса: катиониты и аниониты. При диссоциации катионитов образуется высокомолекулярный анион, в воду выделяется множество катионов. При диссоциации анионитов, соответственно, происходит выделение в воду анионов.

Процесс ионного обмена выглядит следующим образом. Вначале ион, содержащийся в растворе – он называется вытесняющий ион – попадает на

поверхность ионита, потом диффундирует в объём ионита туда, где происходит акт обмена. Вытесняемый ион диффундирует из объёма ионита к его поверхности и переходит в раствор.

2. Специфическая адсорбция заключается в поглощении твёрдой фазой ионов, достраивающих её кристаллическую решётку. При этом вокруг фазы образуется слой противоионов. Формируется двойной электрический слой.

Строение двойного электрического слоя наиболее точно описывается современной теорией Штерна:

1. Поверхность твёрдой фазы адсорбирует ионы, достраивающие её кристаллическую решётку – потенциалопределяющие ионы

2. Адсорбционные силы принимают участие и в образовании первого слоя противоионов – адсорбционного слоя. Ионы этого слоя притягиваются к заряженной поверхности твёрдой фазы электростатическими силами и затем адсорбируются.

3. За адсорбционным слоем образуется диффузный слой противоионов. Количество ионов в нём такое, что они полностью нейтрализуют оставшийся противоположный заряд потенциалопределяющих ионов [63].

1.3 Флуоресцентная спектроскопия

Флуоресценция веществ дает возможность получать информацию о самых различных физических и биологических процессах. Макромолекулы белков, как и большинство органических соединений, являются флуорофорами, а также взаимодействуют с веществами, способными флуоресцировать, таким образом, метод флуоресценции может быть использован для анализа поведения макромолекул белков, в частности их взаимодействия с другими веществами, например, тяжелыми металлами. Данный метод обладает высокой чувствительностью к обнаружению малых концентраций вещества в биологических образцах, а также удобным

временным диапазоном. Еще одним важным свойством флуоресцентного метода является то, что он не нарушает естественного хода биологических процессов, и, таким образом, успешно может применяться для медицинских исследований.

1.3.1 Основные понятия люминесцентной спектроскопии

В электронной спектроскопии [64] изучают энергетические переходы между различными электронными состояниями атомов и молекул.

При переходе из состояния с более высокой энергией E_1 в состояние с меньшей энергией E_2 происходит выделение или поглощение энергии в виде кванта света с частотой ν :

$$h\nu = E_1 - E_2. \quad (23)$$

В общем случае оптические спектры делятся на:

- 1) спектр рассеяния, падающая энергия меньше энергии возбуждения молекулы, электронная оболочка только возмущается, не перестраивается;
- 2) спектр испускания – переход молекулы из состояния с высокой энергией в состояние с более низкой энергией;
- 3) спектр поглощения [53].

Люминесценцией называют испускание фотонов из электронно-возбужденных состояний, при переходе в основное состояние (состояние с низкой энергией). При люминесценции предусматривается предварительный перевод молекул в возбужденное состояние, путем поглощения молекулами квантов излучения.

Люминесценция подразделяется на 2 вида, в зависимости от электронного состояния, в котором находилась молекула до своего перехода в основное состояние.

Флуоресценция – это излучательный переход между двумя состояниями одинаковой мультиплетности ($M=2S+1$, где S -суммарный спин данного состояния).

Такие переходы разрешены квантовомеханически, время затухания флуоресценции порядка 10^{-8} с.

Фосфоресценция – испускание при переходе между состояниями различной мультиплетности, как правило, из возбужденного триплетного в основное синглетное. Такие переходы не разрешены, поэтому время затухания значительно больше, чем время затухания флуоресценции. Синглетным называют такое состояние, в котором электроны на более высокой энергетической орбитали и второй электрон на орбитали с энергией ниже имеют противоположную ориентацию спинов (спаренные электроны), т.е. в синглетном состоянии $M=1$, а в триплетном, соответственно, $M=3$.

Поглощение и испускание света иллюстрирует диаграмма Яблонского (рис. 4).

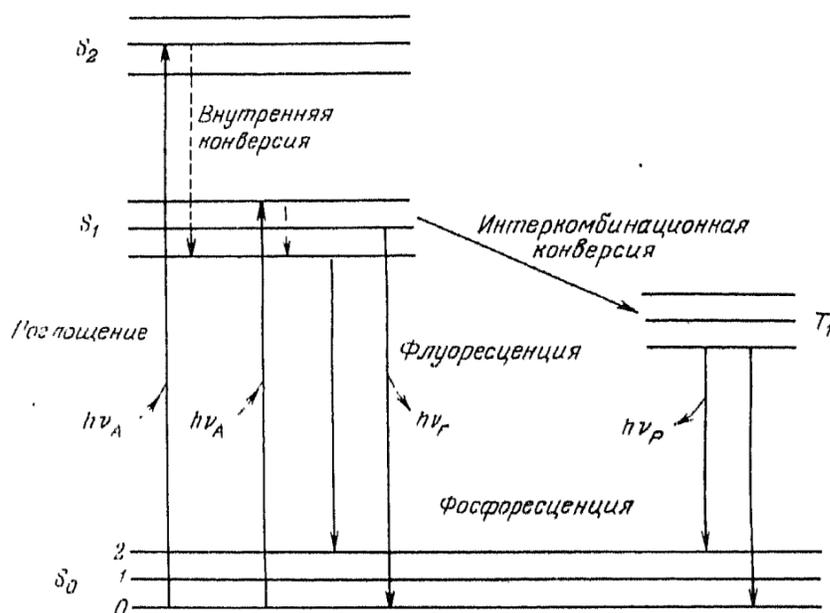


Рисунок 4. Излучательные и безызлучательные переходы между состояниями одинаковой и различной мультиплетности [65, 66.]

На диаграмме (рис. 4) представлены основное, первое и второе электронные состояния, каждый из уровней может состоять из множества энергетических уровней (S_0 , S_1 и S_2 соответственно). Каждый из этих уровней энергии состоит из нескольких

колебательных энергетических уровней, обозначенных 0, 1, 2 и т.д. Расположение электронов на различных колебательных состояниях описывается распределением Больцмана: пусть есть два состояния молекул, 1 и 2, тогда отношение числа молекул в 1м и 2м состояниях $N_1/N_2 = \exp(-(E_2 - E_1)/KT)$ т.е. большинство молекул будет находиться на нижнем колебательном состоянии, именно эти молекулы и поглощают свет. Возбуждение флуорофора, как правило, идет до некоторого высшего уровня состояния (S_1 или S_2), затем, путем безызлучательных переходов, молекула переходит на состояние, соответствующее процессам фосфоресценции или флюоресценции, соответственно. Возможные безызлучательные переходы между различными электронными состояниями одной и той же мультиплетности называются внутренней конверсией. Процесс внутренней конверсии происходит за время порядка 10^{-12} с, при этом время затухания флюоресценции $\sim 10^{-8}$ с, т.е. внутренняя конверсия обычно полностью прекращается до процесса флюоресценции. Возможные безызлучательные переходы между различными электронными состояниями разной мультиплетности называются интеркомбинационной конверсией.

1.3.2 Основные характеристики и свойства флюоресценции.

1. Стоксов сдвиг (рис. 5). Спектр флюоресценции сдвинут относительно спектра поглощения в сторону длинных волн. Это явление получило название «Стоксов сдвиг». Его причиной являются безызлучательные релаксационные процессы. В результате часть энергии поглощенного фотона теряется, а испускаемый фотон имеет меньшую энергию, и, соответственно, большую длину волны: $h\nu_{\text{махфлюор}} < h\nu_{\text{махполг}}$.

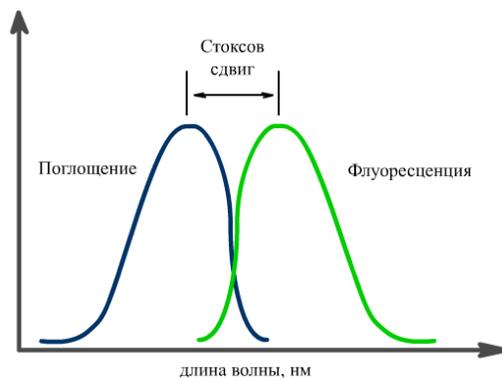


Рисунок 5. Стоксов сдвиг [67]

2. Спектр испускания флуоресценции не зависит от длины волны возбуждения (с высших энергетических уровней избыточная энергия расходуется, переводя молекулу на нижние колебательные уровни S_1). Существуют исключения, если испускание происходит с уровней S_2 или S_1 .

3. Спектр испускания флуоресценции представляет зеркальное отражение спектра поглощения, т.к. поглощение и испускание обусловлены одними и теми же переходами. Из принципа Франка-Кондона следует, что все электронные переходы происходят без изменения межъядерного расстояния, таким образом, если вероятность какого-либо перехода максимальна при поглощении, она будет максимальна и при испускании. Существуют исключения, которые возникают при различном геометрическом расположении ядер в основном и возбужденном состояниях.

4. Наблюдается одновременное свечение многих молекул, излучающих независимо друг от друга, поэтому свечение люминесценции не когерентно.

5. Основными характеристиками флуоресценции являются:

6. Квантовый выход люминесценции [68, 69] ($O_{кв}$) – отношение числа испущенных квантов $N_{исп}$ к числу поглощенных квантов возбуждающего света $N_{погл}$

$$O_{кв} = \frac{N_{исп}}{N_{погл}} = \frac{\Gamma}{\Gamma + K^2} \quad (24)$$

где константы скорости Γ и K соответствуют процессам уменьшения заселенности возбужденного состояния для излучательного и безызлучательного переходов соответственно.

Эффективность люминесценции часто характеризуется выходом люминесценции, т.е. отношением энергии, выделяемой флюоресценцией:

$$Q_{\text{энерг}} = \frac{E_{\text{исп}}}{E_{\text{погл}}} = \frac{h\nu_{\text{люм}}N_{\text{исп}}}{h\nu_{\text{погл}}N_{\text{погл}}}, \quad (25)$$

где $E_{\text{исп}}$, $E_{\text{погл}}$ – энергия испускаемого и поглощенного света соответственно, $\nu_{\text{люм}}$, $\nu_{\text{погл}}$ – средние частоты испускания и поглощения.

С.И. Вавилов показал, что энергетический выход люминесценции растворов органических веществ может достигать значения ~ 0.8 . В этом случае величина квантового выхода люминесценции близка к единице. Таким образом, часть энергии возбуждения практически всегда расходуется на развитие безызлучательных переходов [65].

Время жизни флуоресценции – время, в течение которого молекула находится в возбужденном состоянии, с которого происходит излучательный переход:

$$\tau = 1/\Gamma + K, \quad (26)$$

где Γ – константа скорости излучательной дезактивации флуорофора, K – константа скорости безызлучательной дезактивации.

Время жизни флуорофора в отсутствие безызлучательных процессов, называемое собственным временем жизни (τ_0):

$$t_0 = \frac{1}{\Gamma}. \quad (27)$$

Отсюда вытекает обычное соотношение между квантовым выходом и временем жизни:

$$Q = t/t_0. \quad (28)$$

Помимо безызлучательных переходов, квантовый выход уменьшается из-за явления, называемого тушением флуоресценции. Тушение может быть вызвано присутствием посторонних веществ в растворе, а также миграцией энергии возбуждения от молекулы к молекуле. Миграция энергии, очевидно, растет с уменьшением расстояния между молекулами, т.е. с увеличением концентрации.

1.4 ИК-спектроскопия

Для определения строения молекул и структуры различных соединений используется ИК-спектроскопия [70]. Оптические спектры молекул получаются при изменении трех видов внутренней энергии молекул: энергии электронов $E_{эл}$, энергии колебания атомов в молекуле E_k (относительно некоторого положения равновесия), энергии вращения всей молекулы $E_{вр}$, подобно волчку, вокруг своей собственной оси, то есть:

$$E = E_{эл} + E_k + E_{вр}. \quad (29)$$

Каждому виду внутренней энергии соответствует свой набор энергетических уровней. Строение молекул вещества задает расстояние между уровнями, их количество и относительное расположение. Возбуждая тот или иной вид внутренней энергии молекул, получают соответствующие молекулярные спектры: электронные, колебательные и вращательные [70].

Для возбуждения вращательного спектра нужна небольшая энергия: $0.005 \div 0.025$ эВ, для колебания атомов в молекуле: $0.05 \div 0.5$ эВ, для возбуждения электронных спектров: $5 \div 10$ эВ. Однако, в чистом виде, не удастся получить электронные и колебательные спектры. Одновременно с возбуждением колебаний атомов изменяется и скорость вращения всей молекулы, поэтому спектр получается колебательно-вращательным [70].

Закон Ламберта-Бугера-Бера позволяет проводить анализ молекулярных спектров поглощения:

$$I(l) = I_0 e^{-k_\lambda l}, \quad (30)$$

где I_0 — интенсивность входящего пучка, l — толщина слоя вещества, через которое проходит свет, k_λ — коэффициент поглощения.

Для получения спектров поглощения нужно направить на вещество излучение, необходимое для возбуждения того или иного вида внутренней энергии. Возбуждение электронных спектров осуществляется ультрафиолетовым и видимым излучением, для колебательных спектров требуются кванты ИК излучения, вращательные – кванты микроволнового излучения или дальнего ИК излучения. В методе ИК-спектроскопии [71] наиболее широкое распространение получило исследование ИК-спектров поглощения, возникающих при прохождении ИК излучения через вещество. Для каждого вещества характерен свой колебательный спектр [72]. Число полос поглощения в спектре, ширина, форма, интенсивность определяются структурой и химическим составом вещества. Тем самым появляется возможность проводить качественный и количественный анализы вещества во всех агрегатных состояниях с помощью ИК-спектров.

Длина волны λ , частота ν или волновое число k и соответствующая им энергия излучения E являются основными параметрами электромагнитного излучения. Расстояние, проходимое волной за время одного периода, называется длиной волны. Основными единицами измерения длин волн в УФ и видимой области являются нанометры, в ИК-области – микрометры. Длина волны зависит от показателя преломления среды, в которой распространяется излучение. Скорость распространения излучения в различных средах отличается, поэтому для характеристики определённого участка спектра используют частоты или волновые числа, которые не зависят от среды.

Частота излучения ν – число колебаний в одну секунду; равная отношению скорости распространения излучения (скорости света c) к длине волны $\nu = c/\lambda$.

Частота измеряется в обратных секундах c^{-1} или герцах ($1 \text{ Гц} = c^{-1}$).

Волновое число k показывает, какое число длин волн укладывается на 1 м пути излучения в вакууме и определяется соотношением $k = 1/\lambda$. Волновое число связано с частотой излучения: $\nu = c \cdot k$, где c - скорость света в вакууме ($c \approx 3 \cdot 10^8 \text{ м/с}$).

Энергия излучения $E = h \cdot \nu$, где h – постоянная Планка ($h = 6,62 \cdot 10^{-31} \text{ Дж} \cdot \text{с}$). Спектр излучения описывается набором частот (или длин волн). Деление электромагнитного спектра на ряд областей (табл. 2) не является резким и связано, главным образом, со способом получения и регистрации излучения различных длин волн (или частот) и с использованием различных оптических материалов [69].

Вид излучения	Диапазон длин волн
Гамма-излучение	10^{-2} нм
Рентгеновское	10^{-2} - 1 нм
Ультрафиолетовое	5-400 нм
Видимое	400-750 нм
Инфракрасное	760 нм - 300 мкм
Микроволновое	300 мкм - 300 мм
Радиоволны	От 300 мм до нескольких километров

Таблица 2. Длины волн электромагнитного излучения

Экспериментальное определение характеристических частот позволяет, не производя никаких дополнительных расчетов, определять по спектру присутствие в молекуле различных групп и связей, и тем самым устанавливать строение молекулы [71].

Глава 2. Экспериментальное оборудование

2.1 Экспериментальная установка «*Photocor Complex*»

Исследования проводились на оптической установке «*Photocor Complex*» [73, 74]. Прибор собран по традиционной схеме спектрометра динамического рассеяния света (рис. 6), предназначенного для многоугловых измерений динамического и статического рассеяния света и измерения размеров частиц (рис. 7). В установке использовался диодный лазер [75] с длиной волны 647 нм и мощностью 25 мВ. Пучок света попадает на фокусирующий узел и проходит через кювету с исследуемым раствором, рассеянный под углом 90° свет регистрируется лавинным фотодиодом фирмы *Perkin Elmer*, выходной сигнал которого обрабатывается на компьютере. В кювете с исследуемым раствором поддерживается комнатная температура (20°C) при помощи встроенного в прибор термостата. Обработка сигнала, длительность и число выборок устанавливается экспериментатором. Обработка сигнала включает в себя построение и усреднение автокорреляционных функций, а далее решение обратной задачи – определение коэффициентов диффузии и гидродинамических радиусов рассеивающих частиц. При решении обратной задачи используется метод регуляризации Тихонова для интегральных уравнений [76].

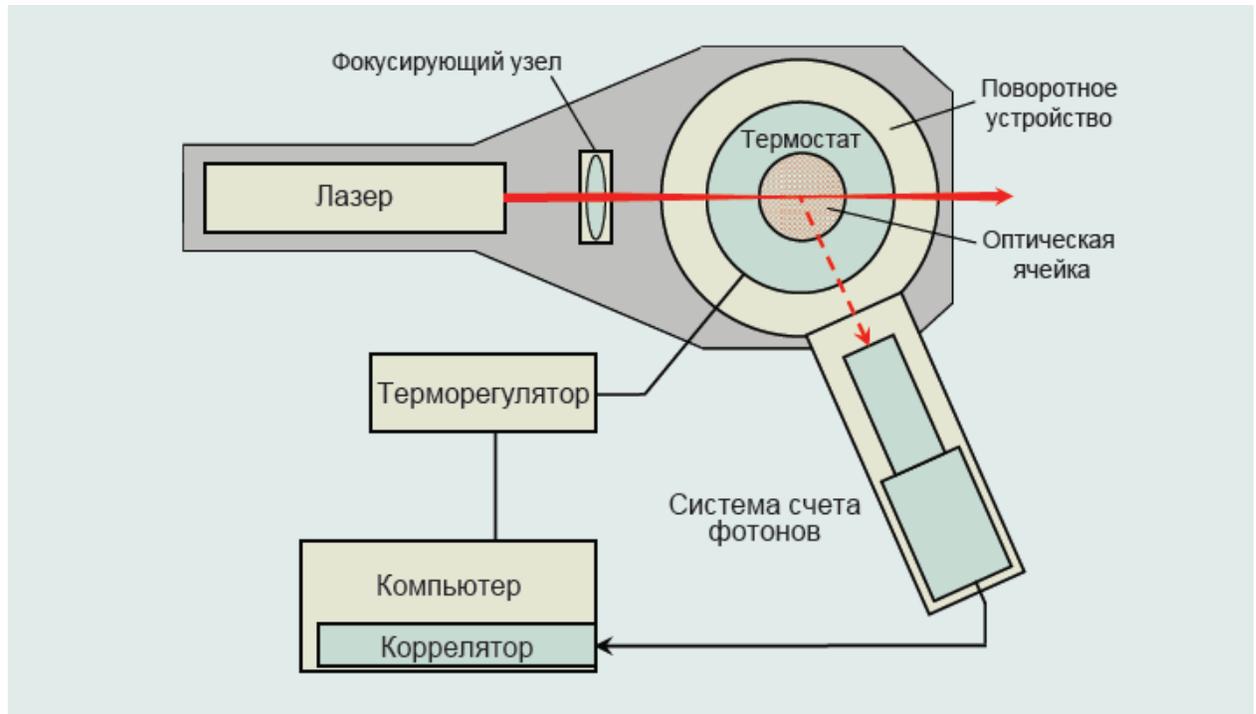


Рисунок 6. Схема спектрометра «Photocor Complex»



Рисунок 7. Схема процесса измерения размеров частиц [77]

На рисунке 8 представлена принципиальная схема спектрометра динамического рассеяния света «*Photocor Complex*» [78]. На жестком основании (6) смонтированы прецизионный гониометр (10) и оптическая скамья (5), на которой размещены лазер (1) и фокусирующий узел (3). На гониометре коаксиально с его осью установлены термостат (7) и адаптер кювет (8). На поворотной консоли (11) гониометра располагается фотоприемный блок (14), в состав которого входит приемная оптическая система (13) со сменной диафрагмой выбора апертуры (12), малошумящий фотоумножитель, работающий в режиме счета фотонов, быстрый усилитель-дискриминатор (15) со сквозным по постоянному току трактом и специальный высоковольтный источник питания ФЭУ без паразитных корреляций. Сигнал с выхода фотоприемного блока анализируется многоканальным коррелятором, который подключается непосредственно к персональному компьютеру. С помощью компьютера осуществляется управление процессом измерения и обработка результатов измерения.

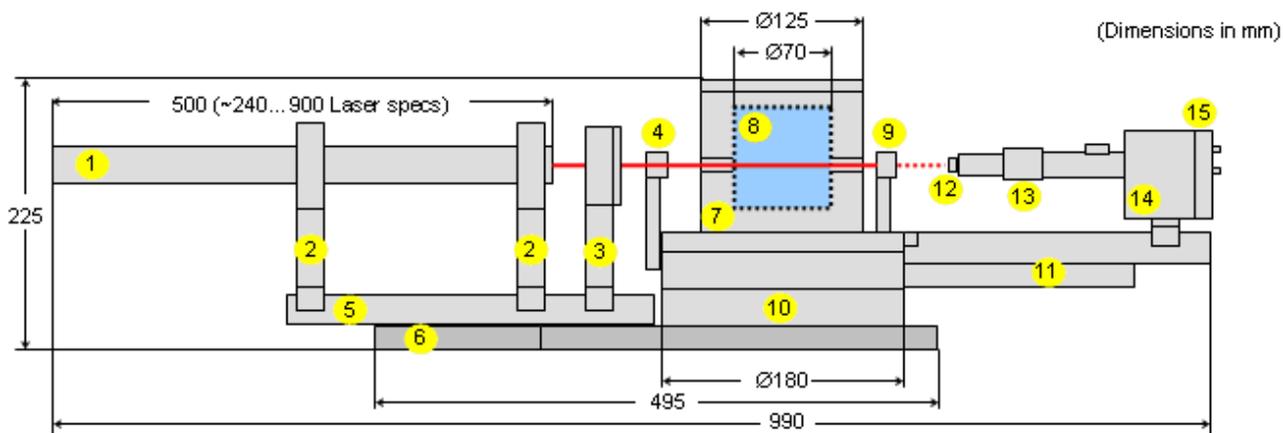


Рисунок 8. Принципиальная схема спектрометра динамического рассеяния света [76], размеры в мм

2.2 Оптическая установка Bruker IFS 66v/S

Исследования проводились на ИК-спектрометре немецкой фирмы *Bruker IFS 66 v/S* (рис. 9).



Рисунок 9. ИК-спектрометр

Диапазон сканирования прибора от 7500 до 370 см^{-1} , разрешение 0.25 см^{-1} . Вакуумирование измерительной камеры до 3 мбар. В основе прибора лежит интерферометр. На рисунке 10 показана принципиальная оптическая схема фурье-спектрометра. Он состоит из двух фиксированных позиций для источников излучения S_1 и S_2 . Набор диафрагм ограничивает расходимость пучка, светоделитель (СД) – полупрозрачная плоскопараллельная пластинка. СД делит параллельный световой пучок на два: один из пучков попадает на неподвижное плоское зеркало M_1 , а другой на подвижное зеркало M_2 . После отражения от зеркал оба пучка возвращаются к СД, где они вновь делятся на две части: одна идет на фотоприемник $\Phi\Pi_1$ или $\Phi\Pi_2$ в зависимости от выбранного рабочего спектрального диапазона [79].

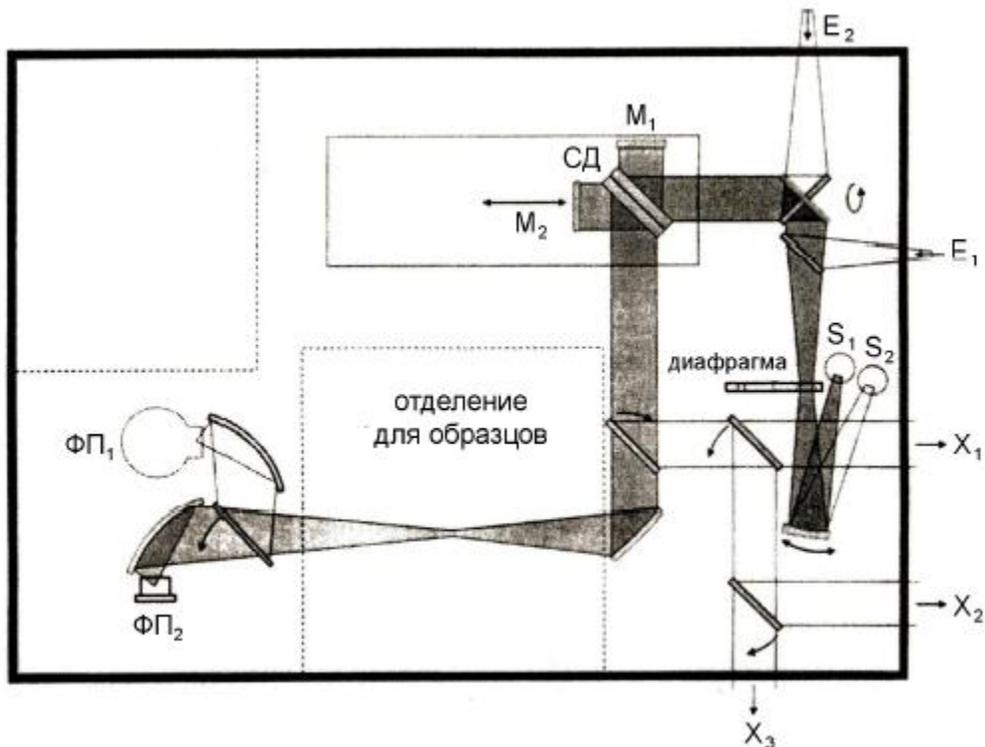


Рисунок 10. Принципиальная оптическая схема фурье-спектрометра IFS 66V [80]

Спектры считаются в два этапа: 1) регистрируется интерферограмма, т.е. выходной световой поток в зависимости от разности, разделенной на когерентные пучки входной волны от источника; 2) данные обрабатываются на специальной компьютерной программе.

2.3 Флуориметр и фотометр

Спектрофлуориметр SM 2203

Спектрофлуориметр SM 2203 (рис. 11) является высокочувствительным и стабильным прибором для проведения измерений в ультрафиолетовой и видимой области спектра [81]. Сочетает возможности 4-х приборов в одном: спектрофлуориметра, спектрофосфориметра, спектрофотометра и хемилюминометра. Использование двух двойных монохроматоров обеспечивает минимальный уровень мешающего излучения, что гарантирует высокую точность

измерений. Спектрофлуориметр *СОЛАР* отличается широкой спектральной областью работы и автоматически поддерживает постоянный выделяемый спектральный интервал во всем диапазоне сканирования, что существенно повышает достоверность измерений при регистрации широкодиапазонных спектров. Измеренные спектры отображаются в истинном виде в относительных квантовых единицах.



Рисунок 11. Спектрофлуориметр CM 2203

Исследование фотонестабильных проб возможно за счет того, что лампа светит не постоянно, а включается автоматически в момент регистрации данных. В качестве источника света в спектрофлуориметре *CM 2203* используется импульсная ксеноновая лампа.

Управление прибором и обработка результатов измерений осуществляется от компьютера с помощью программы «Универсал». Основные технические характеристики прибора представлены в таблице 3.

Чувствительность	отношение сигнал/шум – не менее 160 (190) ¹ для Рамановского спектра воды (при выделяемой спектральной полосе пропускания монохроматоров 5 нм, длине волны возбуждения – 350 нм, длине волны регистрации – 397 нм, времени усреднения сигнала 2
------------------	--

¹ параметры прибора с улучшенными характеристиками спектрального диапазона и чувствительности

	сек и времени регистрации – 5 мин)
Монохроматоры возбуждения и регистрации	двойные со сложением дисперсии, с автоматически перестраиваемыми светофильтрами, отсекающими высшие порядки спектра
Выделяемый спектральный интервал	произвольный: 0...15 нм с дискретом 0.1 нм. Прибор автоматически поддерживает постоянный выделяемый спектральный интервал при сканировании
Точность установки длины волны	± 0.4 нм
Воспроизводимость установки длины волны	± 0.2 нм
Спектральный диапазон в режиме спектрофлуориметра	220...820 нм (220-920)*
Кюветный держатель	однопозиционный термостатируемый (10...60 °С с дискретностью 0.1 °С)
Минимальный объем образца	1 мл в стандартной 10 мм кювете
Режим спектрофотометра	
Спектральный диапазон	220...1100 нм

Фотометрический диапазон	— 0.3...3 Б
Точность фотометрирования	< 1% (в зависимости от величины поглощения)
Подключение к ПК	RS232 или через адаптер USB-COM
Габариты	500x400x230 мм
Вес	18 кг
Энергопотребление	230 (± 10 %) В, 50 Гц, 100 ВА

Таблица 3. Технические характеристики спектрофлуориметра СМ 2203

Принцип работы спектрофлуориметра основан на выделении узких участков спектра и спектральном сканировании как возбуждающего, так и испускаемого (флуоресцентного), излучения посредством монохроматоров и последующей автоматической регистрацией, измерением и обработкой спектров возбуждения и испускания.

В режиме спектрофотометра в основу работы положен принцип измерения на определенной длине волны отношения светового потока I , прошедшего через исследуемый образец, к световому потоку I_0 в отсутствии исследуемого образца.

Конструкция спектрофлуориметров включает в себя следующие основные узлы и системы:

1. Оптическая система возбуждения на основе ксеноновой лампы и двойного монохроматора со сложением дисперсии.
2. Оптическая система регистрации

3. Кюветное отделение с откидывающейся крышкой расположено в центральной верхней части спектрофлуориметров. Внутри кюветного отделения расположен термостатируемый держатель кювет. Держатель кювет обеспечивает термостатирование кюветы (образца) в диапазоне температур от 20 до 50 ОС и перемешивание в стандартной кювете исследуемого жидкого образца магнитным якорем с помощью электронной магнитной мешалки.

4. Система электропитания

5. Система управления и обработки сигналов. Управление работой спектрофлуориметров осуществляется с помощью программного обеспечения с внешнего персонального компьютера [81].

Оптическая схема спектрофлуориметра (рис. 12) в режиме спектрофотометра состоит из осветителя I, монохроматора II и кюветного отделения III. Осветитель I включает в себя источник излучения 1 (ксеноновая короткодуговая лампа типа ДКсШ 150-3, имеющая почти непрерывный спектр излучения в области 220-4000 нм), контротражатель 2 и эллипсоидное фокусирующее зеркало 3. Между осветителем I и монохроматором II установлен блок сменных диафрагм 4, служащий для дискретного изменения светового потока, падающего на входную щель 5 монохроматора возбуждения, с целью расширения динамического диапазона работы прибора. Монохроматор возбуждения люминесценции II - двойной, служит для селекции длин волн возбуждающего излучения с низким уровнем рассеянного излучения. Содержит входную щель 5, два коллиматорных объектива 6 и 8, промежуточную щель 29, выходную щель 10, две идентичные дифракционные решетки 7 и 9. Диапазон раскрытия входной и выходной щелей монохроматора от 0 до 4 мм (ширина щелей), высота щелей – 3 мм. Узел светофильтра 11 служит для устранения излучения высших порядков дифракции. Кюветное отделение III служит для размещения исследуемого образца. С помощью плоскопараллельной пластинки 13 на фотодиод 14 отводится часть излучения с целью контроля нестабильности

источника (опорный канал). Излучение, прошедшее кювету 15 с исследуемым образцом, регистрируется фотоприемником 16 измерительного канала. В качестве фотоприемного устройства используется кремниевый фотодиод. Промежуточная щель обозначена цифрой 17.

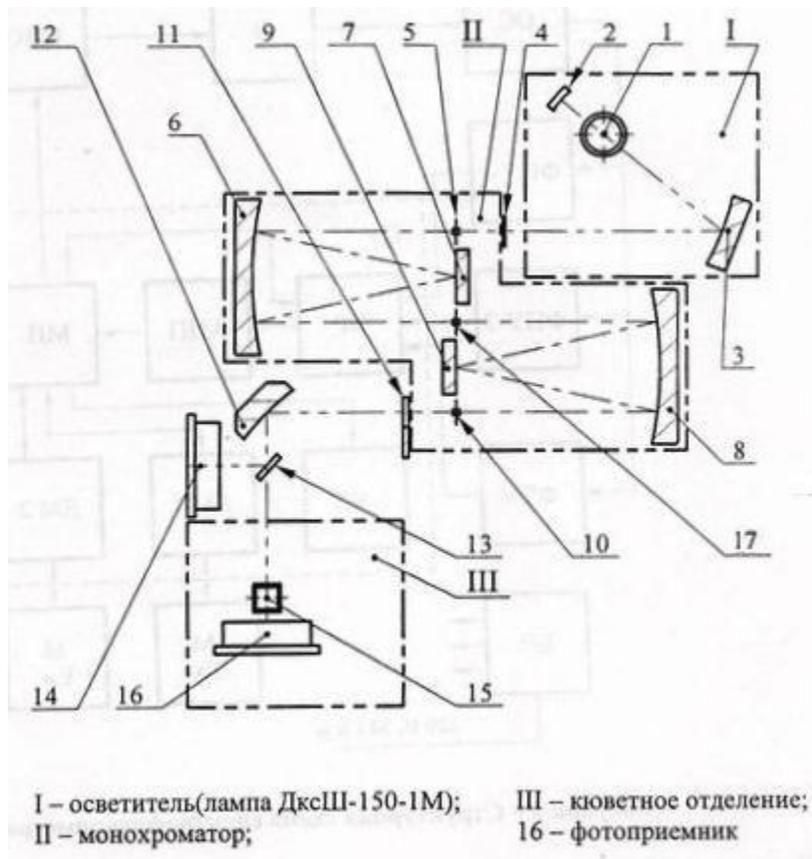


Рисунок 12. Оптическая схема спектрофлуориметра СМ 2203 в режиме спектрофотометра

Спектрофотометр ЮНИКО 4802 двулучевой [83]

Двулучевой UV-4802 спектрофотометр (рис. 13) работает в спектральном диапазоне 190-1100 нм. Эта модель имеет два независимых детектора для одновременного измерения пробы и холостого раствора, спектральную щель 1.8 нм и скорость сканирования до 1000 нм/мин. Прибор отличается высокой точностью

определения пропускания/оптической плотности, установки длины волны, разрешение 0.1 нм и высокая временная стабильность (табл. 4).



Рисунок 13. спектрофотометр UNICO SQ-4802

Спектральный диапазон, нм	190-1100
Погрешность, %	±0.3
Фотометрический диапазон, %, А	0 – 200 % Т; -0.3 – 3.0 А
Повторяемость, нм	0.2
Ширина щели, нм	1.8
Рабочая длина кювет	от 5 до 100 мм

Таблица 4. Технические характеристики спектрофотометра

Глава 3. Исследуемые вещества

Белки – это высокомолекулярные природные органические вещества, играющие фундаментальную роль в структуре и жизнедеятельности организмов. Огромный интерес для современной медицины, биофизики и экологии представляет изучение влияния внешних факторов на белковые системы.

Также как и многие биологические макромолекулы (полисахариды, липиды) и нуклеиновые кислоты, белки — необходимые компоненты всех живых организмов, участвующие во всех внутренних процессах клетки. Они осуществляют обмен веществ и энергетические превращения, входят в состав клеточных структур — органелл или секретируются во внеклеточное пространство для обмена сигналами между клетками и гидролиза пищевых субстратов.

В данной работе исследовались глобулярные белки [84] – бычий сывороточный альбумин (БСА) и γ -глобулин [85, 86] немецкой фирмы «Sigma» (данный вид белков относится к компактным, плотноупакованным макромолекулам), НЧ золота (производство ИБФРМ РАН², приготовленные по методу Френса, путем восстановления золотохлористоводородной кислоты цитрата натрия [87], хлорид железа III фирмы «Ranreas» и медицинский железосодержащий препарат «Мальтофер».

3.1 Альбумин

Сывороточные альбумины (рис. 14) выполняют в организме транспортную функцию. Они хорошо растворяются в воде и легко диффундируют сквозь стенки сосудов. Молекулярный вес сывороточного альбумина составляет около 69000 единиц. Гидродинамическое поведение таких молекул в водных растворах хорошо

² ИБФРМ РАН - Лаборатория нанобиотехнологии (зав. лаб. д.ф.-м.н., профессор *Хлебцов Н.Г.*)

описывается моделью жесткого эллипсоида вращения с соотношением осей: 150/50/50 Å. Биохимические исследования показали, что сывороточные альбумины состоят из одной полипептидной цепи, содержащей около 550 аминокислотных остатков. На рисунке 14 представлена структура БСА, справа отмечено разделение на три гомологичных домена I(1-190), II (191-382) и III (383-582), каждый домен в свою очередь подразделяется на два субдомена [90].

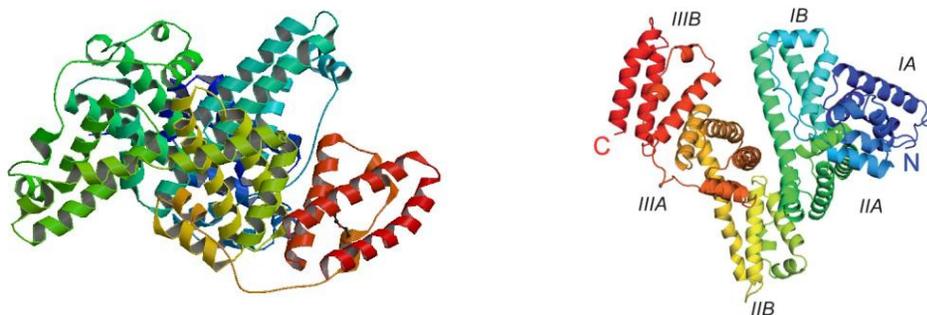


Рисунок 14. Слева кристаллическая структура бычьего сывороточного альбумина [88], справа ленточная модель белка альбумина [89]

На основании данных по титрованию белка, подтвержденных данными рентгеноструктурного анализа, был сделан вывод о том, что большинство ионизируемых групп находится на поверхности белковой глобулы. Эти группы обуславливают значительный заряд белковой макромолекулы, и ее электростатические свойства в растворе. Электрически нейтральный альбумин содержит порядка сотни пар положительных и отрицательных зарядов. Их распределение по поверхности белка можно представить как диполь, имеющий наклон примерно 30° к длинной оси молекулы и расстоянием между концевыми зарядами около 150 Å. Значения дипольных моментов молекул белков весьма велики: для БСА он составляет – 480 D, для яичного – 400 D.

Общая площадь поверхности альбуминов очень велика, и поэтому они очень хорошо подходят для выполнения функции переносчиков многих транспортируемых

кровью веществ, таких как билирубин, уробилин, жирные кислоты, соли желчных кислот и некоторых экзогенных веществ: пенициллина, сульфонамидов, и др.

3.2 γ -глобулин

Как видно из рисунка 15, молекула γ -глобулина состоит из трёх основных свёрнутых спиральных структур, две из которых положительно заряжены, а одна – отрицательно. За счёт такого разделения зарядов, молекула γ -глобулина обладает большим дипольным моментом.

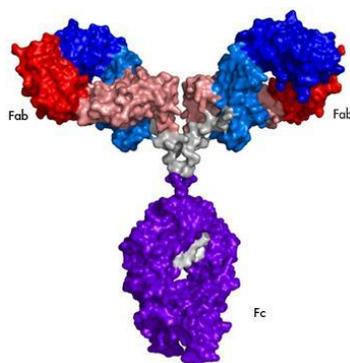


Рисунок 15. Модель γ -глобулина [91]

При воздействии на молекулы иммуноглобулинов ферментом пепсина, они расщепляются на два фрагмента: $F(ab)_2$ – связывающий антиген, и F_c – кристаллизующийся. Домены F_c выполняют биологические, эффекторные функции иммуноглобулинов (рис. 15). F_c фрагмент – это часть молекулы антитела, взаимодействующая с клетками иммунной системы, а $F(ab)$ фрагмент – это часть молекулы антитела, предназначенная для связывания с антигеном [92]. γ -глобулин составляет часть белков плазмы крови (человека или животных), содержащую противобактериальные и противовирусные антитела, многие из которых обладают ферментативной активностью. Так как потребности в белках, выполняющих такие специальные функции, бывают различны, размеры и состав фракции γ -глобулина может значительно изменяться. Почти при всех заболеваниях, особенно

воспалительных, содержание γ -глобулина в плазме крови повышается, в то время как общее количество белков в плазме остается примерно одинаковым. Повышение содержания γ -глобулина сопровождается уменьшением фракции альбумина, в результате снижается так называемый альбумин-глобулиновый коэффициент. Таким образом, γ -глобулин является основным показателем биохимических исследований крови, который меняется при различных заболеваниях. В основном, иммуноглобулины вырабатываются организмом в ответ на чужеродные вещества, такие как бактерии, вирусы и раковые клетки [93].

3.3 Сыворотка крови

Кровь – жидкость, циркулирующая в кровеносной системе и переносящая газы и другие растворенные вещества, необходимые для метаболизма либо образующиеся в результате обменных процессов. Плазма (прозрачная жидкость бледно-желтого цвета) и взвешенные в ней клеточные элементы вместе и составляют кровь.

Красные кровяные клетки (эритроциты), белые кровяные клетки (лейкоциты) и кровяные пластинки (тромбоциты) являются тремя основными типами клеточных элементов крови. Наличием в эритроцитах красного пигмента в гемоглобине объясняется красный цвет крови.

Кровь является вязкой жидкостью, причем содержанием эритроцитов и растворенных белков и определяет её вязкость. Кровяное давление и скорость, с которой кровь протекает через артерии, зависят в значительной мере от вязкости крови. Текучесть крови определяется также ее плотностью и характером движения различных типов клеток. Лейкоциты, например, движутся поодиночке, в непосредственной близости к стенкам кровеносных сосудов; эритроциты могут перемещаться как по отдельности, так и группами наподобие уложенных в стопку монет, создавая аксиальный, т.е. концентрирующийся в центре сосуда, поток. Объем крови взрослой женщины составляет порядка 66 мл на килограмм веса тела, а у

взрослого мужчины примерно 75 мл. Соответственно общий объем крови у взрослого мужчины составляет в среднем около 5 л; более половины объема составляет плазма, а остальная часть приходится в основном на эритроциты.

Количество и состав крови, а также ее физико-химические свойства у здорового человека относительно постоянны: они могут подвергаться небольшим колебаниям, но быстро выравниваются. Относительное постоянство состава и свойств крови является необходимым условием жизнедеятельности всех тканей организма [57].

В норме pH артериальной крови близок к нейтральному и составляет 7.4. Поддержание кислотно-щелочного равновесия является важным. Значительное снижение pH вызывает уменьшение активности ферментов в тканях, что опасно для организма. Изменение pH крови, выходящее за рамки интервала 6.8-7.7, несовместимо с жизнью. Почки помогают поддерживать уровень pH на постоянном уровне, так как они выводят из организма кислоты или мочевину (которая дает щелочную реакцию). Уровень pH также поддерживается благодаря присутствию в плазме определенных белков и электролитов, обладающих буферным действием (т.е. способностью нейтрализовать некоторый избыток кислоты или щелочи).

После отделения взвешенных в крови клеточных элементов остается водный раствор сложного состава, называемый плазмой. Как правило, плазма представляет собой прозрачную жидкость, желтоватый цвет которой определяется присутствием в ней небольшого количества желчного пигмента и других окрашенных органических веществ. Плазма участвует во многих процессах жизнедеятельности организма. Она переносит клетки крови, питательные вещества и продукты метаболизма и служит связующим звеном между всеми экстравакуляными (т.е. находящимися вне кровеносных сосудов) жидкостями; последние включают, в частности, межклеточную жидкость, и через нее осуществляется связь с клетками и их содержимым.

На плазму приходится 55-60% всего объема крови, клетки крови составляют соответственно 40-45%. Плазма имеет удельный вес 1.020-1.028 (удельный вес крови 1.054-1.066) и состоит из воды, органических соединений и неорганических солей. 90-92% составляет вода, 7-8% – белки, 0.1% – глюкоза и 0.9% – соли [57].

Основные компоненты плазмы и их концентрации приведены в таблице 5. Среди растворенных в плазме веществ – низкомолекулярные органические соединения (мочевина, мочевая кислота, аминокислоты и т.д.); большие и очень сложные по структуре молекулы белков; частично ионизированные неорганические соли. К числу наиболее важных катионов (положительно заряженных ионов) относятся катионы натрия (Na^+), калия (K^+), кальция (Ca^{2+}) и магния (Mg^{2+}), к числу важнейших анионов (отрицательно заряженных ионов) - хлорид-анионы (Cl^-), бикарбонат (HCO_3^-) и фосфат (HPO_4^{2-} или $H_2PO_4^-$). Белки плазмы делятся на глобулины (альфа-, бета- и гамма-глобулины), альбумины, фибриноген, играющий важную роль в свертывании крови.

Из всех белков [94] в наибольшей концентрации в плазме присутствует альбумин, синтезируемый в печени. Альбумин участвует в процессе поддержания осмотического равновесия, обеспечивающего нормальное распределение жидкости между кровеносными сосудами и экстравакулярным пространством. Содержание альбумина в плазме падает при голодании или недостаточном поступлении белков с пищей, это может привести к повышенному накоплению воды в тканях. Такое состояние, связанное с белковой недостаточностью, называется голодным отеком. В плазме присутствуют глобулины нескольких типов, или классов, важнейшие из которых обозначаются греческими буквами α (альфа), β (бета) и γ (гамма), соответствующие белки - α_1 , α_2 , β , γ_1 и γ_2 . После разделения глобулинов (методом электрофореза) антитела обнаруживаются лишь во фракциях γ_1 , γ_2 и β . Хотя антитела часто называют гамма-глобулинами, тот факт, что некоторые из них присутствуют и в β -фракции, обусловил введение термина «иммуноглобулин». В эту

же группу белков входят и факторы коагуляции, которые наряду с фибриногеном участвуют в процессе свертывания крови.

Компоненты	Функции
Вода (90-92% от объема плазмы)	Основной компонент крови и лимфы. Необходима для жизнедеятельности клеток. Разносит по телу растворенные в ней вещества. Способствует поддержанию кровяного давления и объема крови в организме.
Белки плазмы (7-8% ее объема)	
Сывороточные альбумины (56.5—66.8% белков)	Содержатся в очень большом количестве. Связывают и транспортируют кальций. Синтезируются в печени. Обуславливают осмотический потенциал крови.
Сывороточные глобулины (33,2—43,5% белков):	
α -глобулины (9.9—15.5% белков)	Синтезируются в печени. Связывают и транспортируют гормон тироксин, липиды и жирорастворимые витамины (А, D, Е и К).
β -глобулины (7.3—12.5% белков)	Синтезируются в печени. Связывают и транспортируют холестерол и жирорастворимые витамины (А, D, Е и К).
γ -глобулины (12.9—19.0% белков)	Являются антителами. Синтезируются лимфоцитами. Участвуют в иммунном ответе.

Протромбин	Участвует в свертывании крови.
Фибриноген (0.2—0.4% белков)	Синтезируется в печени. Участвует в свертывании крови.
Ферменты	Участвуют в метаболических процессах.
Минеральные ионы	
Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , HCO_3^- , $H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-} , PO_4^{3-} , SO_4^{2-}	В совокупности участвуют в регуляции осмотического потенциала и <i>pH</i> крови. Кроме того, они осуществляют и другие разнообразные функции, например, Ca^{2+} может участвовать в свертывании крови.

Таблица 5. Компоненты плазмы крови и их функции [9]

Основная функция фибриногена состоит в образовании кровяных сгустков (тромбов). В процессе свертывания крови фибриноген превращается в фибрин, который и составляет основу кровяного сгустка; не содержащая фибриногена плазма, обычно имеющая вид прозрачной жидкости бледно-желтого цвета, называется сывороткой крови.

В 100 мл плазмы содержится около 7 г белка, в том числе 5 г альбумина и 2 г глобулинов, другие белки представлены в очень малых количествах. В качестве моделей биологических жидкостей, таких как кровь или лимфа могут быть использованы водные растворы белков.

3.4 Металлы и их роль в организме человека

Многие металлы [95], такие как железо, цинк, медь и хром и др., выполняют жизненно важные функции в живом организме, их ионы влияют на обменные процессы. В связи с тем, что металлы могут присоединять электроны и тем самым образовывать связь, они способны изменять структуру белков. Многие белки содержат ионы металлов. Многие реакции, протекающие в организме животных и человека, идут с участием металлических ионов. На рисунке 16 представлено распределение металлов в организме человека [95]. Например, кальций, примерно 99% приходится на скелет человека, а оставшийся 1% распределяется в крови и мягких тканях. Кальций играет важную роль в таких процессах, как нервная проводимость, сокращение мышц, свертывание крови, проницаемость мембран. Магний является нужным для многочисленных биохимических реакций. Он участвует в регуляции сердечного ритма, кровяного давления и уровня глюкозы в крови. Он используется при синтезе и метаболизме белка, является необходимым элементом для поддержания нормального функционирования иммунной системы и мышц.

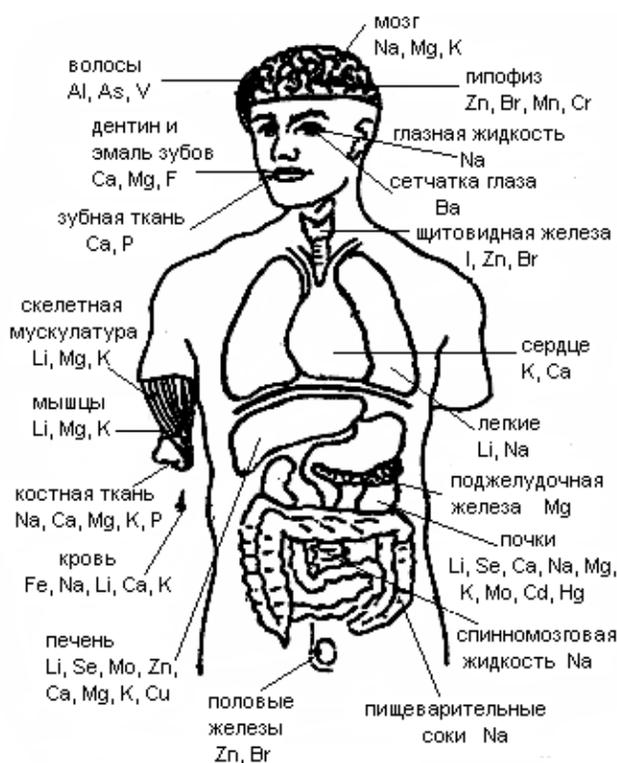


Рисунок 16. Концентрация некоторых химических элементов в органах, тканях и биожидкостях человека [95]

3.5 Наночастицы золота

НЧ золота [96] (рис. 17) из-за их уникальных физических и химических свойств вызывают большой интерес у исследователей.

Главной проблемой при работе с НЧ является то, что они весьма неустойчивы и стремятся к агрегации в водных растворах. При использовании стабилизирующих агентов (полимеров), можно не только поддержать стабильность НЧ, но и создать новый материал, свойства которого будут взаимно дополняться его компонентами. Одно из основных свойств НЧ золота состоит в том, что они хорошо рассеивают и поглощают свет. НЧ золота могут быть использованы в качестве переносчиков лекарства, а также с помощью них можно определить местоположение раковой опухоли, т.е. использовать их в качестве биомаркеров.

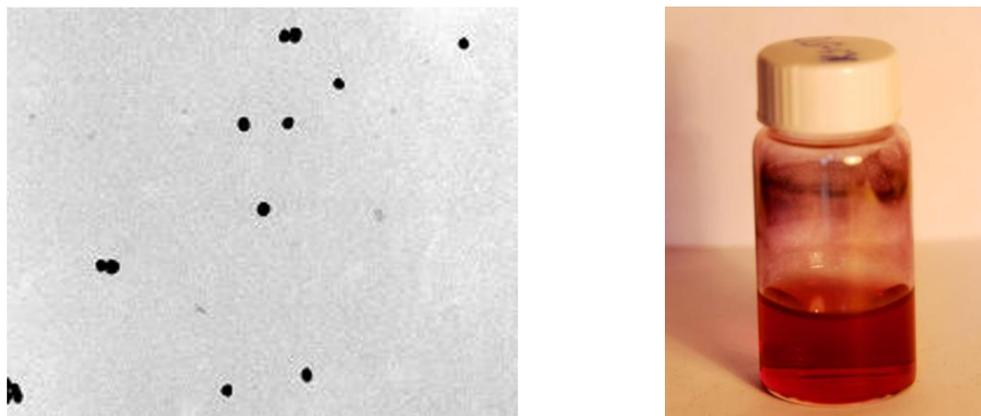


Рисунок 17. Слева – электронная микрофотография НЧ золота со средним диаметром 55 нм (размер изображения 2.2×1.8 мкм) [97]; справа – баночка с раствором НЧ золота.

В данной работе использовались квазисферические НЧ золота, конъюгированные с ПЭГ (полиэтиленгликолем) методом ковалентной пришивки молекул на поверхность частицы. Длина волны ПР – 540 нм. Дзетта-потенциал = -25 мВ. Дзетта-потенциал — это потенциал на границе между коллоидной частицей, способной к движению в электрическом поле, и окружающей жидкостью, т.е. потенциал поверхности скольжения частицы в коллоидном растворе. Наличие дзетта-потенциала на границах скольжения всех дисперсных частиц формирует на них одноименные заряды и электростатические силы отталкивания, что обеспечивает устойчивость коллоидного раствора и препятствует агрегации.

3.5.1 Хлорид железа III

Хлорид железа (III) (хлорное железо) (рис. 18) — средняя соль трехвалентного железа и соляной кислоты. На вид это химическое сырье представляет собой мягкую кристаллическую массу ржаво-коричневато-черного цвета. Температура его кипения составляет 319 °С, температура плавления – 309 °С. Хлорное железо образуется в результате нагревания железа с хлором [98].

Сфера применения хлорного железа достаточно широка. Его используют как:

- коагулянт для очистки воды,
- как катализатор в органическом синтезе,
- как протраву в процессе окрашивания тканей.

Используется этот продукт и в других сферах жизнедеятельности человека, в частности:

- с его помощью осветляются природные воды в системах водоподготовки;
- удаляется масло из стоков масложировых комбинатов;
- он используется при очистке сточных вод кожевенно-меховых предприятий от соединений хрома;
- для смягчения хозяйственно-питьевой воды [99].

Хлорид железа является незаменимым элементом для нормальной жизнедеятельности организма. Его недостаток может привести к серьезным заболеваниям. Благодаря железу в виде солей организм быстро восполняется им и принимает участие в следующих процессах:

- является дополнительным источником поступления железа в организм (при его пониженном содержании – анемии);
- регулирует окислительно-восстановительные реакции (связывает кислород), стимулирует эритропоэз;
- восстанавливает кровопотери при травмах;
- при снижении всасывания железа (в период интенсивного роста, во время беременности);
- для остановки кровотечения (ватку с раствором кладут на рану) [100].

В данном эксперименте используется водный 30%-ый раствор FeCl_3 компании «Panreac». Ионный радиус Fe^{3+} составляет 64 пм, а $d(\text{Fe}-\text{Cl}) = 230$ пм [100].



Рисунок 18. Раствор хлорида железа компании «Panreac»

3.5.2 Железосодержащий препарат

В данной работе в качестве железосодержащего компонента использовался лечебный препарат «Мальтофер» (рис. 19). Препарат содержит железо в виде полимальтозного комплекса гидроокиси железа III – это водорастворимый, макромолекулярный комплекс многоядерной гидроокиси железа III и частично гидролизованного декстрина (полимальтозы). Ядро этого комплекса гидроокиси железа III окружено нековалентно связанными молекулами полимальтозы [101]. Молекулярная масса всего комплекса составляет примерно 52300 Дальтон.



Рисунок 19. Лекарственный препарат «Мальтофер»

Данный макромолекулярный комплекс стабилен и не выделяет железо в виде свободных ионов в ЖКТ. Железо в полинуклеарном «ядре» связано со структурой, подобной сывороточному ферритину. (P. Geisser и A. Mueller, 1987) [101]. Благодаря такому сходству, железо (III) поступает из кишечника в кровь путем активного транспорта (рис. 20). Всосавшееся железо связывается с ферритином и хранится в организме, преимущественно в печени. Затем в костном мозге оно включается в состав гемоглобина. Железо, входящее в состав полимальтозного комплекса гидроокиси железа (III), не обладает прооксидантными свойствами, в отличие от простых солей железа [102].

Железосодержащий препарат «Мальтофер» применяется в случае дефицита железа в организме человека.

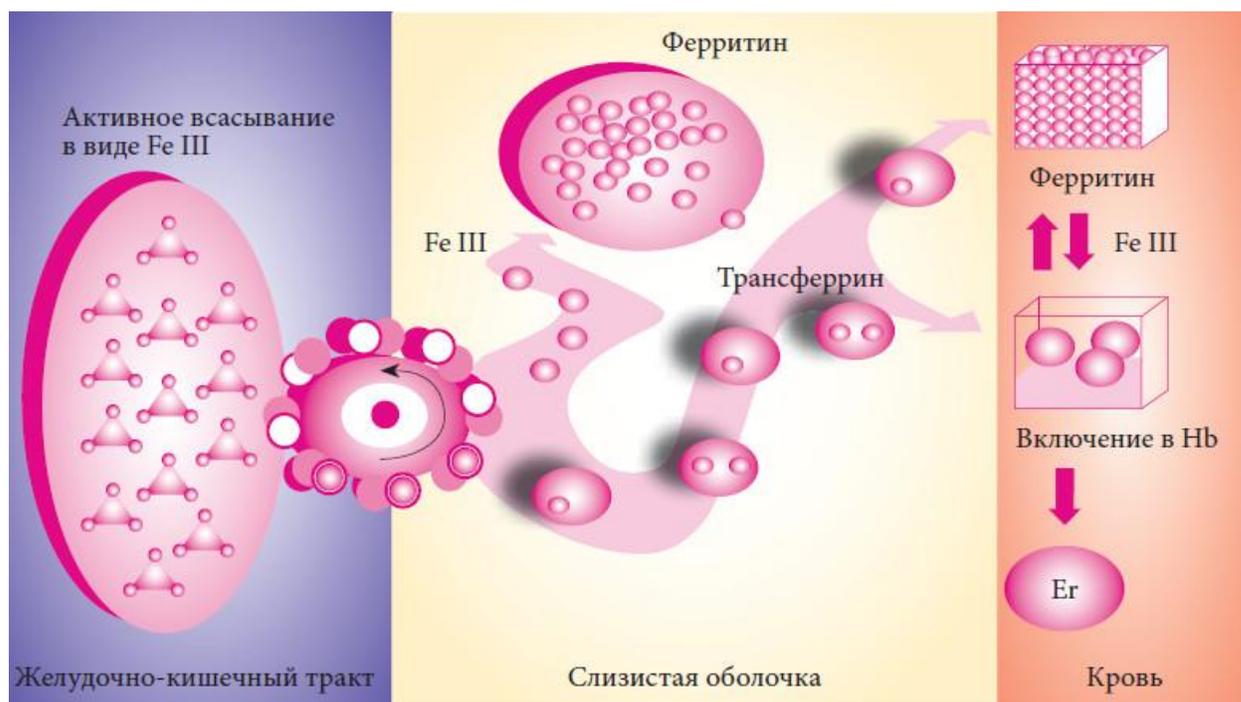


Рисунок 20. Механизм действия железа (III) гидроксид-полимальтозного комплекса

[103]

Доза препарата рассчитывается индивидуально и адаптируется в соответствии с общим дефицитом железа по следующей формуле: общий дефицит железа (мг) = масса тела (кг) × (нормальный уровень Hb – уровень Hb пациента) (г/л) × 0,24 + железо запасов (мг).

Глава 4. Экспериментальные результаты

Все исследуемые растворы готовились непосредственно перед проведением эксперимента в лабораторных условиях. Навески производились на электронных аналитических весах «*Adventureg*», позволяющих поводить измерения с точностью до 0.1 мг. Для измерений водородного показателя среды применялся портативный рН-метр – *pH-420* фирмы Аквилон, диапазон измерений *pH* от 0.5 до 14 при температуре от -10° до 100° C. Для приготовления водного раствора бычьего сывороточного альбумина брали воду для инъекций фирмы ОАО «БИОХИМИК», далее ее фильтровали при помощи фильтра *millipore* 0.2 мкм. Затем брали концентрацию 0.2 мг/мл (разводили изначально 50 мг/мл – это концентрация, соответствующая концентрации альбумина в крови человека). Исследуемые образцы перемешивали в ультразвуковой ванне *CT brand CT-405* (производство Китай) со следующими параметрами: частота 28 кГц, мощность 50 Вт (рис. 21).



Рисунок 21. Ультразвуковая ванна слева, рН-метр справа

4.0 Калибровочные измерения

В работе были проведены калибровочные измерения по определению размеров рассеивающих частиц латекса-полистирола фирмы *Sigma* (№ *LB-1*, производство США), – эталонного вещества с (диаметром 100 нм) (рис. 22). Погрешность таких

измерений составила порядка (5-15)%. В серии экспериментов с НЧ и альбумином в водных растворах погрешность составила (10-25)%. Эта величина обусловлена, главным образом, довольно значительным разбросом размеров рассеивающих частиц.

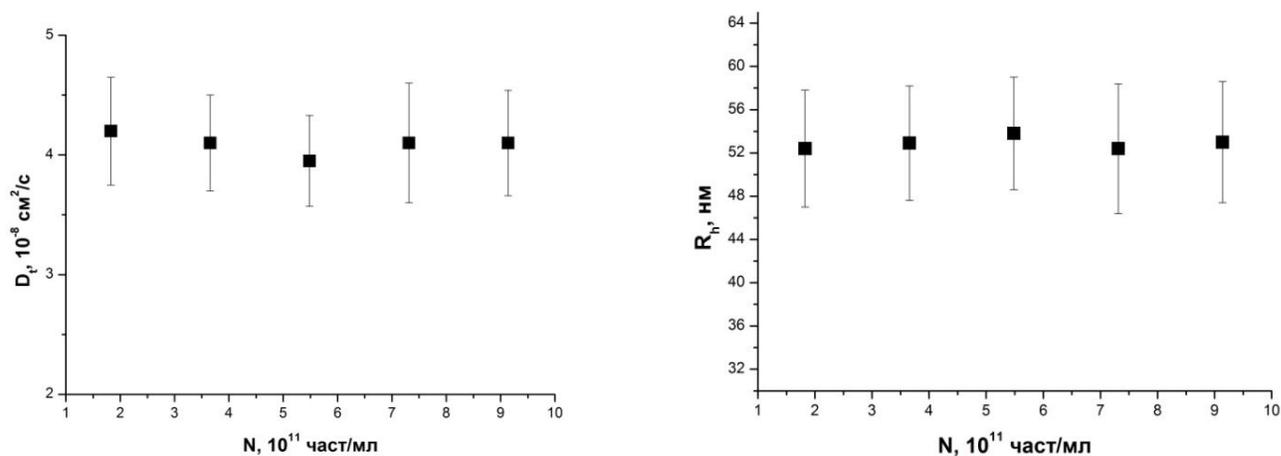


Рисунок 22. Графики концентрационной зависимости коэффициента трансляционной диффузии (слева) и гидродинамического радиуса (справа) рассеивающих частиц – латекса полистирола (№ LB-1)

4.1 Эксперименты с наночастицами золота

В экспериментах с НЧ золота и БСА образцы имели следующие концентрации: альбумин $c=0.1$ мг/мл (начальная концентрация альбумина 50 мг/мл, соответствующая концентрации альбумина в крови человека), концентрация НЧ золота в предоставленных образцах изначально составляла $c=2 \cdot 10^{10}$ част/мл. В процессе эксперимента концентрация НЧ золота в водном растворе варьировалась от $3.64 \cdot 10^8$ до $18.2 \cdot 10^8$ част/мл ($1.19 \cdot 10^{-10}$ мг/мл).

В экспериментах с НЧ золота и γ -глобулином образцы имели следующие концентрации: γ -глобулин – $c=0.033$ мг/мл (начальная концентрация γ -глобулина 8.42 мг/мл), концентрация НЧ золота варьировалась от $2 \cdot 10^8$ до $10 \cdot 10^8$ част/мл.

В работе проводились исследования с модельными растворами белков альбумина и γ -глобулина при их различных массовых соотношениях (табл. 6) [104] с добавлением НЧ золота:

- а) модельный раствор сыворотки крови «здорового» пациента (соотношения альбумина и γ -глобулина – 3:1 – табл. 6, п. А);
- б) модельный раствор сыворотки крови «больного» пациента (соотношения альбумина и γ -глобулина – 1:3 – табл. 6, п. Б);
- в) модельный раствор сыворотки крови «зоны риска» (соотношения альбумина и γ -глобулина – 1:1 – табл. 6, п. В);

Модельный раствор	альбумин, мг	γ -глобулин, мг
С чистым альбумином	5,5	–
С чистым γ -глобулином	–	1,6
А) сыворотки крови «здорового» человека	5,5	1,6
Б) сыворотки крови «больного» человека	1,6	5,5
В) зоны «риска»	3,5	3,5

Таблица 6. Используемые соотношения белков в модельных растворах

В исследованиях, проводимых с нативными образцами сыворотки крови человека, концентрация раствора рассчитывалась исходя из того, что конечная система не должна превышать 1%, таким образом, исследовались разбавленные растворы нативных образцов сыворотки крови. Брали 10 мкл из нативных образцов сыворотки крови и разбавляли их в 5 мл воды для инъекций.

4.1.1 Растворы глобулярных белков (БСА и γ -глобулин) при добавлении НЧ золота

В качестве объектов исследования использовались НЧ золота имеющие размер 55 ± 10 нм. Их добавляли в водные растворы белков альбумина и γ -глобулина. Исследования были проведены методом динамического рассеяния света. На рисунке 23 а приведена полученная зависимость коэффициента трансляционной диффузии D_t рассеивающих частиц от концентрации НЧ золота в водных растворах. Измерения проводились в нейтральной среде (pH 7.0). Видно, что коэффициенты трансляционной диффузии не изменяются при увеличении концентрации НЧ золота. Как видно из рисунка 23 а, наблюдаются две компоненты – одна из которых соответствует коэффициентам трансляционной диффузии молекул альбумина, а другая – D_t НЧ золота. Для НЧ золота среднее экспериментальное значение коэффициентов трансляционной диффузии получается – $\langle D_t \rangle_{\text{экс.}} \approx (7.9 \pm 1.5) \cdot 10^{-8}$ см²/с, а рассчитанный по формуле (8) – $D_{\text{теор.}} \approx 8.5 \cdot 10^{-8}$ см²/с. Этот результат указывает на то, что между БСА и НЧ нет взаимодействия. Противоположный результат был получен для наноалмазов в статье [42], где наблюдалось взаимодействие между исследуемыми наноалмазами и белком альбумином, зависящее от вида покрытия НЧ и их размера. В статье [41] наоборот, результаты, полученные с помощью метода фотонной корреляционной спектроскопии, а также ИК спектроскопии исследуемых растворов указывают на отсутствие взаимодействия между БСА и кремниевыми НЧ в диапазоне pH 3–7.

Рассчитанные по формуле Стокса-Эйнштейна (8) значения гидродинамических радиусов совпадают с их теоретическими значениями: для молекул БСА $\langle R_h \rangle_{\text{экс.}} \approx 3.5 \pm 0.8$ нм, для НЧ золота – $\langle R_h \rangle_{\text{экс.}} \approx 26$ нм.

В водных растворах γ -глобулина с НЧ золота (рис. 23 б), радиус рассеивающих

частиц увеличивается: $\langle R_h \rangle_{\text{эксн.}} \approx 35$ нм, а полученный коэффициент трансляционной диффузии уменьшается $\langle D_t \rangle_{\text{эксн.}} \approx (6.2 \pm 1.01) \cdot 10^{-8}$ см²/с (для сравнения – $\langle D_t \rangle_{\text{теор.}} \approx 8.5 \cdot 10^{-8}$ см²/с). Взаимодействие НЧ золота с молекулами γ -глобулина приводит к увеличению размеров рассеивающих частиц и уменьшению их молекулярной подвижности [104].

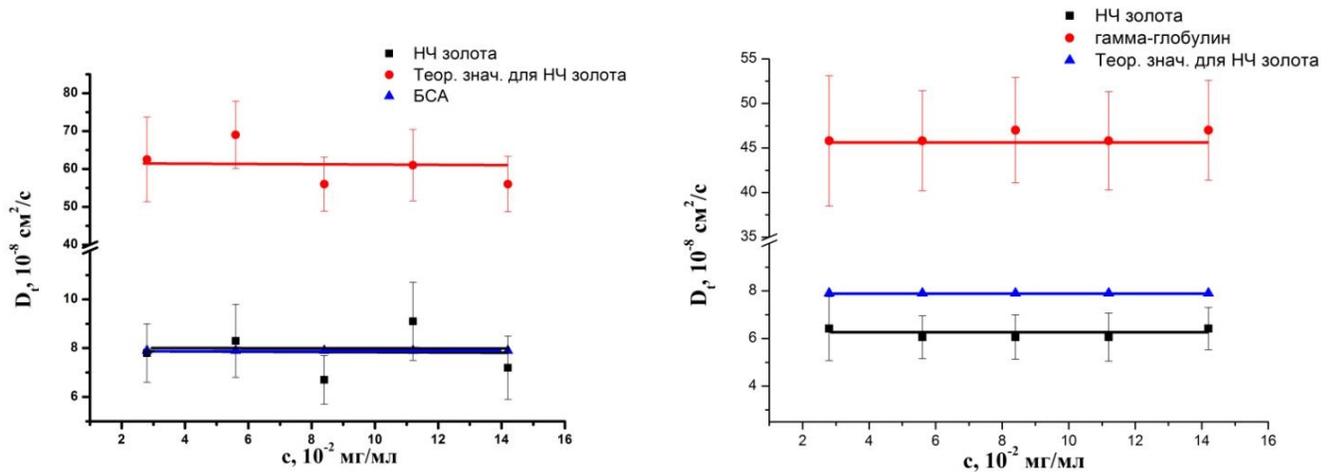


Рисунок 23. Графики зависимости коэффициента трансляционной диффузии D_t рассеивающих частиц от концентрации НЧ золота в водных растворах при добавлении а) БСА (слева) $\langle R \rangle_{\text{эксн.}} \sim 25$ нм, б) γ -глобулина (справа) $\langle R \rangle_{\text{эксн.}} \sim 35$ нм

На рисунке 24 представлены результат обработки экспериментальных данных с помощью программы “DynaLS” для метода ДРС.

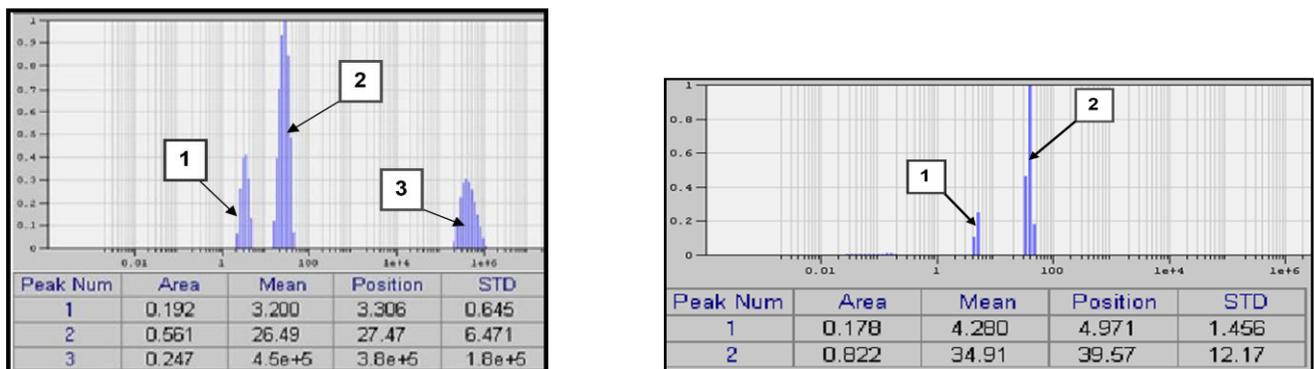


Рисунок 24. Результат обработки экспериментальных данных с помощью программы “DynaLS” для растворов, содержащих НЧ золота при добавлении слева

БСА (1 – БСА, 2 – НЧ золота, а 3 – артефактный пик), а справа для раствора γ -глобулина (1 – γ -глобулин, 2 – смесь НЧ золота и γ -глобулин)

4.1.2 Модельные растворы сыворотки крови с НЧ золота

В дальнейших экспериментах были рассмотрены три модельных раствора, соответствующие: а) здоровой крови (рис. 25 а), б) зоне риска (рис. 25 б) и в) больной крови (рис. 25 в) методом динамического рассеяния [106]. Во всех трех случаях (табл. 7) наблюдается уменьшение коэффициента трансляционной диффузии НЧ золота, что свидетельствует о взаимодействии НЧ золота и белков. Анализируя результаты предыдущей серии экспериментов (п. 4.1.1), можно сделать вывод о том, что НЧ золота взаимодействуют только с одним из белков – γ -глобулином.

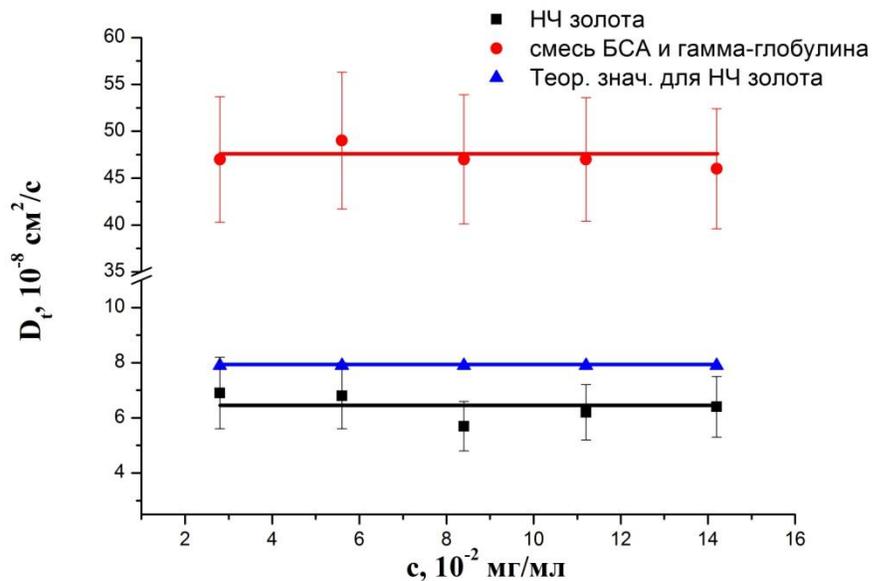


Рисунок 25а. График зависимости коэффициента трансляционной диффузии D_t от концентрации НЧ золота (модельный раствор сыворотки крови здорового пациента)

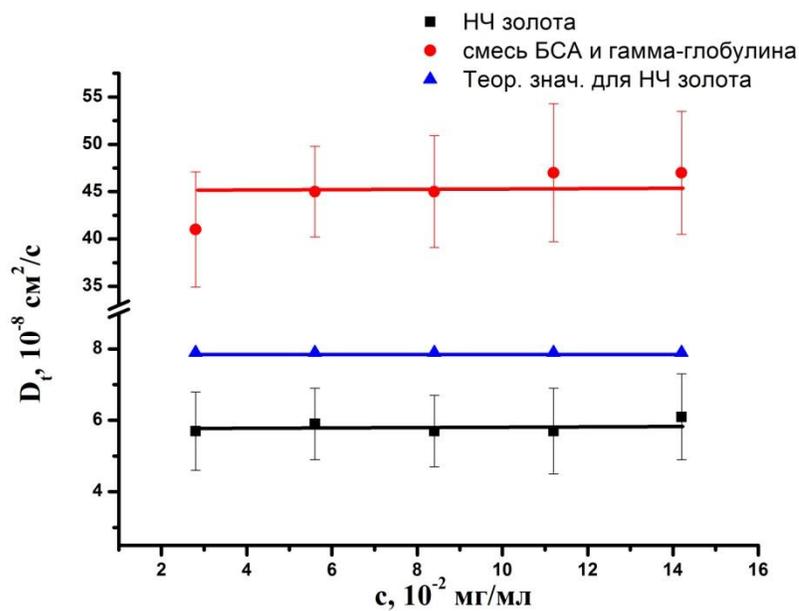


Рисунок 25б. График зависимости коэффициента трансляционной диффузии D_t от концентрации НЧ золота (модельный раствор, соответствующий зоне «риска»)

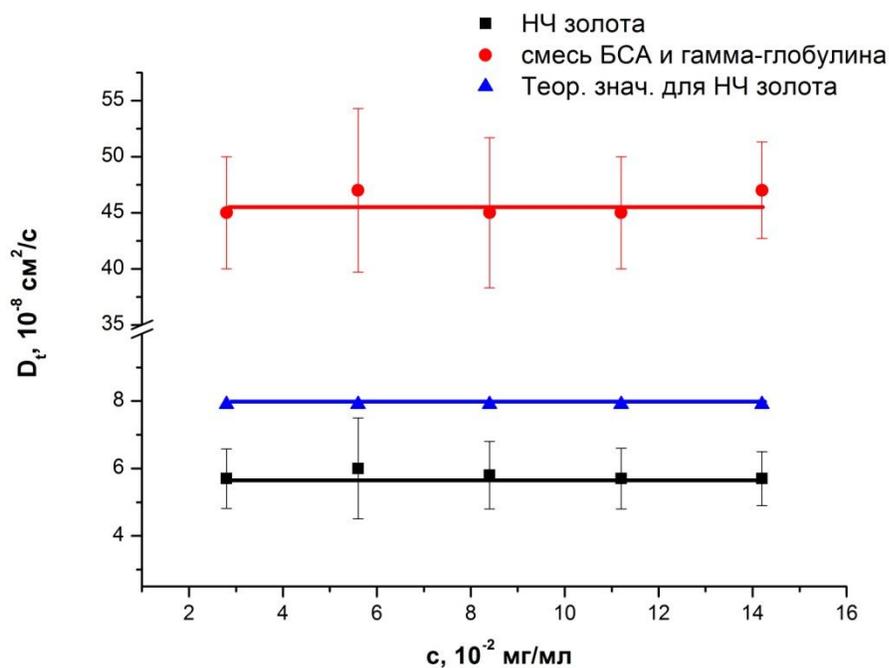


Рисунок 25в. График зависимости коэффициента трансляционной диффузии D_t от концентрации НЧ золота (модельный раствор сыворотки крови больного пациента)

Модельный раствор при добавлении НЧ золота	$D_{\text{теор. НЧ золота}}$	$D_{\text{эксп. НЧ золота}}$	$D_{\text{эксп. белки}}$
А) сыворотки крови «здорового» человека	$8,5 \cdot 10^{-8} \text{ см}^2/\text{с}$	$6 \cdot 10^{-8} \text{ см}^2/\text{с}$	$4,5 \cdot 10^{-7} \text{ см}^2/\text{с}$
Б) сыворотки крови «больного» человека	$8,5 \cdot 10^{-8} \text{ см}^2/\text{с}$	$5,9 \cdot 10^{-8} \text{ см}^2/\text{с}$	$4,5 \cdot 10^{-7} \text{ см}^2/\text{с}$
В) зоны «риска»	$8,5 \cdot 10^{-8} \text{ см}^2/\text{с}$	$5,9 \cdot 10^{-8} \text{ см}^2/\text{с}$	$4,5 \cdot 10^{-7} \text{ см}^2/\text{с}$

Таблица 7. Сравнение результатов трех модельных растворов сыворотки крови человека

4.1.3 Нативные растворы сыворотки крови с НЧ золота

На завершающем этапе были проведены эксперименты с разбавленными растворами нативных образцов сыворотки крови³ человека при помощи статического метода рассеяния света [107]. На рисунке 26 представлен график зависимости параметра рассеяния cH/R_{90} в водных растворах НЧ золота. По наклону прямой была оценена масса НЧ золота: $M_{\text{эксп}} \sim 1,6 \cdot 10^{11}$ г/моль, что хорошо согласуется с теоретическим значением – $M_{\text{теор}} \sim 0,8 \cdot 10^{11}$ г/моль.

³ РАМПО – Образцы предоставлены лабораторией радиологии (ст. науч. сотр. Папиш Е.А.)

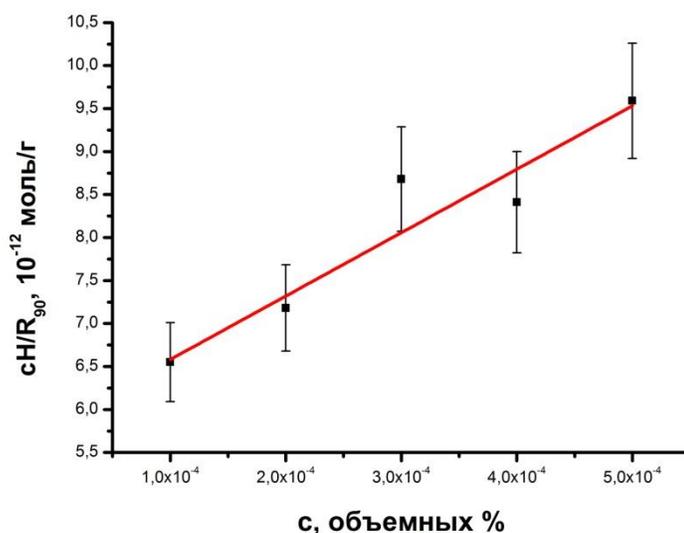


Рисунок 26. График концентрационной зависимости параметра рассеяния cH/R_{90} в водных растворах НЧ золота

В дальнейших экспериментах было исследовано большое количество образцов (100 штук) сыворотки крови здоровых людей и больных пациентов с онкологическими заболеваниями разных возрастов, в том числе и прошедших лечение (гистограмма 1).

В ходе экспериментов определялись масса рассеивающих частиц и коэффициент межмолекулярного взаимодействия. Результаты исследования показали, что для здоровых пациентов зависимость параметра рассеяния имеет положительный наклон (рис. 27 а). Для больных пациентов наклон параметра рассеяния становится отрицательным (рис. 27 б). Поскольку наклон прямой связан с тангенсом угла наклона, то коэффициент межмолекулярного взаимодействия можно рассматривать как один из основных параметров при ранней диагностике различных заболеваний, связанных с компонентами плазмы крови.

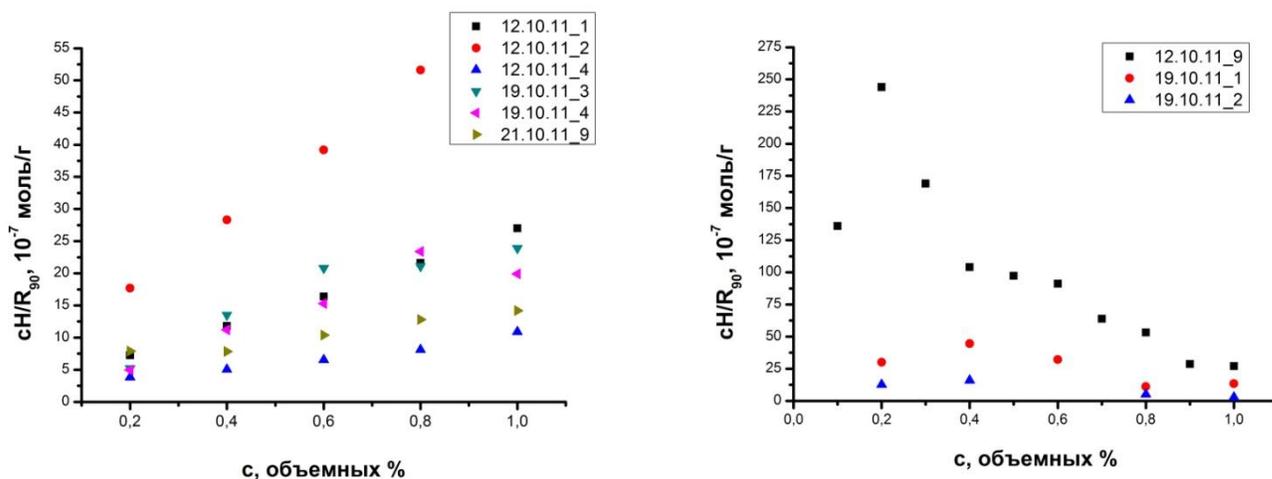
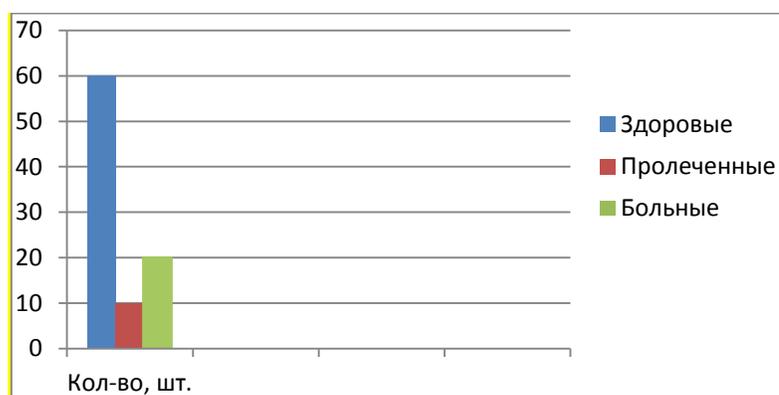


Рисунок 27. График концентрационной зависимости параметра рассеяния sH/R_{90} разбавленных растворов нативных образцов сыворотки крови а) здоровых пациентов, б) больных пациентов



Гистограмма 1 исследуемых образцов сыворотки крови

Далее исследовалось взаимодействие НЧ золота с разбавленными растворами нативных образцов сыворотки крови здорового (рис. 28) и больного пациентов (рис. 29). В первом случае при добавлении в раствор НЧ золота положительный наклон зависимости сохраняется (рис. 28 а, б), т.е. не меняет своего знака. Во втором случае наклон зависимости для больных пациентов является отрицательным (рис. 29 а, б), а при добавлении НЧ золота становится положительным. Из полученных данных следует, что, вероятно, НЧ золота взаимодействуют с белком γ -глобулином, что приводит к изменению знака коэффициента межмолекулярного взаимодействия B и

наклон меняется на противоположный. Данный результат хорошо согласуется с нашими экспериментами по модельным растворам сыворотки крови.

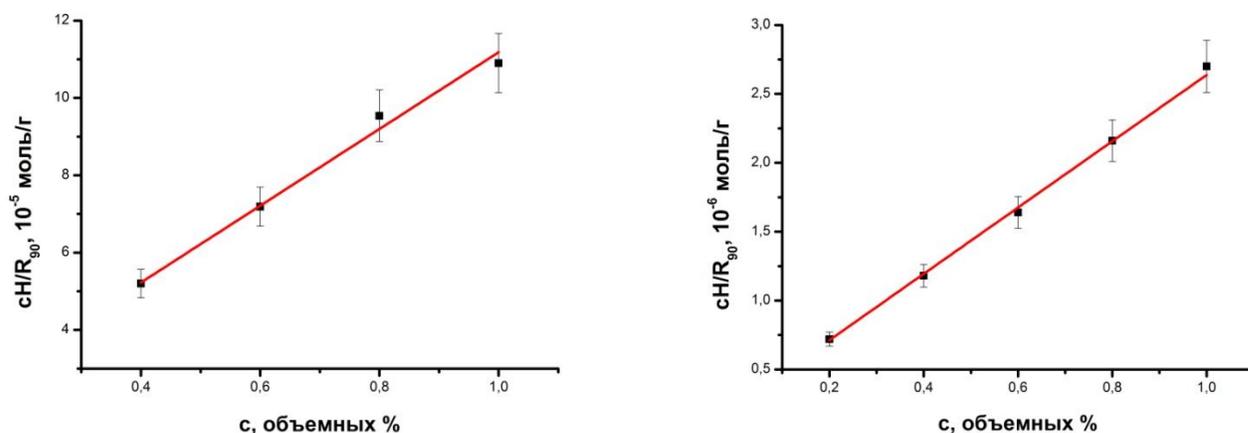


Рисунок 28. График концентрационной зависимости параметра рассеяния sH/R_{90} разбавленных растворов образцов сыворотки крови здоровых пациентов: а) без добавления НЧ золота, б) с добавлением НЧ золота

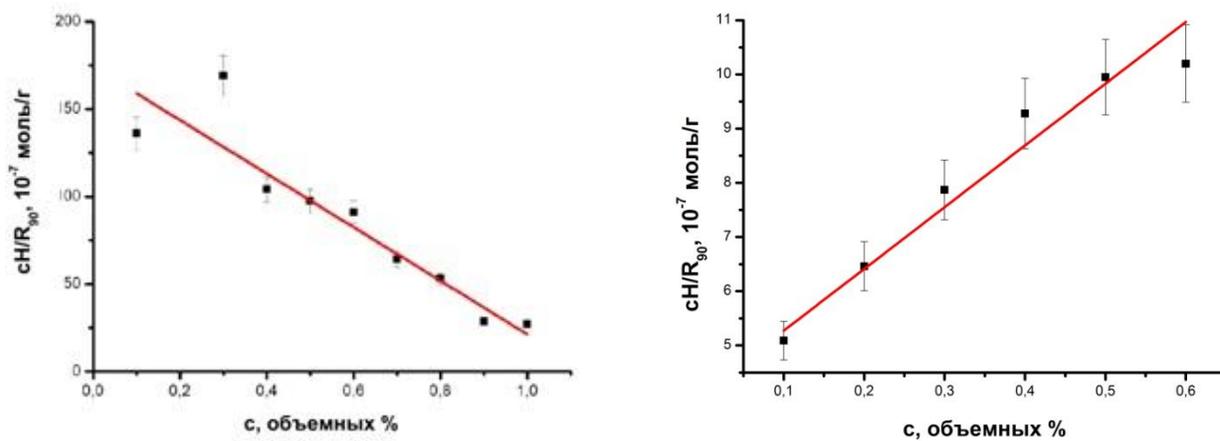


Рисунок 29. График концентрационной зависимости параметра рассеяния sH/R_{90} разбавленных растворов образцов сыворотки крови больных пациентов: а) без добавления НЧ золота, б) с добавлением НЧ золота

4.1.4 Качественный анализ спектра

Для проведения качественного анализа проб по ИК спектрам необходимо провести их интерпретацию. При этом сопоставляют экспериментальные данные и теоретический расчет. Изучение инфракрасных спектров веществ в настоящее время проводится двумя методами: выявлением характеристических частот и сравнением спектров сложных веществ со спектрами индивидуальных соединений [70].

Метод характеристических частот

Молекулы, имеющие одни и те же химические группы, часто имеют одинаковые частоты в спектре. Эти частоты называют характеристическими.

Расшифровка инфракрасного спектра производится следующим образом: идентификацию полос поглощения начинают с наиболее сильных и высокочастотных полос в области валентных колебаний ОН-связи. По таблицам характеристических частот полосу поглощения относят к колебанию конкретной связи. Наличие той или иной связи подтверждают деформационной полосой поглощения, относящейся к данной связи [70].

Метод сравнения

Неизвестное соединение по ИК спектру находится путем сравнения его спектра с эталонными спектрами. Для этого необходима большая база данных эталонных спектров; при этом важнейшим фактором является стандартность условий их регистрации. В настоящее время имеются многочисленные атласы органических и неорганических соединений [70].

Рассмотрим рисунок 30 а, на котором изображен ИК-спектр пропускания водного раствора НЧ золота и альбумина и сравним его с рисунком 30 б, на котором изображен ИК-спектр пропускания водного раствора НЧ золота. Из анализа спектров видно, что в первом случае интенсивность увеличилась, а ширина пиков не

изменилась. Из этого следует, что, несмотря на то, что интенсивность изменилась, водный раствор не изменил своей структуры. Данный результат подтверждает то, что НЧ золота не вступают во взаимодействие с молекулами альбумина в водных растворах.

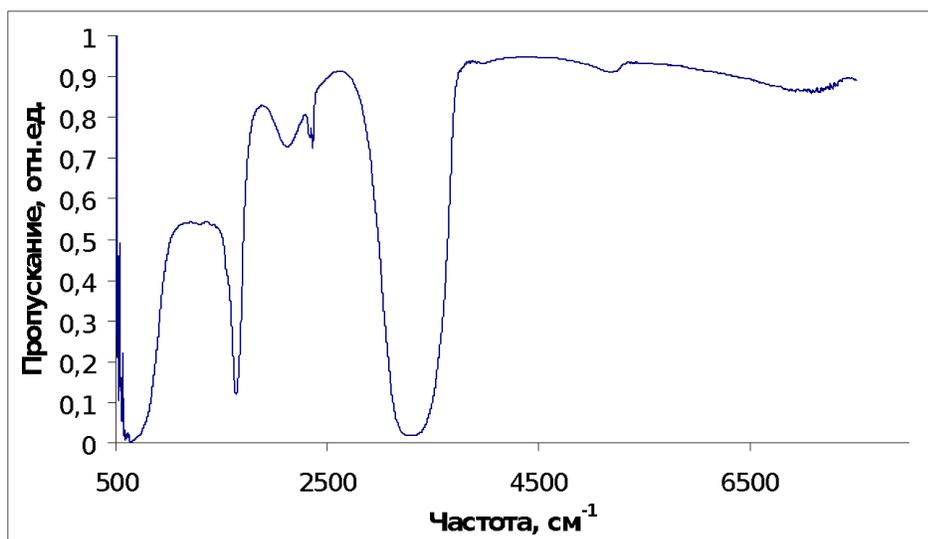


Рисунок 30 а. График зависимости интенсивности рассеивающих частиц от длины волны для раствора НЧ золота и белка альбумина

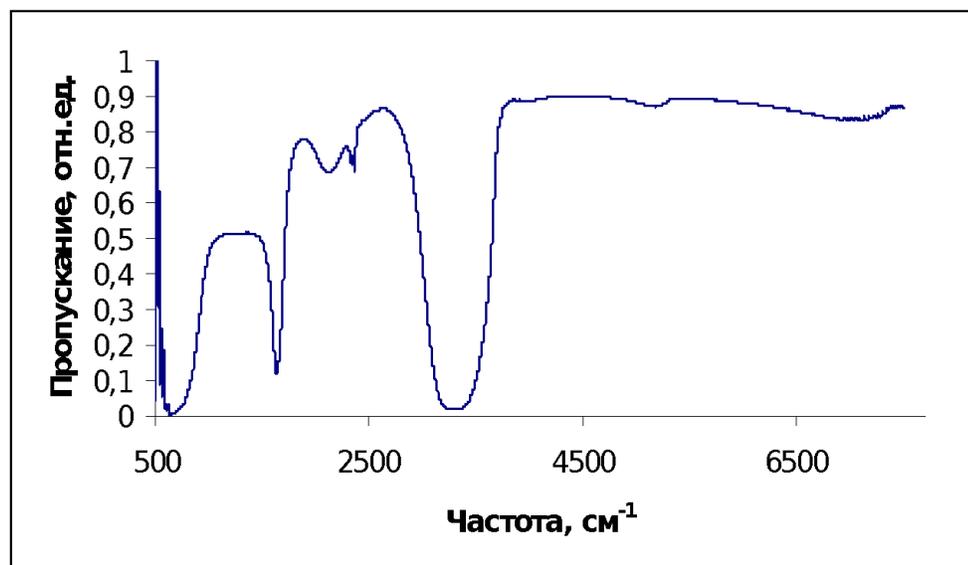


Рисунок 30 б. График зависимости интенсивности рассеивающих частиц от длины волны для раствора НЧ золота

4.2 Растворы альбумина, содержащие хлорид железа III

4.2.1 Приготовление исследуемых растворов

В данной работе в качестве железосодержащего компонента использовался 30% водный раствор хлорида железа (III) фирмы Panreac и БСА фирмы Sigma.

В качестве растворителя использовалась вода для инъекций (ОАО «Биохимик», pH 7.0). Измерения проводились при температуре 20 °С.

Для проведения экспериментов необходимо было приготовить три раствора: с нормальным (соответствующим здоровому организму) содержанием железа (1.12 мг/л), повышенным (3.35 мг/л) и пониженным (0.28 мг/л), соответственно. Для приготовления первого раствора использовалось 10 мкл 30% хлорида железа (III), который затем разводился в 5 мл воды. В полученном растворе (1) масса хлорида железа (III) составляла 13.4 мг. Из нового раствора (1) бралось 21 мкл и добавлялось в 5 мл воды. В итоге получался раствор с нормальной концентрацией железа. Для растворов с повышенной и пониженной концентрациями, бралось 62 мкл и 5 мкл полученного водного раствора (1) хлорида железа (III), соответственно, и добавлялось в 5 мл воды. Далее в каждый из этих образцов добавлялось 20 мкл раствора БСА концентрацией 50 мг/мл.

4.2.2 Экспериментальные результаты, полученные методом ДРС

В ходе эксперимента фиксировалась концентрация хлорного железа и изменялась концентрация БСА. На основе полученных результатов, методом динамического рассеяния света были построены графики зависимости гидродинамического радиуса (R_h) и коэффициента трансляционной диффузии (D_t) от концентрации БСА [108].

Первая серия экспериментов проводилась с растворами БСА и растворами БСА в присутствии хлорида железа III ($c(\text{Fe}^{3+}) = 0.28$ мг/л), что соответствует пониженному содержанию железа в крови человека (рис. 31).

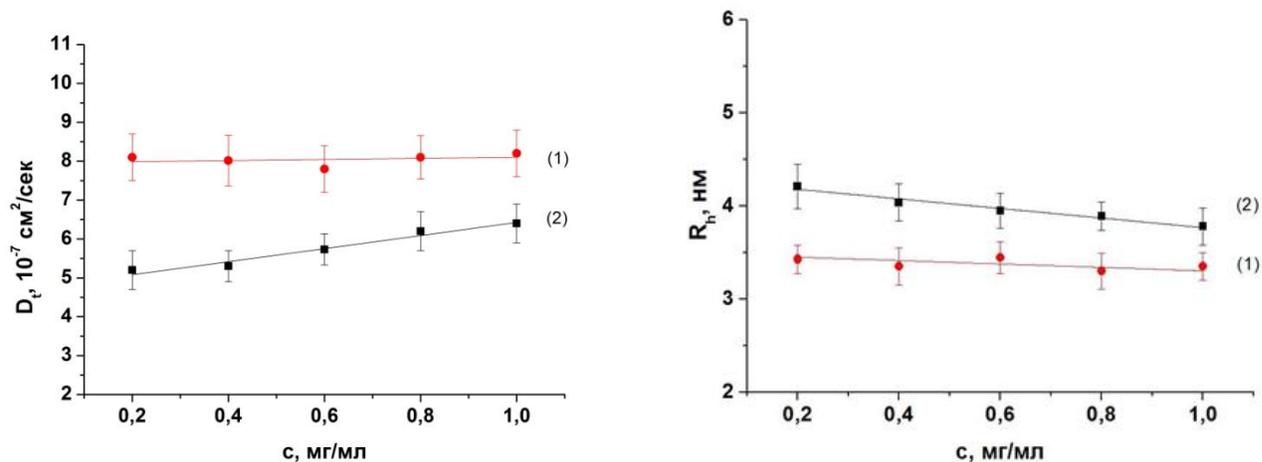


Рисунок 31. График концентрационной зависимости коэффициента трансляционной диффузии (D_t) (слева), гидродинамического радиуса (R_h) (справа) (для чистого БСА (1) и (2) – молекул БСА, при добавлении водного раствора хлорида железа III с содержанием Fe^{3+} равным 0.28 мг/л)

Затем была проведена серия экспериментов с растворами, содержащими нормальную концентрацию железа ($c(\text{Fe}^{3+}) = 1.12$ мг/л) (рис. 32).

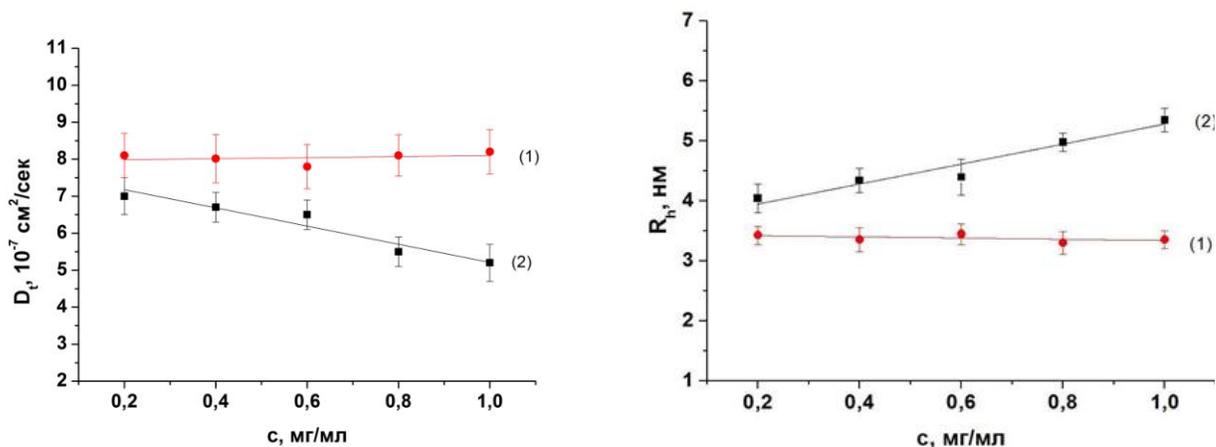


Рисунок 32. График концентрационной зависимости коэффициента трансляционной диффузии (D_t) (слева) и гидродинамического радиуса R_h (справа) ((1) – раствор чистого БСА и (2) – раствор БСА, при добавлении водного раствора хлорида железа III с содержанием Fe^{3+} равным 1.12 мг/л

Последняя серия экспериментов проводилась для повышенной концентрации железа ($c(Fe^{3+}) = 3.35$ мг/л) (рис. 33).

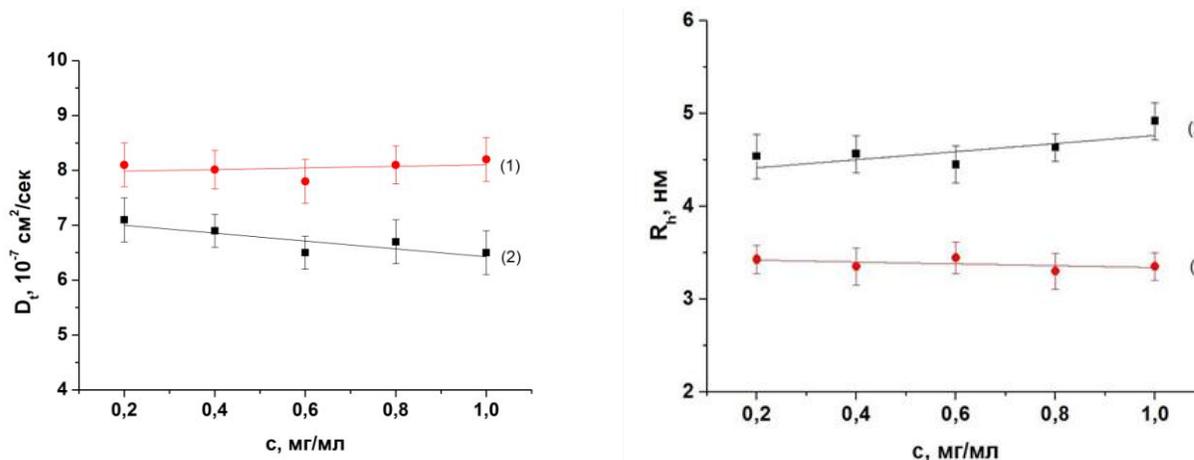


Рисунок 33. График концентрационной зависимости коэффициента трансляционной диффузии (D_t) (слева), гидродинамического радиуса (R_h) (справа) ((1) – молекул чистого БСА и (2) – молекул БСА, при добавлении водного раствора хлорида железа III с содержанием Fe^{3+} равным 3.35 мг/л)

4.2.3 Экспериментальные результаты, полученные методом статического рассеяния света

Методом статического рассеяния света был определен коэффициент межмолекулярного взаимодействия – B для растворов БСА при добавлении хлорида железа III (рис. 34) и молекулярная масса рассеивающих частиц – M (рис. 35) [107].

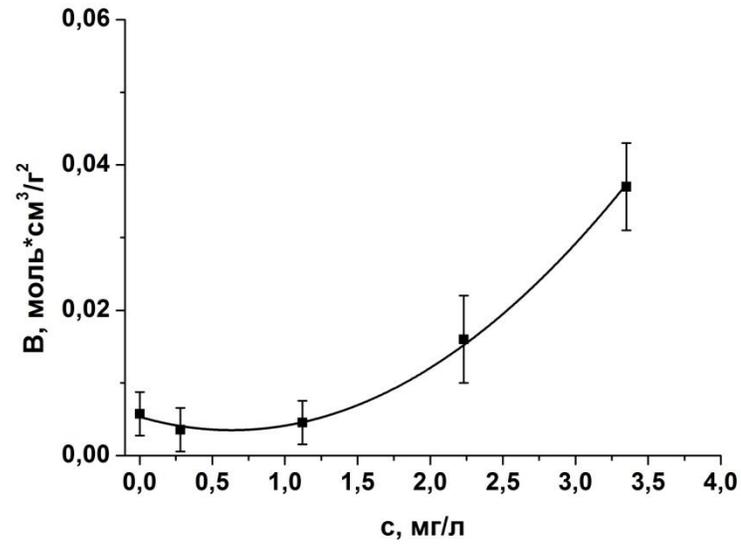


Рисунок 34. График концентрационной зависимости коэффициента межмолекулярного взаимодействия от концентрации Fe^{3+}

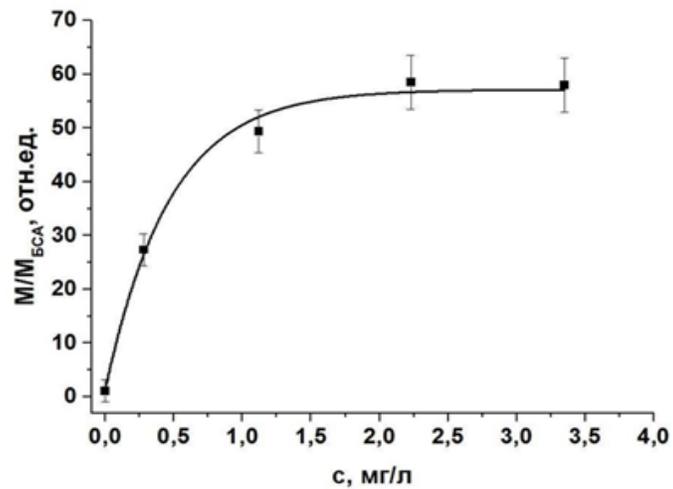


Рисунок 35. График концентрационной зависимости отношения молекулярной массы рассеивающих частиц к молекулярной массе БСА от концентрации Fe^{3+}

4.2.4 Экспериментальные результаты, полученные методом флуоресценции

В данной серии экспериментов были измерены спектры поглощения БСА, воды, FeCl_3 , а также растворов FeCl_3 +БСА. На рисунке 36 приведены спектры поглощения воды, БСА и FeCl_3 .

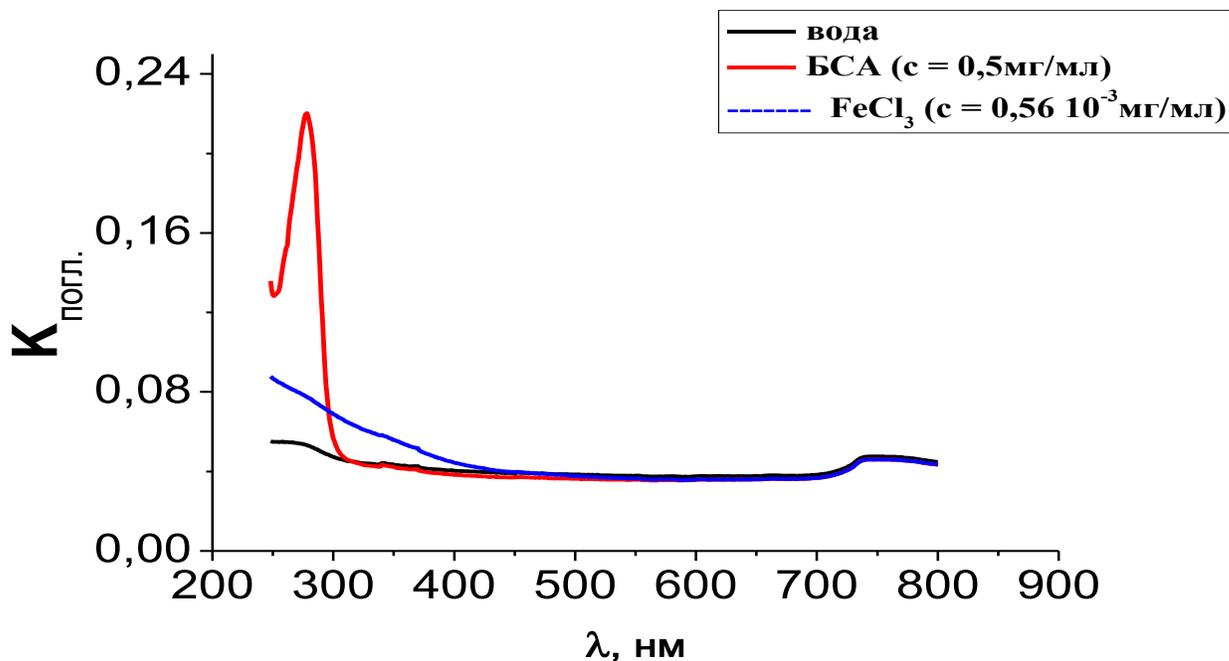


Рисунок 36. Спектр поглощения воды, БСА и FeCl_3

Максимум поглощения БСА приходится на длину волны 278 нм, что соответствует поглощению тирозина и триптофана. Чистый раствор FeCl_3 в воде также обладает некоторым поглощением в интересующей нас области.

Как видно из рисунка 37, спектры поглощения указанных смесей почти полностью совпадают, что опять же говорит о том, что хлорид железа III не взаимодействует с БСА.

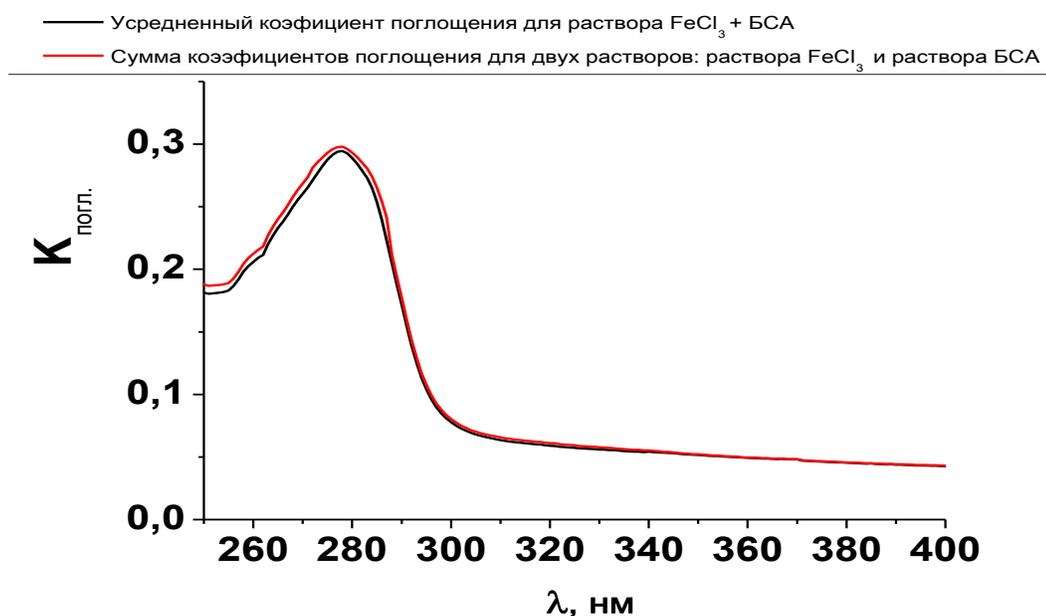


Рисунок 37. Спектр поглощения для раствора FeCl_3 +БСА и суммарный спектр поглощения двух растворов: БСА и FeCl_3

Усредненный спектр флуоресценции раствора FeCl_3 +БСА имеет такой же вид, как и спектр чистого БСА (рис. 38), интенсивность остается на таком же уровне, пик излучения по длине волны не смещается (335 нм).

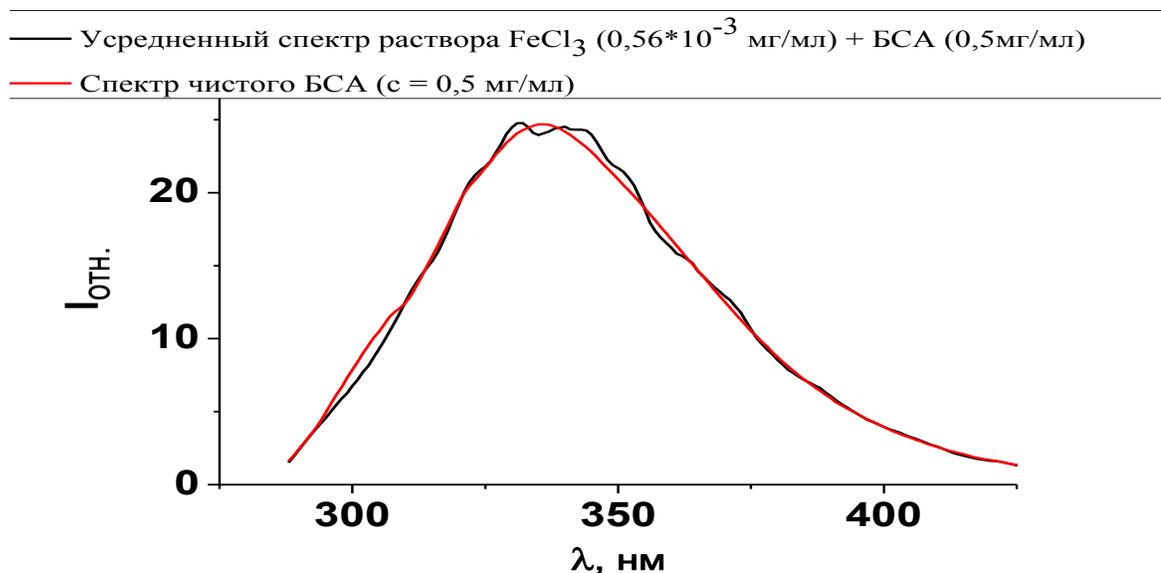


Рисунок 38. Спектр испускания флуоресценции для чистого БСА и смеси БСА+ FeCl_3 , возбуждение проводилось на длине волны максимального поглощения 278 нм

4.3 Растворы γ -глобулина, содержащие хлорид железа III

4.3.1 Приготовление образцов

При приготовлении образцов в качестве растворителя использовалась вода для инъекций (ОАО «Биохимик», $pH \approx 7$). Значения pH измерялись каждый раз при разведении новой серии растворов. Измерения проводились при температуре 20 °С.

Для исследования динамических свойств чистого раствора γ -глобулина в 3 мл чистой воды добавляется раствор γ -глобулина концентрацией 20 мг/мл и шагом 15 мкл. Таким образом, измерения проводятся для концентраций γ -глобулина от 0.1 мг/мл до 0.5 мг/мл с шагом 0.1 мг/мл.

Так как исследуемое вещество $FeCl_3$ компании «Panreac» имеет слишком большую концентрацию, для исследования динамических свойств молекул γ -глобулина в водных растворах необходимо приготовить менее разбавленный раствор $FeCl_3$. Для приготовления этого раствора используется 60 мкл из исследуемого раствора $FeCl_3$ компании «Panreac» и добавляется в 3 мл воды. В полученном разбавленном растворе концентрация $FeCl_3$ составляет 26 мг/мл.

Для эксперимента по исследованию взаимодействия γ -глобулина и $FeCl_3$ нужно получить два раствора, которые получаются двумя различными способами.

В первом случае из получившегося разбавленного раствора $FeCl_3$ берется 12 мкл и добавляется в 3 мл воды. В итоге мы получаем концентрацию $FeCl_3$ равную 0.1 мг/мл. В полученный раствор добавляется раствор γ -глобулина концентрацией 20 мг/мл с шагом 3 мкл. Таким образом, измерения проводятся для концентраций γ -глобулина от 0.02 мг/мл до 0.1 мг/мл с шагом 0.02 мг/мл.

Во втором случае берется 15 мкл из раствора γ -глобулина концентрацией 20 мг/мл и добавляется в 3 мл воды. В полученном растворе концентрация γ -глобулина

составляет 0.1 мг/мл. Далее к этому раствору добавляется FeCl_3 из разбавленного раствора с шагом 2.4 мкл. В этом случае измерения проводятся для концентрации FeCl_3 от 0.02 мг/мл до 0.1 мг/мл с шагом 0.02 мг/мл.

4.3.2 Экспериментальные результаты, полученные методом ДРС

В ходе экспериментов были получены следующие результаты [109]:

На рисунке 39 приведены данные для раствора чистого γ -глобулина в изоэлектрической точке (для γ -глобулина изоэлектрическая точка $pI \approx 6$). По полученным данным видно, что со временем и при изменении концентрации γ -глобулина в растворе гидродинамический радиус практически не изменяется и составляет $R_h \approx (6.38 \pm 0.67)$ нм, что согласуется с литературными данными $R_h \approx (7.12 \pm 0.2)$ нм [51].

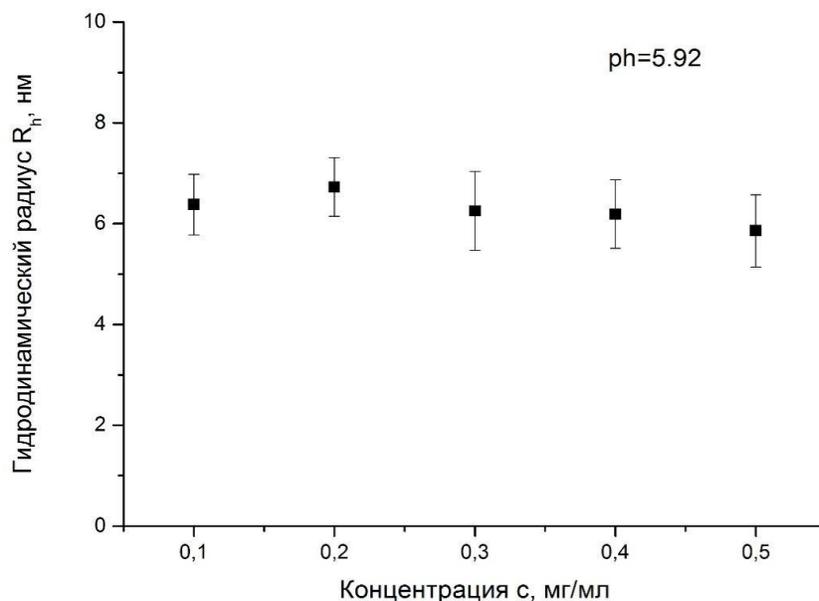


Рисунок 39. График зависимости гидродинамического радиуса R_h от концентрации γ -глобулина

На рисунке 40 показан пример обработки программой “DynaLS”, в котором отражено распределение рассеиваемых частиц в растворе γ -глобулина по размерам.

Первый пик соответствует γ -глобулину, второй пик – это артефактный пик, связанный с явлением входа–выхода частиц из объема рассеяния, так как частицы в растворе совершают броуновское движение, то они то попадают, то покидают объем рассеяния [110].

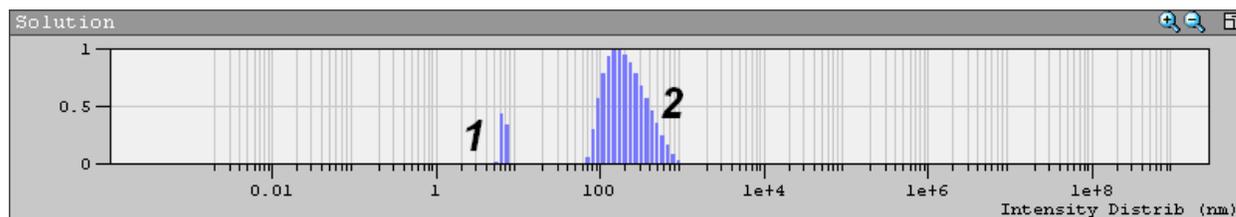


Рисунок 40. Распределение по размерам рассеивающих частиц в водном растворе γ -глобулина

В таблице 8 приведен пример полученных данных для раствора γ -глобулина при концентрации $c = 0.1$ мг/мл.

Номер пика	R_h , нм	Погрешность, нм
1	6,543	0,589
2	253,0	142,5

Таблица 8. Результаты измерений для гидродинамического радиуса (к рисунку 40)

На рисунке 41 приведены данные для раствора чистого γ -глобулина. По полученным данным видно, что коэффициент трансляционной диффузии практически не изменяется при изменении концентрации γ -глобулина. Полученное значение для D_t составило $D_t \approx (3.45 \pm 0.38) \cdot 10^{-7}$ см²/с, что совпадает с литературными данными $D_t \approx (3,8 \pm 0,2) \cdot 10^{-7}$ см²/с [51].

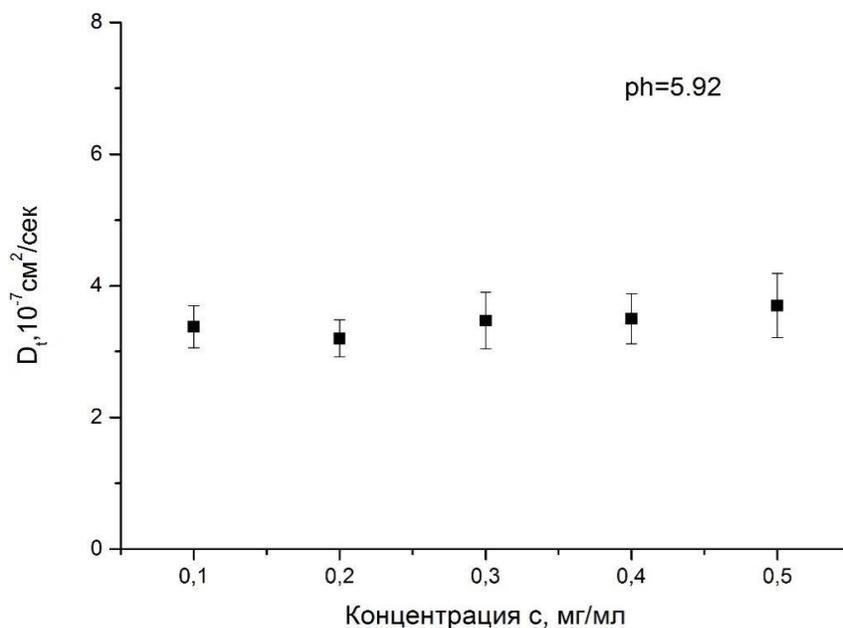


Рисунок 41. График зависимости коэффициента трансляционной диффузии D_t от концентрации γ -глобулина

На рисунке 42 показан пример обработки программой *DynaLS*, в котором отражено распределение рассеиваемых частиц в чистом растворе γ -глобулина по коэффициенту трансляционной диффузии. Первый пик соответствует артефактному пику, второй пик соответствует γ -глобулину.

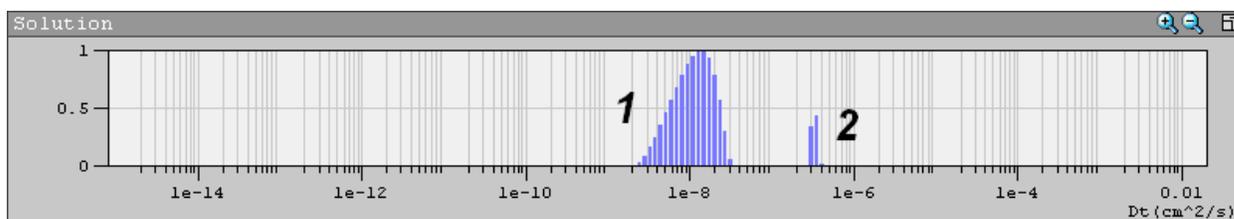


Рисунок 42. Распределение по коэффициенту трансляционной диффузии рассеивающих частиц в водном растворе γ -глобулина

В таблице 9 приведен пример полученных данных для коэффициента трансляционной диффузии для раствора γ -глобулина при концентрации $c=0.1$ мг/мл.

Номер пика	$D_t, 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{сек}$	Погрешность, $10^{-7} \text{ cm}^2/\text{сек}$

1	0,12	0,061
2	3,3	0,3

Таблица 9. Результаты измерений для коэффициента трансляционной диффузии (к рисунку 42)

На рисунке 43 представлены данные для коэффициента трансляционной диффузии раствора чистого γ -глобулина при изменении pH среды. По графику видно, что коэффициент диффузии меняется при изменении pH . Зависимость D_t от pH близка к параболической.

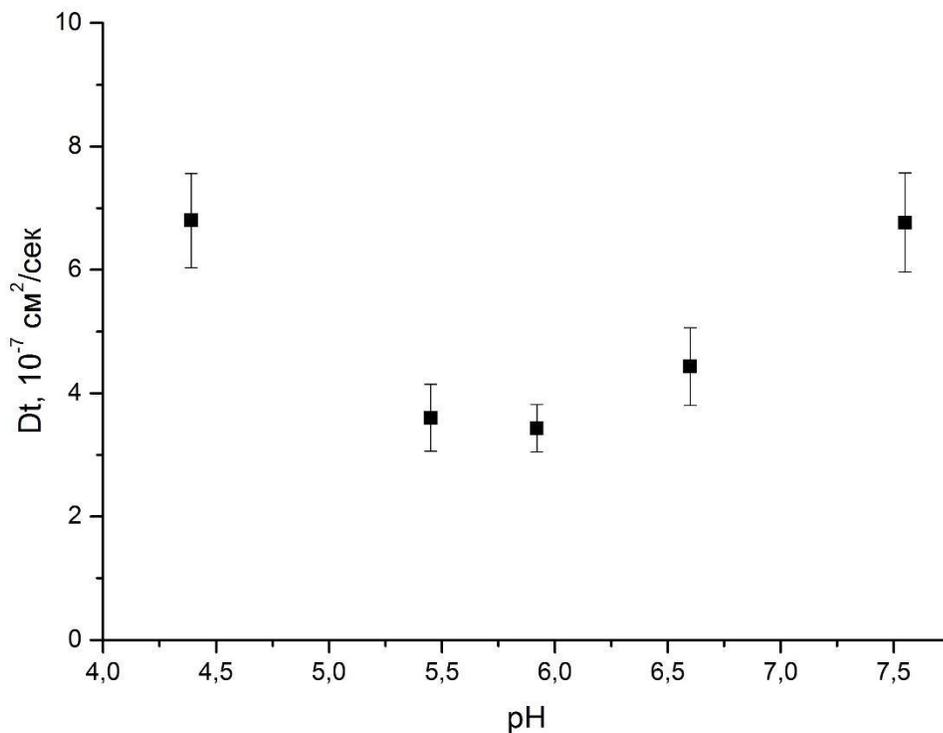


Рисунок 43. График зависимости коэффициента трансляционной диффузии D_t от pH раствора. Концентрация γ -глобулина 0.05 мг/мл

На рисунке 44 представлена зависимость коэффициента трансляционной диффузии D_t от концентрации γ -глобулина при концентрации $c(\text{FeCl}_3)=0.1$ мг/мл. По

полученным данным видно, что коэффициент трансляционной диффузии остается постоянным в пределах погрешности.

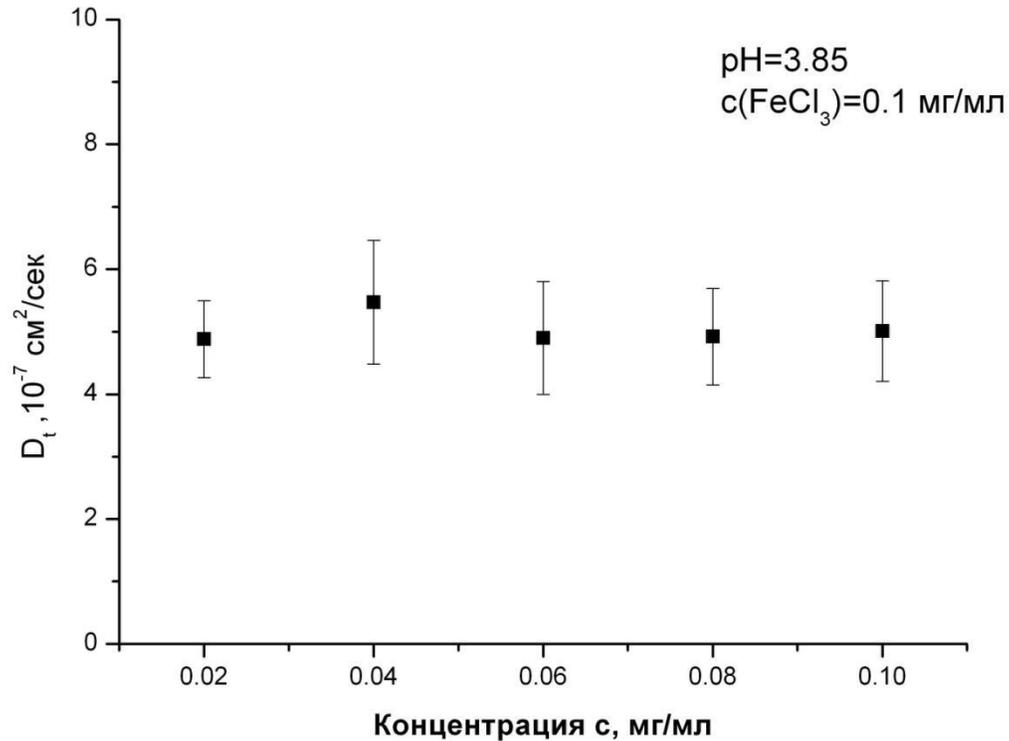


Рисунок 44. График зависимости коэффициента трансляционной диффузии D_t от концентрации γ -глобулина при добавлении $Fe(Cl)_3$

Полученное значение D_t для данных условий ($pH \sim 3.85$ и $c(FeCl_3)=0.1$ мг/мл) составило $D_t \approx (5,01 \pm 0.81) \cdot 10^{-7} \text{ см}^2/\text{с}$, что согласуется в пределах погрешности со значением D_t для γ -глобулина при $pH \sim 3.85$ без добавления $FeCl_3$.

На рисунке 45 представлена зависимость коэффициента трансляционной диффузии D_t от концентрации $FeCl_3$ при концентрации γ -глобулина $c=0.1$ мг/мл. По полученным данным видно, что при добавлении $FeCl_3$ в раствор чистого γ -глобулина с шагом 20 мкл значение D_t остается постоянным в пределах погрешности.

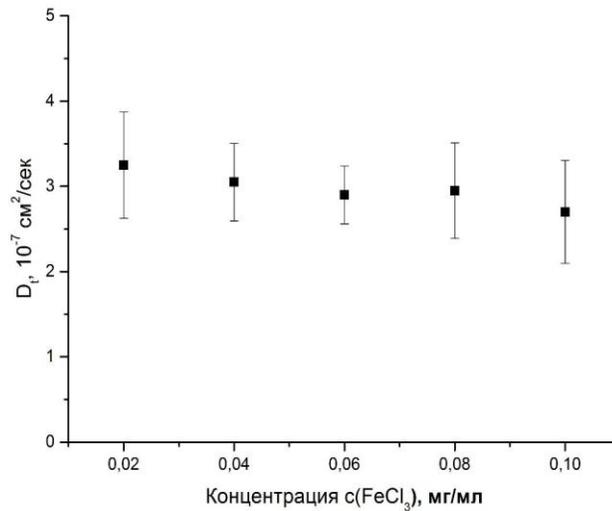


Рисунок 45. График зависимости коэффициента трансляционной диффузии D_t от концентрации FeCl_3

4.4 Растворы, содержащие препарат «Мальтофер»

При приготовлении образцов в качестве растворителя использовалась вода для инъекций (ОАО «Биохимик», pH 7.0). Все измерения проводились при физиологических значениях $pH \approx 7$, при этом, значения pH измерялись каждый раз при разведении новой серии растворов. Измерения проводились при температуре 20 °С.

Для проведения экспериментов необходимо было приготовить три раствора с пониженным (0.7 мг/л), нормальным (1.4 мг/л) и повышенным (2.8 мг/л) содержанием железа, соответственно. Для приготовления первого раствора бралось 10 мкл препарата «Мальтофер» и разбавлялось в 5 мл воды, в полученном растворе масса железа составила 0.5 мг. Из получившегося раствора бралось 0.035 мл и добавлялось в 4.965 мл воды. В итоге получалась пониженная концентрация железа 0.7 мг/л. Для получения нормальной концентрации бралось 0.07 мл водного раствора препарата «Мальтофер» и добавлялось в 4.93 мл воды. Для раствора с повышенной

концентрацией железа бралось 0.14 мл водного раствора препарата «Мальтофер» и добавлялось в 4.86 мл воды.

Для исследования динамических свойств молекул альбумина в водных растворах, содержащих ионы железа, в каждый из трех образцов добавлялся раствор БСА концентрацией 50 мг/мл с шагом 20 мкл. Аналогично, для исследования динамических свойств молекул γ -глобулина в водных растворах, содержащих ионы железа, в каждый из трех образцов добавлялся раствор бычьего сывороточного γ -глобулина концентрацией 8.42 мг/мл с шагом 20 мкл.

Для исследования динамических свойств молекул модельных растворов сыворотки крови здорового человека (больного пациента), содержащих ионы железа, в каждый из трех образцов добавлялся модельный раствор, состоящий из молекул альбумина и γ -глобулина в соотношении 3:1 (1:3) соответственно, с шагом 20 мкл.

4.4.1 Основные результаты экспериментов

Все эксперименты производились при значении $pH \approx 7$. В ходе экспериментов были получены следующие результаты:

На рисунке 46 приведены сравнительные данные для раствора чистого альбумина и для случаев избытка, недостатка и нормального содержания ионов железа в сыворотке крови, полученные методом статического светорассеяния.

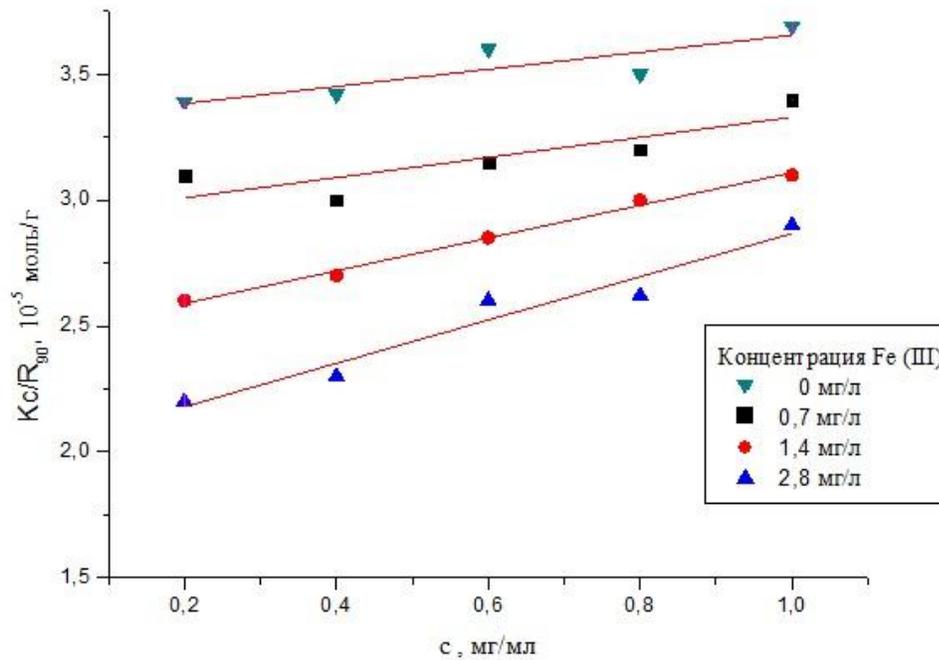


Рисунок 46. График зависимости Kc/R_{90} от концентрации альбумина при различном содержании железа в растворе

С помощью программы *Photocor* были получены массы рассеивающих частиц: $M_{\text{прак}} = 72236$ г/моль ($M_{\text{теор}} = 69000$ г/моль), $M_{\text{нед}} = 74564$ г/моль, $M_{\text{норм}} = 86212$ г/моль, $M_{\text{изб}} = 94732$ г/моль.

На рисунке 47 приведены сравнительные данные для раствора чистого альбумина и для случаев избытка, недостатка и нормального содержания ионов железа в сыворотке крови, полученные методом ДРС.

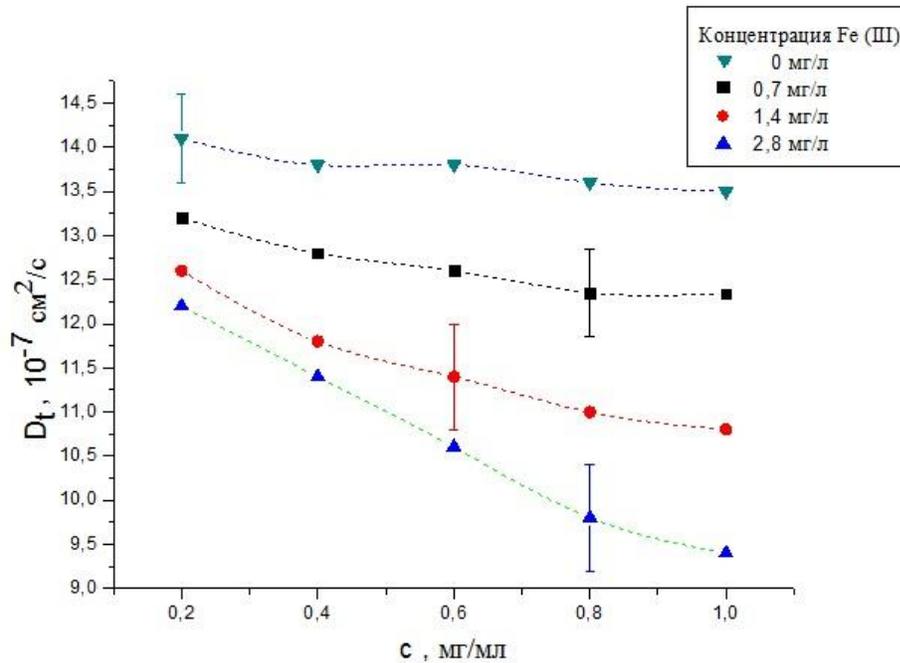


Рисунок 47. График зависимости коэффициента трансляционной диффузии D_t от концентрации альбумина при различном содержании железа в растворе

На рисунке 48 приведены сравнительные данные для модельного раствора (альбумина больше, чем γ -глобулина) для случаев избытка, недостатка и нормального содержания ионов железа в сыворотке крови, полученные методом статического светорассеяния.

С помощью программы *Photocor* были получены массы рассеивающих частиц: $M_{\text{прак}} = 79115$ г/моль, $M_{\text{нед}} = 86783$ г/моль, $M_{\text{норм}} = 95321$ г/моль, $M_{\text{изб}} = 99456$ г/моль.

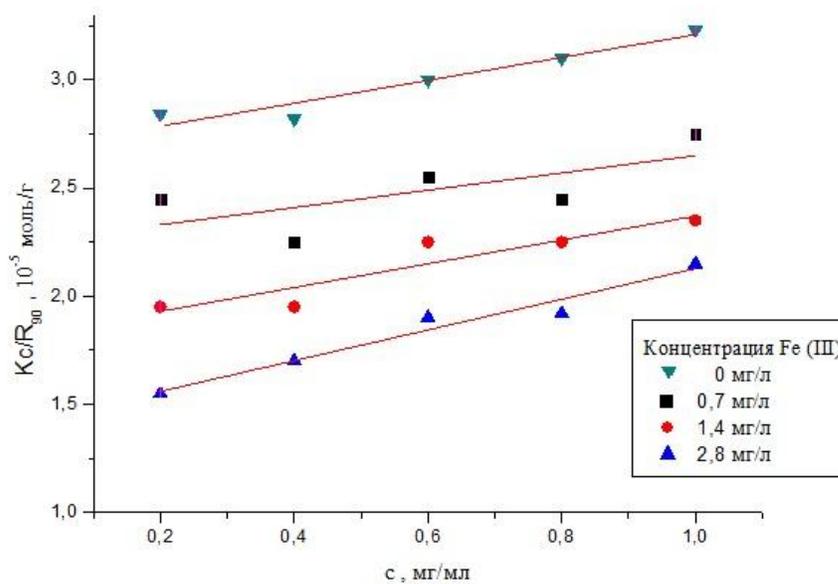


Рисунок 48. График зависимости Kc/R_{90} от концентрации модельного раствора (альбумина больше, чем γ -глобулина)

На рисунке 49 приведены сравнительные данные для модельного раствора (альбумина больше, чем γ -глобулина) для случаев избытка, недостатка и нормального содержания ионов железа в сыворотке крови, полученные методом ДРС.

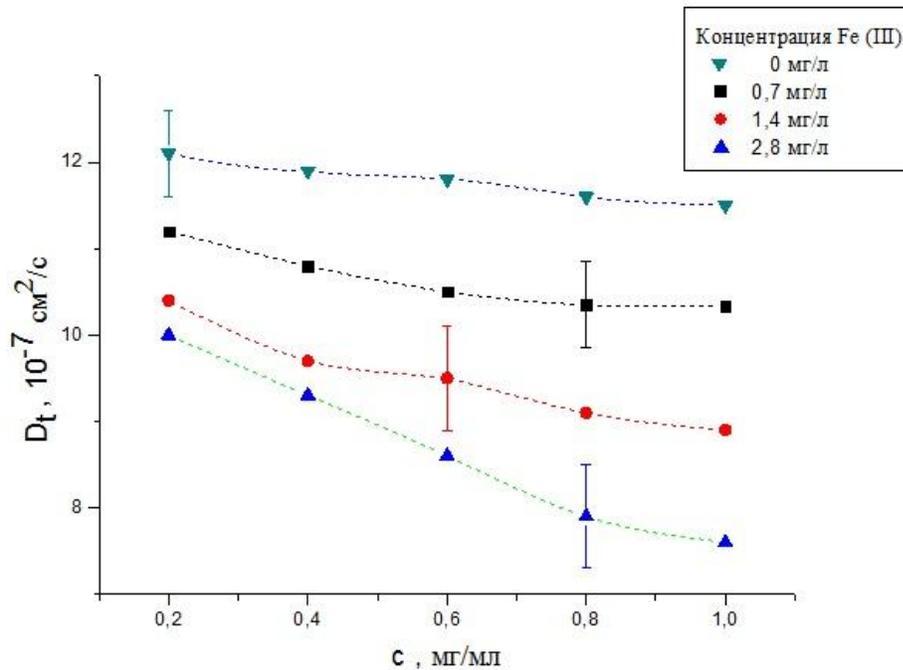


Рисунок 49. График зависимости коэффициента трансляционной диффузии D_t от концентрации модельного раствора (альбумина больше, чем γ -глобулина)

На рисунке 50 приведены сравнительные данные для раствора чистого γ -глобулина и для случаев избытка, недостатка и нормального содержания ионов железа в сыворотке крови, полученные методом статического светорассеяния.

С помощью программы *Photocor* были получены массы рассеивающих частиц: $M_{\text{прак}} = 147800$ г/моль ($M_{\text{теор}} = 150000$ г/моль), $M_{\text{нед}} = 150321$ г/моль, $M_{\text{норм}} = 154674$ г/моль, $M_{\text{изб}} = 156211$ г/моль.

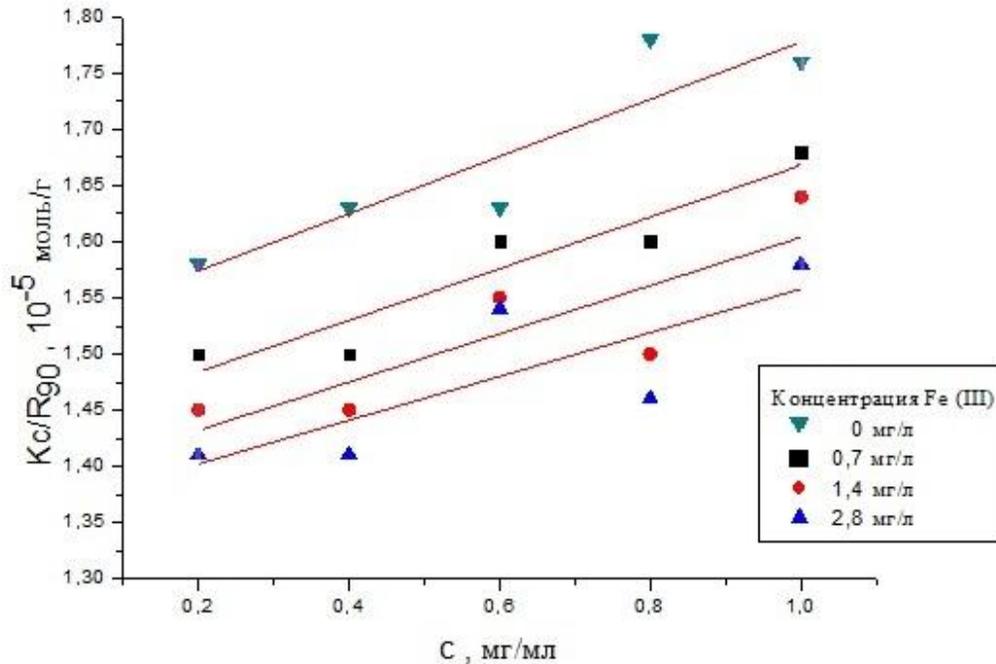


Рисунок 50. График зависимости K_c/R_{90} от концентрации γ -глобулина при различном содержании железа в растворе

На рисунке 51 приведены сравнительные данные раствора чистого γ -глобулина и для случаев избытка, недостатка и нормального содержания ионов железа в сыворотке крови, полученные методом ДРС.

На рисунке 52 приведены сравнительные данные для модельного раствора (γ -глобулина больше, чем альбумина) и для случаев избытка, недостатка и нормального содержания ионов железа в сыворотке крови, полученные методом статического светорассеяния.

С помощью программы *Photocor* были получены массы рассеивающих частиц: $M_{\text{прак}} = 137800$ г/моль, $M_{\text{нед}} = 142129$ г/моль, $M_{\text{норм}} = 148367$ г/моль, $M_{\text{изб}} = 156211$ г/моль.

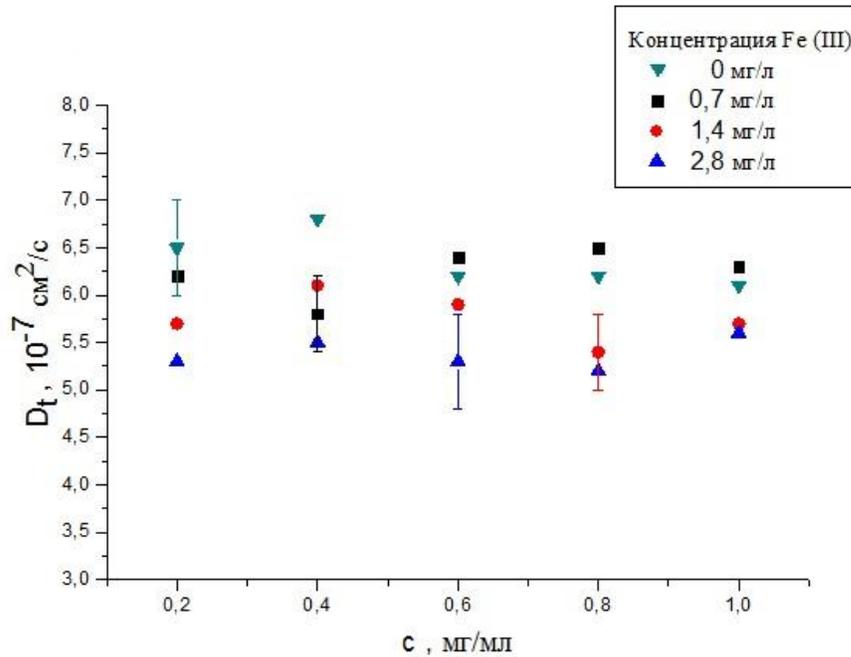


Рисунок 51. График зависимости коэффициента трансляционной диффузии D_t от концентрации γ -глобулина при различном содержании железа в растворе

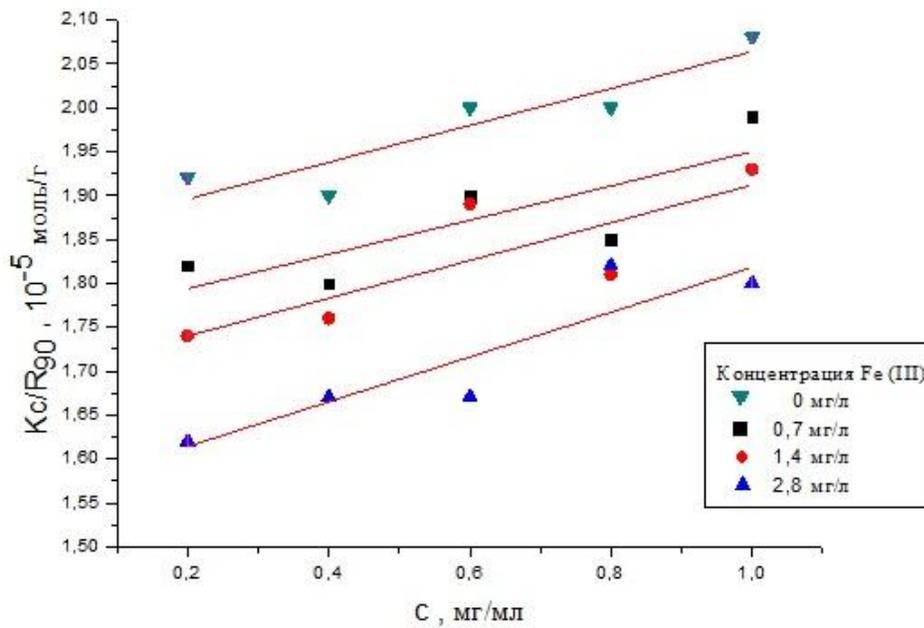


Рисунок 52. График зависимости Kc/R_{90} от концентрации модельного раствора (γ -глобулина больше, чем альбумина) при различном содержании железа в растворе

На рисунке 53 приведены сравнительные данные для модельного раствора (γ -глобулина больше, чем альбумина) и для случаев избытка, недостатка и нормального содержания ионов железа в сыворотке крови, полученные методом ДРС. В таблице 10 представлена сводная информация экспериментальных данных, полученных методами статического и динамического светорассеяния для растворов, содержащих медицинский препарат «Мальтофер».

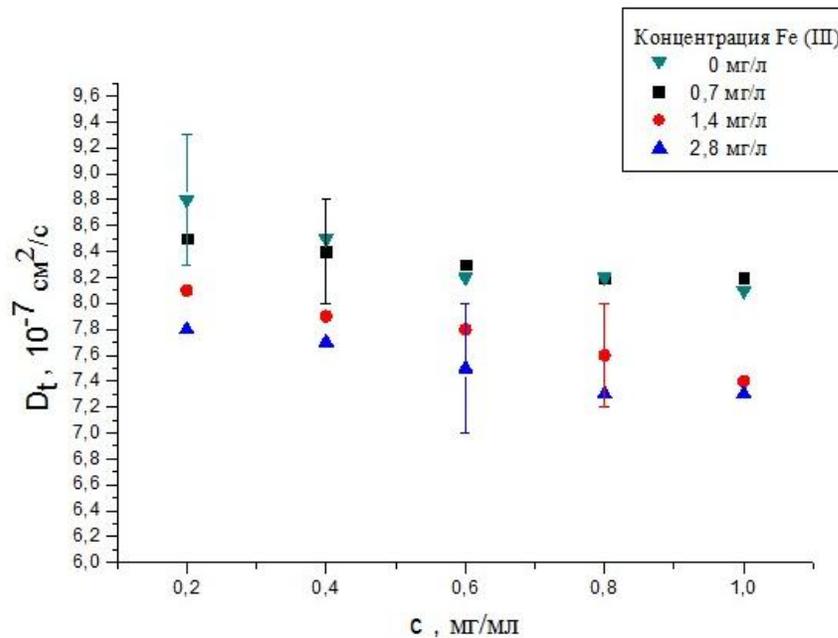


Рисунок 53. График зависимости коэффициента трансляционной диффузии D_t от концентрации модельного раствора (γ -глобулина больше, чем альбумина)

c_{Fe} , мг/л	c , мг/мл	D_t альб., $10^{-7} \text{ см}^2/\text{с}$	D_t γ -глоб., $10^{-7} \text{ см}^2/\text{с}$	D_t мод.р-р (альб > γ -глоб), $10^{-7} \text{ см}^2/\text{с}$	D_t мод.р-р (γ -глоб > альб), $10^{-7} \text{ см}^2/\text{с}$	$M_{\text{эф.}}$, г/моль	
						альб.	γ -глоб.
0	0,2	14,1	6,51	12,12	8,8	72236	147800
	0,6	13,8	6,2	11,82	8,24		
	1	13,5	6,11	11,54	8,11		
0,7	0,2	13,2	6,2	11,27	8,5	74564	150321

	0,6	12,59	6,4	10,51	8,3		
	1	12,34	6,3	10,32	8,21		
1,4	0,2	12,62	5,72	10,4	8,1	86212	154674
	0,6	11,4	5,9	9,5	7,8		
	1	10,8	5,6	8,9	7,45		
2,8	0,2	12,2	5,38	10	7,8	94732	156211
	0,6	10,6	5,3	8,6	7,5		
	1	9,4	5,62	7,6	7,31		

Таблица 10. Сводная таблица результатов экспериментальных исследований водных растворов основных белков сыворотки крови, содержащих ионы железа

Обсуждение результатов экспериментов

Наночастицы золота

Методом ДРС было изучено взаимодействие НЧ золота и основных белков сыворотки крови – альбумина и γ -глобулина. Были получены коэффициенты трансляционной диффузии для компонент исследуемых растворов, а также их гидродинамические радиусы.

Образование кластеров белка альбумина с НЧ золота не было обнаружено. Это обстоятельство вызвано тем, что молекулы альбумина и НЧ золота имеют отрицательный заряд в исследуемых водных растворах.

В экспериментах с γ -глобулином получено, что белок слабо взаимодействует с НЧ золота. Данное взаимодействие приводит к увеличению размеров рассеивающих частиц и уменьшению их молекулярной подвижности (D_t уменьшается) [105]. Вероятно, данный результат может быть связан с формированием дополнительного слоя за счет частичной адсорбции молекул белка на поверхности НЧ золота.

В модельных растворах сыворотки крови также наблюдается взаимодействие НЧ золота с молекулами γ -глобулина, что может быть также связано с явлением частичной адсорбции молекул белка на поверхности НЧ.

В разбавленных растворах нативных образцов сыворотки крови здоровых пациентов с добавлением НЧ золота знак коэффициента межмолекулярного взаимодействия не изменяется (положительный наклон сохраняется), а в образцах крови больных пациентов меняется на противоположный (отрицательный наклон становится положительным) [106].

Мальтофер

Была проведена серия экспериментов по исследованию воздействия ионов железа на основные белки сыворотки крови – альбумин и γ -глобулин. Все

эксперименты производились при физиологических значениях pH ($pH \approx 7$). Полученные результаты, позволяют сделать следующие выводы:

Подвижность молекул альбумина уменьшается с ростом концентрации ионов железа в растворе, при увеличении концентрации препарата «Мальтофер». При этом заметно возрастает молекулярная масса рассеивающих частиц в исследуемых растворах.

В случае растворов γ -глобулина при добавлении препарата «Мальтофер» наблюдаемое уменьшение подвижности и относительный рост массы рассеивающих частиц выражены слабее (примерно на 5 %), чем в предыдущем случае. Это свидетельствует о том, что основное взаимодействие ионов железа происходит с альбумином, который осуществляет транспортную функцию – переносит железосодержащий комплекс.

Хлорид железа III

А) БСА

Полученные значения гидродинамического радиуса молекул превосходят размеры молекул БСА в чистом растворе не более чем на 60%. Это может означать, что в растворе может происходить лишь частичная агрегация белковых молекул.

Увеличение размеров рассеивающих частиц вероятнее всего связано с частичной адсорбцией ионов, образующихся в результате взаимодействия хлорида железа III с водой, на молекулах БСА. Модель данного процесса представлена на рисунке 54.

Вместе с тем, происходит незначительное снижение коэффициента трансляционной диффузии и увеличение коэффициента межмолекулярного взаимодействия, вызванное добавлением FeCl_3 .

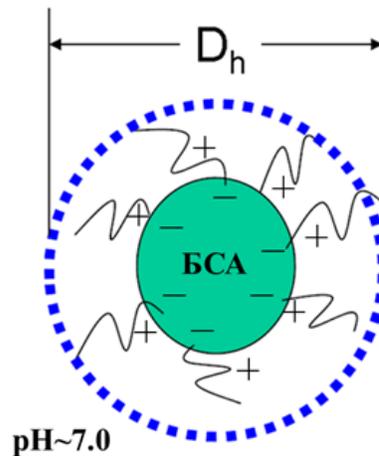


Рисунок 54. Модель частичной адсорбции ионов железа на белке БСА

Полученные в ходе измерений результаты для молекулярной массы рассеивающих частиц в растворе БСА при добавлении хлорида железа III (Табл. 11) сравнивались с величиной массы частиц в чистом растворе хлорида железа III (Табл. 12).

I , ммоль/л	0	0.025	0.1	0.2	0.3
$M/M_{\text{БСА}}$, отн.ед.	1.09	27.03	49.3	58.5	58

Таблица 11. Отношение массы рассеивающих частиц к массе чистого альбумина, в зависимости от ионной силы раствора

	Значение	Погрешность
$M \cdot 10^6$, г/моль	3.25	0.24

В, моль·см ³ г ²	0.601	0.012
--	-------	-------

Таблица 12. Масса рассеивающих частиц и коэффициента межмолекулярного взаимодействия в растворе хлорида железа III

Рассчитанное значение массы частиц в растворе хлорида железа III полностью объясняет столь резкое увеличение массы рассеивающих частиц при добавлении в раствор белковых молекул БСА. Тяжелые ионы комплексных соединений железа, которые, вероятно, образуются при взаимодействии с водой, представляют собой частицы, радиус которых в 50 раз меньше, чем радиус молекул БСА. Теоретически возможным становится факт существования процесса ионной адсорбции, т.е. присоединения этих тяжелых комплексов к молекулам белка, что значительно увеличивает среднюю массу рассеивающих частиц при почти не изменяющемся их гидродинамическом радиусе [108].

Б) γ -глобулин

В работе была проведена серия экспериментов по исследованию поведения молекул γ -глобулина в водных растворах, содержащих хлорид железа III. Исходя из полученных результатов, можно сделать выводы:

Гидродинамический радиус и подвижность молекул γ -глобулина не изменяются при увеличении концентрации γ -глобулина в растворе и составляет $R_h \approx (6.38 \pm 0.67)$ нм, что согласуется с литературными данными $R_h \approx (7.12 \pm 0.2)$ нм, $D_t \approx (3.45 \pm 0.38) \cdot 10^{-7}$ см²/с, что согласуется с литературными данными $D_t \approx (3.8 \pm 0.2) \cdot 10^{-7}$ см²/с [51].

При изменении pH раствора γ -глобулина коэффициент трансляционной диффузии D_t изменяется по зависимости близкой к параболической. Это связано с тем, что при отклонении pH от изоэлектрической точки заряд на белке возрастает (как в положительную, так и в отрицательную стороны), молекула белка перестает

быть электронейтральной и создает вокруг себя электрическое поле, за счет чего кулоновское отталкивание частиц увеличивается и подвижность частиц возрастает.

При добавлении FeCl_3 в раствор γ -глобулина значение D_t практически не изменяется в пределах погрешности. Из чего можно сделать вывод, что частицы γ -глобулина практически не взаимодействуют с частицами FeCl_3 [109].

Выводы:

- (1) В водных растворах альбумина с НЧ золота наблюдаются два независимых компонента коэффициента трансляционной диффузии, что указывает на отсутствие взаимодействия между исследуемыми частицами.
- (2) В водных растворах γ -глобулина с НЧ золота коэффициент трансляционной диффузии уменьшается, что может свидетельствовать о взаимодействии НЧ золота с молекулами γ -глобулина.
- (3) В модельных растворах сыворотки крови также наблюдается взаимодействие НЧ золота с молекулами γ -глобулина, что может быть связано с формированием дополнительного слоя белковых молекул на поверхности НЧ за счет их частичной адсорбции.
- (4) В разбавленных растворах нативных образцов сыворотки крови здоровых пациентов с добавлением НЧ золота знак коэффициента межмолекулярного взаимодействия не меняется (положительный наклон концентрационной зависимости параметра рассеяния сохраняется), а в образцах крови больных пациентов меняется на противоположный (отрицательный наклон становится положительным).
- (5) НЧ золота, стабилизированные ПЭГ, могут быть использованы при создании методов лечения и диагностики распространенных заболеваний.
- (6) При добавлении FeCl_3 в раствор γ -глобулина значение коэффициента трансляционной диффузии практически не изменяется в пределах погрешности. Из чего можно сделать вывод, что частицы γ -глобулина практически не взаимодействуют с FeCl_3 .
- (7) При добавлении FeCl_3 в раствор альбумина имеет место процесс ионной адсорбции, т.е. присоединения тяжелых комплексов железа, соединенных с молекулами воды к белковым макромолекулам, что значительно увеличивает

среднюю массу рассеивающих частиц при почти не изменяющемся их гидродинамическом радиусе.

- (8) Подвижность молекул альбумина уменьшается с ростом концентрации ионов железа в растворе, при увеличении концентрации препарата «Мальтофер».
- (9) В случае растворов γ -глобулина при добавлении препарата «Мальтофер» наблюдаемое уменьшение подвижности и относительный рост массы рассеивающих частиц выражены слабее (примерно на 5 %), чем в предыдущем случае. Основное взаимодействие ионов железа происходит с альбумином.

Заключение

Методами рассеяния света (статического и динамического) были определены оптические параметры в растворах основных белков сыворотки крови, а также в модельных и нативных системах сыворотки крови при воздействии различных соединений, в том числе, хлорида железа III, медицинского препарата «Мальтофер», содержащего железо и НЧ золота, стабилизированных ПЭГ. Из полученных результатов можно сделать вывод, что, в основном, используемые препараты, содержащие железо, слабо реагируют с белками сыворотки крови (альбумином и γ -глобулином), за исключением альбумина, который по всей вероятности может взаимодействовать с комплексами, образованными железом с молекулами воды. Эти результаты показывают, что данные препараты не оказывают негативного влияния на белки сыворотки крови, что было также подтверждено методом флуоресцентной спектроскопии. В связи с этим они являются безопасными для медицинских целей.

Результаты, полученные для НЧ золота, показывают, что как модельные системы, так и нативные образцы сыворотки крови реагируют на добавление НЧ золота. Наличие НЧ золота в разбавленных растворах образцов сыворотки крови здоровых пациентов не изменяет знак коэффициента межмолекулярного взаимодействия. Эксперименты, проведенные с разбавленными растворами образцов сыворотки крови больных пациентов, выявили, что НЧ золота меняют знак коэффициента межмолекулярного взаимодействия с отрицательного на положительный (характерный для здоровых пациентов), что является весьма интересным результатом, который может быть использован для медицинских приложений.

Список публикаций по результатам диссертации:**Статьи в журналах из списка ВАК:**

- 1) **В. В. Гибизова**, И. А. Сергеева, Г. П. Петрова, А. В. Приезжев, Н. Г. Хлебцов. *Взаимодействие молекул альбумина и γ -глобулина с золотыми наночастицами в водных растворах* // Вестник Московского университета. Серия 3: Физика, астрономия. 2011. № 5. 39–42.
- 2) Ю. С. Самсонова, А. В. Приезжев, А. Е. Луговцов, Г. П. Петрова, **В. В. Гибизова**, Е. И-Щ, Су Т-Х, Е. В. Переведенцева, Ч.Л. Ченг. *Исследование взаимодействия молекул альбумина с наночастицами алмазов в водных растворах методом динамического рассеяния света* // Квантовая электроника. 2012. 42 (6). 484–488.
- 3) И. А. Сергеева, Е. А. Ширшин, Н. Г. Жданова, **В. В. Гибизова**, Г. П. Петрова, С. А. Кургузенков, В. В. Фадеев. *Влияние катионов свинца на флуоресцентные характеристики бычьего сывороточного альбумина в водном растворе* // Оптика и спектроскопия. 2013. 115 (2). 201–206.
- 4) К. А. Аненкова, Г. П. Петрова, **В. В. Гибизова**, Л. А. Осминкин, К.П. Тамаров. *Свойства водных растворов сывороточного альбумина, содержащих частицы мезопористого кремния* // Оптика и спектроскопия. 2013. 115 (2). 195–200.
- 5) **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. 44 (2). 158–164.

Статья в рецензируемом журнале не из списка ВАК

1. **Victoria V. Gibizova**, Viktor A. Sapozhnikov, Ksenia V. Fedorova, Galina P. Petrova. *Serum albumin molecular mobility in water solutions, containing iron chloride III* // Journal of Biomedical Photonics & Engineering. 2016. 2 (4). 040304-1040304-5.

Статьи в сборниках:

1. М. Riabchikova, **V. Gibizova**, G. Petrova. *Interaction of γ -globulin and $FeCl_3$* // WDS'16 Proceedings of Contributed Papers. Physics. Matfyzpress Prague. 2016. 204–208.

2. **В. В. Гибизова**, А. В. Комарова, И. А. Сергеева, Г. П. Петрова, А. В. Шленская. *Intermolecular interaction of gold nanoparticles with native human serum samples* // Сборник материалов международных научных е-симпозиумов. Технические и естественные науки: теория и практика. МЦНИП Киров. 2015. 245–258.

3. **В. В. Гибизова**, А. В. Комарова, И. А. Сергеева, К. В. Федорова, Г. П. Петрова. *Interactions between biomarkers and main blood proteins* // WDS'13 Proceedings of Contributed Papers: Part III. Physics. Prague. Matfyzpress. 2013. 177–179.

4. **V. V. Gibizova**, X. Zhang, I. A. Sergeeva, G. P. Petrova, K. V. Fedorova. *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. **В. В. Гибизова**, И. А. Сергеева, Г. П. Петрова. *Межмолекулярное взаимодействие наночастиц золота с модельными и нативными образцами сыворотки крови* // Международный конкурс научных работ по приоритетным направлениям развития науки, технологий и техники в Российской Федерации. Сборник трудов. МГТУ им. Н.Э. Баумана. 2012. 42–47.

Тезисы докладов:

1. М. С. Рябчикова, **В. В. Гибизова**, Г. П. Петрова. *Особенности взаимодействия гамма-глобулина и $FeCl_3$* // Материалы XXIII Международной научной конференции

Ломоносов-2016. Материалы международного молодежного научного форума ЛОМОНОСОВ-2016. МАКС Пресс Москва. 2016. С 228.

2. I. A. Sergeeva, A. V. Komarova, **V. V. Gibizova**, A. V. Shlenskaya, A. D. Maslennikova G. P. Petrova. *The interaction of cesium with globular proteins in model and native serum solutions of healthy and cancer patients by static light scattering (sls)* // Book of Abstracts of 22th International Conference on Advanced Laser Technologies (ALT'14). Cassis. France. 2014. S2–22.

3. А. В. Шленская, А. В. Комарова, **В. В. Гибизова**. *Взаимодействия наночастиц золота и ионов цезия с нативными образцами сыворотки крови в водных растворах* // Материалы XXI Международной научной конференции Ломоносов-2014. Материалы международного молодежного научного форума ЛОМОНОСОВ-2014. МАКС Пресс Москва. 2014. 109–110.

4. **В. В. Гибизова**, А. В. Шленская, И. А. Сергеева, Г. П. Петрова. *Оптические свойства нативных образцов сыворотки крови человека при добавлении ионов хлорида цезия* // Сборник Тезисов Всероссийской школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых “Материалы и технологии XXI века”. 11–12 декабря 2014. Казань: Изд-во Казанского федерального университета. 213–213.

5. I. A. Sergeeva, A. V. Komarova, **V. V. Gibizova**, G. P. Petrova. *The interaction of cesium with model solutions of serum by static light scattering (sls)* // International conference ALT'13. Book of abstracts. Montenegro. 2013. 37–37.

6. A. V. Komarova, **V. V. Gibizova**, I. A. Sergeeva. *The interaction of heavy metals with the model solutions of serum by static light scattering (sls)* // Proceedings of ICONO/LAT'13 Conference. ICONO-06 Nano-Optics and Photonics. Moscow. 2013. 120–120.

7. I. A. Sergeeva, **V. V. Gibizova**, G. P. Petrova. *Investigation of proteins aggregation in water solutions containing heavy metal ions with laser fluorescence methods* // Book of

Abstracts of 20th International Conference on Advanced Laser Technologies (ALT'12). Thun. Switzerland. 2012. 336–336.

8. G. P. Petrova, A. M. Makurenkov, I. A. Sergeeva, T. N. Tikhonova K. V. , Fedorova, **V. V. Gibizova**. *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. 281–281.

9. **V. V. Gibizova**, X. Zhang, I. A. Sergeeva, G. P. Petrova. *Photon-correlation spectroscopy in albumin water solutions containin gadolinium ions* // Book of Abstracts of the 20th International Conference on Advanced Laser Technologies ALT'12. Thun. Switzerland. 2012. 337–337.

10. А. В. Комарова, **В. В. Гибизова**, И. А. Сергеева. *Межмолекулярное взаимодействие наночастиц золота с нативными образцами сыворотки крови* // Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых по фундаментальным наукам "Ломоносов-2012". Секция "Физика". Москва. 2012. 137–137.

11. **V. V. Gibizova**, I. A. Sergeeva, G. P. Petrova. *Study of gold nanoparticles behavior in model solutions of blood serum by dynamic light scattering* // Book of Abstracts of 19th International Conference on Advanced Laser Technologies (ALT'11). Golden Sands. Bulgaria. 2011. 122–122.

12. **В. В. Гибизова**, И. А. Сергеева. *Изучение поведения наночастиц золота в модельных растворах сыворотки крови методом динамического рассеяния света* // XVIII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных Ломоносов-2011. Москва. 2011. 161–162.

13. **В. В. Гибизова**, К. А. Аненкова, Г. П. Петрова, А. В. Приезжев, Н. Г. Хлебцов. *Исследование взаимодействия молекул альбумина с наночастицами золота в водных растворах с помощью метода фотонно-корреляционной*

спектроскопии // III Евразийский конгресс по медицинской физике и инженерии "Медицинская физика". 2010. 1. 219–219.

14. К. А. Аненкова, **В. В. Гибизова**, К. В. Федорова. *Исследование взаимодействия молекул альбумина с наночастицами золота и кремния в водных растворах с помощью метода фотонно-корреляционной спектроскопии* // Нанотехнологии в онкологии. 2010. 83–83.

Список литературы

- 1 P. Debye. *Molecular-weight determination by light scattering* // J. Phys. Chem. 1947. 51 (1). PP. 18–32.
- 2 A. T. Forrester, R. A. Gudmunsen, P. O. Johnson. *Photoelectric mixing of incoherent light* // Phys. Rev. 1955. 99. P. 1691.
- 3 Г. С. Горелик. *О возможности малоинерционного фотометрирования и демодуляционного анализа света* // ДАН СССР. 1947. 58(1). С. 45-47.
- 4 F. W. Herschel. *On a case of superficial colour presented by a homogeneous liquid internally colourless* // Phil. Trans. RS London. 1845. 135. PP. 143-145.
- 5 O. Stern, M. Volmer. *Über die Abklingungszeit der Fluoreszenz* // Physikalische Zeitschrift. 1919. 20. PP. 183-188.
- 6 С. И. Вавилов. *Выход флуоресценции растворов красителей в зависимости от длины волны возбуждающего света* // Собр. соч. в 5 томах. М. 1954. 1. С. 222-229.
- 7 F. W. Herschel. *Experiments on the refrangibility of the invisible rays of the Sun* // Phil. Trans. Roy. Soc. London. 1800. 90. PP. 284–292.
- 8 A. Einstein. *On a heuristic point of view concerning the production and transformation of light* // Annalen der Physik. 1905. 17. PP. 132-148.
- 9 Г. П. Петрова. *Анизотропные жидкости. Биологические структуры* // Москва. Физический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова. 2005. С. 99.
- 10 Г. П. Петрова, Ю. М. Петрусевич, А. Н. Евсеевичева. *Роль тяжелых металлов в образовании белковых кластеров в водных растворах* // Вестник МГУ, Сер. Физ. Астр. 1998. 4. С. 71-75.

- 11 Б. Н. Хлебцов. *Плазмонно-резонансные наночастицы для биомедицинских приложений* // Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора физико-математических наук. Саратов. 2010. С. 3.
- 12 [Электронный ресурс] – <http://rough-polished.com/ru/analytics/32271.html>
- 13 O. V. Zlobina, S. S. Pakhomiy, A. B. Bucharskay , I. O. Bugaeva, G. N. Maslyakova, N. G. Khlebtsov, B. N. Khlebtsov, V. A. Bogatyrev. *Accumulation and biodistribution of gold nanoparticles in the mesenteric lymph nodes at oral administration* // Russian Open Medical Journal. 2013. 2 (3). PP. 1-3.
- 14 С. С. Пахомий, А. Б. Бучарская, Н. А. Наволокин, Г. Н. Маслякова, О. В. Злобин, Н. Г. Хлебцов, Б. Н. Хлебцов, В. А. Богатырев. *Морфологические изменения в печени лабораторных животных при пролонгированном введении золотых наночастиц* // Саратовский научно-медицинский журнал. 2014. 10 (2). С. 250-256.
- 15 *Биохимия: Учеб. для вузов*, под ред. Е. С. Северина. 2003. 779 с.
- 16 А. А. Кишкун. *Клиническая лабораторная диагностика: учебное пособие* // ГЭОТАР-Медиа. 2015. 976 с.
- 17 В. В. Долгов, С. А. Луговская, В. Т. Морозова, М. Е. Почтарь. *Лабораторная диагностика анемий: Пособие для врачей.* // Тверь: "Губернская медицина". 2001.
- 18 Zhang Shu-honga, Fan Yong-shana, Feng Shuob, Zhang Yun-fenga. *Microdetermination of proteins by resonance light scattering technique based on aggregation of ferric nanoparticles* // Spectrochimica Acta Part A. 2008. 72. China. PP. 748–752.
- 19 B. D. Fair and A. M. Jamieson. *Effect of Electrodynamic Interactions on the Translational Diffusion of Bovine Serum Albumin at Finite Concentration.* // Journal of Colloid and Interface Science. 1980. 73 (1). USA. PP. 130-135.

- 20 M. Othman, A. Aschi, A. Gharbi. *Polyacrylic acids–bovine serum albumin complexation: Structure and dynamics* // Materials Science and Engineering C. 2016. 58. Tunisia. PP. 316-323.
- 21 I. M. Papok, G. P. Petrova, K. A. Anenkova. E. A. Papish. *Using the dynamic light-scattering method for the analysis of a blood-serum model solution* // MOSCOW UNIVERSITY PHYSICS BULLETIN. 2012. 67(5). PP. 39–43.
- 22 Xiaolong Xu, Liyun Zhang, Dengke Shen, Hao Wu, Qingliang Liu. *Oxygen-dependent Oxidation of Fe(II) to Fe(III) and Interaction of Fe(III) with Bovine Serum Albumin, Leading to a Hysteretic Effect on the Fluorescence of Bovine Serum Albumin* // Journal of Fluorescence. January 2008. 18 (1). PP. 193–201.
- 23 Т. Н. Тихонова. *Проявление межмолекулярных взаимодействий альбумина и европия(III) в их оптических и структурных характеристиках* // дис. канд. физ.-мат. наук. 2013. Москва.
- 24 И. А. Сергеева, Е. А. Ширшин, Н. Г. Жданова, В. В. Гибизова, Г. П. Петрова, С. А. Кургузенков, В. В. Фадеев. *Влияние катионов свинца на флуоресцентные характеристики бычьего сывороточного альбумина в водном растворе* // Оптика и спектроскопия. 2013. 115 (2). С. 201–206.
- 25 Gholamreza Dehghan, Masoomeh Shaghghi, Safura Sattari, Abolghasem Jouyban. *Interaction of human serum albumin with Fe(III)–deferasirox studied by multispectroscopic methods* // Journal of Luminescence. 149. 2014. PP. 251–257.
- 26 W. Bal, M. Sokołowska, E. Kurowska, P. Faller. *Binding of transition metal ions to albumin: sites, affinities and rates*// Biochim Biophys Acta. 2013. 1830 (12). PP. 5444–55.
- 27 M. Y. Losytskyy, V. B. Kovalska, O. A. Varzatskii, A. M. Sergeev, S. M. Yarmoluk, Y. Z. Voloshin. *Interaction of the Iron(II) Cage Complexes With Proteins: Protein Fluorescence Quenching Study.* // J. Fluoresc. 2013. 23. PP. 889–895.

- 28 T. N. Tikhonova, G. P. Petrova, Y. M. Petrusevich, K. V. Fedorova, V. V. Kashin. *Formation of dipole nanoclusters in blood serum protein solutions containing europium and potassium ions.* // MOSCOW UNIVERSITY PHYS. BULL. 2011. 66 (2). PP. 190–195.
- 29 V. V. Gibizova, X. Zhang, I. A. Sergeeva, G. P. Petrova, K. V. Fedorova. *Photon-correlation spectroscopy in albumin water solutions containing gadolinium ions* // Bern Open Publishing: Proceedings of the International Conference on Advanced Laser Technologies 2012. 1.
- 30 В. В. Гибизова, А. В. Комарова, И. А. Сергеева, К. В. Федорова, Г. П. Петрова. *Interactions between biomarkers and main blood proteins* // WDS'13 Proceedings of Contributed Papers: Part III. Physics. Prague. Matfyzpress. 2013. PP. 177–179.
- 31 Н. Г. Хлебцов. *Оптика и биофотоника наночастиц с плазмонным резонансом* // Квантовая электроника. 2008. 38 (6). С. 504-529.
- 32 [Электронный ресурс] — <http://www.o8ode.ru/article/water/nanotechnology/nanogold.htm>
- 33 D. Pissuwan, S. M. Valenzuela, C. M. Miller, M. B. Cortie. *A golden bullet? Selective targeting of Toxoplasma gondii tachyzoites using antibody-functionalized gold nanorods* // Nano Letters. 2007. 7(12). PP. 3808-3812.
- 34 Danielle Rand, Vivian Ortiz, Yanan Liu, Zoltan Derdak, Jack R. Wands, Milan Tatič`ek, Christoph Rose-Petruck. *Nanomaterials for X-ray Imaging: Gold Nanoparticle Enhancement of X-ray Scatter Imaging of Hepatocellular Carcinoma* // Nano Letters. 2011. 11 (7). PP. 2678–2683.
- 35 Silvia H. De Paoli Lacerda, Jung Jin Park, Curt Meuse, Denis Pristinski, Matthew L. Becker, Alamgir Karim and Jack F. Douglas. *Interaction of Gold Nanoparticles with Common Human Blood Proteins.* // ACS Nano. 2010. 4 (1). PP. 365–379.

- 36 Я. М. Краснов. *Исследование агрегации наночастиц коллоидного золота и их конъюгатов с биополимерами* // Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата хим. наук. Саратов. 2003.
- 37 В. И. Красовский, И. А. Наговицын, Г. К. Чудинова, В. В. Савранский, В. А. Караванский. *Взаимодействие наночастиц золота с бычьим сывороточным альбумином* // Краткие сообщения по физике 2007. 34. 11. С. 24-29.
- 38 Н. Г. Хлебцов, В. А. Богатырев, Б. Н. Хлебцов, Л. А. Дыкман. *Многослойная модель биоконъюгатов золотых наночастиц: исследование адсорбции желатина и иммуноглобулина человека с использованием спектров статического рассеяния и поглощения света и метода динамического* // Коллоидный журнал. 2003. 65 (5). СС. 679-693.
- 39 G. Videen, Ya. S. Yatskiv, M. I. Mishchenko. *Photopolarimetry in Remote Sensing* // NATO Science Series, II. Mathematics, Physics, and Chemistry. 2004. 161. PP. 265–308.
- 40 Г. П. Петрова, Ю. М. Петрусевич, А. П. Евсеевичева. *Физические методы мониторинга токсических тяжелых металлов* // II Всероссийская научная конференция: Физические проблемы экологии. Москва. Тезисы докладов. 1. 1999.
- 41 К. А. Аненкова, Г. П. Петрова, В. В. Гибизова, Л. А. Осминкина, К. П. Тамаров. *Оптические свойства водных растворов сывороточного альбумина, содержащих частицы мезопористого кремния* // Оптика и спектроскопия. 115 (2). С. 195-200.
- 42 Ю. С. Самсонова, А. В. Приезжев, А. Е. Луговцов, Г. П. Петрова, В. В. Гибизова, Е. И-Щ, Су Т-Х, Е. В. Переведенцева, Ч.Л. Ченг. *Исследование взаимодействия молекул альбумина с наночастицами алмазов в водных*

- растворах методом динамического рассеяния света* // Квантовая электроника. 2012. 42 (6). С. 484–488.
- 43 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. 44 (2). С. 158–164.
- 44 Г. Харнед, Б. Оуэн. *Физическая химия растворов электролитов* // пер. с англ., М., 1952.
- 45 Ch. Tanford. *Physical Chemistry of Macromolecules* // Willey. New York, 1961.
- 46 Ч. Тенфорд. *Физическая химия полимеров* // Изд-во Химия. Москва. 1965.
- 47 J. Bier. *Electrophoresis* // N.Y. 1968.
- 48 А. П. Крешков. *Основы аналитической химии. Том 2. Теоретические основы. Качественный анализ* // М.: Химия. 1971. 456 С.
- 49 А. Д. Таганович, В. К. Кухта, Т. С. Морозкина, Э. И. Олецкий, А. В. Колб, Т. В. Василькова, Л. П. Лисицына, И. Л. Котович, Ж. А. Рутковская. *Биологическая химия: краткий курс лекций для иностранных учащихся стом.фак-та* // Мн.: БГМУ. 2005. 119 С.
- 50 О. В. Спирина, Н. С. Громаков. *Химическая связь* // Методические указания по общей химии для студентов очной формы обучения. КГАСУ. Казань. 2016. 28 С.
- 51 Г. З. Камминс, Э. Р. Пайк. *Спектроскопия оптического смешения и корреляция фотонов* // Книжный дом “Университет”. М. 2002.
- 52 Л. В. Левшин, А. М. Салецкий. *Оптические методы исследования молекулярных систем* // Изд-во МГУ. 1994. 320 С.

- 53 Г. П. Петрова. *Оптические спектральные методы исследования жидкостей и растворов ч. 2* // Москва. 2009. С.24.
- 54 М. В. Волькенштейн. *Молекулярная оптика* // ГИТТЛ. М.Л.. 1951.
- 55 И. Л. Фабелинский. *Молекулярное рассеяние света* // Наука. М. 1965
- 56 В. Е. Эскин. *Рассеяние света растворами полимеров* // Наука. Москва. 1973.
- 57 А. В. Бойко. *Особенности молекулярной подвижности и межмолекулярного взаимодействия белков сыворотки крови в норме и при патологии* // дис. канд. физ.-мат. наук. Москва. 2005. С. 23.
- 58 А. Эйнштейн. *Собрание научных трудов* // Наука. Москва. 1966.
- 59 П. Дебай. *Избранные труды* // Москва. 1987. С.363.
- 60 П. Дебай. *Определение молекулярного веса методом рассеяния света* // Наука. Л. 1987.
- 61 В. Н. Цветков, В. Е. Эскин, С. Я. Френкель. *Структура макромолекул в растворах* // Наука. 1964.
- 62 С. С. Воюцкий *Курс коллоидной химии* // Изд-во «Химия». Москва. 1975.
- 63 Джесси Рассел. *Адсорбция* // Изд-во «VSD». Москва. 2012. с. 98.
- 64 В. Г. Лещенко. *Введение в спектральный и люминесцентный анализ* // Мн.: БГМУ. 2002. 37 С.
- 65 С. В. Пацаева, В. И. Южаков. *Электронные спектры сложных молекул* // Спецпрактикум кафедры общей физики. Москва 2010.
- 66 Дж. Лакович. *Основы флуоресцентной спектроскопии* // М.: Мир. 1986.
- 67 [Электронный ресурс] – <http://dmicro.ru/articles/fluorestsentnyj-mikroskop/>
- 68 Т. Д. Смирнова. *Методы люминесцентного анализа СГУ*
- 69 Т. И. Гришаева. *Методы люминесцентного анализа 2003 Санкт-Петербург*

- 70 Т. И. Шишелова, Т. В. Созинова, А. Н. Коновалова. *Практикум по спектроскопии. Вода в минералах* // Учебное пособие. Академия Естествознания. 2010.
- 71 Н. Б. Егоров, В. В. Шагалов. *Инфракрасная спектроскопия редких и рассеянных элементов* // ТПУ. Томск. 2008.
- 72 Б. Н. Тарасевич. *Справочные материалы* // МГУ имени М.В.Ломоносова, химический факультет, кафедра органической химии. Москва. 2012.
- 73 Ю. М. Петрусевич, Г. П. Петрова. *Сильные электростатические взаимодействия заряженных биополимеров в водных растворах* // Биомед. Радиоэлектроника. 2000. 3. С. 41-47.
- 74 А. Д. Лебедев, Ю. Н. Левчук, А. В. Ломакин, В. А. Носкин. *Лазерная корреляционная спектроскопия в биологии* // Наукова Думка. Киев. 1987. 256 С.
- 75 О. Звелто. *Принципы лазеров*. // Мир. Москва. 1990. С. 401.
- 76 [Электронный ресурс] – <http://www.photocor.ru/dynals.htm>
- 77 [Электронный ресурс] – <http://www.photocor.ru/theory/particle-size-analysis/>
- 78 К. В. Бочаров Н. И. Марукович А. Ю. Куксин. *Методы статического и динамического рассеяния света для исследования наночастиц и макромолекул в растворах* // Москва. МФТИ. 2016.
- 79 А. И. Ефимова, В. Б. Зайцев, Н. Ю. Болдырев, П. К. Кашкаров. *Инфракрасная Фурье-Спектрометрия* // физический факультет МГУ. Москва. 2008. С. 133.
- 80 А. И. Ефимова. *Инфракрасная спектроскопия наноструктурированных полупроводников и диэлектриков* // Кафедра общей физики и молекулярной электроники Физический факультет МГУ. Москва. 2014.
- 81 [Электронный ресурс] – http://solar-lab.ru/?page_id=137
- 82 [Электронный ресурс] – <http://td-str.ru/file.aspx?id=10669>

- 83 [Электронный ресурс] – <http://www.unicosci.com/spectro/4802detail.htm>
- 84 А. В. Финкельштейн, О. Б. Птицын. *Физика белка* // М.: КДУ. 2012.
- 85 Г. Нейрат, К. Бейли. *Белки* // ИЛ. 1958.
- 86 А. Л. Ленинджер. *Биохимия* // Мир. Москва. 1987.
- 87 G. Frens. *Nature* // Phys. Sci. 1973. 241. PP. 20–22.
- 88 [Электронный ресурс] – <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=4F5S>
- 89 Wei Peng, Fei Ding, Yu-Ting Jiang, Ying Sun, Yu-Kui Peng. *Evaluation of the biointeraction of colorant flavazin with human serum albumin: insights from multiple spectroscopic studies, in silico docking and molecular dynamics simulation* // Food Funct., 2014. 5. PP. 1203-1217.
- 90 U. Kragh-Hansen. *Molecular aspects of ligand binding to serum albumin* // Pharmacol. Rev. 1981. 33 (1). PP. 17–53.
- 91 [Электронный ресурс] – <http://www.nist.gov/mml/bmd/nmr-fingerprinting.cfm>
- 92 А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл. *Иммунология* // Мир. Москва. 2000. С. 9.
- 93 [Электронный ресурс] – <http://biohimik.net/priobretennyj-immunitet-vidy/gumoralnyj-i-kletochnyj-adaptivnyj-immunitet/immunoglobuliny-cto-eto-struktura-klassy-gamma-globuliny-povysheny-snizheny>
- 94 Г. Шульц, П. Ширмер. *Принципы структурной организации белков* // Москва-Мир. 1982.
- 95 Ю. А. Ершов, В. А. Попков, В. А. Берлянд, А. З. Книжник. *Общая химия. Биофизическая химия. Химия биогенных элементов* // М.: Высш. шк., 2003. 560 С.

- 96 Л. А. Дыкман, В. А. Богатырев, С. Ю. Щёголев, Н. Г. Хлебцов. *Золотые наночастицы: Синтез, свойства, биомедицинское применение* // Наука. Москва. 2008. 319 С.
- 97 М. В. Ширманова, Е. В. Загайнова, И. В. Балалаева, А. Г. Орлова, Н. А. Саунина, В. А. Каменский. *Исследование контрастирующих свойств золотых наночастиц для оптической когерентной томографии* // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. 2008. 3. С. 92-97.
- 98 [Электронный ресурс] – <http://www.perekopbromine.com/ru/ourpartners/stati/khlorid-zheleza-ego-svoystva-i-sfery-primeneniya>
- 99 [Электронный ресурс] – <http://www.perekopbromine.com/ru/ourpartners/stati/khlorid-zheleza-ego-svoystva-i-sfery-primeneniya>
- 100 [Электронный ресурс] – <http://www.pcgroup.ru/blog/hlorid-zheleza-ponyatie-svoystva-i-primeneniya/>
- 101 М. Х. Карапетьянц, С. И. Дракин. *Общая и неорганическая химия* // Москва. "Химия". 1981.
- 102 А. Л. Тихомиров, С. И. Сарсания, Е. В. Ночевкин. *Некоторые аспекты диагностики и лечения железодефицитных состояний в практической деятельности на современном этапе* // ТРУДНЫЙ ПАЦИЕНТ. 2011. 9 (11). С. 26-38.
- 103 [Электронный ресурс] – http://umedp.ru/articles/pediatrica_2014/defitsit_zheleza_u_podrozkov_i_ego_korrektziya_preparatami_zheleza.html
- 104 Г. П. Петрова, Ю. М. Петрусевич, А. В. Бойко, А. В. Платонова, В. П. Хлапов, И. В. Домбровская, А. В. Иванов, Е. А. Папиш. *Метод рассеяния света в*

- клинической диагностике онкологических заболеваний* // Медицинская физика. 2006. 4. С. 47-49.
- 105 В. В. Гибизова, И. А. Сергеева, Г. П. Петрова, А. В. Приезжев, Н. Г. Хлебцов. *Взаимодействие молекул альбумина и γ -глобулина с золотыми наночастицами в водных растворах* // Вестник Московского университета. Серия 3: Физика, астрономия. 2011. 5. С. 39–42.
- 106 В. В. Гибизова, А. В. Комарова, И. А. Сергеева, Г. П. Петрова, А. В. Шленская. *Intermolecular interaction of gold nanoparticles with native human serum samples* // Сборник материалов международных научных е-симпозиумов. Технические и естественные науки: теория и практика. МЦНИП Киров. 2015. С. 245–258.
- 107 В. В. Гибизова, И. А. Сергеева, Г. П. Петрова. *Межмолекулярное взаимодействие наночастиц золота с модельными и нативными образцами сыворотки крови* // Международный конкурс научных работ по приоритетным направлениям развития науки, технологий и техники в Российской Федерации. Сборник трудов. МГТУ им. Н.Э. Баумана. 2012. С. 42–47.
- 108 Victoria V. Gibizova, Viktor A. Sapozhnikov, Ksenia V. Fedorova, Galina P. Petrova. *Serum albumin molecular mobility in water solutions, containing iron chloride III* // Journal of Biomedical Photonics & Engineering. 2016. 2 (4). PP. 040304-1040304-5.
- 109 M. Riabchikova, V. Gibizova, G. Petrova. *Interaction of γ -globulin and $FeCl_3$* // WDS'16 Proceedings of Contributed Papers. Physics. Matfyzpress Prague. 2016. PP. 204–208.
- 110 М. Н. Кириченко, А. Т. Саноева, Л. Л. Чайков. *Появление артефактного пика в распределении частиц по размерам, измеряемым методом ДРС при малых концентрациях* // Краткие сообщения по физике ФИАН, Москва. 2016. 8.

Благодарности

Автор выражает благодарность за помощь в процессе работы над диссертацией:

Галине Петровне Петровой, за предоставление интересной темы исследования, за помощь в организации и проведении экспериментов, интерпретацию результатов, терпение и поддержку, а также за ценные рекомендации

Ирине Александровне Сергеевой, за содействие в планировании экспериментов, ценные советы, заботу, внимание

Ксении Вячеславовне Федоровой, за организацию работы экспериментальной установки, помощь при работе с экспериментальным оборудованием, отличное настроение

Ксении Александровне Аненковой, за помощь в исследованиях на ИК-спектрометре и флуориметре, а также при обработке результатов эксперимента, за поддержку в трудные минуты

Кафедре молекулярных процессов и экстремальных состояний вещества и всем ее сотрудникам

Любимой семье, друзьям за поддержку и веру в меня.