

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

РОЖКОВ Сергей Павлович

**ЭФФЕКТЫ КЛАСТЕРИЗАЦИИ ГЛОБУЛЯРНЫХ БЕЛКОВ В
РАСТВОРАХ**

Специальность 03.01.02 - биофизика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Санкт-Петербург-2010

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Институте биологии
Карельского научного центра РАН

Официальные оппоненты: Засл. деятель науки РФ, доктор биологических наук,
профессор Воробьев Владимир Иосифович

доктор физико-математических наук, профессор
Трусов Анатолий Анатольевич

доктор биологических наук, профессор
Розенфельд Марк Александрович

Ведущая организация: Учреждение РАН Институт высокомолекулярных
соединений РАН

Защита состоится «_21_»_октября 2010 года в_16_ часов на заседании Совета
Д.212.232.09 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Санкт-
Петербургском государственном университете по адресу: 199034, Санкт-Петербург,
Университетская наб., 7/9, ауд.90.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке им.А.М.Горького Санкт-
Петербургского государственного университета.

Автореферат разослан «_____» _____ 2010 г.

Ученый секретарь
Диссертационного Совета,
кандидат биологических наук, доцент

Курилова Л.С.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы – Взаимодействие молекул биополимеров с водой, ионами солей и между собой непосредственным образом связано с проблемой растворяющей способности воды и эволюции биологических растворов (Хочачка и Сомеро, 1988). Взаимодействие белок- белок и белок- растворитель присутствует во всех аспектах метаболической регуляции и установления надмолекулярной организации, а также определяет механизм агрегации, кристаллизации, денатурации и коагуляции белков при их выделении и очистке. Поэтому изучение самих явлений и механизмов, лежащих в их основе, остается одной из самых актуальных проблем молекулярной биофизики.

Золь ↔ гель фазовые превращения, сопровождающие большинство биохимических реакций в цитоплазме, являются сложными и многоступенчатыми процессами, первые этапы которых можно обнаружить лишь с помощью прецизионных физических методов. Несомненно, что важную роль на этих этапах играют динамические, т.е. обратимые ассоциаты макромолекул (Измайлова, Ребиндер, 1974; Frieden and Nichol, 1981, Веденов, 1984). Динамическая ассоциация глобулярных белков обеспечивает переходный уровень к надмолекулярной организации раствора макромолекул, осуществляя возможность более тонкой и сложной регуляции биохимических процессов, чем та, которая происходит при участии только растворенных молекул. Посредством взаимодействия белок- белок и белок- растворитель решается проблема мгновенной, на уровне микроокружения макромолекул, регуляции осмотического гомеостаза (Наточин и др., 1991). Патогенез ряда заболеваний связан с нарушением кооперативных взаимодействий между молекулами белков, их неконтролируемой ассоциацией и агрегацией и обусловлен потерей устойчивости состояния (гомеостаза) под действием внешних факторов (Хорст, 1982). В рамках современных представлений гомеостаз и стресс (который предшествует патологии) на разных уровнях структурной организации биосистем предлагается рассматривать как два устойчивых состояния (или фазы), переход между которыми (фазовый переход) сопровождается кооперативным изменением структурно-динамических и морфологических свойств биосистемы. На молекулярном уровне на это указывает существование неспецифического адаптационного синдрома клеточных систем (НАСКС), определяющим звеном белковой теории которого в настоящее время есть основания считать реакции полимеризации глобулярного актина (Браун, Моженок, 1987).¹

В решении задач биотехнологии важную роль играют методы выделения и очистки белков, наиболее известными из которых являются «высаливание» и кристаллизация. Для оптимизации этих процессов требуется глубокие знания роли температуры, величины рН, концентрации и физико-химических свойств агентов, влияющих на растворимость биополимеров. Вместе с тем эти данные разрозненны и трудно достижимы, поскольку около 20 факторов приходится учитывать для получения кристаллов белков. Фазовые диаграммы, полезные в таких случаях, существуют лишь для десятка белков и то весьма ограниченные (Grouazel et.al., 2006). Более чем за полтора века практических достижений в кристаллизации белков не разработана общая теория этого процесса, поэтому до сих пор

¹ **Список сокращений:** НАСКС – неспецифический адаптационный синдром клеточных систем; САЧ, САЧ-СМ – сывороточный альбумин человека и его спин-меченый аналог; L-L, L-S – фазовые переходы (ФП) типа жидкость-жидкость, жидкость-твердое тело. ДЛФО – теория устойчивости коллоидов Дерягина-Ландау-Фервея-Овербека; ЭПР-электронный парамагнитный резонанс, ВБМ – водно-белковая матрица, ПЭГ – полиэтиленгликоль; ФД – фазовая диаграмма; НКТР, ВКТР – нижняя и верхняя критические температуры растворения; С60FWS – водорастворимый фуллерен, ShC – шунгитовый углерод; ND- наноалмаз; HbS, HbA, HbC – формы гемоглобина

метод проб и ошибок является доминирующим. В настоящее время особый интерес к обратимым ассоциатам (кластерам) в растворах биополимеров возникает в связи с тем, что они предшествуют возникновению зародышей новой фазы и могут определять механизм кристаллизации или преципитации (высаливания) белка в насыщенных растворах, являясь зародышами «скрытой» фазы.

В качестве объекта экспериментального исследования взят сывороточный альбумин человека (САЧ) и лизоцим. Они являются одними из наиболее доступных и изученных белков и широко применяются в медицине, биотехнологии и в пищевой промышленности. СА один из первых белков, в растворах которого были идентифицированы белковые кластеры (Giordano et.al., 1991). Вместе с тем СА гетерогенный белок как по существованию множества изоформ, так и по загрузке лигандами, поэтому существуют значительные трудности в изучении и построении фазовых диаграмм этого белка современными методами малоуглового нейтронного и рентгеновского рассеяния (Zhang et.al., 2007). Это требует внедрения новых экспериментальных и теоретических подходов в исследовании его фазовых диаграмм.

Разрабатываемые в работе вопросы непосредственно связаны с проблемой существования даже в умеренно концентрированных растворах глобулярных белков концентрационной гетерогенности - белковых кластеров. Подобные явления предполагают наличие потенциала притяжения между одноименно заряженными частицами, что не вписывается в рамки традиционных теорий. Однако появившиеся в последнее время теоретические разработки допускают возникновение в некоторых условиях дальнедействующих сил притяжения в растворах одноименно заряженных частиц (Chu and Wasan, 1996). По своей природе это силы кулоновские и их происхождение связано с определенной периодичностью расположения заряженных частиц и противоионов.

Процессы формирования кластеров сопряжены с фазовыми переходами типа жидкость- жидкость (De Young et.al., 1993), результатом которых является образование субмикронных размеров обогащенных белком капель жидкости, метастабильных по отношению к кристаллической фазе. Их возникновение описывается на основе короткодействующего парного потенциала взаимодействия между макромолекулами, которые представляются в виде жестких сфер, и дальнего потенциала отталкивания. Такой потенциал средней силы может включать несколько видов энергии взаимодействия. Иногда его строят на основе элементов классической теории ДЛФО, с привлечением сил отталкивания за счет структурированных слоев растворителя (Brandon et.al., 2006). С использованием такого подхода, а также с учетом энтропийных эффектов исключенного объема и/или деплеций удается достаточно точно объяснить некоторые экспериментальные данные различных структурно-динамических методов в растворах глобулярных белков, построить их фазовые диаграммы (Tavares et.al., 2004; Bonnete et.al., 1999), оценить силу белок-белкового взаимодействия по величине и знаку второго вириального коэффициента осмотического давления (George and Wilson, 1994; Neal et.al., 1998; Bonette et.al., 1999). С другой стороны, этот коэффициент в большей степени характеризует взаимодействие белка с солью (Edsall et.al., 1950).

Однако силовой подход не способен объяснить эффекты лиотропных рядов электролита в механизме взаимодействия белков (Tardieu et.al., 1999) и существенно анизотропный характер белок-белкового взаимодействия (Lomakin et.al., 1999). Поэтому в последнее время энергичные попытки были предприняты в изучении специфических эффектов распределения ионов на границах фаз (Luo et.al., 2006), взаимодействия ионов электролита с белками с учетом поляризуемости анионов (Bostrom et.al., 2005), их гидратации (Collins, 2006) и влияния на структурированность воды (Grigsby et.al., 2002). Все же этих усилий пока явно недостаточно, чтобы понять возможную определяющую роль воды в формировании надмолекулярной организации растворов белков.

В выяснении механизма образования белковых кластеров существенный прогресс могла бы внести равновесная термодинамика, однако по ряду причин он мал (Naas and Drenth, 2000). Как известно, поверхностное натяжение вносит значительный вклад в работу образования критического зародыша новой фазы при нуклеации. Поскольку молекула белка имеет развитую поверхность с выраженной кривизной, одной из важнейших задач для понимания функциональной активности белка, в частности, стабилизации той или иной конформации белка, является изучение связи удельной поверхностной энергии водно-белковой матрицы с межмолекулярной энергией взаимодействия белок-белок, ответственной за образование белковых кластеров. На существование такой связи могут указывать явления капиллярных эффектов первого и второго рода (Щукин и др., 1982), обусловленные кривизной гидратируемой поверхности и раскливающим давлением между взаимодействующими макромолекулами. Кроме того, индуцируемые в присутствии различных осмотически активных молекул (осмолитов) изменения конформационного равновесия белковых структур часто рассматриваются на основе энтропийных эффектов исключенного объема или деплеций, приводящих к изменению взаимодействия между молекулами белка (Saunders et.al., 2000). Это сопряжено с наличием потенциала отталкивания в таких системах между молекулами осмолитов и белков.

С другой стороны, (де)стабилизация структуры белка в присутствии осмолитов, влияющих на поверхностное натяжение растворителя, в биохимии интерпретируется в терминах равновесного связывания молекул осмолитов и растворителя, а также конкуренции между ними (Kita et.al., 1998) - то есть эффектами предпочтительной гидратации. К категории взаимодействия белок – растворитель относится также гидрофобное, изменяющееся пропорционально неполярной поверхности макромолекулы. «Гидрофобные силы» дают большой вклад в функциональную динамику белка, структурный фолдинг и в механизм агрегации.

Таким образом, взаимодействие белок-белок и белок-растворитель есть два подхода к одному явлению, связующим звеном между которыми могла бы стать концепция микроскопического поверхностного натяжения растворителя. К сожалению, имеющиеся теории поверхностного натяжения и способы его измерения пока весьма далеки от совершенства, так что их изучение также остается актуальной задачей.

Целью работы является исследование фундаментальной проблемы природы и механизмов дальних взаимодействий и поверхностных явлений, приводящих к возникновению надмолекулярной организации в многокомпонентных растворах глобулярных белков. При этом особое внимание уделяется теоретическому подходу к построению различного вида фазовых диаграмм и способов их взаимной трансформации. Теоретический анализ системы вода-белок-соль проводится на основе равновесной термодинамики с элементами теории устойчивости по отношению к процессам диффузии (Пригожин, Дефей, 1968), критических и закритических явлений (Базаров, 1983), термодинамики многокомпонентных систем (Edsall et.al., 1950).

Непосредственная задача исследования – изучение закономерностей кластеризации белков при их взаимодействии с водой, осмолитами и между собой в связи с проблемой растворяющей способности воды и регуляции физико-химического состояния биологических растворов. Анализируются возможности управления структурными свойствами и динамическим поведением подобных систем, а также выясняется роль этих явлений в функционировании биосистем (осморегуляция, механизмы срочных реакций белковых систем на изменения температуры и солености) и в технологических процессах (стабилизация структуры белка осмолитами, «высаливание», нуклеация). Экспериментально проблема решается на базе метода ЭПР спиновых меток и зондов.

Для достижения цели решаются следующие задачи:

1. Разрабатывается комплекс методических приемов на базе метода ЭПР спиновой метки для анализа изменений динамических и термодинамических свойств водно-белковой матрицы макромолекул, в том числе расклинивающего давления и удельной поверхностной энергии, в процессе соль-индуцируемых структурных фазовых переходов. Для проверки работоспособности метода полученные результаты по эффективности различных осмолитов в стабилизации структурной динамики молекул белка сопоставляются с данными независимых методов.
2. Исследуются процессы формирования кластерной организации водно-солевых растворов молекул САЧ в условиях изменения концентрации компонентов и температуры.
3. Строятся теоретические фазовые диаграммы модельной системы вода-белок-соль и определяются условия возможных фазовых переходов ней в зависимости от концентрации компонентов, температуры, заряда белка, связывания с ионами электролита и активности электролита.
4. Проводится анализ существующих литературных данных по кластерной природе растворов лизоцима как наиболее изученного модельного белка для верификации разработанной модели и установленных на основе модели закономерностей.
5. Исследуется влияние на водно-белковые системы нового типа осмолитов – гидратированных наночастиц и нанокластеров углерода, представленных фуллеренами, фуллереноподобными структурами шунгитового углерода и наноалмазами.

Научная новизна результатов.

1. Предложена модель возникновения кластеров в растворах глобулярных белков, в основу которой положена определяющая роль компенсации удельной поверхностной энергии воды в результате анизотропного взаимодействия между молекулами белков в кластере. При этом теория допускает существование кластеров двух типов, различающихся размерами, один из которых может быть охарактеризован как «фаза».
2. Предложен способ анализа детерминанта устойчивости модельной системы вода-белок-соль, построена фазовая диаграмма состояния раствора и показана возможность ее представления в разных системах координат. Установлено, что положение фазового перехода и критической точки на фазовой диаграмме определяется отношением молярных концентраций белка и соли. Величина этого отношения зависит от индивидуальных характеристик белка (заряд, число адсорбируемых ионов) и активности электролита.
3. Впервые в аналитическом виде получены коэффициенты, характеризующие уравнение «высаливания» белка электролитом и показывающие роль адсорбированных ионов в этом процессе.
4. Фазовый переход типа жидкость-жидкость рассматривается как фазовый переход воды, участвующей в гидратации мономеров и кластеров белка. Это позволяет именно к воде применить основные термодинамические следствия существования критических фазовых переходов. При этом представления об универсальной растворимости всех компонент раствора в критической точке, неравномерное и селективное перераспределение компонент системы по пути к критической точке по разным типам гидратных оболочек позволяют предположить существование механизма регуляции активности белка с участием ненативных форм белковых глобул.
5. Зарегистрированы эффекты неспецифического влияния гидратированных наночастиц углерода на стабилизацию САЧ и мембранных белков, в основе которого может лежать способность наночастиц регулировать фазовое состояние водно-солевого раствора белка и адсорбировать компоненты раствора.
6. Предлагается механизм срочной регуляции осмотического равновесия и неспецифических физико-химических регуляторных реакций на уровне микроокружения

макромолекул в ответ на изменение состава или температуры, основанный на существовании кластерной организации белка.

7. Апробированы новые экспериментальные подходы на базе метода ЭПР спиновой метки, позволяющие с использованием изотерм изменения вязкости раствора сахарозой регистрировать изменения удельной поверхностной энергии белка, а также эффективных термодинамических функций состояния водно-белковой матрицы как результата изменения взаимодействия между компонентами раствора в процессе фазовых переходов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Разработка комплекса методических приемов на базе метода ЭПР спиновой метки для анализа свойств водно-белковой матрицы молекул белка, их изменений под действием осмолитов и в процессе соль-индуцируемых структурных фазовых переходов.

2. Теоретический подход к построению фазовых диаграмм модельной системы вода-белок-соль, поиск условий и механизмов образования кластеров белка и сопряженных с ними фазовых переходов в зависимости от концентрации компонентов, температуры, заряда белка, связывания с ионами электролита и активности электролита.

3. Экспериментальное обнаружение фазовых переходов и кластерной организации водно-солевых растворов молекул САЧ и лизоцима в условиях изменения концентрации компонентов и температуры.

4. Эффекты влияния на водно-белковые системы и их кластерную организацию нового типа осмолитов – гидратированных наночастиц и нанокластеров углерода, представленных фуллеренами, фуллереноподобными структурами шунгитового углерода и наноалмазами.

5. Оценка перспектив использования результатов исследования в решении ряда биомедицинских и технологических задач (осморегуляция, стабилизация белка осмолитами, регуляция активности белка, поиск оптимальных условий кристаллизации, механизмы стресс-индуцированных денатурационных изменений белков).

Практическая значимость работы заключается в разработанной методологии изучения явления кластеризации глобулярных белков, объединяющей экспериментальное наблюдение эффектов взаимодействия белков в разных областях фазовой диаграммы и ее теоретический анализ на основе взаимодействия белок-растворитель.

Установленные закономерности возникновения белковых кластеров двух типов в системе вода-белок-соль и фазовых переходов позволяют получить научно-методический подход к выбору условий, наиболее оптимальных для целей кристаллизации, очистки и стабилизации структуры белка.

Предлагаемая концепция связи межмолекулярного расклинивающего давления и давления в водно-белковой матрице дает возможность теоретически и экспериментально связать изменения межмолекулярного взаимодействия с изменениями конформационной динамики молекул и стабилизации структуры белка. Показано, что метод ЭПР спиновых меток и зондов при условии адекватной интерпретации формы спектра можно использовать для построения фазовых диаграмм растворов глобулярных белков, при этом становится доступной информация как о взаимодействии белок-белок, так и об изменении внутримолекулярной динамики, которая сопряжена с межмолекулярным взаимодействием.

Предложен способ измерения удельной поверхностной энергии в области локализации спиновой метки и ее изменений в присутствии различных осмолитов, позволяющий оценивать эффективность осмолитов в стабилизации структуры белка.

На молекулярном уровне образованием кластеров обоснован механизм срочной регуляции ионно-осмотического равновесия и рассмотрен кооперативный фазовый

переход системы под действием неспецифических факторов (изменении температуры, концентрации соли) из состояния осмотического гомеостаза к состоянию стресса и патологии. Найдены возможности управления этим процессом на уровне микроокружения макромолекул. Обнаруженные закономерности дают основание для построения физико-химической модели, которая позволила бы понять эволюционные механизмы возникновения конформационных белковых патологий и неспецифического адаптационного синдрома клеточных систем.

Апробация работы Основные результаты исследований были представлены на международных и отечественных съездах, конференциях, семинарах:

2nd International Symposium “Molecular order and mobility in polymer systems”, (Saint Petersburg, 1996); XI и XIII международного совещания по эволюционной физиологии, Санкт-Петербург, 1996; 2006); Юбилейная научная Конференция «50 лет Карельскому Научному Центру РАН (Петрозаводск, 1996); International Symposium “Protein structure, stability and folding. Fundamental and medical Aspects”, (Moscow, 1998); 2 и 3 съезда биофизиков России (Москва, 1999, Воронеж, 2004); V – X Всероссийских конференциях «Структура и динамика молекулярных систем (Яльчик, 1997-2003); 4, 5, 6, 7 Biennial International Workshop “Fullerenes and atomic clusters” (St. Petersburg, 1999; 2001; 2003; 2005); 3 Международного Семинара «Минералогия и жизнь: биоминеральные гомологии» (Сыктывкар, 2000); Международного Минералогического Семинара (Сыктывкар, 2001); III Съезда Биохимического Общества (С-Петербург, 2002); Международной Конференции “Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем” (Минск, 2004); IX International Conference “Hydrogen material science and chemistry of carbon nanomaterials” (ICHMS 2005) (Sevastopol, 2005); Российской Конференции “Современные проблемы молекулярной биофизики” (СПбГУ, 2006); XVI International Conference “Chemical Thermodynamic in Russia” (Suzdal, 2007).

Публикации Всего по материалам диссертации опубликовано 34 работы (без учета тезисов докладов).

Личный вклад автора Автором осуществлен выбор направления исследований и постановка задач. Эксперименты, анализ и интерпретация данных проведены лично автором. Им же предложен аналитический подход для построения фазовых диаграмм и проведен их теоретический анализ. Часть исследований, результаты которых представлены в диссертации, были поддержаны грантами РФФИ, № 99-03-32388 и № 03-03-32347, при этом автор являлся руководителем проектов.

Структура работы Диссертация состоит из введения, 7 глав, выводов и списка литературы, содержащего 402 источника. Работа изложена на 270 страницах, содержит 11 таблиц и иллюстрирована 69 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **Введении** изложены проблемы, связанные с обнаружением в растворах глобулярных белков концентрационной неоднородности - кластеров, обосновывается актуальность их изучения, формулируются цели и задачи исследования, приводится общая характеристика работы.

Первая глава носит обзорный характер. Первая треть главы 1 посвящена вопросам изучения взаимодействия белок-белок и физической природы сил взаимодействия, начиная от диполь-дипольных, затем коллоидных, включающих молекулярные, ион-электростатические и гидратационные и заканчивая энтропийными эффектами исключенного объема и деплеций. Кратко представлены силы, обуславливающие возникновение потенциала взаимодействия одинаково заряженных частиц и учитывающие конечный радиус ионов и неравномерность их распределения в растворах коллоидных частиц. Как экспериментальная характеристика сил взаимодействия более

подробно рассмотрено осмотическое давление и его вириальные коэффициенты. Приведены примеры экспериментального обнаружения кластеров в растворах различными физическими методами, в основном в связи с их предполагаемой ролью в процессах кристаллизации белков. Анализируются существующие гипотезы о механизмах фазовых переходов в растворах биополимеров, сопряженных с возникновением кластеров и возможные способы представления фазовых диаграмм растворов белков.

Во второй трети главы 1 обсуждаются некоторые аспекты взаимодействия молекул с растворителем, основанные на структурных особенностях воды и ее способности располагать в своей структуре различные по строению молекулы. Затем вопросы структурирования воды рассмотрены применительно к проблеме гидратации биомакромолекул и роли когезионной прочности воды в механизме взаимодействия белок-растворитель. Эта концепция позволяет использовать модель предпочтительной гидратации в изучении стабилизации структуры белка в растворе. Далее приводится взгляд на состояние воды с позиции макроскопических представлений, где активность воды и осмотическое давление являются интегральными термодинамическими характеристиками раствора. Исходя из этих представлений, рассмотрена концепция осмотических сил и расклинивающего давления как сил, ответственных за опосредованное растворителем взаимодействие белок-белок. Здесь же расклинивающее давление сопоставляется с капиллярными эффектами, обусловленными кривизной поверхности и зависимостью удельной поверхностной энергии от кривизны.

Заключительная часть главы 1 посвящена вопросам взаимодействия ионов электролита с белковой глобулой и анализу существующих механизмов взаимодействия. Заканчивается глава обсуждением структурных и физико-химических особенностей молекул сывороточного альбумина и их растворов как основного объекта исследования.

Во второй главе описаны возможности применения метода ЭПР спиновых меток для изучения структурной динамики белков, обусловленной эффектами взаимодействия белок-растворитель. Сначала рассмотрены некоторые задачи, решаемые методом спиновых меток, обсуждаются его достоинства и недостатки применительно к поставленной проблеме. В качестве достоинств отмечается широкий выбор возможностей изучения структурной динамики белка в зависимости от легко варьируемых внешних условий и чувствительность к дальним, опосредованным растворителем, взаимодействиям спиновых меток на основе диполь-дипольного механизма, проявляющегося в уширении спектров ЭПР. Это позволяет при температурах жидкого азота регистрировать изменения локальной концентрации спин-меченых биополимеров в растворе как результата их взаимодействия.

К недостатку метода относится необходимость выбора соответствующей модели

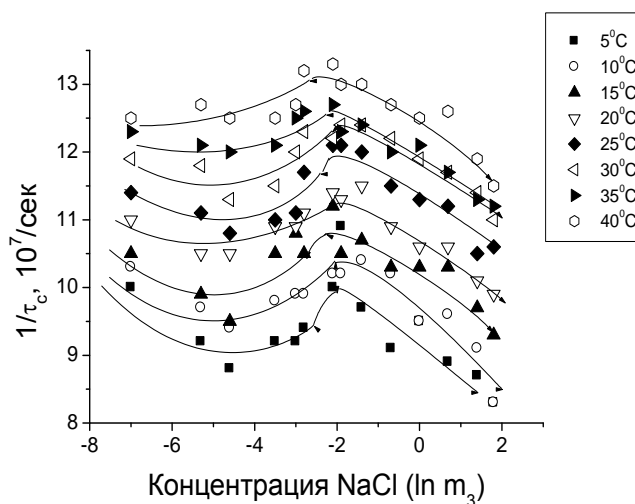


Рис.1 Зависимости экспериментальных значений частоты вращения $1/\tau_c$ метки Maleimido-TEMPO, модифицирующей молекулы САЧ, от молярной концентрации NaCl (m_3) при разных температурах. Белок в 0,001 М фосфатном буфере, pH 7,3. Концентрация белка 50 мг/мл

движения нитроксильного радикала и многократная вырожденность спектров ЭПР, зачастую не позволяющая точно оценить характер движения метки, дать спектрам однозначную интерпретацию и получать абсолютные значения динамических характеристик. Это вынуждает искать обходные пути извлечения нужной информации и данных об относительном изменении параметров спектра, что усложняет проведение эксперимента.

В этой главе проведен анализ экспериментальных результатов, полученных в рамках существующих модельных подходов, для интерпретации спектров ЭПР молекул САЧ и расчета эффективных значений времен корреляции τ_c вращательной диффузии спиновых меток в водно-белковой матрице. На рис.1 представлены экспериментальные данные по изменению частоты вращения $1/\tau_c$ спиновой метки, модифицирующей молекулы САЧ, от температуры и концентрации NaCl. Существенно нелинейный характер зависимости частоты вращения от варьируемых параметров (аналогия с расслаивающимися полимерными системами (Вассерман, Коварский, 1986)), свидетельствует в пользу гипотезы о фазовом переходе в водно-белковой системе, хотя и не раскрывает его природу.

Третья глава посвящена разработке новых экспериментальных подходов для изучения взаимодействия белок-растворитель методом спиновой метки. На рис.2. представлены спектры ЭПР сывороточного альбумина человека (САЧ), модифицированного спиновой меткой на основе малеимида (САЧ-СМ) по SH -группе Цис-34 (Hull et.al.1975). Показано, что В- компонента спектра не обусловлена посадкой метки на других центрах, например, аминоклуппах (Benga, Strach, 1975). Совокупность экспериментальных наблюдений позволяет предложить модель (Wetzel et.al., 1980), согласно которой полость в структуре белка, где локализована метка, находится в двух конформациях, с большей (А) и меньшей (В) микровязкостью. В (А)- состоянии метка находится в «закрытой» полости белка и характеризует глубинные слои водно- белковой матрицы (ВБМ), а в (В)- состоянии – поверхностные.

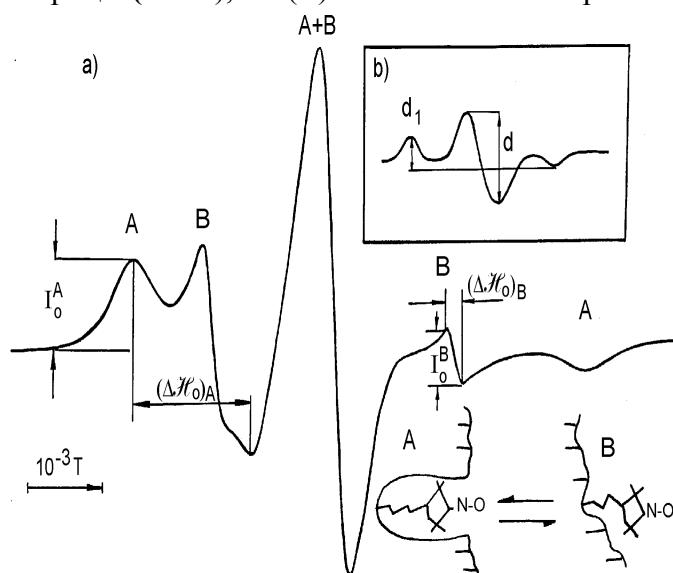


Рис.2 Спектры ЭПР спин-меченого САЧ: а) 0,01 М фосфатный буфер, рН 7,3 + 0,15 М NaCl, 20 °С. А и В указывают положение компонент, соответствующих сильной (А) и слабой (В) иммобилизации метки в водно-белковой матрице; I_0^A , $(\Delta H_0)^2_A$, I_0^B , $(\Delta H_0)^2_B$ – экспериментальные параметры для расчета эффективного распределения спин-метки между (А) и (В) состояниями. б) Температура 77 К, полная иммобилизация метки.. Отношение d_1/d зависит от диполь-дипольного взаимодействия меток и используется для оценки среднего расстояния между молекулами белка.

Благодаря хорошему разрешению А и В компонент спектра ЭПР молекул САЧ-СМ можно измерять эффективные значения коэффициента распределения радикалов $K_p^{\text{эф}}$, не применяя процедур разделения и интегрирования спектров:

$$K_p^{\text{эф}} \approx I_0^A (\Delta H_0)^2_A / I_0^B (\Delta H_0)^2_B. \quad (1)$$

Амплитуда и эффективная ширина линии I_0 и ΔH_0 показаны на рис.2. Использование $K_p^{\text{эф}}$ позволяет регистрировать термодинамические отличия А и В состояний ВБМ и их изменения, индуцируемые присутствием гостевых молекул в растворе.

$$-\ln K_p^{\text{эф}} = (\Delta G_A - \Delta G_B)^{\text{эф}} = (\Delta H_A - \Delta H_B)^{\text{эф}} - T(\Delta S_A - \Delta S_B)^{\text{эф}} \quad (2)$$

где $\Delta G^{\text{эф}} = (\Delta G_A - \Delta G_B)^{\text{эф}}$ – разность эффективных значений свободной энергии Гиббса; $\Delta H^{\text{эф}} = (\Delta H_A - \Delta H_B)^{\text{эф}}$ – энтальпии и $\Delta S^{\text{эф}} = (\Delta S_A - \Delta S_B)^{\text{эф}}$ – энтропии А и В состояний ВБМ. С помощью уравнения Вант-Гоффа рассчитывали $\Delta H = -R \ln K / d(T^{-1})$ и $\Delta S = -(\partial G / \partial T)_p = R(T \ln K / dT + \ln K)$.

В работе предлагается новый высокочувствительный способ регистрации величины, пропорциональной изменению $\Delta G^{\text{эф}}$, с использованием сахарозных зависимостей. В координатах $\ln[A]/[B] = f\{\ln(T/\eta)\}$ строятся линейные изотермы изменения вязкости и определяется угол их наклона α . Так как $T/\eta \sim (\eta_0)^{-1} \exp(-W/RT)$, где W – энергия активации вязкого течения, а η – вязкость раствора, то:

$$tg \alpha \sim RT \Delta \ln([A]/[B]) / \Delta W = -\Delta G^{A \leftrightarrow B} / \Delta W, \quad (3)$$

где $-\Delta G^{A \leftrightarrow B}$ характеризует разность свободных энергий Гиббса А и В состояний водно-белковой матрицы, куда экспонирована спиновая метка. Таким образом, $-\Delta G^{A \leftrightarrow B} / \Delta W$ является безразмерным параметром, позволяющим регистрировать изменения свободной энергии состояния ВБМ (см.рис.12), вносимые возмущениями различной природы.

Знание функции изменения свободной энергии ВБМ в присутствии осмолитов (сахароза, глицерин, мочевины, полиэтиленгликоли (ПЭГ), электролиты) позволяет представлять результаты действия осмолитов на ВБМ в терминах изменения силового параметра Π – поверхностного расклинивающего давления (Рожков, 1991; 1992), либо химического потенциала белка $\Delta \mu_2^{\text{Tr}}$ (энергетический параметр):

$$\Delta \mu_2^{\text{Tr}} \sim (\Delta G_A - \Delta G_B)^{\text{эф}}_{\text{осмолит}} - (\Delta G_A - \Delta G_B)^{\text{эф}}_{\text{вода}} = \Delta G_S - \Delta G_W, \quad (4)$$

Изменение $\Delta \mu_2^{\text{Tr}} \sim \Delta G_S - \Delta G_W$ характеризует удельную свободную энергию переноса спин-метки из А в В состояние полости белка, когда белок переходит из водного (w) в водно-солевое (s) окружение. Здесь $\Delta \mu_2^{\text{Tr}}$ определяет растворимость белка $S_{2(m3)}$ в солевом растворе (Arakawa et.al., 1991): $\Delta \mu_2^{\text{Tr}} = \int (\partial \mu_2 / \partial m_3) dm_3 = -RT \ln(S_{2(m3)} / S_{2(w)})$, где m_2 и m_3 – молярные концентрации белка и соли.

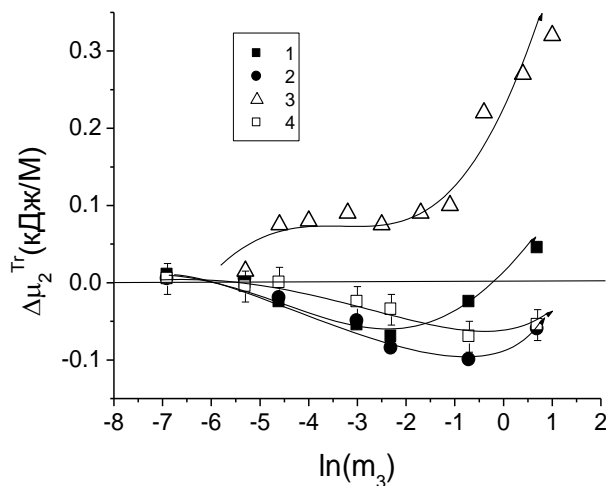


Рис.3 Эффективные значения свободной энергии $\Delta \mu_2^{\text{Tr}}$ переноса белка из бессолевой в солевую среду: (1,2,4) – NaCl; (3) – CaCl₂. Концентрация белка: (3) – 110 мг/мл в 0.01 М ацетатном буфере, pH 6.4; (1) – 50 мг/мл; (2) – 150 мг/мл; (4) – 200 мг/мл в 0.001 М фосфатном буфере, pH 7.3

На рис. 3 показано, что $\Delta \mu_2^{\text{Tr}}$ принимает отрицательные значения при умеренных концентрациях NaCl и положительные – при больших концентрациях. Это можно интерпретировать так, что в первом случае взаимодействие белок-соль термодинамически более выгодное (доступное состояние полости белка, где локализована метка, для воды,

растворимость выше), а во втором случае наблюдается стабилизация закрытой полости белка, сопряженная с уменьшением растворимости.

Приводимые в этой главе данные метода ЭПР спин-метки о действии осмолитов на состояние водно-белковой матрицы находятся в полном соответствии с имеющимися в литературе данными других методов о (де)стабилизирующем влиянии того или иного осмолита на структуру белка (Arakawa et.al., 1991).

Далее в главе 3 предлагается способ определения удельной поверхностной энергии водно-белковой матрицы методом изотерм вязкости (Рожков, Горюнов 2006). Он основан на данных метода ЭПР спин-метки, которые использовались для построения изотерм зависимости частоты вращения метки $1/\tau_c$ от T/η , где η - вязкость раствора, изменяемая сахарозой. Это позволяет в пределе линейной экстраполяции изотерм к бесконечной вязкости $(T/\eta) \rightarrow 0$ получить предельные значения частоты вращения $1/\tau^*$:

$$1/\tau_c = \kappa (T/\eta)/v + 1/\tau^*, \quad (5)$$

где κ - постоянная Больцмана, v - эффективный объем метки и белка. Здесь $1/\tau_c$ учитывает как диффузию метки в ВБМ с эффективной вязкостью η^* , так и диффузию белка в среде с вязкостью η , изменяемую сахарозой. Граничное значение частоты диффузии метки $1/\tau^*$ соответствует такому движению, когда вязкость среды как таковая в спектрах ЭПР уже не проявляется, а дальнейшее уменьшение подвижности метки определяется ростом удельной поверхностной энергии в ВБМ из-за эффектов предпочтительной гидратации.

В соответствии с существующими моделями (Вассерман, Коварский, 1986), элементарный акт переориентации метки требует флуктуации свободного объема - объема активации v^* . Средний квадрат радиуса такой флуктуации $\langle r \rangle^2 \approx (kT)/\pi\sigma$, где σ - поверхностное натяжение растворителя. Частота флуктуаций метки $1/\tau^*$, связанная с v^* , определяется работой против поверхностных сил, стремящихся ее уничтожить:

$$1/\tau^* = A^* \exp(-\Delta P v^* / RT) \approx A^* \exp(-2 v^* \sigma / rRT) \quad (6)$$

где ΔP - внутреннее давление, r - эффективный радиус, A^* - константа, определяемая из температурной зависимости $1/\tau^*$.

Тогда в пределе $(T/\eta) \rightarrow 0$ подвижность метки $1/\tau^*$ определяется лишь флуктуациями объема активации, зависящими от σ . Поэтому условие $(T/\eta) \rightarrow 0$ позволяет приводить давление к стандартному состоянию $\Delta P v^* = \text{const.}$ в уравнении (6). Присутствие в растворе белка других молекул (помимо сахарозы), влияющих на σ , будет приводить к изменению ΔP . Тем самым создается возможность сравнения эффекта разных осмотически активных веществ на σ в стандартных условиях. Из уравнения (6) следует:

$$\sigma \approx rRT(\ln A^* - \ln(1/\tau^*)) / 2 v^*, \quad (7)$$

где $r \approx 5 \cdot 10^{-10}$ м, $v^* \approx 125$ см³ (половина молярного объема метки). Значения τ_c вычисляли по формуле Фрида: $\tau_c = 2,55 \cdot 10^{10} (1 - A_{zz}/A_{zz}^0)^{-0,615}$, где A_{zz} и A_{zz}^0 - расстояния между крайними линиями спектра ЭПР исследуемого образца и образца при 77К.

На примере спин-меченых молекул САЧ, гемоглобина, антител проведена экспериментальная проверка методического подхода и исследован характер изменения поверхностного натяжения в зависимости от концентрации белка, строения спиновой метки, лигандного состояния белка, а также в присутствии разных концентраций солей (см.рис.13), декстранов и полиэтиленгликолей, D₂O.

В теоретической части работы, которая представлена в **Главе 4**, обсуждается механизм образования белковых кластеров и анализируются условия их наиболее вероятного возникновения с использованием фазовых диаграмм. Это дает возможность целенаправленно регулировать фазовое состояние такой системы и предсказывать структурно-динамическое поведение ее компонент в заданных точках фазовой диаграммы.

Исходя из представлений (Фролов, 1987) о важной роли в агрегативной устойчивости дисперсных систем способности к компенсации поверхностной энергии частиц энтропийной составляющей свободной энергии Гиббса смешения, предложен возможный компенсационный механизм возникновения белковых кластеров. В кластере экранировка неполярной поверхности белка от взаимодействия с объемной водой раствора осуществляется заряженными и полярными группами соседних молекул белка и тем самым компенсируется избыточная поверхностная энергия. Это предполагает существенно анизотропный характер взаимодействия из-за мозаичного расположения полярных и неполярных групп на поверхности белка. В этом случае удельная поверхностная энергия молекулы белка в кластере уменьшается и ее среднее значение будет равно:

$$\sigma_c = \sigma_0 (1 - r_{кр} S_3 N_A / 3V_M), \quad (8)$$

где σ_0 - поверхностное натяжение на границе неполярной поверхности белка с водой, S_3 - экранируемая полярными группами площадь неполярной поверхности молекулы, N_A - число Авогадро, V_M - молярный объем белка, $r_{кр}$ - радиус кластера.

Используя уравнение Гиббса-Томсона для критического зародыша $RT \ln(m_2/m_2^*) = 2V\sigma/r_{кр}$, условие (8) и зависимость удельной поверхностной энергии от радиуса частиц, известную как уравнение Толмена, $\sigma_0 \approx \sigma_n (1 - 2l/r_{кр})$, где σ_n - поверхностное натяжение плоской поверхности, $2l$ - толщина поверхностного слоя, получаем, что в растворе, близком к насыщению, могут существовать критические квазичастицы размеров R_1 и R_2 :

$$R_{1,2} = (6V/S_3 N_A) \{ (1 \pm (-Y)^{1/2}) / (Y + 1) \}, \quad \text{где } Y = 3(RT \ln m_2/m_2^*) / (2\sigma_n S_3 N_A). \quad (9)$$

Из этого уравнения следует, что при концентрации белка $m_2 \approx m_2^* \exp(-2\sigma_n S_3 N_A / 3RT)$ в растворе создаются условия для формирования кластеров с размерами $R_2 = 3V/S_3 N_A$. Также теоретически возможным оказывается существование в этих условиях квазичастиц с еще большим радиусом - R_1 , однако активационный барьер их формирования может быть достаточно велик, чтобы они возникали спонтанно, и лишь в условиях насыщения, которое можно уменьшать добавлением соли, вероятность возникновения квазичастиц радиуса R_1 возрастает. Зависимость радиусов этих квазичастиц от концентрации биополимера m_2 показана на рис.4.

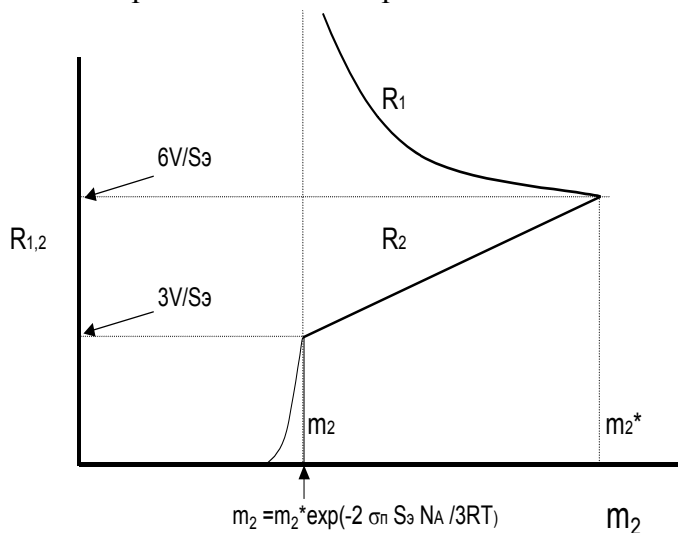


Рис.4 Изменения радиусов кластеров R_1 и R_2 от концентрации белка m_2 : m_2^* - концентрация насыщения; $3V/S_3$ - минимальный радиус устойчивого кластера, возникающего при $m_2 \approx m_2^* \exp(-2\sigma_n S_3 N_A / 3RT)$, $6V/S_3$ - максимальный радиус устойчивого кластера R_2 (или минимальный радиус устойчивого кластера R_1 , возникающего в условиях насыщения раствора)

Таким образом, согласно рис.4, еще до достижения условия насыщения образуются кластеры первого типа с радиусом R_2 , которые по мере приближения к насыщению могут трансформироваться в кластеры второго типа с радиусом R_1 . Однако концентрацию белка, необходимую для насыщения раствора, можно уменьшать добавлением «осадителя»,

например, электролита. При этом кластеры с радиусом R_1 могут расти за счет уменьшения кластеров первого типа. В литературе есть сведения о существовании в растворах лизоцима субмикронного размера фрактальных кластеров и компактных кластеров-олигомеров с меньшими размерами (Muschol, Rozenberger, 1997).

Экспериментальные данные, подтверждающие гипотезу о компенсационном механизме, представлены на рис.13, где показано, что по мере роста концентрации белка поверхностное натяжение сначала растет, а затем резко падает, что совпадает с моментом образования белковых кластеров.

Далее стояла задача отнесения кластеров к определенному фазовому состоянию раствора. Для получения уравнений, характеризующих фазовые границы в растворе белка, проводится анализ термодинамической устойчивости модельной системы вода (1)- белок (2)- электролит (3) по отношению к росту флуктуаций, с которых начинается фазовое разделение, от концентрации компонент системы. Исходя из представлений равновесной термодинамики и основных неравенств, характеризующих устойчивость систем:

$$\delta^2 G = \sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^3 \left(\frac{\partial^2 G}{\partial m_i \partial m_j} \right) \delta m_i \delta m_j > 0, \quad (10)$$

исследован детерминант устойчивости $0 \leq \partial^2 G / \partial m_i \partial m_j < \infty$ в области его минимального (нулевого) значения. Здесь $\partial G / \partial m_i = \mu_i$ - химический потенциал компонент раствора. При условии равенства нулю детерминанта и его главных миноров, а также с использованием элементов термодинамической теории многокомпонентных систем Скэтчарда (Edsall et.al. 1950), получено аналитическое выражение для коэффициента устойчивости системы $(\partial \mu_1 / \partial m_2)_{m_3}$, где μ_1 - химический потенциал воды, m_2 и m_3 - молярные концентрации биополимера и электролита:

$$\left(\frac{\partial \mu_1}{\partial m_2} \right) = RT \frac{(m_2^2 - \frac{2m_3}{v(2+\Delta)} m_2 - \frac{2m_3}{z^2})}{4m_3^2 (2+\Delta) - \Delta \cdot z^2 m_2^2} (1+\Delta). \quad (11)$$

Здесь v - число ионов электролита, адсорбированных белком, z - его заряд, Δ - функция изменения коэффициента активности электролита от концентрации в приближении Дебая-Хюккеля, расширенного на большие концентрации соли введением экспериментальных поправок:

$$\Delta = -m_3 \frac{\partial}{\partial m_3} \left(\frac{Q\zeta^{1/2}}{1+rd\zeta^{1/2}} - \sum \alpha_i \zeta^i \right). \quad (12)$$

Здесь ζ - ионная сила, r - Дебаевский радиус иона, d и Q - параметры, зависящие от температуры и диэлектрической проницаемости, α_i - экспериментальные константы. Интегрирование выражения (11) позволяет получить уравнение линий, ограничивающих устойчивую (выше линии) и неустойчивую (ниже линии) по отношению к росту флуктуаций концентрации белка область фазовой диаграммы в координатах $[\mu_1, m_2]$. Эти линии схематически изображены на рис.5. Их подробный анализ легко провести вследствие существования характеристических точек: экстремума и наибольшей крутизны, выражения для которых можно получить в аналитическом виде.

Если параметр $\Delta < 0$ (низкие и умеренные концентрации соли), то линия устойчивости имеет максимум, соответствующий критической точке С, а также одну точку максимальной крутизны В. При $\Delta > 0$ существует две точки максимальной крутизны, В и D. Совокупность точек С при различных значениях переменных параметров (температуры, концентрации соли и т.д.) образует линию спинодали на фазовой диаграмме, (т.е. линию, ограничивающую устойчивые и метастабильные

состояния, от неустойчивых) а совокупность точек В и D соответствуют нодам бинодали и характеризуют метастабильное фазовое равновесие.

Химический потенциал воды μ_1 с ростом m_2 изменяется вдоль изотермы (пунктир на рис.5), достигает границы устойчивости и образует петлю Ван-дер-Ваальса. При этом в точке (А) (на бинодали как на линии метастабильного равновесия фаз) начинают возникать метастабильные белковые кластеры концентрированной фазы с концентрацией белка D, а μ_1 во всем диапазоне концентраций белка остается неизменным. Это фазовый переход типа жидкость-жидкость (L-L), близкий к ФП 1 рода. Важное условие метастабильности и существования квазиравновесных кластеров – равенство заштрихованных площадей на рис.5 (правило Максвелла).

Справа от линии устойчивости на рис.5 пунктиром показан рост изотермы в область больших концентраций белка, свидетельствующий о существовании энергетического барьера для кристаллизации F. Однако этот участок изотермы можно рассматривать как уменьшение μ_1 в процессе разбавления водой набухшей твердой фазы. В этом случае изотерма также пересекается с линией устойчивости, но уже для набухшей твердой фазы. В этом случае правило Максвелла не выполняется (нет точки максимальной крутизны) и метастабильного состояния - кластера разбавленной «фазы» не образуется. Поэтому растворение не может происходить по механизму образования метастабильного кластера разбавленной фазы в набухшей твердой фазе.

С дальнейшим ростом m_3 ($\Delta > 0$) форма линии устойчивости изменяется (рис.5, кривая 2). Появляется вторая точка перегиба (D) и вторая нода бинодали. При этом возможны два метастабильных состояния: ($A \leftrightarrow D$) и ($E \leftrightarrow B$). Это означает, что появляющиеся в этих условиях кластеры белка метастабильны как по отношению к кристаллической фазе, так и по отношению к раствору и время жизни таких динамических кластеров должно быть ограничено. В такой ситуации критический раствор в некотором диапазоне изменения состава представляет собой смесь флуктуационных кластеров от обеих граничных фаз и может при этом выглядеть макроскопически прозрачным. Такое состояние раствора наблюдалось нами в присутствии CaCl_2 и MgCl_2 .

При еще большей концентрации электролита (кривая 3) раствор полностью теряет устойчивость и выделяется твердая фаза.

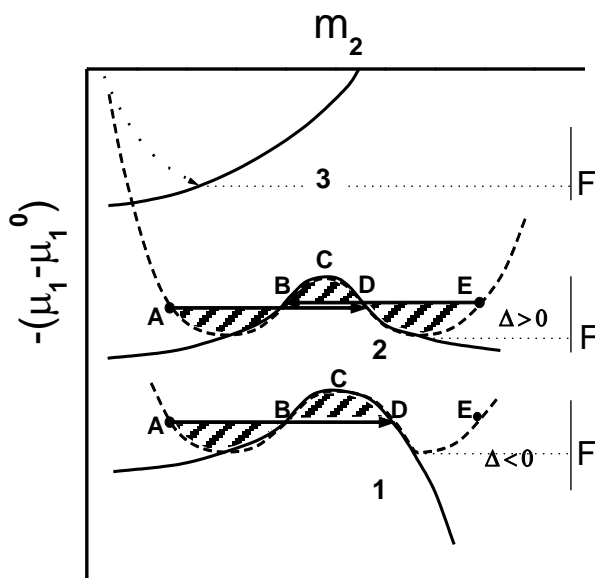


Рис.5. Три типа поведения линии границы устойчивости в координатах изменения химического потенциала воды μ_1 от концентрации белка m_2 при разных концентрациях соли (в терминах активности Δ):

1. $\Delta < 0$. Одна точка максимальной крутизны (B) и критическая точка (C). Одно метастабильное состояние $A \leftrightarrow D$ и квазиравновесие мономер-кластер.
 2. $\Delta > 0$. Две точки максимальной крутизны (B) и (D) и критическая точка (C). Метастабильные состояния $A \leftrightarrow D$ и $E \leftrightarrow B$ свидетельствуют о динамической природе кластеров и непрерывном флуктуационном фазовом переходе.
 3. $\Delta = 2v^2/(z^2 - v^2)$. Тройная точка. Все фазы в равновесии.
- F – граница твердой фазы

Согласно критерию Пригожина, из условия $(\partial\mu_1/\partial m_2) = 0$ уравнения (11) можно получить уравнение спинодали фазовой диаграммы, которое связывает критический состав, при котором достигается критическая точка С, с характеристиками белка и соли:

$$\left(\frac{m_2}{m_3}\right) = 2 \frac{1 + \sqrt{1 + \frac{(2 + \Delta)^2 v^2}{z^2}}}{v(2 + \Delta)}. \quad (13)$$

Выражение для состава, при котором достигаются точки максимальной крутизны линии устойчивости (ноды бинодали В и D на рис.5), получается из условия $(\partial\mu_1^2/\partial m_2^2) = 0$:

$$\left(\frac{m_2}{m_3}\right) = 2 \frac{v(2 + \Delta)}{\Delta \cdot z^2} \left(1 \pm \sqrt{1 - \frac{\Delta \cdot z^2}{(2 + \Delta)v^2}}\right). \quad (14)$$

Из условия $(\partial\mu_1/\partial m_2) = \infty$ получаем уравнение линии, ограничивающей максимально стабильную твердую фазу F от других состояний раствора:

$$\left(\frac{m_2}{m_3}\right) = \frac{2}{z} \sqrt{\frac{2 + \Delta}{\Delta}}. \quad (15)$$

Уравнения (13)-(15) связывают критический состав системы $(m_2/m_3)_{кр}$ со специфическими характеристиками биополимера: $(m_2/m_3)_{кр} = f(v, z, \Delta)$. Все три линии сходятся в одной сверхкритической (тройной) точке с координатами $(m_2/m_3) = 2/v$ при $\Delta = 2v^2/(z^2 - v^2)$. В этой точке все фазы находятся в термодинамическом равновесии.

Экспериментальные фазовые диаграммы часто представляются в координатах изменения растворимости белка $\log S$ от концентрации соли (или ионной силы). Если $\log S$ представить в форме уравнения Дебая-Хюккеля, эквивалентному выражению в скобках в уравнении (12) (Бланделл, Джонсон 1979), тогда из уравнения (12) следует, что:

$$\log S \approx - \int \frac{\Delta}{m_3} dm_3. \quad (16)$$

Уравнения (13) – (15), после их преобразования относительно параметра Δ , с помощью уравнения (16) приводятся к виду, соответственно:

$$\log S \sim \ln m_3^2 - \frac{2z}{v} \operatorname{arth} \frac{2m_3}{zm_2} + \operatorname{const}; \quad (17)$$

$$\log S \sim \ln\left(m_3^2 - m_2 vm_3 + \frac{m_2^2 z^2}{4}\right) - \frac{2}{\sqrt{\frac{z^2}{v^2} - 1}} \operatorname{arctg} \frac{2m_3 - m_2 v}{m_2 v \sqrt{\frac{z^2}{v^2} - 1}} + \operatorname{const}; \quad (18)$$

$$\log S \sim \ln\left(m_3^2 - \frac{z^2 m_2^2}{4}\right) + \operatorname{const}, \quad (19)$$

где уравнение (17) есть спинодаль, (18) – ноды бинодали, (19) – линия границы твердой фазы в координатах растворимости белка от концентрации соли.

Здесь наибольший интерес представляет уравнение (18), поскольку по смыслу рис.5 оно должно отражать существование двух фаз раствора с разными концентрациями белка, соответствующими длине ноды. Рассмотрим уравнение (18) вблизи критической точки. Так как $m_3 = m_2 v/n$ (уравнение 13), где $n > 2$ – положительные рациональные числа и $2v^2 < z^2$, то уравнение (18), в пренебрежении малыми членами $O(1/n^2)$, будет иметь вид:

$$\log S - \ln(m_2^2) \approx - \frac{4\nu^2(2z^2 - \nu^2)}{z^2(z^2 - \nu^2)} \frac{1}{n} + \frac{2\nu^2}{z^2 - \nu^2} + \ln\left(\frac{z^2}{4}\right) \approx K_s \left(\frac{1}{n}\right) + \mathbf{b}, \quad (20)$$

Здесь уравнение (18) трансформируется в уравнение Сеченова и характеризует линию “высаливания”, где $1/n$ играет роль безразмерной концентрации соли, а

$$\mathbf{b} \approx \frac{2\nu^2}{(z^2 - \nu^2)} + \ln\left(\frac{z^2}{4}\right) \quad (21)$$

- отрезок на оси ординат, полученный экстраполяцией прямолинейного участка на $m_3 = 0$, или гипотетическая растворимость в отсутствие электролита. K_s определяет угол наклона экстраполяционной прямой в области “высаливания”:

$$K_s \approx - \frac{4\nu^2(2z^2 - \nu^2)}{z^2(z^2 - \nu^2)}. \quad (22)$$

Этот коэффициент “высаливания” характеризует эффективность соли. Из уравнения (21) следует, что гипотетическая растворимость растет с ростом заряда белка и с числом адсорбированных ионов соли. Однако в области больших концентраций соли главным становится коэффициент высаливания и растворимость резко уменьшается с ростом ν . Механизм этого явления раскрывается в теории предпочтительной гидратации белков в присутствии солей (Arakawa, Timasheff 1984).

В таком представлении в уравнении (20) величина S является концентрацией белка в разбавленной фазе, а $m_2 \equiv m_2^*$ - концентрацией белка в «фазе» кластера. Поэтому уравнение высаливания белка электролитом характеризует взаимосвязь между концентрациями белка в двух «фазах». Таким образом, зная заряд белка, число связанных анионов соли и ее концентрацию, а также концентрацию белка, при которой наступает высаливание, можно оценивать концентрацию белка в кластере. С другой стороны, если известна концентрация белка в разбавленной фазе и в кластере (иногда ее удается определить после центрифугирования раствора, в результате чего кластеры образуют макрофазу (Dumetz et al., 2008)), то можно оценивать число связанных с белком ионов.

Можно проверить адекватность уравнения (20) доступным экспериментальным данным для лизоцима. Чтобы установить соответствие безразмерного параметра $1/n$ и молярной концентрации соли NaCl (m_3), которая обычно используется для высаливания и кристаллизации лизоцима, необходимо решить трансцендентное уравнение:

$$2\ln(m_3 n / \nu) - \frac{4\nu^2(2z^2 - \nu^2)}{z^2(z^2 - \nu^2)} \frac{1}{n} = - \frac{2\nu^2}{z^2 - \nu^2} - \ln\left(\frac{z^2}{4}\right) \quad (23)$$

На рис.6 сопоставлены теоретически рассчитанные значения $\log S - 2\ln(m_2^*)$ и экспериментальные значения $\log S$ при разных значениях pH (заряда белка z) и концентрациях NaCl. Растворимость лизоцима в работе (Retailleau et al., 1997) определялась путем установления равновесия с кристаллом. Обычно с лизоцимом связано не менее 4-5 ионов Cl^- и с ростом концентрации соли их адсорбция может возрастать. Из рис.6 видно, что тенденции в поведении теоретических и экспериментальных зависимостей качественно совпадают, но отличаются на величину $\ln(m_2^*)^2$, которая характеризует концентрацию белка в кластере. Расчетная концентрация оказывается несколько выше (около 700 мг/мл), чем реально наблюдаемая в кластере белка (около 500 мг/мл), получаемого в результате высаливания (Dumetz et al., 2008).

На рис.6 также приведены данные по «растворимости» при концентрациях соли от 1 М NaCl и выше, полученные методом высаливания (Кривая 7). Концентрация белка, при которой в растворе появляется мутность, обусловленная возникновением кластеров, оказывается больше, чем в условиях равновесия (скачок на зависимостях в области 1М NaCl). Чтобы получить «скачок» на теоретических зависимостях, следует предположить, что часть ионов Cl^- десорбируется при образовании кластеров.

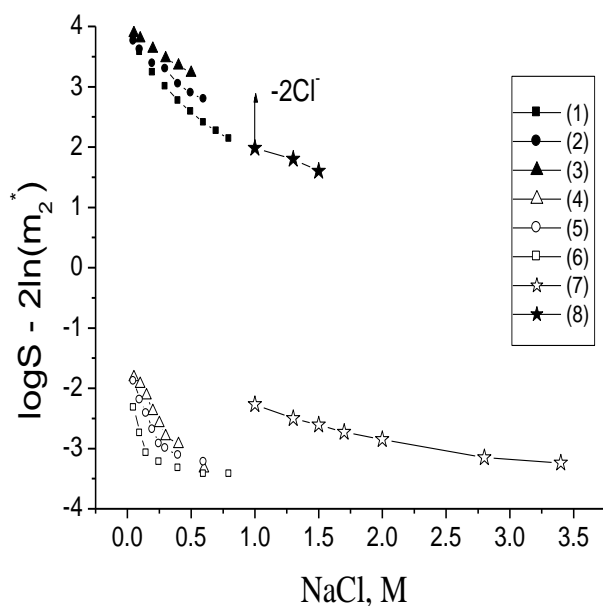


Рис.6. Теоретическая (1,2,3) и экспериментальная (4,5,6) зависимости растворимости лизоцима от концентрации NaCl при разных значениях pH (заряда белка z): (1) – pH 7 (z = 8); (2)- pH 5 (z = 10); (3)- pH 4 (z = 11); (4) – pH 4,3; (5) – pH 6,5; (6) – pH 8,4. Расчет теоретических кривых проведен при $\nu = 5$. Экспериментальные данные из (Retailleau et.al., 1997); (7) - экспериментальная и (8) - теоретическая зависимости начала высаливания лизоцима при pH 7. Параметры расчета: $z = 8$, ν изменяется от 6 до 7. Экспериментальные данные из (Dumetz et.al., 2008).

Реальные значения ν можно получить из данных по изменению концентрации белка в кластерах или в геле лизоцима в зависимости от концентрации NaCl (Dumetz et.al., 2008). В этом случае расчет по прямому уравнению (18) показывает, что при 1 М NaCl с белком связано 4,5 иона Cl⁻, при 2 М NaCl – 6,5 иона Cl⁻ и при 3 М NaCl - 6,9 иона Cl⁻, что согласуется с (Retailleau et.al., 1997). Таким образом можно определить число адсорбированных ионов электролита. При этом видна тенденция к насыщению в связывании анионов с ростом концентрации соли.

Температура является важнейшим фактором в механизме ФП и критической точки (КТ) можно достичь изменением температуры. Это предполагает существование взаимосвязи между температурой и критическим составом $X = (m_2/m_3)_{кт}$. Параметр Δ связан с температурой через константы d и Q уравнения Дебая-Хюккеля, где $Q \sim C/(\epsilon T)^{3/2}$. Здесь ϵ – диэлектрическая проницаемость, C - константа. Соотношение между $X = (m_2/m_3)_{кр}$ и температурой можно получить, используя уравнение (13) и (14):

$$\pm 1/\Delta = (4 - X^2 z^2)/(2X^2 z^2 - 4Xz^2/\nu - 8) \quad (24)$$

$$\pm 1/\Delta = (X^2 z^2 - 4X\nu + 4)/(8X\nu - 8) \quad (25)$$

На рис.7 показана взаимосвязь критического параметра $(m_2/m_3)_{кр}$ и эффективной температуры: $|1/\Delta| \sim (\epsilon T)^{3/2}$. При заданной концентрации белка m_2 кривые 1 и 2 на рис. 7 характеризуют температурное поведение критической точки при вариациях концентрации соли и соответствуют низким ($\Delta < 0$) и высоким ($\Delta > 0$) концентрациям соли, соответственно. Из рис.7 следует, что температура критической точки (и спинодали) возрастает с ростом концентрации соли при $\Delta < 0$, в то время как при $\Delta > 0$ температура критической точки уменьшается. Максимальной температуры спинодали достигает при $\Delta = 0$ и составе: $(m_2/m_3)_{кр} = (1/\nu)[1 + (1 + 4\nu^2/z^2)^{0,5}]$.

При условии $\Delta > 0$ поведение кривых 2 (для спинодали) и 3 (для нод бинодали) на рис.7 показывает, что с ростом m_3 температура критической точки и температура нод понижается и достигает температуры минимальной (тройной точки), соответствующей значению $|1/\Delta| = N = (z^2 - \nu^2)/2\nu^2$. Здесь состав системы удовлетворяет условию $(m_2/m_3) = 2/\nu$. При этой температуре и составе все фазы находятся в равновесии.

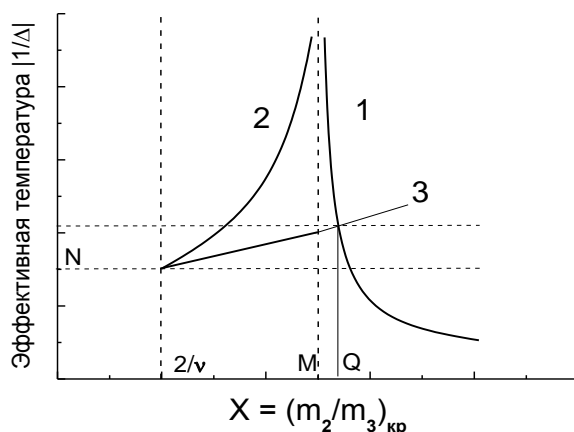


Рис.7. Связь критического состава $X = (m_2/m_3)_{кр}$ с эффективной температурой при вариациях концентрации соли. Кривая 1 соответствует низким концентрациям соли, $\Delta < 0$; кривая 2 для больших концентраций, $\Delta > 0$. Кривая 3 изменяется монотонно во всем диапазоне составов. При $(m_2/m_3) > Q$ происходит температурная инверсия бинадали и двухфазная область возникает при повышении температуры.

Существование точки пересечения кривых 1 и 3 на рис.7 свидетельствует о температурной инверсии бинадали и спинодали. При составах m_2/m_3 справа от точки пересечения Q (очень малые концентрации соли или большие белка) температура фазового квазиравновесия расположена выше, чем критическая точка. Это система с нижней критической температурой растворения (НКТР). При составах m_2/m_3 слева от точки пересечения Q, но еще при $\Delta < 0$, температура фазового квазиравновесия ниже, чем у критической точки, т.е. это система с ВКТР. Таким образом, есть основания предположить, что постепенное увеличение концентрации соли может приводить к постепенному переходу от системы с НКТР к системе с ВКТР и это может быть зарегистрировано экспериментально как фазовый переход.

Используя температурные зависимости критического состава на рис.7 и диаграмму рис 5, качественно можно представить фазовую диаграмму (ФД) растворимости системы в широко используемых координатах: температура – концентрация белка, где концентрация соли является варьируемым параметром (рис.8). Эта ФД аналогична общему (generic) типу диаграмм для глобулярных белков, (Muschol and Rozenberger, 1997). Повышение температуры критической точки (максимума спинодали) с увеличением концентрации соли при $\Delta < 0$ показано сплошной стрелкой, а при $\Delta > 0$ пунктирной стрелкой показано уменьшение температуры критической точки и стремление к тройной точке. «Низкосолевые» кластеры существуют на бинадали 5 на рис 8, а «высокосолевыми» кластеры существуют на бинадали S - m_2^* на рис 8.

На рис.8 для системы с ВКТР верхняя точка спинодали и бинадали является критической. При изменении температуры или состава системы вода-белок-соль здесь имеет место критический ФП флуктуационного типа, когда обе фазы, сосуществующие при более низких температурах, становятся тождественными при ее повышении. При этом, в соответствии с теорией непрерывных фазовых переходов (Базаров,1983), у системы сначала появляются свойства однородной системы, а потом, будучи в целом однородной, у нее пропадают свойства двухфазной системы. Этот переход может занимать значительный участок фазовой диаграммы и представлять собой область закритических ФП (область между бинадалью и кривой растворимости). Здесь могут существовать динамические кластеры белка с ограниченным временем жизни, метастабильные по отношению к обеим граничным фазам белка. Аналогичные процессы и динамические кластеры могут существовать и в системе с НКТР. Поскольку механизмы образования систем с НКТР и ВКТР различны, различны должны быть и динамические кластеры. Согласно существующим данным, в растворах лизоцима обнаруживаются два типа динамических кластеров размерами ~ 10 нм и 100 нм. Первые из них характерны для

низкосолевых растворов и являются динамическими компактными олигомерами белка (Stradner et.al. 2006).

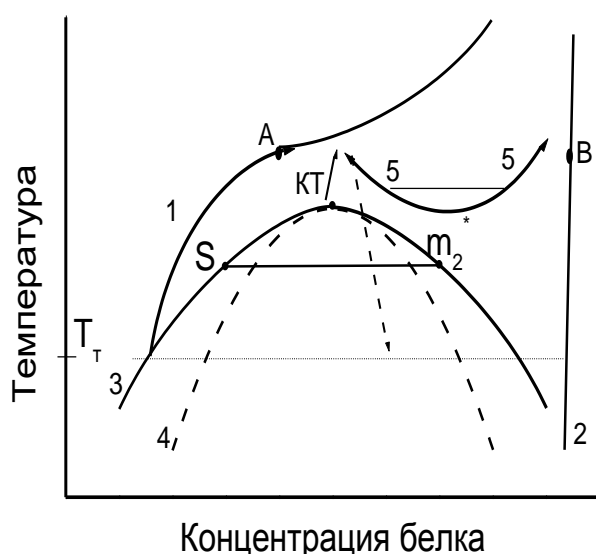


Рис.8. Схематическое представление фазовой диаграммы системы вода-белок-соль в координатах температура-концентрация белка. Кривая 1 является линией растворимости белка; кривая 2 — граница твердой фазы; кривые 3 и 4 — бинодаль и спиноподаль, соответственно, с ВКТР; 5 — бинодаль с НКТР. АВ отражает равновесие кристалла с надосадочной жидкостью. S и m_2^* характеризует квазиравновесие разбавленной фазы и концентрированной фазы (высокосолевых кластеров), КТ — критическая точка. Стрелка — ее поведение при увеличении концентрации соли, T_T — температура тройной точки (все фазы в равновесии).

В Главе 5 представлены результаты исследования влияния неорганических солей на структурную гетерогенность растворов САЧ-СМ. Растворы белка (50-200 мг/мл), модифицированного меткой на основе малеимида, содержали соли (NaCl , KSCN , MgCl_2 , CaCl_2) разной концентрации в диапазоне 10^{-3} – 4 М/л. Выбор солей обусловлен тем, что они (за исключением KSCN) имеют параболического типа зависимость коэффициента активности от концентрации. Для них последовательно реализуются условия $\Delta > 0$, $\Delta = 0$ и $\Delta < 0$ с ростом концентрации соли. Если для MgCl_2 , CaCl_2 экстремум коэффициента

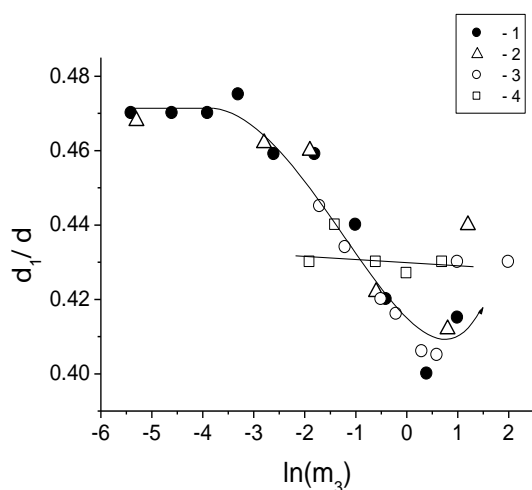


Рис.9 Зависимости экспериментального параметра d_1/d , спектров ЭПР САЧ-СМ (77 К), от концентрации различных солей: (1) — CaCl_2 , концентрация белка 110 мг/мл, pH 6,4; (2) — NaCl , концентрация белка 40 мг/мл., pH 7,3; (3) — MgCl_2 , концентрация белка 90 мг/мл, pH 5,7; (4) — KSCN , концентрация белка 110 мг/мл, pH 6,4. Соединяющие линии проведены для удобства наблюдения.

активности имеет место при 0,3 – 0,5 М, то для NaCl пологий минимум существует около 1,5 М концентрации.

Регистрировали индуцированные солями изменения в спектрах ЭПР модифицированных белков и сравнивали со спектрами белков в буферных растворах без соли. При этом анализировались параметры спектров (ширина линий, расстояния между экстремумами линий и соотношение амплитуд) в диапазоне температур от 77К до 318 К,

позволяющие получить информацию о диполь-дипольных взаимодействиях спин-меток и средних расстояниях между молекулами белка (рис.9), их диффузионных характеристиках (рис.1) и термодинамических функциях состояния водно-белковой матрицы (рис 10,11).

На бинадали фазовой диаграммы, при температурах ниже критической, для многих белковых систем имеет место фазовый переход типа жидкость-жидкость, приводящий к фазовому разделению и образованию метастабильных концентрированных кластеров белка. Макроскопическое проявление этого явления в солевых растворах сопряжено с высаливанием. Для многих белков эффект наблюдается в области субнулевых температур. Согласно выводам Главы 4, увеличение концентрации соли будет приводить к смещению бинадали из области низких в область комнатных (физиологических) температур. При этом в эксперименте при комнатной температуре, согласно выводам Главы 4, может наблюдаться фазовый переход, связанный с «плавлением» низкосолевых динамических кластеров -олигомеров и появлением высокосолевых динамических кластеров и даже концентрированных микрофаз белка при высаливающих концентрациях солей.

По данным литературы (Zhang et.al, 2007) в водно-солевых растворах сывороточного альбумина быка при комнатных температурах не было обнаружено явных признаков ФП типа L-L. Наши же результаты свидетельствуют о наличии фазовых переходов типа «плавления» в растворах САЧ при более низких температурах (рис.10 и рис.11). Возможно, это обусловлено большей склонностью САЧ к взаимодействию и агрегации, чем САБ и более низким диапазоном температур исследования. Повышенные значения параметра d_1/d в диапазоне низких концентраций соли наиболее вероятно указывают на наличие компактных кластеров-олигомеров. При умеренном повышении концентрации соли эти кластеры «плавятся» и исчезают, о чем говорит уменьшение d_1/d и скачок термодинамических функций состояния .

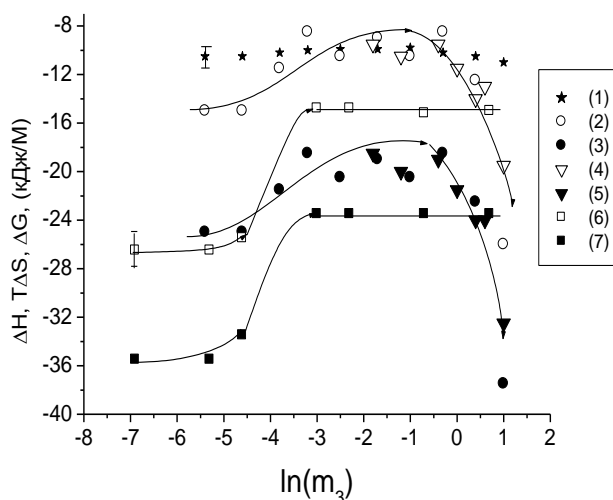


Рис.10 Зависимость эффективных термодинамических функций состояния водно-белковой матрицы САЧ-СМ от концентрации солей: CaCl_2 – (1,2,3), MgCl_2 – (4,5) and NaCl - (6,7). (1) - ΔG ; (2,4,6) - $T\Delta S$; (3,5,7) - ΔH . Концентрация белка: с NaCl – 200 мг/мл (0.001 М фосфатный буфер, pH 7.3); с CaCl_2 и MgCl_2 (0.01 М ацетатный буфер, pH 6.4) - 110 мг/мл и 90 мг/мл, соответственно. Приведено к 15⁰С

В диапазоне больших концентраций солей (близких к высаливающим) появляются динамические «высокосолевые» кластеры и новые концентрированные фазы белка субмикронных размеров с несколько большим расстоянием между молекулами белка, чем в «низкосолевых» олигомерах (рис.9). В растворах САЧ с CaCl_2 и MgCl_2 они становятся визуально заметны по увеличению мутности. Однако при дальнейшем увеличении концентрации соли раствор становится вновь прозрачным. Вероятно, здесь имеет место критический фазовый переход. Для этих солей на рис.10 изотерма $T\Delta S$ в верхней точке сливается с изотермой ΔG , т.е. $\Delta G \approx T\Delta S$. Таким образом, энтропия начинает управлять поведением системы, что характерно для критического фазового перехода (Юркин, 1991). Кроме того, зависимость параметра $\Delta\mu_2^{\text{Tr}}$ в области плато (рис.3) соответствует нулевым

значениям высших производных удельной свободной энергии вплоть до четвертой, что также является термодинамическим признаком критического ФП (Моравец, 1967). Вероятно, возможность наблюдать критический переход обусловлена снижением температуры критической точки в условиях высоких концентраций двухвалентных солей, т.е. при условии $\Delta \geq 0$ и попаданием ее в область температур эксперимента. В этом случае раствор белка представляет собой смесь флуктуационных зародышей обеих граничных фаз при сохранении макроскопической прозрачности (рис.5, кривая 2).

В растворах САЧ с NaCl критического фазового перехода визуально наблюдать не удастся, как и кластеров новой фазы, но по мере уменьшения концентрации белка и соли амплитуда скачка (при постоянном значении m_2/m_3 , что согласуется с уравнением (13)) убывает (см. рис.11). Это может свидетельствовать о приближении к критическому фазовому переходу, причем со стороны высоких концентраций белка (рис.8).

Солью индуцируемый структурный фазовый переход (ФП) можно интерпретировать как фазовый переход воды, участвующей в гидратации низкосолевого и высокосолевого динамических кластеров белка. В таком представлении спиновая метка является индикатором термодинамических изменений гидратации в процессе ФП. Отрицательные значения термодинамических функций ΔH , $T\Delta S$, ΔG свидетельствуют, что закрытое (А) – состояние полости в структуре белка, где локализована спин-метка, термодинамически более стабильно, чем открытое для растворителя В- состояние. В «низкосолевого» зоне эта стабилизация сильнее.

Поскольку фазовый переход на рис.10 и рис.11 сопровождается увеличением среднего расстояния взаимодействия между молекулами белка (рис.9), есть основания считать, что под действием соли плотные динамические кластеры белка – олигомеры разрушаются и образуются более «рыхлые», но большего размера динамические кластеры второго типа, постепенно формируя метастабильные микрофазы, обогащенные белком.

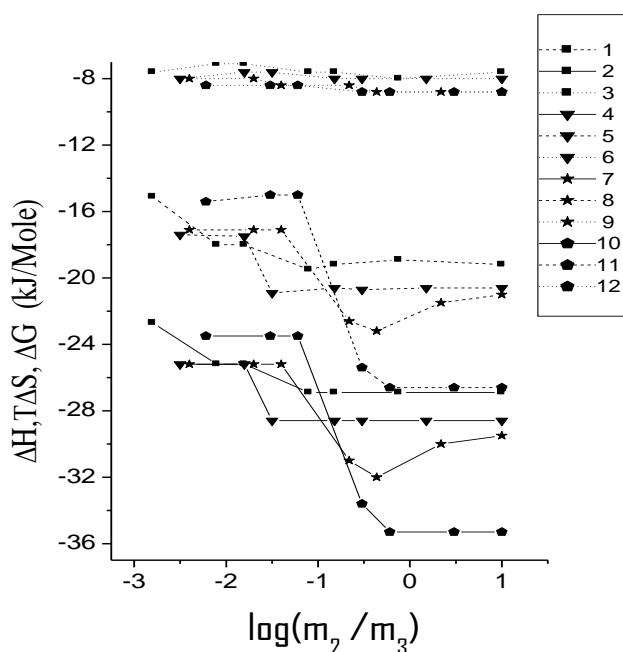


Рис.11 Эффективные термодинамические функции состояния водно - белковой матрицы: (3,6,9,12) – ΔG (точки); (1,5,8,11) – $T\Delta S$ (пунктир); (2,4,7,10) – ΔH (сплошные линии). Изменяется концентрация NaCl (m_3) при концентрациях белка (m_2): (1,2,3) – 50 мг/мл; (4,5,6) – 100 мг/мл; (7,8,9) – 150 мг/мл; (10,11,12) – 200 мг/мл в 0.001 М фосфатном буфере, pH 7,3. Приведено к 15 °С.

При относительно плавном поведении $\Delta G(m_3)$. на рис.10 и рис.11, следует отметить существование пологого экстремума при определенной концентрации соли. С ростом концентрации белка экстремум сдвигается в область больших концентраций соли (Рожков, Борисова 1993). Для более точного анализа $\Delta G(m_3)$. использован подход с влиянием вязкости раствора на соотношение амплитуд спектра ЭПР САЧ-СМ (Глава 3).

Рассчитанные таким образом данные представлены на рис.12. В таком виде они представляют собой зависимость безразмерной энергии Гиббса А-состояния водно-белковой матрицы от состава. По краям солевого интервала структура белка более жесткая (стабилизация А-состояния полости), чем в середине, где происходит перестройка структуры раствора из «низкосолевого» (кластеры первого типа) в «высокосолевою» (кластеры второго типа). При температуре 45 °С фазовый переход не регистрируется.

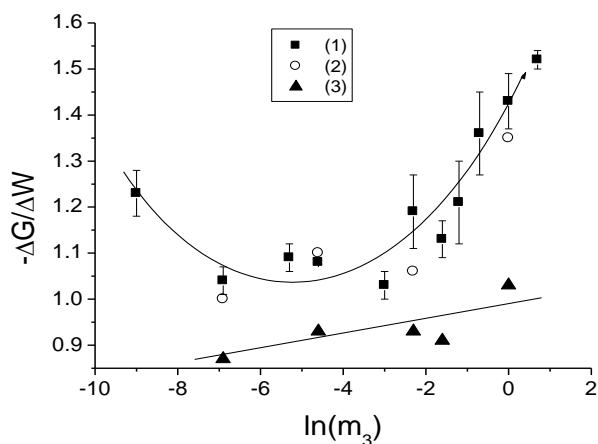


Рис.12 Зависимости безразмерного параметра $\Delta G/\Delta W$, отражающего изменения свободной энергии Гиббса водно-белковой матрицы, от концентрации NaCl m_3 при разных температурах: (1) -15°C , (2) -26°C , (4) -45°C . 0,01 М фосфатный буфер, pH 7,3. Концентрация САЧ-СМ 50 мг/мл.

Фазовый переход в середине солевого интервала сопряжен с ростом частоты вращения метки (рис.1), с ростом растворимости белка (рис.3), и с ростом расклинивающего давления воды в ВБМ, характеризующего увеличение гибкости белка.

На рис.13 показано поведение удельной поверхностной энергии в области локализации спиновой метки на поверхности белка в зависимости от состава раствора. Увеличение концентрации белка ведет к росту энергии, однако с появлением кластеров рост σ компенсируется. Плавление белковых кластеров 1 типа и их превращения во 2 тип с ростом концентрации соли существенным образом в значениях σ не проявляется.

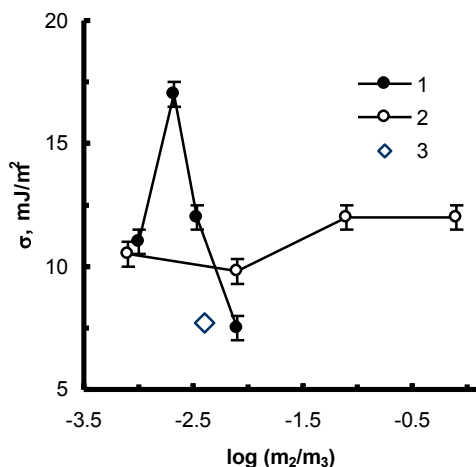


Рис.13 Зависимости изменения микроскопического поверхностного натяжения σ в области локализации спиновой метки от отношения m_2/m_3 . Вариации m_2/m_3 осуществляются за счет изменения концентрации белка при $m_3 = 0,15 \text{ M NaCl}$ – (1); и соли m_3 , при $m_2 = 50 \text{ мг/мл}$ – (2). Минимальное значение σ в присутствии гидратированных фуллеренов – (3).

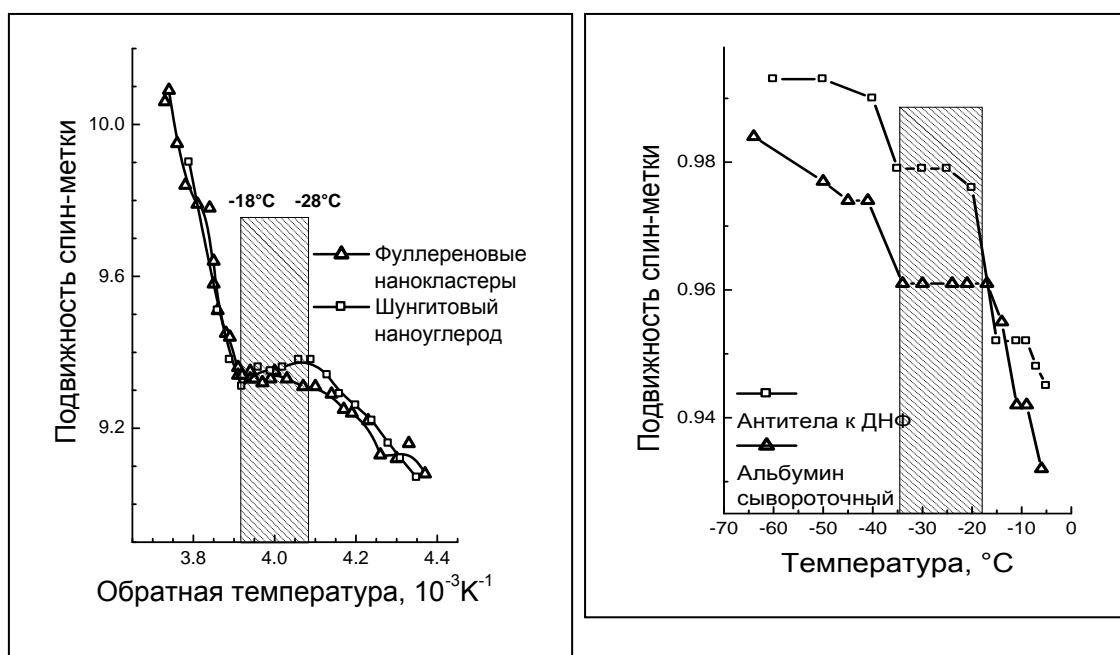
Несмотря на то, что представленные здесь данные характеризуют взаимодействие белок-растворитель, качественное объяснение результатов можно провести на основе взаимодействия белков. В этой главе на основе коллоидного подхода (теория ДЛФО) обсуждается возможная структурно-динамическая модель раствора белка. Она оперирует белковыми кластерами-олигомерами, располагающимися на расстоянии второго энергетического минимума потенциальной энергии взаимодействия. При этом мономеры белка окружают кластеры на расстоянии первичного энергетического минимума и

обеспечивают стабилизацию как коллоидного состояния раствора, так и стабилизацию структуры белка (закрытое А-состояние полости белка, где локализована спин-метка). На основании этой модели удастся качественно объяснить «плавление» кластеров-олигомеров действием электролита на величину и положение потенциальных барьеров энергии взаимодействия кластеров и молекул белка.

Глава 6 посвящена изучению влияния молекулярно-коллоидной системы гидратированных фуллеренов C₆₀ на структурно-динамические характеристики молекул сывороточного альбумина. Другая задача работы заключалась в регистрации отклика белков (в т.ч. актин-спектринового цитоскелета) эритроцитарных мембран (теней), приготовленных по известным методикам, на присутствие в их суспензии наночастиц углерода различного происхождения, включая шунгитовый углерод и наноалмазы. В качестве рабочей гипотезы было предположение, что в основе неспецифических проявлений биологической активности коллоидной дисперсии фуллеренов (C₆₀FWS, Andrievsky et.al., 1995) может лежать их способность влиять на фазовое состояние раствора, т.е. на изменение критического состава (Рожков, Горюнов, 2002; Rozhkov et.al., 2003), как это характерно для многих осмолитов. Вместе с тем можно ожидать и адсорбцию белков на нанокластерах углерода.

Характерной особенностью C₆₀FWS является их коллоидный характер, что означает присутствие в растворе агрегатов (кластеров) различного размера. Коллоидными являются также растворы водорастворимых производных фуллеренов, фуллеренов и их производных в органических растворителях. Это делает их в структурном плане во многом похожими на растворы биополимеров, для которых определяющим условием стабильности является состояние гидратации.

Рис 14 а,б



Исследовали изменения динамики спиновых зондов при плавном замораживании воды, участвующей в гидратации наночастиц и белков (рис.14 а,б). Показано, что реакция гидратной оболочки на замораживание как в дисперсиях наноуглерода, так и в белках содержит общие закономерности, связанные с существованием незамерзающей воды в диапазоне (-15 - -30⁰С) в устойчивых дисперсиях наночастиц и ее отсутствием в неустойчивых дисперсиях.

Чрезвычайно важно знать состояние гидратации нанокластеров углерода, места возможного взаимодействия нанокластеров с биологическими структурами, поскольку

нанокластеры могут служить сильными катализаторами окислительно-восстановительных реакций, создавая в своем окружении повышенную концентрацию кислорода и ионов металлов. Следствием этих взаимодействий может оказаться токсический эффект

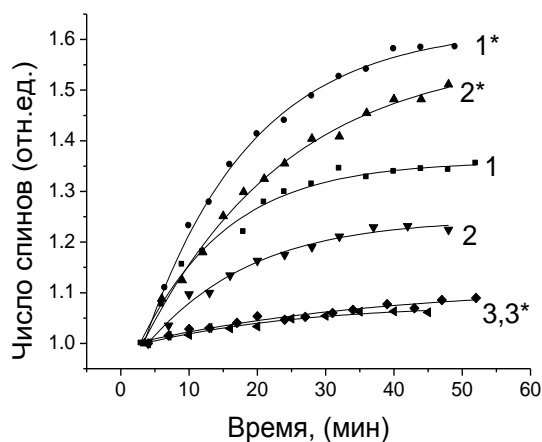


Рис.15. Влияние фуллеренов (20 мкМ) на кинетические кривые восстановления парамагнетизма 5-Доксил-стеариновой кислоты в мембране теней эритроцитов – (1*,2*,3*) по сравнению с контролем (1,2,3). при разных концентрациях Fe⁺² (М): 0,8 мМ – (1); 0,4 мМ – (2); 0,04 М – (3)

наноуглерода. В работе исследовано влияние гидратированных фуллеренов (C₆₀FWS) и наночастиц шунгитового углерода (ShC) на изменение скорости запускаемых ионами железа потери и последующего зависимо от кислорода восстановления парамагнитных свойств водо и мембранорастворимых стабильных спиновых зондов 4-оксо-ТЕМПО (1) и 5-Доксилстеариновой кислоты (2). Зонды служили в качестве индикаторов модулирующего действия наночастиц углерода на свободнорадикальные процессы. В опытах с (1) в коллоидные растворы, содержащие либо C₆₀FWS, либо ShC в разных концентрациях от 0,1 до 1 мг/мл и 0,1 мМ зонда, добавляли разные концентрации FeSO₄ (от 0,1 до 1 мМ). Первые 20-30 минут шла относительно быстрая известная реакция восстановления (реакция -I) зонда ионами железа с потерей парамагнетизма зонда, которая затем сменялась медленной реакцией окисления (реакция-II) зонда с восстановлением сигнала ЭПР. При этом скорости обеих реакций росли пропорционально концентрации как сульфата железа, так и наночастиц ShC. Без наночастиц углерода реакция окисления (II) не шла.

Добавлением аскорбиновой кислоты (200 мкМ и 40 мкМ FeSO₄) можно замедлять скорость реакции (I), при этом фуллерены на скорость реакции (I) практически не влияют. В этой же системе реакция (II) запускалась добавлением свежей порции воды или следовых количеств перекиси водорода. Это свидетельствует о важной роли молекул кислорода в реакциях окисления зонда, при этом в присутствии фуллеренов скорость реакции (II) возрастала.

В опытах с (2) зонд вводили в мембрану теней эритроцитов и наблюдали динамику изменения парамагнетизма зонда добавлением FeSO₄ в концентрации от 0,04 до 0,8 мМ в суспензию теней, не содержащую и содержащую 20 мкМ фуллеренов (рис.15). В этой системе после мгновенного восстановления зонда, индуцируемого Fe⁺², сразу (< 3 мин) начинался рост сигнала ЭПР, причем скорость роста изменялась пропорционально росту концентрации FeSO₄ и увеличивалась в присутствии фуллеренов, если концентрация FeSO₄ была больше 0,04 мМ. При меньшей концентрации FeSO₄ эффект фуллеренов не обнаруживается, что может свидетельствовать об отсутствии у фуллеренов собственных прооксидантных свойств, выражающихся в способности генерировать активные формы кислорода.

Таким образом, обнаруженный прямой каталитический эффект углеродных наночастиц на радикальные реакции в водной среде и в тенях мембран эритроцитов в

присутствии O_2 указывает на необходимость тщательного контроля содержания ионов железа в дисперсиях углеродных наночастиц при их медико-биологическом применении.

В солевых растворах в присутствии фуллеренов отмечено уменьшение в водно-белковой матрице микроскопического поверхностного натяжения, которое также является интегральной характеристикой гидратации. Было также обнаружено, что индуцируемый солью фазовый переход, сопряженный с разрушением «низкосолевых» динамических белковых кластеров, в присутствии фуллеренов происходил при больших концентрациях электролита (Таблица 1). Как следует из таблицы, при концентрации соли 0,15 М в присутствии фуллерена $\Delta H/\Delta W$ и $T\Delta S/\Delta W$ белка соответствуют «низкосолевому» типу гидратной оболочки, в то время как при этой концентрации они должны бы соответствовать «высокосолевому» типу. Таким образом, присутствие фуллерена влияет на положение фазового перехода на фазовой диаграмме, сдвигая критический состав в сторону больших концентраций соли. Они способствуют сохранению «низкосолевых» динамических белковых кластеров (олигомеров) в том диапазоне концентраций электролита (физиологически значимом), где в отсутствие фуллеренов они начинали «плавиться». Если следовать логике фазовой диаграммы рис.9, то в присутствии фуллеренов температура спинодали должна понижаться, как это происходит в присутствии глицерола и полиэтиленгликолей (Galkin and Vekilov, 2000). Вероятно, нанокластеры фуллеренов, являясь коллоидными частицами, стабилизируют коллоидное состояние белкового раствора за счет дальнедействующих сил.

Таблица 1 Изменение термодинамических функций состояния водно- белковой матрицы, рассчитанные из температурной зависимости свободной энергии перехода спин-метки из А в В состояние полости белка в диапазоне 15-36 °С и приведенные к 15 °С , в зависимости от концентрации NaCl и в присутствии фуллеренов

NaCl (M)	1,0	0,1	0,01	0,001	0,15+ 5мкМ C_{60}
$T\Delta S/\Delta W$ (отн.ед)	28,8±3,5	29,9±4,0	15,5±1,5	15,9±1,3	17,3±1,5
$\Delta H/\Delta W$ (отн.ед)	30,2±3,5	31,1±4,0	16,6±1,5	16,9±1,3	18,4±1,5

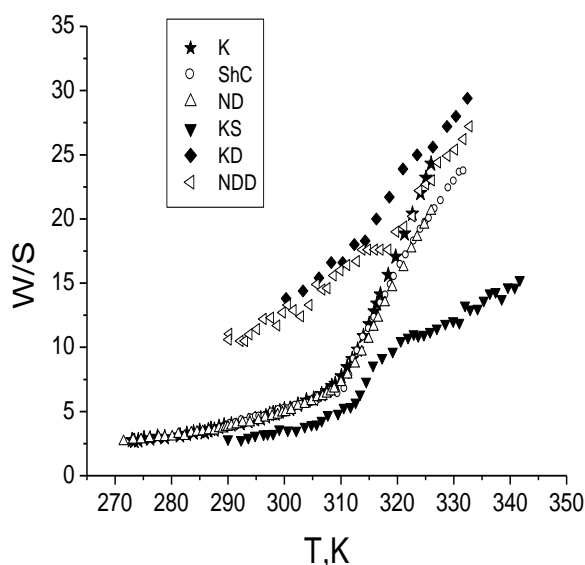


Рис.16 Влияние наноалмазов (ND) и наночастиц шунгитового углерода (ShC) на конформационную динамику, характеризуемую отношением W/S , белков актин-спектринового комплекса эритроцитов. (K) - контрольная суспензия мембран (теней) эритроцитов в 0,005 М фосфатном буфере, pH 8. (KD) и (NDD) – кривые “отжига” контрольной суспензии теней и теней в присутствии (ND), соответственно, при 60°C. (KS) – контрольная суспензия теней в 0,01 М фосфатном буфере, pH 7,4 + 0,15 М NaCl.

Обнаружен универсальный стабилизирующий эффект наночастиц на мембранные белки теней эритроцитов при температурах больше 310 К. На рис.16 представлены зависимости отношения параметров спектра ЭПР W/S спиновой метки, модифицирующей белки актин-спектринового каркаса теней эритроцитов, от температуры. В присутствии наноалмазов (ND) и шунгита (ShC) белки ведут себя практически одинаково с контролем вплоть до температур 310 К, однако далее в актин-спектриновом комплексе начинается денатурационный процесс и проявляется стабилизирующий эффект наночастиц углерода: уменьшение отношения W/S свидетельствует об усилении внутри и межмолекулярного взаимодействия белков цитоскелета (Butterfield,1982). Стабилизирующий эффект (ND) сохраняется после «отжига» - нагреве суспензии теней до 60⁰С, последующем охлаждении до 25⁰С и повторном нагревании до 60⁰С, что может говорить о защитном действии наночастиц против необратимых процессов термоиндуцированной агрегации.

В опытах со спин-зондом 5-Доксилстеариновой кислотой было показано, что наночастицы углерода вызывают перераспределение спин-зонда из одного микроокружения (предположительно, в аннулярном слое липидов), в другое. Это может быть связано с изменением взаимодействия белков в мембране в связи с их ассоциацией, индуцированной наночастицами.

В Главе 7 обсуждаются возможные следствия, вытекающие из существования кластерной организации раствора белка и фазовых переходов, сопровождающих ее трансформацию. Эти следствия можно использовать для лучшего понимания молекулярных механизмов, лежащих в основе некоторых конкретных биотехнологических процессов, а также биопроцессов, находящихся в стадии интенсивного изучения на более высоких уровнях биологической организации.

В первой части Главы 7 обсуждаются результаты исследования механизма кристаллизации лизоцима, т.е. изменений структурно-динамического состояния раствора лизоцима при увеличении концентрации NaCl. Молекулы лизоцима модифицировали спиновой меткой на основе йодацетамида в условиях посадки метки в одном центре на Гис-15. Снимали спектры ЭПР образцов белка концентрации 35 мг/мл при разных концентрациях NaCl от 0,003 до 3 М в 0,01 М фосфатном буфере, рН 6,4 при температурах 293 К и 77 К. Определяли время корреляции молекул лизоцима и при разных мощностях СВЧ измеряли степень насыщения и параметр d_1/d , обратно пропорциональный среднему расстоянию между белками. На рис.17 показано его изменение в зависимости от концентрации NaCl. Можно выделить три диапазона концентраций NaCl, в которых поведение d_1/d кардинально изменялось. Эти изменения достаточно легко интерпретировать с использованием фазовой диаграммы (рис.8), которая адекватно описывает раствор лизоцима. Так, в диапазоне до 0,15 М NaCl происходит постепенное разрушение структурной организации, вероятно представленной «низкосолевыми» кластерами (олигомерами) белка. Здесь много общего с раствором САЧ (рис.10). От 0,3 М до 1,5 М NaCl напротив, видна существенная разница с раствором САЧ.

Дело в том, что лизоцим, в отличие от альбумина, легко кристаллизуется, поэтому в этой области образовывались зародыши и микрокристаллы белка, визуально заметные на 4 сутки. Расстояние между молекулами белка при этом сокращается (рост d_1/d). Высокая скорость зародышеобразования объясняется близким расположением спинодали на фазовой диаграмме белка. Поскольку спинодаль с ростом концентрации соли поднимается по оси температур и приближается к температуре эксперимента, усиливается рост флуктуаций концентрации молекул белка. В этом случае возрастает вероятность флуктуаций, достаточных для образования зародыша кристалла.

При 3 М NaCl мгновенно появился белый преципитат белка, который за 4 суток не изменился. Образец, соответствующий 3 М концентрации NaCl, уже попадает в область спинодали (рис.8), так как критическая концентрация NaCl для высаливания 35 мг/мл

лизоцима соответствует 1,6 М соли. Однако при этом образуется не кристалл, а вязкий гель, о чем свидетельствует резкий рост времени корреляции вращения метки при относительно большом расстоянии между макромолекулами белка (рис.17). Образование геля в этой области фазовой диаграммы также отмечено в работе (Dumetz et.al.2008). Хотя это явление довольно слабо исследовано, можно предположить, что адсорбированные ионы электролита играют здесь немаловажную роль. Если молекулы белка с адсорбированными на поверхности ионами формируют кластер, то ионы оказываются в среде с пониженной диэлектрической проницаемостью. Из-за избыточного роста электростатической свободной энергии структура белка будет подвергаться денатурационным изменениям. Это может приводить как к их последующей агрегации, так и к полимеризации. Возможно, в этом заключен механизм возникновения геля лизоцима, поскольку ионы Cl^- достаточно прочно связаны с белком (Retailleau et.al., 1997).

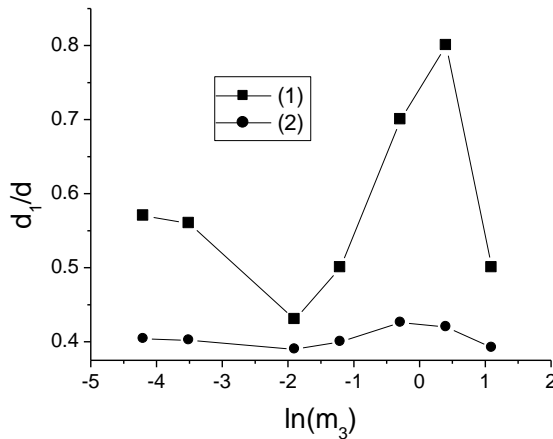


Рис.17 Зависимость параметра d_1/d от концентрации NaCl (M) как $\ln(m_3)$ при значении СВЧ мощности 12,6 мВт - (1) и 0,6 мВт - (2). Погрешность измерений входит в размер символа.

Таким образом, на примере водно-солевых растворов лизоцима с использованием метода ЭПР спиновой метки и соответствующих теоретических подходов показано существование ряда структурно-динамических состояний раствора белка, связанных с взаимодействием белок-растворитель и сопряженных с возникновением сложных надмолекулярных, в том числе и кристаллических структур.

Для белковых кристаллографов важно, что значения второго вириального коэффициента взаимодействия можно использовать в качестве критерия для облегчения поиска условий кристаллизации белка. Развиваемый в работе подход обнаруживает взаимосвязь этого коэффициента с параметрами системы z и v и позволяет установить пределы его изменения. Существует аналитическое выражение для коэффициента взаимодействия B в виде (Edsall et.al., 1950).

$$B = \frac{1000}{2M_2^2} \left(\frac{z^2}{2m_3} + \beta_{22} - \frac{\beta_{23}^2}{2 + \beta_{33}m_3} m_3 \right) \quad (26)$$

Здесь первое слагаемое – Доннановский член, β_{22} – коэффициент активности белка, зависящий от его концентрации и формы. Он имеет положительное значение в случае асимметричных молекул, но в случае сильно заряженных молекул и взаимодействия белка с солью им можно пренебречь. Третье слагаемое характеризует взаимодействие белка с электролитом и имеет отрицательное значение. Здесь $\beta_{23} = (-v/2m_3)(2 + \beta_{33}m_3)$, а $\beta_{33}m_3 = \Delta$. Учтем, что в суперкритической (тройной) точке, где спинодаль и бинадаль вырождаются в одну линию, пересекающую границу твердой фазы, выполняется условие $(m_2/m_3) = 2/v$. Подставив это значение в уравнение (13), получим: $\Delta = 2v^2/(z^2 - v^2)$. Тогда уравнение (26) вблизи этой точки, в пренебрежении β_{22} и с учетом соответствующих выражений, будет выглядеть как:

$$B = \frac{1000}{4M_2^2 m_3} \left\{ z^2 \frac{(z^2 - 2v^2)}{z^2 - v^2} \right\}. \quad (27)$$

Отсюда следует, что приближение к фазовому переходу жидкость-твердое тело характеризуется отрицательными значениями коэффициента взаимодействия и может происходить в узком диапазоне изменения его величины, определяемом вариациями параметров:

$$v^2 < z^2 < 2v^2. \quad (28)$$

В таблице 2 представлены рассчитанные по уравнению (27) значения B для лизоцима, $M_2 = 14000$, для концентраций NaCl 2% и 7%, и ряда значений pH. Значения v (как правило, это анионы для 1:1 электролита) брались с учетом условия (28), но при этом предполагалось, что с ростом концентрации NaCl значение v может возрастать. Как видно из таблицы, рассчитанные величины располагаются в относительно узком диапазоне значений и близки к экспериментальным (Guo et.al., 1999) (B табл.2 они приведены в скобках). Однако из ур.(27) следует, что не потенциал взаимодействия белок-белок определяет знак и величину этого коэффициента, а взаимодействие с ионами электролита.

Таблица 2. Расчет значений коэффициента взаимодействия для лизоцима

Заряд белка z	2% NaCl		7% NaCl	
	v , число Cl^-	$B \times 10^4$, mol мл/г ²	v , число Cl^-	$B \times 10^4$, mol мл/г ²
9 (pH 5.4)	7	-1.9 (-2.8)	8	-2.4
10 (pH 5.0)	8	-3.0 (-2.9)	9	-3.5
11 (pH 4.6)	8	-0.6 (-1.7)	10	-4.9
13 (pH 4.0)	10	-2.9 (0.1)	12	-5.0 (-7.4)

Далее в Главе 7 на основе особенностей фазовой диаграммы модельной системы вода-белок-соль (рис.5) обсуждаются механизмы мгновенной регуляции ионно-осмотического гомеостаза висцеральных жидкостей, а на основе обобщенной ФД (рис.8) механизмы возможного эволюционного происхождения регуляторных явлений в цитоплазме в ответ на изменение физико-химических условий среды, известных как неспецифический адаптационный синдром клеточной системы (НАСКС).

Наличие в модельной системе вода-белок-соль фазового перехода 1 рода, заканчивающегося критическим переходом, предполагает существование петли Ван-дер-Ваальса (рис.5). При этом в качестве метастабильных состояний в квазиравновесии со старой фазой возникают кластеры новой фазы, которые последовательно трансформируются по мере изменения состава вплоть до макроскопического фазового превращения. При этом, согласно правилу Максвелла, химический потенциал воды системы остается постоянным, пока поддерживается квазиравновесие мономер \leftrightarrow кластер. В то же время динамическое состояние макромолекул в кластере и в растворе могут различаться, хотя в среднем баланс стабилизирующих и дестабилизирующих структуру белка сил будет поддерживаться на некотором стационарном уровне. Это обеспечивает одновременно и быструю регуляцию и относительную стабильность функции в целом. Квазиравновесие мономер \leftrightarrow кластер предлагается рассматривать как квазиравновесие двух псевдофаз воды, участвующей в гидратации мономеров белка и кластеров белка. Эти псевдофазы находятся в равновесии с объемной водой раствора как с третьей фазой, не участвующей в критическом переходе. В критической точке в водной части системы наблюдается критический фазовый переход двух типов гидратации, соответствующих мономерам и динамическим кластерам. Таким образом, получает подтверждение гипотеза (Дудолоадов, Тинчер, 1971) о существовании структурно-температурного оптимума гомеостаза системы (норма), сопряженного с непрерывным фазовым переходом в поверхностном слое воды молекул белка, в наибольшей степени приспособленного к

регуляции. В данном случае регуляция возникает как термодинамические следствия близости критического фазового перехода (Юркин, 1991). Основные проявления этих следствий заключаются в неравномерном и селективном распределении компонент системы на пути к критической точке (например, распределение Na^+ и K^+ между фазами) и универсальная растворимость компонент раствора в области критической точки.

Выход системы под действием физико-химических факторов среды из состояния «нормы» (фазовый переход) является «стрессом». Как следует из диаграммы на рис.8, при повышении температуры, но прежнем составе системы, может нарушаться квазиравновесие белок \leftrightarrow кластер и устанавливается однофазная мономерная форма структурной организации раствора белка. При этом теряется способность к осмотической регуляции (зона выше кривой растворимости). При понижении температуры ниже некоторого предела и том же составе система также теряет способность к осмотической регуляции, поскольку оказывается в неустойчивой области фазовой диаграммы внутри спинодали. При этом в ней идут процессы спинодального распада, завершающиеся образованием новых фаз, обогащенных белком, либо кинетически стабилизированных, но термодинамически неравновесных состояний – геля (Dumetz et.al. 2008).

Таким образом, структурно-температурный оптимум гомеостаза является особенностью макромолекулярной системы, находящейся вблизи термодинамического равновесия, элементы которой обладают фазообразующими свойствами по отношению к растворителю, а структурированность возникает вследствие специфического проявления метастабильности (кластеризации) в многокомпонентных системах. Реализация этого состояния не требует затрат метаболической энергии, так как соответствует относительному минимуму химического потенциала воды. Такие системы могли оказаться объектом эволюционного отбора. Так, механизм аллостерической регуляции ферментативной активности олигомерных белков изначально мог иметь в основе динамическое равновесие мономер-кластер, а существование расклинивающего давления между элементами надмолекулярных структур могло реализоваться в способности сократительных белков генерировать силу при изменении степени полимеризации.

Из термодинамической теории критических и закритических фазовых переходов известно (Семенченко, 1962), что сильное развитие флуктуаций в системе позволяет ей в течение некоторого времени сохранять свой состав и частично структуру при относительно резком изменении внешних воздействий, при этом слабая реакция обусловлена малостью кинетических коэффициентов. Такие мезофазы слабо проводят тепло, вязкие, самодиффузия в них замедляется. Можно предположить, что в процессе добиологической эволюции одним из критериев отбора была способность растворов полипептидов и полинуклеотидов переходить в закритическое состояние или в состояние спинодального распада. В этом состоянии гигантских флуктуаций концентрации можно было «пережить» действие неблагоприятных факторов, таких, как резкие скачки температуры, давления, солености без потери состава, а потом возвращаться в исходное или близкое к нему структурное состояние с оптимизированным значением химического потенциала воды. При этом давление отбора могло быть направлено на подбор полипептидов и нуклеотидов (и катализаторов), способных к быстрым процессам де(полимеризации), поскольку при этом и вся система при изменении внешних условий быстро возвращается к квазиравновесному состоянию мономер \leftrightarrow кластер.

На современном этапе биологического развития могла сохраниться эта реликтовая способность химического этапа эволюции, естественно, усовершенствованная в процессе биологической эволюции. Возможно, что «память» об этом естественном процессе проявляется в современных условиях в форме НАСКС (Браун, Моженок, 1987). Можно предположить, что основная задача НАСКС состоит в том, чтобы в стрессовой ситуации за счет частичной потери клеточного содержимого перевести межклеточную среду в

новое изотоническое состояние, подобное квазиравновесию мономер-кластер, которое в силу своих термодинамических особенностей не позволит клеткам допустить избыточных потерь внутриклеточного материала.

С другой стороны, в основе явлений НАСКС лежит способность цитоплазматических белков к обратимым денатурационным изменениям (Александров, 1985) и/или полимеризации. Однако механизм денатурационных изменений до сих пор остается неизвестен. В свете излагаемых нами представлений (уравнение 22), под денатурационными можно представлять изменения структуры белков в кластере - микрофазе, вызванные присутствием на поверхности белков, образующих кластер, адсорбированных ионов электролита, которые по каким-либо причинам оказались не способными к десорбции при образовании кластера. Уменьшение диэлектрической проницаемости среды будет приводить к росту свободной энергии системы из-за усиления электростатических взаимодействий, которые могут «взрывать» белок (Финкельштейн, Птицын, 2002). В свою очередь, денатурированные белки в кластере могут обладать способностью к полимеризации, а полимеры – к последующей нуклеации.

В настоящее время установлено, что гомогенная нуклеация полимеров HbS является двухступенчатым процессом (Galkin et.al., 2007). Первым шагом является обратимый L-L фазовый переход, создающий высококонцентрированного аморфного предшественника для полимеризации, а разбавленная фаза сильно влияет на последующую кинетику нуклеации полимеров. Термодинамические и кинетические характеристики L-L перехода сильно зависят от наличия специфических контактов молекул гемоглобина разных форм (HbS, HbC, HbA) и их конформаций (Chen et.al., 2004; Pan et.al., 2007). Подобный механизм сейчас интенсивно обсуждается в связи с проблемой формирования амилоидных фибрилл, лежащей в основе многих конформационных заболеваний (Киселев, 2005). В связи с этим можно высказать гипотезу, что загрузка белков ионами, к примеру, тяжелых металлов, не способных к десорбции при формировании кластеров, может провоцировать кластерную денатурацию белков по прионному типу, их последующие полимеризацию и нуклеацию фибрилл.

ОСНОВНЫЕ ВЫВОДЫ:

1. Разработан термодинамический подход, позволяющий строить фазовые диаграммы системы вода-белок-соль. При этом установлено соотношение между критическим составом системы, соответствующим индуцируемому солью фазовому переходу между двумя типами белковых кластеров, температурой и физико-химическими характеристиками белка и соли, включающими заряд белка, число адсорбированных ионов и их активность. Тем самым открывается возможность целенаправленно регулировать фазовое состояние этой системы и предсказывать структурно-динамическое поведение ее компонент в заданных точках фазовой диаграммы.
2. Впервые в аналитическом виде получены коэффициенты, характеризующие уравнение высаливания белка электролитом и показывающие роль адсорбированных ионов в этом процессе. При этом, зная концентрацию белка в разбавленной и концентрированной фазах, на основе уравнения высаливания можно определить число адсорбированных ионов соли.
3. Показано, что методом ЭПР спиновых меток и зондов можно регистрировать индуцируемые температурой и солью фазовые переходы в растворах глобулярных белков, получая информацию как о взаимодействии белок-белок по изменению среднего расстояния между белками, так и о внутримолекулярной конформационной динамике, которая сопряжена с межмолекулярным взаимодействием. В этом заключается преимущество данного метода по сравнению с другими.
4. Обнаружено неспецифическое стабилизирующее влияние гидратированных наночастиц углерода на белки, в основе которого может быть как механизм их взаимной адсорбции,

так и коллоидная природа и структурированность дисперсий углерода, обусловленная дальнедействующими силами. Это влияет на характеристики фазовых переходов на фазовой диаграмме раствора белка. Кроме того, биологическая активность наночастиц может проявляться в их способности катализировать окислительно-восстановительные реакции в модельных и живых системах, во многом благодаря общим особенностям гидратации наночастиц и белков.

5. Фазовый переход типа жидкость-жидкость, сопряженный с образованием микронных капель концентрированных белковых растворов и кластеров белка, предложено рассматривать как фазовый переход воды, участвующей в гидратации мономеров и кластеров белка. Это позволяет именно к воде применить основные термодинамические следствия, обусловленные существованием критических фазовых переходов и связанные с универсальной растворяющей способностью воды в критической точке, (что способствует образованию ненативных белковых конформаций), неравномерным и селективным перераспределением компонент (ионов соли) между фазами по пути к критической точке, пониженной термодинамической устойчивостью околокритических фаз.

6. Предлагается механизм срочной регуляции осмотического равновесия и неспецифических физико-химических регуляторных реакций на уровне микроокружения макромолекул в ответ на изменение состава или температуры, основанный на существовании кластерной организации и фазовых переходов в растворе белка.

ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Kaivarainen A.I., **Rozhkov S.P.**, Franek F., Olshovska Z. Intramolecular mobility in antiDNP antibodies and their Fab fragments. ESR spectra of the complexes with a spin-labelled hapten in H₂O-D₂O mixtures at various temperatures // **Folia biologica.**- 1983.- V.29.- P.209-220.
2. **Рожков С.П.**, Кяйвярайнен А.И. Изучение гибкости молекул сывороточного альбумина методом спиновой метки. // **Биофизика.**- 1985.- Т.30.- №5.- С.772-776.
3. Кяйвярайнен А.И., **Рожков С.П.** Влияние температуры и связывания с ионами меди на подвижность субъединиц спин- меченых окси и метгемоглобина.// **Биофизика.**- 1987.- Т.32.- С.407-412.
4. Кяйвярайнен А.И., **Рожков С.П.** Определение времен корреляции молекул лизоцима и лизоцима в комплексе с ингибитором методом спиновых меток.// **Биофизика.**- 1987.- Т.32.- №1.- С.22-25.
5. **Рожков С.П.** Спинодаль в концентрированных водно- солевых растворах молекул сывороточного альбумина // **Журн. физической химии.**- 1988.- Т.62.- С.1925-1928.
6. **Рожков С.П.** Стабилизация белка сахарозой по данным метода спиновой метки // **Биофизика.**-1991.- Т.36.- В.4.- С.571-576.
7. **Рожков С.П.** Изменение знака расклинивающего давления в гидратной оболочке молекул сывороточного альбумина в зависимости от концентрации соли по данным метода спиновой метки.// **Коллоидный журнал.**- 1992.- Т.54.- №6.- С.64-69.
8. **Рожков С.П.** Механизм взаимодействия молекул сывороточного альбумина с полиэтиленгликолями по данным метода спиновой метки // **Журн. физической химии.**- 1991.- Т.65.- №8.- С.2204-2209.
9. **Рожков С.П.**, Борисова А.Г. Фазовый переход критического типа в водно- белковой матрице молекул сывороточного альбумина, индуцируемый солью.// **Биофизика.**- 1993.- Т.38.- В.4.- С.590-595.
10. **Рожков С.П.** Проблемы “нормы” в молекулярных модельных эколого- биохимических системах.// Теоретические аспекты экологической биохимии.Сб.статей./ Петрозаводск: ВИзд-во Кар.НЦ РАН.- 1993.- С.195-203.
11. **Рожков С.П.** Критические явления в водно- солевых растворах биополимеров // **Журн. физической химии.** -1996.- Т.70.- №11.- С.1982-1986.
12. **Рожков С.П.** Стабилизация альбумина CaCl₂ и MgCl₂ регулируемым взаимодействием макромолекул: исследование методом спиновой метки. // **Биофизика.**- 1997.- Т.42.- В.5.- С.1020-1028.

13. **Рожков С.П.**, Горюнов А.С. Белок- белковые взаимодействия в водно- солевых растворах молекул сывороточного альбумина по данным метода спиновой метки.// Структура и динамика молекулярных систем (ред. Скирда и др.). Сб.статей /Йошкар- Ола, Казань, Москва:- 1997.- С.52-56.
14. **Рожков С.П.**, Горюнов А.С. Кластеры макромолекул в недонасыщенных растворах биополимеров.// Структура и динамика молекулярных систем. Ч.1.Сб.статей./ Йошкар- Ола, Казань, Москва:- 1998.- С.140-144.
15. **Рожков С.П.**, Горюнов А.С. Удельная поверхностная энергия и кластерная организация молекул сывороточного альбумина.// Структура и динамика молекулярных систем.- Вып.6 Сб.статей/ Казань: Изд-во УНИПРЕСС.- 1999.- С.197-200.
16. **Rozhkov S.P.**, Goryunov A.S. Effects of inorganic salts on the structural heterogeneity of serum albumin solutions // **Eur. Biophys. J.**- 2000.- V.28.- N8.- P.639-647.
17. **Рожков С.П.**, Горюнов А.С., Суханова Г.А., Рожкова Н.Н., Андриевский Г.В. Молекулярные аспекты биологической активности водной молекулярно- коллоидной системы гидратированных фуллеренов в модельных растворах биополимеров.// Фуллерены и фуллереноподобные структуры. Сб. статей/ Минск: Изд-во БГУ.- 2000.- С.140-147.
18. **Рожков С.П.**, Горюнов А.С. Индуцируемое фуллеренами взаимодействие ионов электролита с молекулами белка по данным метода спиновой метки // Структура и динамика молекулярных систем. Вып.7. Сб. статей./ М.: Изд-во ИФХ РАН.- 2000.-С.286-289.
19. **Рожков С.П.** Трехкомпонентная система вода- биополимер-ионы как модель молекулярных механизмов осмотического гомеостаза // **Биофизика.**- 2001.- Т.46.- №1.- С.53-59.
20. **Рожков С.П.**, Горюнов А.С. Кластеры белков как кластеры “скрытой” фазы и влияние состава раствора на их размер // Структура и динамика молекулярных систем. Сб. статей.Вып.8,Ч.2/ Йошкар-Ола.- 2001.- С.124-127.
21. Горюнов А.С., **Рожков С.П.** Взаимодействие доменов сывороточного альбумина в присутствии декстрана и фуллерена по данным ДСК// Структура и динамика молекулярных систем. Сб. статей.Вып.8,Ч.2/ Йошкар-Ола.- 2001.- С.231-234.
22. **Рожков С.П.**, Горюнов А.С. Влияние гидратированных фуллеренов C60 на удельную поверхностную энергию водных растворов сывороточного альбумина // **Журн. физ. химии.**- 2002.- Т.76.- №7.- С.1303-1309.
23. **Rozhkov S.P.**, Goryunov A.S., Sukhanova G.A., Borisova A.G. Rozhkova N.N. and Andrievsky G.V. Protein interaction with hydrated C60 fullerene in aqueous solutions // **Biochem.Biophys. Res.Comm.**-2003.-V.303.-P.562-566.
24. **Рожков С.П.** Фазовая диаграмма системы, моделирующей водно-солевой раствор биополимера. // Структура и динамика молекулярных систем. Вып.Х Часть 2/ Казань.-2003.- С.197-201.
25. **Рожков С.П.** Критические фазовые переходы в системе вода-биополимер-электролит и проблемы кристаллизации белка // **Журн.физ.химии.**- 2004.-Т.78.- №11 -С.1962-1966.
26. **Рожков С.П.** Критические явления, фазовые равновесия и структурно-температурный оптимум гомеостаза в модельной системе вода-биополимер-электролит// **Биофизика.**- 2005 - Т.50.- в.2.- С.115-122.
27. **Rozhkov S.P.** Phase transition and precrystallization processes in a water-protein –electrolyte system // **J.Cryst.Growth.**- 2004.- V.273.- P.266-279.
28. **Рожков С.П.**, Горюнов А.С. Определение удельной поверхностной энергии гидратной оболочки белка методом ЭПР с использованием спиновой метки // **Биофизика.**- 2006.- Т.51.- №2.- С. 236-241.
29. **Рожков С.П.** Растворимость и фазовые переходы в системе вода-белок-соль // **Биофизика.**- 2006.- Т.51.- С.822-826.
30. **Рожков С.П.**, Суханова Г.А., Горюнов А.С., Борисова А.Г., Рожкова Н.Н. Стабилизация мембранных белков эритроцитов наночастицами углерода // Углеродные наночастицы в конденсированных средах(под ред. П.А.Витязя и др.)/ Минск: - 2006.- С.212-214.
31. **Rozhkov S.P.**, Goryunov A.S., Rozhkova N.N. EPR spin-probe study of carbon nanoparticles hydration properties in aqueous dispersions // In: Hydrogen materials science and chemistry of carbon nanomaterials (Vezirogly T.E. et.al, Eds.)/ Springer Science+Bisuness Media B.V.- 2007.- P.539-544.