

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ПУШКИНСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

Пеньков Никита Викторович

Молекулярная организация водных растворов биомолекул

Специальности: 1.5.2 – Биофизика, 1.1.10 – Биомеханика и биоинженерия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени

доктора физико-математических наук

Москва 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	6
ВВЕДЕНИЕ.....	7
Актуальность темы исследования.....	7
Научная новизна.....	8
Степень разработанности темы.....	9
Цель диссертационного исследования.....	11
Объект и предмет исследования.....	11
Теоретическая и практическая значимость работы.....	11
Методология и методы диссертационного исследования.....	12
Положения, выносимые на защиту.....	13
Степень достоверности и апробация результатов.....	13
Личный вклад автора.....	14
Внедрение результатов работы.....	15
Публикации.....	15
Структура и объём диссертации.....	15
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	16
1.1. Типы структур в водных растворах.....	16
1.2. Гидратация биомолекул.....	18
1.3. Структура биомолекул в водном окружении.....	30
1.4. Характеристики гетерогенности растворов биомолекул.....	32
1.5. Естественная гетерогенность водных растворов – нанопузырьки.....	34
1.6. Методы исследования молекулярной организации водных растворов биомолекул.....	36
1.6.1. Краткий обзор методов.....	36
1.6.2. ИК спектроскопия собственного излучения.....	42
1.6.3. Метод динамического светорассеяния.....	45

1.6.4. Специфика терагерцовой спектроскопии при исследовании водных растворов.....	52
1.6.5. Терагерцовая спектроскопия временного разрешения.....	54
1.6.6. Модели эффективной среды применительно к растворам биомолекул.....	58
ГЛАВА 2. АНАЛИЗ ГИДРАТАЦИИ БИМОЛЕКУЛ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ С ПОМОЩЬЮ ТЕРАГЕРЦОВОЙ СПЕКТРОСКОПИИ ВРЕМЕННОГО РАЗРЕШЕНИЯ	62
2.1. Алгоритм исследования гидратации биомолекул в водных растворах.....	62
2.2. Определение спектров комплексной диэлектрической проницаемости водных растворов в ТГц диапазоне.....	62
2.3. Расчёт спектров диэлектрической проницаемости водной фазы растворов биомолекул.....	66
2.4. Разработка модели эффективной среды для растворов фибриллярных биомолекул.....	67
2.4.1. Базовые теоретические соотношения.....	67
2.4.2. Двухфазный диэлектрик с нитевидными включениями.....	68
2.4.3. Применимость полученных соотношений для переменных полей.....	71
2.4.4. Экспериментальная проверка модели эффективной среды на примере раствора ДНК.....	71
2.4.5. Применимость модели эффективной среды для растворов фибриллярных биополимеров.....	73
2.5. Расчёт параметров диэлектрической проницаемости воды в ТГц диапазоне	73
2.6. Интерпретация параметров в терминах межмолекулярной структуры и динамики воды.....	77
2.7. Расчёт количества свободных молекул воды в водных растворах.....	79
2.8. Гидратация белков.....	81
2.8.1. Материалы и методы.....	82

2.8.2. Характеристики гидратации белка в различных конформациях.....	83
2.9. Гидратация фосфолипидов.....	90
2.9.1. Материалы и методы.....	91
2.9.2. Зависимость характеристик гидратных оболочек липосом от фазового состояния фосфолипида.....	94
2.10. Гидратация АТФ.....	102
2.10.1. Материалы и методы.....	102
2.10.2. Характеристики гидратных оболочек АТФ в зависимости от связывания с ионами Mg^{2+}	105
2.11. Гидратация ДНК.....	110
2.11.1. Материалы и методы.....	111
2.11.2. Особенности гидратных оболочек ДНК в релаксированной форме...113	
2.11.3. Влияние ионов Mg^{2+} и K^{+} на гидратацию ДНК.....	117
2.11.4. Кооперативные эффекты гидратации ДНК.....	120
2.12. Гидратация сахаров.....	121
2.12.1. Материалы и методы.....	121
2.12.2. Общие характеристики гидратации сахаров.....	124
2.12.3. Гидратные оболочки моносахаридов.....	128
2.12.4. Сравнение гидратации моно- и полисахаридов.....	131
ГЛАВА 3. ИНФРАКРАСНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ СОБСТВЕННОГО ИЗЛУЧЕНИЯ ПРИМЕНИТЕЛЬНО К ИССЛЕДОВАНИЮ СТРУКТУРЫ БИОМОЛЕКУЛ В РАСТВОРАХ.....	134
3.1. Принцип и устройство измерения спектров собственного излучения образца с использованием холодного фона.....	134
3.1.1. Устройство измерительной системы.....	134
3.1.2. Вакуумирование спектрометра.....	135
3.1.3. Измерительная кювета для жидких образцов.....	137

3.1.4. Подбор толщины слоя образца.....	138
3.1.5. Коррекция спектров.....	138
3.2. Физическая природа явления собственного излучения на примере воды.....	139
3.3. Примеры применения ИК спектроскопии собственного излучения для исследования структуры биомолекул в растворах.....	141
3.4. Преимущества метода ИК спектроскопии собственного излучения перед абсорбционной ИК спектроскопией.....	144
ГЛАВА 4. АНАЛИЗ ГЕТЕРОГЕННОСТИ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ БИОМОЛЕКУЛ МЕТОДОМ ДИНАМИЧЕСКОГО СВЕТОРАССЕЯНИЯ.....	149
4.1. Приборы и методы.....	149
4.2. Примеры применения метода динамического светорассеяния для определения распределений по размерам биомолекул в растворах. Учёт артефактов, связанных с наличием нанопузырьков.....	150
4.3. Физические характеристики нанопузырьков в водных растворах.....	159
4.4. Влияние механического воздействия на характеристики гетерогенности водных растворов биомолекул.....	163
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	166
ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ.....	168
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	170
ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ В ЖУРНАЛАХ, ИНДЕКСИРУЕМЫХ В БАЗАХ ДАННЫХ WEB OF SCIENCE, SCOPUS	202
ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ НА МЕЖДУНАРОДНЫХ И ВСЕРОССИЙСКИХ НАУЧНЫХ КОНФЕРЕНЦИЯХ.....	208
ПАТЕНТЫ НА ИЗОБРЕТЕНИЯ.....	209
БЛАГОДАРНОСТИ.....	210

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

DMPC – 1,2-димиристоил фосфатидилхолин

DRPC – 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфахолин

THz-TDS – терагерцовая спектроскопия временного разрешения

АТФ – аденозин-5`-трифосфат

АЧТ – абсолютно-чёрное тело

БСА – бычий сывороточный альбумин

ГГц – гигагерцовый

ДСР – метод динамического светорассеяния

ДП – диэлектрическая проницаемость

ИК – инфракрасный

ТГц – терагерцовый

ВВЕДЕНИЕ

При подготовке данного раздела диссертации использованы материалы семинара ИТЭБ РАН, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, автором были апробированы основные результаты, положения и выводы его исследования: Пеньков Н.В. Молекулярная организация водных растворов биомолекул. Автореф. дисс. д.ф.-м.н. (ПРОЕКТ) <https://iteb.ru/news/zasedanie-sektsii-teoreticheskaya-biofizika-i-mode-202205/>

Актуальность темы исследования

К настоящему моменту накоплен большой объем знаний о молекулярной организации водных растворов небольших молекул и ионов. При этом растворы, содержащие биологические макромолекулы, изучены явно недостаточно. Для такой системы можно выделить следующие основные направления исследования: гидратные оболочки биомолекул; структура биомолекул в водном окружении; характеристики гетерогенности раствора биомолекул.

В растворе биомолекулы, взаимодействуя с водой близлежащего слоя, изменяют её структурно-динамические характеристики. Эту водную фазу с изменённым состоянием обычно называют гидратной оболочкой. Несмотря на длительный период изучения гидратации биомолекул разными методами, многое ещё не ясно. Один из последних импульсов развития данного направления обусловлен появлением метода терагерцовой (ТГц) спектроскопии. ТГц диапазон по частотам, временам, и энергиям идеально соответствует межмолекулярной структуре и динамике воды, что делает данный метод чрезвычайно эффективным. Было введено понятие динамической гидратной оболочки, толщина которой для биомолекул достигает нескольких нанометров. В живых системах это сопоставимо со средним расстоянием между биомолекулами, что может играть важную роль в регуляции их взаимодействия, но об этом почти ничего не известно. Отметим, что даже на уровне структурно-динамических характеристик указанные гидратные оболочки изучены мало. Поэтому актуальным является развитие эффективных подходов на основе ТГц спектроскопии с целью получения качественно новых данных о гидратации биомолекул.

Хорошо известно, что не только биомолекулы модифицируют прилегающий слой воды, но и наоборот. Закономерности модификации структуры биомолекул под влиянием гидратации до сих пор не полностью ясны. Для изучения структуры биомолекул применяют различные методы, каждый из которых даёт информацию, полезную для понимания общей картины. Один из наиболее информативных методов, позволяющий анализировать структурные характеристики биомолекул в нативном состоянии в растворе – инфракрасная (ИК) спектроскопия. При этом обращает на себя внимание, что одна из разновидностей ИК спектроскопии – спектроскопия собственного излучения или эмиссионная спектроскопия – практически не применяется. Данный метод удаётся успешно использовать только при сильном нагреве образцов, что неприменимо для растворов биомолекул. Развитие данного типа

спектроскопии с устранением необходимости нагрева объекта и иных типов агрессивного возбуждения может расширить методический арсенал исследования структуры биомолекул в растворах, что актуально для молекулярной биофизики и биоинженерии.

Гетерогенность водных растворов биомолекул также является фундаментальным аспектом их молекулярной организации, поскольку в зависимости от условий биомолекулы в растворе могут находиться в форме мономера или в виде различных молекулярных комплексов. Основопологающей характеристикой гетерогенных систем является распределение по размерам. По мере агрегации, мицеллообразования, межмолекулярного и внутримолекулярного связывания биомолекул меняются их распределения по размерам, анализ которых может предоставить важную информацию об изменениях, происходящих с биомолекулами в растворе. Однако имеются фундаментальные особенности водных растворов, приводящие к появлению артефактов в измеряемых характеристиках гетерогенности, что особенно критично при малых концентрациях биомолекул. Так, вода обладает естественной гетерогенностью, обусловленной наличием пузырьков газа субмикронных размеров (нанопузырьков). Этот фактор часто служит источником неоднозначности анализируемых характеристик гетерогенности растворов биомолекул, особенно с применением оптических методов. Поэтому разработка подходов для обнаружения фракции нанопузырьков в распределениях по размерам биомолекул является актуальной задачей.

Таким образом, для изучения молекулярной организации водных растворов биомолекул, следует рассматривать следующие три взаимосвязанных аспекта: (1) гидратация биомолекул, (2) строение биомолекулы в водном окружении, (3) характеристики гетерогенности раствора. Такой комплексный подход позволит углубить понимание процессов, лежащих в основе взаимодействий биомолекул. В молекулярной биологии, биохимии и некоторых других разделах науки основным источником знаний являются исследования *in vitro*, которые проводят с биомолекулами в водных растворах. В связи с этим развитие новых исследовательских подходов и получение новых фундаментальных знаний о водных растворах биомолекул на всех их уровнях молекулярной организации является актуальным научным направлением.

Научная новизна

Разработан новый подход для изучения гидратации любых типов биомолекул в растворах на основе ТГц спектроскопии временного разрешения. Это позволило выявить отличия молекулярных релаксационных параметров гидратных оболочек белка в различных конформациях. Обнаружены особенности гидратации фосфолипидных липосом в зависимости от их фазового состояния, причём оказалось, что наиболее сильные изменения гидратации

происходят в результате предперехода, а не основного перехода фосфолипида. Показано, что влияние липосомы на воду простирается на расстояние более 5 нм от её поверхности. Получены новые данные о строении гидратной оболочки АТФ, демонстрирующие существенные отличия в зависимости от связывания АТФ с ионом Mg^{2+} . Впервые показано, что гидратная оболочка ДНК отличается от невозмущённой воды наличием трёх фракций молекул воды: более сильно связанные, фракция с большим количеством свободных молекул и фракция с большим числом водородных связей. Показаны различия влияния ионов Mg^{2+} и K^+ на гидратацию ДНК. Получен ряд новых данных, вскрывающих корреляции между структурой сахаров и характеристиками их гидратных оболочек. Показано, что гидратация ДНК выражена сильнее, чем у отдельных нуклеотидов, тогда как гидратация полисахаридов, наоборот, слабее, чем у моносахаридов.

Впервые получена теоретическая модель эффективной среды для двухфазных диэлектриков с нитевидными включениями, применяемая для анализа водных растворов протяжённых биополимеров в терагерцовой и более низкочастотной области.

Описан новый метод ИК спектроскопии собственного излучения с использованием холодного фона. Он не требует какого-либо возбуждения образца и может использоваться для неинвазивного структурного анализа биомолекул в водных растворах.

Впервые предложен алгоритм, позволяющий идентифицировать наличие фракции нанопузырьков, как правило, присутствующих в водных растворах биомолекул, и создающих затруднения в интерпретации распределений по размерам.

Степень разработанности темы

В середине XX века сформировалось современное представление о молекулярной организации воды и водных растворов. К наиболее фундаментальным публикациям на эту тему можно отнести: «Структура воды и ионных растворов» (Берналь и Фаулер, 1934 г.) и «Структура водных растворов электролитов и гидратация ионов» (Самойлов, 1957). В ряду классических трудов следует отметить также работы «Статистическая теория жидкостей» (Фишер, 1961) и «Кинетическая теория жидкостей» (Френкель, 1975). При рассмотрении структуры водного раствора важно учитывать его динамические свойства на различных временных интервалах. Для каждого метода характерен определённый временной интервал анализа молекулярной структуры, что может приводить к отличиям в интерпретации результатов.

Гидратные оболочки биомолекул изучаются достаточно давно, однако основная масса данных относится к первичным гидратным оболочкам, ограничивающихся единичными молекулами воды в ближайшем контакте с биомолекулой. С развитием в 2000-х годах метода

ТГц спектроскопии и применением её для исследования гидратации биомолекул, к гидратным оболочкам стали относить не только ближайшие один-два слоя молекул воды, но и более отдалённые молекулы воды. Главным образом, эти работы ограничены изучением гидратации белков и сахаров на основе анализа спектров поглощения. Одним из основных недостатков применяющихся подходов является слишком упрощённое рассмотрение спектральных данных. Во-первых, современные модификации ТГц спектроскопии (ТГц спектроскопия временного разрешения) позволяют определять не только спектры поглощения, но и спектры комплексных диэлектрических проницаемостей водных растворов, информативность которых намного выше. Во-вторых, полноценное изучение гидратации биомолекул в растворе требует вычитания вклада биомолекул из экспериментального спектра диэлектрической проницаемости их раствора. Для этого необходимо использовать модели эффективной среды, однако такой подход практически не применялся. Отметим, что существующие модели эффективной среды (Максвелла Гарнетта, Бруггемана и некоторые другие) применимы для анализа растворов компактных биомолекул, при этом отсутствуют модели для растворов протяжённых биополимеров. Настоящее диссертационное исследование направлено на выработку теоретических и экспериментальных подходов, преодолевающих указанные недостатки и позволяющих получать надёжную информацию о гидратации биомолекул, в том числе, протяжённых биополимеров на основе ТГц данных.

Для изучения структуры биомолекул, в том числе в растворах, достаточно широко применяют метод ИК спектроскопии. Существуют различные модификации данного метода: поглощение, зеркальное отражение, нарушенное полное внутреннее отражение, диффузное отражение, фотоакустическая спектроскопия и другие. Однако одна из разновидностей данного метода – ИК спектроскопия собственного излучения, до сих пор практически не применяется для анализа молекулярной структуры. В литературе описано развитие этого подхода и показаны его преимущества перед классическим вариантом спектроскопии пропускания, заключающиеся в больших достижимых значениях чувствительности и сигнал/шум. Однако известные варианты реализации этого метода сопряжены с созданием таких условий (нагрев, мощное облучение), при которых невозможно нативное состояние биомолекул. Диссертационное исследование направлено на разработку соответствующей модификации метода и его апробацию на примере анализа структурных характеристик различных биомолекул в растворах.

Анализ биомолекул в растворах на основании их распределений по размерам является одним из стандартных подходов описания состояния биомолекул. Это позволяет делать множество выводов о взаимодействиях биомолекул друг с другом и их конформационных изменениях. Известно также, что водные растворы практически всегда содержат

самопроизвольно образующиеся нанопузырьки. При этом их вклад в определяемые распределения по размерам биомолекул обычно не учитывается. Вопросы образования нанопузырьков, их стабилизации, влияние на это растворённых газов и различных ионов изучены неполно. Диссертационное исследование также направлено на исследование этих вопросов.

Цель диссертационного исследования – разработка и применение новых подходов для комплексного изучения молекулярной организации водных растворов биомолекул по трём основным направлениям: гидратация биомолекул, структура биомолекул в водном окружении, характеристики гетерогенности растворов биомолекул.

Для достижения цели были поставлены и решены следующие **задачи**:

- 1) Разработка подходов на основе терагерцовой спектроскопии временного разрешения для исследования гидратации биомолекул в водных растворах.
- 2) Теоретическая разработка модели эффективной среды, применимой для разделения вкладов протяжённых биополимеров и водной фазы в спектры комплексной диэлектрической проницаемости растворов.
- 3) С использованием результатов пп. 1 и 2 определение характеристик гидратных оболочек биомолекул (белков, фосфолипидов, АТФ, ДНК, моно- и полисахаридов) в водных растворах.
- 4) Развитие метода ИК спектроскопии собственного излучения, не нуждающегося в возбуждении образца, и проверка его применимости для определения структурных характеристик различных биомолекул в водных растворах.
- 5) Анализ распределений по размерам различных биомолекул и нанопузырьков в водных растворах при различных условиях методом динамического светорассеяния и выработка алгоритма, позволяющего разделять их вклады.

Объект и предмет исследования

Объектом исследования являются водные растворы биомолекул (белков, фосфолипидов, АТФ, ДНК, моно- и полисахаридов). Предметом исследования являются структурные характеристики биомолекул, их гидратных оболочек, характеристики гетерогенности растворов.

Теоретическая и практическая значимость работы

Разработана теоретическая модель эффективной среды для двухфазного диэлектрика с нитевидными включениями. Данная модель может применяться для анализа комплексных

диэлектрических проницаемостей водных растворов протяжённых биополимеров (нуклеиновых кислот, фибриллярных белков и фибриллярных белковых агрегатов, полисахаридов) в ТГц диапазоне, а также при более низких частотах.

Описана методология на основе ТГц спектроскопии временного разрешения, позволяющая изучать гидратацию биомолекул в растворах и интерпретировать полученные данные с использованием параметров межмолекулярной структуры и динамики воды.

Описанная модификация метода ИК спектроскопии, позволяющая измерять характеристические спектры собственного излучения изучаемых образцов, расширяет возможности применения данного метода с использованием стандартных спектрометров с Фурье-преобразованием. Спектроскопия собственного излучения в ряде случаев обладает большей чувствительностью по сравнению с абсорбционным аналогом. Для измерения спектров не требуется возбуждение образца, что имеет значение для чувствительных к различным внешним факторам (в том числе, ИК излучению) объектов исследования. Метод может применяться для анализа структуры биомолекул в растворах.

Метод динамического светорассеяния широко применяется для изучения биомолекул в водных растворах, однако при этом возможно наличие артефакта, обусловленного присутствием нанопузырьковой фазы. Предложенный в работе алгоритм позволяет идентифицировать упомянутый артефакт.

Методология и методы диссертационного исследования

В рамках данной диссертационной работы использовались три основных экспериментальных метода:

- 1) Метод терагерцовой спектроскопии временного разрешения – для изучения гидратации биомолекул в водных растворах;
- 2) ИК спектроскопия с Фурье-преобразованием в режиме измерения поглощения, а также разработанный в данном исследовании подход измерения собственного ИК излучения – для определения структурных характеристик биомолекул в растворах;
- 3) Метод динамического светорассеяния – для анализа распределений по размерам биомолекул и нанопузырьков в растворах.

Также использовались вспомогательные методы: вискозиметрия – для корректного учёта вязкости образцов при их исследовании методом динамического светорассеяния; вакуумирование – для высушивания плёнок биомолекул и дегазации растворов; лазерная сканирующая микроскопия в режиме отражения – для измерения толщин плёнок биомолекул;

дифференциальная сканирующая калориметрия – для определения температур фазовых переходов фосфолипидов в растворе; измерение pH и dc-проводимости.

Кроме того, на основании базовых закономерностей электродинамики сплошных сред теоретически разработана модель эффективной среды, применимая для анализа растворов протяжённых биополимеров, которая использовалась при анализе их гидратации.

Положения, выносимые на защиту

1) Разработанная теоретически модель эффективной среды может применяться для водных растворов протяжённых биополимеров при анализе их комплексных диэлектрических проницаемостей в области ТГц частот.

2) Разработан подход на основе ТГц спектроскопии временного разрешения, предназначенный для исследования гидратации биомолекул в водных растворах в терминах межмолекулярной структуры и динамики воды. С его помощью были установлены новые характеристики гидратации следующих типов биомолекул: белка в различных конформациях; фосфолипидных липосом в различных фазовых состояниях; АТФ и комплекса Mg·АТФ; ДНК в релаксированной форме в воде и при наличии ионов Mg^{2+} и K^+ ; моно- и полисахаридов.

3) Разработан метод эмиссионной ИК спектроскопии с холодным фоном, не требующий какого-либо возбуждения исследуемых образцов. Данный подход является альтернативой классической абсорбционной ИК спектроскопии, позволяя проводить молекулярный анализ, в том числе, биомолекул в растворе. Метод покрывает область основных частот молекулярных колебаний и в несколько раз превосходит традиционную ИК спектроскопию поглощения по чувствительности. Не требуя источника возбуждения, метод может применяться для анализа любых образцов, в том числе и чувствительных к ИК излучению.

4) При измерении распределений по размерам биомолекул в водных растворах методом динамического светорассеяния возможно появление артефактной фракции с субмикронными размерами, относящейся к нанопузырькам, обычно присутствующим в водных растворах. Впервые предложен алгоритм, позволяющий определить принадлежность данной фракции к нанопузырькам на основе сравнения её интенсивности рассеяния с интенсивностью рассеяния растворителя.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов диссертационного исследования подтверждается использованием проверенных методов исследования и теоретических подходов, а также их множественными публикациями в рецензируемых журналах, входящих в международные

системы Web of Science и Scopus. Все эксперименты проводились в достаточном количестве независимых повторов; использовались необходимые контроли. Анализ данных проводился с применением адекватных методов статистической обработки. Статистическая значимость отличий параметров оценивалась по не перекрытию 95% доверительных интервалов средних. Результаты работы представлены на 13 конференциях (13 тезисов, 5 устных докладов) и на семинаре кафедры биофизики физического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Личный вклад автора

Все результаты, изложенные в диссертации, получены автором лично. Описанные в диссертации идеи экспериментальных и теоретических работ, а также методологии исследований полностью принадлежат автору диссертации. Пробоподготовка большинства растворов биомолекул для исследований методом динамического светорассеяния, описанных в Главе 2, была проведена с помощью д.б.н. К.Н. Белослудцева (ИТЭБ РАН), к.б.н. А.Г. Бобылёва (ИТЭБ РАН). Образцы ДНК для исследования, описанного в разделе 2.9, были приготовлены и охарактеризованы д.б.н. М.Г. Шараповым (ФИЦ ПНЦБИ РАН).

Вклад соискателя в работы, опубликованные в соавторстве (согласно списку «Публикаций автора по теме диссертации в журналах, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI») характеризуется следующим образом. В работах [1-3, 7-10, 17-18, 21-23, 28, 41, 49] вклад автора является основополагающим; идеи исследования, получение результатов, анализ данных и подготовка статей к публикации были реализованы автором лично. В работе [43] вклад автора составляет 1/2 и заключается в написании 50% обзорной статьи. В работе [40] вклад автора составляет 1/2 и заключается в проведении исследования гидратных оболочек диклофенака натрия в водных растворах методом НПВО-ИК спектроскопии. В работах [5, 11-14, 20, 24-26, 29-30, 33-38, 44-45, 47-48, 50-54] вклад автора составляет 1/3 и заключается в проведении экспериментов с использованием метода динамического светорассеяния, анализе полученных данных распределений по размерам биомолекул и нанопузырьков. В работах [32, 39] вклад автора составляет 1/3 и заключается в проведении физико-химического анализа растворов пероксиредоксинов методами динамического светорассеяния и дифференциальной сканирующей калориметрии. В работах [4,6,31] вклад автора составляет 1/5 и заключается в проведении исследований методами оптической и лазерной сканирующей микроскопии клеток, пузырьков и образующихся кристаллов в исследуемых образцах. В работе [15] вклад автора составляет 1/5 и заключается в проведении анализа полученных данных по ИК и КР спектроскопии водных растворов ацетата европия, интерпретации данных. В работах [16, 19, 27, 42, 46] вклад автора составляет 1/5 и заключается в проведении исследований методом динамического светорассеяния размерных

характеристик белков и наночастиц при различных модифицирующих воздействиях. Автором проведена значительная работа над текстом статей, с последующей перепиской с редакторами и рецензентами.

Внедрение результатов работы

По результатам работы получены 3 патента РФ на изобретения. Часть результатов, описанных в диссертационной работе, были получены в рамках исследования по проекту Фонда перспективных исследований «Разработка технологии криоконсервации тканей и органов», 2015-2018 гг.

Публикации

Всего опубликовано 59 статей. По теме диссертации опубликовано всего 54 статьи, из них 54 статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах Web of Science, Scopus, RSCI.

Структура и объём диссертации

Диссертация состоит из введения, четырёх глав, заключения, выводов и списка литературы. Отдельно приводится список публикаций автора. Работа изложена на 210 страницах, включает 55 рисунков и 11 таблиц. Библиография включает 555 источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

При подготовке данного раздела диссертации использованы материалы семинара ИТЭБ РАН, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, автором были апробированы основные результаты, положения и выводы его исследования: Пеньков Н.В. Молекулярная организация водных растворов биомолекул. Автореф. дисс. д.ф.-м.н. (ПРОЕКТ) <https://iteb.ru/news/zasedanie-sektsii-teoreticheskaya-biofizika-i-mode-202205/>

1.1. Типы структур в водных растворах

Водный раствор представляет собой систему, в которой реализуется большинство процессов, относящихся к молекулярной биофизике, биохимии, молекулярной биологии и многим другим естественнонаучным дисциплинам, связанным с изучением биомолекулярных взаимодействий.

Под структурой водных растворов исходно понимали структурно-динамические характеристики воды на межмолекулярном уровне. Полноценное рассмотрение этого вопроса складывается из двух аспектов: пространственного и временного. Это означает, что, говоря о какой-либо структуре в плане пространственном, необходимо уточнять на каких временах она реализуется. Такой подход является вполне естественным в физике конденсированного состояния [1,2]. Можно выделить три основных типа структуры воды в зависимости от временного масштаба [2,3]: мгновенная ($\ll 10^{-13}$ с), не обладающая упорядоченностью, которая может исследоваться с помощью молекулярного моделирования; колебательно-усреднённая ($10^{-13} - 10^{-11}$ с), обладающая ближним порядком, которая не учитывает молекулярных колебаний, а рассматривает их усреднённые положения; и диффузионно-усреднённая ($\gg 10^{-11}$ с), которая описывается функциями радиального распределения и может быть получена, например, с помощью рентгеноструктурного анализа.

Колебательно-усреднённые типы структуры воды являются наиболее важными для изучения, поскольку именно на этих временах реализуются межмолекулярные взаимодействия в водных растворах. Наиболее выраженной характеристикой молекулярного взаимодействия в водных растворах является водородное связывание [4]. Молекула воды способна образовывать до четырёх, а иногда и более того [5], водородных связей. Характерные времена флуктуаций водородных связей в воде порядка 0.1-1 пс [6–8]. После получения молекулой воды энергии активации, происходит разрыв всех водородных связей и молекула может совершить поворот или трансляционное перемещение [9–12]. Среднее время жизни молекулы воды между двумя указанными событиями составляет 1-10 пс [11–13] и с ростом температуры имеет тенденцию к уменьшению. Сама переориентация или смещение молекулы воды происходит за время порядка 0.1 пс [9]. Динамика молекул в жидкой воде также может рассматриваться с использованием понятия времени оседлой жизни [2] без явного учёта водородного связывания.

Похожий подход использовал О.Я. Самойлов [14], анализируя степень связанности молекул воды в растворах по их трансляционной подвижности.

Очень важным фактором, определяющим связанность (или подвижность) молекул воды является гидратация. В водных растворах реализуется воздействие растворённых молекул (или ионов) на молекулы воды. Это приводит к изменению молекулярной организации воды в близлежащем слое, который обычно называют гидратной оболочкой. В зависимости от распределения заряда в растворённых молекулах или ионах, близлежащие молекулы воды могут становиться как более, так и менее связанными. На основании этого принципа гидратацию простых ионов делят на положительную и отрицательную. Ионы с положительной гидратацией иногда называют космотропами, а с отрицательной – хаотропами. Ионы могут быть выстроены в ряды Хофмейстера [15,16], по принципу усиления или ослабления их взаимодействия с молекулами воды (рисунок 1.1).



Рисунок 1.1. Ряды Хофмейстера катионов и анионов, построенные по принципу усиления гидратации.

Интересно, что изначально в 1888 году Ф. Хофмейстером был построен ряд анионов [17] по принципу ослабления их высаливающей способности белковых растворов. Впоследствии было установлено, что эти ряды имеют более общий смысл, связанный с воздействием на структуру воды [18].

Подобные ряды однозначно могут быть сформированы для небольших ионов по принципу изменения их плотности поверхностного заряда. Чем меньше радиус иона и больше заряд, тем больше плотность поверхностного заряда и тем сильнее он структурирует воду вокруг себя. Более сильное структурирование в данном контексте означает более сильное ион-дипольное взаимодействие и большее гидратационное число. Однако в случае, когда речь идёт о сложных молекулах, таких как крупные органические или тем более биологические макромолекулы, то взаимодействие воды с ними вряд ли может быть однозначно охарактеризовано как космотропное или хаотропное. Разные участки поверхности таких молекул могут проявлять разные типы взаимодействия с водой, что создаёт уникальную для

данной молекулы гидратную оболочку со своими структурно-динамическими характеристиками.

Взаимодействие биологических молекул с водой обычно приобретает чрезвычайно сложный характер, обладающий, в том числе, и биологическим смыслом. Структура биомолекул в нативном состоянии, реализующимся обычно в водном окружении, может радикально отличаться от структуры в дегидратированном виде, а способность биомолекул реализовывать свои биологические функции находится в прямой зависимости от гидратации [19–21]. При изучении молекулярной организации водных растворов не менее важным, чем структура самой воды, является вопрос структуры растворённых молекул, ведь они являются частью раствора. В итоге для полноценного анализа строения растворов биомолекул необходимо учитывать взаимодействие двух указанных типов структур.

Поскольку водные растворы биомолекул являются гетерогенными системами, их важной характеристикой является пространственное распределение растворённого вещества в объёме или, другими словами, характеристики гетерогенности раствора. Биомолекулы в растворе могут находиться как в мономолекулярной форме, так и в виде молекулярных комплексов. Могут наблюдаться эффекты агрегации, полимеризации, мицеллообразования, ковалентного или водородного межмолекулярного связывания, гидрофобные типы взаимодействия между биомолекулами и внутри крупных биополимеров. Все эти явления приводят к изменению характеристик гетерогенности раствора.

Очевидно, что все три выделенные аспекта молекулярной организации водных растворов биомолекул – гидратация, структура биомолекул в водном окружении и характеристики гетерогенности – взаимосвязаны. Наиболее полное описание строения растворов биомолекул возможно только при учёте всех перечисленных аспектов. Однако такой обобщённый подход к анализу водных растворов биомолекул до сих пор не рассматривался в литературе.

1.2. Гидратация биомолекул

Наличие биомолекул в водном растворе приводит к изменениям в структуре, динамике и энергетическом состоянии близлежащего слоя воды, который называют гидратной оболочкой. Вопрос гидратации биомолекул является наименее изученным и наиболее сложным в контексте исследования строения водных растворов. На самом деле, проблема ещё глубже: на сегодняшний день нельзя даже сказать, что мы вполне понимаем молекулярную организацию чистой воды, не возмущённой наличием посторонних молекул. Получено множество надёжных

экспериментальных данных, однако их надёжность нивелируется наличием разных интерпретаций, порой совершенно не согласующихся друг с другом. Перечислим основные типы молекулярной динамики чистой воды, реализующиеся на разных временных масштабах, чтобы потом, опираясь на эту информацию, можно было предметно сравнивать невозмущённую воду с водой в гидратных оболочках. Поскольку динамика молекулярных процессов, в большей мере, анализируется различными спектроскопическими методами, часто для их описания используют не шкалу времени, а обратную величину – частоту.

Самый медленный молекулярный процесс, зарегистрированный для чистой воды, реализуется за времена порядка пикосекунд, что по частотной шкале соответствует десяткам ГГц. Этот процесс называют дебаевской релаксацией. Наиболее признанная в мировой науке интерпретация данного процесса – это ориентационная релаксация молекул воды, связанных водородными связями, либо находящихся в поляризующем кулоновском поле ионов [11,12,22]. Связанная молекула «ожидает» энергию активации из теплового пула окружающего раствора, получив её, разрывает водородные связи, и совершает ориентационное движение, после чего образует водородные связи с другими молекулами воды. Время дебаевской релаксации описывается формулой:

$$\tau = \tau_0 * \exp\left(\frac{E}{kT}\right), \quad (1.1)$$

где E – энергия активации, требующаяся для разрыва всех связей молекулы воды, kT – характерная тепловая энергия. Для молекул воды в гидратных оболочках, как правило, время дебаевской релаксации увеличивается, что свидетельствует о большей энергии связи с молекулами растворённого вещества по сравнению с межмолекулярным связыванием воды. По изменению времени релаксации и ширине его распределения можно делать количественные выводы об энергиях гидратации.

Была высказана и альтернативная интерпретация данного релаксационного процесса в работах А.А. Волкова с соавторами [23–32], позволяющая удовлетворить всем математическим зависимостям, полученным из экспериментальных данных. Авторы выдвинули гипотезу, в основе которой лежит газо-твёрдотельная модель Френкеля, дополненная взаимопревращением молекул и ионов, предполагающая в воде смешанное трансляционно-колебательное движение молекул. Согласно данной концепции дебаевская релаксация обусловлена не ориентационной динамикой молекул воды, а трансляционным перемещением заряженных ионов H_3O^+ и OH^- . Данная гипотеза, хотя и удовлетворяет экспериментальным данным по электродинамике воды,

испытывает трудности при рассмотрении с точки зрения термодинамики и не является общепризнанной.

Особо стоит упомянуть, что в области дебаевской релаксации воды при наличии ионов, кроме дипольных потерь, обусловленных процессом дебаевской релаксации воды, существенный вклад в диэлектрическую проницаемость оказывают ионные потери, связанные с ионной проводимостью. При этом спектральные характеристики могут существенно отличаться для ионов с положительной и отрицательной гидратацией. В работе А.К. Лященко с соавторами [33] было показано, что, например, для основного внутриклеточного иона K^+ и основного внеклеточного иона Na^+ наблюдаются разнознаковые коэффициенты, описывающие как поглощение, так и излучение водных растворов в ГГц диапазоне. Ион K^+ обуславливает пониженное излучение, по сравнению с водой, а ион Na^+ , наоборот, повышенное.

Ещё один релаксационный процесс воды, зарегистрированный около 0.5 ТГц, обычно относят к ориентационной релаксации свободных или слабо связанных молекул воды [34–38]. В литературе его иногда называют высокочастотной релаксацией воды («fast relaxation»). Данная полоса надёжно регистрируется как область дисперсии диэлектрической проницаемости и иногда используется для оценки количества свободных молекул воды в растворе [39–42].

Для полноты рассмотрения приведём альтернативные интерпретации. В упомянутых выше работах А.А. Волкова данный процесс соотносят с миграцией протона между молекулами воды. Ещё один подход описания межмолекулярной динамики воды был представлен в цикле работ А.К. Лященко с соавторами [43–48]. В указанных работах ориентационная динамика молекул воды описывается набором ограниченных ротаторов, характеризующихся дипольным моментом, моментом инерции, угловым диапазоном качаний, временем жизни ротатора и долей молекул воды, относящихся к каждому типу динамики. В рамках этого представления авторам не удалось подобрать такие параметры ротаторов, при которых можно было бы описать высокочастотную релаксационную полосу. Однако оказалось, что указанный процесс хорошо может быть описан ориентационным колебанием димера из молекул воды.

Кроме двух указанных релаксационных процессов у воды и водных растворов выделяют также две колебательные полосы: очень слабая около 1.5 ТГц и сильная около 5 ТГц. Основная интерпретация – это поперечные и продольные трансляционные колебания молекул воды, связанных водородными связями [49–54]. В рамках концепции А.А. Волкова полоса около 5 ТГц очень хорошо количественно объясняется при рассмотрении процесса осцилляций ионов гидроксония (H_3O^+). Работы А.К. Лященко с соавторами сопоставляют этому процессу

вращательно-трансляционное колебание молекулы воды относительно оси, проходящей через два собственных протона молекулы, участвующие в водородном связывании с соседними молекулами. Также была описана версия [55], согласно которой эта полоса соответствует достаточно сложной вращательно-поступательной комбинации молекулярных движений.

В настоящей диссертационной работе для интерпретаций спектральных данных, относящихся ко всем описанным типам молекулярной динамики воды, используется наиболее широко признанные интерпретации, согласно которым: дебаевская релаксационная полоса около 20 ГГц описывает процесс ориентационной релаксации связанных молекул воды; высокочастотная релаксационная полоса около 0.5 ТГц обусловлена ориентационной релаксацией свободных (не связанных ни одной водородной связью и не находящихся в сильном кулоновском поле ионов) молекул воды; колебательная полоса около 5 ТГц относится к межмолекулярным продольным колебаниям молекул воды, связанным водородными связями.

Ещё более высокочастотный процесс межмолекулярной динамики воды – либрационные колебания, наблюдаемые около $500-700 \text{ см}^{-1}$ [49,56]. Это поворотные колебания молекул воды, связанных водородными связями, без их разрыва. На ещё бóльших частотах уже не наблюдается межмолекулярная динамика воды, а начинают проявляться внутримолекулярные колебания: деформационные, валентные и их суммы и обертона. Данные колебания не имеют отношения к структуре воды, под которой обычно понимают межмолекулярный уровень организации. Однако внутримолекулярные частоты, как известно [49], чувствительны к межмолекулярному связыванию. По сдвигу внутримолекулярных частот часто определяют связанность молекул воды в разных системах методами ИК спектроскопии. Но заметим, что делается это, как правило, за неимением более прямых и чувствительных методов спектроскопии в терагерцовой или гигагерцовой области.

Характеристики указанных типов межмолекулярной динамики воды зависят от физических факторов, таких как температура и давление, и конечно от химических, таких как взаимодействие с другими молекулами. Наличие биомолекулы в водном растворе приводит к изменению в структуре, динамике и энергетическом состоянии воды в гидратной оболочке. Имеется огромное количество данных, свидетельствующих о том, что гидратация играет существенную роль в стабилизации структуры биомолекул, необходимой для реализации их биологических функций [57–66]. В ряде работ даже использовали термин «биологическая вода» [65,67–70], подразумевая, что гидратная оболочка в некотором смысле является частью биомолекулы, поскольку взаимодействие биомолекул реализуется почти всегда в водном

окружении и первый контакт происходит именно на уровне гидратных оболочек. Очевидно также, что вода гидратной оболочки значительно влияет на лабильность, структуру и энергетику биомолекул.

Если говорить о физических свойствах, то гидратная оболочка существенно отличается от невозмущённой воды. Например, сжимаемость воды гидратных оболочек биомолекул [71] оказывается на 15-35% меньше, а плотность на 5-30% больше [72–74], чем у невозмущённой воды. Такая плотность воды, самопроизвольно формирующаяся вблизи биомолекул, в чистой воде возможна лишь при давлении в несколько тысяч атмосфер.

Перечислим основные факторы, способствующие столь сильной модификации свойств воды, относящейся к гидратным оболочкам биомолекул:

1. Образование водородных связей между молекулами воды и поверхностными группами биомолекул. Энергия и распределённость формирующихся водородных связей с биомолекулами отличаются от собственной структуры воды, что приводит к её нарушению.
2. Влияние поверхностных зарядов биомолекулы на молекулы воды через кулоновские и вандер-ваальсовы взаимодействия. Поскольку поверхность биомолекул имеет, как правило, сложную зарядовую структуру, то и влияние на воду достаточно сложное и высокоспецифичное для каждой биомолекулы.
3. Стерические ограничения вблизи биомолекул. Из-за этого фактора молекулы воды, контактирующие с поверхностью биомолекул, не имеют естественного для воды соседства с другими молекулами воды и естественных степеней свободы: трансляционной, релаксационной и колебательной.
4. Помимо трёх выше перечисленных факторов, которые можно назвать «статическими», выделим ещё один фактор – динамический, который является наиболее сложным для изучения. Биомолекулы в воде проявляют определённую динамику поверхностных групп или даже в масштабе всей молекулы. Вода тоже обладает собственной межмолекулярной динамикой. Очевидно, что оба типа динамики, биомолекул и воды, воздействуют друг на друга и приходят в некоторое взаимное согласие на многопорядковой шкале по времени. Один из наиболее ярких эпитетов, описывающих эту взаимосогласованность, был приведён в заголовке статьи [75] под названием: «Терагерцовый танец воды с белками».

Исследование гидратации биомолекул ведётся достаточно давно и получено множество данных для каждого типа биологических молекул. Можно привести ряд крупных обзоров, а

также обширных экспериментальных и теоретических работ, посвящённых изучению гидратации белков [19,61,80–89,62,63,65,66,76–79]. В обзорах [90,91] были показаны множественные взаимосвязи между структурой гидратной оболочки белка с его молекулярной стабильностью и функциями. В работах [60,92–95] описаны данные, демонстрирующие взаимосвязь коллективной динамики белка и его гидратной оболочки. То есть речь идёт не о статическом влиянии гидратации на структуру белка, а о влиянии на его динамику. В одной из работ [60] на примере различных молекулярных процессов миоглобина показано, что они могут быть разделены на два типа: независимые и зависимые. Второй тип процессов, как например связывание CO, принципиально зависит от флуктуаций растворителя. Описаны синфазные температурные зависимости скоростей этих процессов и флуктуаций воды в гидратной оболочке. Авторы даже используют термин «рабство белка», подчёркивая главенствующую роль именно воды в определённых биологических процессах белкового взаимодействия.

Если говорить о временном аспекте гидратации, то в большинстве случаев было обнаружено наличие замедленных молекул воды в гидратных оболочках белка [13,96,97]. Большинство работ по теоретическому рассмотрению этого вопроса подтверждают тенденцию к замедлению динамики молекул воды [76–79,98,99]. Однако в некоторых случаях, как например, при исследовании гидратации F-актина [100] и некоторых других белков [67,95], помимо замедленных, были обнаружены и более быстрые молекулы воды, названные авторами «гипермобильными». То есть молекула белка в некоторых случаях способна не только более сильно связывать, но и высвобождать из естественной сетки водородных связей молекулы воды. Также в нашей работе [101] было обнаружено, что даже для одного и того же белка в разных конформациях может реализовываться как первый, так и второй случай.

Как правило, распределение релаксационных времён молекул воды в гидратных оболочках различных белков лежит от единиц до десятков-сотен пикосекунд. Но в некоторых случаях регистрируются ультрабыстрые молекулы воды (порядка 1 пс), либо ультрамедленные (наносекунды [102,103]), обоснованных объяснений наличия которых пока нет. Распределение времён релаксации молекул воды в гидратных оболочках зависит от гидрофобно-гидрофильных взаимодействий, топологии зарядовой поверхности и расстояния до соответствующих поверхностных химических групп белка [21]. В некоторых случаях удавалось также регистрировать молекулы воды с характерными временами динамики 0.1-10 мкс [103,104]. Эти молекулы воды, по-видимому, находятся внутри белковой глобулы.

Как пример сложности динамики воды в гидратных оболочках молекул белка можно привести совокупность данных, собранных в [105], для двух близких по строению молекул белка: китовый миоглобин и лошадиный миоглобин (таблица 1.1).

Таблица 1.1 Времена релаксации молекул воды в гидратных оболочках китового и лошадиного миоглобина [105].

Белок	Времена релаксации молекул воды, пс				
	Китовый миоглобин	8	40	10 000	74 000
Лошадиный миоглобин	5	10	250	3 000	29 000

Несмотря на близость структур двух указанных в таблице 1.1 молекул, временные характеристики динамики воды в гидратных оболочках отличаются существенно.

Нуклеиновые кислоты имеют не менее сложную структуру, чем молекулы белка, и, следовательно, не менее сложную организацию гидратных оболочек. В работах [19,65,111–116,66,81,82,106–110] имеются обширные данные о гидратации нуклеиновых кислот. В работах [115,117–119] описано множество корреляций динамики воды со структурой и динамикой ДНК.

В работе W. Saenger с соавторами [120] описаны сайты первичной гидратации молекул ДНК и их гидратационные числа. Показано, что наиболее сильно гидратируются фосфатные группы, тогда как на фуранозу и азотистые основания приходится лишь малая часть гидратных молекул. При этом возможно формирование гидратных мостиков между кислородами соседних фосфатов. В работе демонстрируется, что структура ДНК прямо зависит от содержания воды. В случае снижения гидратации молекулы ДНК ниже критического уровня (порядка 20 молекул воды на нуклеотид) происходят структурные переходы В→А или В→Z, обусловленные процессом обобществления молекул воды фосфатными группами, поскольку формы А и Z более экономичны в плане требуемого количества молекул воды для гидратации. При этом за пределами первичной гидратной оболочки рассмотрение становится намного сложнее.

Также как и в случае гидратных оболочек белка, вода в гидратных оболочках ДНК проявляет тенденцию к замедлению в довольно широком диапазоне характерных времён. Но в некоторых случаях также отмечали наличие гипермобильных молекул воды [65,81,117] со временами релаксации порядка 1 пс. Обобщая имеющиеся данные, можно выделить несколько фракций молекул воды в гидратных оболочках ДНК по их характерным временам релаксации: ~ 1 пс, 20-40 пс и 0.3-0.6 нс.

Отдельное внимание многие исследователи уделяли локализации тех или иных фракций молекул воды с характерными релаксационными временами. Множество работ [107,115,118,121–124] демонстрирует, что в желобках молекулы ДНК наблюдается наиболее сильное замедление до субнаносекундных времён. В работах [118,121] показано, что динамика молекул воды в минорном желобке со временами релаксации около 0.6 нс примерно в 2 раза замедленна, по сравнению с гидратной водой в главном желобке (0.3 нс). Также описано примерно двукратное замедление динамики воды в минорном желобке В-ДНК по сравнению с В'-ДНК. В работе [125] был произведён расчёт энтропии воды в желобках молекулы ДНК, и показано большее значение для главного желобка, но значения для воды в обоих желобках существенно меньше, чем в невозмущённой воде. В работе [126] рассматривался вопрос распределения времён жизни молекул воды играющих роль водных мостиков в минорном желобке, и была показана сильная зависимость времени от последовательности нуклеотидов и взаимного расположения сайтов связывания – от 1 до 300 пс.

В работах [127–129] использовался термин «хребет гидратации», описывающий феномен сильно связанной водной структуры в минорном желобке, которая была идентифицирована методами рентгеновской дифракцией и ЯМР. Данный термин подразумевает наличие сильно связанных нескольких слоёв воды в минорном желобке, даже выходящих за пределы сахарофосфатного остова, что сильно отличается от гидратации главного желобка ДНК. В работе [130] продемонстрировано, что хребет гидратации способен стабилизировать ДНК только в В-форме. В статьях [131,132] авторы писали о наличии особого слоя воды в желобках, который разрушается при денатурации ДНК. Они назвали этот слой «струноподобными кластерами». По-видимому, все эти данные подтверждают общий вывод об отличиях строения гидратной оболочки ДНК в зависимости от локализации, в частности о наличии существенно более структурированной воды в минорном желобке.

Отметим, что исследованию гидратации РНК посвящены единичные работы, и те на уровне исследования кристаллов или слабо гидратированных образцов, порядка единиц-десятков молекул воды на нуклеотид [133–137].

Отдельного внимания заслуживает вопрос гидратации аденозин-5'-трифосфат (АТФ). Это молекула, значение которой в биологии трудно переоценить. АТФ является основным и универсальным молекулярным источником энергии в живой клетке. Помимо этого, АТФ участвует в процессах фосфорилирования [138], выступает в роли аллостерического эффектора ряда ферментов [139], является донором аденозина [140]. АТФ выполняет также внеклеточные функции [141], например, в качестве нейромедиатора [142]. Удивительно, но не смотря на

относительную простоту молекулы АТФ и с учётом её значимости, до сих пор нет полного понимания механизмов функционирования АТФ хотя бы на физико-химическом уровне. Наглядным является пример изучения вопроса энергоёмкости фосфатных связей. Значения энергии, высвобождаемой при гидролизе АТФ, определены экспериментально [143], однако теоретической модели, дающей точное количественное описание этого процесса, не существует. Ещё в 1970 г. Р. George [144] показал, что для понимания процесса гидролиза АТФ необходим учёт энергий гидратации. Таким образом, была обозначена важность изучения гидратных оболочек АТФ и продуктов гидролиза. Было проведено множество исследований гидратных оболочек АТФ, используя разные подходы [145–152], но ни один из них не дал полноценного решения упомянутой энергетической проблемы.

Принципиально важным для процессов с участием АТФ является также наличие ионов Mg^{2+} . Известно, что в клетке подавляющее большинство молекул АТФ находится в виде хелатов $Mg \cdot ATP^{2-}$. И именно этот молекулярный комплекс фигурирует практически во всех известных реакциях с участием АТФ. Изучению влияния Mg^{2+} на свойства гидратных оболочек АТФ были посвящены некоторые теоретические работы [146,147,153,154]. В одной из наших работ [155] было установлено, что гидратные оболочки АТФ и $Mg \cdot ATP$ существенным образом отличаются. АТФ демонстрирует искажение структуры воды за счёт связывания молекул воды, а $Mg \cdot ATP^{2-}$, наоборот, способствует упорядочиванию воды в гидратной оболочке.

Изучению гидратации фосфолипидов тоже посвящено немало работ [62,156–161]. В статье [162] проведено изучение гидратации на уровне отдельных молекул фосфолипида, показано образование внутримолекулярных и межмолекулярных водородно-связанных водных мостиков. Поскольку фосфолипиды относятся к типу молекул, формирующих в водных растворах биомолекулярные ансамбли, то наибольший интерес представляет изучение гидратации именно в таком их виде. Липидные бислои могут находиться в разных фазовых состояниях. Некоторые подходы на основе флуоресценции [163,164] и ИК спектроскопии [165] позволяют анализировать гидратацию в глубине гидрофильной поверхности. Проникновение молекул воды внутрь гидрофильной поверхности липосом зависит от плотности их структуры. Таким образом, по анализу гидратации можно определять фазовое состояние фосфолипидных комплексов в интересующих условиях. При этом основная область гидратации это, конечно, гидрофильная поверхность.

Как и в случае других биомолекул гидратные оболочки фосфолипидов содержат несколько фракций молекул воды, отличающиеся по их связанности или подвижности. Основная фракция относится к замедленным молекулам воды [159,166], причём снижение

подвижности тем сильнее, чем меньше соотношение объёма фаз вода/фосфолипид. В работе [167] показано, что в системе вода-фосфолипид можно выделить три фракции воды с отличными характерными временами релаксации: невозмущённая вода, замедленные связанные молекулы воды, и свободные молекулы воды, обладающие более быстрой динамикой, чем в среднем невозмущённая вода. Соотношение указанных трёх фракций зависит от температуры и соотношения объёмов фосфолипида и воды. В работах [168,169] было показано образование нанокластеров, которые формируют молекулы воды в контакте с фосфолипидным бислоем, причём структуры этих кластеров отличаются в зависимости от соотношения вода/липид. Имеется множество работ [163,167,170–175], в которых исследованы особенности гидратации различных модельных липидных мембран в зависимости от их состава, степени гидратации и фазового состояния.

Исследование гидратации сахаров было начато более 100 лет назад [176]. За это время накоплено огромное количество данных. Однако до сих пор многое неясно. Показательным примером является факт того, что в современных работах разных авторов сахара считают либо космотропами [177], либо хаотропами [178], либо обсуждают этот вопрос [179] в рамках научного исследования! Множество накопленных данных о гидратации сахаров изложено в работах [13,39,183–192,41,193,194,42,79,177,179–182].

В работах [195,196] проведён анализ активности воды и рассчитаны гидратные числа множества различных сахаров, и показано, что с ростом концентрации сахара гидратационное число уменьшается. Это связывают с перекрытием гидратных оболочек. В работах [185,193,197–199] проведено исследование свойств гидратной воды в гидратированных плёнках различных полисахаридов. Показаны отличия физических параметров плёнок в зависимости от степени гидратации, наличия различных групп, ионов и заряда полисахаридных цепей.

В работах [13,39,186–188,200–202] при исследовании различных моносахаридов, олигосахаридов и полисахаридов было обнаружено замедление в 2-5 раз гидратных молекул воды, исчисляемых десятками в расчёте на моносахарид. Но при этом, как и в некоторых случаях с белками, фосфолипидами и ДНК, в гидратных оболочках обнаруживается небольшая доля свободных молекул воды. Например, в работе [179] было отмечено, что каждая молекула сахарозы, наряду с существенным замедлением молекул воды в гидратных оболочках, способствует образованию в среднем 1.25 молекул воды в свободном состоянии.

Во многих работах [180,203–208] по изучению молекулярной ориентационной релаксации водных растворов сообщали об особенностях сахаров по сравнению с другими типами химических соединений. Было обнаружено [180,203–206], что для не очень

концентрированных растворов моносахаридов (менее 1-2 М) наблюдается всего одна область дисперсии диэлектрической проницаемости. То есть имеется единственная область времён дебаевской релаксации. При этом по аналогии с другими молекулами, можно было ожидать наличие трёх релаксационных процессов, соответствующих невозмущённой воде, связанной воде и самим молекулам сахара. Указанная особенность объясняется высокой степенью совместимости множества ОН-групп молекул моносахаридов со структурой воды, из-за чего молекулярная динамика системы моносахарид-вода ведёт себя в высокой степени кооперативно. В работе [205] даже демонстрировалось, что гексагональный кластер в решётке льда может быть заменён молекулой глюкозы с небольшим искажением. В работе [204] сравнивали температурные зависимости вязкости и времени релаксации и выявили существенные отличия. Оказалось, что энтальпии активации вязкости и дебаевской релаксации сильно отличаются. Это авторы объяснили тем, что имеются существенные высокочастотные конформационные процессы релаксации самих молекул сахара. Для растворов дисахаридов [180,205,206] наблюдается похожая тенденция распределения времён релаксации, только предельная концентрация, ниже которой регистрируется единственная релаксационная полоса, несколько меньше, порядка 0.5-1 М.

Обобщая, можно сказать, что единственная полоса дебаевской релаксации растворов сахаров наблюдается при выполнении двух условий: не очень высокие концентрации сахара и не очень крупные молекулы сахаров. Для трисахаридов [180,205] и более крупных молекул сахаров при любых ощутимых концентрациях можно видеть три ожидаемые области релаксации. Также с увеличением концентрации моно- и дисахаридов более 1-2 М удаётся выявить второй пик ориентационной релаксации молекулы сахара, а для высоких концентраций все три [206].

Растворы полисахаридов демонстрируют [207,209], помимо двух релаксационных полос воды (невозмущённая и связанная вода), релаксационные полосы связанные с локальным движением их цепей. Например, в работе [208] при изучении циклодекстринов отчётливо выделяли три времени релаксации: 8.5 пс для невозмущённой воды, 20-25 пс для связанной воды; и время 1-2.5 нс, соответствующее вращательной релаксации макромолекулы. Интересные данные были получены о гидратации крупного трёхцепочечного полисахарида шизофиллана [210]. Показано, что имеются три времени релаксации воды в его гидратных оболочках. Данный пример напоминает обсуждаемые выше особенности гидратации ДНК. По-видимому, при достижении некоторых критических размеров макромолекулы начинают проявляться кооперативные эффекты гидратации. То есть молекулы воды, расположенные вдоль определённых систематически расположенных молекулярных групп фибриллярных

структур формируют фракцию гидратной оболочки с характерными типами межмолекулярной структуры и динамики воды.

Отдельным направлением явилось исследование зависимости гидратации сахаров от взаимной ориентации ОН-групп [200,211–215]. Было выявлено, что степень гидратации зависит не только от числа ОН-групп, но и от их взаимной ориентации. То есть изомеры моносахаридов могут сильно отличаться по гидратному числу и степени замедления молекул воды в гидратных оболочках. Это было связано с тем, что расстояние между ОН-группами сахара сопоставимо с расстоянием между ОН-группами молекул воды в невозмущённом состоянии. Возможны ситуации, когда геометрия ОН-групп сахара близко соответствует структуре воды, а возможна ситуация, когда не соответствует вообще. Оказалось, что наиболее важным в этом ключе является взаимное расположение 4-ОН и 2-ОН групп. Моносахариды с аксиальными 2-ОН и 4-ОН группами, как талоза, наилучшим образом соответствуют структуре воды, поэтому гидратные оболочки наименьшим образом отличаются от невозмущённой воды. Моносахариды с экваториальной 4-ОН группой и произвольной ориентацией 2-ОН группы несколько хуже соответствуют структуре воды. И наконец, моносахариды с аксиальной 4-ОН и экваториальной 2-ОН, как галактоза, наихудшим образом соответствует структуре воды, и проявляют наибольшие отличия строения гидратных оболочек от невозмущённой воды. Это выражается, например, в наибольшем отличии сжимаемости или заторможенности молекул воды гидратных оболочек. Описанные особенности гидратации оказались верны и для гексоз, и для пентоз.

В литературе присутствует направление, которое привлекало большое внимание исследователей на стыке физической химии и биологии, о роли гидратации сахаров в их биопротекторной функции [41,187,194,202,216–219]. Многие пытались понять, чем принципиально отличается, например, трегалоза от других моно- и дисахаридов по своим характеристикам взаимодействия с водой, что делает её намного более эффективной для криосохранения биообъектов. Рассматривались две противоположные версии, что сахар связывает воду и не даёт ей сформировать лёд, либо, наоборот, разрушает структуру воды, что также не позволяет формироваться льду вблизи молекулы сахара. К сожалению, эти попытки до сих пор не увенчались успехом, хотя работы продолжаются.

Подавляющее большинство работ изучения гидратации проводилось со слабо гидратированными биомолекулами в виде плёнок, порошков или замороженных образцов, либо теоретическими компьютерными методами. В результате большинство выводов делалось о гидратации, относящейся к одному-двум слоям сильно связанных молекул воды. При этом

очевидно, что полноценные проявления гидратации должны наблюдаться при изучении растворов с избытком воды.

В последние пятнадцать лет, с развитием новых экспериментальных методов термин гидратная оболочка был существенно пересмотрен. Было показано, что протяжённость гидратных оболочек биомолекул оказывается существенно больше. Например, по оценкам [220–222] протяжённости гидратных оболочек белков составляют 1-5 нм. В нашей работе оценка протяжённости гидратных оболочек липосом в одной из фаз дала неожиданно большую величину – более 5 нм. То есть осязаемое влияние биомолекул на воду может распространяться на расстояния в десятки раз большие, чем размер молекулы воды. В некоторых работах [75,220,223,224] даже использовался особый термин, характеризующий эти протяжённые гидратные оболочки – «динамическая гидратная оболочка» или «глобальная гидратация». Этот термин, употребляемый разными авторами, подчёркивает, что речь идёт не только о молекулах воды с сильно изменённой энергетикой (вымороженные молекулы, первичная гидратная оболочка) в непосредственной близости от гидратируемой молекулы, а также о молекулах, которые подвержены несколько изменённой динамике на достаточно больших расстояниях.

Значение столь протяжённой гидратной оболочки для биомолекулярных взаимодействий мало изучено, но может быть огромным. Можно отметить лишь, что расстояния, на которые распространяется влияние биомолекулы в растворе, соизмеримы или даже больше среднего расстояния между биомолекулами в живой клетке. В качестве примера биологической значимости динамических гидратных оболочек можно привести работы [223,225], где утверждается, что они могут определять криопротекторные свойства некоторых белков. Чем более протяжённой является динамическая гидратная оболочка белка, тем более выражена его антифризная способность.

1.3. Структура биомолекул в водном окружении

Хорошо известно, что молекулы воды, обладая дипольным моментом и способностью к водородному связыванию, интенсивно взаимодействуют с молекулами растворённого вещества. Даже сам факт высокой диэлектрической проницаемости воды определяет многие особенности водных растворов, в том числе растворимость веществ. Для многих биологических макромолекул вода является сильнейшим фактором в формировании специфической структуры, при которой возможно осуществление её биологической функции [57,59,226].

Отличия структуры биомолекул в отсутствии и присутствии воды могут быть огромны. Например, при уменьшении гидратации ниже определённых значений в молекуле ДНК происходят принципиальные структурные изменения [227–230]. W. Saenger для этого явления даже сформулировал «концепцию гидратной экономии» [120], согласно которой при дефиците воды молекула ДНК перестраивается таким образом, чтобы сохранить максимальную гидратацию фосфатов за счёт обобществления имеющихся молекул воды. Только при наличии достаточного количества воды, более 10-20 молекул на нуклеотид [110], ДНК приобретает естественную форму, в которой она существует в живой природе.

Клеточные мембраны, главным образом состоящие из фосфолипидов, также своей стабильностью и функциональностью обязаны эффектам взаимодействия молекул фосфолипидов с водой. Только в водной фазе возможна самосборка устойчивого липидного бислоя. Данный процесс обязан гидрофобным взаимодействиям, благодаря которым гидрофобные хвосты жирных кислот фосфолипидов группируются друг напротив друга, избегая контакта с водой, а гидрофильные головки образуют поверхности, контактирующие с водной фазой. Характеристики структур фосфолипидных макрокомплексов зависят от ряда факторов. Например, при изменении концентрации липидов, температуры, рН, ионной силы, давления возможны фазовые переходы между множеством структурных типов [231]. Одних только ламеллярных фаз выделяют не менее 8, наиболее известными из которых являются: гель, риппл-гель, жидкий кристалл. Помимо этого, могут формироваться липидные мицеллярные агрегаты, неламеллярные мезоморфные фазы различной топологии [232], в том числе инвертированные формы [233]. Наличие различных дополнительных компонент раствора, способных взаимодействовать с липидами, также может влиять на тип формирующихся структур [234–236].

Одной из основных движущих сил формирования третичной и четвертичной структур белка также является гидратация [237,238], то есть этот процесс возможен только в водном окружении. В процессе фолдинга гидрофобные участки избегают контакта с водой, а гидрофильные, наоборот, оказываются на поверхности, что обусловлено гидрофобными взаимодействиями [239]. Дополнительным фактором является водородное связывание молекул воды с поверхностными группами молекулы белка. Структура, стабильность и динамика белковых молекул прямо зависит от свойств содержащего их водного раствора [58,63,240–242]. На примере одного из хорошо известных модельных белков, БСА, можно увидеть, что только при изменении рН в диапазоне от 2 до 13 белок может пребывать в шести различных конформациях [243–245]: при рН=2–3.5 Е-форма; при рН=3.5–4.5 F-форма; при рН=5–7 N-

форма; при $pH=7-9$ В-форма; при $pH=9-11$ А-форма; при $pH>11$ происходит необратимая денатурация и осаждение белка, с разрушением вторичной структуры. Любой другой белок при изменении физико-химических условий будет проявлять собственный набор характерных конформаций, каждая из которых обладает уникальной структурой и, возможно, сопряжена с биологической функцией. И все эти структуры реализуются именно в водном окружении.

Полисахариды, способные к растворению в воде, теряют свою исходную кристаллическую форму в результате гидратации. При этом их способность к гидратации и растворению в воде зависит от молекулярного веса, разветвлённости молекулы, наличия заряженных или гидрофобных групп, а также количества гибких 1-6 гликозидных связей [246]. Молекулы полисахаридов в растворах могут образовывать случайные клубки, формировать гели и даже образовывать нерастворимые структуры, как например, в случае ретроградации крахмала [247]. В работах [218,248–250] было показано, что даже у таких небольших молекул, как дисахариды, в воде структура может быть разной. Возможно образование внутримолекулярных водородных связей, причём доля таких молекул зависит от концентрации сахара. Если рассмотреть простейшие мономеры сахаров, то в растворённом виде их структура отличается от структуры в кристаллах. К примеру, фруктоза в растворе распределяется между четырьмя основными изомерами [204]: α -D-фруктофураноза, β -D-фруктофураноза, α -D-фруктопираноза, β -D-фруктопираноза, также имеется небольшая доля (около 0.5%) открытой формы. При изменении температуры соотношение изомеров сахаров меняется [251].

Очевидно, что наиболее важная информация о структуре биомолекулы может быть получена только тогда, когда она находится в нативном состоянии, которое реализуется, как правило, в водном окружении. Соответственно, наиболее ценные данные о структуре биомолекул получают при исследовании их водных растворов.

1.4. Характеристики гетерогенности растворов биомолекул

Важной характеристикой молекулярной организации растворов является пространственное распределение растворённых молекул. В более точном физико-химическом смысле растворы макромолекул или молекулярных комплексов, например белков или фосфолипидных везикул, являются коллоидными системами, в которых они формируют отдельную фазу с достаточно чёткой межфазной границей. Биомолекулы в зависимости от физико-химических условий (температуры, давления, pH , содержания других растворённых веществ) могут образовывать связанные структуры с определёнными размерными характеристиками.

Характеристики гетерогенности растворов биомолекул очень важны для понимания происходящих процессов. Например, укрупнение фракции белков в растворах при изменении условий может быть связано с агрегацией [252,253], денатурацией [254], образованием белковых комплексов [255] или белковых фибрилл [256]. При исследовании модельных мембран в виде липосом, изменение температуры и состава среды может приводить к слиянию [257], агрегации [258] и разбуханию липосом [259], либо дроблению, мицеллизации или образованию других фаз [260], что прямо сказывается на размерных характеристиках. Молекулы АТФ и другие нуклеотиды [261,262] в зависимости от наличия разных катионов и их концентрации, рН, температуры тоже могут ассоциировать за счёт стэкинг-взаимодействия и образования макрохелатов. Это приводит к распределению их по фракциям с различным количеством связанных молекул. Образование молекулярных комплексов влияет на доступность мономеров и скорость биохимических реакций с их участием. Различные факторы могут способствовать переходу молекулы ДНК из суперскрученной в релаксированную форму [263]. При определённых условиях сахара в растворе тоже могут формировать агрегаты [195,218] или трансформироваться с образованием внутримолекулярных водородных связей [218,264,265]. Перечисленные и многие другие процессы сопровождаются существенным изменением гетерогенности растворов биомолекул. Приведённые примеры подчёркивают тесную связь между особенностями структуры биомолекул и свойствами гетерогенности их растворов.

Характеристики гетерогенности растворов биомолекул, как и понятие структуры воды не являются статичными. Наличие броуновского движения приводит к постоянному перемещению молекул и перегруппировке молекулярных комплексов. Тем не менее, можно выделить количественные характеристики гетерогенности, позволяющие однозначно описывать систему. Одной из основных характеристик гетерогенных систем является распределение по размерам дисперсной фазы. Для растворов биомолекул, находящихся в равновесном состоянии, распределение по размерам также сохраняется и может служить критерием стабильности биомолекул. Если же происходят изменения в распределениях, то они могут использоваться для объяснения происходящих в растворе молекулярных процессов биологического и физико-химического толка. Наиболее широко используемые типы распределений по размерам жидких коллоидных систем, в том числе растворов биомолекул, строят на основе гидродинамических диаметров или радиусов вращения, которые могут быть измерены оптическими методами (см. разделы 1.6.1 и 1.6.3).

Как правило, размеры биомолекул в мономолекулярной форме лежат от нанометрового до микронного масштаба. Гидродинамический диаметр глобулярных белков лежит от 4 нм для малых белков (лизоцим [266]), до 20-30 нм для крупных белков (гладкомышечный титин [267]). Размеры фосфолипидных везикул варьируют от десятков нанометров до микрометров [268].

Молекулы нуклеиновых кислот тоже могут быть охарактеризованы гидродинамическим диаметром, однако в данном случае такая характеристика применима только для сравнительных целей, поскольку структура нуклеиновых кислот далека от сферически симметричной. Тем не менее, даже по этому параметру можно отличать структурные типы ДНК [263,269] – суперскрученную, кольцевую, линейную. То же самое относится к фибриллярным белкам и фибриллярным белковым агрегатам, у которых структура высоко регулярна. Но и в этом случае размерные распределения могут использоваться для их характеристики.

1.5. Естественная гетерогенность водных растворов – нанопузырьки

Говоря о гетерогенности растворов, обычно имеют в виду наличие как минимум двух фаз. В случае растворов биомолекул – это водно-солевая фаза и фаза биомолекул. Однако в некоторых случаях важным обстоятельством является то, что вода сама обладает гетерогенностью субмикронного масштаба, которую можно назвать естественной гетерогенностью. Это было зарегистрировано во множестве работ [270–277]. Данному факту дано несколько отличных интерпретаций, две основные из которых: наличие наноассоциатов (супрамолекулярных комплексов) [276] и нанопузырьков [270]. На сегодняшний день накопилось достаточно данных, чтобы сделать однозначный вывод в пользу нанопузырьков.

Предположение о наличии стабильных нанопузырьков было сделано в результате попыток объяснить явление кавитации в сверхчистой воде. Дело в том, что порог механической прочности воды оказывается существенно ниже молекулярной прочности [278]. Впервые экспериментальное подтверждение наличия газовых пузырьков в воде было получено при исследовании лазерного пробоя в работе Н.Ф. Бункина и Ф.В. Бункина [270]. Впоследствии появилось множество дополнительных свидетельств этому факту [279,280]. Вода практически всегда, если не принимать специальных мер, содержит растворённые газы, а газы могут формировать пузырьки воздуха, что и приводит к наличию гетерогенности этого типа.

К сегодняшнему дню получено много экспериментальных данных, позволяющих более детально обсуждать свойства нанопузырьков в растворах. Одиночные пузырьки, спонтанно образовавшиеся в водно-солевых растворах и достигшие равновесного состояния, по размерам

составляют порядка сотен нанометров, а их числовая концентрация зависит от концентрации и типа ионов и составляет порядка 10^6 - 10^7 см⁻³ [281]. Помимо одиночных пузырьков также обнаружены и описаны характеристики кластеров таких пузырьков [282–286], размеры которых достигают нескольких микрометров.

Вопросы зарождения и стабилизации пузырьков на сегодняшний день до конца не раскрыты. Давление внутри пузырька p_{in} связано с поверхностным натяжением σ , радиусом r и внешним давлением p_{ex} через соотношение $p_{in} = p_{ex} + 2\sigma/r$. Очевидно, что при таком балансе давлений нет баланса диффузионного. Внутри пузырька наблюдается избыток газа, что должно сопровождаться выходом газа в раствор и уменьшением размера пузырька. Причём чем меньше размер пузырька, тем больше нарушение диффузионного баланса. По сути та же проблема возникает при рассмотрении вопроса образования пузырька. Если он формируется из какого-то малого зародыша, как он может увеличиться в размерах?

Частично ответ на вопрос о стабильности пузырьков был раскрыт в работах [271,287,288], где описана идея селективной адсорбции ионов на поверхности пузырька, точнее раздела фаз газ-жидкость. В этих же работах был введён термин «бабстон» (bubble stabilized by ions). То есть сила поверхностного натяжения пузырька стабилизируется силой Кулоновского отталкивания адсорбированных ионов, что и обеспечивает стабильность пузырька с размерами сотен нанометров [278]. Данная идея была подтверждена в работах других авторов, например [289]. В работе [290] также было дано термодинамическое обоснование стабильности пузырьков в воде с размерами от 180 до 600 нм. В работе [291] рассматривался вопрос гидратных оболочек нанопузырьков. Было показано, что возможно формирование стабильных оболочек связанной воды, по структуре подобной икосаэдру и полостям-многогранникам в водных клатратных каркасах.

Неотъемлемое присутствие бабстонов в составе водных растворов даёт понимание того, что анализ гетерогенности водных растворов биомолекул должен производиться с учётом наличия третьей фазы – нанопузырьков. Зависимость концентрации нанопузырьков от типа и концентрации ионов, а также, возможно, от наличия биомолекул требует особой проработки вопроса дифференцировки этих двух фаз. Однако до сих пор данный вопрос практически не затрагивался в литературе.

1.6. Методы исследования молекулярной организации водных растворов биомолекул

1.6.1. Краткий обзор методов

Исследования водных растворов биомолекул проводится давно и с применением огромного числа методов. Далее проводится краткий обзор методов, с разбивкой на принципиально отличающиеся группы, по принципу предоставляемой ими информации.

1. Прямое исследование структуры.

Наиболее прямым методом исследования молекулярной структуры является электронная микроскопия. Одним из ярких примеров признания этого метода является Нобелевская премия по химии 2017 года «за развитие криоэлектронной микроскопии высокого разрешения для определения структуры биомолекул в растворе» [292]. Выделяют несколько разновидностей этого метода, которые делят на две группы – сканирующая и просвечивающая электронная микроскопия.

Рентгеновские методы исследования позволяют определять молекулярную структуру, как в кристаллическом виде, так и в виде хаотически расположенных молекул в растворах. Одним из наиболее известных методов данной группы является рентгеноструктурный анализ. Он позволяет определять взаимное расположение атомов в кристаллических образцах. В случае водных растворов он определяет диффузионно-усреднённые структуры, а результат анализа представляет собой функции радиального распределения. Рассеяние рентгеновских лучей происходит на электронных оболочках, поэтому наиболее эффективно рентгеновские методы регистрируют тяжёлые атомы. В составе биомолекул такими наиболее часто встречающимися атомами являются углерод, азот, кислород, фосфор и др. Основные принципы применения рентгеноструктурного анализа биомолекул описаны, например, в [293]. Кроме классического рентгеноструктурного анализа, регистрирующего рассеяние рентгеновского излучения в широком диапазоне углов, имеются другие разновидности, применяемые для исследования структуры растворов биомолекул: малоугловое (упругое) рентгеновское рассеяние, неупругое рентгеновское рассеяние нескольких разновидностей, рентгеновская абсорбционная спектроскопия, рентгеновский магнитный круговой дихроизм, Мёссбауэровская спектроскопия, и др. Выборочные примеры применения рентгеновских методов для исследования структуры воды [294], различных биомолекул и их гидратных оболочек: белков [295], ДНК [296], липидов

[297], сахаров [248], а также процессов образования межмолекулярных комплексов в растворе [248].

Нейтронное рассеяние – ещё один классический метод прямого исследования структуры как биомолекул, так и их гидратных оболочек. В отличие от рентгеновского рассеяния, рассеяние нейтронов происходит не на электронных плотностях молекул, а в основном на атомах водорода и дейтерия. Нейтронное рассеяние, как и рентгеновское рассеяние, даёт информацию о структуре кристаллов, либо о диффузионно-усреднённой структуре в растворах. Оба этих структурных метода дополняют друг друга.

Нейтронное рассеяние тоже имеет ряд разновидностей: малоугловое и широкоугловое нейтронное рассеяние, упругое, квазиупругое, неупругое и комптоновское нейтронное рассеяние и некоторые другие. Методы нейтронного рассеяния применяются как для исследования структуры воды [294], так и в биологических исследованиях [298], в том числе для изучения структуры биомолекул и их гидратных оболочек: белков [295,299], нуклеиновых кислот [300], фосфолипидов [129,170], сахаров [216]. Методы нейтронного рассеяния, кроме определения статической или диффузионно-усреднённой структуры, в некоторых разновидностях способны достигать пикосекундного временного разрешения при исследовании молекулярной динамики в растворах биомолекул [301].

2. Структура и динамика индивидуальных молекул.

Метод спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) – один из наиболее известных методов данной группы, позволяющий расшифровывать молекулярную структуру весьма сложных молекул, в том числе биологических макромолекул. К тому же он способен анализировать молекулярную динамику и гидратацию. ЯМР может быть использован для изучения любой молекулы, содержащей атомы с нечётным числом протонов и/или нейтронов, таких как ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P , ^2H , ^{14}N . Существует несколько разновидностей данного метода: ЯМР жидкостей или твердотельный ЯМР, корреляционная спектроскопия ЯМР, двумерная J-спектроскопия, обменная спектроскопия, спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера и некоторые другие. ЯМР методы регистрируют динамику молекул на временах от наносекунд до секунд. Методы ЯМР долгое время эффективно применяются для исследования структуры, динамики биомолекул и их гидратных оболочек, например, белков [83,302], нуклеиновых кислот [106,118,122,303], биомолекулярных комплексов фосфолипидов [174] и сахаров [215].

Методы колебательной спектроскопии – инфракрасная спектроскопия (ИК) и спектроскопия комбинационного рассеяния света (КРС) – являются структурными методами, основанными на анализе спектров в инфракрасном диапазоне. Область инфракрасных частот соответствует частотам молекулярных колебаний. Каждая молекулярная группа имеет определяемые квантовой структурой частоты колебаний, и эти колебания могут быть возбуждены путём поглощения или комбинационного рассеяния излучения. Спектры содержат характеристические частоты колебаний молекулярных групп, что позволяет их однозначно идентифицировать. При расшифровке структуры крупных молекул могут приниматься во внимание сдвиги полос, относительно положения свободных молекулярных групп. Это даёт возможность определять энергию связей между молекулярными группами. Наиболее известные разновидности метода ИК спектроскопии следующие: дисперсионная и фурье-спектроскопия, спектроскопия поглощения, зеркального отражения, нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО), диффузного отражения, фотоакустическая спектроскопия и другие. КРС тоже применяется в различных модификациях: дисперсионная спектроскопия или с фурье-преобразованием; резонансная рамановская спектроскопия, поверхностно-усиленная рамановская спектроскопия, микроспектроскопия и др.

Методы колебательной спектроскопии применяются для исследования структуры биомолекул, в том числе в растворённом виде: белков [304–306], нуклеиновых кислот [110,227,306–308], липидов [165], сахаров [306,309] и др. ИК спектроскопия нередко используется для определения соотношения типов вторичной структуры белка в нативном состоянии в водном растворе [310,311], когда стандартный для этого метод кругового дихроизма неприменим. Фазовое состояние фосфолипидов может быть определено по полосе валентных колебаний карбонильных групп [165], положение которой зависит от гидратации. В работе [312] приведены яркие примеры широких возможностей метода колебательной спектроскопии, применительно к исследованию соотношения АТФ и АДФ в растворе, их самоассоциации в зависимости от рН и содержания ионов Mg, также продемонстрированы широкие возможности анализа характеристик водородных связей в этих растворах.

Методы колебательной спектроскопии применимы и для исследования гидратации биомолекул. У воды имеется несколько характеристических полос [49]. Межмолекулярные полосы: поперечная и продольная трансляционные, либрационные; и внутримолекулярные: деформационная, валентные; также можно зарегистрировать множество комбинированных и обертоновых полос. По сдвигу и изменению формы спектральных полос воды относительно

положения чистой воды можно делать выводы о характеристиках связанности воды в присутствии биомолекул [111,175,313], то есть анализировать гидратацию.

3. Спектральные методы временного разрешения.

В эту группу входят методы, позволяющие регистрировать молекулярную динамику со временами вплоть до фемтосекундных значений. Например, время-разрешённые методы флуоресцентной [117,163,164,314–317], инфракрасной [110,161,318–322] спектроскопии или спектроскопия оптического эффекта Керра [323,324] позволяют исследовать трансляционную и ориентационную динамику молекул воды в гидратных оболочках биомолекул, в том числе вблизи отдельно выбранных молекулярных групп.

4. Методы анализа коллективной динамики.

Данная группа методов основана на анализе коллективных молекулярных изменений в образце под воздействием переменного электромагнитного поля и выявлении макроскопического изменения дипольного момента или поляризуемости в широком диапазоне частот. Это позволяет выявить характерные времена происходящих молекулярных процессов в растворах. Основными методами этого типа являются следующие: диэлектрическая спектроскопия, спектроскопия рассеяния деполяризованного излучения, терагерцовая (ТГц) спектроскопия. Указанные методы позволяют анализировать коллективную динамику молекул воды, в том числе в гидратных оболочках, а также динамику самих биомолекул в водном окружении. Они эффективно применяются в области частот, характерных для межмолекулярной динамики в растворах $\sim 1-10^{13}$ Гц.

Метод диэлектрической спектроскопии [325] основан на анализе частотной зависимости комплексной диэлектрической проницаемости. Области дисперсии диэлектрической проницаемости, регистрируемые данным методом, обусловлены процессами изменения дипольного момента. Биомолекулы целиком или их структурные части могут обладать дипольным моментом. От размеров молекул, величин дипольных моментов и межмолекулярной связанности зависят характерные времена различных процессов ориентационной релаксации, и величина их вклада в диэлектрическую проницаемость. Особенно ценным метод диэлектрической спектроскопии при исследовании водных растворов делает то, что он позволяет глубоко анализировать структурно-динамические характеристики воды в растворах. Молекулы воды обладают постоянным дипольным моментом и определённой степенью связанности в растворах. Диэлектрическая спектроскопия позволяет

идентифицировать частотные области дисперсии и амплитуды полос дебаевской релаксации, что позволяет рассчитывать степень связанности воды в растворах. Диэлектрическая спектроскопия является одним из классических методов исследования структуры растворов, в том числе биологических молекул. Примеры успешного применения данного метода для исследования воды и водных растворов [326,327] биомолекул и их гидратных оболочек: белков [328], ДНК [131,132], липидов [172], сахаров [180,206,329,330]. Например, результаты работы [206] демонстрируют множество типов релаксации в растворах сахаров, связанных как с динамикой молекул воды, так и молекул сахара. Каждая область дисперсии соответствует определённой молекулярной динамике, реализующейся в растворе. Например, были зафиксированы процессы инверсии сахарного кольца, псевдоротации, муторотации и др.

Спектроскопия рассеяния деполяризованного излучения [331] позволяет проводить измерение спектров поляризуемости вещества. Применение данного метода оказалось эффективным при исследовании гидратационной динамики различных биомолекул в растворах [13,187,332,333]. Поскольку у молекулы воды тензор поляризуемости практически изотропен, этот метод чувствителен только к трансляционной динамике воды, в отличие от диэлектрической спектроскопии, чувствительной только к ориентационной релаксации. С этим связаны отличия характерных времён релаксации, определённые с помощью диэлектрической спектроскопии и спектроскопии рассеяния деполяризованного излучения [13]. При этом оба указанных метода эффективно дополняют друг друга.

ТГц спектроскопия [334] покрывает диапазон времён, частот и энергий межмолекулярной структуры и динамики водных растворов. ТГц спектроскопия имеет несколько разновидностей: абсорбционная спектроскопия, спектроскопия временного разрешения, кинетическая ТГц спектроскопия; широкополосная или с перестраиваемой частотой. Применение ТГц спектроскопии для исследования динамики биомолекул и их гидратных оболочек описано в ряде работ, например, белков [35,101,335,336], ДНК [337,338], фосфолипидов [167,173,339], сахаров [35,79,179,192].

ТГц спектроскопия – особенный метод в плане исследования гидратации. Именно с этим методом связано появление понятия динамической гидратной оболочки или глобальной гидратации [75,220,223,224]. Из литературных данных следует, что чувствительность разных методов в плане оценки гидратного числа биомолекул существенно отличается. Это можно продемонстрировать на примере молекулы сахарозы: калориметрия – 6.3 [340], вискозиметрия – 11.2 [219], ультразвуковые методы – 13.8 [219], ТГц спектроскопия – 35 [192]. Как видно, ТГц спектроскопия способна регистрировать намного больше гидратных молекул, ориентируясь по

изменению их межмолекулярной динамики даже в достаточном отдалении от растворённых молекул. Подробное описание метода ТГц спектроскопии и его применений будет рассмотрено в разделах 1.6.4, 1.6.5.

5. Термический анализ.

Данная группа методов позволяет анализировать характеристики биомолекул и их гидратацию на основании измерения тепловых эффектов, реализующихся при изменении температуры. Основными методами, входящими в данную группу, являются дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК), термогравиметрия, изотермическая титрационная калориметрия. Они часто используются для исследования растворов биомолекул, как например, белков [341], фосфолипидов [172], нуклеиновых кислот [109], полисахаридов [190]. Указанные методы не столько позволяют определять структуру биомолекул в растворах, сколько их термодинамические характеристики. Например, указанные методы позволяют определять температуры, при которых происходят конформационные перестройки биомолекул (денатурация белка, фазовые переходы в фосфолипидных комплексах и др.), изменение состава (разложение молекул, отщепление гидратных молекул), а также энтальпию и энтропию соответствующих процессов. В ряде случаев на основании калориметрических данных можно судить о гидратном числе различных молекул, опираясь на разницу в тепловых эффектах фазовых переходов чистого буферного раствора и аналогичного раствора биомолекул [190]. При этом определяемые гидратные числа соответствуют молекулам воды, которые не превращаются в лёд при кристаллизации основной части водной фазы раствора. Это означает, что калориметрические методы позволяют определять лишь часть гидратной оболочки, состоящей из сильно связанных молекул воды. Термогравиметрия позволяет определять температуры, при которых происходит связывание или высвобождение определённого количества молекул воды из гидратных оболочек [109,190]. Однако в данном случае речь идёт об исследовании слабо гидратированных биомолекул в виде плёнок или порошков.

6. Методы гранулометрического анализа.

Данные методы позволяют получать информацию о размерах формирующихся структур биомолекул в растворе. Основными методами данной группы являются методы турбидиметрии, статического светорассеяния (лазерной дифракции) и динамического светорассеяния. Метод турбидиметрии и его аналог – нефелометрия, являются наиболее простыми из перечисленных методов. Они основаны на измерении рассеянного монохроматического света, проходящего через коллоидный раствор. Тем не менее, они позволяют решать ряд важных задач определения размеров и концентраций биомакромолекулярных комплексов в растворах [342], в том числе,

отслеживать процессы агрегации в реальном времени [343]. Разновидность данного метода – иммунотурбидиметрия – даже примеряется в клинической химии [344,345].

Метод статического светорассеяния применим для анализа размеров от 10 нм до миллиметров. Он не способен анализировать биомолекулы с размерами малых глобулярных белков и менее, однако может регистрировать белковые агрегаты, липидные макрокомплексы и отдельные клетки [346]. В частности, одна из составляющих проточных цитометров для анализа размеров клеток, по сути, является системой статического лазерного рассеяния [347].

Метод динамического светорассеяния является наиболее известным из всех перечисленных в данном разделе. Он имеет очень широкое применение для исследования растворов биомолекул. Данный метод способен определять распределения по размерам неоднородностей в жидкости от субнанометровых размеров до микрометров, то есть практически все размеры биомолекул. При этом он обычно не требует сложной пробоподготовки, является бесконтактным и чрезвычайно чувствительным (до 10^{-8} объёмных долей). Подробное описание данного метода и его применений будет рассмотрено в разделе 1.6.3.

7. Другие методы.

В данном разделе не ставилась цель перечислить все существующие методы исследования молекулярной организации водных растворов биомолекул, а лишь большинство наиболее известных. Стоит упомянуть ещё некоторые методы, не входящие ни в одну из выделенных групп, но представляющих интерес с точки зрения применимости к исследованию структуры водных растворов биомолекул.

Ультразвуковые методы, с помощью которых измеряют сжимаемость растворов биомолекул [71,114,184,212,214,348,349], что позволяет получать информацию о свойствах гидратных оболочек, гидратных числах и удельных объёмах биомолекул в растворах. Вискозиметрический анализ позволяет анализировать связанность воды, межмолекулярные взаимодействия в растворах биологических макромолекул [184,204,215,218,350–352], а также определять сольватационные числа [219]. В работах А.Ф. Бункина и С.М. Першина [353,354] была продемонстрирована применимость метода спектроскопии четырёхфотонного рассеяния для исследования характеристик гидратных оболочек биомолекул. Ещё один метод исследования структуры биомолекул в растворах, ИК спектроскопия собственного излучения, более подробно рассматривается в следующем разделе.

1.6.2. ИК спектроскопия собственного излучения

ИК спектроскопия давно зарекомендовала себя как один из наиболее надёжных и эффективных методов определения химического состава и анализа молекулярной структуры [355]. Для исследования структуры биологических макромолекул этот метод также применяется весьма широко [305,309,356]. ИК спектроскопия стала активно применяться в биологических исследованиях начиная с появления своей продвинутой разновидности – ИК спектроскопии с фурье-преобразованием (FTIR) [357]. Этот метод имеет существенные преимущества перед классической ИК спектроскопией дисперсионного типа. Можно выделить 6 таких преимуществ:

1. Быстрота. Фурье-спектрометр не проводит сканирование по частоте, как дисперсионный спектрометр. Измеряется интерферограмма, содержащая информацию обо всем интересующем спектральном диапазоне, после чего с помощью преобразования Фурье рассчитывается спектр. Благодаря этому время измерения спектров может сокращаться до секунд и даже миллисекунд [358,359].
2. Более высокая чувствительность. Фурье-спектрометр не содержит монохроматор, как дисперсионный спектрометр, поэтому не приходится проводить измерение интенсивности множества узких спектральных линий с малыми интенсивностями относительно общей интенсивности излучения.
3. Более высокое отношение сигнал/шум. ИК Фурье-спектрометр позволяет получать спектры с отношением сигнал/шум в сотни раз больше, чем дисперсионный спектрометр, при одинаковом времени измерения.
4. Возможно достижение высокого спектрального разрешения до 0.001 см^{-1} и менее.
5. Более высокая точность определения положения спектральных полос. Фурье-спектрометры по своему принципу устройства обладают внутренней калибровкой волнового числа, позволяющей определять положение максимумов даже широких полос с точностью порядка 0.01 см^{-1} .
6. Для фурье-спектрометров доступна более длинноволновая область спектра вплоть до единиц см^{-1} . Это позволяет проводить измерения в дальней области ИК спектра, где проявляется множество полос органики и межмолекулярные полосы воды.

Существуют различные конфигурации измерения ИК спектров [360]: пропускание, зеркальное отражение, диффузное отражение, микроспектроскопия, нарушенное полное

внутреннее отражение, фотоакустическая спектроскопия и др. Каждая конфигурация удобна и наиболее информативна для определённого типа образцов. Интересно, что до сих пор без должного внимания оставлена возможность измерения ИК спектров собственного излучения (эмиссионных спектров). Эмиссионная спектроскопия применяется при исследовании атмосферы [361] или космоса [362,363], но в лабораторной практике этот метод абсолютно не представлен. Попытки развития эмиссионной ИК спектроскопии предпринимались, что хорошо отражено в обзорах [364–366], однако они не дали должного результата для популяризации этого метода. Проблема в том, что, если образец находится при температуре окружающей среды, тепловой фон дополняет спектр излучения образца и полностью его маскирует. В итоге удаётся измерить лишь спектр излучения абсолютно чёрного тела (АЧТ).

Было испробовано несколько путей решения указанной проблемы: воздействие лазером на объект исследования [367] для возбуждения энергетических уровней и регистрации излучения при спонтанных переходах молекул с возбуждённых уровней на основной уровень. Но такой подход, как правило, сопряжён с сильным нагревом, и даже с образованием плазмы, и не годится для анализа структуры биомолекул в нативном состоянии, а разве что для проведения элементного анализа [368].

Известны также чрезвычайно трудоёмкие подходы измерения спектров излучения при охлаждении спектрометра целиком, вплоть до температур ниже азотных [369]. Использование такого подхода для исследования биологических образцов, в том числе растворов биомолекул, вряд ли возможно по причине невозможности сохранения образца в области вакуумирования и поддержания локальной температуры образца с хорошей точностью в области криогенных температур.

Так или иначе, основной предложенный подход для регистрации собственного излучения в ИК области – это изменение температуры образца относительно фонового окружения. Наилучший вариант – нагрев, и чем больше температура образца относительно окружения, тем больше интенсивность его излучения и выше качество спектра. Для достижения приемлемого отношения сигнал/шум необходимо нагреть образец на десятки, а лучше на сотни градусов. Этот подход позволил получать качественные спектры излучения твёрдых тел и плёнок [365,370], жидкостей [364], газов [366]. Однако, по причине невозможности сохранения нативной структуры биомолекул при таких температурах, это не применимо для исследования биомолекул и ограничено применимо для каких-либо водных растворов.

Для адаптации эмиссионной ИК спектроскопии к исследованию биологических образцов предпринимались попытки в работах Е.Л. Терпугова с соавторами [371–373]. Однако они в основе своей содержат возбуждение образца внешним излучением различных частотных диапазонов. Это неионизирующее, нетепловое излучение, которое не производит явного разрушающего действия на биомолекулы в растворе. Тем не менее, регистрируемое излучение образца в полном смысле слова нельзя назвать «собственным», поскольку оно реализуется под внешним воздействием. Также это может влиять на биологический образец и приводить к изменению его структуры. Последнее подтверждается в работах самих авторов [374].

В наших работах [375–377] был предложен подход на основе ИК фурье-спектроскопии, позволяющий измерять спектры собственного излучения растворов биомолекул в ИК диапазоне абсолютно без какого-либо возбуждения и анализировать структуру биомолекул. Это подробно описано в Главе 3.

1.6.3. Метод динамического светорассеяния

Метод динамического светорассеяния, иногда называемый также фотонной корреляционной спектроскопией [378], является наиболее эффективным при анализе распределений по размерам большинства коллоидов. Он позволяет определять размеры частиц в жидкой фазе в широчайшем диапазоне размеров: от долей нанометров до микрометров. Это покрывает размеры практически всех биомолекул, от моносахаридов до крупных макромолекулярных комплексов, таких как белковые агрегаты, мультиламеллярные липосомы, нуклеиновые кислоты.

Метод основан на измерении корреляционной функции интенсивности рассеянного лазерного излучения в растворе, содержащем исследуемые частицы. Поскольку они подвержены броуновскому движению, то возникают флуктуации их концентрации и, следовательно, флуктуации коэффициента преломления. Рассеянное на этих флуктуирующих оптических неоднородностях излучение регистрируется под выбранным углом и рассчитывается временная корреляционная функция интенсивности:

$$G_2(\tau) = \frac{1}{I(\bar{t})^2} * \frac{1}{T} \int_0^T I(t) I(t - \tau) dt \quad (1.2)$$

Времена корреляции полностью определяются коэффициентами диффузии изучаемых частиц. Для случая броуновского движения невзаимодействующих частиц корреляционная функция интенсивности $G_2(\tau)$ связана с корреляционной функцией напряжённости

электрического поля $G_I(\tau)$ через соотношение Зигерта [379]: $G_1(\tau) = \sqrt{G_2(\tau) - 1}$. Для монодисперсных распределений функция $G_I(\tau)$ связана с коэффициентом диффузии D частиц следующим образом [378]:

$$G_1(\tau) = \exp(-q^2 D \tau), \quad (1.3)$$

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

где τ – время корреляции, q – вектор рассеяния, λ – длина волны лазерного излучения в вакууме, n – коэффициент преломления жидкой фазы, θ – угол рассеяния.

Таким образом, метод позволяет определять коэффициент диффузии частиц (коллоидных или молекулярных). После этого на основании соотношения Стокса-Эйнштейна коэффициенту диффузии ставится в соответствие гидродинамический радиус r_h частиц, в предположении их сферической формы:

$$r_h = kT / 6\pi\eta D, \quad (1.4)$$

где k – постоянная Больцмана, T – абсолютная температура, η – динамическая вязкость.

Монодисперсные распределения в реальных коллоидных системах встречаются крайне редко. В ином случае требуется получение распределений по размерам. Для этого производится процедура регуляризации, как например [380], позволяющая получить разложение корреляционной функции (1.3) на составляющие по временам затухания с определением распределений коэффициентов диффузии. Из этих распределений рассчитываются распределения гидродинамических радиусов (чаще диаметров) по формуле (1.4).

Согласно соотношениям (1.3, 1.4) для корректного расчёта размеров частиц требуется знание коэффициента преломления и динамической вязкости анализируемых растворов. Они могут быть найдены в справочниках или определены экспериментально. Имея в виду водные растворы, важно помнить, что вязкость сильно зависит от температуры, следовательно, важна точная стабилизация температуры. Погрешность определения температуры водного раствора в 1°С приводит к погрешности определения размера 2-3%.

С учётом специфики метода динамического светорассеяния, важно понимать, что размеры рассчитываются из коэффициентов диффузии частиц, подверженных броуновскому движению. Следовательно, наличие каких-либо потоков, связанных, например, с конвекцией, может приводить к артефактам и ошибкам определения размеров.

Динамическое светорассеяние – самый чувствительный метод, позволяющий определять размеры частиц в жидкой фазе. Предел чувствительности метода оценивается в возможности регистрации частиц в объёмной концентрации порядка 10^{-8} . Однако она не всегда достижима и зависит от размеров и рассеивающей способности частиц. Рассеяние света малыми частицами, размер которых много меньше длины волны света, определяется согласно закону Релея:

$$I = I_0 \frac{1 + \cos^2 \theta}{2L^2} \left(\frac{2\pi}{\lambda} \right)^4 \left| \frac{n_r^2 - 1}{n_r^2 + 2} \right|^2 r_h^6 \quad (1.5)$$

I_0 – интенсивность падающего излучения, θ – угол рассеяния, L – расстояние от детектора до частицы, λ – длина волны падающего излучения, n_r – отношение комплексных коэффициентов преломления материала частицы и среды. В условиях эксперимента параметры I_0 , θ , L и λ являются постоянными, поэтому соотношение (1.5) можно переписать в следующем виде:

$$I = C * R_i * r_h^6 \quad (1.6)$$

где C – постоянная величина, определяемая конфигурацией измерительного оборудования,

$R_i = \left| \frac{n_r^2 - 1}{n_r^2 + 2} \right|^2$ – рассеивающая способность частиц.

Как видно из соотношения (1.6), интенсивность рассеяния зависит от размера частицы в шестой степени. Это весьма сильная зависимость, из-за которой, например, интенсивность рассеянного излучения уменьшается в миллион раз при уменьшении размера частицы в десять раз.

Рассеивающая способность также может отличаться для разных типов частиц. Например, комплексные коэффициенты преломления различных веществ относительно воды для излучения с длиной волны 633 нм такие: целлюлоза/вода – $1.1 + 0i$ [381], белок/вода – $1.2 + 0i$ [382], коллоидное золото/вода – $0.14 + 2.6i$ [381]. Рассеивающая способность указанных материалов составляет 0.004, 0.016, и 3, соответственно. То есть для одного и того же размера частиц белок будет рассеивать в 4 раза больше целлюлозы, а коллоидное золото в 1300 раз больше. Указанные зависимости от размера и рассеивающей способности необходимо учитывать при анализе многокомпонентных систем.

Если размер частиц соизмерим или больше длины волны рассеиваемого света, то интенсивность рассеяния уже не описывается законом Релея. Наиболее развитой теорией, применимой для рассеяния на крупных частицах, является теория Ми [383]. Она позволяет учитывать отражение от поверхностей частицы и интерференцию отражённых волн. В этом

случае интенсивность рассеяния более сложным образом зависит от размера, коэффициентов преломления и угла рассеяния.

Гидродинамический радиус (или диаметр) – это одно из возможных выражений размера объекта. Определяемые размеры другими методами (например, методами лазерной дифракции или электронной микроскопии) могут несколько отличаться. Более того, различные представления одного и того же распределения по размерам, полученного методом динамического светорассеяния, тоже могут друг от друга отличаться. Как было отмечено выше, размеры определяются на основании интенсивности рассеяния. Соответственно, при наличии нескольких размерных фракций, соотношение их вкладов будет определяться по соотношению интенсивностей рассеяния. С учётом указанной выше зависимости от рассеивающей способности и, что ещё более важно, размера частиц может наблюдаться сильный перекося распределений в сторону более крупных фракций. В этом случае можно использовать распределения по объёму или по числу частиц. Например, если в растворе имеется равное количество белковых молекул и их олигомеров с гидродинамическими диаметрами 10 нм и 20 нм, соответственно, то соотношение интенсивностей будет отличаться в $2^6=64$ раза в пользу олигомеров. Можно преобразовать распределение по интенсивности в распределение по объёму, то есть вклад фракций определять по общему объёму частиц каждого размера. В этом случае распределение будет содержать два пика с соотношением вкладов 2^3 , то есть 1:8. Если две фракции по смыслу представляют собой две биомолекулы с разным размером и при этом важно определить их количественное соотношение, то более правильным будет представить распределение по числу частиц. В некоторых случаях, когда важна площадь поверхности частиц, контактирующих с растворителем, например при химическом катализе, можно использовать распределение по площади поверхности.

Преобразования размерных распределений из исходного формата, по интенсивности, в другие форматы несложно сделать чисто математически. Однако не всегда это возможно, поскольку в исходном распределении по интенсивности некоторые фракции могут вообще не быть зарегистрированы, если их рассеивающие способности слишком малы. Тогда математические процедуры, преобразующие распределения не смогут учесть эти фракции вообще. В таких случаях важно иметь дополнительную информацию об образце и проводить соответствующую пробоподготовку, связанную с обработкой ультразвуком, фильтрацией, центрифугированием и др. Также преобразования между различными типами размерных распределений некорректны, когда некоторые фракции представлены широкими размерными

интервалами. В этом случае преобразование из интенсивности в объём приведёт к сильным искажениям размерных пиков.

В некоторых случаях при высокой полидисперсности частиц и плохой воспроизводимости размерных распределений, вместо процедуры регуляризации используют кумулянтный анализ [384,385] корреляционных функций. Этот подход даёт намного более стабильные результаты, но только среднее значение и полидисперсность размеров частиц.

Метод динамического светорассеяния используется достаточно широко для исследования биомолекул в растворах с точки зрения их распределений по размерам [386]. Например, данный метод использовался для контроля чистоты вирусных РНК в растворе [387] на основании критерия монодисперсности, а также для регистрации образования комплекса белок-РНК [388]. В работах [252,253,389] производилось изучение влияния различных факторов, способствующих образованию белковых агрегатов и процессов дезагрегации, денатурации [254], образованию белковых комплексов [255] и структурированных агрегатов [256,390]. Работа [218] даёт интересный пример, где на основе анализа псевдо-размерных распределений изучались процессы взаимодействия сахаров в растворах при различных температурах и концентрациях. Анализ изменения гидродинамических радиусов модельных липидных мембран при различных условиях может идентифицировать их разбухание [259], агрегацию [258] или слияние [257].

Формула (1.4) даёт зависимость гидродинамического радиуса от коэффициента диффузии. При этом подразумевается некий гипотетический шарообразный объект, характеризующийся этим радиусом. Фосфолипидные везикулы, естественным образом достигая минимума поверхностной энергии, обретают сферическую форму, многие глобулярные белки в первом приближении тоже могут считаться сферическими. Однако далеко не все биомолекулы и их комплексы обладают сферической симметрией. Например, фибриллярные белки и ДНК не соответствуют этому приближению. Тем не менее, анализ таких объектов методом динамического светорассеяния может проводиться на основании отслеживания изменений гидродинамического радиуса, среднего размера или полидисперсности. Например, в работе [263] проводилось изучение влияния давления на размеры суперскрученной и кольцевой формы плазмидной ДНК.

Когда учёт формы биомолекулы принципиален, требуются дополнительные данные для более полного анализа. Известны коэффициенты диффузии не сферических частиц, но обладающих различной правильной формой, например эллипсоидальной или цилиндрической.

В этом случае могут быть использованы, например, коэффициенты Перрена [269,391] для определения соотношения гидродинамического радиуса и радиуса равновеликого объёма. Если имеются данные о геометрической форме и соотношении размеров по разным направлениям, то метод динамического светорассеяния может позволить получать дополнительные сведения об изучаемых объектах. Например, в работе [269] методом динамического светорассеяния проводилось исследование линейной ДНК в одноцепочечной, двухцепочечной и суперскрученной формах. Молекула ДНК моделировалась жёстким стержнем, и это позволило установить ряд внутримолекулярных интерференционных эффектов.

Важным обстоятельством является зависимость гидродинамического радиуса частиц от заданного значения вязкости раствора (формула (1.4)). При невысоких концентрациях частиц обычно используется значение вязкости растворителя. Если влиянием частиц на вязкость нельзя пренебречь, то требуется прямое измерение вязкости образца и учёт полученного значения при определении распределений по размерам. Такой подход к учёту вязкости является методической рекомендацией к применению в рамках метода динамического светорассеяния и используется в мировой практике. Однако возможны погрешности определения размера при работе не с твёрдыми частицами. Например, при анализе эмульсий в качестве частиц выступают капли одной жидкости, диспергированные в другой. Применение закона Стокса-Эйнштейна в форме (1.4) в данном случае не вполне корректно. Более правильно было бы использовать обобщённый закон Стокса [392], согласно которому связь гидродинамического радиуса с коэффициентом диффузии выражается следующим образом:

$$r_h = \frac{kT}{2\pi\eta D} * \frac{\eta + \eta'}{2\eta + 3\eta'}, \quad (1.7)$$

где η' – вязкость жидкости дисперсной фазы. Очевидно, что для твёрдых частиц $\eta' \rightarrow \infty$ и формула (1.7) преобразуется в формулу (1.4). Описанный подход использовался в наших работах [393–397] по исследованию эмульсий различных органических жидкостей в воде.

Метод динамического светорассеяния, кроме определения размеров иногда используется для определения молекулярного веса и второго вириального коэффициента [398]. В этом случае требуется измерить концентрационную зависимость интенсивности рассеяния и воспользоваться следующим соотношением:

$$\frac{Kc}{R_\theta} = \frac{1}{M} + 2A_2c, \quad (1.8)$$

где R_θ – коэффициент Релея, определяемый на основании сравнения с рассеянием от стандартного образца, c – концентрация, M – молекулярный вес, A_2 – второй вириальный коэффициент, K – оптическая константа, определяющаяся следующим образом:

$$K = \frac{4\pi^2 n^2}{\lambda^4 N_A} \left(\frac{dn}{dc} \right)^2, \quad (1.9)$$

n – коэффициент преломления, λ – длина волны излучения, $\frac{dn}{dc}$ – производная показателя преломления по концентрации, N_A – постоянная Авогадро.

Коэффициент Релея, входящий в формулу (1.8) определяется следующим образом:

$$R_\theta = \frac{I_A n^2}{I_{ст} n_{ст}^2} R_{ст}, \quad (1.10)$$

I_A – разность интенсивностей рассеяния от образца и чистого растворителя $I_{ст}$, $n_{ст}$ и $R_{ст}$ – коэффициент преломления и Релеевское отношение стандартной чистой жидкости.

Построив зависимость величины $\frac{Kc}{R_\theta}$ от концентрации и экстраполировав её прямой линией, по точке пересечения с осью ординат можно получить значение обратной молекулярной массы M , а тангенс угла наклона позволяет определить второй вириальный коэффициент.

Второй вириальный коэффициент позволяет получать информацию о стабильности растворов. Если $A_2 > 0$, то взаимодействие растворённых молекул с растворителем более энергетически выгодно, чем взаимодействие растворённых молекул между собой. Чем больше этот параметр, тем больше растворимость. Если же $A_2 < 0$, то раствор склонен к расслоению.

Данный подход часто используют для исследования растворов полимеров, в том числе биополимеров. Например, в работах [399,400] проводилось исследование различных химических и биологических модификаций структуры хитозана и на основании значения второго вириального коэффициента определялось изменение его склонности к гидратации. В работе [401] анализировалось взаимодействие белков в растворах биофармацевтической направленности. В работе [402] определялись термодинамические параметры, способствующие самосборке циклодекстринов, и структурные характеристики образующихся комплексов. В работах [403,404] данный метод успешно применялся для определения молекулярной массы полисахаридов.

Метод динамического светорассеяния часто используется также для измерения дзета-потенциала частиц, в том числе биомолекул и их комплексов в растворах. Дзета-потенциал является одной из важнейших характеристик раздела двух фаз, определяющей зарядовые характеристики. Для многих коллоидных систем этот параметр является мерой стабильности.

Принцип измерения дзета-потенциала заключается в следующем. На два электрода, помещённые в раствор, прикладывается электрическое поле, которое приводит в движение заряженные частицы, а установившаяся скорость движения V определяется балансом кулоновских сил и сил вязкого трения:

$$\frac{V}{E} = \frac{2\varepsilon\zeta f(ka)}{3\eta} \quad (1.11)$$

где ε — диэлектрическая проницаемость среды, η — вязкость, ζ — дзета-потенциал, V — скорость движения частицы, E — напряжённость электрического поля, $f(ka)$ — функция Генри, которая рассчитывается в зависимости от ионной силы дисперсионной среды и размера движущихся частиц [405].

В эксперименте измеряется скорость движения исследуемых частиц V при заданных значениях η , ε и E , что позволяет рассчитать дзета-потенциал. Для измерения скорости заряженных частиц используются модификации метода, основанные на оптическом гетеродинамировании [406].

Знание дзета-потенциала востребовано при решении различных задач, относящихся к растворам биомолекул и их комплексов. Например, в работах [407–411] исследовалось влияние состава и наполнения везикул на их зарядовые характеристики, что важно для возможности их применения в медицинских целях. В работах [412–415] определение дзета-потенциала различных биологически активных наночастиц использовалось для анализа характеристик их покрытий. Также определение дзета-потенциала позволяет определять зависимость заряда белков от ионного состава среды [416], в том числе, находить изоэлектрическую точку [417].

1.6.4. Специфика терагерцовой спектроскопии при исследовании водных растворов

Терагерцовый спектральный диапазон (~0.3-3 ТГц) лежит между микроволновым и инфракрасным диапазонами. Эта область частот относится к молекулярным вращениям, скелетным и торсионным колебаниям крупных органических молекул, фоннным колебаниям кристаллов и межмолекулярным колебаниям в жидкостях. Исторически так сложилось, что в

плане чувствительных спектральных методов терагерцовый диапазон был освоен последним из-за трудности генерации и детектирования излучения. Одним из стимулов к развитию терагерцовой спектроскопии со стороны биологических наук были теоретические предпосылки к тому, что у биологических макромолекул в терагерцовой области могут наблюдаться характеристические колебательные полосы, связанные с колебаниями на уровне всей макромолекулы, например, колебания на уровне вторичной, третичной и четвертичной структуры белка. Это принципиально отличает ТГц диапазон от хорошо исследованной средней ИК области, где наблюдаются характеристические колебания отдельных небольших молекулярных групп. К тому же ТГц область соответствует межмолекулярной динамике воды, что делает её востребованной при исследовании гидратации.

При появлении надёжных спектральных методов в терагерцовой области они почти сразу начали применяться в различных научных областях [418–421], в том числе для исследования воды и водных растворов [422,423]. Например, В.И. Тихонов и А.А. Волков реализовали разделение орто- и пара-изомеров воды [424], которые были зарегистрированы с помощью спектроскопии в ТГц области. Это подтвердило существование двух спиновых изомеров, по крайней мере, в газовой фазе. Это открытие дало импульс для множества исследований, базирующихся на использовании данных о спиновых изомерах, применительно к биологическим эффектам, например в работах С.М. Першина с соавторами [425–430].

ТГц спектроскопия также применялась для исследования структуры биологических макромолекул, таких как нуклеиновые кислоты [431,432], белки [433–435], липиды [436,437], полисахариды [438–440] и др., даже делались попытки применять терагерцовую спектроскопию в области биомедицины или фармацевтики [441–444]. Однако оказалось, что спектры биологических образцов, почти всегда обладающих высоким содержанием воды, в терагерцовом диапазоне почти полностью определяются спектральными свойствами самой воды, а вклад биологической субстанции очень слаб и нехарактеристичен. То есть получение информативных терагерцовых спектров биологических образцов возможно лишь при столь малом содержании воды, что неуместно говорить о нативном состоянии биообъекта.

Тогда естественно поставить следующий вопрос: если спектральные свойства водных растворов в терагерцовой области практически полностью определяются спектральными свойствами воды, то не попытаться ли зарегистрировать влияние растворённых веществ на спектральные свойства самой воды? В ряде работ [13,39,79,178,188,435,445], в том числе в наших работах [101,155,338,339,446], с использованием ТГц спектроскопии было показано, что

наблюдаются существенные отличия в межмолекулярной динамике воды, принадлежащей гидратным оболочкам различных биомолекул, включая белки, нуклеиновые кислоты, сахара и полисахариды, липидные комплексы. Характеристики гидратных оболочек могут сильно отличаться даже между разными конформациями одной и той же биомолекулы [101,339].

Обнаруженные с помощью метода ТГц спектроскопии особенности динамических гидратных оболочек оказались абсолютно новыми по сравнению с полученными ранее данными с помощью других методов. Одна из основных особенностей заключается в оценке протяжённости этих гидратных оболочек, названных динамическими гидратными оболочками. Оказалось, что их протяжённость достигает нескольких нанометров, в то время как ЯМР, рентгеновская и нейтронная дифракция и другие методы способны анализировать лишь 1-2 слоя близлежащих молекул воды, что не превышает 0.5 нм. Например, в работах [220,221,339] было показано, что объём воды с изменёнными структурно-динамическими характеристиками в растворах белков и фосфолипидов сопоставим или даже больше объёма, занимаемого самими биомолекулами.

ТГц спектроскопия имеет несколько разновидностей, которые могут быть разделены на два основных типа: абсорбционная спектроскопия и спектроскопия временного разрешения (THz-TDS). Абсорбционная ТГц спектроскопия является прямым аналогом абсорбционной спектроскопии из других частотных диапазонов. Метод THz-TDS принципиально отличается от предыдущего тем, что позволяет измерять не только спектры поглощения, но и спектры коэффициента преломления. Это позволяет определять спектры комплексной диэлектрической проницаемости (ДП) изучаемого вещества без использования соотношений Крамерса-Кронига. С учётом этого информативность THz-TDS существенно выше абсорбционной ТГц спектроскопии.

1.6.5. Терагерцовая спектроскопия временного разрешения

Принцип THz-TDS был описан и реализован технически в 1989 г. [447], и в этом же году он был опробован для измерения спектров паров воды [448]. Производство коммерческих приборов THz-TDS и их активное использование началось только в конце 2000-х годов. Устройство спектрометра THz-TDS изображено на рисунке 1.2. В основе данной технологии лежит принцип когерентной генерации и детектирования коротких импульсов широкополосного терагерцового излучения с помощью фемтосекундных лазеров.

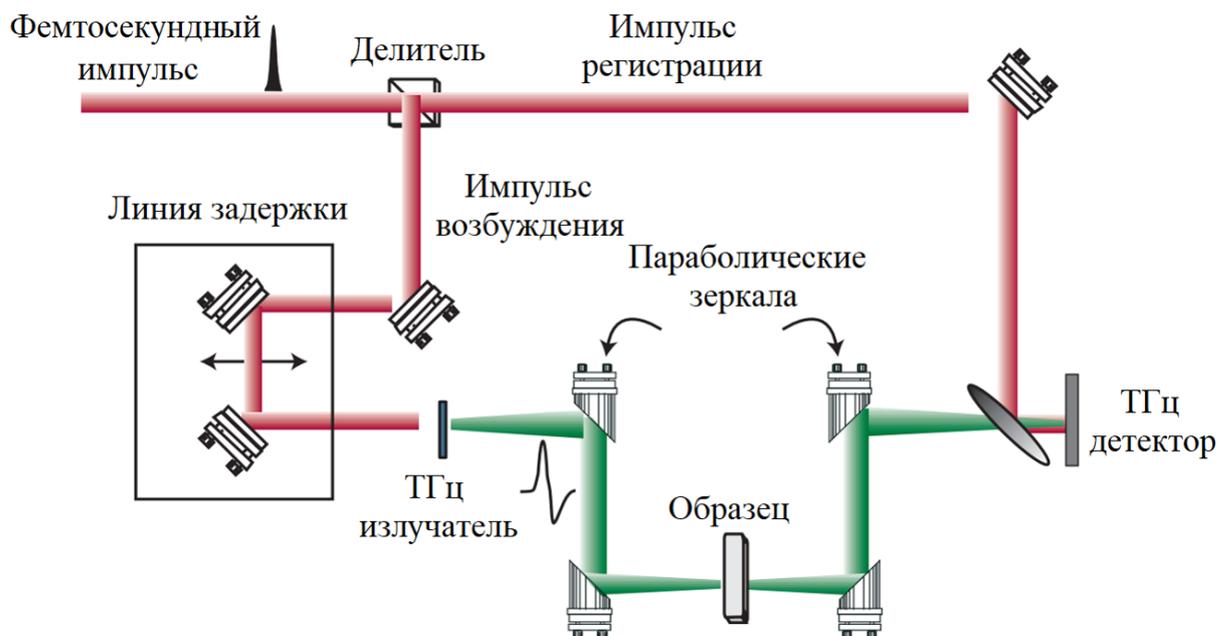


Рисунок 1.2. Схема THz-TDS спектрометра.

Терагерцовый излучатель, схематично изображён на рисунке 1.3. Он представляет собой полупроводник (обычно низкотемпературный GaAs), с двумя встроенными электродами, между которыми создана разность потенциалов. В межэлектродную область направляется фемтосекундный лазерный импульс с энергией квантов, превышающей ширину запрещённой зоны. Это приводит к появлению электрон-дырочных пар в полупроводнике, которые движутся между электродами под действием разности потенциалов. Движение зарядов происходит с характерными временами ~ 1 пс до момента их рекомбинации. Импульс тока $I(t)$ порождает пикосекундный электромагнитный импульс $E(t) \sim dI(t)/dt$. Спектральная ширина импульса на основании принципа неопределённости частота-время составляет несколько ТГц. Поскольку в описанной схеме частотное уширение отсчитывается от нулевой частоты, спектральный диапазон импульса лежит в ТГц области.

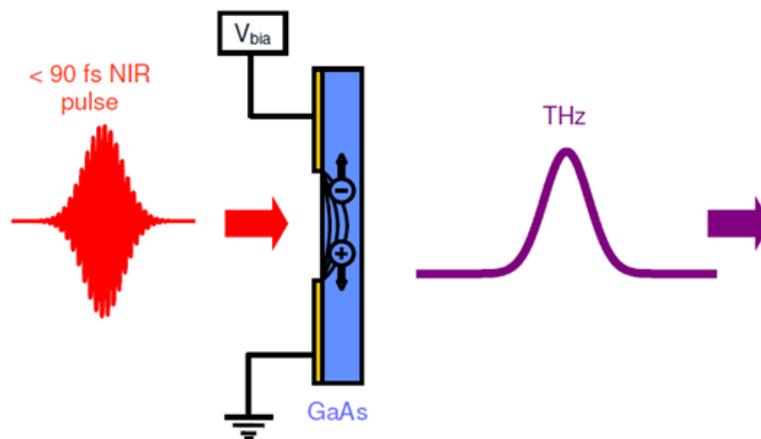


Рисунок 1.3. Принцип генерации терагерцового импульса в методе THz-TDS.

Терагерцовый импульс фокусируется в область для размещения изучаемого образца, а затем поступает на детектор (рисунок 1.2). В случае нахождения образца в области фокусировки, импульс теряет часть энергии согласно его спектральным характеристикам.

ТГц детектор устроен аналогично ТГц излучателю (рисунок 1.3), за исключением того, что на электроды не подаётся разность потенциалов. До момента генерации терагерцового импульса, лазерный импульс разделяется на две части с помощью делителя излучения (рисунок 1.2). Одна из двух частей лазерного импульса направляется на детектор и высвобождает в полупроводнике детектора носители заряда синхронизировано по времени с приходом ТГц импульса. Носители заряда движутся под действием напряжённости электрического поля некоторого участка временного профиля ТГц импульса. Фототок детектора пропорционален проинтегрированному по времени произведению напряжённости электрического поля на полное число сгенерированных носителей заряда. В идеальном случае время жизни носителей заряда должно быть много меньше длительности ТГц импульса, тогда регистрируемый ток будет прямо пропорционален напряжённости поля в некоторой точке ТГц импульса. В оптической схеме (рисунок 1.2) имеется узел задержки лазерных импульсов, приходящих на детектор. Меняя задержку и измеряя ток пикоамперметром, можно определить зависимость напряжённости электрического поля ТГц импульса от времени $E(t)$. Характерная временная зависимость $E(t)$, полученная описанным способом на спектрометре TPS Spectra 3000 (Teraview, UK), изображена на рисунке 1.4.

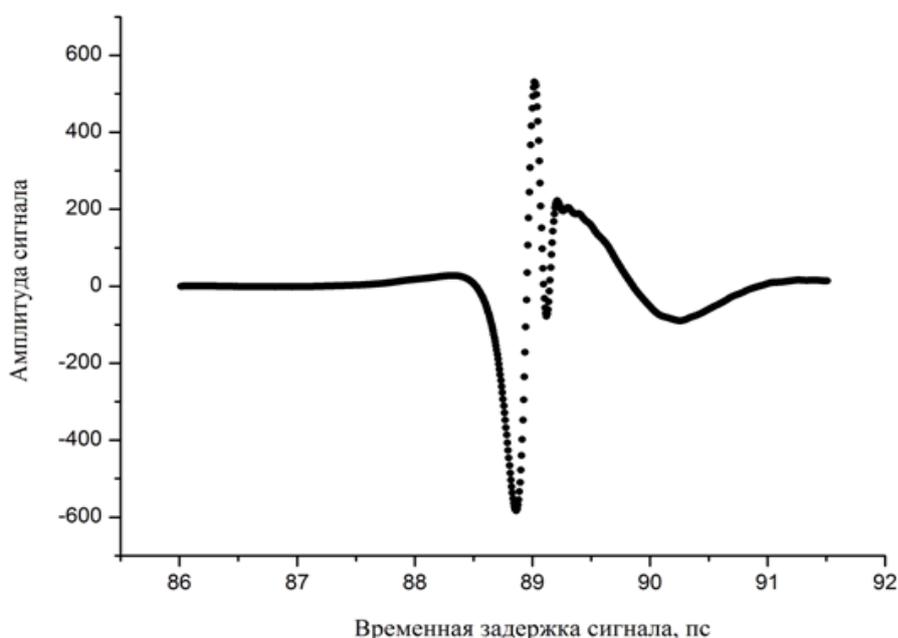


Рисунок 1.4. Временной профиль напряжённости электрического поля в терагерцовом импульсе спектрометра TPS Spectra 3000 (Teraview, UK).

Измеренная функция $E(t)$ подвергается комплексному фурье-преобразованию, что позволяет получить спектры терагерцового излучения по амплитуде и по фазе. Спектральное разрешение в данной измерительной схеме обратно пропорционально диапазону времён задержки.

При прохождении электромагнитной волны $E_0(\omega)$ через образец толщиной l она модифицируется следующим образом:

$$E(\omega) = E_0(\omega) * \exp\left(\frac{i\omega l}{c} [n(\omega) + ik(\omega)]\right) = E_0(\omega) * \exp\left(\frac{i\omega l}{c} n(\omega)\right) * \exp(-\alpha(\omega)l/2), \quad (1.12)$$

где c – скорость света, $n(\omega)$ – коэффициент преломления, $k(\omega)$ – мнимая часть коэффициента преломления, $\alpha(\omega)$ – коэффициент поглощения, при этом все три функции зависят от частоты.

В простейшем случае измерения спектра образца в виде плоскопараллельного слоя и спектра фона в отсутствие образца, после деления первого спектра на второй, получается комплексный спектр пропускания $t(\omega)$ следующего вида:

$$t(\omega) = \frac{E_{\text{обр}}(\omega)}{E_{\text{фон}}(\omega)} = \exp\left(\frac{i\omega l}{c} (n(\omega) - 1)\right) * \exp(-\alpha(\omega)l/2) \quad (1.13)$$

Описанная схема THz-TDS позволяет определить частотную зависимость изменения амплитуды $|t(\omega)|$ и фазы $\Delta\varphi(\omega)$ терагерцового импульса при прохождении через образец по сравнению с фоновым импульсом. Спектры пропускания $T(\omega)$ и коэффициента преломления $n(\omega)$ рассчитываются с помощью следующих соотношений:

$$T(\omega) = |t(\omega)|^2,$$

$$n(\omega) = 1 + \Delta\varphi(\omega) * \frac{c}{\omega l} \quad (1.14)$$

Из спектров $T(\omega)$ и $n(\omega)$ может быть однозначно рассчитана комплексная ДП [449]:

$$\begin{aligned} \varepsilon'(\nu) &= n^2(\nu) - \left[\frac{\ln Tr(\nu)}{4\pi\nu l} \right]^2, \\ \varepsilon''(\nu) &= -\frac{n(\nu) \ln Tr(\nu)}{2\pi\nu l}, \end{aligned} \quad (1.15)$$

где ε' и ε'' – действительная и мнимая части ДП, а $\nu = \frac{\omega}{2\pi c}$ – волновое число, которое наиболее часто используется для выражения частотной характеристики в ТГц диапазоне.

Возможность определения спектров комплексной ДП с помощью метода THz-TDS является существенным преимуществом перед аналогичными спектральными методами, позволяющими измерять только пропускание. ДП содержит в себе полную информацию о процессах поляризации, происходящих в изучаемых растворах. Поскольку молекула воды обладает дипольным моментом, а ТГц диапазон соответствует характерным частотам межмолекулярной динамики воды, данный метод позволяет глубоко анализировать структурно-динамические характеристики воды в растворах, в том числе изучать гидратацию.

1.6.6. Модели эффективной среды применительно к растворам биомолекул

Полученные с помощью метода THz-TDS спектры ДП растворов биомолекул содержат в себе совокупность диэлектрических проявлений воды и биомолекул. То есть с диэлектрической точки зрения раствор биомолекул является гетерогенной двухфазной системой, состоящей из непрерывной водной фазы с включениями биомолекул. При изучении гидратации биомолекул, необходимо анализировать параметры водной фазы раствора. Для этого из определённой экспериментально ДП раствора нужно вычесть вклад биомолекул.

Описание электродинамической модели двухкомпонентного диэлектрика с известным соотношением их объёмных долей в простейшем случае может выглядеть следующим образом:

$$\varepsilon_s^* = (1 - f_i) \varepsilon_w^* + f_i \varepsilon_i^*, \quad (1.16)$$

где ε_s^* , ε_w^* , ε_i^* – комплексные ДП раствора, воды и биомолекул, соответственно, f_i – объёмная доля биомолекул. Однако подход к решению описанной электродинамической задачи на основании аддитивной модели (1.16) является крайне упрощённым и может быть использован лишь для грубых оценок. Более точный подход должен учитывать процессы взаимной поляризации фаз гетерогенной системы. В качестве примера можно привести работу [450], где анализировались спектры ДП растворов белка в области дебаевской релаксации и было показано, что изменения диэлектрических параметров с изменением концентрации белка ведёт себя существенно нелинейно. Это свидетельствует о неприменимости аддитивной модели и необходимости более глубокого анализа ДП.

Обычно в физике диэлектриков гетерогенные системы рассматриваются с использованием моделей эффективной среды [451–455], которые позволяют получить корректную связь ДП всей системы с ДП составляющих её фаз. К сожалению, не существует модели эффективной среды, применимой в общем случае, поскольку обычно требуется учёт

ряда конкретных параметров системы. Например, важное значение имеют такие параметры как распределение фаз в объёме, форма включений, их связанность, анизотропия и др. В связи с этим было разработано множество моделей эффективной среды, применимых для различных типов гетерогенных систем.

Задача несколько упрощается для двухфазных систем, у которых включения обладают сопоставимыми размерами во всех направлениях, и при этом много меньшими, чем длина волны излучения. Поскольку речь идёт о ТГц диапазоне с длинами волн более 100 мкм, то практически все биомолекулы не фибриллярного типа (глобулярные белки, олигопептиды и бесструктурные белковые агрегаты, липиды в виде липосом, нуклеотиды и олигонуклеотиды, моносахариды и олигосахариды) удовлетворяют этим условиям. Для растворов указанных биомолекул можно использовать две хорошо известные модели эффективной среды: модель Максвелла Гарнетта [456]

$$\frac{\varepsilon_s^* - \varepsilon_w^*}{\varepsilon_s^* + 2\varepsilon_w^*} = f_i \frac{\varepsilon_i^* - \varepsilon_w^*}{\varepsilon_i^* + 2\varepsilon_w^*}, \quad (1.17)$$

и модель Бруггемана [457]

$$f_i \frac{\varepsilon_i^* - \varepsilon_s^*}{\varepsilon_i^* + 2\varepsilon_s^*} + (1 - f_i) \frac{\varepsilon_w^* - \varepsilon_s^*}{\varepsilon_w^* + 2\varepsilon_s^*} = 0. \quad (1.18)$$

Обе эти модели были разработаны для применения к двухфазным системам со сферическими включениями. Однако они успешно применяются также для систем с малыми несферическими, но хаотически расположенными включениями. Этим условиям вполне соответствуют водные растворы биомолекул не фибриллярного типа. Модель Максвелла Гарнетта в основном используется при очень малой объёмной доле включений f_i (в данном случае при малой концентрации биомолекул), а у модели Бруггемана это требование менее жёсткое. Например, при анализе ДП растворов белка в ТГц области [450] была показана хорошая применимость модели Максвелла Гарнетта для объёмной доли менее 2 об%, для больших концентраций гораздо точнее экспериментальные данные описываются моделью Бруггемана.

Важно отметить, что до сих пор при анализе в ТГц диапазоне ДП водных растворов компактных биомолекул (белков и сахаров), для которых могут быть применены известные модели эффективной среды, они либо не использовались [13,114,116,247,248,253,254,436, 443,456], либо использовалась примитивная аддитивная модель [79,186,217,459,460]. В

последнем случае рассматривались три фазы раствора (биомолекулы, гидратные оболочки, невозмущённая вода), между которыми не учитывалось диэлектрическое взаимодействие, к тому же анализ проводился не в терминах ДП, а на основании спектров поглощения. То есть, в полном смысле слова, последний подход вообще не относится к модели эффективной среды.

Примечательно, что уже в одной из первых работ по изучению раствора сахарозы методом THz-TDS [461] поднимался вопрос о необходимости использования моделей эффективной среды, хотя сами авторы и не нашли подходящих решений. Единственным, найденным нами в литературе исключением, можно назвать работу член-корр. РАН А.П. Шкуринова с соавторами [42]. Авторы провели глубокий анализ ДП смеси глюкозы с водой во всём диапазоне концентраций, от кристаллической глюкозы до сильно разбавленных растворов. Это позволило им определить соотношение разных фаз и рассчитать параметры ДП гидратной воды в ТГц диапазоне. Для этого использовалась одна из хорошо известных моделей эффективной среды Landau–Lifshitz–Looyenga [462], правда применяемая обычно для гетерогенных систем со слабо отличными по ДП фазами.

В работах [463,464] были описаны модели эффективной среды Максвелла-Вагнера и Ханая, применимые при анализе ДП суспензий клеток и модельных клеточных мембран. Авторы опробовали их на суспензиях различных клеток крови. Было сделано упрощение о сферичности анализируемых клеток, однако сильной стороной описанных подходов является возможность учёта различий диэлектрических характеристик внутренней и внешней среды относительно липидной мембраны.

При исследовании растворов биомолекул фибриллярного типа – ДНК, полисахариды, фибриллярные белки и фибриллярные белковые агрегаты – анализ их ДП становится существенно сложнее. Фактически не существует разработанных и опробованных моделей эффективной среды для такого типа включений. Тем не менее, имеется несколько работ [465,466] по изучению водных растворов ДНК с помощью ТГц спектроскопии, где проводили оценку объёма гидратной воды и пытались разделять вклады фаз в ДП. Авторы использовали в расчётах суспензионную модель эффективной среды. Обращает на себя внимание, что эта модель была исходно разработана для анализа глинисто-песчаных шламов [467], аналогия которых с растворами ДНК совершенно неясна. Понятно, что использование подобных подходов обусловлено отсутствием подходящих моделей эффективной среды, что делает актуальной их разработку. В нашей работе [468] было проведено теоретическое рассмотрение

данного вопроса и предложена модель эффективной среды, применимая для анализа растворов фибриллярных биомолекул. Данная модель подробно описана в Разделе 2.2.

ГЛАВА 2. АНАЛИЗ ГИДРАТАЦИИ БИОМОЛЕКУЛ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ С ПОМОЩЬЮ ТЕРАГЕРЦОВОЙ СПЕКТРОСКОПИИ ВРЕМЕННОГО РАЗРЕШЕНИЯ

При подготовке данного раздела диссертации использованы материалы семинара ИТЭБ РАН, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, автором были апробированы основные результаты, положения и выводы его исследования: Пеньков Н.В. Молекулярная организация водных растворов биомолекул. Автореф. дисс. д.ф.-м.н. (ПРОЕКТ) <https://iteb.ru/news/zasedanie-sektsii-teoreticheskaya-biofizika-i-mode-202205/>

2.1. Алгоритм исследования гидратации биомолекул в водных растворах

В настоящей главе описан подход, позволяющий определять характеристики гидратации биомолекул в водных растворах. Алгоритм исследования состоит из нескольких этапов:

1. Экспериментальное определение спектров комплексной ДП водного раствора биомолекул ϵ_s^* , а также растворителя (аналогичного раствора, но без биомолекул) ϵ_w^{0*} и сухого вещества биомолекул ϵ_i^* в ТГц области частот. Для определения спектров ДП используется метод THz-TDS, как это описано в разделе 2.2.
2. С помощью моделей эффективной среды, используя ϵ_s^* и ϵ_i^* , из спектров растворов биомолекул вычитается вклад самих биомолекул, что позволяет рассчитать спектры ДП водной фазы раствора ϵ_w^* . Это описано в разделе 2.3.
3. Затем производится расчёт параметров межмолекулярной структуры и динамики воды анализируемых растворов. Методология расчёта и смысл каждого параметра описаны в разделах 2.5 – 2.7.
4. Проводится сравнение значений параметров воды раствора биомолекул и растворителя без биомолекул на предмет выявления отличий. Искомые отличия обусловлены тем, что водная фаза раствора биомолекул неоднородна. Часть водной фазы аналогична растворителю, однако вблизи биомолекул она меняется, за счёт образования гидратных оболочек. Таким образом, сравнивая водную фазу раствора биомолекул и растворитель по параметрам межмолекулярной структуры и динамики, можно определять некоторые характеристики гидратации биомолекул.

Описанный подход был применён для исследования гидратации всех основных типов биомолекул в растворах: белка (раздел 2.8), фосфолипидов (раздел 2.9), АТФ (раздел 2.10), ДНК (раздел 2.11), сахаров (раздел 2.12).

2.2. Определение спектров комплексной диэлектрической проницаемости водных растворов в ТГц диапазоне

Основным экспериментальным методом, использованным в данном разделе, является метод THz-TDS. Спектры получали с помощью спектрометра TPS Spectra 3000 (Teraview, UK) в диапазоне волновых чисел от 2 до 120 см^{-1} с разрешением 4 см^{-1} . Фурье-преобразование временного профиля ТГц импульсов производилось штатным программным обеспечением с применением функции аподизации Blackmann-Harris 3. Для получения одного спектра производилось усреднение по 1800-3600 импульсов. Принципы описания метода THz-TDS могут быть найдены, например, в [418] или разделе 1.6.4.

Наиболее распространённый подход в спектроскопии при анализе жидких образцов заключается в измерении двух однолучевых спектров: спектра образца в кювете и спектра пустой кюветы в качестве фона. Затем из этих спектров определяются спектры, характеризующие образец. Однако такой подход приводит к наличию артефактов в спектрах, обусловленных различиями в отражениях от поверхностей пустой и заполненной кюветы [35]. Для достижения наивысшего качества спектров в настоящей работе измерения проводились иначе. Измерялись однолучевые спектры каждого раствора в двух идентичных кюветах с различным расстоянием между окнами. Поскольку две заполненные кюветы отличаются только толщиной слоя раствора, спектр кюветы большей толщины может рассматриваться как «спектр образца», а спектр кюветы меньшей толщины – как «спектр фона». После измерения спектров раствора в двух указанных кюветах спектр кюветы большей толщины, делился на спектр кюветы меньшей толщины, в результате получался спектр пропускания раствора с разностной толщиной двух кювет. Спектр фазы исследуемого раствора определялся как разница спектров фазы, полученных для двух указанных кювет с образцом. При известной разнице толщин образца однозначно рассчитывался спектр показателя преломления (см. раздел 1.6.4). Описанная методика измерения спектров позволяет избежать практически всех возможных оптико-спектральных артефактов.

Каждый раствор в двух кюветах последовательно измерялся не менее 25 раз (в некоторых случаях число повторов было увеличено до 45) для возможности усреднения и проведения статистического анализа. Измеренные спектры пропускания и коэффициента преломления использовались для расчёта спектров комплексной ДП растворов по формуле (1.15).

Перед измерением растворы дегазировались путём их выдержки в течение 15 мин под вакуумом 140 мм рт. ст. с использованием degassing station (TA Instruments, USA). Это предотвращало образование пузырьков на окнах кювет во время измерения спектров. После

установки кюветы с образцом в кюветное отделение выдерживалась пауза 10 мин до начала измерения. За это время производилась стабилизация температуры образца и продувка оптической части осушенным воздухом с использованием FT-IR Purge Gas Generator 74-5041 (Parker Hannifin Corporation, Haverhill, MA, USA). Температура стабилизировалась с помощью термостатирующего держателя кюветы с точностью $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$.

Используемые окна жидкостных кювет изготовлены из монокристаллического кварца. При этом главная ось кристалла располагалась перпендикулярно плоскости окна, вдоль направления распространения излучения в спектрометре (z-cut кварц). Такое расположение позволяет избежать эффекта двойного лучепреломления в материале окон, который в результате интерференции обыкновенного и необыкновенного лучей может существенно исказить спектры растворов. Толщина окон составляла 2.04 мм. Сама кювета в сборе изображена на рисунке 2.1.

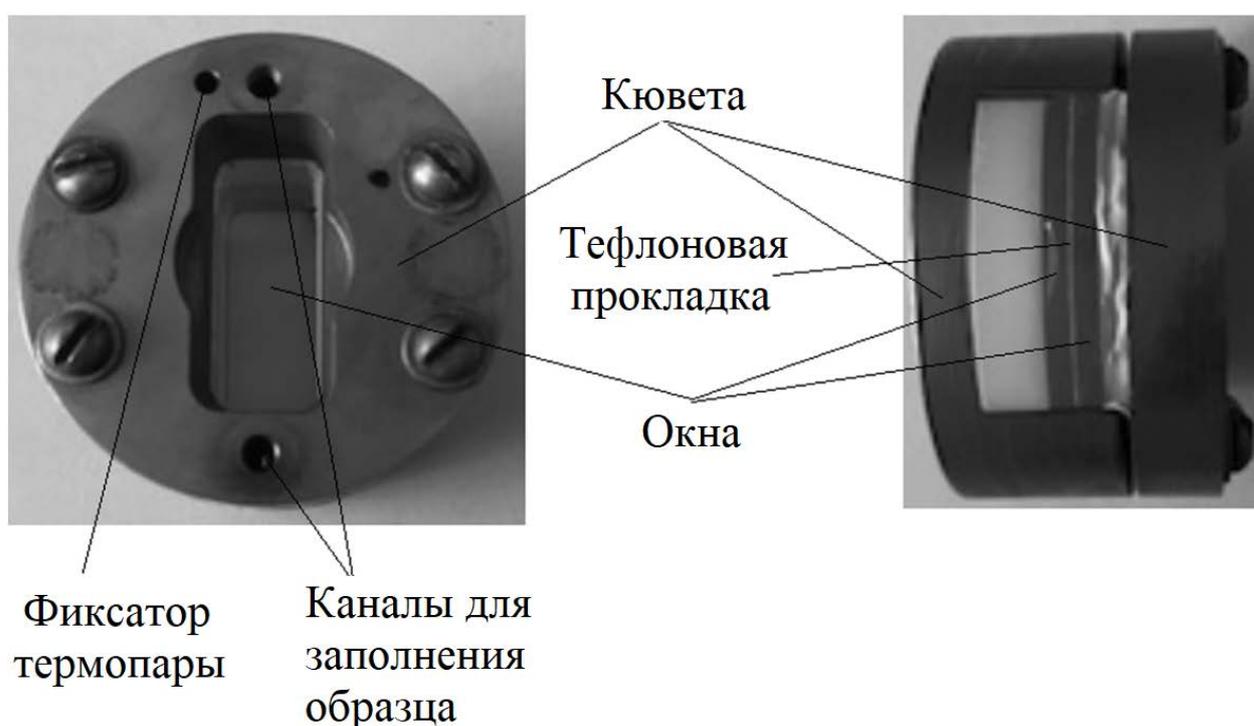


Рисунок 2.1. Жидкостная кювета для измерения спектров в терагерцовой области.

Для фиксации толщин образца в кюветах использовались тефлоновые прокладки между окнами толщиной 50 и 100 мкм. Однако реальные толщины немного варьируют, в зависимости от силы затягивания корпуса кюветы, неровностей самих прокладок и др. Поэтому точное расстояние между окнами измерялось после сборки кювет. Для этого применяли интерферометрический метод с использованием ИК спектрометра с Фурье-преобразованием

Vertex 80v (Bruker, Germany). Окна из z-cut кварца, помимо терагерцового диапазона, прозрачны и в ближней ИК области, поэтому ИК спектры пустых кювет измерялись в области 4000-8000 см^{-1} . Спектры содержат периодические полосы, обусловленные переотражением излучения между окнами и последующей интерференцией [469]. На рисунке 2.2 показаны спектры двух описанных пустых кювет.

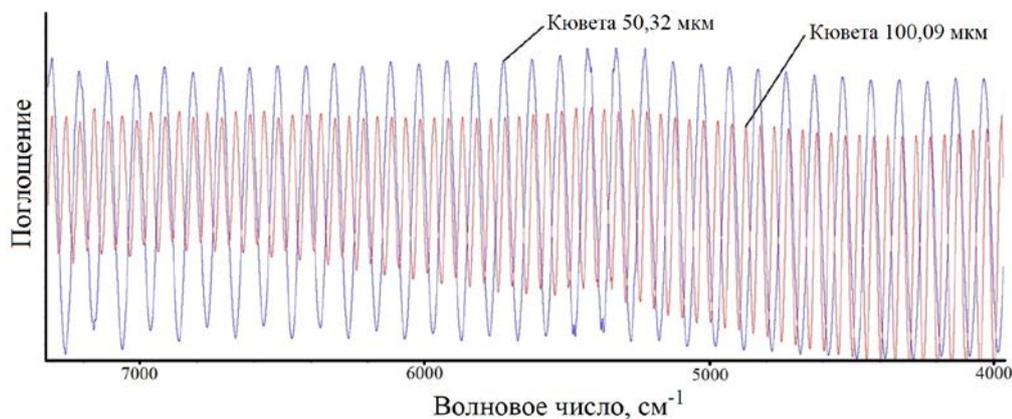


Рисунок 2.2. Интерференционные полосы в спектрах пустых кювет.

Несложно установить, что расстояние между двумя соседними интерференционными полосами $\Delta\nu$ по шкале волновых чисел связано с расстоянием между окнами l через соотношение:

$$l \text{ (мкм)} = \frac{5000}{\Delta\nu(\text{см}^{-1})}. \quad (2.1)$$

Отметим, что при измерении заполненных водным раствором кювет с указанными толщинами эффектом интерференции можно полностью пренебречь. Дело в том, что происходит ослабление интенсивности излучения не менее чем в 10^4 раз при прохождении двойного слоя водного раствора толщиной 50 или 100 мкм, с учётом потерь при двукратном отражении на границах раствор-кварц. Интерференция из-за переотражения в кварцевом окне тоже не проявляется в спектрах по причине того, что выбранное спектральное разрешение 4 см^{-1} превышает расчётный период интерференционных полос для окна 1.2 см^{-1} .

Помимо спектров растворов, проводились измерения спектров сухого вещества биомолекул, для которых также рассчитывались ДП по формулам (1.15). Приготовление сухих образцов и измерения их толщин для каждого типа биомолекул описаны в соответствующих методических разделах 2.9 – 2.12.

Важно отметить одну техническую деталь. Используемый в работе спектрометр по спецификации позволяет измерять спектры от 1.2 до 120 см⁻¹. Если говорить о спектрах поглощения, то этот диапазон действительно покрывается спектрометром. Однако при анализе спектра фазы, необходимого для расчёта комплексной ДП, оказывается, что диапазон получения корректных данных несколько уже. Сначала в расчёт брали спектры из диапазона 10-100 см⁻¹ для анализа белковых растворов (раздел 2.8). Затем спектрометр был отъюстирован силами нашей лаборатории, что дало возможность получать стабильные данные в более широком диапазоне 10 – 110 см⁻¹, которые использовались для анализа суспензий липосом (раздел 2.9), растворов АТФ (раздел 2.10), ДНК (раздел 2.11) и сахаров (раздел 2.12). Это привело к небольшим смещениям определяемых параметров (раздел 2.5), но полученные выводы во всех случаях делались на основании сравнения анализируемых образцов с контрольными образцами, как это описано в разделах 2.8 – 2.12, что позволяло делать обоснованные выводы, не зависящие от проведения упомянутой технической процедуры.

2.3 Расчёт спектров диэлектрической проницаемости водной фазы растворов биомолекул

Раствор биомолекул с диэлектрической точки зрения является гетерогенной системой, состоящей из водной фазы и биомолекул, то есть это двухфазная система. Выделение в отдельную фазу присутствующих в растворах нанопузырьков, подробное обсуждение которых содержится в Главе 4, в данном случае нецелесообразно, поскольку анализировались растворы с концентрациями биомолекул порядка нескольких объёмных процентов, а объёмная доля нанопузырьков не превышает 10⁻⁷. В принципе, можно выделить ещё одну фазу – гидратные оболочки биомолекул, тогда система может рассматриваться как трёхфазная. Однако выделение гидратных оболочек в отдельную фазу представляет трудности, заключающиеся в том, что нельзя определить её чёткие границы, а параметры гидратной воды изменяются по мере удаления от биомолекулы. Поэтому более определённым в интерпретациях результатов является рассмотрение раствора биомолекул как двухфазной системы. При этом характеристики гидратных оболочек можно анализировать по отличиям усреднённых ДП водной фазы раствора биомолекул от ДП растворителя.

Для получения ДП водной фазы раствора биомолекул необходимо из измеренных ДП растворов вычесть вклад биомолекул. Это делалось на основании моделей эффективной среды. В настоящей работе использовались три модели эффективной среды: Максвелла Гарнетта, Бруггемана и разработанная собственная модель для фибриллярных биомолекул (раздел 2.4).

Для каждого типа биомолекул в соответствующих методических частях разделов 2.8-2.12 сделаны обоснования применения выбранной модели эффективной среды.

2.4. Разработка модели эффективной среды для растворов фибриллярных биомолекул

В разделе 1.6.6 дан обзор применения моделей эффективной среды при анализе ДП растворов биомолекул и описана проблема отсутствия проверенных моделей эффективной среды, применимых для растворов фибриллярных биомолекул. В данном разделе проводится теоретическая разработка такой модели и описана её экспериментальная проверка.

2.4.1. Базовые теоретические соотношения

Взаимодействие электрического поля с веществом описывается методами электродинамики сплошных сред [470]. Наиболее простой для рассмотрения случай – диэлектрик в постоянном электрическом поле. Сначала будет использоваться именно это приближение, а затем произведено обобщение на случай переменных полей с некоторыми оговорками.

Приложение электрического поля \mathbf{E} вызывает отклик среды в виде электрической поляризации \mathbf{P} , где смысл вектора \mathbf{P} – это средний дипольный момент единичного объёма среды. Для изотропных сред под действием не очень сильных электрических полей (по сравнению с внутриатомными полями) поляризация линейно связана с напряжённостью через параметр поляризуемости α :

$$\mathbf{P} = \alpha \mathbf{E}. \quad (2.2)$$

Также для описания электрического поля в диэлектрике используют вектор электрической индукции \mathbf{D} , который связан с напряжённостью поля и поляризацией:

$$\mathbf{D} = \mathbf{E} + 4\pi \mathbf{P} \quad (2.3)$$

Соотношение (2.3) может быть записано в другом виде:

$$\mathbf{D} = \varepsilon \mathbf{E}, \quad (2.4)$$

где определена одна из важнейших характеристик вещества – ДП: $\varepsilon = 1 + 4\pi\alpha$.

Описание диэлектрических свойств неоднородных диэлектриков (гетерогенных систем) производят с использованием моделей эффективной среды. Суть этого подхода сводится к рассмотрению средних (или эффективных) параметров, содержащихся в формуле (2.4). В таком случае эффективная ДП ε_{eff} определяется следующим образом:

$$\bar{\mathbf{D}} = \varepsilon_{eff} \bar{\mathbf{E}}, \quad \text{или}$$

$$\frac{1}{V} \int \varepsilon(\mathbf{r}) \mathbf{E}(\mathbf{r}) dV = \varepsilon_{eff} \frac{1}{V} \int \mathbf{E}(\mathbf{r}) dV, \quad (2.5)$$

где интегрирование проводится по объёму диэлектрика V , намного превышающем размер включений.

В большинстве случаев имеют дело с двухфазными диэлектриками, представляющими собой однородную среду (матрицу) из одного диэлектрика ε_1 , внутри которой содержатся однородные включения другого диэлектрика ε_2 . В таких случаях производится разделение объёма диэлектрика на части $V_1 + V_2 = V$, относящиеся к разным фазам, и формула (2.5) преобразуется к следующему виду:

$$\frac{1}{V} \int \varepsilon_1 \mathbf{E}(\mathbf{r}) dV_1 + \frac{1}{V} \int \varepsilon_2 \mathbf{E}(\mathbf{r}) dV_2 = \varepsilon_{eff} \frac{1}{V} (\int \mathbf{E}(\mathbf{r}) dV_1 + \int \mathbf{E}(\mathbf{r}) dV_2) \quad (2.6)$$

Решением задачи для модели эффективной среды является получение зависимости ε_{eff} от ε_1 , ε_2 , концентрации и других параметров составляющих фаз.

2.4.2. Двухфазный диэлектрик с нитевидными включениями

Под нитевидными в данной работе понимаются включения, удовлетворяющие следующим условиям: длина намного превышает толщину, толщина заметно не меняется по всей длине, в поперечном сечении размеры соизмеримы, изгибы плавные. Нитевидный объект достаточно сложен для описания из-за его хаотичности. При этом в отсутствии какого-либо упорядочивания системы можно считать, что в двухфазном диэлектрике с нитевидными включениями в среднем все направления равноправны, и это само по себе задаёт условие симметрии. Процесс поляризации такого диэлектрика может быть описан скалярной эффективной ДП ε_{eff} , определяемой уравнением (2.6).

Для интегрирования по объёмам V_1 , V_2 , относящимся к матрице и включениям, соответственно, необходимо обладать информацией о напряжённости поля $\mathbf{E}(\mathbf{r})$, как в матрице, так и внутри включений. Обозначим поле внутри матрицы как \mathbf{E}_1 . При рассмотрении поля в какой-либо точке нитевидного включения можно выделить фрагмент нити длиной много больше толщины с равноудалёнными от этой точки концами (рис. 1). Ввиду описанных выше требований к нитевидным включениям, всегда можно выбрать такой фрагмент, чтобы его форму можно было в первом приближении считать цилиндрической. При этом направление оси выделенного цилиндра может описываться углом θ относительно направления электрического поля \mathbf{E}_1 .

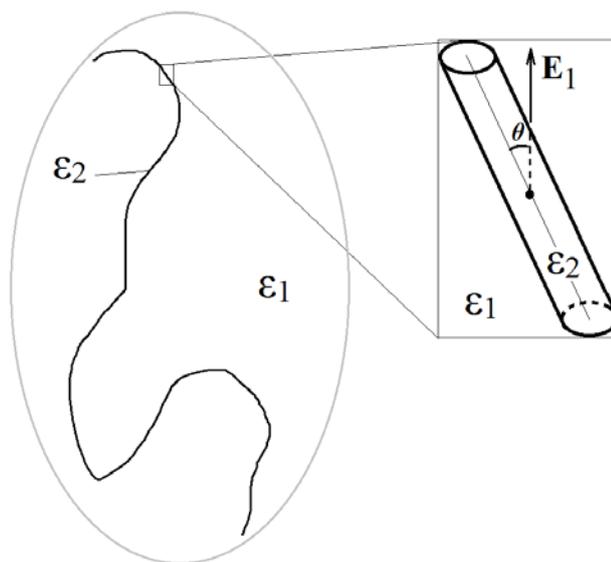


Рисунок 2.3. Выделение длинного приблизительно цилиндрического фрагмента из нитевидной структуры ϵ_2 , находящейся в однородном диэлектрике ϵ_1 с напряжённостью электрического поля \mathbf{E}_1 . Направление выделенного цилиндрического фрагмента определяется углом θ относительно направления электрического поля.

Таким образом, электрическое поле в любой точке нитевидного включения можно определить, опираясь на модель длинного цилиндрического диэлектрика ϵ_2 , находящегося в среде другого диэлектрика ϵ_1 с внутренним полем \mathbf{E}_1 . Решение данной задачи может быть получено на основании базовых закономерностей электродинамики сплошных сред [470]. Известно, что находясь во внешнем однородном электрическом поле, внутреннее поле диэлектрического эллипсоида однородно. Длинный (в идеале, бесконечный) цилиндр является предельным случаем этой задачи и также характеризуется однородным внутренним полем. Внутреннее поле такого цилиндрического диэлектрика \mathbf{E}_2 при внешнем поле \mathbf{E}_1 , перпендикулярном оси цилиндра, определяется следующим образом:

$$\mathbf{E}_2^n = \frac{2\varepsilon_1}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2} \mathbf{E}_1, \quad (2.7)$$

а при внешнем поле, параллельном оси цилиндра, \mathbf{E}_2 определяется из граничного условия для тангенциальных составляющих напряжённости поля:

$$\mathbf{E}_2^t = \mathbf{E}_1. \quad (2.8)$$

При направлении оси цилиндра под углом θ к полю \mathbf{E}_1 , внутреннее поле \mathbf{E}_2 , очевидно, определяется векторной суммой проекций:

$$\mathbf{E}_2 = E_1 * \cos \theta * \mathbf{l} + E_1 * \frac{2\varepsilon_1}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2} * \sin \theta * \mathbf{n}, \quad (2.9)$$

где \mathbf{l} – единичный вектор, направленный вдоль оси цилиндра, а \mathbf{n} – единичный вектор, перпендикулярный оси цилиндра и лежащий в плоскости векторов \mathbf{l} и \mathbf{E}_1 .

Ввиду хаотического расположения включений, единственное выделенное направление в рассматриваемой двухфазной системе определяется вектором \mathbf{E}_1 . Поэтому усреднение поля \mathbf{E} по объёму V_2 в формуле (2.6) тождественно усреднению проекции поля \mathbf{E}_2 на направление \mathbf{E}_1 :

$$\overline{\mathbf{E}_2} = \overline{(\mathbf{E}_2 * \mathbf{E}_1) \mathbf{E}_1 / E_1^2} = \overline{\left(\cos^2 \theta + \frac{2\varepsilon_1}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2} \sin^2 \theta \right)} \mathbf{E}_1 \quad (2.10)$$

Данная операция усреднения наиболее простым образом может быть выполнена с использованием сферической системы координат и интегрированием по телесному углу:

$$\overline{\mathbf{E}_2} = \frac{E_1}{4\pi} \int_0^{2\pi} d\varphi \int_0^\pi \left(\cos^2 \theta + \frac{2\varepsilon_1}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2} \sin^2 \theta \right) \sin \theta d\theta = \frac{1}{3} \left(\frac{5\varepsilon_1 + \varepsilon_2}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2} \right) \mathbf{E}_1, \quad (2.11)$$

Введём объёмную концентрацию нитевидных включений $f_2 = V_2/V$, тогда с учётом (2.11) выражение (2.6) преобразуется к виду:

$$(1 - f_2)\varepsilon_1 + \frac{f_2\varepsilon_2}{3} \left(\frac{5\varepsilon_1 + \varepsilon_2}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2} \right) = \varepsilon_{eff} \left(1 - f_2 + \frac{f_2}{3} \left(\frac{5\varepsilon_1 + \varepsilon_2}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2} \right) \right) \quad (2.12)$$

Отметим отдельно, что выражение (2.12) получено для нитевидных включений, состоящих из изотропного диэлектрика. В случае, когда ДП в поле поперечном ε_2^n и продольном ε_2^t относительно оси нитевидного включения отличаются, выражение для ε_{eff} несколько усложняется:

$$(1 - f_2)\varepsilon_1 + \frac{f_2}{3}\left(\varepsilon_2^t + \frac{4\varepsilon_1\varepsilon_2^n}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2^n}\right) = \varepsilon_{eff}\left(1 - f_2 + \frac{f_2}{3}\left(\frac{5\varepsilon_1 + \varepsilon_2^n}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2^n}\right)\right) \quad (2.13)$$

При малых концентрациях включений ($f_2 < 0.1$) с изотропными диэлектрическими свойствами, уравнение (2.12) можно упростить, записав ε_{eff} в виде разложения по f_2 с точностью до первого порядка малости:

$$\begin{aligned} \varepsilon_{eff} &= \frac{(1 - f_2)\varepsilon_1 + \frac{f_2\varepsilon_2}{3}\left(\frac{5\varepsilon_1 + \varepsilon_2}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2}\right)}{1 - f_2 + \frac{f_2}{3}\left(\frac{5\varepsilon_1 + \varepsilon_2}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2}\right)} \approx \\ &\approx \left((1 - f_2)\varepsilon_1 + \frac{f_2\varepsilon_2}{3}\left(\frac{5\varepsilon_1 + \varepsilon_2}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2}\right)\right) * \left(1 + f_2 - \frac{f_2}{3}\left(\frac{5\varepsilon_1 + \varepsilon_2}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2}\right)\right) \approx \\ &\approx \varepsilon_1 + f_2 \frac{(\varepsilon_2 - \varepsilon_1)(5\varepsilon_1 + \varepsilon_2)}{3(\varepsilon_1 + \varepsilon_2)} \end{aligned} \quad (2.14)$$

2.4.3. Применимость полученных соотношений для переменных полей

Напомним, что соотношения (2.12-2.14) были получены в электростатическом приближении. Рассмотрение той же системы в переменных полях является более общим случаем. Диэлектрический отклик может сложным образом зависеть от частоты, что связано с наличием различных типов поляризационных процессов, обусловленных строением вещества и проявляющихся в разных частотных диапазонах. При этом появляется частотно зависимый сдвиг фаз между векторами \mathbf{E} и \mathbf{P} , \mathbf{E} и \mathbf{D} , входящими в базовые зависимости (2.2-2.5). Для описания диэлектрических свойств в переменных полях обычно вводят комплексную ДП: $\varepsilon^* = \varepsilon' - i\varepsilon''$ [452,454]. Наличие мнимой части позволяет учитывать упомянутый сдвиг фаз, а также диэлектрические потери. Этот подход применим также для веществ, обладающих ненулевой проводимостью. Важно, что все основные соотношения между \mathbf{E} и \mathbf{D} , а, следовательно, и полученные выражения для ε_{eff} при этом сохраняют форму. Только ДП в этом случае рассматривается не как константа, а как комплексная функция частоты.

Однако имеется два условия, которые должны выполняться для правомерности указанного перехода к переменным полям [454]. Во-первых, размеры включений должны быть малы по сравнению с длиной волны излучения рассматриваемой частоты. Это гарантирует отсутствие процессов рассеяния на включениях. Во-вторых, некорректно рассмотрение гетерогенных систем в переменных полях с тотальным ослаблением поля хотя бы одной из

компонент. Это исключает применимость описанного подхода, например, при наличии металлических включений с размерами, превышающими толщину скин-слоя.

2.4.4. Экспериментальная проверка модели эффективной среды на примере раствора ДНК

В качестве экспериментальной проверки представленной теоретической модели эффективной среды был проведён контрольный эксперимент с водным раствором ДНК. Раствор готовили из натриевой соли ДНК из тимуса телёнка (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 80 мг/мл в воде MilliQ (Millipore, Германия). Помимо растворов готовили сухие образцы ДНК в виде плёнок на окнах из z-cut кварца путём высушивания растворов ДНК под вакуумом 1 мбар в течение 12 часов.

Производилось измерение спектров воды, раствора ДНК и сухой плёнки ДНК с помощью terahertz time-domain спектрометра TPS Spectra 3000 (Teraview, UK) согласно методикам, описанным в разделах 2.1 и 2.11.1.

В разделе 2.4.2. указано, что для нитевидных включений, обладающих изотропными диэлектрическими свойствами, применима формула (2.12). В случае отличий диэлектрических характеристик в поперечном и продольном направлении нитевидных включений необходимо использовать более точную формулу (2.13). Для ДНК имеются данные [471,472], согласно которым указанные отличия малы, поэтому в первом приближении их можно не учитывать.

Для использования формулы (2.12) необходимо знать объёмную долю включений f_2 . Этот параметр был рассчитан путём умножения массовой доли ДНК в растворе (8%) на удельный объём ДНК ($0.5 \text{ cm}^3/\text{g}$) [473], в результате $f_2 = 0.04$.

Модель эффективной среды (2.12), применительно к раствору ДНК, описывает взаимосвязь трёх комплексных ДП: воды, раствора ДНК и сухой ДНК. Все три экспериментально полученные ДП представлены на рисунке 2.4, вместе с теоретической ДП раствора ДНК, рассчитанной по формуле (2.12) с использованием ДП воды и сухой ДНК. Очевидно, теоретические кривые хорошо совпадают с экспериментальными. Это свидетельствует об адекватности полученной теоретической модели (2.12). Небольшие отличия между теоретическими и экспериментальными кривыми можно объяснить (помимо погрешности эксперимента и небольшой степени анизотропии ДНК) неоднородностью свойств воды в растворе ДНК. Хорошо известно, что вблизи биологических макромолекул вода претерпевает изменения, формируя гидратную оболочку. Диэлектрические свойства гидратной

воды отличаются от невозмущённой воды, что может вносить свой вклад в ДП. Этот аспект будет подробно рассмотрен в разделе 2.11.

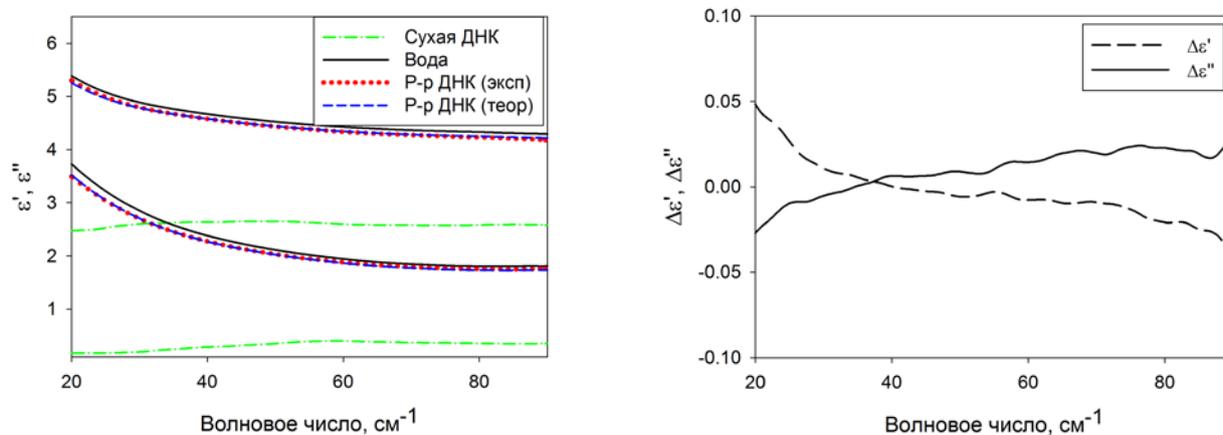


Рисунок 2.4. Слева: ДП (действительные ϵ' и мнимые ϵ'' части) сухой ДНК, воды, водного раствора ДНК (экспериментальные и теоретически рассчитанные). Справа: разность экспериментальных и теоретических спектров ϵ' и ϵ'' раствора ДНК.

Напомним, что формула (2.12) была получена в электростатическом приближении и обобщена на случай переменных полей с условием малости отношения размера включений к длине волны. Это означает, что модель (2.12) применительно к растворам ДНК корректна не только в подтверждённом ТГц диапазоне, но и во всей более длинноволновой (низкочастотной) области спектра.

2.4.5. Применимость модели эффективной среды для растворов фибриллярных биополимеров

Разработанная в разделе 2.4.2 теоретическая модель эффективной среды может использоваться для анализа ДП двухфазных систем с нитевидными включениями. Это могут быть различные полимеры в соответствующих растворителях, сохраняющие химическую стабильность. Видится, что в биологических исследованиях наибольшее применение она найдёт при исследовании растворов биополимеров. В разделе 2.4.4 уже была продемонстрирована её применимость для раствора ДНК [465,474]. Кроме этого, очевидно, она может использоваться для анализа растворов фибриллярных белков [475,476], фибриллярных белковых агрегатов [477,478], полисахаридов [209,479].

2.5. Расчёт параметров диэлектрической проницаемости воды в ТГц диапазоне

Как описано в разделе 2.1, идея исследования гидратации биомолекул в водном растворе сводится к сравнению характеристик воды раствора биомолекул и растворителя. При сравнении их ДП оказывается, что это гладкие нехарактеристичные спектры, немного смещённые друг относительно друга (рисунки 2.8, 2.11, 2.15, 2.18, 2.23), и визуальное отличие в ДП не позволяет получить какую-либо конкретную информацию об изменениях структурно-динамических характеристик воды в гидратных оболочках. Поэтому требуется более глубокий анализ спектров ДП для извлечения параметров с ясным физическим смыслом, относящимся к структуре и динамике воды изучаемых растворов.

В настоящей работе для анализа спектров ДП использовался подход на основе фитинга. Строилась модельная ДП воды, и реализовывался её фитинг к ДП, полученным экспериментально для изучаемых растворов. Это позволяет рассчитывать значения параметров модельной ДП, характеризующих межмолекулярную структуру и динамику воды. Для построения модельной ДП воды необходимо учесть вклад всех основных молекулярно-динамических процессов, ответственных за наличие областей дисперсии в анализируемой частотной области ($10 - 110 \text{ см}^{-1}$). В указанном диапазоне проявляются следующие процессы (рисунок 2.5):

1. Дебаевская релаксация – ориентационная релаксация связанных молекул воды. Они могут быть связаны как водородными связями в структуре невозмущённой воды, так и будучи в гидратных оболочках под влиянием кулоновского поля ионов [11,12,36,37,480,481]. Акт ориентационного движения молекулы воды реализуется после получения энергии активации, приводящей к её высвобождению из связанного состояния с последующим связыванием в другой позиции. В спектре водных растворов это интенсивная широкая область дисперсии с максимумом поглощения $\sim 1 \text{ см}^{-1}$ (сильно зависит от температуры и растворённых веществ [480,481]). Время дебаевской релаксации отражает характерное время существования молекул воды в связанном состоянии. Чем сильнее связана молекула, тем больше время дебаевской релаксации.
2. Высокочастотная релаксация, обнаруживаемая в спектрах любых водных растворов как слабая полоса, с максимумом $\approx 10-20 \text{ см}^{-1}$. Данный тип молекулярной динамики воды относят к процессу ориентационной релаксации свободных молекул воды [34–38]. Под свободными понимаются молекулы, не связанные ни одной водородной связью и не находящиеся в сильном поляризующем кулоновском поле ионов. Возможно, данная фракция гипермобильных молекул содержит некоторую примесь слабо связанных молекул воды, например, молекул с одной сильно искажённой водородной связью [37], но данный вопрос пока открыт в мировой науке.

Время высокочастотной релаксации характеризует время переориентации свободных молекул воды.

3. Межмолекулярные (трансляционные) продольные колебания молекул воды, связанных водородными связями [49–51]. Широкая интенсивная колебательная полоса с максимумом ≈ 200 см^{-1} .
4. В ряде работ выделяют также поперечные трансляционные колебания связанных водородными связями молекул воды [50–52]. Данная полоса с максимумом около ≈ 50 см^{-1} отчётливо наблюдаются в спектрах комбинационного рассеяния [50,53] ввиду достаточно сильно изменения поляризуемости молекул при данном типе колебаний. При этом в спектрах поглощения она проявляется чрезвычайно слабо [51,52], её интенсивность примерно в 30 раз меньше, чем интенсивность продольной трансляционной полосы. Это, очевидно, связано с малым дипольным моментом перехода на данный колебательный уровень, а значит она также крайне слабо должна проявляться в диэлектрических спектрах.

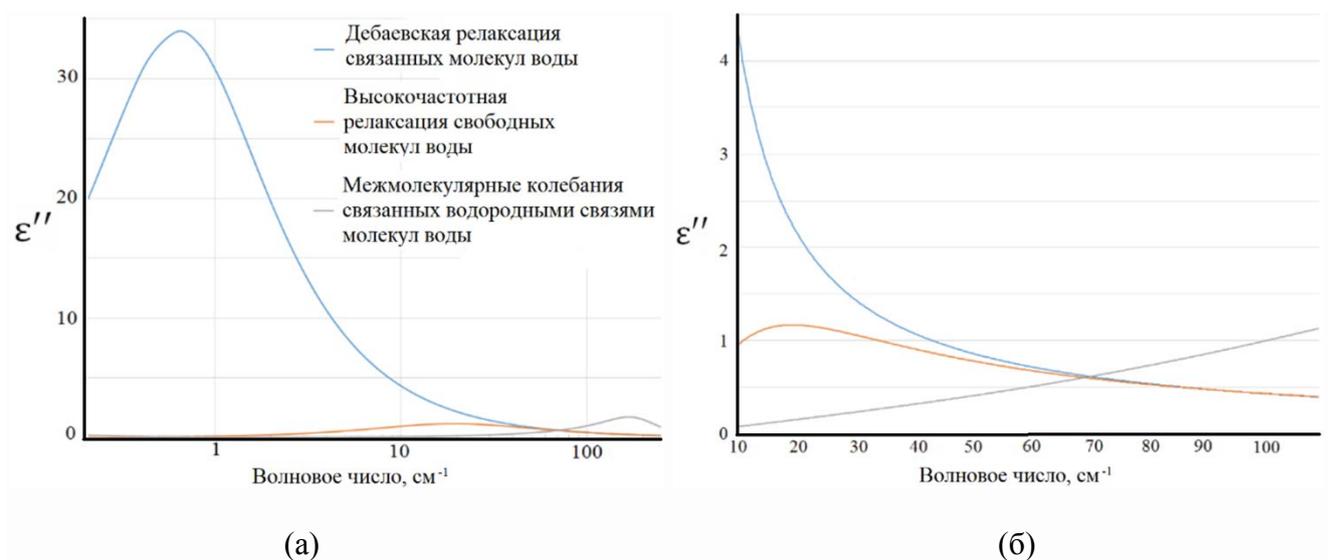


Рисунок 2.5. Разложение на полосы мнимой части ДП воды при 25°C. Слева показан общий вид спектра в широком диапазоне частот, справа – в анализируемом ТГц интервале.

В настоящей работе использовалась модель ДП воды, включающая в себя первые три спектральные полосы из четырёх перечисленных, а также ионную проводимость:

$$\epsilon_w^* = \frac{\Delta\epsilon_1}{1-i\omega\tau_1} + \frac{\Delta\epsilon_2}{1-i\omega\tau_2} + \frac{A_1}{\omega_1^2 - \omega^2 - i\omega\gamma_1} + \epsilon_\infty + i \frac{\sigma_0}{\epsilon_0\omega}, \quad (2.15)$$

где $\tau_{1,2}$ – время релаксации связанных и свободных молекул воды; $\Delta\epsilon_{1,2}$ – вклад соответствующих релаксационных процессов в общий диэлектрический отклик воды; A_1 – амплитуда продольной трансляционной полосы; ω_1 – резонансная частота; γ_1 – параметр,

имеющий смысл ширины полосы; ε_∞ – высокочастотная ДП (в области более высоких частот относительно колебательной полосы); ω – циклическая частота; i – мнимая единица, а член $i \frac{\sigma_0}{\varepsilon_0 \omega}$ описывает диэлектрические потери, связанные с ионной проводимостью (σ_0 – проводимость в постоянном электрическом поле, ε_0 – электрическая постоянная).

Каждый член модельной ДП (2.15) описывает определённый тип структуры и динамики воды с привлечением вполне определённых физических параметров, таких как время ориентационной релаксации, частота межмолекулярных колебаний, вклад того или иного молекулярно-динамического процесса в общий диэлектрический отклик и т. д. Единственная полоса из анализируемого диапазона, которая не была включена в рассмотрение – полоса поперечных трансляционных колебаний. Эта полоса намного слабее остальных и не вносит существенного вклада в ДП. К тому же её учёт добавил бы ещё три параметра в модель ДП, что подразумевает большие неопределённости в расчётах всех параметров модели в процессе фитинга.

Модель (2.15) всего содержит 9 параметров: τ_1 , τ_2 , $\Delta\varepsilon_1$, $\Delta\varepsilon_2$, A_1 , ω_1 , γ_1 , ε_∞ , σ_0 . Часть этих параметров исключалась из рассмотрения. Параметр σ_0 определялся с помощью прямых измерений проводимости. Параметр высокочастотной ДП ε_∞ можно считать постоянным, поскольку он почти не меняется среди слабо отличных растворов, к тому же его вариации практически не влияют на значения остальных параметров, определяемых в процессе фитинга. Для этого параметра использовалось постоянное значение 2.5, соответствующее величине действительной части ДП воды вблизи 300 см^{-1} .

Также из фитинга исключался параметр τ_1 на основании следующих соображений. В анализируемом спектральном интервале ($10 - 110 \text{ см}^{-1}$) выполняется следующее соотношение параметров: $\omega\tau_1 \gg 1$, следовательно, по первому члену модельная ДП (2.15) зависит от отношения $\Delta\varepsilon_1/\tau_1$. Это означает, что изменение модельных спектров при уменьшении $\Delta\varepsilon_1$ практически аналогично увеличению τ_1 . Здесь важно отметить, что при усилении связывания молекул воды эти параметры меняются именно таким образом: происходит снижение амплитуды дебаевской полосы $\Delta\varepsilon_1$ и увеличение времени релаксации τ_1 [13,203,204,482–484]. Поскольку, как будет показано далее, данная полоса использовалась для анализа изменения связанности молекул воды, нет смысла в процессе фитинга определять оба эти параметра. Поэтому в настоящей работе варьировался параметр $\Delta\varepsilon_1$, а параметр τ_1 фиксировался на значении для чистой воды при заданной температуре, взятом из [485]. В итоге, в модели (2.15) остались следующие варьируемые параметры: $\Delta\varepsilon_1$, $\Delta\varepsilon_2$, τ_2 , A_1 , ω_1 , γ_1 .

В данном случае информативность предлагаемого подхода зависит от двух факторов: количества параметров и точности их расчёта. При малом количестве параметров страдает полнота описания, а при слишком большом – точность фитинга. Опытным путём описанный подход был выбран как оптимальный.

Процедура фитинга реализовывалась с помощью программы, написанной на языке C++. Алгоритм сводился к перебору значений параметров модельной ДП и поиску минимального отклонения s модельной ДП $\varepsilon_w^{\text{МОД}}$ от экспериментальной ДП $\varepsilon_w^{\text{ЭК}}$ согласно следующему критерию:

$$s = \frac{1}{N} \sqrt{\sum_{i=1}^N \left[\left(\frac{\varepsilon_w^{\text{ЭК}}(\omega_i) - \varepsilon_w^{\text{МОД}}(\omega_i)}{\varepsilon_w^{\text{МОД}}(\omega_i)} \right)^2 + \left(\frac{\varepsilon_w^{\text{ЭК}}(\omega_i) - \varepsilon_w^{\text{МОД}}(\omega_i)}{\varepsilon_w^{\text{ЭК}}(\omega_i)} \right)^2 \right]} \quad (2.16)$$

где $N=250$ – число точек в спектре. Сама численная процедура фитинга была построена по принципу последовательного перебора всех значений сетки параметров, без использования итерационных процедур. Это позволяло гарантированно находить глобальный минимум при реализации численной процедуры. Интервалы перебора значений параметров выбирались так, чтобы при уменьшении их в два раза не происходило заметного изменения результата фитинга.

2.6. Интерпретация параметров в терминах межмолекулярной структуры и динамики воды

В результате процедуры фитинга, описанной в разделе 2.5, рассчитывались параметры модельной ДП, характеризующие водную фазу раствора биомолекул, а также параметры аналогичного раствора без биомолекул. Это позволяет сравнить состояние воды в присутствии и отсутствии биомолекул по ряду параметров. Установив отличие в значении какого-либо параметра можно дать интерпретацию этим отличиям на молекулярном уровне и сделать выводы о структурно-динамических характеристиках гидратных оболочек биомолекул. Каждый параметр несёт в себе определённый физический смысл.

Амплитуда полосы дебаевской релаксации $\Delta\varepsilon_1$ характеризует вклад дебаевской релаксации в диэлектрический отклик раствора. Уменьшение этой величины свидетельствует о проявлении процессов деполяризации в растворе. При рассмотрении диэлектрических характеристик растворов выделяют несколько типов процесса деполяризации [482,486–489]:

1. эффект разбавления – вытеснение молекул воды ионами;

2. кинетическая деполяризация – движение ионов в поле приводит к влиянию на ориентацию молекул воды;

3. статическая деполяризация – растворённые вещества частично связывают молекулы воды в гидратных оболочках, что приводит к уменьшению их подвижности.

При невысоких концентрациях свободных ионов (порядка физиологических значений) в растворах вклад эффекта разбавления не превышает 1% и им можно с хорошей точностью пренебречь. Именно такие концентрации солей, как правило, требуются для сохранения нативной структуры биомолекул. Кинетическая деполяризация тоже определяется долей свободных ионов, а также суммарной ионной проводимостью раствора. Как показано, например, в работе [487], при концентрации ионов вплоть до 2-3 М вклад кинетической деполяризации не превышает 1%. Это означает, что эффектом кинетической деполяризации без существенного ущерба точности тоже можно пренебречь. В итоге, уменьшение величины $\Delta\epsilon_1$ в присутствии биомолекул в растворах умеренных концентраций солей практически полностью определяется процессами статической деполяризации и свидетельствует о переходе части молекул воды в более связанное состояние.

Высокочастотная релаксационная полоса, определяющаяся параметрами $\Delta\epsilon_2$ и τ_2 , соответствует ориентационной релаксации свободных молекул воды. В данном контексте под свободными понимаются молекулы, не связанные водородными связями и не находящиеся в сильно поляризующих их кулоновских полях ионов. Увеличение/уменьшение амплитуды $\Delta\epsilon_2$, как правило, соответствует увеличению/уменьшению количества свободных молекул воды в растворе. Параметр τ_2 определяет среднее время переориентации этих молекул.

Полоса, описываемая параметрами A_1 , ω_1 и γ_1 , характеризует межмолекулярные колебания связанных водородными связями молекул воды. Увеличение/уменьшение резонансной частоты ω_1 указывает на увеличение/уменьшение средней энергии водородных связей. Увеличение/уменьшение параметра γ_1 свидетельствует об уширении/уменьшении ширины распределения энергий межмолекулярных водородных связей. Изменение амплитуды колебательной полосы A_1 характеризует изменение вклада межмолекулярных колебаний связанных водородными связями молекул воды в спектр водного раствора. Это может быть обусловлено двумя факторами: изменением количества водородных связей (количество молекулярных осцилляторов), либо изменением среднего дипольного момента межмолекулярных колебаний. Увеличение/уменьшение дипольного момента колебания сопряжено с увеличением/уменьшением амплитуды колебания, которая, как известно, связана с

энергией водородной связи. А именно, с увеличением энергии связи её длина и амплитуда колебания уменьшаются и наоборот [490]. Как было отмечено выше, изменение средней энергии водородных связей в растворе может быть идентифицировано по изменению параметра ω_1 . То есть для того, чтобы сделать правильный вывод о причинах отличия в значении параметра A_1 необходимо рассматривать также и изменение по параметру ω_1 . Если же отличий по параметру ω_1 не наблюдается, то увеличение/уменьшение параметра A_1 однозначно свидетельствует об увеличении/уменьшении числа водородных связей в растворе.

В диэлектрической спектроскопии при анализе вклада отдельного колебательного процесса в ДП чаще рассматривают не параметр A , а комбинированный параметр A/ω^2 . Этот параметр имеет размерность, аналогичную амплитудам релаксационных полос $\Delta\varepsilon$, что в ряде случаев делает рассмотрение диэлектрических характеристик более удобным. Однако, когда изменяются оба параметра A и ω , более информативным является рассмотрение их по отдельности.

2.7. Расчёт количества свободных молекул воды в водных растворах

Как было указано при описании модели (2.15), второй её член связан с ориентационной релаксацией свободных молекул воды, следовательно, амплитуда $\Delta\varepsilon_2$ должна быть связана с их количеством. Рассчитать долю свободных молекул воды можно на основании рассмотрения процессов молекулярной поляризации воды в электрическом поле.

Можно выделить несколько типов процессов поляризации воды: ориентационная поляризация молекул, связанных водородными связями, происходящая при разрыве этих связей; ориентационная поляризация свободных молекул; также имеется множество более быстрых поляризационных процессов, таких как смещение ядер в молекуле и электронная поляризация. Каждый из этих процессов реализуется за свои характерные времена и даёт определённый вклад в общее изменение дипольного момента, следовательно, в ДП. Отметим, что любой тип поляризации вещества, будучи связан с изменением дипольного момента, проявляется в виде области дисперсии в спектрах ДП и относится к определённому релаксационному или колебательному молекулярному процессу. Каждый такой процесс, как это схематично показано на рисунке 2.6, сопряжён с определённым вкладом в статическую ДП. Вклад релаксационных процессов определяется их амплитудой $\Delta\varepsilon_1$ и $\Delta\varepsilon_2$, а вклад молекулярных колебаний – величиной A_1/ω_1^2 (см. формулу 2.15). Каждый тип молекулярной поляризации аддитивным образом участвует в общей поляризации вещества, поэтому может

рассматриваться отдельно от других. Однако при этом необходимо учесть экранировку электрического поля со стороны других поляризационных процессов. Понятно, что рассматривая отдельный процесс поляризации на характерных для него временах, эффективная экранировка будет реализовываться за счёт соизмеримых по времени или более быстрых поляризационных процессов. При рассмотрении ориентационной релаксации свободных молекул, единственным более медленным процессом является дебаевская релаксация, со временем релаксации в 20-30 раз меньше. Это означает, что экранировкой со стороны данного типа поляризации в первом приближении можно пренебречь.

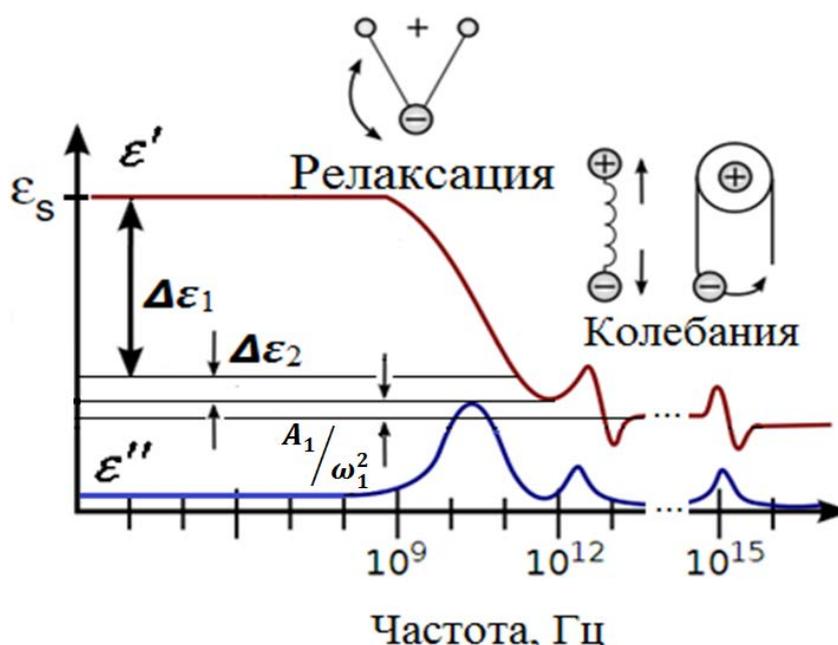


Рисунок 2.6. Схематичное изображение связи ДП воды с молекулярными релаксационными и колебательными процессами на разных частотах [491].

Согласно модели (2.15), вклад процесса ориентационной поляризации свободных молекул воды в ДП определяется величиной $\Delta\epsilon_2$, а вклад всех более быстрых поляризационных процессов выражается следующим образом:

$$\epsilon'_{\infty} = \frac{A_1}{\omega_1^2} + \epsilon_{\infty} \quad (2.17)$$

Для описания процесса поляризации воды в области частот между двумя релаксационными полосами воды можно использовать соотношение, по смыслу аналогичное формуле Дебая-Ланжевена:

$$\frac{\bar{\epsilon} - 1}{\bar{\epsilon} + 2} = N \frac{4\pi}{3} \left(\alpha_{\infty} + n \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{p^2}{3kT} \right) \quad (2.18)$$

где $\tilde{\epsilon} = \Delta\epsilon_2 + \epsilon'_{\infty}$, N – число молекул воды в единице объёма, α_{∞} – высокочастотная поляризуемость, n – доля свободных молекул воды, p – дипольный момент молекулы воды, k – постоянная Больцмана, T – абсолютная температура. Соотношение (2.18) отличается от формулы Дебая-Ланжевена тем, что содержит величину n перед членом, определяющим ориентационную поляризацию. Данный коэффициент определяет долю свободных молекул воды, поскольку только они в рассматриваемой частотной области способны активно реализовывать ориентационную поляризацию, тогда как в более быстрых поляризационных процессах участвуют все N молекул.

Для высокочастотной поляризуемости α_{∞} можно записать следующее соотношение:

$$\frac{\epsilon'_{\infty} - 1}{\epsilon'_{\infty} + 2} = N \frac{4\pi}{3} \alpha_{\infty}, \quad (2.19)$$

являющееся аналогом формулы Лоренца-Лоренца для дальней ИК-области.

Исключая величину α_{∞} из уравнения (2.18) с использованием соотношения (2.19) и учитывая соотношение (2.17), можно получить формулу для n :

$$n = \frac{3\Delta\epsilon_2}{(\Delta\epsilon_2 + A_1/\omega_1^2 + \epsilon_{\infty} + 2)(A_1/\omega_1^2 + \epsilon_{\infty} + 2)} * \frac{9kT\epsilon_0}{Np^2}. \quad (2.20)$$

Если в формулу (2.20) подставить константы $k=1.38 \times 10^{23}$ Дж/К, $p=6.17 \times 10^{-30}$ Кл*м, $N=N_A \times 55.56 \times 10^3$ молекул/м³, $N_A=6 \times 10^{23}$ молекул/моль, то расчётная формула для процента свободных молекул воды может быть записана следующим образом:

$$n[\%] = \frac{0.26 * \Delta\epsilon_2 * T[^\circ\text{K}]}{(\Delta\epsilon_2 + A_1/\omega_1^2 + \epsilon_{\infty} + 2) * (A_1/\omega_1^2 + \epsilon_{\infty} + 2)} \quad (2.21)$$

Температура T задаётся в эксперименте, а параметры $\Delta\epsilon_2$, A_1 , ω_1 и ϵ_{∞} определяются на основании процедуры фитинга, как это описано в разделе 2.5. Таким образом, с помощью формулы (2.21) можно рассчитывать процент свободных молекул воды в растворах на основании спектров ДП в ТГц области.

2.8. Гидратация белков

В данном разделе описаны результаты исследования гидратации белка в растворе на примере бычьего сывороточного альбумина (БСА) в различных конформациях.

2.8.1. Материалы и методы

Растворы БСА (чистота 98%, Amresco, США) готовили в концентрации 50 мг БСА на 1 мл растворителя или 4.762вес%. В качестве растворителя для белковых растворов использовался раствор NaCl (Sigma-Aldrich corp., США) в концентрации 10 mM в деионизованной воде MilliQ (Millipore, Germany). Растворы анализировались при следующих значениях pH: 2.5, 4.2, 6, 8, 10. Требуемые значения pH достигались с использованием добавок HCl и NaOH (Sigma-Aldrich corp., США). Помимо растворов БСА, анализировался водный растворитель без БСА при тех же значениях pH, солевом составе. Температура всех анализируемых растворов стабилизировалась при 25 ± 0.1 °C.

Для анализа стабильности белковых молекул (отсутствие агрегации) использовался метод ДСР, позволяющий регистрировать распределения по размерам белковых молекул в растворе. Измерения проводились на приборе Zetasizer nano ZS (Malvern, UK). Также с использованием данной техники в режиме измерения ζ -potential определялась проводимость растворов σ_0 , необходимая для учёта в модельной ДП (2.15). Измерения проводимости выполняли в капиллярных кюветах с электродами DTS1060 (Malvern, UK). Измерение pH проводилось с помощью автотитратора МРТ-2, входящего в комплект Zetasizer nano ZS.

Расчёт ДП водной фазы раствора БСА производился с использованием модели эффективной среды Бруггемана (1.18):

$$f_p \frac{\varepsilon_p^* - \varepsilon_s^*}{\varepsilon_p^* + 2\varepsilon_s^*} + (1 - f_p) \frac{\varepsilon_w^* - \varepsilon_s^*}{\varepsilon_w^* + 2\varepsilon_s^*} = 0. \quad (2.22)$$

где ε_p^* , f_p – комплексная ДП белка и объёмная доля белка; ε_{sol}^* и ε_w^* – комплексные ДП раствора белка и его водной фазы, соответственно. Для использования соотношения (2.22) при расчёте ε_w^* необходимо знать действительную ε_p' и мнимую ε_p'' части функции ε_p^* в исследуемой частотной области. Из данных работы [492] можно извлечь приближённые значения ε_p' и ε_p'' для БСА: на 1 ТГц они составляют 2.89 и 0.26, соответственно. Для воды величины ε_w' и ε_w'' на частоте 1 ТГц составляют около 4.6 и 2.6, причём близкие к этим соотношения между ДП воды и БСА сохраняются в диапазоне частот от 10 см^{-1} – 100 см^{-1} . Таким образом, величина ε_p'' оказывается на порядок меньше, чем величины ε_w' , ε_w'' и ε_p' во всём анализируемом диапазоне частот, и на основании этого ей можно пренебречь для упрощения расчётов. То есть можно считать, что ДП белка ε_p^* содержит только действительную часть $\varepsilon_p' = 2.89$, которая слабо меняется в анализируемом диапазоне частот, поэтому может считаться константой.

Уравнение (2.22) содержит комплексные переменные и может быть переписано в виде системы двух уравнений с действительными переменными. Решение данной системы уравнений относительно ε'_w и ε''_w выглядит следующим образом:

$$\begin{cases} \varepsilon'_w = \frac{b}{a} * \frac{c*b-a*d}{b^2+a^2} - \frac{c}{a}, \\ \varepsilon''_w = \frac{c*b-a*d}{b^2+a^2}. \end{cases}$$

$$a = \varepsilon'_p + (2 - 3f_p) * \varepsilon'_{sol},$$

$$b = (2 - 3f_p) * \varepsilon''_{sol}, \quad (2.23)$$

$$c = (3f_p - 1) * \varepsilon'_p * \varepsilon'_{sol} + 2(\varepsilon''_{sol}{}^2 - \varepsilon'_{sol}{}^2),$$

$$d = (3f_p - 1) * \varepsilon'_p * \varepsilon''_{sol} - 4\varepsilon'_{sol}\varepsilon''_{sol}.$$

Для расчёта ε'_w , ε''_w нужно знать объёмную долю белка в растворе, которая рассчитывалась путём деления массовой доли БСА на плотность белка. Как известно [493], плотность глобулярных белков более 30 кДа практически одинакова и составляет примерно 1.41 г/см³. То есть 50 мг белка в 1 мл раствора соответствует 35.5 мкл, следовательно, объёмная доля белка в растворе составляла 0.034. Функции ε'_{sol} и ε''_{sol} рассчитывались из спектров растворов по формулам (1.15), величины ε'_p и f_p известны. Таким образом, имелись все необходимые данные для расчёта ДП водной фазы раствора белка (ε'_w и ε''_w) с использованием соотношений (2.23).

2.8.2. Характеристики гидратации белка в различных конформациях

Значения рН растворов (2.5, 4.2, 6, 8, 10), при которых анализировалась гидратация БСА, были выбраны на основании данных о конформационных изменениях молекулы БСА. При каждом из указанных рН белок находится в отличной от других конформации [243–245]:

- При рН=2–3.5 преобладает Е-форма (развернутая). Для данного конформера характерно разрушение внутреннего спирального участка домена I. Частичное разворачивание молекул БСА в растворе регистрировалось по увеличению размера белковых молекул (рисунок 2.7).

- При рН=3.5–4.5 образуется F-форма (быстрая) в результате обратимого перехода из нативного состояния. Переход связан с разворачиванием домена III. F-форма характеризуется

значительной потерей α -спиральных структур. Было также обнаружено существование при рН 4.2 димеров, без примеси крупных дисульфидно-сшитых агрегатов.

- При рН=5–7 наблюдается N-форма (нативная).

- При рН=7–9 образуется В-форма (основная) в результате перехода из нативного состояния, который сопряжен с изменениями в домене I.

- При рН=9–11 белок разворачивается в результате структурной перестройки домена III, что обуславливает образование А-формы (агрегированной, зрелой). Агрегация молекул белка при данном значении рН регистрировалась по увеличению размера белковой фракции (рисунок 2.7). Средний размер увеличивается несильно, что свидетельствует о сохранении значительной части структуры белка и образовании лишь небольших агрегированных форм.

- При рН>11 происходит необратимая денатурация и осаждение белка, с разрушением даже вторичной структуры.

В работе проводился контроль растворов БСА на предмет белковой агрегации. Для этого до и после проведения спектральных исследований измерялись распределения по размерам БСА в растворах. Заметных изменений ни у одного раствора БСА обнаружено не было. Распределения белка по размерам (рисунок 2.7) свидетельствуют об отсутствии значимого количества крупных агрегатов (более 12 нм) белковых молекул при всех конформациях. Таким образом, при пяти выбранных значениях рН молекулы БСА сохраняют коллоидную стабильность, находясь в основном в мономерной форме, но между собой отличаются на уровне вторичной и третичной структуры с некоторыми модификациями поверхности белковой молекулы, взаимодействующей с водным окружением. Целью данного исследования было показать отличия характеристик гидратации одного и того же белка в разных конформациях. Стоит отметить также, что выбранная концентрация альбумина близка к концентрации данного белка в крови. То есть описанные далее особенности влияния белка на свойства воды в некоторой степени имеют отношение к реальным высокоорганизованным биологическим системам.

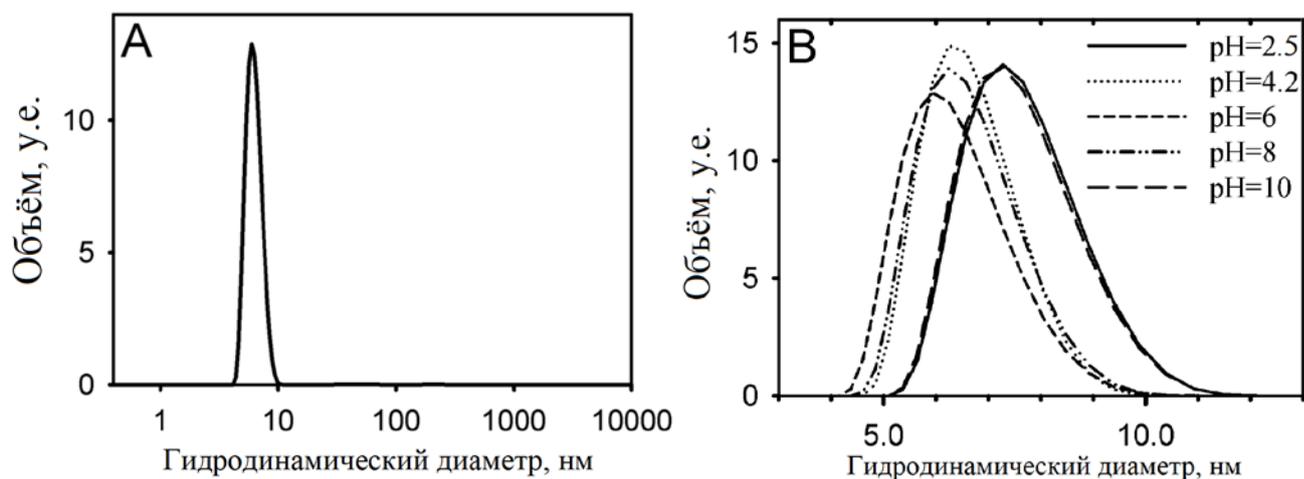


Рисунок 2.7. Характерное распределение по размерам БСА в растворе в диапазоне 0.4 нм – 10 мкм (слева); распределения по размерам БСА при различных значениях рН (справа).

На рисунке 2.8 представлены ДП водной фазы растворов БСА и ДП растворителя (аналогичных растворов, но без БСА) при всех анализируемых значениях рН, а в таблице 2.1 содержатся параметры, рассчитанные для указанных ДП.

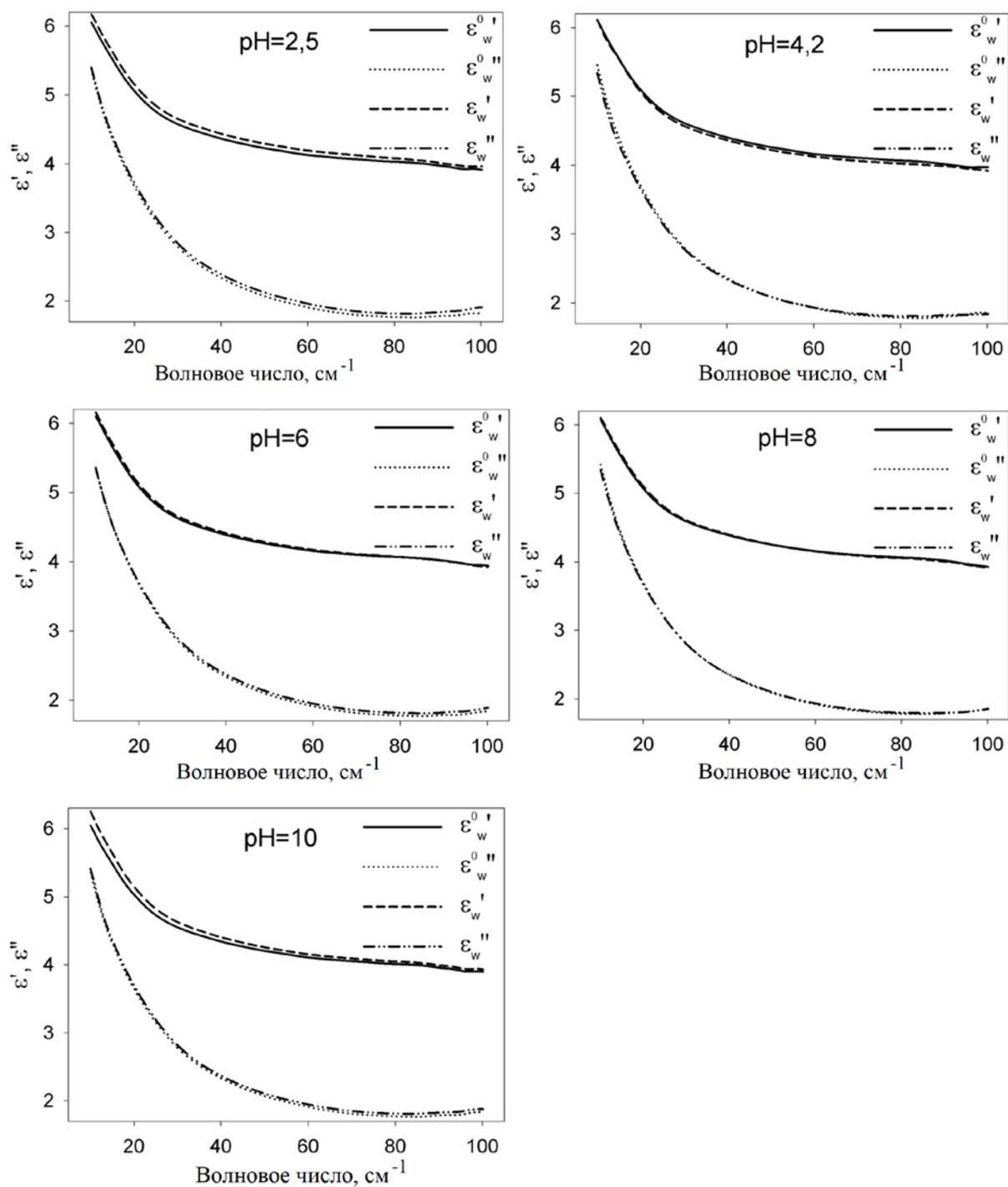


Рисунок 2.8. Средние спектры действительных (ϵ') и мнимых (ϵ'') частей ДП водной фазы растворов БСА (ϵ_w) и аналогичного водного растворителя без БСА (ϵ_w^0) при различных значениях рН.

Таблица 2.1*. Параметры модельной ДП (2.15) водной фазы растворов БСА и растворителя (аналогичных растворов, но без БСА) при всех проанализированных рН.

Образец	$\Delta\varepsilon_1$	$\Delta\varepsilon_2$	τ_2 , пс	ω_1 , см^{-1}	$\frac{A_1}{1000}$, см^{-2}	γ_1 , см^{-1}	s^*10^4
рН 2.5	69.4±1.0	<u>2.55±0.05</u>	0.308±0.005	189±4	189±4	50.2±3.1	6.3
БСА рН 2.5	68.1±0.5	<u>2.69±0.05</u>	0.308±0.007	185±3	185±3	50.7±2.0	7.4
рН 4.2	<u>69.9±0.6</u>	2.60±0.04	0.310±0.004	185±5	185±5	50.2±3.6	6.5
БСА рН 4.2	<u>67.5±0.7</u>	2.63±0.06	0.310±0.007	181±5	181±5	47.1±3.3	7.8
рН 6	68.7±0.5	2.61±0.04	0.313±0.005	186±3	186±3	50.8±2.2	6.2
БСА рН 6	68.2±0.5	2.66±0.04	0.310±0.006	184±3	184±3	49.5±1.7	7.4
рН 8	<u>70.1±0.5</u>	2.56±0.04	0.311±0.005	186±3	186±3	50.9±2.1	6.1
БСА рН 8	<u>68.7±0.7</u>	2.58±0.07	0.303±0.009	188±6	188±6	52.1±5.2	6.6
рН 10	<u>68.7±0.7</u>	<u>2.58±0.05</u>	<u>0.309±0.005</u>	182±3	182±3	46.3±1.9	6.5
БСА рН 10	<u>65.6±0.6</u>	<u>2.88±0.03</u>	<u>0.332±0.003</u>	185±4	185±4	50.6±3.2	5.7

*Результаты представлены в виде парных сравнений водной фазы раствора БСА и растворителя при одинаковом рН. В первой колонке указано значение рН раствора, а также наличие или отсутствие БСА в нём. Погрешность представляет собой 95% доверительные интервалы среднего с объёмом выборок 25. Жирным шрифтом отмечены пары сравниваемых значений параметров, по которым обнаружены достоверные отличия. В последней колонке содержится средняя ошибка фитинга, рассчитанная по формуле (2.16).

Из таблицы 2.1 видно, что имеются отличия между водной фазой раствора белка и растворителем по разным параметрам, и для каждой конформации белка отличия свои. Это означает, что влияние молекулы белка на водную фазу отличается при различных конформациях. Говоря о влиянии белка на водную фазу раствора, имеется в виду, что часть водной фазы занята гидратными оболочками, которые по своей молекулярной организации отличаются от невозмущённой воды, как в растворителе или вдали от молекулы белка, то есть это проявления гидратации. Отметим, что гидратация белка во всех конформациях характеризуется изменением релаксационных параметров $\Delta\varepsilon_1$, $\Delta\varepsilon_2$, τ_2 , а по параметрам межмолекулярных колебаний A_1 , ω_1 , γ_1 значимых отличий не обнаружено.

Анализируя изменение воды в растворе под действием белка, важно понимать характерный объём этой гидратной воды в расчёте на одну молекулу белка. Как показано в ряде работ, терагерцовая спектроскопия позволяет регистрировать достаточно протяжённые гидратные оболочки [220–222] 10–50 Å. Такая протяжённость в случае БСА с характерным размером 7 нм соответствует объёму, занимаемому гидратными оболочками от 120 до 1300% от

объёма белка. То есть объём воды, модифицированной присутствием белка в растворе, существенно превосходит объём, самого белка.

Интересно отметить, что наименее выраженная гидратация белка реализуется в его нативной конформации при рН 6, поскольку ни по одному из параметров не обнаружено значимых отличий между водной фазой раствора белка и растворителем (таблица 2.1).

При рН 4.2 и 8 гидратация белка проявляется в уменьшении параметра $\Delta\varepsilon_1$ (таблица 2.1), что свидетельствует об усилении связанности воды в гидратных оболочках при соответствующих конформациях.

При рН 2.5 главной характеристикой гидратации белка является увеличение параметра $\Delta\varepsilon_2$ (таблица 2.1), что говорит о повышенном количестве свободных молекул воды в его гидратных оболочках, по сравнению с невозмущённой водой. Данный результат объясняется тем, что при рН 2.5 белок пребывает в форме расплавленной глобулы. При этом гидрофобные участки молекулы белка частично экспонируются в воду и, естественно, приводят к её разрушению, что сопряжено с наличием большего количества свободных молекул в гидратных оболочках.

Наиболее сильные эффекты гидратации отмечены для конформации белка при рН 10 (таблица 2.1). Это единственная конформация, у которой, кроме существенно больших, чем у других конформаций, отличий по параметрам $\Delta\varepsilon_1$ и $\Delta\varepsilon_2$, также зарегистрировано увеличение по параметру τ_2 . Поскольку при рН 10 молекулы БСА приобретают склонность к агрегации [244], то в агрегатах между объединёнными молекулами белка могут создаваться особые условия для гидратации, отличные от гидратации мономерных форм. Возможно, речь идёт о дважды гидратных молекулах воды, заключённых между связанными молекулами белка.

Проведём расчёт процента свободных молекул воды в растворах при рН 10 по формуле (2.21). Для раствора без белка доля свободных молекул воды составляет примерно 4%, тогда как при наличии белка процент свободных молекул возрастает до 4.2%. Нужно учесть, что это доля свободных молекул, усреднённая по всему объёму водной фазы раствора. Если взять в расчёт усреднённую протяжённость гидратной оболочки по данным разных авторов [220–222], примерно 30 Å, то объём воды, входящей в гидратную оболочку составляет около 20% от общего объёма раствора (при используемой концентрации белка). Соответственно доля свободных молекул воды в гидратной оболочке оказывается на 1% больше по сравнению с

остальной частью водной фазы (5% против 4%). Это весьма заметное отличие может иметь важное значение при взаимодействии биомолекул в растворе.

Увеличение времени релаксации τ_2 молекул воды под влиянием БСА при pH 10 (0.332 пс для раствора с БСА против 0.309 пс для растворителя) также является усреднённым по всему объёму водной фазы. В предположении, что динамическая гидратная оболочка занимает объём 20% (по аналогии с оценкой процента свободных молекул), легко рассчитать характерное время переориентации свободных молекул в гидратной оболочке – 0.41 пс. Это значение для гидратных оболочек на 33% превышает время ориентационной релаксации свободных молекул в невозмущённой воде. Факт столь сильного замедления свободных молекул воды в гидратных оболочках БСА при pH 10 и отсутствия такового эффекта для других конформаций труднообъясним на основании имеющихся данных. Однако, исходя из общих соображений, можно высказать предположение. Очевидно, что при разных конформациях белка структура гидратной оболочки отличается. Она содержит молекулы воды разной степени связанности, в том числе, некоторую долю свободных. Свободное состояние молекулы воды осуществимо, пока она находится в некоторой полости, «стенки» которой состоят из молекул воды с занятыми вакансиями водородных связей. Чем меньше размер полости, тем большее замедляющее воздействие она оказывает на ориентационную релаксацию свободных молекул, приводя к увеличению τ_2 . Предположительно, в гидратных оболочках БСА при pH 10 среднестатистическая структура этих полостей более компактна, чем в невозмущённой воде, что и приводит к увеличению времени τ_2 . Однако в данном случае необходим поиск подходов на основании молекулярного моделирования для полноценного прояснения этого вопроса.

Из данных таблицы 2.1, помимо отличий гидратации белка в разных конформациях, следуют и некоторые общие закономерности. Если проводить сравнение по средним значениям, то для всех растворов БСА наблюдается уменьшение параметра $\Delta\varepsilon_1$ и увеличение параметра $\Delta\varepsilon_2$ по сравнению с растворителем. Уменьшение $\Delta\varepsilon_1$ свидетельствует об усилении связанности воды в гидратных оболочках, но одновременно с этим увеличение $\Delta\varepsilon_2$ означает увеличение количества свободных молекул воды, то есть уменьшение связанности. На первый взгляд, эти две тенденции вступают в противоречие друг с другом. Объяснение данного явления, по-видимому, заключается в том, что энергетически сильное связывание молекул воды в первичных гидратных оболочках приводит к искажению структуры воды и не позволяет формироваться невозмущённой («нормально связанной») структуре воды за пределом первичного гидратного слоя по стерическим причинам. В то же время за пределом первичного слоя уже нет энергетически сильного влияния белка. То есть можно предположить, что

гидратная оболочка белка, грубо говоря, состоит из двух слоёв: сильно связанной первичной и частично разрушенной вторичной, за пределами которой уже формируется структура невозмущённой воды. Можно предположить, что описанная специфика молекулярной организации гидратных оболочек белков является причиной её большой протяжённости, зарегистрированной в работах [220–222], существенно превышающей толщину первичной гидратации. Важно отметить также, что для различных конформаций белка упрочнение первичного слоя и «разрыхление» отдалённых слоёв достаточно сильно отличаются, судя по значениям $\Delta\varepsilon_1$ и $\Delta\varepsilon_2$ в таблице 2.1. Отмеченная особенность гидратации белка в растворе (разнонаправленные изменения параметров $\Delta\varepsilon_1$ и $\Delta\varepsilon_2$) проявляется также и для АТФ (таблица 2.3), ДНК (таблица 2.4), сахаров (таблица 2.7), то есть является универсальной характеристикой многих биомолекул.

Данные таблицы 2.1 количественно описывают отличия состояния воды в растворе при наличии белка и без него по ряду физически интерпретируемых параметров. При достижении большей точности определения значений параметров, получается информативный многопараметрический метод, позволяющий характеризовать гидратацию белка и других биомолекул в растворах. Для количественного описания влияния белка в различных конформациях на водную фазу, можно определить отклонения значений параметров растворов белка от соответствующих значений параметров растворителя в пересчёте на единицу массы или объёма белка в заданных условиях. Возможна и постановка обратной задачи: на основании зарегистрированных отличий параметров водной фазы определять структурные характеристики молекул белка и, возможно, других биомолекул. Попытки продвижения в этом направлении делались в некоторых работах. Например, в работе [494] в результате анализа спектров растворов различных белков в диапазоне $7.33\text{--}10.83\text{ см}^{-1}$ была обнаружена корреляция между гидрофобностью поверхности белка и концентрационной зависимостью поглощения. В работе [495] для восьми различных аминокислот были обнаружены зависимости величины поглощения в интервале частот $70\text{--}90\text{ см}^{-1}$ от гидрофобности и полярности аминокислот. К сожалению, в этих работах анализ проводился в достаточно узких частотных диапазонах и ограничивался рассмотрением спектров поглощения растворов без определения комплексной ДП, что существенно ограничивало информативность и не позволяло сделать никаких выводов о молекулярной организации гидратных оболочек.

2.9. Гидратация фосфолипидов

В настоящем разделе проводится анализ гидратации фосфолипидных липосом в различных фазовых состояниях.

2.9.1. Материалы и методы

Суспензию однослойных липосом готовили из 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфахолин (DPPC) с концентрацией 20 мг/мл в 10 mM Трис-буфере с pH=7.5 на основе деионизованной воды MilliQ (Millipore, Germany), как это описано в [339].

Измерение ТГц спектров и расчёт комплексных ДП в диапазоне 10-110 см⁻¹ суспензий липосом и буферных растворов производился согласно методике, описанной в разделе 2.2.

Измерение спектров каждого образца производилось при трёх температурах: 30, 40, 45°C, стабилизированных с точностью ±0.5°C с помощью термостатирующего держателя кюветы High Stability Temperature Controller, 4000 Series (Specac Inc., USA). Перед каждым измерением суспензия липосом обрабатывалась на шейкере во избежание процесса агрегации липидов. Для каждой серии измерений при определённой температуре пробирка с суспензией липосом поддерживалась при такой же температуре для предотвращения многократных фазовых переходов фосфолипида. Спектры каждого образца измерялись не менее чем по 25 раз.

Из экспериментальных ДП суспензий липосом рассчитывались ДП водной фазы. Для этого использовалась модель Бруггемана (1.18):

$$f_{lip} \frac{\epsilon_{lip}^* - \epsilon_s^*}{\epsilon_{lip}^* + 2\epsilon_s^*} + (1 - f_{lip}) \frac{\epsilon_w^* - \epsilon_s^*}{\epsilon_w^* + 2\epsilon_s^*} = 0, \quad (2.24)$$

где ϵ_s^* , ϵ_{lip}^* , ϵ_w^* – комплексные ДП суспензии, сухого фосфолипида, и водной фазы, f_{lip} – объёмная доля фосфолипида. Модель Бруггемана применима в данном случае ввиду малости липосом по сравнению с длиной волны ТГц излучения и их сферической симметрии.

ϵ_{lip}^* определялась с помощью метода THz-TDS (раздел 2.1) для сухих плёнок фосфолипида. Плёнка DPPC была сформирована на оптически прозрачном в ТГц области окне из монокристаллического кварца следующим образом. На окно помещалась плоская шайба из фторопласта с вырезом по центру, которая плотно прижималась своей плоской частью к плоскости окна с помощью держателя. Таким образом была сформирована ванночка с кварцевым дном и фторопластовыми краями. В эту ванночку заливался раствор DPPC в хлороформе в объёме 0.5 мл с концентрацией 10 мг/мл. Эта ванночка помещалась в герметичный резервуар объёмом 0.5 л, заполненный аргоном при атмосферном давлении, который помещался в термостат при температуре 50°C. Резервуар был оснащён газовым входом

и выходом, с использованием которых в постоянном режиме производилась прокачка аргона в течение 4 часов до полного высыхания образца в виде плёнки на кварцевом окне.

Стоит уточнить, что молекулярная структура фосфолипида в плёнке, приготовленной таким образом, конечно, отличается от ламеллярного состояния фосфолипида в липосомах. Но это не имеет значения, поскольку, ввиду сферической симметрии ориентации молекул фосфолипида в липосоме, нет никакого выделенного направления относительно направления распространения и поляризации излучения при измерении спектров. Равно как и при хаотическом расположении молекул фосфолипида в плёнке нет такого выделенного направления. Поэтому в смысле определения диэлектрических свойств, плёнка с хаотическим расположением молекул фосфолипида аналогична сферической симметрии молекул в липосомах.

Для расчёта ϵ_{lip}^* из измеренных ТГц спектров по формулам (1.15) необходимо знать толщину плёнки фосфолипида. Поскольку распределение раствора DPPC в ванночке не было равномерным (смачиваемость по краям приводила к большей толщине высохшей плёнки фосфолипида на краях), необходимо было измерить толщину плёнки в её центре, где производилось измерение спектров. Для этого использовался конфокальный микроскоп LSM 510 META (Carl Zeiss, Germany) (Ar лазер с длиной волны 488 нм, безымерсионный объектив 10x/0.30 Plan-Neofluar) в режиме отражения (регистрация излучения в линии возбуждения с размером конфокальной диафрагмы 0.1 диска Эйри) со сканированием по трём координатам XYZ. При такой измерительной конфигурации наблюдается резкое увеличение регистрируемой интенсивности при фокусировке на поверхностях раздела фаз: воздух-фосфолипид и фосфолипид-кварц. Разница по координате Z двух этих поверхностей определяла толщину плёнки, которая с учётом разрешения по Z составила 11 ± 1 мкм.

Рассчитанная действительная часть ДП сухого DPPC ϵ'_{lip} составила 2.49 с отклонением на разных частотах в измеряемом спектральном диапазоне не более 5% (не превышает погрешность измерения), а мнимая часть ϵ''_{lip} на разных частотах составила 0.03-0.06. Для суспензий липосом и буферного раствора во всех исследованных случаях значения ϵ'_{sus} и $\epsilon_w^{0'}$ находятся в диапазоне 3.7-6.5, а ϵ''_{sus} и $\epsilon_w^{0''}$ – в диапазоне 1.9-6.8. То есть значение величины ϵ''_{lip} не превышает 3% относительно значений остальных диэлектрических параметров, входящих в формулу (2.24). Следовательно, можно с хорошей точностью пренебречь величиной ϵ''_{lip} для упрощения расчётов. То есть можно считать, что ДП фосфолипида содержит только

действительную часть $\varepsilon'_{lip}=2.49$ и эта величина несильно варьирует во всём диапазоне исследуемых частот.

Для расчёта ε_w^* из уравнения (2.24) также необходимо знать величину объёмной доли фосфолипида в растворе f_{lip} . Эта доля рассчитывалась путём деления массовой доли фосфолипида (2%) в суспензии на его плотность. В работе учитывалась зависимость плотности DPPC от температуры [496]: 1.05 г/см³ при 30°C, 1.03 г/см³ при 40°C и 1.00 г/см³ при 45°C.

Уравнение (2.24) при разделении действительной и мнимой частей сводится к системе двух линейных уравнений, решение которой относительно ε'_w и ε''_w выглядит следующим образом:

$$\begin{cases} \varepsilon'_w = \frac{b}{a} * \frac{c*b-a*d}{b^2+a^2} - \frac{c}{a}, \\ \varepsilon''_w = \frac{c*b-a*d}{b^2+a^2}. \end{cases} \quad (2.25)$$

$$a = \varepsilon'_{lip} + (2 - 3f_{lip}) * \varepsilon'_{sus}$$

$$b = (2 - 3f_{lip}) * \varepsilon''_{sus}$$

$$c = (3f_{lip} - 1) * \varepsilon'_{lip} * \varepsilon'_{sus} + 2(\varepsilon''_{sus} - \varepsilon'^2_{sus})$$

$$d = (3f_{lip} - 1) * \varepsilon'_{lip} * \varepsilon''_{sus} - 4\varepsilon'_{sus} * \varepsilon''_{sus}$$

ДП водной фазы анализировались с помощью процедуры фитинга, описанной в разделе 2.5, с одной особенностью. Использовалась дополнительная связь между диэлектрическими параметрами:

$$\varepsilon_s = \Delta\varepsilon_1 + \Delta\varepsilon_2 + \frac{A_1}{\omega_1^2} + \varepsilon_\infty \quad (2.26)$$

Это известная связь между статической ДП вещества и вкладами отдельных молекулярных поляризационных процессов на всей спектральной шкале, которая связана с соотношением Крамерса-Кронига. Зная величину статической ДП раствора ε_s при каждой комбинации варьируемых параметров $\Delta\varepsilon_2$, A_1 , ω_1 можно однозначно определять величину $\Delta\varepsilon_1$, что позволяет уменьшить число варьируемых параметров на один и повысить точность определения параметров. Для величины ε_s в формуле (2.26) устанавливалось значение чистой воды [497]: 76.61 при 30°C, 73.19 при 40°C, 71.54 при 45°C. Отличия параметра ε_s для воды и

Трис-буфера 10 мМ, используемого для суспензии липосом, не превышает 0.2% [498], чем можно пренебречь.

Гидродинамический диаметр липосом в суспензии измерялся методом ДСР с использованием установки Zetasizer nano ZS (Malvern Instruments, UK) при трёх температурах 30, 40, 45°C. Также с использованием данной техники в режиме измерения ζ -потенциала при каждой из указанных температур определялась проводимость растворов σ_0 , необходимая для расчёта параметров модельной ДП (2.15). Измерения выполняли в капиллярных кюветах с электродами DTS1060 (Malvern, UK).

Также проводилось определение температур фазовых переходов DPPC в исследуемом диапазоне температур с использованием дифференциального сканирующего калориметра (TA Instruments, USA) путём сканирования суспензии липосом от 10 до 60°C со скоростью нагрева 1°C/мин.

Для количественного измерения степени гидратации гидрофильных головок липосом использовался метод измерения обобщённой поляризации флуоресценции лаурдана [164,234,499].

2.9.2. Зависимость характеристик гидратных оболочек липосом от фазового состояния фосфолипида

На рисунке 2.9 изображено распределение липосом по размерам в исследуемом образце. При изменении температуры в диапазоне от 30 до 45°C распределения заметно не менялись. Полученные распределения липосом по размерам свидетельствуют о том, что подавляющая часть фосфолипида в суспензии находится в виде одиночных липосом. Это означает, что практически вся гидрофильная поверхность липосом находится в контакте с водной фазой.

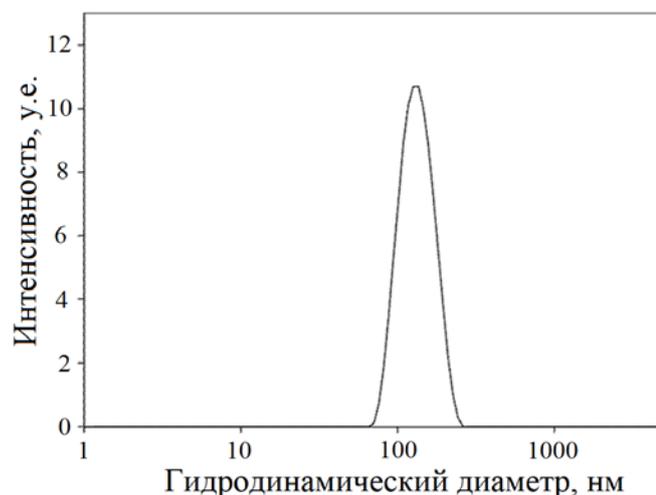


Рисунок 2.9. Распределение по размерам DPPC липосом в суспензии.

На рисунке 2.10 представлена калориметрическая кривая суспензии DPPC. Зарегистрированы два эндотермических пика в анализируемом температурном диапазоне с температурами максимумов 35.56 и 42.05°C. Они соответствуют двум известным фазовым переходам [231,232]: предпереход (полиморфный переход гель–рипл-фаза, $L_{\beta'}$ – $P_{\beta'}$) и основной фазовый переход (гель–жидкий кристалл, $P_{\beta'}$ – L_{α}). Это означает, что при выбранных трёх значениях температуры фосфолипид находится в разных фазовых состояниях: гель при 30°C, рипл-фаза при 40°C и жидкий кристалл при 45°C.

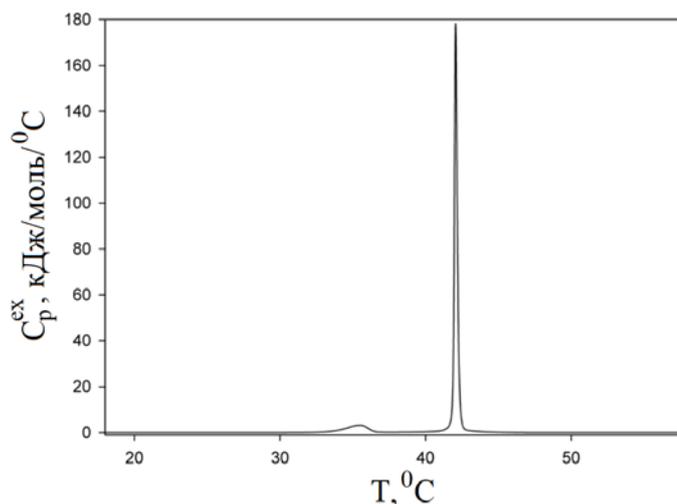


Рисунок 2.10. Температурная зависимость избыточной теплоёмкости C_p^{ex} DPPC в суспензии.

На рисунке 2.11 представлены спектры действительной и мнимой частей ДП водной фазы всех исследованных образцов. Дано попарное сравнение ДП водной фазы суспензии липосом с ДП аналогичного буферного раствора без липосом. В таблице 2.2 содержатся параметры модельной ДП (2.15) для водной фазы суспензии липосом и буферного раствора при трёх температурах, а также процент свободных молекул воды, рассчитанный по формуле (2.21).

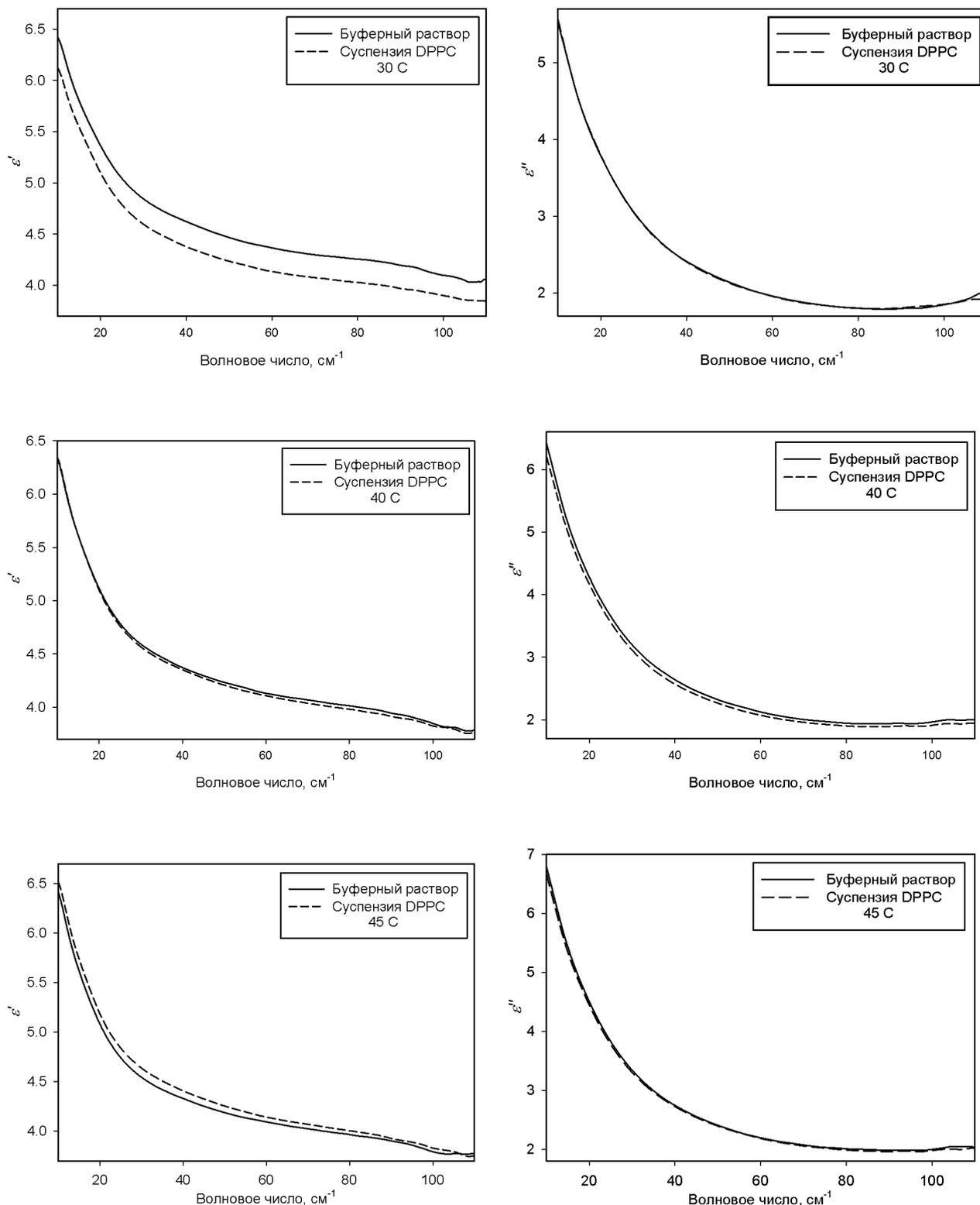


Рисунок 2.11. Попарные сравнения водной фазы суспензии однослойных DPPC липосом с буферным раствором по спектрам действительной ϵ' и мнимой ϵ'' частей ДП при температурах 30, 40 и 45°C.

Таблица 2.2*. Параметры модельной ДП (2.15) водной фазы суспензии липосом DPPC в разных фазовых состояниях, определяемых температурой, и соответствующего буферного раствора, а также процент свободных молекул воды в них, рассчитанный по формуле (2.21).

Образец	$\Delta\varepsilon_1$	$\Delta\varepsilon_2$	τ_2 , пс	ω_1 , см ⁻¹	$\frac{A_1}{1000}$, см ⁻²	γ_1 , см ⁻¹	n , %
Буфер 30°C	70.4±0.3	2.2±0.15	0.254±0.019	<u>203±9</u>	<u>67±11</u>	180±20	<u>3.27±0.08</u>
DPPC (гель) 30°C	70.6±0.1	2.11±0.07	0.252±0.008	<u>183±7</u>	<u>46±6</u>	159±16	<u>3.49±0.08</u>
Буфер 40°C	<u>67.2±0.1</u>	<u>2.06±0.02</u>	<u>0.264±0.004</u>	187±2	50±2	183±5	<u>3.38±0.02</u>
DPPC (риплл-фаза) 40°C	<u>67.4±0.1</u>	<u>1.84±0.06</u>	<u>0.248±0.007</u>	192±5	53±4	193±10	<u>3.11±0.07</u>
Буфер 45°C	65.7±0.2	<u>1.98±0.11</u>	0.257±0.015	<u>183±6</u>	<u>46±5</u>	<u>177±13</u>	<u>3.32±0.12</u>
DPPC (жидкий кристалл) 45°C	65.8±0.1	<u>1.84±0.02</u>	0.243±0.004	<u>199±3</u>	<u>58±2</u>	<u>211±9</u>	<u>3.07±0.03</u>

*Результаты представлены в виде парных сравнений параметров, относящихся к водной фазе суспензии липосом и аналогичному буферному раствору без липосом. Погрешность представляет собой 95% доверительные интервалы среднего с объёмом выборок 25. В первой колонке указана температура образца, наличие или отсутствие DPPC в нём, а также фазовое состояние фосфолипида. Жирным шрифтом выделены пары значений, между которыми зарегистрированы достоверные отличия.

Как следует из таблицы 2.2, имеется ряд отличий в значениях параметров сравниваемых образцов. Поскольку сравнивалась водная фаза в суспензии липосом с аналогичным буферным раствором без липосом, то все обнаруженные отличия касаются именно состояния воды, без непосредственного вклада фосфолипида. При этом обнаруженные отличия обусловлены влиянием липосом на окружающую водную фазу, то есть наличием гидратных оболочек с изменённой молекулярной организацией воды вблизи гидрофильной поверхности липосом. Хотя гидратные оболочки занимают только часть водной фазы суспензии липосом, судя по данным таблицы 2.2 этого достаточно для регистрации изменений в усреднённых параметрах водной фазы.

Из данных таблицы 2.2 можно установить несколько закономерностей. При температуре 30°C (фосфолипид в фазе гель) в гидратных оболочках липосом обнаруживается ослабление энергии водородного связывания молекул воды (ω_1 меньше) и уменьшение числа водородных связей (A_1 меньше) по сравнению с невозмущённой водой (буферным раствором без липосом). Также гидратные оболочки липосом характеризуются большим количеством свободных молекул воды n . Очевидно, все три тенденции согласуются друг с другом: молекулы связаны слабее, поэтому образуются больше свободных молекул воды.

При температуре 40°C (фосфолипид в риппл-фазе) наблюдается принципиально отличное влияние липосом на воду в гидратной оболочке, чем в фазе гель. В данном случае

гидратные оболочки характеризуются меньшим количеством свободных молекул, чем в невозмущённой воде. Это согласуется также с количественно близким изменением двух параметров (при переходе от буферного раствора к суспензии липосом): $\Delta\varepsilon_1$ увеличился, а $\Delta\varepsilon_2$ уменьшился примерно на 0.2 (таблица 2.2), что может быть интерпретировано как переход части свободных молекул в состояние связанных в гидратных оболочках.

Также гидратные оболочки липосом в риппл-фазе характеризуются меньшим значением τ_2 (таблица 2.2). Уменьшение времени релаксации свободных молекул воды τ_2 при гидратации липосом является тенденцией, противоположной гидратации белка в частично агрегированной форме (см. раздел 2.8.2), где это время увеличивалось по сравнению с невозмущённой водной фазой. Как и в случае с белком детальное объяснение этого эффекта требует дополнительных сведений и, вероятно, может быть получено при использовании методов молекулярного моделирования.

При температуре 45°C (фосфолипид в жидкокристаллической фазе), также как и при 40°C (в риппл-фазе), гидратные оболочки липосом характеризуются меньшим количеством свободных молекул воды n , а также обнаружены значимо большие величины параметров A_1 , ω_1 и γ_1 по сравнению с невозмущённой водой. Увеличение параметров A_1 и ω_1 означает увеличение числа и средней энергии водородных связей в гидратных оболочках. При этом одновременное увеличение средней энергии (судя по параметру ω_1) и ширины энергетического распределения водородных связей (судя по параметру γ_1) происходит, по-видимому, за счёт появления фракции более сильных водородных связей. В совокупности это означает, что при жидкокристаллической фазе фосфолипида связывание воды в гидратных оболочках липосом реализуется более сильно, чем при риппл-фазе.

Сравним значения параметров A_1 , ω_1 и γ_1 воды в суспензии липосом и в буферном растворе. При гелевой фазе фосфолипида значение каждого из трёх параметров для суспензии меньше, чем для буфера; при риппл-фазе значения параметров неотличимы; при жидкокристаллической фазе для суспензии липосом эти параметры больше, чем для буфера. То есть с ростом температуры от 30 до 45°C влияние липосом на гидратные оболочки меняется от ослабления межмолекулярного связывания до противоположного – усиления. Тенденция по каждому из трёх параметров может быть описана как монотонная со сменой знака в диапазоне 30-45°C. При какой конкретно температуре происходит изменение влияния липосом на водную фазу с разрушающего на структурирующее в рамках точности определения значений параметров неясно.

Несколько большую определённости о температуре, при которой происходит отмеченная смена знака эффекта гидратации липосом, можно получить из анализа процента свободных молекул воды. Это температура находится вблизи температуры предперехода (см. рисунок 2.12), что неожиданно, поскольку предпереход (гель – риппл-фаза) термодинамически намного слабее основного перехода (риплл-фаза – жидкий кристалл). Энтальпия основного перехода примерно в 7 раз больше (рисунок 2.10). Тем не менее, именно предпереход приводит к принципиальным изменениям в гидратации, а основной переход лишь количественно усиливает тенденции, наметившиеся после предперехода.

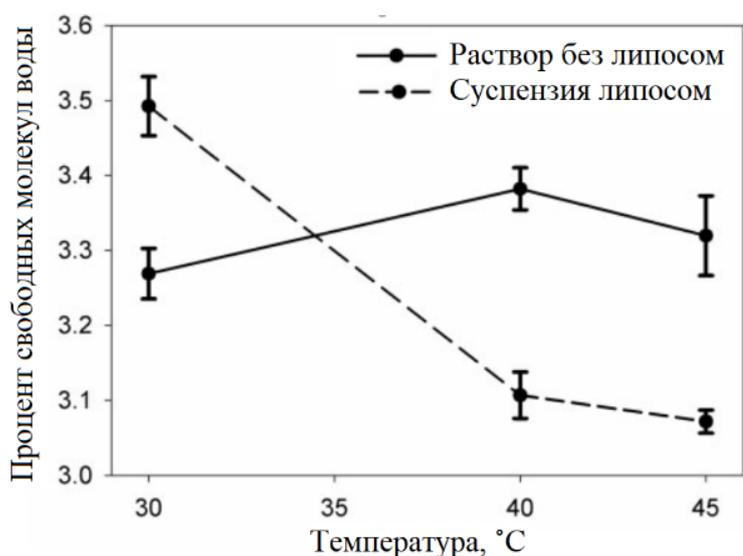


Рисунок 2.12. Температурная зависимость процента свободных молекул воды суспензии липосом и соответствующего буфера без липосом. Разброс совпадает с данными таблицы 2.2 .

Полученные данные об отличии гидратации фосфолипидных липосом в разных фазовых состояниях требуют рассмотрения вопроса о молекулярных механизмах, лежащих в основе выявленных особенностей гидратации. Как показано выше, в гидратных оболочках липосом с ростом температуры происходит уменьшение доли свободных молекул, что коррелирует с другой закономерностью – увеличением водородного связывания молекул воды. Известно, что с ростом температуры происходит разрушение связей между гидрофобными хвостами фосфолипида в липосомах и увеличение среднего расстояния между гидрофильными головками [500]. Это приводит к большей доступности гидрофильных головок для молекул воды и увеличению их гидратированности, что может быть зарегистрировано, например, методами ИК спектроскопии (рисунок 3.8). Предположительно, это могло бы качественно объяснить снижение доли свободных молекул воды за счёт усиления их связанности на поверхности гидрофильных головок. В этом случае необходимо убедиться, что с ростом температуры в

области предперехода происходит значимое увеличение гидратированности головок фосфолипида.

Для количественного измерения степени гидратации гидрофильных частей липосом часто используют метод измерения обобщённой поляризации (GP) флуоресценции лаурдана. Согласно данному методу, снижение величины GP количественно связано со степенью гидратации. Температурная зависимость GP для DPPC липосом представлена на рисунке 2.13.

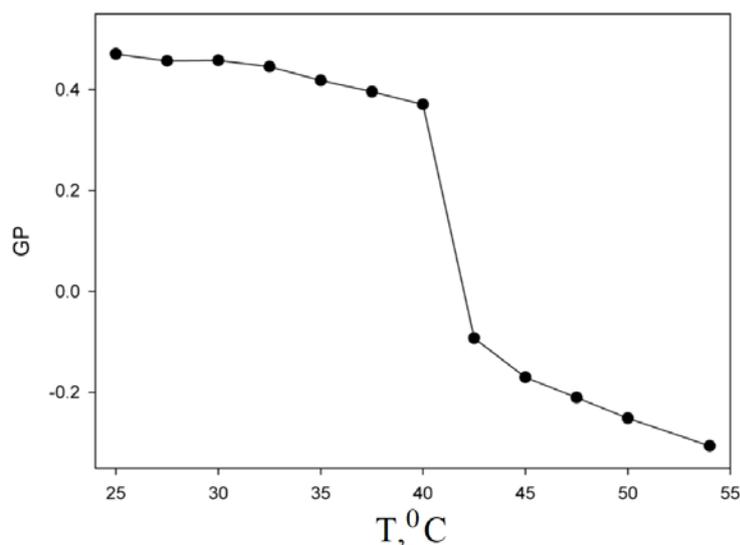


Рисунок 2.13. Влияние температуры на обобщённую поляризацию (GP) флуоресценции лаурдана в DPPC липосомах [339].

Из рисунка 2.13 следует, что, согласно методу измерения обобщённой поляризации флуоресценции лаурдана, гидратация с ростом температуры при прохождении предперехода, действительно, растёт (с изменением температуры от 30 до 40 °C $\Delta GP=0.09$). Однако увеличение гидратации гораздо более сильно выражено при прохождении основного перехода (при изменении температуры от 40 до 45 °C $\Delta GP=0.54$). Из этого следует, что гидратация гидрофильных головок фосфолипида не является основным фактором, обуславливающим обнаруженные отличия связанности воды в присутствии липосом в разных фазовых состояниях. Это означает, что обсуждаемые изменения молекулярной организации воды происходят в гидратных оболочках на некотором удалении от поверхности липосом, тогда как данные рисунка 2.13 относятся лишь к первичным гидратным оболочкам.

Далее возникает вопрос, насколько далеко от поверхности липосомы распространяется её влияние на молекулярную организацию воды. Другими словами, какова протяжённость обсуждаемых гидратных оболочек? Полученные в настоящей работе данные могут быть

использованы для оценки со стороны минимального значения протяжённости гидратных оболочек DPPC липосом. Для этого рассмотрим данные из таблицы 2.2 при 40°C, где зарегистрировано максимальное отличие (с учётом погрешности) в проценте свободных молекул воды n . В суспензии липосом по сравнению с буферным раствором величина n отличается минимум на 0.18% в меньшую сторону. При этом в буфере среднее значение $n=3.38\%$. Данные таблицы 2.2 описывают усреднённые значения по всей водной фазе, как с учётом гидратных оболочек, так и за их пределами. Для оценочных целей примем, что гидратная оболочка вообще не содержит свободных молекул, то есть их процент равен 0. В этом случае доля гидратных оболочек от общего объёма водной фазы суспензии может быть рассчитана как $0.18/3.38=0.053$. То есть, если гидратные оболочки занимают 5.3% от объёма водной фазы и вообще не содержат свободные молекулы, то удаётся удовлетворить имеющейся в таблице 2.2 разнице в n при 40°C на 0.18%. Зная объёмную долю фосфолипида в анализируемой суспензии липосом (2%), толщину липидного бислоя (4 нм) и учитывая двусторонний характер его гидратации, нетрудно посчитать, что толщина гидратной оболочки составляет примерно 5.3 нм. В реальности маловероятно полное отсутствие свободных молекул воды в гидратных оболочках, поэтому толщина гидратации на самом деле должна быть существенно больше. Также, очевидно, нельзя предполагать наличие чёткой границы между гидратной и не гидратной водой. В реальности, должно происходить уменьшение влияния поверхности липосомы на воду с увеличением расстояния, поэтому обсуждаемая величина – это некая характерная толщина слоя воды с заметно изменёнными характеристиками молекулярной организации, регистрируемые с использованием метода ТГц спектроскопии.

Полученное значение толщины гидратной оболочки липосомы (больше 5.3 нм) является оценкой с нижней стороны, но даже оно представляется аномально большим, по сравнению с общепринятым представлением о гидратных оболочках. С использованием ТГц спектроскопии проводились оценки толщин гидратации сахаров, 0.3-0.6 нм, [217] и белков, 1-2 нм [220,221]. Как видно, протяжённость гидратации фосфолипидных липосом оказывается заметно больше. Это, по-видимому, связано с размером объекта, возле которого формируется гидратная оболочка. Молекула сахара не превышает 1 нм, размер молекулы глобулярного белка ~10 нм, тогда как размер липосомы ~100 нм оказывается несопоставимо больше молекулы воды. То есть липосома может рассматриваться как макро-поверхность, вблизи которой проявляются кооперативные эффекты гидратации.

Представленные в настоящем разделе данные в основном носят физико-химический характер, однако, они с неизбежностью требуют постановки вопросов биологического

характера. А именно, если липосома, которая является признанной моделью биологической мембраны, настолько далеко от себя модифицирует водное окружение, не несёт ли это какой-то биологический смысл, связанный с взаимодействием биообъектов друг с другом на клеточном и внутриклеточном уровне? Можно надеяться, что ответ на этот вопрос будет получен в дальнейших исследованиях с использованием, в том числе, результатов настоящей работы.

2.10. Гидратация АТФ

В данном разделе проводится анализ гидратации молекул АТФ в растворе, самих по себе и в присутствии ионов Mg^{2+} .

2.10.1. Материалы и методы

Для приготовления растворов использовались следующие реактивы: натриевая соль АТФ $C_{10}H_{13}N_5O_{13}P_3Na_3$ 100 мМ, рН=7.2-7.5 (Thermo Fisher Scientific, США); $MgCl_2$ безводный $\geq 98\%$ (Merck, Германия); хлорид натрия $\geq 99.5\%$ (Sigma Aldrich, США); деионизованная вода MilliQ (Millipore, Германия).

Анализировались следующие образцы: 1) вода; 2) раствор АТФ, разбавленный водой до концентрации 40 мМ; 3) раствор $MgCl_2$ 40 мМ; 4) раствор, содержащий АТФ и $MgCl_2$ по 40 мМ; 5) раствор $NaCl$ 120 мМ. Во время всех измерений температура образцов поддерживалась при $25 \pm 0.1^\circ C$.

Для расчёта ДП водной фазы растворов АТФ использовалась модель Максвелла Гарнетта (1.17):

$$\frac{\varepsilon_s^* - \varepsilon_w^*}{\varepsilon_s^* + 2\varepsilon_w^*} = f \frac{\varepsilon_a^* - \varepsilon_w^*}{\varepsilon_a^* + 2\varepsilon_w^*}, \quad (2.27)$$

где ε_s^* , ε_w^* , ε_a^* – комплексные ДП раствора АТФ, водной фазы раствора и сухого АТФ, соответственно, f – объёмная доля АТФ в растворе. Решение уравнения (2.27) позволяет найти действительную ε_w' и мнимую ε_w'' части функции ε_w^* , выраженные через действительные и мнимые части функций ε_s^* и ε_a^* :

$$\left\{ \begin{array}{l} \varepsilon'_w = \frac{1}{e} \left[a + \sqrt{\frac{c + \sqrt{c^2 + d^2}}{2}} \right], \\ \varepsilon''_w = \frac{1}{e} \left[b + \sqrt{\frac{-c + \sqrt{c^2 + d^2}}{2}} \right], \\ a = \varepsilon'_a(1 + 2f) - \varepsilon'_s(2 + f), \\ b = \varepsilon''_a(1 + 2f) - \varepsilon''_s(2 + f), \\ c = 4(\varepsilon'^2_s - \varepsilon''^2_s)(1 + f) + (\varepsilon'^2_a - \varepsilon''^2_a)(1 + 4f) + 2(\varepsilon'_a \varepsilon'_s - \varepsilon''_a \varepsilon''_s)(2 - 13f), \\ d = 2 \left(\varepsilon'_s(4\varepsilon''_s(1 + f) + \varepsilon''_a(2 - 13f)) + \varepsilon'_a(\varepsilon''_a(1 + 4f) + \varepsilon''_s(2 - 13f)) \right), \\ e = 4(f - 1). \end{array} \right. \quad (2.28)$$

Величина f рассчитывалась умножением массовой доли АТФ в растворе (2.02%) на удельный объём АТФ (0.44 см³/г) [473]. Функция ε_s^* определялась прямым измерением ТГц спектров растворов АТФ с последующим расчётом по формулам (1.15). Функция ε_a^* определялась из ТГц спектров сухих плёнок АТФ.

Сухие плёнки формировали на окнах из z-cut кварца путём высушивания растворов АТФ 40 мМ (в воде и водном растворе MgCl₂ 40 мМ). Высушивание проводилось под вакуумом 1 мбар в течение 14 часов. Спектры плёнок измерялись согласно методике, описанной в разделе 2.2. В качестве фонового спектра выступал спектр чистого окна из z-cut кварца. Для расчёта ДП сухих плёнок АТФ использовались формулы (1.15), для которых нужно задать толщину образца l . Она измерялась с помощью конфокального микроскопа LSM 510 META (Carl Zeiss, Germany) в режиме отражения с Ar лазером 488 нм, безымерсионным объективом 10x/0.30 Plan-Neofluar, размером конфокальной диафрагмы 0.1 диска Эйри. Сканирование по толщине плёнки позволяло зарегистрировать обе её поверхности по повышенному отражению. На основании этого определялись толщины плёнок: АТФ – 17 мкм, АТФ с MgCl₂ – 11.3 мкм.

Особо стоит отметить, что в полученных сухих образцах АТФ не формировались кристаллические структуры. Это важно, поскольку формирование кристалла могло бы привести к существенному отличию ДП АТФ в плёнке и в растворе, что недопустимо, так как ДП сухого АТФ использовались для вычитания вклада АТФ из ДП растворов. Надо отметить, что формирование кристалла АТФ – достаточно трудоёмкая процедура, описанная, например в [230], требующая использования специальных растворов и очень медленного высушивания. В данном случае при быстрой сушке под вакуумом получалась, очевидно, аморфная структура с хаотическим расположением молекул АТФ, как в растворе. Подтверждением этому является также отсутствие характерных полос кристалла АТФ [501,502], в спектрах пропускания анализируемых плёнок (рисунок 2.14).

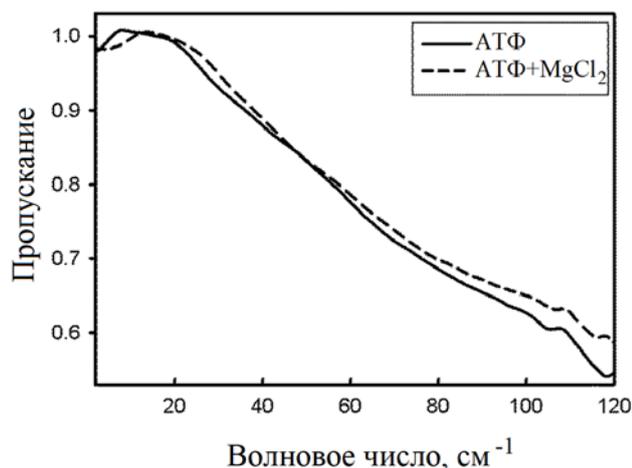


Рисунок 2.14. Спектры пропускания сухих плёнок АТФ (17.0 мкм) и АТФ+MgCl₂ (11.3 мкм).

Помимо ТГц спектров растворов измерялись гидродинамические диаметры молекул АТФ в воде и растворе MgCl₂ 40 мМ с помощью метода ДСР на анализаторе Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Великобритания). Использовались кюветы малого объёма 0.1 мл. Накопление корреляционной функции в каждом отдельном измерении составляло 12 циклов по 12 секунд. Расчёт распределений по размерам из корреляционных функций выполнялся с использованием ПО Malvern Instruments. Для точного определения размеров задавались справочные значения вязкости и коэффициента преломления (для воды и раствора MgCl₂ 40 мМ) при измеряемой температуре 25°C. Каждый образец измерялся не менее 10 раз для повышения точности и возможности статистической обработки данных. Также с использованием Zetasizer Nano ZS в режиме измерения ζ-potential определялись проводимости растворов σ_0 , которые необходимы для расчётов с использованием модельной ДП (2.15).

Метод ИК спектроскопии с Фурье-преобразованием в данной работе использовался для контроля сохранения структуры АТФ в растворах во время экспериментов. Параллельно с измерением ТГц спектров проводились измерения ИК спектров тех же растворов АТФ при той же температуре в области полос колебаний фосфатных групп. ИК полосы антисимметричных (около 1230-1240 см⁻¹) и симметричных (около 1170-1190 см⁻¹) PO²⁻ колебаний проявляют высокую чувствительность к разложению АТФ [312,503]. В течение всего времени измерения каждого образца ИК спектры сохранялись в неизменном виде, что свидетельствовало об отсутствии значимых изменений АТФ, в частности, об отсутствии её гидролиза. Спектры измерялись на спектрометре Vertex 80v (Bruker, Германия) со спектральным разрешением 2 см⁻¹ и усреднением 50 интерферограмм для каждого спектра. Использовалась герметичная

жидкостная кювета с расстоянием 40 мкм между окнами из CaF_2 . Спектрометр во время измерения вакуумировался до 0.9 мбар.

2.10.2. Характеристики гидратных оболочек АТФ в зависимости от связывания с ионами Mg^{2+}

В данном разделе ставилась цель изучения гидратации молекулы АТФ в двух водных растворителях: чистая вода и эквимолярный (по АТФ) раствор MgCl_2 . Рассмотрение гидратации в растворе MgCl_2 имеет особый интерес, поскольку константа связывания АТФ с Mg^{2+} очень велика, около 9550 M^{-1} [504], следовательно, подавляющее большинство молекул АТФ в растворе пребывает в комплексе $\text{Mg}\cdot\text{АТФ}$ [147,503,505]. То есть изучение гидратации АТФ в растворе MgCl_2 сводится, в сущности, к изучению гидратации $\text{Mg}\cdot\text{АТФ}$. В то же время хорошо известно, что практически во всех биологически значимых реакциях участвует именно комплекс $\text{Mg}\cdot\text{АТФ}$. То есть сравнение гидратации АТФ и $\text{Mg}\cdot\text{АТФ}$ представляет непосредственный интерес для молекулярной биофизики.

Как и в разделах 2.8, 2.9, логика изучения гидратации реализовывалась на основе попарного сравнения водной фазы растворов АТФ с соответствующими растворителями. Выявление между ними отличий позволяет делать выводы о характеристиках гидратных оболочек, так как они занимают часть водной фазы растворов АТФ и отсутствуют в растворителе.

Дополнительно анализировался раствор NaCl 120 мМ, так как в качестве АТФ использовалась её тринатриевая соль, то есть в растворах 40 мМ АТФ присутствовало 120 мМ ионов Na^+ . Однако измерения всеми методами в данной работе (кроме измерения проводимости) не позволили выявить значимые отличия раствора NaCl 120 мМ от воды. Поэтому данные раствора NaCl 120 мМ далее не приводятся. Также это позволяет анализировать результаты и делать выводы о гидратации АТФ и $\text{Mg}\cdot\text{АТФ}$ без учёта наличия ионов Na^+ .

На рисунке 2.15 представлены ДП водной фазы исследованных растворов АТФ и их растворителей.

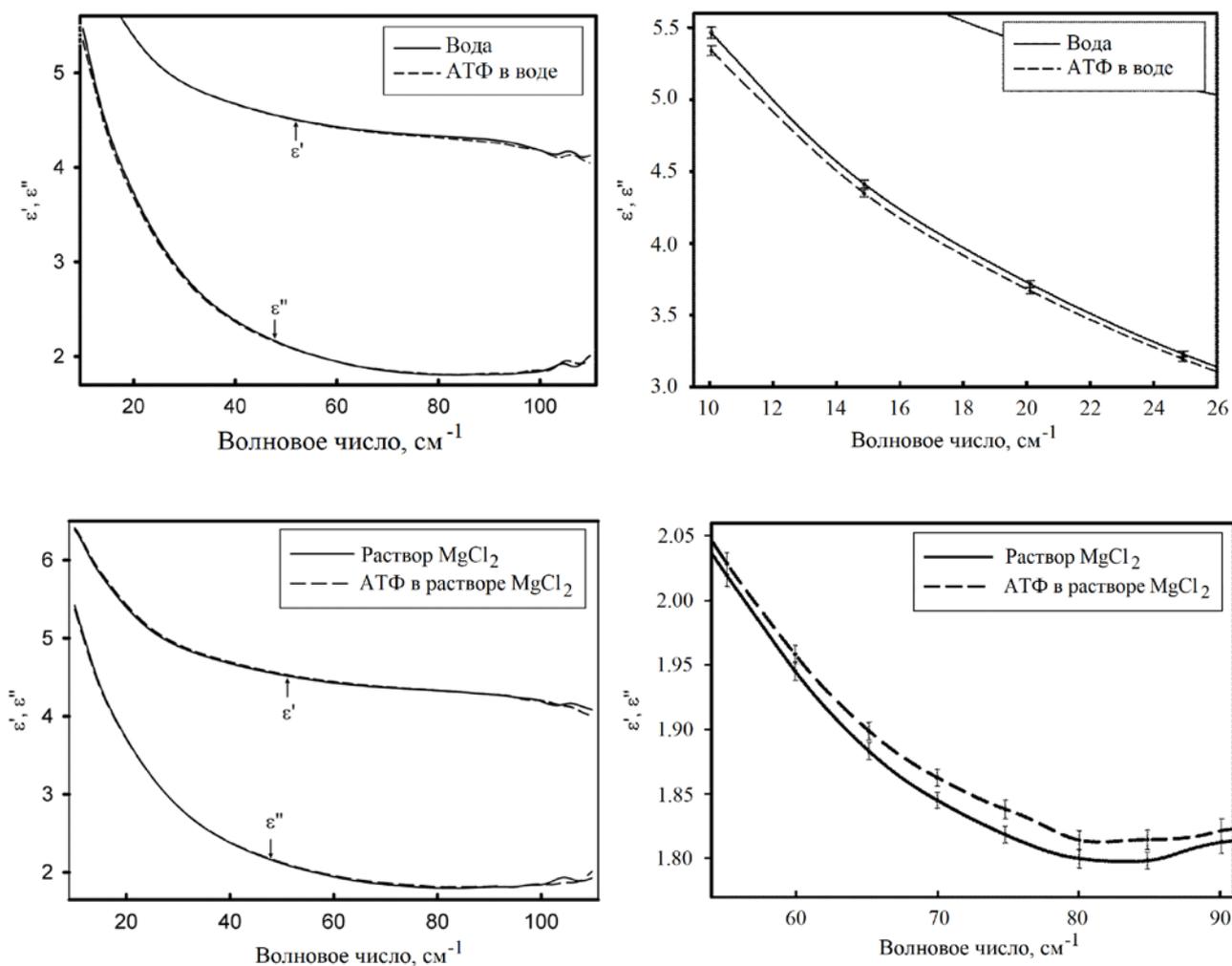


Рисунок 2.15. Действительная ϵ' и мнимая ϵ'' части ДП водной фазы растворов АТФ и их растворителей (вода и раствор MgCl_2 40 мМ). Слева приведены ДП во всём анализируемом диапазоне волновых чисел. Справа выделены интервалы, где наблюдаются достоверные отличия между ДП водной фазы растворов АТФ и их растворителей. Разброс представляет собой доверительные интервалы 95% среднего при 30 повторах.

Рисунок 2.15 свидетельствует о значимых отличиях в мнимой части ДП: между водным раствором АТФ и водой в диапазоне $10\text{-}23\text{ см}^{-1}$, а также между растворами АТФ + MgCl_2 и MgCl_2 в диапазоне $62\text{-}86\text{ см}^{-1}$. По действительной части ДП отличия не обнаружены. Судя по указанным частотным интервалам отличий, гидратация АТФ проявляется в изменении релаксационных процессов молекул воды, а гидратация $\text{Mg}\cdot\text{АТФ}$ – в изменении колебательной динамики молекул воды (см. рисунок 2.5). Это подтверждается на основе сравнения значений параметров таблицы 2.3, рассчитанных для анализируемых растворов. Из таблицы следует, что основное влияние АТФ на воду может быть описано уменьшением амплитуды дебаевской

релаксации $\Delta\epsilon_1$, а основное влияние $\text{Mg}\cdot\text{ATФ}$ описывается увеличением амплитуды колебательной полосы A_1/ω_1^2 , при отсутствии значимого уменьшения $\Delta\epsilon_1$.

Таблица 2.3*. Параметры модельной ДП (2.15) водной фазы растворов АТФ и их растворителей.

Образец	$\Delta\epsilon_1$	$\Delta\epsilon_2$	τ_2 , пс	ω_1 , см^{-1}	γ_1 , см^{-1}	A_1/ω_1^2
Вода	<u>68.9±0.8</u>	2.69±0.04	0.316±0.006	207±4	197±11	1.70±0.02
АТФ в воде	<u>66.5±0.8</u>	2.74±0.04	0.318±0.005	207±5	202±13	1.73±0.02
Раствор MgCl_2	67.6±0.6	2.71±0.04	0.318±0.004	209±5	202±11	<u>1.710±0.016</u>
АТФ в растворе MgCl_2 ($\text{Mg}\cdot\text{ATФ}$)	66.4±0.7	2.75±0.03	0.318±0.005	215±4	216±10	<u>1.748±0.017</u>

*Представлено попарное сравнение растворов АТФ 40 мМ с используемыми растворителями – вода и раствор MgCl_2 40 мМ. Разброс покрывает 95% доверительные интервалы среднего с объёмом выборок 30. Жирным шрифтом выделены пары значений, между которыми зарегистрированы достоверные отличия.

Полученные отличия по параметру $\Delta\epsilon_1$ объясняются зарядовой структурой АТФ. Молекула АТФ в данных экспериментальных условиях находится, большей частью, в виде четырёхзарядного иона ATФ^{4-} , причём весь заряд расположен на фосфатных группах [506]. Как известно, фосфатные группы сильно связывают воду [151,312], что и выражается в уменьшении величины $\Delta\epsilon_1$.

Как было отмечено, при наличии в растворе ионов Mg^{2+} , происходит его связывание с фосфатными группами АТФ и значительное экранирование их заряда. В результате связывание молекул воды с $\text{Mg}\cdot\text{ATФ}$ оказывается существенно слабее, поэтому не регистрируется отличие по параметру $\Delta\epsilon_1$. По-видимому, указанное отличие не пропадает полностью, а только становится заметно меньше (в пределах погрешности), чем для случая АТФ в чистой воде.

Большее значение параметра A_1/ω_1^2 как характеристика гидратации $\text{Mg}\cdot\text{ATФ}$ позволяет утверждать о наличии большего количества водородных связей в гидратных оболочках $\text{Mg}\cdot\text{ATФ}$ по сравнению с невозмущённой водой. Отметим, что в чистой воде при 25°C среднее число водородных связей с одной молекулой составляет около 3.6 из 4 возможных [507]. Следовательно, в гидратных оболочках $\text{Mg}\cdot\text{ATФ}$ происходит увеличение числа водородных связей, но не более чем на 10% по сравнению с невозмущённой водой. Это весьма небольшое отличие молекулярной организации гидратной оболочки, но оно надёжно регистрируется описанным методом на основе ТГц спектроскопии.

Полученные данные позволяют сделать заключение, что гидратация АТФ и Mg·АТФ принципиально отличается. Если АТФ за счёт заряда фосфатных групп искажает структуру воды, сильно связывая близлежащие молекулы, то Mg·АТФ, наоборот, структуру воды упорядочивает, способствуя образованию дополнительных водородных связей.

Этот вывод косвенно подтверждается результатами измерений размера (гидродинамического диаметра) АТФ (в воде) и Mg·АТФ (АТФ в растворе MgCl₂), представленными на рисунке 2.16. Оказалось, что размер Mg·АТФ (1.46±0.05 нм) примерно в полтора раза больше, чем АТФ (0.98±0.27 нм). Это может означать, что гидратная оболочка Mg·АТФ обладает большей жёсткостью или протяжённостью, что согласуется с описанными выше данными о большем количестве водородных связей в гидратных оболочках Mg·АТФ.

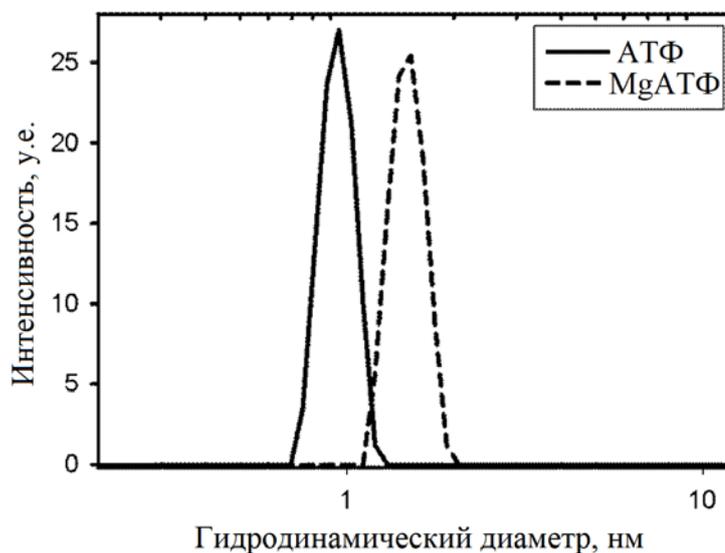


Рисунок 2.16. Распределение по размерам молекул АТФ в воде и растворе MgCl₂ 40 мМ.

При этом важно рассмотреть и исключить возможные артефакты. В первую очередь был внимательно рассмотрен вопрос агрегации АТФ в присутствии ионов Mg²⁺. Известно, что АТФ может агрегировать за счёт стэкинг-взаимодействий азотистых оснований, причём в присутствии ионов Mg²⁺ этот процесс усиливается. Константы самоассоциации молекул АТФ в присутствии различных ионов определены и хорошо известны [220,261]. При использованных в данной работе условиях около 10% молекул АТФ образуют димеры в воде и около 20% в присутствии Mg²⁺. Более крупные олигомеры представлены в ничтожных количествах. Увеличение гидродинамического диаметра в 1.5 раза соответствует увеличению гидродинамического объёма в $1.5^3 \approx 3.4$ раза. То есть для объяснения зарегистрированного

укрупнения олигомеризацией необходимо, чтобы все молекулы АТФ в присутствии Mg^{2+} объединились тримеры-тетрамеры, чего не происходит судя по справочным данным.

Помимо размеров, можно проанализировать соотношение интенсивностей рассеяния. Интенсивность рассеяния АТФ в воде (после вычитания интенсивности рассеяния воды) составляет 9.5 кГц (число отсчётов детектора в секунду), а АТФ в растворе $MgCl_2$ (после вычитания интенсивности рассеяния раствора $MgCl_2$) – 15.3 кГц. То есть интенсивность рассеяния от $Mg \cdot АТФ$ в 1.6 раз больше, чем от АТФ. Учитывая специфику метода ДСР [386], увеличение гидродинамического диаметра в k раз (в данном случае $k=1.5$) должно сопровождаться увеличением интенсивности рассеяния, согласно закону Релея, в $k^6=11.4$ раз. Если бы укрупнение происходило за счёт агрегации имеющихся молекул, то с учётом уменьшения их количества в k^{-3} раз, в итоге, интенсивность выросла бы в $k^3=3.4$ раза, что не согласуется с экспериментом. Это дополнительно подтверждает, что разница в размерах АТФ и $Mg \cdot АТФ$ не объясняется агрегацией.

С другой стороны, увеличение размера в 1.5 раза также не соответствует увеличению интенсивности согласно закону Рэлея $\sim k^6$. Объяснить это можно следующим образом. Разница в размерах была зарегистрирована методом ДСР, в основе которого лежит принцип измерения коэффициентов диффузии молекул (см. раздел 1.6.3). При этом интенсивность рассеяния не зависит от коэффициентов диффузии, а определяется рассеивающей способностью, зависящей от размера и коэффициента преломления (1.5). Увеличение интенсивности рассеяния по закону $\sim k^6$ можно ожидать только в том случае, если увеличение размера происходит с сохранением коэффициента преломления частицы. Более слабый рост интенсивности с ростом размера свидетельствует о том, что увеличение размера $Mg \cdot АТФ$ по сравнению с АТФ происходит за счёт формирования оболочки, слабо отличающейся по коэффициенту преломления от окружающей среды – воды. Это согласуется со сделанным выводом на основе данных ТГц спектроскопии, что гидратная оболочка $Mg \cdot АТФ$ представляет собой неискажённую структуру воды с небольшим (менее 10%) увеличением количества водородных связей. Очевидно, коэффициент преломления такой гидратной оболочки отличается, но слабо от окружающей невозмущённой воды.

Из представленных данных о размерах молекул следует, что гидратная оболочка $Mg \cdot АТФ$ примерно на 0.25 нм толще, чем у АТФ. Это соответствует 1-2 дополнительным слоям молекул воды. По-видимому, такая оценка занижает реальную протяжённость гидратации, поскольку при небольшом отличии структурных характеристик гидратной оболочки от

невозмущённой воды неуместно предполагать наличие чёткой границы между ними. Более вероятно, что при удалении от Mg·АТФ свойства воды постепенно уравниваются со свойствами невозмущённой воды, а 0.25 нм – это некий характерный параметр, регистрируемый методом ДСР.

Говоря о повышенной структурированности гидратной оболочки Mg·АТФ, неверно было бы сравнивать её со льдом. Во-первых, у льда и воды достаточно сильно отличаются коэффициенты преломления. Во-вторых, связывание АТФ с Mg²⁺ – процесс эндотермический [504], а кристаллизация – экзотермический. Поэтому, если и можно уподоблять структуру гидратной оболочки Mg·АТФ кристаллу, то только жидкому кристаллу. Однако для полноценного изучения этого аспекта необходимо применение молекулярного моделирования, что можно рассматривать в качестве потенциального продолжения данной работы.

Для выяснения причин столь значительного отличия характеристик гидратных оболочек АТФ и Mg·АТФ важно понять, какие факторы являются определяющими для гидратации. Можно выделить два фактора. 1) Большой заряд фосфатных групп. Экранировка ионом Mg²⁺ приводит к снижению плотности заряда и изменению структуры воды вблизи фосфатных групп при слабом изменении гидратации вблизи остальных частей молекулы АТФ. 2) Большая величина дипольного момента молекулы АТФ ≈230 Д, что на два порядка больше, чем у молекулы воды. Вопрос о значении дипольного момента обсуждался в некоторых работах [149,508]. Очевидно, что он сильно уменьшается при связывании АТФ с Mg²⁺. Динамическая гидратная оболочка может быть чувствительна к изменению дипольного момента крупной молекулы и реагировать на эти изменения коллективным образом.

И наконец, самым интригующим вопросом является биологический смысл зарегистрированной «особой» гидратной оболочки Mg·АТФ, которой нет у АТФ. Ведь практически все биологически значимые реакции протекают именно с участием комплекса Mg·АТФ. Не исключено, что характеристики гидратации определяют некоторые параметры этих реакций. Прояснение данного аспекта может иметь важное фундаментальное значение для молекулярной биологии, биохимии и биофизики.

2.11. Гидратация ДНК

В данном разделе проводится изучение гидратации ДНК в воде, а также в присутствии ионов K⁺ и Mg²⁺.

2.11.1. Материалы и методы

Исследовались растворы плазмидной ДНК рЕТ-11с (размер 5.7 kb) в концентрации 25 мг/мл. Растворы ДНК получали в трёх водных растворителях: вода, 40 mM MgCl₂ (Helicon, Россия) и 150 mM KCl (Helicon, Россия). Для приготовления растворов использовалась деионизованная вода MilliQ (Millipore, Германия). Температура всех образцов 25°C.

Выделение плазмидной ДНК проводилось с помощью метода щелочного лизиса [509]. Целостность плазмиды оценивалась с помощью электрофореза в 1% агарозном геле, в присутствии 1 мкг/мл бромистого этидия [510]. Денситометрический анализ электрофореграммы проводился с помощью программы ImageJ v.1.50 (National Institutes of Health, США). Концентрация ДНК оценивалась с помощью спектрофотометра NanoDrop ND-1000 («NanoDrop Technologies», США) по поглощению на длине волны 260 нм с учётом молярной экстинкции $0.020 \text{ (мкг/мл)}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [509]. Чистота препарата ДНК оценивалась по соотношению поглощения на 260 нм (ДНК), 280 нм (белки) и 230 нм (феноляты и тиоцианаты). Соотношение $A_{260} / A_{280} = 2.01$, а $A_{260} / A_{230} = 2.65$, что свидетельствует о высокой степени чистоты плазмидной ДНК [511]. При этом для достижения высокой точности определения концентрации ДНК, растворы разбавлялись таким образом, чтобы измеряемая оптическая плотность была в диапазоне 0.5 – 1.5. Результаты электрофореза, представленные на рисунке 2.17, свидетельствуют, что в исследуемых образцах около 90% ДНК представлено в кольцевой (релаксированной) форме.

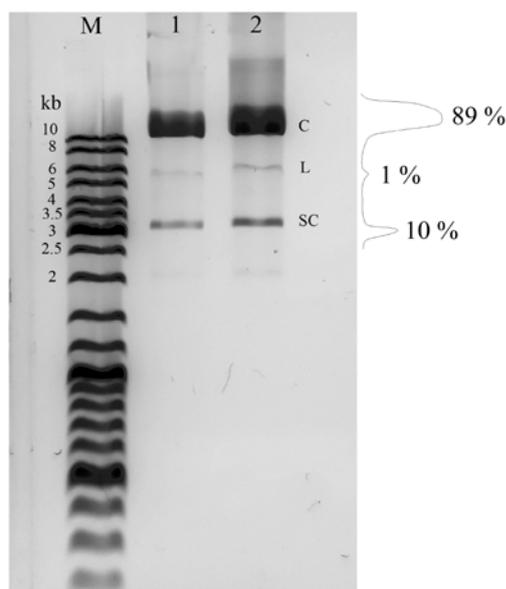


Рисунок 2.17. Электрофореграмма плазмидной ДНК рЕТ-11с и распределение по фракциям: С – кольцевая DNA, L – линейная DNA, SC – суперскрученная DNA.

Для анализа гидратации ДНК проводилось сравнение ДП водной фазы растворов ДНК с ДП их растворителей (аналогичных водных растворов по составу, кроме наличия в них ДНК). Расчёт ДП водной фазы раствора ДНК производится с помощью разработанной в рамках настоящей работы модели эффективной среды для двухфазных диэлектриков с нитевидными включениями (см. раздел 2.4). Она в полной мере применима к водному раствору ДНК в кольцевой форме. При малых концентрациях ДНК модель может быть записана в следующем виде:

$$\varepsilon_s^* = \varepsilon_w^* + f \frac{(\varepsilon_d^* - \varepsilon_w^*)(5\varepsilon_w^* + \varepsilon_d^*)}{3(\varepsilon_w^* + \varepsilon_d^*)}, \quad (2.29)$$

где ε_s^* , ε_d^* , ε_w^* – комплексные ДП раствора ДНК, сухого вещества ДНК и водной фазы, соответственно, f – объёмная доля ДНК в растворе, которая может быть рассчитана умножением массовой доли ДНК (2.5%) на удельный объём ДНК (0.5 см³/г) [473]: $f=0.0125$. Решение комплексного уравнения (2.29) относительно действительной ε'_w и мнимой ε''_w частей ε_w^* выглядит следующим образом:

$$\varepsilon'_w = \frac{1}{e} \left(a - \sqrt{\frac{3}{2}(\sqrt{c^2 + d^2} + c)} \right),$$

$$\varepsilon''_w = \frac{1}{e} \left(b - \sqrt{\frac{3}{2}(\sqrt{c^2 + d^2} - c)} \right), \quad (2.30)$$

$$a = (3 + 4f)\varepsilon'_d - 3\varepsilon'_s$$

$$b = (3 + 4f)\varepsilon''_d - 3\varepsilon''_s$$

$$c = 3(\varepsilon_s'^2 - \varepsilon_s''^2) + (6 - 28f)\varepsilon'_d\varepsilon'_s - 2(3 - 14f)\varepsilon''_d\varepsilon''_s + (3 + 4f + 12f^2)(\varepsilon_d'^2 - \varepsilon_d''^2)$$

$$d = (6 - 28f)\varepsilon''_d\varepsilon'_s + 6\varepsilon'_s\varepsilon''_s + \varepsilon'_d((6 - 28f)\varepsilon''_s + (6 + 8f + 24f^2)\varepsilon_d'')$$

$$e = 2(5f - 3)$$

Функции ε'_s , ε''_s и ε'_d , ε''_d , входящие в формулы (2.30), определялись путём измерения ТГц спектров растворов ДНК и сухих плёнок ДНК, с последующим расчётом по формулам (1.15), как это описано в разделе 2.2. Высушивание плёнок ДНК производилось на окнах из z-cut кварца под вакуумом 1 мбар. Визуально высушивание происходило за несколько минут, однако образцы выдерживали под вакуумом в течение 14 часов для достижения предельной степени

дегидратации. Для расчёта ДП сухой ДНК по формулам (1.15) необходимо было знать толщину плёнок l . Она измерялась с помощью конфокального микроскопа LSM 510 META (Carl Zeiss, Germany) согласно методике, описанной в разделе 2.10.1. Толщины нескольких измеренных плёнок составляли от 6 до 10 мкм.

2.11.2. Особенности гидратных оболочек ДНК в релаксированной форме

В данной работе была использована кольцевая форма плазмидной ДНК. Эта форма присутствует в прокариотических (митохондриальная и геномная ДНК) и эукариотических (митохондриальная и внехромосомная кольцевая ДНК) клетках, а также у большинства ДНК-содержащих вирусов. Интересно, что даже линейная форма ДНК некоторых вирусов замыкается в кольцо после проникновения в клетку [512]. Кольцевая форма ДНК играет важную роль в репликации и транскрипции генов. Эволюционно она является наиболее ранней и наиболее удобной с точки зрения репликации. Линейные формы хромосомной ДНК высших организмов возникли значительно позже и потребовали развития дополнительных механизмов репликации (теломерная ДНК) [513]. В настоящее время внехромосомные кольцевые ДНК эукариот привлекают значительное внимание исследователей, что связано с их важной ролью в регуляции экспрессии различных генов, процессах иммунного ответа, межклеточном взаимодействии и онкогенезе [514].

На рисунке 2.18 приведены ДП водной фазы растворов ДНК в сравнении с ДП их растворителей, из которого можно видеть ряд отличий. В растворах ДНК часть водной фазы, относящаяся к гидратным оболочкам, отличается по структуре от невозмущённой воды (вдали от молекулы ДНК или в растворителе). Очевидно, этим и обусловлены наблюдаемые отличия в ДП. Из рисунка 2.18 видно, что под влиянием ДНК в воде и растворе $MgCl_2$ происходит увеличение ϵ' практически во всём анализируемом спектральном диапазоне и снижение ϵ'' в его низкочастотной части. В растворе KCl под влиянием ДНК ϵ' тоже увеличивается, но только в низкочастотной области, и наблюдается увеличение ϵ'' в середине диапазона. Из этого следует, что с точки зрения диэлектрических свойств, гидратные оболочки ДНК в чистой воде и растворе $MgCl_2$ имеют сходство между собой, но заметно отличаются от гидратных оболочек в растворе KCl .

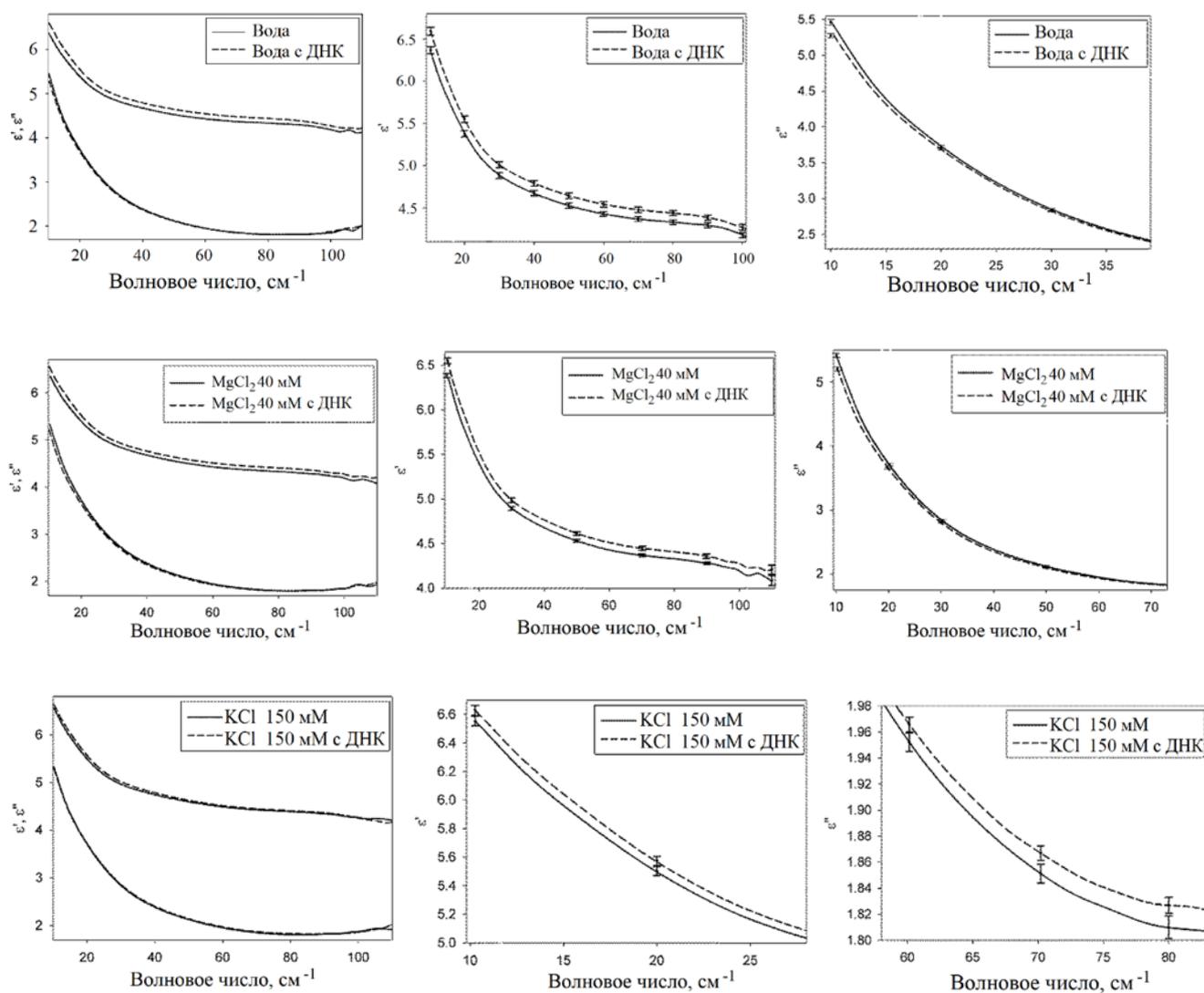


Рисунок 2.18. Парные сравнения ДП водной фазы растворов ДНК и растворителей (водных растворов с аналогичным содержанием ионов, но без ДНК). На левой части рисунка даны ДП во всём анализируемом диапазоне волновых чисел. В центральной и правой частях рисунка представлены действительные ϵ' и мнимые ϵ'' части ДП, соответственно, в тех спектральных интервалах, где зарегистрированы достоверные отличия. Разброс представляет собой 95% доверительные интервалы среднего с числом повторов 35.

Указанные отличия ДП предметно могут быть проанализированы при рассмотрении значений параметров таблицы 2.4, рассчитанных из этих ДП. Можно выделить общие закономерности гидратации ДНК для всех использованных растворителей. Наличие ДНК способствует усилению связывания воды (судя по уменьшению $\Delta\epsilon_1$), увеличению числа свободных молекул воды (увеличение $\Delta\epsilon_2$ и n) и увеличению количества водородных связей (судя по увеличению A_1/ω_1^2). Также в присутствии ДНК наблюдается увеличение времени

релаксации свободных молекул (τ_2). Увеличение ω_1 и γ_1 прослеживается на уровне средних, но не даёт достоверных отличий, поэтому далее не обсуждается.

Таблица 2.4. Значения параметров модельной ДП (2.15) и процент свободных молекул воды n , рассчитанный по формуле (2.21), для исследованных растворов ДНК и их растворителей.

Образец	$\Delta\varepsilon_1$	$\Delta\varepsilon_2$	τ_2 , пс	ω_1 , см ⁻¹	A_1/ω_1^2	γ_1 , см ⁻¹	n , %
Вода	<u>68.9±0.8</u>	<u>2.69±0.04</u>	<u>0.316±0.006</u>	207±4	<u>1.70±0.02</u>	197±11	<u>3.78±0.04</u>
Вода + ДНК	<u>61.7±1.0</u>	<u>3.09±0.10</u>	<u>0.346±0.009</u>	217±8	<u>1.83±0.04</u>	215±16	<u>4.01±0.07</u>
40 мМ MgCl ₂	<u>67.6±0.6</u>	<u>2.71±0.04</u>	<u>0.318±0.004</u>	209±5	<u>1.71±0.02</u>	202±11	<u>3.79±0.04</u>
40 мМ MgCl ₂ + ДНК	<u>60.6±0.7</u>	<u>2.99±0.05</u>	<u>0.337±0.005</u>	218±6	<u>1.81±0.03</u>	217±15	<u>3.95±0.04</u>
150 мМ KCl	<u>63.1±0.9</u>	<u>2.93±0.07</u>	0.329±0.007	212±5	1.77±0.03	201±12	<u>3.95±0.06</u>
150 мМ KCl + ДНК	<u>59.4±0.7</u>	<u>3.11±0.04</u>	0.335±0.005	217±4	1.81±0.03	216±9	<u>4.05±0.03</u>

* Данные представлены в виде парных сравнений водной фазы растворов ДНК и растворителей (водных растворов с аналогичным содержанием ионов, но без ДНК). Разброс представляет собой доверительные интервалы среднего с вероятностью 95% с числом повторов 35. Жирным шрифтом обозначены параметры, по которым обнаружены значимые отличия.

Рассмотрим более детально каждую из отмеченных тенденций. Усиление связывания воды в гидратной оболочке ДНК является известным фактом. Это было обнаружено с помощью разных методов [109,110,120], а также определены сайты связывания, наиболее сильными из которых являются фосфатные группы. Как было отмечено выше, наряду с усилением связанности воды, наблюдается увеличение количества свободных молекул воды. Совместное проявление двух указанных тенденций наблюдалось и в других работах по исследованию гидратных оболочек ДНК, как например [515]. Также это было обнаружено при гидратации белка в частично агрегированной форме (таблица 2.1) и моносахаридов (таблица 2.7). В настоящей работе эти факты объединены в общую закономерность и объясняются устройством динамической гидратной оболочки биомолекул, состоящей из сильно связанных молекул воды

в первичном слое гидратации и частично разрушенной структуры более отдалённых слоёв воды.

Увеличение параметра A_1/ω_1^2 при гидратации ДНК, как и в случае Mg·АТФ (таблица 2.3), свидетельствует об увеличении количества водородных связей между молекулами воды в гидратных оболочках.

Изменение времени релаксации свободных молекул воды τ_2 при гидратации ДНК было обнаружено также при гидратации белка в частично агрегированной форме (таблица 2.1), фосфолипидных липосом в риппл-фазе (таблица 2.2) и моносахаридов (таблица 2.7). По-видимому, в основе всех этих закономерностей лежит общий механизм. Однако, как и в упомянутых случаях, в настоящей работе этому сложно дать обоснованные объяснения с использованием только имеющихся данных. Поэтому ограничимся описанием полученного результата и гипотезой об отличиях среднестатистической структуры полостей в гидратных оболочках, внутри которых свободные молекулы воды испытывают большее тормозящее влияние (см. раздел 2.8.2).

С учётом сделанных интерпретаций, изменение параметров $\Delta\epsilon_1$, $\Delta\epsilon_2$, A_1/ω_1^2 под влиянием ДНК может быть истолковано как наличие трёх структурных фракций молекул воды в гидратной оболочке ДНК: фракция сильно связанных молекул воды, область с повышенным количеством свободных молекул воды и область с повышенным количеством водородных связей.

Рассмотрим вопрос распределения указанных трёх фракций относительно молекулы ДНК. Наиболее сильно связанные молекулы воды, как известно, локализованы вблизи фосфатных групп [109,110,120]. Как уже было упомянуто выше, за пределом сильно связанного первичного гидратного слоя может формироваться слой с большим содержанием свободных молекул воды, в данном случае расположенный вдоль сахарофосфатного остова.

Фракция молекул воды с повышенным количеством водородных связей, по-видимому, находится в желобках молекулы ДНК. Как известно, в области желобков происходит водородное связывание молекул воды с азотистыми основаниями через эндоциклические атомы азота, экзоциклические кетогруппы и аминогруппы (рисунок 2.19). Также известно, что образование водородной связи с молекулой воды, приводит к увеличению её способности образовывать другую водородную связь [516]. Образование множества водородных связей с азотистыми основаниями способно инициировать формирование особого слоя молекул воды с

повышенным водородным связыванием в желобках. Подтверждение этому можно найти в других работах. Например, известно такое понятие как «хребет гидратации», относящееся к более сильно структурированному слою воды в малом желобке ДНК [127–130]. Также в работе [125] был произведён расчёт энтропии воды в желобках молекулы ДНК, и для обоих желобков получены существенно меньшие значения, чем для невозмущённой воды. Исследования гидратных оболочек ДНК, проведённые методом диэлектрической спектроскопии в ГГц области [131,132], свидетельствовали о наличии особого слоя воды в желобках, который авторы назвали струноподобными кластерами. Утверждалось, что образование этого слоя имеет кооперативную природу, поскольку он разрушается при денатурации ДНК. По-видимому, эта фракция молекул воды с повышенным количеством водородных связей, зарегистрированная в настоящей работе с использованием метода THz-TDS, соотносится с упомянутыми данными.

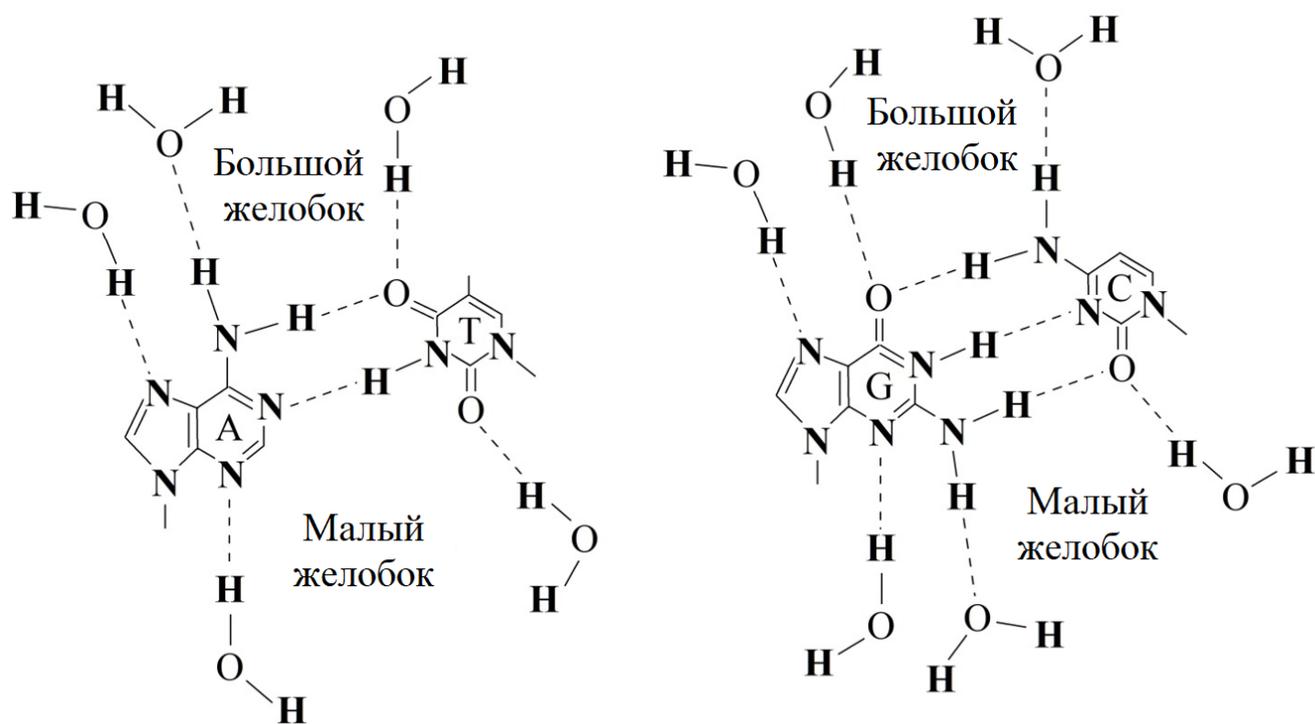


Рисунок 2.19. Схематичное изображение водородного связывания молекул воды с азотистыми основаниями в малом и большом желобках двойной спирали ДНК.

2.11.3. Влияние ионов Mg^{2+} и K^+ на гидратацию ДНК

Отдельного внимания заслуживает вопрос влияния ионов на характеристики гидратации ДНК. Известно, что различные катионы могут оказывать существенное воздействие как на структуру ДНК [517], так и на структуру воды [422]. Естественно также ожидать их воздействия на структуру гидратных оболочек. Как было отмечено выше, в рамках

предлагаемого рассмотрения гидратация ДНК может быть охарактеризована изменением параметров $\Delta\epsilon_1$, n , A_1/ω_1^2 , τ_2 при переходе от чистого растворителя к водной фазе раствора ДНК. Как следует из Таблицы 2.4, каждый из указанных параметров однонаправленно меняется для всех растворителей (вода, 40 мМ $MgCl_2$ и 150 мМ KCl), эти изменения содержатся в таблице 2.5. Примечательно, что в воде и растворе $MgCl_2$ наблюдаются количественно близкие изменения по каждому параметру, тогда как в растворе KCl изменение всех четырёх параметров намного меньше. Это свидетельствует о близкой по структуре, но гораздо менее выраженной гидратации ДНК в растворе KCl , по сравнению с двумя другими растворителями. Очевидно, это не может объясняться отличием в ионной силе использующихся растворителей, а причина кроется в специфическом влиянии катионов Mg^{2+} и K^+ .

Таблица 2.5. Отличие средних значений параметров $\Delta\epsilon_1$, n , A_1/ω_1^2 , τ_2 водной фазы растворов ДНК от растворителя. Символы \downarrow и \uparrow обозначают, что для раствора ДНК значение меньше и больше, соответственно (см. таблицу 2.4).

Образец	$\Delta\epsilon_1$	A_1/ω_1^2	n , %	τ_2
ДНК в воде	\downarrow 7.2	\uparrow 0.13	\uparrow 0.23	\uparrow 0.030
ДНК в растворе 40 мМ $MgCl_2$	\downarrow 7.0	\uparrow 0.10	\uparrow 0.16	\uparrow 0.019
ДНК в растворе 150 мМ KCl	\downarrow 3.7	\uparrow 0.04	\uparrow 0.10	\uparrow 0.006

Рассмотрим возможные отличия гидратации ДНК в присутствии и отсутствии ионов Mg^{2+} . Известно, что в растворе ДНК ионы Mg^{2+} , главным образом, связываются с фосфатными группами [505,517]. При использованных концентрациях ДНК, количество ионов Mg^{2+} (40 мМ) в растворе оказывается примерно в два раза меньше количества фосфатных групп ДНК. Поэтому можно считать, что практически все ионы Mg^{2+} сосредоточены вблизи фосфатных групп. Каждая фосфатная группа (в отсутствие Mg^{2+}) обладает зарядом -1, при этом реализуется ион-дипольное и частично водородное связывание отрицательно заряженной фосфатной группы с положительными сайтами молекулы воды. При связывании с Mg^{2+} заряд фосфата меняется с -1 на +1 (не вдаваясь в рассмотрение вопроса о распределении заряда фосфата), при этом происходит гидратация фосфата за счёт ион-дипольного взаимодействия с отрицательными сайтами молекулы воды. То есть связывание фосфатов с Mg^{2+} приводит лишь к изменению ориентации и расположения молекул воды в их первичной сильно связанной гидратной оболочке. Между двумя описанными случаями нет принципиальной разницы по силе связывания и числу гидратации фосфатов в первичном гидратном слое. Также связывание с фосфатом Mg^{2+} не может заметно повлиять на содержание свободных молекул воды за пределами первичного гидратного слоя вдоль сахарофосфатного остова. Будучи локализованы

вблизи фосфатных групп, ионы Mg^{2+} не способны сильно влиять и на структурные характеристики воды в желобках, ввиду удалённости. Поэтому фракция молекул воды с повышенным числом водородных связей в желобках также не претерпевает существенных изменений при появлении Mg^{2+} . В итоге, приходим к заключению, что гидратные оболочки ДНК не должны сильно отличаться в воде и растворе $MgCl_2$, что согласуется с экспериментальными данными.

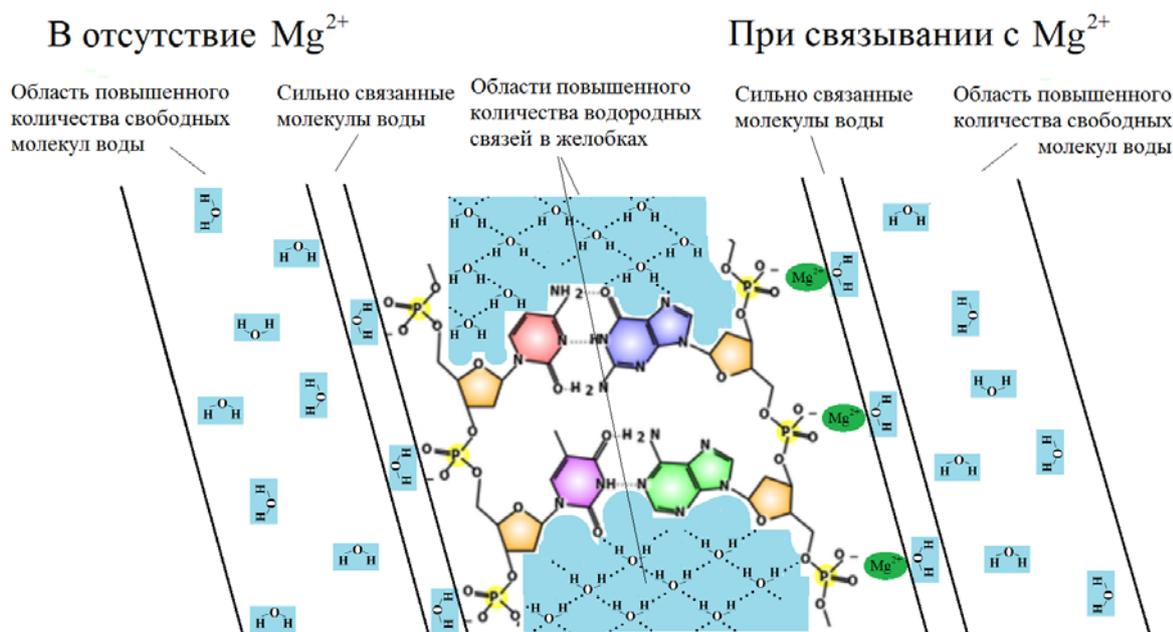


Рисунок 2.20. Схематичное изображение гидратации ДНК в воде и при наличии катионов Mg^{2+} .

Катион K^+ , по сравнению с Mg^{2+} , обладает в два раза меньшим зарядом и в полтора раза большим ионным радиусом [518]. То есть энергия кулоновского взаимодействия фосфатной группы с K^+ значительно меньше, чем с Mg^{2+} . Ион K^+ к тому же обладает гораздо большей трансляционной подвижностью в воде, чем Mg^{2+} [519]. Не имея какой-либо выраженной локализации вблизи молекулы ДНК, ионы K^+ способны эффективно проникать в гидратную оболочку ДНК как вблизи сахарофосфатного остова, так и в желобках. Поскольку ион K^+ обладает хаотропной природой [520], он оказывает лёгкий деструктурирующий эффект на воду. То есть ионы K^+ должны способствовать уменьшению всех трёх описанных фракций молекул воды в гидратных оболочках ДНК и уменьшению отличий гидратных оболочек от невозмущённой воды. Это позволяет на качественном уровне понять причину схожей по типу, но менее выраженной гидратации ДНК в растворе KCl , по сравнению с чистой водой или раствором $MgCl_2$.

Описанные эффекты влияния ДНК на структуру воды и специфическая зависимость этих эффектов от катионов могут представлять интерес не только с точки зрения биоорганической и физической химии, но и с точки зрения молекулярной биофизики. Дело в том, что катион K^+ является основным внутриклеточным ионом, содержание которого около 150 мМ. В работе [521] было показано, что ионы K^+ с близкими к внутриклеточным значениями концентрациями необходимы для формирования правильной структуры G-квадруплекса теломерной ДНК. В работах [522,523] показано, что компактизация ДНК зависит от типа ионов и сильно отличается даже между такими похожими катионами как K^+ и Na^+ . Не исключено, что описанное действие K^+ с внутриклеточной концентрацией на гидратную оболочку ДНК является неким оптимизирующим фактором, важным для молекулярно-биологических процессов. Данная тема может быть предметом отдельных исследований с большей биологической направленностью.

2.11.4. Кооперативные эффекты гидратации ДНК

Дополнительную информацию о гидратации ДНК можно получить из сравнения её с гидратацией АТФ (раздел 2.10). В таблице 2.6 содержатся отличия водной фазы растворов ДНК и АТФ от соответствующих растворителей при одинаковой концентрации по нуклеотидам.

Таблица 2.6*. Отличие средних значений параметров $\Delta\epsilon_1$, n , A_1/ω_1^2 , τ_2 водной фазы растворов ДНК и АТФ от растворителей (вода и раствор 40 мМ $MgCl_2$). Символы \downarrow и \uparrow обозначают, что для раствора ДНК или АТФ значение параметра меньше и больше, соответственно, чем для растворителя.

Образец	$\Delta\epsilon_1$	A_1/ω_1^2	n , %	τ_2
ДНК в воде	\downarrow 3.8	\uparrow 0.07	\uparrow 0.12	\uparrow 0.016
АТФ в воде	\downarrow 2.4	\uparrow 0.03	\uparrow 0.04	\uparrow 0.002
ДНК в растворе 40 мМ $MgCl_2$	\downarrow 3.7	\uparrow 0.05	\uparrow 0.08	\uparrow 0.010
АТФ в растворе 40 мМ $MgCl_2$	\downarrow 1.2	\uparrow 0.04	\uparrow 0.01	0

*Параметры растворов АТФ (таблица 2.3) были получены при концентрации 40 мМ. Для корректного сравнения, параметры растворов ДНК (таблица 2.4) были пересчитаны на концентрацию 40 мМ по нуклеотидам.

Из таблицы 2.6 следует, что гидратация АТФ и ДНК характеризуется однонаправленными изменениями каждого из четырёх параметров. При этом гидратация ДНК выражена сильнее, судя по большим изменениям всех параметров. Данный вывод сохраняется независимо от наличия ионов Mg^{2+} . Из этого можно заключить, что ДНК и АТФ способствуют близким структурно-динамическим изменениям воды в гидратных оболочках, но выраженность гидратации ДНК в расчёте на нуклеотид оказывается заметно сильнее. Это, очевидно, объясняется кооперативными эффектами. То есть, если один нуклеотид способен

определённым образом изменять структуру воды вблизи себя, то нуклеотиды, организованные в двойную полимерную цепочку, приводят к тем же изменениям, но более стабильным и в большем объёме.

2.12. Гидратация сахаров

В работе производилось сравнение гидратации сахаров разного типа: моно- и полисахаридов, заряженных и нейтральных, стереоизомеров.

2.12.1. Материалы и методы

В работе использовались следующие сахара: D(+)-глюкоза (#A1422, Panreac, Испания), D(+)-галактоза (#A1131, Panreac, Испания), декстран ≈ 40 кДа (#31389, Sigma-Aldrich, США), амилопектин (#10120, Sigma-Aldrich, США), D(+)-галактуроновая кислота (#48280, Sigma-Aldrich, США), полигалактуроновая кислота (#81325, Sigma-Aldrich, США). Растворы готовились с использованием деионизованной воды (MilliQ, Германия). Для повышения pH кислых растворов (галактуроновой и полигалактуроновой кислоты) использовался NaOH (#567530, Sigma-Aldrich, США). Приготовление таблеток сухих сахаров выполняли в смеси с полиэтиленовым порошком 34-50 мкм (#434272, Sigma-Aldrich, USA). Структурные формулы всех используемых сахаров изображены на рисунке 2.21.

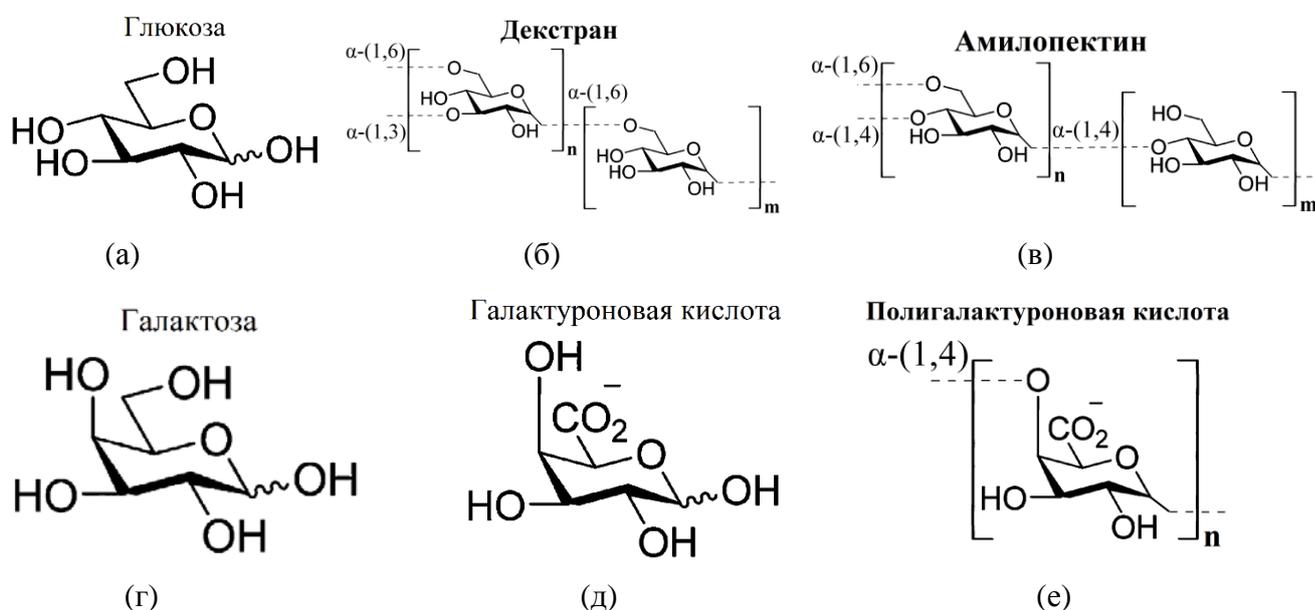


Рисунок 2.21. Структурные формулы изучаемых сахаров: (а) глюкоза; (б) декстран и (в) амилопектин (полисахариды на основе глюкозы); (г) галактоза (стереоизомер глюкозы); (д) галактуроновая кислота; (е) полигалактуроновая кислота (полисахарид галактуроновой кислоты).

Готовились водные растворы сахаров в следующих концентрациях: глюкоза, галактоза – 50 мг/мл; галактуроновая кислота – 53.87 мг/мл; декстран и амилопектин – 45 мг/мл; полигалактуроновая кислота – 48.87 мг/мл. Отличия в концентрациях моносахаридов обусловлены разницей в молекулярном весе: глюкоза, галактоза – 180.16 г/моль, а галактуроновая кислота – 194.1 г/моль. Меньшие концентрации полисахаридов по сравнению с моносахаридами обусловлены тем, что в составе полисахаридов мономеры связаны гликозидными связями, образование каждой из которых сопровождается отщеплением молекулы воды и уменьшением молекулярного веса связанного моносахарида. Таким образом, достигалось уравнивание молярных концентраций (277.5 мМ) всех растворов по моносахаридам. Это позволяло проводить корректное сравнение анализируемых характеристик гидратации различных сахаров.

Разведение моносахаридов в воде производилось простым смешиванием и выдержкой при комнатной температуре около 1 часа перед измерением. Растворы полисахаридов готовились путём постепенного добавления сухого вещества в воду при температуре 80°C с интенсивным перемешиванием магнитной мешалкой. По окончании растворения полисахаридов (при достижении визуально однородной субстанции) производилась дегазация под вакуумом 140 мм рт. ст. с продолжающимся перемешиванием при 80°C с использованием станции дегазации Degassing station (TA Instruments, USA) в течение 20 мин. Это способствовало устранению растворённого воздуха из вязких растворов и исключало появление пузырьков на окнах кюветы при последующих спектральных измерениях. Затем растворы взвешивались, и добавлялась вода, потерянная при испарении в процессе приготовления растворов. Растворы галактуроновой и полигалактуроновой кислоты доводились до pH=6 путём добавки раствора 1 М NaOH.

Из экспериментально полученных ДП растворов сахаров производился расчёт ДП водной фазы растворов с использованием соответствующих моделей эффективной среды. Для моносахаридов использовалась модель Максвелла Гарнетта (1.17), а для полисахаридов – разработанная в данной работе модель эффективной среды (2.14). Так как для указанных моделей требуется определение ДП сухих сахаров, они готовились отдельно с помощью двух различных методик.

Каждый образец сухого полисахарида изготавливался следующим образом. Полисахарид массой 21 мг смешивался с 123 мг порошка полиэтилена, после чего производилось тщательное измельчение в агатовой ступке. Затем порошок помещался в пресс-форму, и под нагрузкой 10

тонн производилось прессование таблеток диаметром 13 мм и толщиной около 1.1 мм. Для измерения фонового спектра аналогичным образом изготавливалась таблетка из чистого полиэтилена с массой 123 мг.

Для моносахаридов применялась другая методика. 30 мг сахара насыпали между двумя тефлоновыми плёнками толщиной 5 мкм. Нижняя плёнка располагалась на гладкой деревянной подложке для термоизоляции. К верхней плёнке прикладывался металлический плоский нагреватель, разогретый до температуры на 3-5°C выше температуры плавления сахара (при этом температура плавления тефлона не достигалась). После расплавления сахара, производилась быстрая замена нагревателя на металлическую пластину, охлаждённую в жидком азоте. Ввиду достаточно высокой температуры стеклования сахаров [330] и тонкого слоя образца, его удавалось быстро охладить и получить моносахарид в аморфной фазе.

Использование двух различных методик приготовления образцов сухих сахаров для спектрального анализа связано с тем, что исследованные полисахариды находятся в аморфной форме, а моносахариды в кристаллической. Спектры кристаллов проявляют характерные фоновые полосы поглощения в ТГц области. Поскольку спектры сухих образцов измерялись с целью вычитания вклада сахаров из ДП их растворов, то необходимо было избегать фоновых колебаний, поскольку у сахаров в растворённом виде их нет. Измерение спектров моносахаридов в аморфной форме позволило решить эту проблему. Рисунок 2.22 наглядно демонстрирует отсутствие фоновых полос у аморфных образцов глюкозы и галактурановой кислоты, которые отчётливо видны у кристаллической галактурановой кислоты. Спектр аморфной галактозы не отличался от спектра аморфной глюкозы, поэтому не приводится. Спектр кристаллической глюкозы может быть найден, например в [524], а спектр кристаллической галактозы в [525].

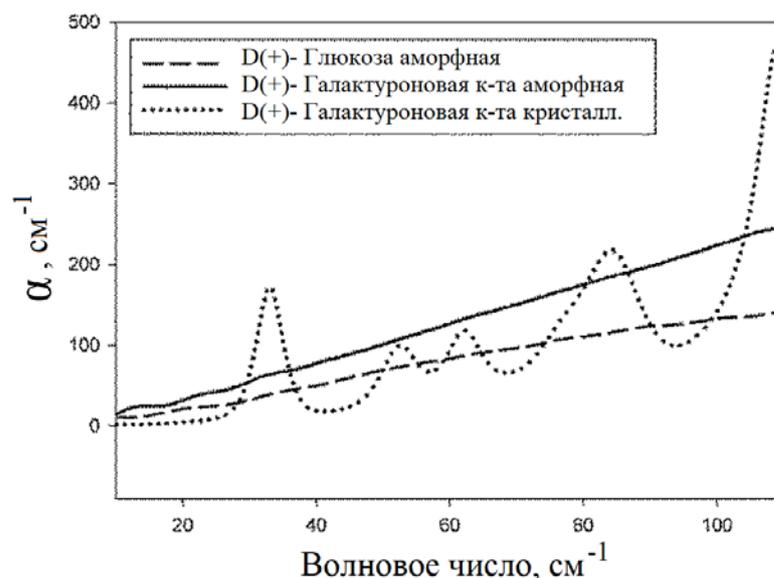


Рисунок 2.22. Спектры поглощения аморфных образцов глюкозы и галактурановой кислоты, а также кристаллической галактурановой кислоты.

Стоит отметить, что описанная методика получения аморфных моносахаридов оказалась лучше, чем методики, описанные в литературе, например в [524], где сахара расплавлялись в открытой ёмкости. Хотя авторы и упоминали, что в расплавленном состоянии сахара находились короткое время, тем не менее, отмечали их потемнение. Потемнение, как известно, связано с термическим разложением сахара, сопровождающимся реакциями дегидратации [525]. В настоящей работе полученные образцы глюкозы и галактозы были абсолютно прозрачны, а галактурановая кислота проявляла едва заметный жёлтый оттенок. Применённый подход плавления сахара в тонком слое между двумя поверхностями, препятствовал испарению воды, образующейся при разложении сахара. А поскольку реакции дегидратации при термическом разложении сахаров обратимы [526], то при охлаждении удавалось сохранить их химический состав.

2.12.2. Общие характеристики гидратации сахаров

В данной работе проводилось исследование растворов сахаров с концентрациями около 5 вес%. Данная концентрация считалась оптимальной по двум причинам. Во-первых, при концентрации ниже 3% в рамках используемого подхода не удаётся зарегистрировать надёжные отличия растворов от воды. Во-вторых, из литературных данных [39,179,192] следует, что в растворах сахаров (моно- и дисахаридов) соотношение объёма гидратной воды к объёму сахара уменьшается с ростом концентрации, начиная примерно с 3-5%. Был сделан вывод, что это связано с частичным перекрытием гидратных оболочек. При этом ТГц

спектроскопия представляет особую ценность именно в её способности регистрировать отдалённые области гидратации. Таким образом, при концентрациях меньше 5% страдает чувствительность метода, а при больших концентрациях теряется информация об отдалённых слоях гидратации.

На рисунке 2.23 представлены действительные и мнимые части ДП водной фазы исследованных растворов сахаров в сравнении друг с другом и с чистой водой. ДП на рисунке 2.23 дают общее представление о диэлектрических спектрах анализируемых растворов в ТГц области, но для сравнения их между собой удобнее использовать разностные ДП, показанные на рисунке 2.24.

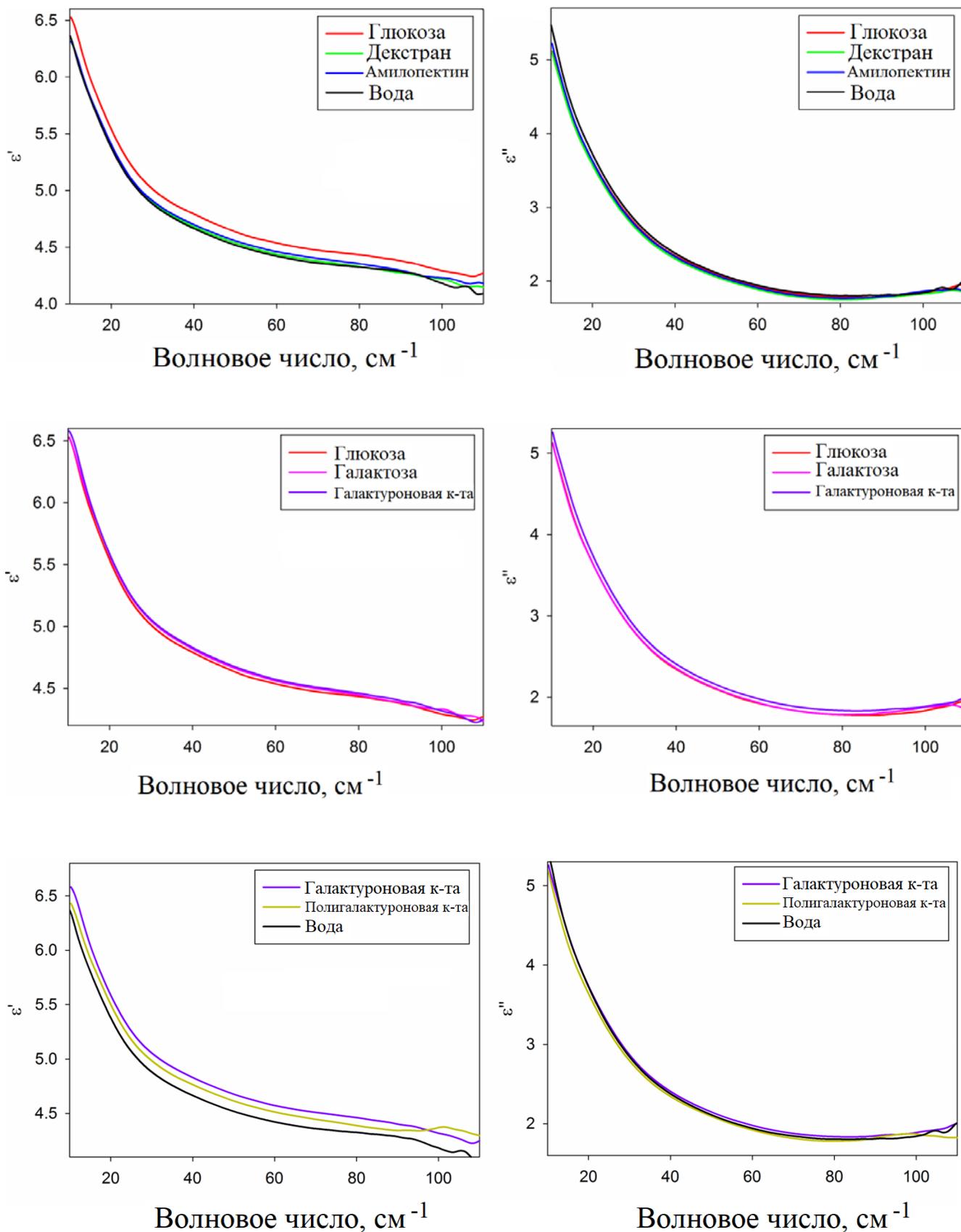
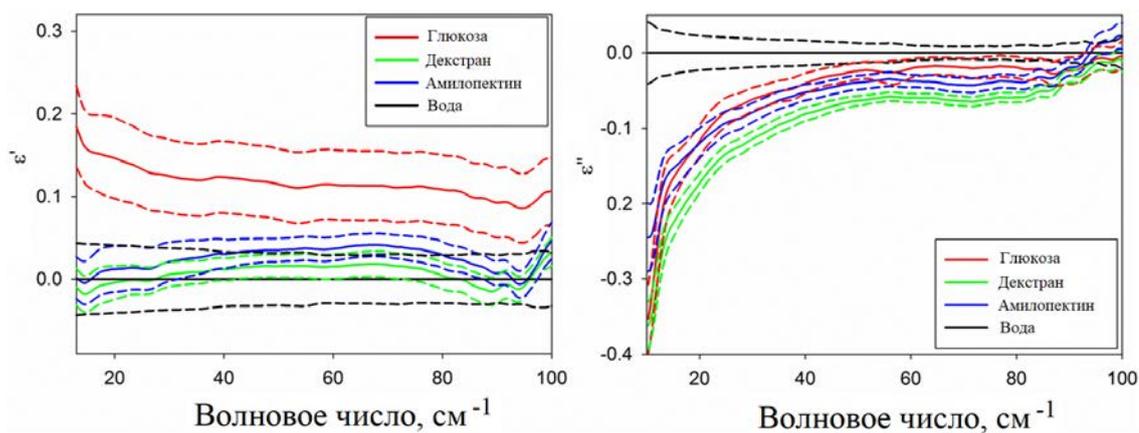
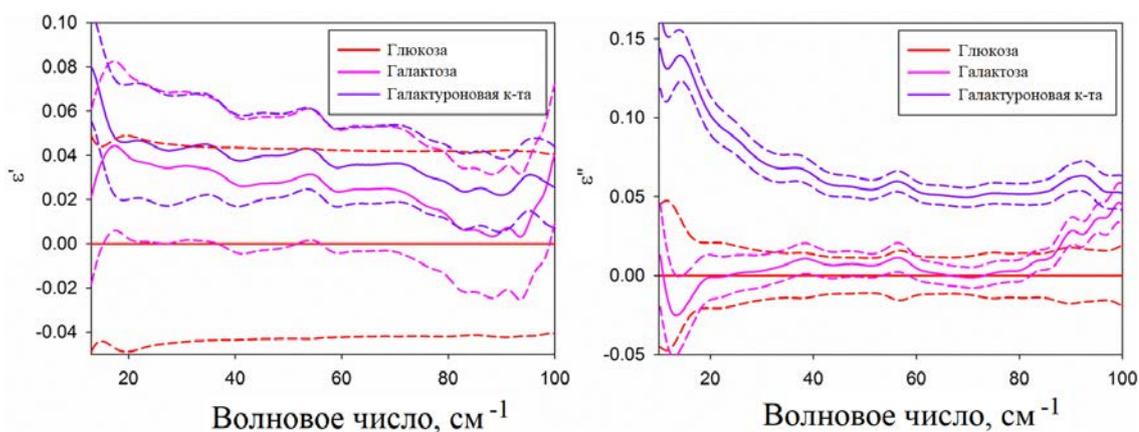


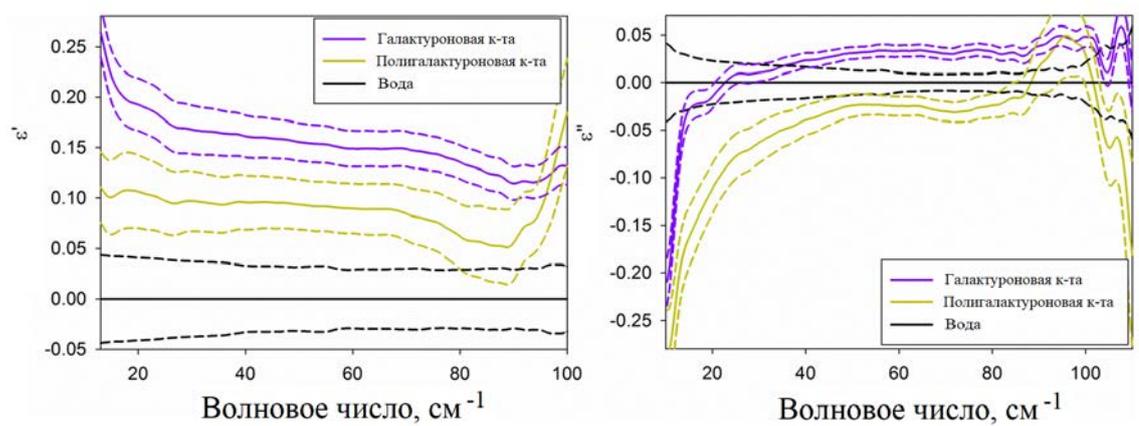
Рисунок 2.23. ДП водной фазы (действительная ϵ' и мнимая ϵ'' части) исследованных растворов сахаров в сравнении друг с другом и с водой.



(а)



(б)



(в)

Рисунок 2.24. Разностные спектры ДП (действительная ϵ' и мнимая ϵ'' части) водной фазы исследованных растворов сахаров. Панель (а) относится к растворам глюкозы, декстрана и амилопектина относительно воды; панель (б) – к растворам галактозы и галактуроновой кислоты относительно раствора глюкозы; панель (в) – к растворам галактуроновой и полигалактуроновой кислоты относительно воды. Сплошные линии – это средние спектры ДП, а пунктирные линии того же цвета показывают разброс в виде доверительного интервала среднего с уровнем значимости 95% с числом повторов не менее 20.

Рисунок 2.24 демонстрирует множество отличий ДП водной фазы растворов различных сахаров от воды и друг от друга. Это обусловлено отличием структурно-динамических характеристик воды в растворах из-за наличия гидратных оболочек различных сахаров. Для интерпретации полученных отличий были рассчитаны параметры модельной ДП воды (2.15), которые содержатся в таблице 2.7.

Таблица 2.7*. Параметры модельной ДП (2.15), рассчитанные для водной фазы растворов сахаров и чистой воды. Также даны значения процента свободных молекул воды в растворах, рассчитанные по формуле (2.21).

Раствор	$\Delta\epsilon_1$	$\Delta\epsilon_2$	τ_2 , пс	ω_1 , см ⁻¹	γ_1 , см ⁻¹	A_1/ω_1^2	n, %
Вода	68.9±0.8	2.69±0.04	0.316±0.006	207±4	197±11	1.70±0.02	3.78±0.04
Глюкоза	62.5±0.5	2.94±0.04	0.326±0.005	216±4	203±6	1.81±0.04	3.91±0.03
Галактоза	62.2±0.8	2.93±0.05	0.327±0.004	221±5	217±9	1.84±0.03	3.86±0.04
Галактуроновая кислота	63.2±0.5	3.01±0.02	0.334±0.003	222±5	223±10	1.87±0.02	3.91±0.03
Декстран	63.8±0.9	2.73±0.05	0.321±0.005	211±4	200±10	1.72±0.02	3.80±0.05
Амилопектин	66.0±0.8	2.69±0.05	0.319±0.005	210±5	197±10	1.74±0.02	3.74±0.04
Полигалактуроновая кислота	63.8±0.8	2.73±0.05	0.312±0.004	219±7	208±13	1.80±0.03	3.72±0.06

*Разброс представляет собой 95% доверительные интервалы среднего с числом повторов не менее 20.

Данные таблицы 2.7 показывают, что независимо от типа молекул сахаров в растворе, гидратация проявляется в уменьшении параметра $\Delta\epsilon_1$ относительно значения чистой воды. Это свидетельствует о большей связанности молекул воды, входящих в гидратные оболочки сахаров. Этот вывод подтверждается другими исследованиями с использованием диэлектрической спектроскопии [180,203] и широкополосной спектроскопии светорассеяния [13]. Усиление связывания воды объясняется гидрофильной природой рассматриваемых сахаров. По остальным параметрам (кроме $\Delta\epsilon_1$) наблюдается большое разнообразие отличий от воды в зависимости от типа растворённого сахара.

2.12.3. Гидратные оболочки моносахаридов

Гидратация всех рассматриваемых моносахаридов (нейтральных и заряженных), кроме уменьшения $\Delta\epsilon_1$, характеризуется также увеличением значений параметров ω_1 , A_1/ω_1^2 , $\Delta\epsilon_2$, n, τ_2 по сравнению с чистой водой (таблица 2.8). Обсудим каждый из этих параметров отдельно.

Таблица 2.8*. Отличия средних значений параметров ω_1 , A_1/ω_1^2 , n , τ_2 водной фазы растворов моносахаридов от воды. Символ \uparrow обозначает, что для раствора сахара значение параметра больше, чем для воды.

Образец	ω_1 , см ⁻¹	A_1/ω_1^2	n , %	τ_2 , пс
Глюкоза	\uparrow 9	\uparrow 0.11	\uparrow 0.13	\uparrow 0.01
Галактоза	\uparrow 14	\uparrow 0.14	\uparrow 0.08	\uparrow 0.01
Галактуронозная к-та	\uparrow 15	\uparrow 0.17	\uparrow 0.13	\uparrow 0.02

*Жирным шрифтом выделены значения параметров растворов, значительно отличающиеся от воды по критерию не перекрытия 95% доверительных интервалов.

Увеличение частоты межмолекулярных колебаний ω_1 в растворах моносахаридов свидетельствует об увеличении средней энергии водородного связывания молекул воды. Это объясняется тем, что водородные связи молекул воды с гидроксильными группами сахаров обладают большей энергией, чем между молекулами воды [179,527].

Увеличение параметра A_1/ω_1^2 свидетельствует о большем количестве водородных связей в гидратной оболочке моносахаридов, чем в невозмущённой воде. Аналогичное проявление гидратации наблюдалось для комплекса Mg·АТФ (таблица 2.3) и ДНК (таблица 2.4). По-видимому, это универсальная характеристика гидратации определённого класса гидрофильных молекул.

Увеличение параметров $\Delta\epsilon_2$ и n в присутствии моносахаридов свидетельствует о наличии в их гидратных оболочках большего количества свободных молекул воды по сравнению с невозмущённой водой [34,35]. Данное проявление гидратации для других типов биомолекул обсуждалось в разделах 2.8.2, 2.11.2 при анализе гидратации белка и ДНК. Общий вывод заключается в том, что, наряду с сильно связанной первичной гидратной оболочкой биомолекул, в отдалённых слоях гидратации наблюдается большее количество свободных молекул воды. Этот вывод согласуется с результатами некоторых других работ [41,151,179]. Например, в работе [179] методами микроволновой и ТГц спектроскопии было показано, что молекулы дисахаридов в растворе, наряду со связыванием молекул воды, способствуют образованию в среднем 1.25 свободных молекул воды. Вопрос определения количества свободных молекул воды достаточно сложный, и в разных работах используются разные подходы. Как правило, при расчёте доли свободных молекул не учитываются процессы экранировки, чему было уделено особое внимание в разделе 2.7 и, в результате, получена формула (2.21). В данном случае, важна согласованность выявленных в разных исследованиях тенденций к увеличению доли свободных молекул воды при гидратации сахаров.

Увеличение времени релаксации свободных молекул воды τ_2 (таблица 2.7) является ещё одной особенностью гидратации моносахаридов. Изменение данного параметра при гидратации было обнаружено для DPPC липосом в риппл-фазе (таблица 2.2), молекул белка в частично агрегированной форме (таблица 2.1), ДНК (таблица 2.4). При обсуждении гидратации этих биомолекул в указанных разделах была дана интерпретация, которую можно обобщить и для моносахаридов.

При сравнении гидратации трёх проанализированных моносахаридов обращает на себя внимание галактуроновая кислота. Её раствор характеризуется наибольшими значениями (и наиболее сильно отличающимися от чистой воды) параметров, указанных в таблице 2.8. Данные проявления, очевидно, обусловлены наличием у галактуроновой кислоты карбоксильной группы, обладающей зарядом и дополнительным сайтом водородного связывания. Для поиска взаимосвязей между значениями указанных параметров и наличием карбоксильной группы требуются дополнительные исследования с использованием более широкого набора химических соединений. В данном случае ограничимся демонстрацией способности предлагаемого подхода отличать сахара с различными химическими группами на основе анализа параметров воды в их растворах.

Особо стоит отметить отличие глюкозы от галактозы, наблюдающееся по параметру γ (таблица 2.7). Эти два стереоизомера отличаются только ориентацией ОН(4) группы [214]: у глюкозы она ориентируется экваториально (рисунок 2.21а), а у галактозы – аксиально (рисунок 2.21г). Все остальные отличия (по соотношению α - и β -аномеров и содержанию фуранозных форм в растворе) незначительны [528]. Параметр γ для раствора галактозы оказывается значительно больше, чем для воды, тогда как данный параметр для раствора глюкозы от значения воды неотличим. Поскольку параметр γ имеет смысл ширины распределения энергий межмолекулярных водородных связей (раздел 2.6), то указанное отличие свидетельствует об уширении распределения энергий водородных связей в гидратной оболочке галактозы. Для понимания данного факта стоит обратиться к работам, где методами ЯМР [200,213,215], измерения сжимаемости [212,214], кинетическими измерениями [211] были установлены отличия связанности гидратной воды в зависимости от взаимной ориентации ОН-групп сахаров в растворах. Было показано, что наибольшее значение имеет взаимная ориентация ОН(4) и ОН(2) групп. Моносахариды с аксиальной ОН(4) и экваториальной ОН(2) группами, как галактоза и галактуроновая кислота, гораздо хуже соответствуют тетраэдрической сети водородных связей, чем моносахариды с обеими экваториальными группами, как глюкоза. Чем хуже соответствие, тем больше искажение структуры воды в первичной гидратной оболочке.

По-видимому, это искажение передаётся и на отдалённую область гидратации, что сопряжено с большей вариативностью межмолекулярного водородного связывания и приводит к большей ширине энергетических распределений.

Определяющее влияние именно аксиальной ОН(4) группы на увеличение параметра γ_1 подтверждается также на примере сравнения галактуроновой и полигалактуроновой кислот. Галактуроновая кислота, как и галактоза, обладает аксиальной ОН(4) группой (рисунок 2.21д), и её раствор характеризуется большей величиной γ_1 . Полигалактуроновая кислота ОН(4) групп не имеет (рисунок 2.21е), ввиду наличия (1,4)-гликозидных связей, и её раствор характеризуется меньшей величиной γ_1 , неотличимой от раствора глюкозы и воды (таблица 2.7).

2.12.4. Сравнение гидратации моно- и полисахаридов

В таблице 2.9 приведены отличия значений параметров водной фазы растворов глюкозы, декстрана и амилопектина от воды.

Таблица 2.9. Отличия средних значений параметров $\Delta\epsilon_1$, ω_1 , A_1/ω_1^2 , n , τ_2 водной фазы растворов сахаров от воды. Приведены данные для моносахарида глюкозы и двух полисахаридов глюкозы – декстрана и амилопектина. Символы \downarrow и \uparrow обозначают, что для раствора сахара значение параметра меньше и больше, соответственно, чем для воды.

Сахар	Глюкоза	Декстран	Амилопектин
$\Delta\epsilon_1$	\downarrow 6.4	\downarrow 5.0	\downarrow 2.9
$\omega_1, \text{см}^{-1}$	\uparrow 9	\uparrow 3	\uparrow 3
A_1/ω_1^2	\uparrow 0.11	\uparrow 0.02	\uparrow 0.04
$n, \%$	\uparrow 0.13	\uparrow 0.02	\downarrow 0.04
$\tau_2, \text{пс}$	\uparrow 0.010	\uparrow 0.005	\uparrow 0.003

*Жирным шрифтом выделены значения параметров растворов, значимо отличающиеся от воды по критерию не перекрытия 95% доверительных интервалов.

Из таблицы 2.9 видно, что гидратация моносахарида и полисахаридов характеризуется однонаправленными изменениями каждого из пяти параметров при сравнении средних значений. При этом также видно, что по каждому параметру растворы полисахаридов меньше отличаются от воды, чем раствор моносахарида. Более того, по всем параметрам, кроме $\Delta\epsilon_1$, растворы декстрана и амилопектина становятся неотличимы от воды.

Похожее соотношение параметров получается при сравнении растворов галактуроновой кислоты (моносахарид) и полигалактуроновой кислоты (полисахарид), то есть все указанные

параметры раствора полигалактуроновой кислоты ближе к значениям воды (таблица 2.7). Отличием полигалактуроновой кислоты от полисахаридов из глюкозы является то, что два её параметра ω_1 и A_1/ω_1^2 , хоть и меньше, чем у галактуроновой кислоты, но достоверно больше, чем у воды. Это, видимо, обусловлено наличием карбоксильной группы, которая присутствует, как в мономере (рисунок 2.21д), так и в полимере (рисунок 2.21е), поскольку она содержит дополнительные сайты достаточно сильного связывания молекул воды.

Меньшие отличия от воды растворов полисахаридов по сравнению с растворами моносахаридов означают, что гидратные оболочки полисахаридов менее выражены, чем у моносахаридов. Это можно объяснить тем, что при образовании полисахаридов часть ОН-групп моносахаридов теряется с образованием гликозидных связей. Гидратация гликозид-кислорода существенно слабее, чем гидратация ОН-групп [181]. Также в полимере каждый моносахарид менее доступен для гидратации из-за связи с соседними моносахаридами.

Интересно сравнить по данному аспекту полисахариды с ДНК (полимеры нуклеиновых кислот). Как было показано в разделе 2.11.4, гидратация ДНК проявляет кооперативные эффекты, заключающиеся в том, что по всем параметрам раствор ДНК отличается от воды больше, чем раствор отдельных нуклеотидов. То есть ДНК проявляет более выраженную гидратацию, чем отдельные нуклеотиды. Это перекликается также с результатами раздела 2.9.2, где оценка толщины гидратного слоя липосом дала неожиданно большую величину – более 5 нм, что тоже может быть объяснено кооперативными эффектами. С полисахаридами подобные эффекты не наблюдаются, а получается обратная тенденция: полисахарид проявляет менее выраженную гидратацию, чем составляющие его моносахариды по-отдельности. Вероятно, для проявления кооперативных эффектов гидратации требуется наличие существенно большей площади контакта макромолекулы с водой по сравнению с размером молекул воды. Диаметр липосом порядка сотен нм. Диаметр спирали ДНК около 2 нм, но в поперечном сечении она обладает сложной пространственной структурой с двумя желобками. При этом линейный размер моносахарида, определяющий поперечное сечение цепи полисахарида, заметно меньше – около 0.7 нм [529].

Интересно сравнить также гидратацию декстрана (рисунок 2.21б) и амилопектина (рисунок 2.21в). Они оба являются разветвлёнными гомополисахаридами, состоящими из D-глюкопиранозных мономеров. Соотношение числа ответвлений к числу мономеров у обоих полисахаридов близко. Их отличие заключается только в соединяющих моносахаридах гликозидных связях. В молекуле декстрана [530,531] основная цепь связана гликозидными

связями α -(1,6) с присоединением боковых ветвей связями α -(1,3), а в амилопектине [532] основная цепь содержит гликозидные связи α -(1,4), а боковые цепи присоединяются связями α -(1,6). Из таблицы 2.7 видно, что растворы декстрана и амилопектина достоверно отличаются по параметру $\Delta\epsilon_1$, то есть по связанности воды в гидратных оболочках. Из этого следует, что используемый в настоящей работе подход анализа гидратации чувствителен, в том числе, к типу гликозидных связей полисахаридов. В то же время, без проведения более широких исследований пока неясно, что является основной причиной указанных отличий гидратации: тип самих гликозидных связей или наличие незадействованных в гликозидных связях ОН-групп моносахаридов.

Обобщая полученные в настоящем разделе данные, можно сделать вывод о том, что метод THz-TDS при использовании описанных подходов к измерению, обработке и анализу спектров позволяет получать многообразную информацию о гидратных оболочках сахаров. Данная работа также показала, что описанные характеристики гидратации сахаров в ряде случаев понятным образом коррелируют со структурой их молекул. Это означает, что через анализ гидратных оболочек можно получать информацию о структуре гидратируемых молекул. Конечно, рано говорить о полном понимании взаимосвязи между этими двумя типами структур (молекул и их гидратных оболочек), требуются дополнительные исследования. Но уже сейчас ясно, что потенциал THz-TDS, как структурного метода, не ограничивается объектами кристаллического типа [439,524,533–535]. Он может быть развит до уровня полноценного метода исследования молекулярной организации водных растворов, в том числе растворов биомолекул, и использоваться наряду с ЯМР и ИК спектроскопией. Только вместо химического сдвига и положения полос поглощения, ТГц спектроскопия должна оперировать параметрами ДП водной фазы изучаемых растворов.

ГЛАВА 3. ИНФРАКРАСНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ СОБСТВЕННОГО ИЗЛУЧЕНИЯ ПРИМЕНИТЕЛЬНО К ИССЛЕДОВАНИЮ СТРУКТУРЫ БИОМОЛЕКУЛ В РАСТВОРАХ

При подготовке данного раздела диссертации использованы материалы семинара ИТЭБ РАН, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, автором были апробированы основные результаты, положения и выводы его исследования: Пеньков Н.В. Молекулярная организация водных растворов биомолекул. Автореф. дисс. д.ф.-м.н. (ПРОЕКТ) <https://iteb.ru/news/zasedanie-sektsii-teoreticheskaya-biofizika-i-mode-202205/>

3.1. Принцип и устройство измерения спектров собственного излучения образца с использованием холодного фона

3.1.1. Устройство измерительной системы

Схема измерения спектров собственного излучения (эмиссионных спектров) изображена на рисунке 3.1. Основу системы регистрации спектров составляет вакуумный ИК спектрометр с Фурье-преобразованием. В настоящей работе использовался спектрометр Vertex 80v (Bruker, Германия). Спектрометр настраивался таким образом, что фокус его оптической системы (место положения источника излучения спектрометра) находился вблизи входного окна с внешней стороны. Изучаемый образец, эмиссионный спектр которого требуется измерить, помещается в этот фокус.

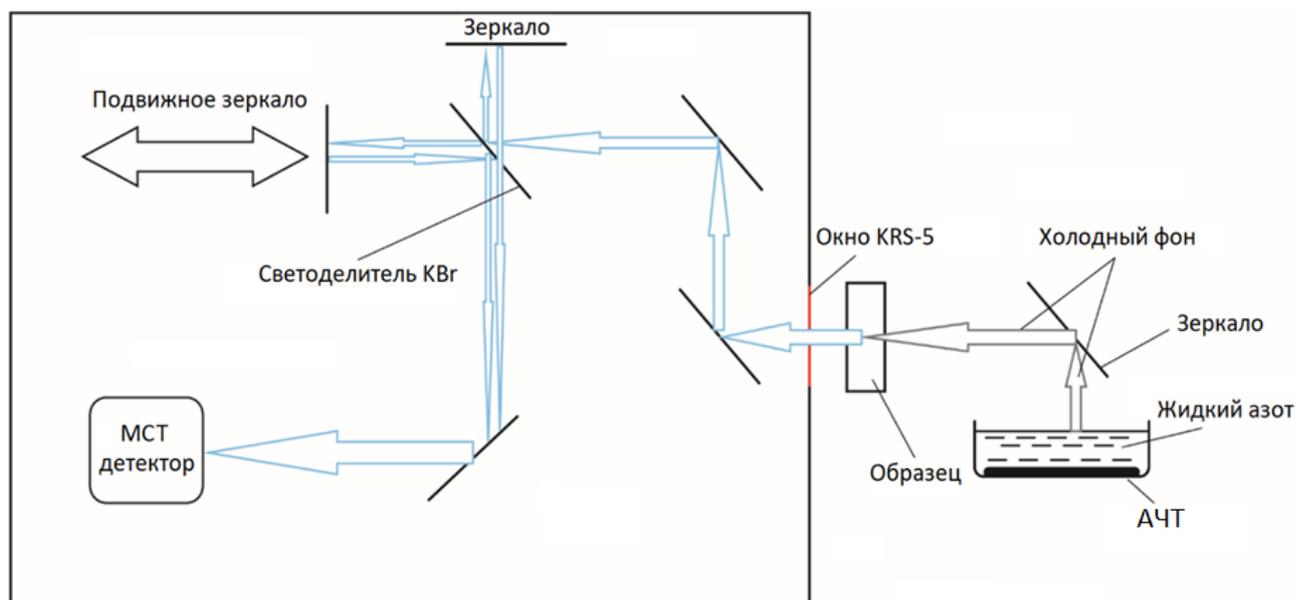


Рисунок 3.1. Схема измерения спектров собственного излучения без возбуждения образца.

Положение фокуса должно быть с максимальной точностью определено и зависит от юстировки всей оптической системы. Для конечного поиска фокуса использовалась лампочка

накаливания с размерами менее 2 мм. Перемещая её по трём координатам, производился поиск положения, при котором достигался максимальный сигнал детектора.

Принципиальным условием для измерения спектра собственного излучения образца без его возбуждения является температурный контраст образца и окружения. В настоящей работе, в отличие от обычной практики нагрева образца [364–366,370], была реализована экранировка окружающего теплового излучения. Для этого на фоне объекта исследования через зеркало помещалась ёмкость, наполненная жидким азотом (рисунок 3.1). На дне ёмкости помещена пластинка, покрытая плотным слоем сажи, имитирующая абсолютно чёрное тело (АЧТ). Таким образом, в качестве фонового излучения выступало излучение АЧТ при температуре кипения азота. Описанная экранировка внешнего теплового излучения в настоящей работе называется холодным фоном.

В данном случае важно, чтобы область холодного фона полностью перекрывала угловую апертуру входящего в спектрометр излучения. Это можно проверить по сигналу детектора: если холодная пластинка слишком мала или смещена, на детектор попадает излучение от окружающих более тёплых предметов, и сигнал резко возрастает. Холодный фон размещался максимально близко к образцу, но не настолько близко, чтобы пары жидкого азота могли оказать охлаждающее воздействие.

Ещё одним важным условием регистрации излучения от не нагретых объектов является использование высокочувствительных охлаждаемых детекторов. В настоящей работе использовался охлаждаемый жидким азотом МСТ-детектор. Вакуумная рубашка детектора перед измерением откачивалась турбомолекулярным вакуумным насосом vCube Turbo Station (Turbo Vacuum, USA) до 10^{-6} мм рт. ст. с проверкой сохранности вакуума в течение запланированного времени экспериментов.

Анализировались спектры в диапазоне волновых чисел от 400 до 7500 см^{-1} . Оптические элементы спектрометра подбирались по принципу соответствия указанному спектральному диапазону: светоделитель из KBr, окно детектора и входное окно спектрометра для внешнего излучения из материала KRS-5. Спектрометр настраивался на спектральное разрешение 8 см^{-1} . Это позволяло измерять спектры за короткое время с низким уровнем шума. Более высокое разрешение в настоящей работе не требовалось, поскольку анализировались спектры водных растворов, которые никогда не содержат узких полос в ИК области.

3.1.2. Вакуумирование спектрометра

Перед измерением спектров спектрометр вакуумировался с использованием вакуумного насоса Adixen ACP 15 (Alcatel, Франция). Данная вакуумная система обладает высокой производительностью для объёма спектрометра, чтобы за время менее 1 мин достигать предельного вакуума 0.9 мбар. Однако было обнаружено, что при откачке до указанной глубины вакуума в измеряемых спектрах излучения, помимо спектра образца, содержится множество паразитных узких линий излучения, которые, судя по малой ширине, могут относиться только к молекулам газовой фазы. Анализ положения полос позволил установить их принадлежность к парам воды и CO_2 . Очевидно, что искажающее излучение испускается слоем воздуха вблизи образца (фокуса оптической системы), а как известно, в составе воздуха только два типа молекул активны в ИК области: вода и CO_2 . Если же совсем не проводить вакуумирование спектрометра, то присутствующие в оптической части спектрометра пары воды и CO_2 поглощают излучение от образца. То есть образец начинает играть роль источника излучения, а воздух в спектрометре – роль поглощающего образца. Это тоже приводит к появлению паразитных линий в спектре излучения на частотах паров воды и CO_2 , только противоположной направленности.

На рисунке 3.2 показаны фоновые (без образца) спектры излучения при максимальной откачке и при атмосферном давлении воздуха в спектрометре. Спектры содержат характеристические линии излучения или поглощения паров воды и CO_2 . Полоса в диапазоне $1300\text{-}2000\text{ см}^{-1}$ включает в себя совокупность колебательно-вращательных частот, связанных с деформационными колебаниями молекул воды, а полосы около 2350 см^{-1} соответствуют валентным антисимметричным колебаниям молекул CO_2 . Для устранения влияния паров воды и CO_2 на анализируемые эмиссионные спектры подбиралась такая глубина вакуума, при которой оба эффекта (излучение и поглощение) полностью компенсировались. То есть при некоторой глубине откачки спектрометра излучение воздуха снаружи полностью поглотится воздухом внутри спектрометра. Оптимальным для использующейся в настоящей работе конфигурации системы оказался вакуум в диапазоне 95-105 мбар.

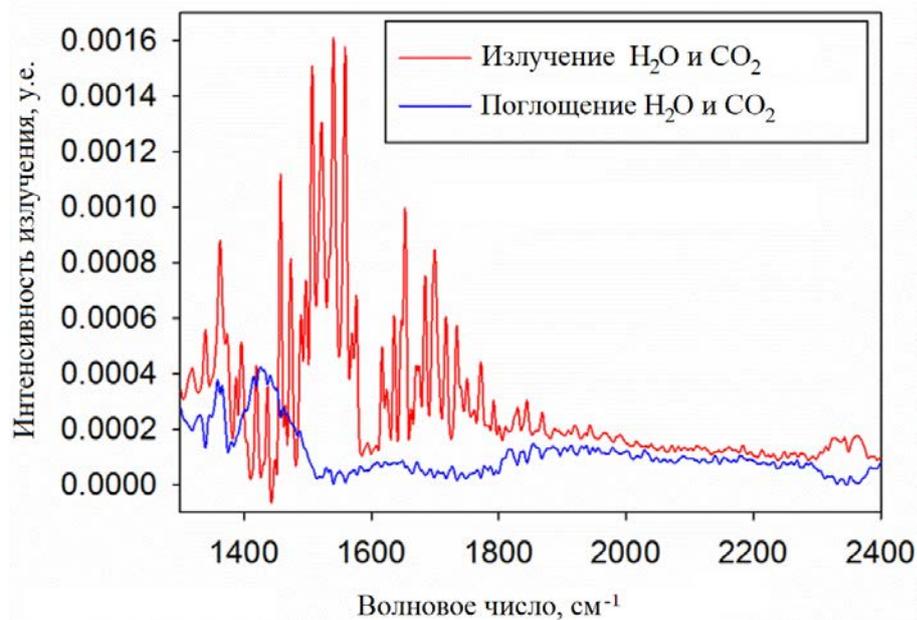


Рисунок 3.2. Спектры излучения, измеренные с использованием холодного фона без образца. Красный – спектрометр откачан до 0.9 мбар, синий – спектрометр заполнен воздухом при атмосферном давлении.

3.1.3. Измерительная кювета для жидких образцов

На рисунке 3.3 представлена схема измерительной кюветы для жидких образцов.

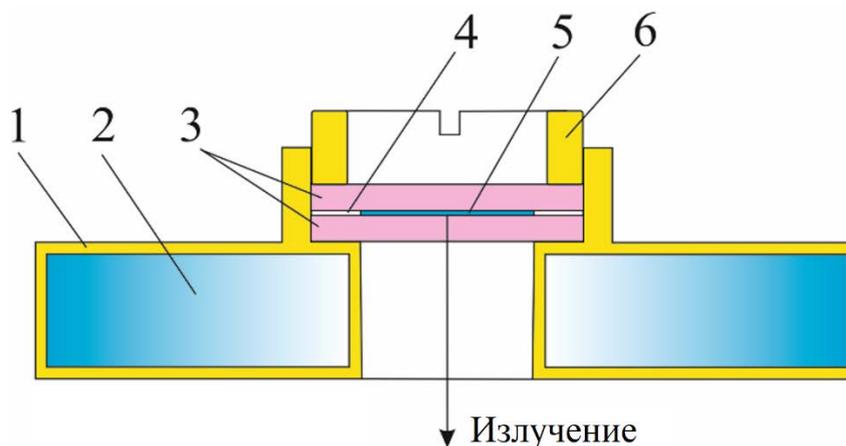


Рисунок 3.3. Измерительная жидкостная кювета. 1 – термостатирующая рубашка, 2 – канал для прокачки термостатирующей жидкости, 3 – окна кюветы, 4 – тефлоновая прокладка, 5 – образец исследования, 6 – закручивающаяся прижимная крышка.

Окна кюветы изготовлены из материала KRS-5 диаметром 50 мм и толщиной 2 мм. Между окнами помещалась прокладка из фторопласта. Капля образца помещалась в центр окна,

и после соединения со вторым окном, она растекалась по всей площади. Окна с образцом устанавливались в латунный держатель и зажимались закручивающейся крышкой. Держатель имеет внутренний канал для прокачки жидкости с заданной температурой с целью термостатирования.

3.1.4. Подбор толщины слоя образца

Отдельно стоит остановиться на одном очень важном методическом вопросе – подборе толщины образца. Для понимания рассмотрим два предельных случая: слишком малая и слишком большая толщина. В первом случае интенсивности полос излучения малы, из-за чего реализуется низкая чувствительность метода. Во втором случае образец начинает экранировать излучение холодного фона и поглощать собственное излучение, в итоге его эмиссионный спектр совпадает со спектром АЧТ при температуре образца и полностью теряет информативность. Оптимальной толщиной водных растворов оказался слой 5-10 мкм. Для образцов другого типа следует подбирать толщину в зависимости от их поглощающей и излучающей способности.

3.1.5. Коррекция спектров

После измерения спектров собственного излучения они подвергались математической коррекции. Дело в том, что помимо излучения от самих образцов, имеется вклад излучения холодного фона (хоть и небольшой), к тому же необходимо учитывать, что излучение образца может частично поглощаться окном кюветы и сами окна могут излучать. С учётом этого каждый измеренный спектр излучения корректировался следующим образом:

$$I_s = (I_{\text{exp}} - I_w * T_s * T_w) / T_w, \quad (3.1)$$

I_{exp} – измеренный спектр излучения образца в кювете с использованием холодного фона (нескорректированный);

I_w – спектр излучения окна кюветы на холодном фоне;

T_s – спектр пропускания образца;

T_w – спектр пропускания окна кюветы;

I_s – скорректированный спектр излучения раствора.

Спектры T_s и T_w измерялись с использованием того же ИК спектрометра, но в стандартном абсорбционном режиме. Рисунок 3.4 иллюстрирует коррекцию спектра, согласно формуле (3.1).

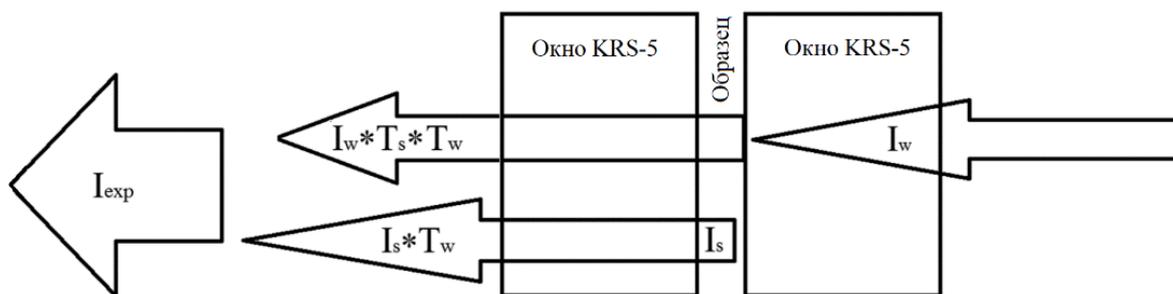


Рисунок 3.4. Иллюстрация потоков излучения в измерительной системе, поясняющая формулу корректирующего преобразования (3.1).

Член $I_w * T_s * T_w$ формулы (3.1) позволяет вычесть из измеренного спектра излучения вклад фонового излучения, прошедшего через первое окно (I_w), ослабленного прохождением через слой образца ($I_w * T_s$) и через второе окно ($I_w * T_s * T_w$). Знаменатель T_w в формуле (3.1) учитывает то, что излучение образца ослабляется, проходя через выходное окно кюветы. В работе не учитывалось излучение и поглощение двух других окон (входное окно спектрометра и окно детектора), а также светоделителя спектрометра, находящихся на оптическом пути излучения. Спектральные вклады этих элементов достаточно малы ввиду практически 100% прозрачности и ничтожно малого спектра излучения используемых материалов, к тому же в данной работе производилось сравнение спектров анализируемых растворов с фоновыми спектрами, измеренными также при наличии указанных элементов. Описанная корректировка может быть дополнена параметрами других оптических элементов в случае, когда на пути регистрируемого излучения имеются сильно поглощающие и излучающие элементы.

3.2. Физическая природа явления собственного излучения на примере воды

На рисунке 3.5 представлен спектр излучения воды. Обращает внимание, что положение полос в спектре излучения воды (рисунок 3.5) совпадает или близко к положению полос в её спектре поглощения (рисунок 3.6). Интерпретации всех полос поглощения хорошо известны [536]: либрационная (700 см^{-1}), деформационная (1640 см^{-1}), сумма либрационной и деформационной (2200 см^{-1}), валентная (3400 см^{-1}).

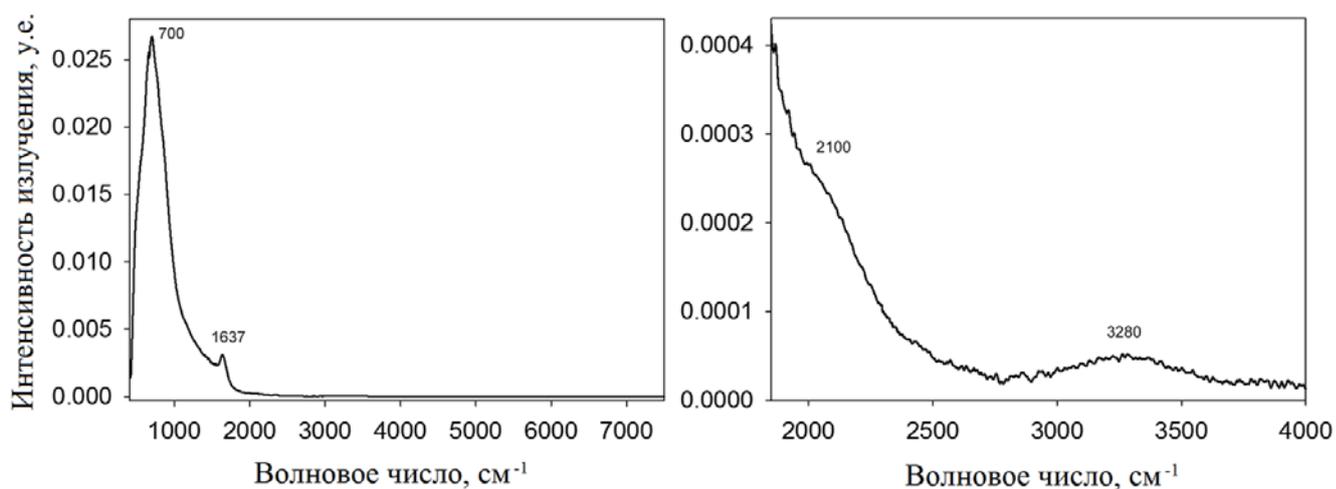


Рисунок 3.5. Спектр излучения H₂O при 25°C. Для наглядности спектр представлен в двух интервалах волновых чисел и в разных масштабах.

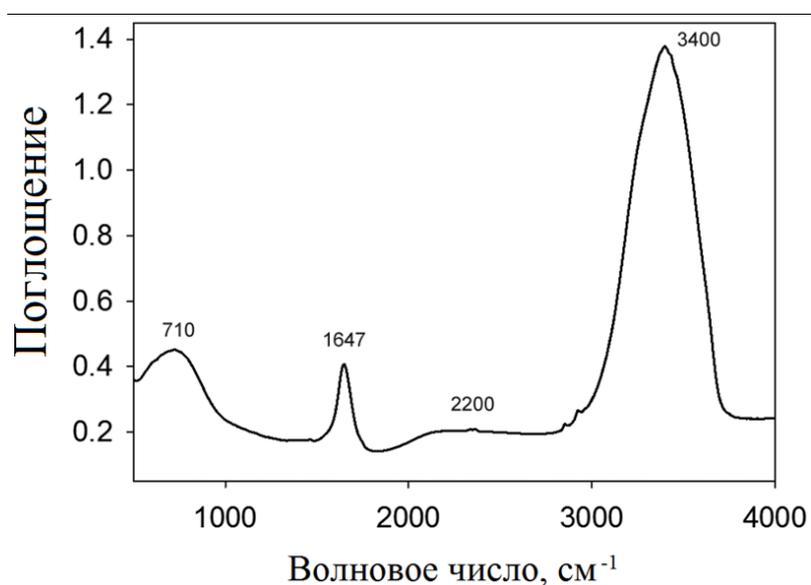


Рисунок 3.6. Спектр поглощения воды при 25°C.

На основании указанного соответствия положения полос в спектрах излучения и поглощения можно объяснить физическую природу наблюдаемых спектров собственного излучения. Регистрируемое излучение происходит в результате спонтанных переходов молекул с возбуждённых колебательных энергетических уровней на основной уровень. Это процесс обратный поглощению, при котором происходят переходы молекул с основного на возбуждённые уровни, что регистрируется по ослаблению интенсивности проходящего излучения. Поскольку оба типа спектров (излучения и поглощения) определяются квантовой структурой молекул, то эти частоты должны совпадать, что и наблюдается из сравнения рисунков 3.5 и 3.6. Поэтому можно утверждать, что спектры излучения, измеренные с

использованием холодного фона, содержат характеристические полосы молекул образца, следовательно, могут использоваться для анализа молекулярной структуры, как и классические спектры поглощения.

Необходимо обсудить при этом некоторые наблюдаемые отличия спектров излучения и поглощения. Во-первых, с ростом частоты интенсивность полос в спектре излучения снижается, во-вторых, положение максимумов широких полос в спектре излучения несколько сдвинуто в сторону меньших частот, относительно спектров поглощения. Объясняется это следующим образом. Для излучения фотонов необходимо наличие молекул в возбуждённых состояниях. При ненулевой температуре молекулы с некоторой вероятностью пребывают на возбуждённых уровнях энергии, что называют их заселённостью. При отсутствии вырожденности, заселённость возбуждённого энергетического уровня N_E по отношению к заселённости нулевого уровня N_0 определяется согласно распределению Больцмана:

$$\frac{N_E}{N_0} = \exp\left(-\frac{\Delta E}{kT}\right), \quad (3.2)$$

где ΔE – разница энергий между возбуждённым и основным уровнями, k – постоянная Больцмана, T – абсолютная температура. Из этого ясно, что при фиксированной температуре с ростом энергии уровней уменьшается их заселённость. Учитывая правило частот Бора $\Delta E = h\nu$ это означает, что с ростом частоты интенсивность полос в спектре излучения уменьшается (согласно распределению Больцмана). По той же причине у широких полос высокочастотный край менее интенсивен, чем низкочастотный, что приводит к смещению максимума полосы в спектре излучения в сторону меньших частот по сравнению со спектром поглощения. При необходимости может быть проведена корректировка спектра излучения путём деления на правую часть выражения (3.2).

3.3. Примеры применения ИК спектроскопии собственного излучения для исследования структуры биомолекул в растворах

Измерялись спектры собственного излучения водных растворов БСА (Amresco, USA), АТФ (Thermo, USA) и водной суспензии липосом на основе 1,2-димиристоил-фосфатидилхолин (DMPC) (Avanti Polar Lipids, USA). Концентрация каждого вещества составляла 1 мг/мл. Для приготовления растворов использовалась вода Milli-Q (Millipore, USA) или D₂O (ООО "Астрахим", Россия).

На рисунке 3.7 приведён спектр излучения БСА в воде в спектральной области амидных полос. Спектр имеет типичную для полос амид I (около 1650 см⁻¹) и амид II (около 1550 см⁻¹)

форму. Эти полосы в абсорбционной ИК спектроскопии обычно анализируют для определения вторичной структуры белка [311,537]. По положению и ширине этих полос можно сделать вывод, что вторичная структура белка состоит в основном из альфа-спиральных участков с небольшим вкладом неупорядоченных клубков и практически не содержит бета-слоёв. Это вполне подтверждается справочными данными о БСА [538]. Данный результат демонстрирует применимость спектроскопии излучения с холодным фоном для исследования вторичной структуры белков в растворах.

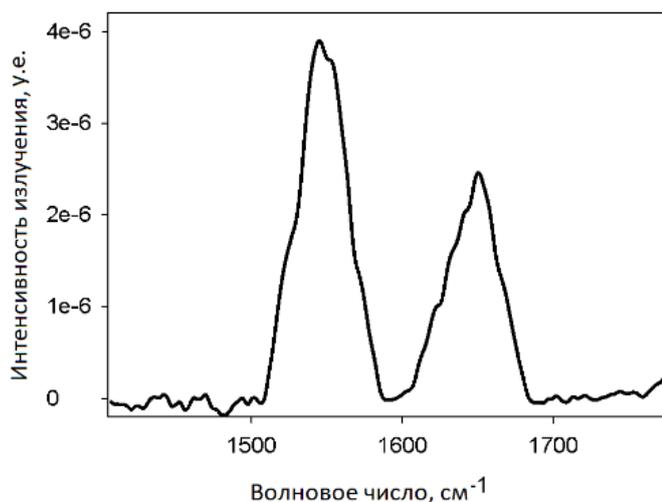


Рисунок 3.7. Разностный спектр излучения раствора БСА (1 мг/мл в H₂O) и H₂O в области частот амидных полос. Спектры измерялись при комнатной температуре (около 23°C).

На рисунке 3.8 представлены спектры излучения суспензии DMPC в D₂O при двух значениях температуры, 10 и 35°C, в области полосы валентных колебаний карбонильных групп. Из практики абсорбционной ИК спектроскопии известно [165], что полоса колебаний C=O групп фосфолипидов в липосомах состоит из двух перекрывающихся полос, соответствующих колебаниям гидратированных (1727 см⁻¹) и дегидратированных (1742 см⁻¹) C=O групп. В зависимости от фазового состояния фосфолипида степень гидратации меняется, что даёт возможность по ИК спектрам делать выводы о фазовых состояниях фосфолипидов в различных условиях. Поскольку температура фазового перехода гель-жидкий кристалл для DMPC в воде составляет 24°C [539], то при выбранных значениях температуры фосфолипид находится в разных фазах: гель при 10°C и жидкий кристалл при 35°C. Как видно из рисунка 3.8, при 35°C положение максимума полосы смещено (на 6 см⁻¹) в сторону меньших частот по сравнению с положением полосы при 10°C. Это полностью объясняется большей гидратацией C=O групп DMPC в состоянии жидкого кристалла, по сравнению с гелем [165]. Данный результат демонстрирует, что эмиссионная ИК спектроскопия с использованием холодного

фона позволяет проводить достаточно точный количественный анализ фазового состояния фосфолипидов, не уступающий абсорбционной ИК спектроскопии.

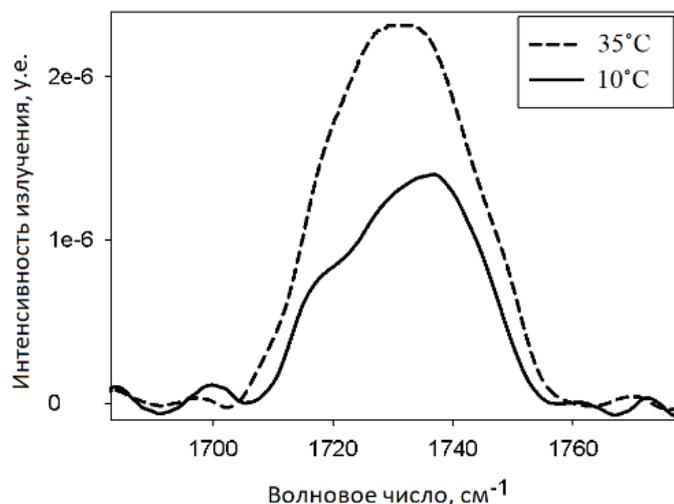


Рисунок 3.8. Разностные спектры излучения суспензии DMPC (1 мг/мл в D₂O) и D₂O при двух значениях температуры в области полосы валентных колебаний C=O групп.

На рисунке 3.9 дан спектр излучения АТФ в водном растворе в широком диапазоне частот. Спектр содержит множество полос, каждая из которых относится к колебаниям фосфатных групп, фуранозного кольца или пуринового основания молекулы АТФ [540,541]. Не вдаваясь в подробности расшифровки спектра АТФ отметим, что каждая из спектральных полос на рисунке 3.9, в том числе мало интенсивные полосы в интервале 1300-1500 см⁻¹, несёт информацию о структуре молекулы АТФ, а не является шумом. Для подтверждения этого на рисунке 3.9 совмещены спектр собственного излучения и спектр поглощения раствора АТФ. Очевидно, что каждая полоса одного спектра дублируется в другом. Данный результат свидетельствует о характеристичности спектров излучения и применимости эмиссионной ИК спектроскопии с холодным фоном для определения структурных характеристик нуклеотидов и, следовательно, нуклеиновых кислот.

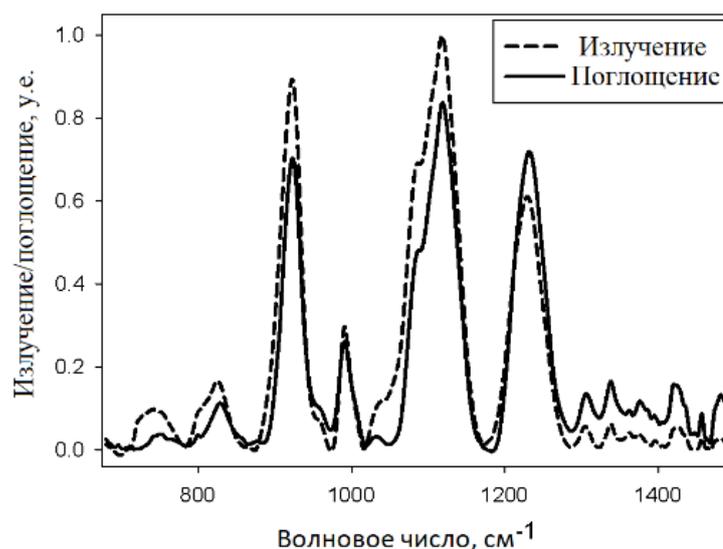


Рисунок 3.9. Представлены два спектра, измеренные при 25°C: 1) разностный спектр излучения раствора АТФ (1 мг/мл в Н₂О) и Н₂О; 2) разностный спектр поглощения того же раствора и Н₂О.

Приведённые примеры свидетельствуют о том, что метод эмиссионной ИК спектроскопии с холодным фоном применим для анализа структурных характеристик биомолекул в их естественных условиях – в водном растворе и при температурах сохранения нативной структуры.

3.4. Преимущества метода ИК спектроскопии собственного излучения перед абсорбционной ИК спектроскопией

Вопрос преимуществ эмиссионной ИК спектроскопии перед абсорбционной поднимался в работах [375,542]. В них показано, что при регистрации собственного излучения (с нагревом образца или с использованием холодного фона) достигается выигрыш по соотношению сигнал/шум. Это преимущество объясняется тем, что при регистрации спектра излучения на детектор поступает только то излучение, которое должно быть измерено, в отличие от абсорбционной спектроскопии, когда измеряется излучение мощного источника, и на его фоне необходимо выделить полосы ослабления излучения образцом. Любой источник излучения проявляет дрейф и флуктуации в своём спектре, что влияет на соотношение сигнал/шум в спектрах.

С точки зрения стабильности измеряемых спектров, что прямо связано с соотношением сигнал/шум и чувствительностью, спектроскопия собственного излучения с холодным фоном имеет преимущество перед спектроскопией излучения сильно нагретых образцов. Дело в том,

что для реализации качественного измерения эмиссионного спектра принципиально важно поддержание стабильной температуры образца, а чем выше температура образца, тем сложнее обеспечить её стабильность. В случае спектроскопии с холодным фоном требуется также стабилизация температуры холодного фона, но это не вызывает проблем, так как она определяется в высшей степени стабильной температурой кипения азота при атмосферном давлении.

При этом очевидно, что преимущество эмиссионной спектроскопии перед абсорбционной по сигнал/шум достигается только когда фоновое излучение намного слабее излучения образца. Проведём сравнение двух подходов к измерению эмиссионных ИК спектров: с использованием холодного фона и с нагревом образца. Согласно закону Стефана-Больцмана, интегральная интенсивность излучения АЧТ пропорциональна абсолютной температуре в четвёртой степени. Следовательно, интенсивность излучения образца при комнатной температуре ($\approx 298^\circ\text{K}$) примерно в 220 раз больше интенсивности фонового излучения при температуре кипения азота (77.4°K). Хотя реальные образцы и не являются АЧТ, такая оценка правомерна при сравнении излучения одного и того же образца при разных температурах. Без использования холодного фона (при температуре фона $\approx 298^\circ\text{K}$), аналогичное соотношение интенсивностей образца и фона может быть достигнуто только путём нагрева образца до $\approx 1150^\circ\text{K}$. Очевидно, что при таких температурах невозможно сохранить структуру органических молекул, а также жидкое фазовое состояние водных растворов. Таким образом, ИК спектроскопия собственного излучения с холодным фоном позволяет достигать высокого отношения сигнал/шум без необходимости нагрева образца.

Рассмотрим вопрос чувствительности предложенного в настоящей работе метода эмиссионной спектроскопии. Для этого можно сопоставить абсолютные значения интегральной интенсивности излучения (площадь под кривой в спектре) АЧТ при 25°C (рисунок 3.10) и площадь самых слабых, но надёжно регистрируемых пиков излучения, например в спектре АТФ (рисунок 3.9). В данном примере удаётся регистрировать пики в 10^6 менее интенсивные по сравнению с интенсивностью спектра АЧТ. Поскольку мощность излучения АЧТ при 25°C составляет $\approx 0.045 \text{ Вт/см}^2$, а площадь пятна образца, от которого регистрируется излучение, составляет $\approx 0.3 \text{ см}^2$, то в рамках предложенного подхода от образца надёжно детектируется излучение с мощностью $\sim 10^{-8} \text{ Вт}$. Уточним также, что от общей интенсивности излучения детектором регистрируется только та часть, которая попадает в угловую апертуру оптической системы спектрометра ($\sim 1\%$). Из этого следует, что можно рассматривать пути повышения

чувствительности за счёт дополнительной фокусировки излучения образца вплоть до мощности излучения $\sim 10^{-10}$ Вт.

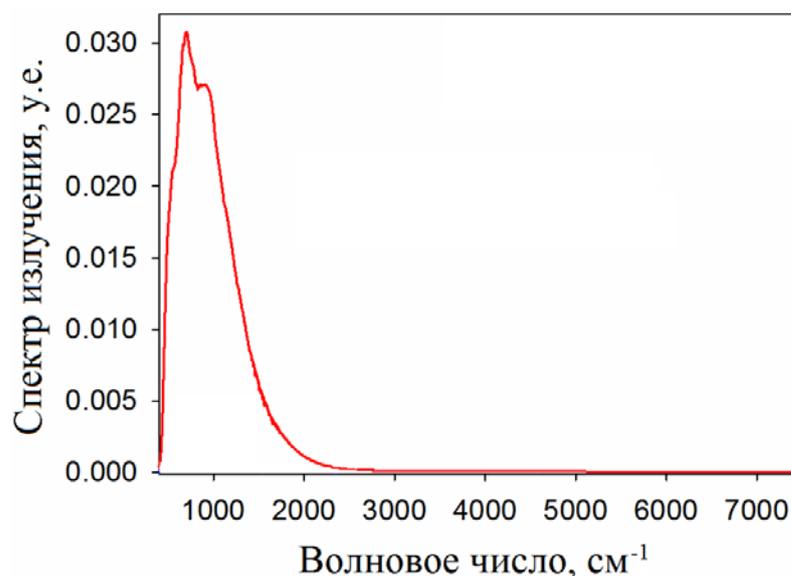


Рисунок 3.10. Спектр излучения АЧТ, измеренный системой, изображённой на рисунке 3.1, без холодного фона (при температуре 25°C).

Проведём ещё одну оценку чувствительности предложенного в настоящей работе метода. Как следует из спектра воды на рисунке 3.5 максимальная надёжно регистрируемая частота излучения лежит около 3600 см^{-1} . Заселённость соответствующего уровня энергии, рассчитанная по формуле (3.2), составляет $2.8 \cdot 10^{-8}$. То есть эмиссионная спектроскопия с холодным фоном способна зарегистрировать излучение от менее 10^{-7} части молекул воды. При этом предел чувствительности абсорбционной ИК спектроскопии значительно выше: $10^{-3} - 10^{-7}$, в зависимости от вещества. Этот результат позволяет утверждать, что эмиссионная ИК спектроскопия с холодным фоном обладает более высокой чувствительностью по сравнению с абсорбционной ИК спектроскопией.

Описанный метод, несмотря на явные преимущества по сравнению с абсорбционной спектроскопией, имеет и некоторые ограничения. Из рисунка 3.5 видно, что при комнатной температуре используемый подход позволяет регистрировать излучение в спектральном интервале $400 - 3600 \text{ см}^{-1}$. На больших волновых числах метод не применим из-за ничтожной заселённости соответствующих колебательных уровней. Видится единственный способ расширить диапазон в высокочастотную область – повышать температуру образца, что весьма ограничено применимо для растворов биомолекул. Однако в данном случае важно, что указанный спектральный интервал покрывает практически всю область частот возможных

валентных и деформационных колебаний любых молекул. В связи с этим говорить о серьёзных недостатках в спектральной доступности предлагаемого метода неверно. Более того, как видно из рисунка 3.10, наибольшая излучательная способность образцов при температурах вблизи комнатной реализуется в интервале 500-1700 см^{-1} . Это означает, что в указанном интервале волновых чисел реализуется наибольшая чувствительность и соотношение сигнал/шум спектроскопии собственного излучения с холодным фоном. Указанный интервал обычно называют областью отпечатков пальцев, поскольку именно в нём спектры органических веществ обладают наибольшей информативностью при анализе молекулярной структуры.

К преимуществам эмиссионной ИК спектроскопии с холодным фоном также можно отнести неинвазивность. Для измерения собственного излучения образца его не требуется ни нагревать, ни облучать мощным ИК или иным излучением. Эти воздействия в некоторых случаях могут оказывать разрушающее или модифицирующее воздействие на биомолекулярные структуры. Для применения метода эмиссионной ИК спектроскопии с холодным фоном нужно только поместить образец в фокус оптической системы спектрометра. Температура выбирается с учётом свойств образца и целей исследования. К тому же, располагая образец с внешней стороны спектрометра, нет необходимости использовать герметичные кюветы при вакуумировании спектрометра, что существенно облегчает и удешевляет процедуру проведения измерений.

Продолжая сравнивать эмиссионный и абсорбционный типы спектроскопии заметим, что в абсорбционной спектроскопии собственное излучение образца полностью игнорируется ввиду его малости по сравнению с излучением ИК источника спектрометра. Собственное излучение даже нет необходимости учитывать при коррекции фона, поскольку оно лежит ниже предела чувствительности прибора. В то же время не исключено, что эмиссионная спектроскопия биомолекул позволит получить не просто уточняющую, но и абсолютно новую спектральную информацию, которую невозможно получить из абсорбционных спектров.

В настоящей работе спектры излучения измерялись в среднем ИК диапазоне. При этом нет принципиальных ограничений для измерения спектров в дальнем ИК диапазоне, вплоть до нескольких см^{-1} . В настоящей работе была сделана попытка также измерять спектры собственного излучения водных растворов в дальнем ИК диапазоне, вплоть до 10 см^{-1} . Для регистрации эмиссионных спектров в этом диапазоне использовался кремниевый болометр, охлаждаемый жидким гелием, чувствительность которого на порядки превосходит чувствительность использованного в среднем ИК диапазоне МСТ-детектора. Однако

необходимо было удовлетворить ещё одному важному условию: окна и светоделитель ИК спектрометра с Фурье-преобразованием должны быть прозрачны в исследуемом диапазоне частот. Как пример, во всём среднем ИК диапазоне пропускание используемых материалов KBr или KRS-5 составляет более 95% (без учёта отражения излучения на границах). Поскольку у данных материалов почти нет поглощения, следовательно, и нет уровней возбуждения, характерных для данных частот, поэтому спектры излучения этих материалов близки к нулю. В дальнем ИК диапазоне обычно используются другие стандартные светоделители – из полиэтилена или лавсана, а также окна из полиэтилена, кремния или германия. Оказалось, что такие материалы, хотя и пропускают большую часть излучения в предназначенной для них спектральной области, в некоторых интервалах частот их суммарное пропускание не превышает 10%. То есть они приобретают свойства серого тела и сами становятся источниками паразитного излучения. В эмиссионных спектрах отчётливо наблюдались полосы, совпадающие с положением полос поглощения указанных материалов (лавсана и полиэтилена), что сильно мешало регистрации спектров излучения исследуемых образцов. В связи с большим количеством артефактов в спектрах излучения дальнего ИК диапазона и сложностью интерпретации эти данные в настоящей работе не приводятся.

Заметим, что описанная проблема решаема. Для работы со спектрами излучения в дальнем ИК диапазоне требуется либо разработка численных методов устранения вклада паразитных излучений и выделения полезного сигнала, либо использование окон и светоделителей, изготовленных из материалов с пропусканием, близким к 100% в требуемом диапазоне. Этому критерию соответствует, например, алмаз. Также возможен подбор более дешёвых полимерных материалов [543], пропускание которых в различных интервалах дальнего ИК диапазона близко к 100%. Решение указанной чисто технической проблемы позволило бы в рамках эмиссионной ИК спектроскопии получить доступ к дальнему ИК и терагерцовому диапазонам, характерные частоты которых несут информацию о межмолекулярной и макромолекулярной структуре, а также гидратации биомолекул [35,339,544].

ГЛАВА 4. АНАЛИЗ ГЕТЕРОГЕННОСТИ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ БИОМОЛЕКУЛ МЕТОДОМ ДИНАМИЧЕСКОГО СВЕТОРАССЕЯНИЯ

При подготовке данного раздела диссертации использованы материалы семинара ИТЭБ РАН, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, автором были апробированы основные результаты, положения и выводы его исследования: Пеньков Н.В. Молекулярная организация водных растворов биомолекул. Автореф. дисс. д.ф.-м.н. (ПРОЕКТ) <https://iteb.ru/news/zasedanie-sektsii-teoreticheskaya-biofizika-i-mode-202205/>

4.1. Приборы и методы

Измерение распределений по размерам различных биомолекул в растворах производилось методом динамического светорассеяния (ДСР). Уточнение состава, деталей пробоподготовки и условий измерения каждого раствора приведено в тексте при описании результатов с соответствующими ссылками. В работе использовалась установка Zetasizer nano ZS (Malvern, Великобритания). Прибор оснащён He-Ne лазером с длиной волны 633 нм мощностью 2 мВт, регистрация излучения реализуется в режиме обратного рассеяния под углом 173° лавинным фотодиодом. Для обработки полученных данных использовалось штатное программное обеспечение, либо данные экспортировались и обрабатывались в программах Excel или Sigma Plot.

Также для работы по данному направлению была специально разработана и сконструирована с участием фирмы «Фотокор» многофункциональная высокочувствительная установка, реализующая метод динамического светорассеяния. Созданная установка Photocor Complex (ООО «Фотокор», Россия), оснащена тремя лазерами с длинами волн 450, 650, 980 нм с регулируемой мощностью вплоть до 150 мВт. Установка собрана на основе гониометра, позволяющего проводить измерение интенсивности рассеяния лазерного излучения под разными углами в диапазоне от 0 (режим турбидиметрия) до 160° . Излучение регистрируется одним из двух лавинных фотодиодов, либо обоими в режиме кросс-корреляции. Измеряемые коррелограммы обрабатывались с помощью программного обеспечения DynaLS (ООО «Фотокор», Россия).

Zetasizer nano ZS имеет возможность термостатирования образцов от 0 до 92°C , а Photocor Complex от -60°C до 200°C . Указанные диапазоны температур обоих приборов полностью покрывают температуры нативного состояния любых биомолекул.

При анализе концентрированных растворов биомолекул производилось измерение их вязкости с использованием синусоидального вибро-вискозиметра SV-10 (A&D corp., Япония). Значения динамической вязкости необходимы для корректного расчёта гидродинамических радиусов (см. формулу 1.4). Указанный тип вискозиметра позволяет при стабилизированной

температуре измерять динамическую вязкость раствора, умноженную на плотность. Для расчёта вязкости плотность измеряли отдельно весовым методом.

4.2. Примеры применения метода динамического светорассеяния для определения распределений по размерам биомолекул в растворах. Учёт артефактов, связанных с наличием нанопузырьков

На рисунках 4.1-4.10 приведены примеры распределений по размерам различных биомолекул в водных растворах, позволяющие анализировать различные аспекты взаимодействий биомолекул. Так, например, можно анализировать процессы олигомеризации и денатурации белков. На рисунке 4.1 дано распределение по размерам пероксиредоксина 2 в мономерной форме, а на рисунке 4.2 температурная зависимость среднего гидродинамического диаметра пероксиредоксина 2 с окисленными и восстановленными остатками цистеина [545]. При восстановленных остатках цистеина белок находится в мономерной форме, тогда как при их окислении за счёт образования межмолекулярных дисульфидных связей он олигомеризуется. Это видно по отличию размеров белка на рисунке 4.2 при температурах ниже температуры денатурации. При нагревании происходит денатурация обоих белков, что можно видеть по увеличению измеряемого размера, начиная с определённых значений температуры. При этом из рисунка 4.2 следует, что в олигомерной форме (при наличии дисульфидных связей) структура белка более стабильна, и плавление начинается при более высокой температуре, чем для белка в форме мономера. Этот и другие примеры показывают, что метод ДСР на основании анализа распределений по размерам позволяет изучать термостабильность белков и определять их температуры плавления.

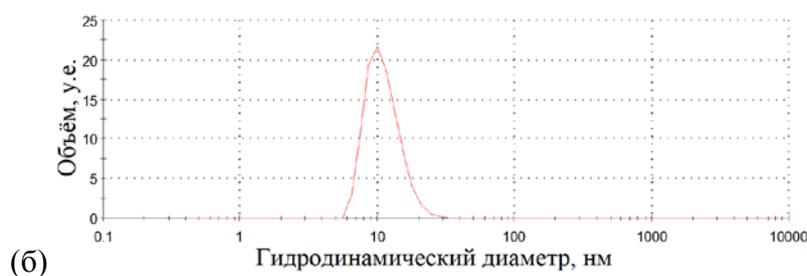
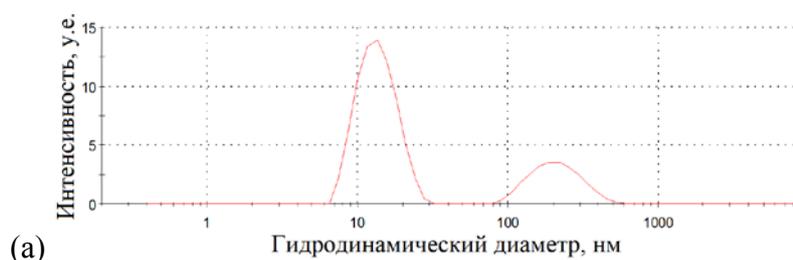


Рисунок 4.1. Распределение по размерам пероксиредоксина 2 (1 мг/мл) с восстановленными остатками цистеина в растворе [545]: (а) распределение по интенсивности; (б) распределение по объёму.

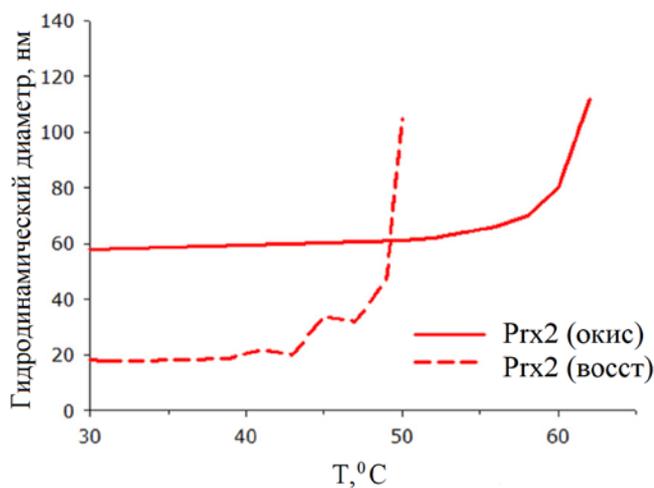
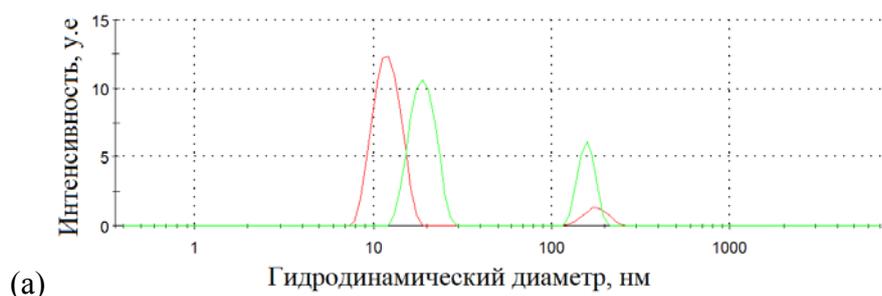
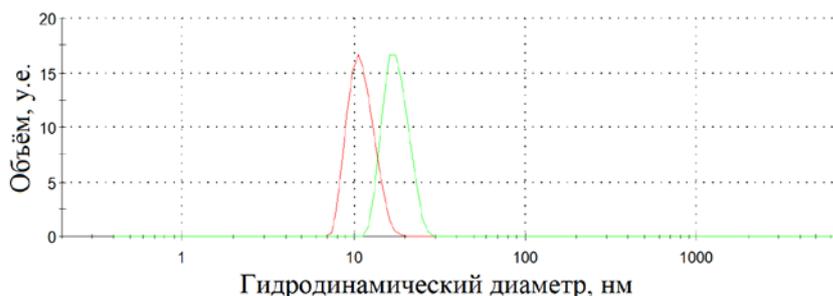


Рисунок 4.2. Изменение среднего гидродинамического диаметра пероксиредоксина 2 с окисленными и восстановленными дисульфидными связями при нагревании в процессе тепловой денатурации.

На рисунках 4.3 – 4.5 распределения по размерам характеризуют агрегационные процессы в растворах некоторых белков под действием различных факторов. На рисунке 4.3 показаны распределения по размерам нативного и частично агрегированного миозинсвязывающего С-белка [546].



(а)



(б)

Рисунок 4.3. Распределения по размерам миозинсвязывающего С-белка (1 мг/мл) в растворах, нативного (—) и после частичной агрегации (—) [546]: (а) распределения по интенсивности; (б) распределения по объёму.

На рисунке 4.4 показаны распределения по размерам гладкомышечного титина в частично агрегированной и дезагрегированной формах [267].

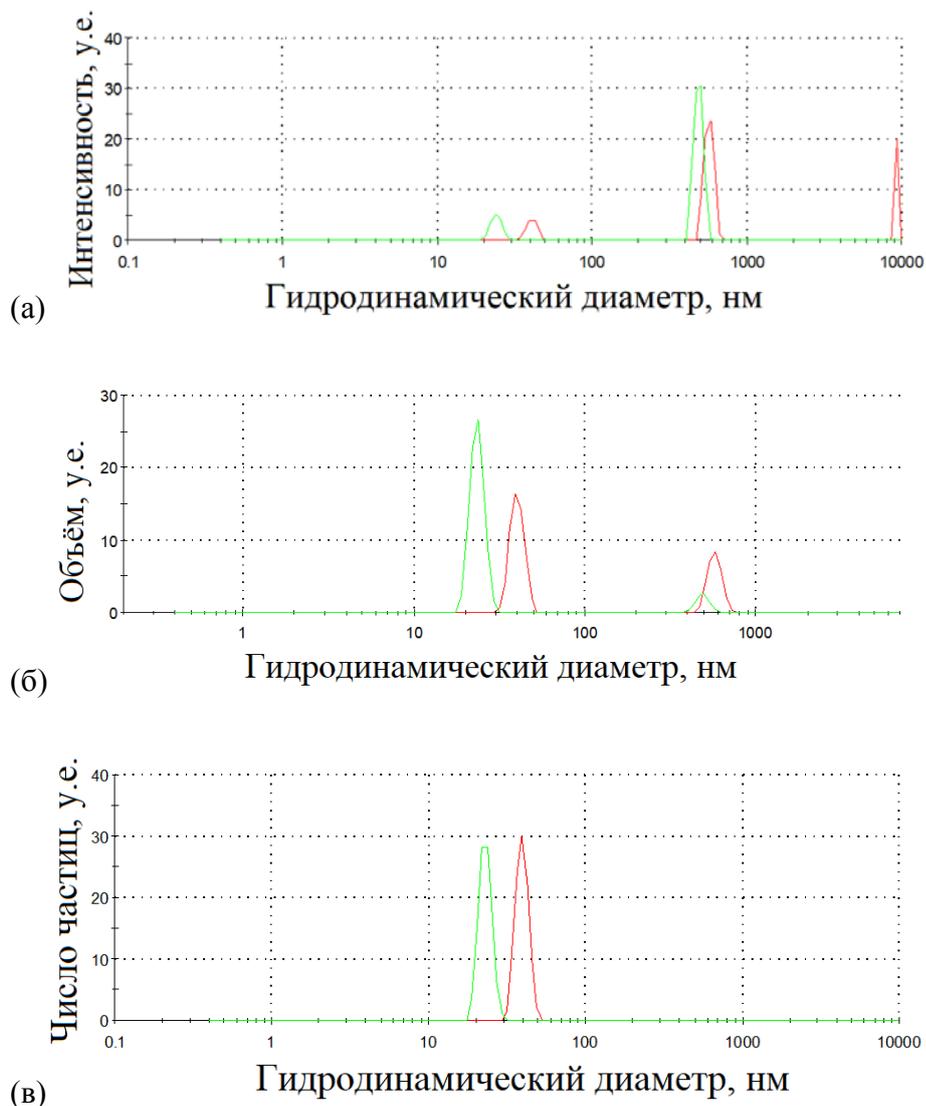


Рисунок 4.4. Распределения по размерам гладкомышечного титина (1 мг/мл) в растворе, частично агрегированного (—) и дезагрегированного (—) [267]: а) распределения по интенсивности; б) распределения по объёму; в) распределения по числу частиц.

Данные на рисунке 4.5 демонстрируют изменения со временем распределения по размерам лизоцима при его денатурации с агрегацией под действием дитиотреитола.

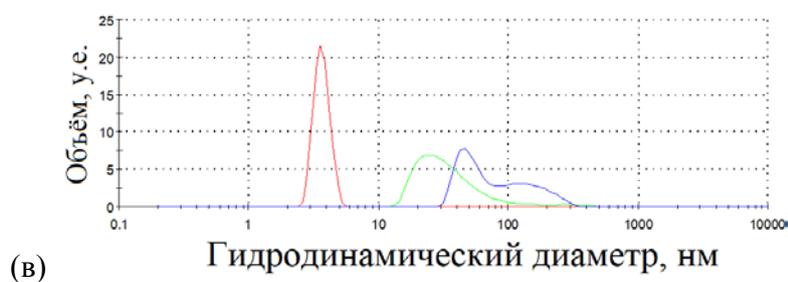
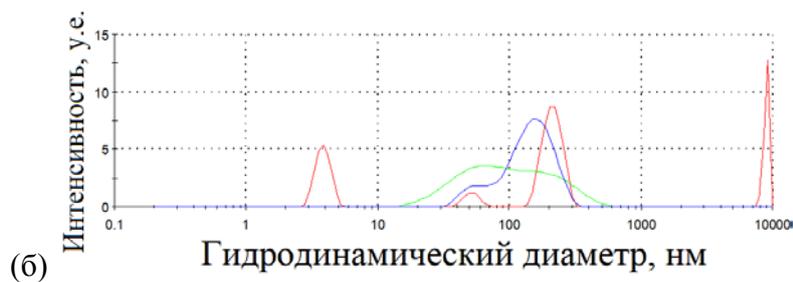
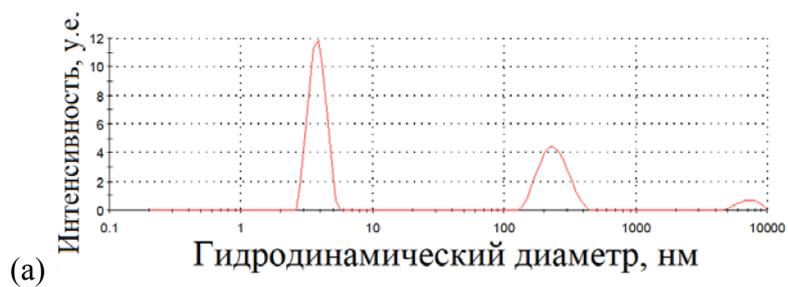


Рисунок 4.5. Распределения по размерам лизоцима из яичного белка (1 мг/мл) в растворе [266]: а) исходное распределение по интенсивности; б) временная зависимость распределений по интенсивности после добавки 30 мМ дитиотреитола (в последовательности —, —, —); в) временная зависимость распределений по объёму после добавки 30 мМ дитиотреитола.

На рисунке 4.6 представлены распределения по размерам лецитиновых липосом в водных суспензиях с различными добавками, влияющими на их размеры [234,547,548].

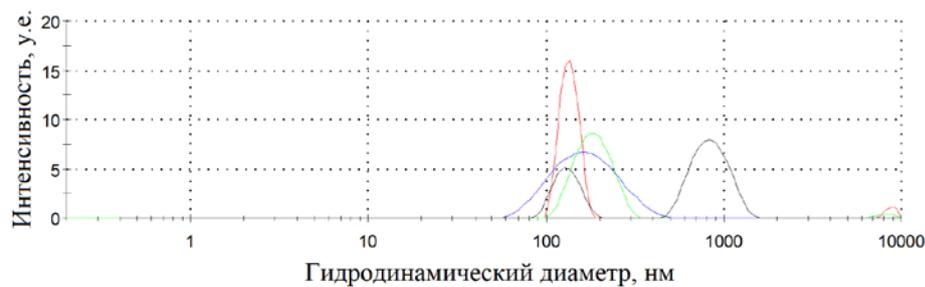


Рисунок 4.6. Распределения по размерам лецитиновых липосом в водной суспензии (буфер 40 мМ КСl, рН=7.5-8.5) (—) и со следующими добавками: 50 мкМ бетулиновой кислоты (—) [547], 10 мкМ бедаквилина (—) [234], 50 мкМ НРА+1 мМ Ca²⁺ (—) [548].

Анализ рисунков 4.1а, 4.3а, 4.4а, 4.5а показывает, что в распределениях по размерам белков в растворах, наряду с фракцией ~10 нм, относящейся к белковым молекулам, во всех случаях также регистрируется некая фракция с характерными размерами 150-500 нанометров. Данная фракция наблюдается при анализе распределений по размерам практически любого раствора биомолекул, и не только биомолекул, но и других коллоидных растворов с наноразмерной фракцией дисперсной фазы (например, рисунок 4.7а).

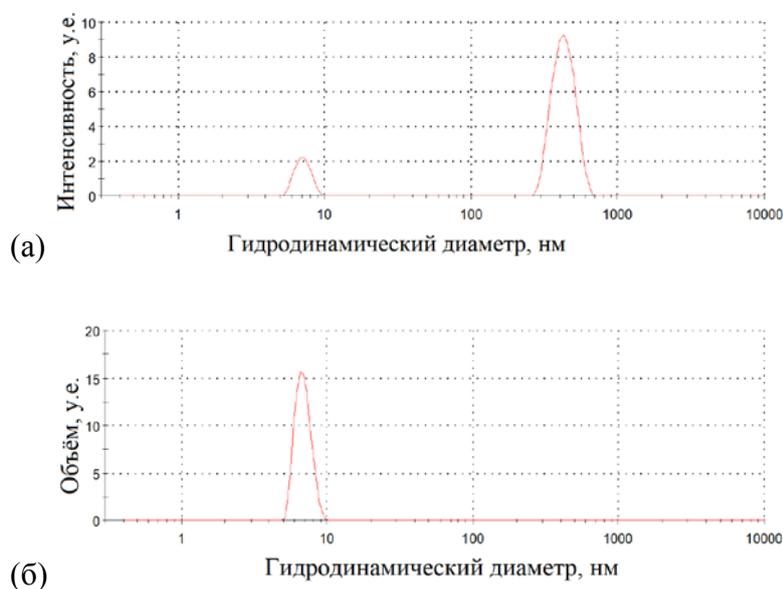


Рисунок 4.7. Распределения по размерам фуллерена C₆₀ (0.1 мг/мл) в растворе [549]: а) распределение по интенсивности; б) распределение по объёму.

Как правило, её относят к посторонним примесям или агрегатам и исключают из рассмотрения. Действительно, данная субмикронная фракция может относиться и к примесям и агрегатам. Однако закономерность её присутствия практически в любом растворе заставляет задуматься о наличии некоторой естественной гетерогенности водных растворов. Тем более, что даже чистая вода [550,551] или солевые растворы [281], заведомо не содержащие коллоидных частиц, тоже демонстрируют наличие фракции с размерами порядка сотен нанометров при проведении высокочувствительных измерений (рисунок 4.11). О природе этой фракции речь пойдёт в следующем разделе, где будет показано, что это газовые нанопузырьки, неотъемлемо присутствующие во всех водных растворах. В данном разделе главной целью

является описание подходов, позволяющих устранить или минимизировать влияние этой фракции на реальные распределения по размерам изучаемых биомолекул.

Нанопузырьки могут в разной степени мешать анализу распределений по размерам биомолекул в растворах. Например, белки в мономерной или олигомерной формах имеют размеры ~10 нм, что много меньше размеров фракции нанопузырьков 150-500 нм, поэтому последнюю можно не брать в расчёт и анализировать только область размеров белка. В то же время при исследовании процессов агрегации (рисунки 4.3а, 4.4а, 4.5б) размер белковой фракции может попадать в область сотен нм. Также при анализе модельных фосфолипидных мембран (рисунок 4.6) их характерные размеры перекрываются с размерами нанопузырьков. В таком случае возникает вопрос, какой вклад вносит фракция нанопузырьков в регистрируемые распределения по размерам биомолекул и насколько искажает их? Необходимо иметь подходы, позволяющие идентифицировать нанопузырьки в распределениях по размерам изучаемых биомолекул.

Метод ДСР определяет распределения по размерам на основании анализа корреляционной функции интенсивности рассеяния света в жидком образце (раздел 1.6.3). Интенсивность рассеяния раствора биомолекул складывается из интенсивностей молекулярного рассеяния водно-солевой среды и всех присутствующих в растворе оптических неоднородностей. Рассеяние водно-солевой среды не обладает корреляциями на временах, соответствующих коэффициентам диффузии биомолекул, то есть не вносит вклад в корреляционную функцию и может рассматриваться как фоновая часть интенсивности. Оставшаяся часть интенсивности рассеяния, вносящая вклад в корреляционную функцию, складывается из парциальных интенсивностей, относящихся ко всем размерным фракциям. То есть метод ДСР определяет распределения по размерам на основе интенсивности рассеяния и позволяет определить вклад каждой размерной фракции в общую интенсивность рассеяния.

Из экспериментальных данных (таблица 4.1) следует, что вклад нанопузырьков в интенсивность рассеяния различных водно-солевых растворов сопоставим с молекулярным рассеянием водно-солевой среды. Определив интенсивности рассеяния раствора биомолекул и растворителя, а также соотношение вкладов каждой размерной фракции в распределение по размерам биомолекул, можно рассчитать интенсивность рассеяния субмикронной фракции. Если она сопоставима с интенсивностью рассеяния растворителя, то данную фракцию необходимо отнести к нанопузырьковой фазе, если много больше интенсивности рассеяния растворителя, то эту фракцию можно рассматривать как часть изучаемого объекта.

Например, на рисунке 4.8 в распределении по размерам раствора БСА (1 мг/мл) общая интенсивность рассеяния раствора после вычитания интенсивности рассеяния буфера составляет 410 кГц (в единицах отсчётов детектора в секунду), а на субмикронную фракцию приходится 6.5% от общей интенсивности. Следовательно, интенсивность рассеяния этой фракции составляет 27 кГц. Сравнивая это значение с интенсивностью рассеяния буферного раствора 23 кГц, можно сделать вывод, что размерный пик около 250 нм относится не к белковой фракции, а к нанопузырькам. Это подтверждается из сравнения с распределениями по размерам растворов БСА в меньших концентрациях, откуда видно, что при снижении концентрации белка увеличивается вклад субмикронной фракции (см. рисунок 4.8). Это происходит из-за того, что распределения по размерам нормированы на 100% и количественное снижение одной фракции автоматически приводит к росту вклада другой.

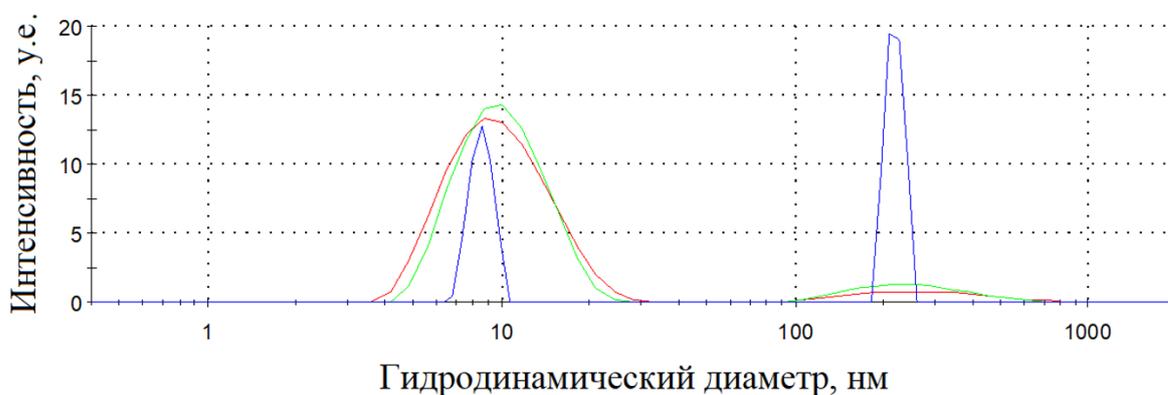


Рисунок 4.8. Распределения по размерам раствора БСА в трёх концентрациях 1 (—), 0.2 (—) и 0.02 мг/мл (—).

В тех случаях, когда интенсивность рассеяния субмикронной фракции существенно больше интенсивности рассеяния растворителя, можно утверждать о том, что она относится к изучаемому объекту. Это могут быть агрегаты биомолекул, либо посторонние примеси, данный вопрос решается в зависимости от наличия дополнительной информации об образце, но точно исключается версия нанопузырьков. Когда же удаётся установить, что субмикронная фракция однозначно относится к нанопузырькам, её можно устранить из распределений по размерам несколькими способами: используя растворы больших концентраций биомолекул; переходя от распределений по интенсивности к распределениям других типов; применяя фильтрацию.

Использование растворов высокой концентрации

Как следует из рисунка 4.8, при снижении концентрации белка до 0.02 мг/мл фракция около 200 нм становится доминирующей, а при концентрациях более 0.2 мг/мл она

малозаметна. Если анализировать растворы белков с близкими размерами к БСА и концентрациями более 0.2 мг/мл, нанопузырьковая фракция не будет вносить существенного вклада в распределения. Однако не всегда есть возможность приготовления растворов биомолекул с высокими концентрациями, например, когда речь идёт о дорогих и трудно производимых биомолекулах.

Переход от распределений на основе интенсивности к другим формам распределений

Когда установлено, что субмикронная фракция относится к нанопузырькам, её можно устранить математически, перейдя от распределений по интенсивности к распределениям по объёму или числу частиц, в которых малоразмерные фракции более выражены. Дело в том, что в случае Рэлеевского рассеяния интенсивность рассеяния I зависит от размера d согласно $I \sim d^6$, а также пропорциональна рассеивающей способности (1.6). Таким образом, один воздушный пузырёк с размером около $d_1=200$ нм в растворе рассеивает столько же света, как $\sim 10^{10}$ молекул лизоцима с размером $d_2=4$ нм. Если в распределении по интенсивности такого раствора регистрируется два сопоставимых по интенсивности пика, относящихся к белку и пузырькам, то соотношение их объёмов составляет $\left(d_2/d_1\right)^3 * 10^{10} \approx 10^5$. То есть для раствора лизоцима при объёмной доле пузырьков 0.001% в распределении по интенсивности будет два равнозначных размерных пика. В то же время, производя несложное математическое преобразование, можно осуществить переход от распределения по интенсивности к распределению по объёму, что приведёт к полному устранению вклада фракции нанопузырьков (рисунки 4.1б, 4.3б).

Описанный подход также может использоваться в случаях, когда субмикронная фракция относится к агрегатам изучаемых молекул или примесям, но не представляет интереса, а основной интерес представляет низкоразмерная фракция (см. рисунки 4.5в, 4.7б).

Когда размеры биомолекул не столь малы и составляют десятки нм, то переход к распределениям по объёму может не полностью устранить субмикронный пик (4.4б). В таком случае можно воспользоваться более сильным математическим подавлением субмикронного пика путём перехода к распределению по числу частиц (рисунок 4.4в). Однако перед проведением математических преобразований важно убедиться в том, что субмикронный пик не несёт в себе полезную информацию об изучаемых биомолекулах.

Отметим, что в некоторых случаях подход на основе математических преобразований распределений по размерам не даёт желаемого результата. Это случается в тех случаях, когда в растворе имеется ещё более низкоразмерная фракция, чем анализируемые биомолекулы. На рисунке 4.9а показано распределение по размерам лизоцима с добавкой гуанидина гидрохлорида [266]. В распределении по размерам идентифицированы три фракции: примеси (с некоторым вкладом нанопузырьков) около 500 нм, белок в начальной стадии денатурации около 7 нм и молекулы гуанидина гидрохлорида около 0.4 нм. Переход к распределениям по объёму (рисунок 4.9б) приводит к полной потере информации о белке и абсолютно неприменим в этом случае.

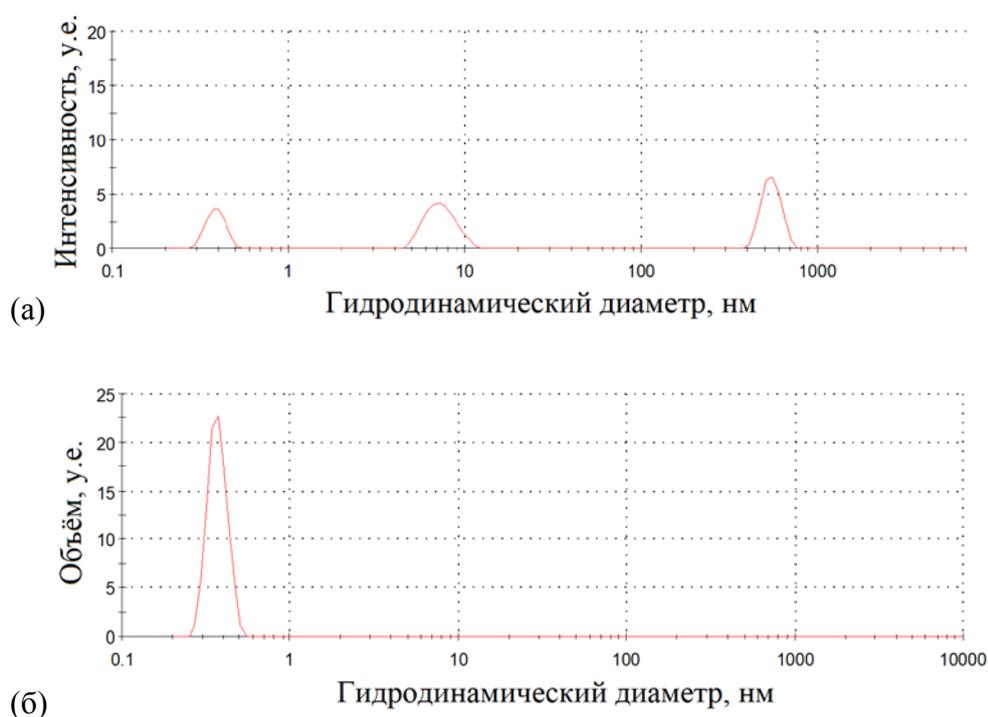


Рисунок 4.9. Распределение по размерам лизоцима (1 мг/мл) в растворе с добавкой 30 мМ дитиотриетолола и 6 М гуанидина гидрохлорида [266]: а) распределение по интенсивности; б) распределение по объёму.

Фильтрация образцов

В некоторых случаях можно использовать процедуру фильтрации изучаемых растворов биомолекул. Основной сложностью этой процедуры является подбор материала фильтров, поскольку часто биомолекулы в значительных количествах оседают на фильтрах, даже будучи много меньше размера пор. На рисунке 4.10 даны распределения по размерам в растворе лизина до фильтрации, сразу после фильтрации и через 3 часа после фильтрации. В данном случае использовались фильтры с размером пор 20 нм.



Рисунок 4.10. Распределения по размерам в растворах лизина (20 мг/мл) при pH 3 [552]: до фильтрации (—), сразу после фильтрации (—) и через 3 часа после фильтрации (—).

Из рисунка видно, что без фильтрации молекулы аминокислоты не видны на фоне нанопузырьковой фазы. После фильтрации они отчётливо регистрируются. Однако несколько часов спустя фракция аминокислоты снова пропадает. По-видимому, фильтрация эффективно устраняет нанопузырьки. При этом, будучи равновесной фазой, нанопузырьки вновь формируются через некоторое время. Также важно отметить, что в данном случае исходная концентрация аминокислоты была достаточно высокой – 20 мг/мл. При меньших концентрациях интенсивность рассеяния столь малых биомолекул намного меньше интенсивности рассеяния буфера, поэтому фракцию аминокислоты не удаётся зарегистрировать.

4.3. Физические характеристики нанопузырьков в водных растворах

Опыт показывает, что метод ДСР регистрирует размерные фракции не только в коллоидных системах, но и в водных растворах, считающихся истинными. При проведении высокочувствительных измерений водных растворов солей обнаруживается фракция с размерами порядка сотен нанометров (рисунок 4.11). Изучению данного вопроса посвящено множество исследований и даны различные интерпретации [271,276,553]. Однако преобладающей на сегодняшний день интерпретацией является наличие в растворах нанопузырьков, стабилизированных ионами (бастонов) [278].

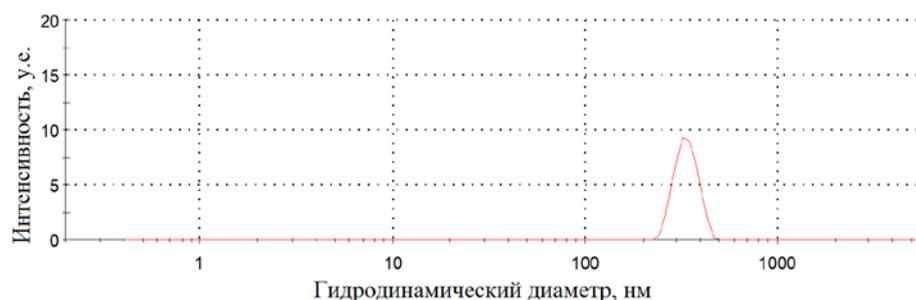


Рисунок 4.11. Характерное распределение по размерам оптических неоднородностей в водных растворах неорганических солей.

Определив методом ДСР размеры пузырьков и интенсивность рассеяния, а также учитывая коэффициенты преломления воздуха и воды, могут быть рассчитаны числовые концентрации пузырьков в растворах. Было исследовано влияние на размер и числовую концентрацию нанопузырьков в растворе различных неорганических ионов [281]. Из таблицы 4.1 видно, что средний гидродинамический диаметр нанопузырьков в растворах разных солей лежит в диапазоне 100-600 нм. Тип ионов влияет также на числовую концентрацию пузырьков, которая варьирует от 10^6 до 10^7 см^{-3} .

Таблица 4.1*. Размеры и равновесная числовая концентрация бабстонов в растворах неорганических солей с концентрацией 0.1 М [281].

Соль	Интенсивность рассеяния, кГц	Размеры нанопузырьков, нм	Числовая плотность нанопузырьков* 10^{-6} , см^{-3}
Вода	11±2	480±320	<<1.0
KI	15±3	260±70	1.0±0.6
KBr	38±4	300±90	5.0±0.7
NaCl	28±3	250±50	4.0±0.7
KCl	29±2	220±30	6.0±0.6
NaNO ₃	18±3	270±40	1.4±0.5
CsCl	33±4	310±50	3.4±0.6
CaCl ₂	21±3	370±50	1.2±0.3
MgCl ₂	24±2	480±90	2.0±0.3
Na ₂ SO ₄	20±2	190±80	5.0±1.0
NaF	15±2	200±60	2.4±0.6
MgSO ₄	19±2	430±80	1.1±0.3
NaOH	37±4	205±50	12.0±1.8
LiOH	21±2	220±90	3.7±0.7

*Погрешность представляет собой стандартное отклонение при числе повторов 10.

На рисунке 4.12 дана зависимость концентрации пузырьков от содержания NaCl в растворе, образующихся в результате перемешивания магнитной мешалкой без разрыва жидкости [274]. При сравнении данных рисунка 4.12 и таблицы 4.1 по NaCl видно, что перемешивание, способствующее появлению турбулентностей в жидкости, приводит к увеличению числа нанопузырьков примерно в 5 раз. Причём предельная концентрация пузырьков, образующихся при перемешивании со скоростями 150 и 1500 об/мин, практически не отличалась. Менялось лишь время достижения этой предельной концентрации с 1100 до 100 с, соответственно [274].

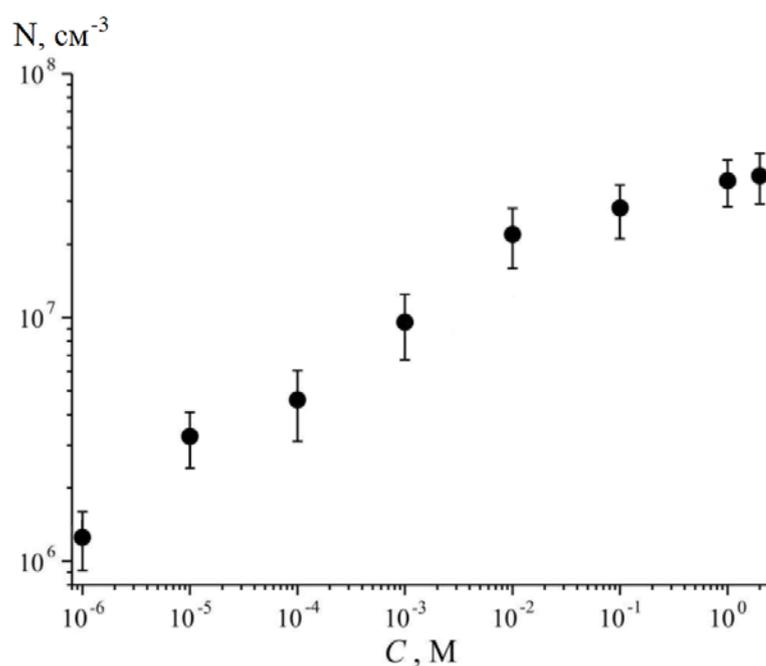


Рисунок 4.12. Зависимость предельной числовой концентрации нанопузырьков N от молярной концентрации NaCl [274], образующихся в растворе в результате перемешивания магнитной мешалкой без разрыва жидкости. Погрешность: стандартное отклонение ($n=10$).

Были проведены исследования распределений по размерам нанопузырьков, образующихся в растворах электролитов под действием электролиза. Размерные распределения пузырьков, образующихся в растворе Na₂SO₄ (1 M) под действием переменного электрического поля представлены на рисунке 4.13. Детальное описание эксперимента описано в [554].

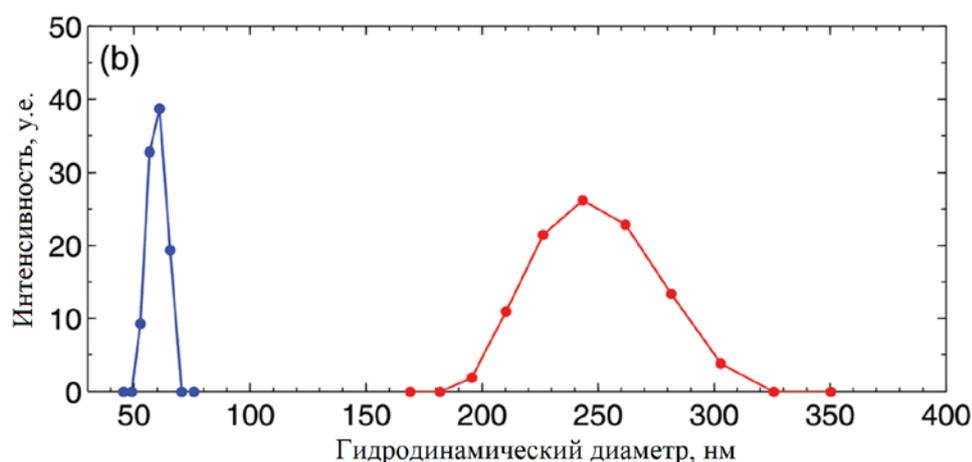


Рисунок 4.13. Распределения по размерам нанопузырьков водорода и кислорода, образовавшихся в результате электролиза в растворе Na_2SO_4 (1 М). Синяя кривая – распределение по размерам, измеренное во время генерации, красная – через 3 минуты после прекращения генерации [554].

Из рисунка 4.13 следует, что во время электролиза образуются пузырьки с размерами около 60 нм, тогда как через 3 мин спустя размер пузырьков стабилизируется около 250 нм и более не увеличивается. Очевидно, что в данном случае размер 60 нм – это максимальный размер основной массы пузырьков, образующихся при электролизе. Меньшие размеры не видны методом ДСР, из-за сильно уменьшающегося светорассеяния ими согласно закону Рэлея (1.6). Стабилизированные размеры пузырьков (после генерации) попадают в область самопроизвольно образующихся пузырьков в растворах электролитов (таблица 4.1). Это подтверждает высказанное ранее утверждение, что размер порядка сотен нанометров является равновесным для пузырьков в водных растворах.

Влияние типа газа на параметры образующихся нанопузырьков в воде и физрастворе показано на рисунке 4.14 [275]. Из рисунка 4.14 видны небольшие отличия в равновесной концентрации нанопузырьков на основе различных газов, что может быть связано с поляризуемостью молекул газа [275]. Однако наблюдается сильный рост концентрации пузырьков с увеличением давления насыщения раствора газами и при переходе от воды к физраствору. Понятно, что с ростом давления увеличивается концентрация растворённого газа, а физраствор содержит большее количество ионов, позволяющих стабилизировать пузырьки.

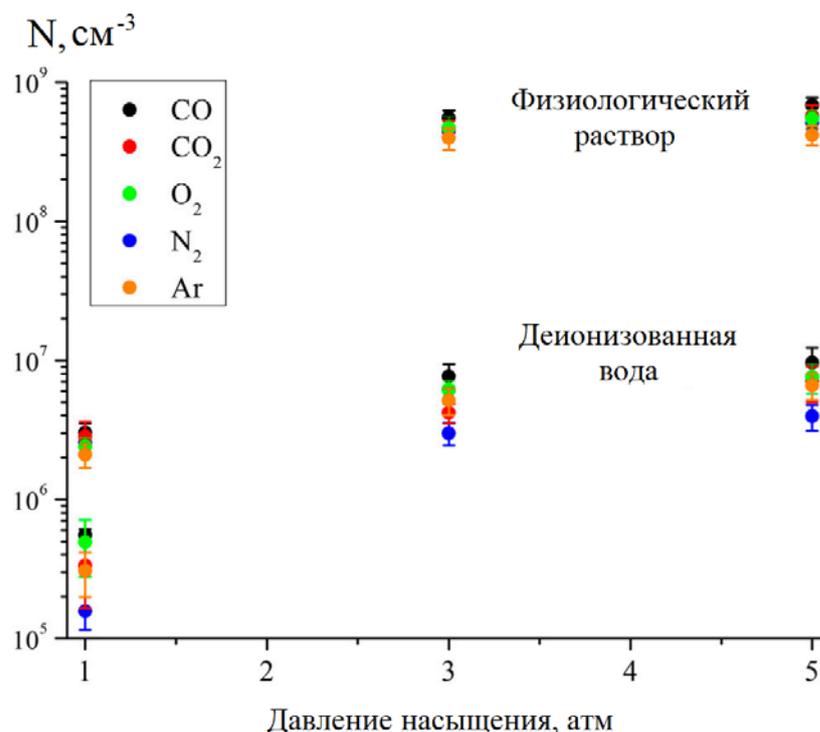


Рисунок 4.14. Влияние типа газа и давления насыщения на числовую концентрацию нанопузырьков в воде и физиологическом растворе [275]. Погрешность: стандартное отклонение (n=10).

Все представленные в настоящем разделе результаты подтверждают природу наблюдаемой субмикронной фракции водных растворов – стабилизированных ионами нанопузырьков.

Отдельно отметим, что в бинарных смесях жидкостей возможно образование не только нанопузырьков, но и нанокпель, обогащённых одной из жидкостей, как было показано в наших работах [393–397]. Однако, как правило, существование биомолекул в нативном состоянии возможно только в водно-солевых растворах, где данное явление не реализуется.

4.4. Влияние механического воздействия на характеристики гетерогенности водных растворов биомолекул

До сих пор речь в основном шла о пузырьках воздуха, самопроизвольно образующихся в водных растворах в равновесных концентрациях. Очевидно, что они могут быть сгенерированы в больших концентрациях путём различных воздействий. В разделе 4.3 были приведены примеры генерации пузырьков путём электролиза (рисунок 4.13) или под действием турбулентностей без разрыва жидкости (рисунок 4.12). В данном разделе рассматриваются

некоторые закономерности образования пузырьков в водном растворе биомолекул в результате интенсивных механических воздействий, сопровождающихся разрывом жидкости.

На рисунке 4.15 показаны распределения по размерам раствора иммуноглобулина G с концентрацией 0.1 мг/мл. На рисунке 4.15а отчётливо видна фракция белка около 10 нм и фракция нанопузырьков около 300 нм. После проведения интенсивного механического воздействия (встряхивания) раствора с образованием большого количества видимых глазом пузырьков и отстаивания в течение 5 минут в распределениях обнаружены две дополнительные размерные фракции около 600 и 3000 нм. Фракция наибольшего размера, по-видимому, соответствует кластерам нанопузырьков [282–286], возможно в комплексе с белками. Однако фракция около 600 нм не регистрировалась в экспериментах без механических воздействий. Анализ матрицы рассеяния и данных по фазовой микроскопии позволил установить, что она относится к агрегатам денатурированной формы белка с нанопузырьками [555].

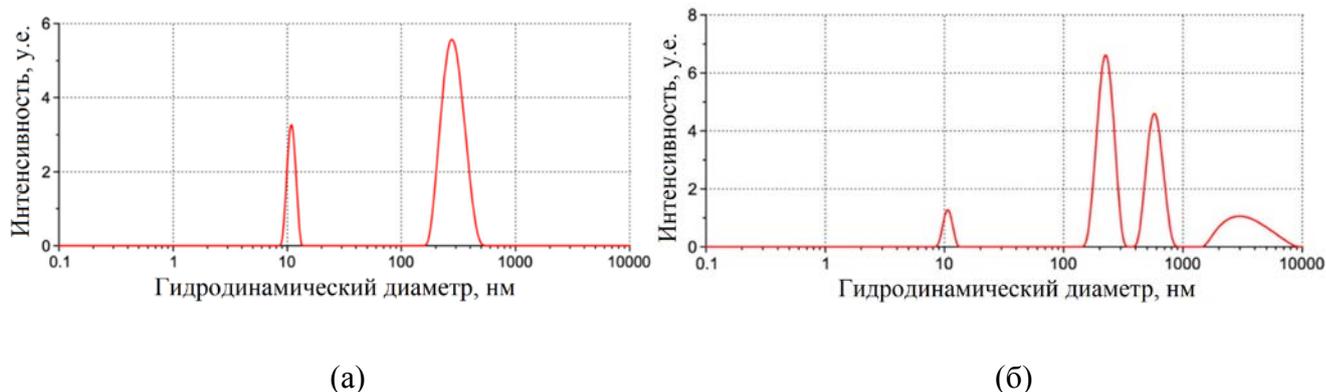


Рисунок 4.15. Распределения по размерам иммуноглобулина G (0.1 мг/мл) в воде: а) исходное распределение; б) распределение после интенсивного механического воздействия с разрывом жидкости.

Из представленных данных следует два вывода. Во-первых, биомолекулы в растворах, в частности белки, могут образовывать комплексы с пузырьками; во-вторых, характеристики гетерогенности белковых растворов после механического воздействия могут существенно меняться. При интенсивном механическом воздействии на водный раствор происходит образование повышенной концентрации пузырьков, которые достаточно быстро всплывают, оставаясь в равновесной концентрации (таблица 4.1). При наличии же биомолекул, обладающих поверхностно-активными свойствами, они образуют комплексы с пузырьками, не позволяя им покидать раствор в течение длительного времени. Это явление требует дальнейшего более глубокого исследования на примерах растворов различных биомолекул, различного типа и

интенсивности механических воздействий, с выяснением временных зависимостей сохранения эффекта.

Показанная возможность объединения белков с нанопузырьками позволяет предположить, что при малой концентрации биомолекул их основная часть может пребывать в комплексах с нанопузырьками. Согласно данным таблицы 4.1 объёмная доля C нанопузырьков в водных растворах с близкой к физиологической концентрации соли составляет $C = n_b * \frac{1}{6} \pi d^3 \approx 10^{-7}$. Это означает, что при сопоставимых концентрациях биомолекул (менее 1 мкг/мл) возможно существенное их захватывание поверхностями нанопузырьков. При этом на сегодняшний день неизвестно, как отличаются свойства биомолекул в свободном состоянии от биомолекул, находящихся на поверхности пузырька. Данный эффект может быть важен при работе с растворами биомолекул малых концентраций, тем более при сопутствующих механических воздействиях, при которых концентрация пузырьков может сильно возрасти.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящая диссертационная работа посвящена исследованиям молекулярной организации водных растворов биомолекул. Несмотря на широту и многообразие аспектов данной тематики, можно выделить три основных направления, в рамках которых она обретает полноту: гидратация биомолекул, структура биомолекул в водном окружении, характеристики гетерогенности растворов биомолекул. В работе описан ряд методических разработок, дающих новые возможности для проведения исследований по каждому из трёх обозначенных направлений.

Описан подход на основе ТГц спектроскопии временного разрешения, позволяющий анализировать гидратацию биомолекул в растворах. Данный подход состоит из нескольких этапов. Сначала проводятся высокоточные спектральные измерения изучаемого раствора биомолекул и расчёт спектров комплексной диэлектрической проницаемости раствора, также определяются спектры диэлектрической проницаемости растворителя и сухого вещества биомолекул. Затем с использованием модели эффективной среды (соответствующей типу биомолекул) рассчитывается диэлектрическая проницаемость водной фазы раствора. Для диэлектрической проницаемости водной фазы с помощью процедуры фитинга определяется ряд параметров, характеризующих межмолекулярную структуру и динамику воды. Сравнивая параметры, рассчитанные для водной фазы раствора биомолекул, с параметрами аналогичного раствора без биомолекул можно делать выводы о структурно-динамических особенностях гидратных оболочек. Данный подход позволил получить новые данные о гидратации белка, фосфолипида, АТФ, ДНК и сахаров в водных растворах.

Разработана новая разновидность метода ИК спектроскопии собственного излучения образцов с использованием холодного фона. Как было показано на ряде примеров, этот подход может использоваться для анализа нативной структуры биомолекул в растворах. При этом возможно достижение более высокой чувствительности, по сравнению с классическим вариантом абсорбционной спектроскопии. Метод характеризуется отсутствием какого-либо воздействия на образец, в том числе ИК излучения, что может быть важно при изучении высокочувствительных объектов.

Объединяя обширные экспериментальные данные исследований растворов различных биомолекул, а также нанопузырьков в водных растворах, методом динамического светорассеяния, удалось установить один часто проявляющийся артефакт: распределения по размерам биомолекул могут содержать пик в области сотен нм, относящийся к нанопузырькам.

Предложена методика, позволяющая выяснить, принадлежит данный пик к фазе нанопузырьков или относится к фракции биомолекул. Это может быть важно при анализе некоторых процессов, происходящих с биомолекулами в растворе, например при агрегации белков.

Возвращаясь к основной идее исследования водных растворов биомолекул с объединением трёх направлений (структура биомолекул, их гидратные оболочки и характеристики гетерогенности), полученные в настоящей работе результаты выявили множество взаимосвязей их между собой на примерах всех основных типов биомолекул. Так, белок в частично агрегированной форме демонстрирует существенное отличие параметров гидратных оболочек данной конформации от всех остальных конформаций, при которых агрегация (изменение гетерогенности) не наблюдается. На примере DPPC липосом показано, что в зависимости от фазового состояния (структуры) фосфолипидного бислоя влияние на воду в гидратных оболочках может быть разным и даже противоположным – ослабляющим или усиливающим межмолекулярное связывание. Анализ гидратных оболочек АТФ показал их существенное отличие в зависимости от связывания с Mg^{2+} . Это оказалось также сопряжено с бóльшим гидродинамическим размером (изменением гетерогенности) комплекса $Mg \cdot АТФ$, по сравнению с АТФ, за счёт изменений в гидратной оболочке. Выявлено множество взаимосвязей между структурой молекул сахаров и их характеристиками гидратации. Также показано, что полисахариды, будучи полимерными структурами, формируют гидратные оболочки с характеристиками похожими на те, которые формируют их мономеры, но у полисахаридов наблюдается меньшая степень выраженности/протяжённости гидратных оболочек. У ДНК наблюдается обратная зависимость гидратации от размера: гидратная оболочка полимера ДНК более выражена, чем у отдельных нуклеотидов. Приведённые примеры сахаров и ДНК демонстрируют явную связь характеристик гетерогенности (размера биомолекул) их растворов не только со структурой биомолекул, но и со свойствами гидратации.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

- 1) Впервые разработана теоретическая модель эффективной среды, позволяющая связать комплексную диэлектрическую проницаемость раствора протяжённых биополимеров с проницаемостями двух фаз раствора: биополимеров и водной фазы. На примере раствора ДНК проведена экспериментальная проверка модели, которая показала высокую точность в ТГц диапазоне.
- 2) Впервые показано, что параметры молекулярной релаксации гидратных оболочек отличаются у белка (БСА) различной конформации. Имеется потенциал использования данного эффекта для определения конформации белков в растворах через анализ их гидратации методом ТГц спектроскопии временного разрешения.
- 3) Выявлены отличия по ряду параметров гидратации фосфолипидных липосом в зависимости от их фазового состояния. Например, у DPPC липосом температурный переход от фазы гель к риппл-фазе меняет влияние фосфолипида на гидратную оболочку с ослабляющего межмолекулярное связывание на усиливающее. Предложенный подход на основе ТГц спектроскопии временного разрешения обладает чувствительностью к изменённым структурно-динамическим характеристикам воды на дистанции более 5 нм от поверхности липосомы.
- 4) Показано, что АТФ искажает структуру воды за счёт сильного связывания её молекул, а комплекс $Mg \cdot АТФ$, наоборот, структуру воды упорядочивает и способствует образованию дополнительных водородных связей в гидратных оболочках. Это может иметь биологический смысл, ввиду того, что только при связывании с Mg^{2+} АТФ участвует в биологически значимых реакциях.
- 5) С помощью метода ТГц спектроскопии временного разрешения в гидратной оболочке ДНК (в релаксированной форме) выявлено наличие трёх фракций молекул воды, отличающих её от невозмущённой воды: более сильно связанные молекулы, область с бóльшим количеством свободных молекул и область с бóльшим количеством водородных связей. Ионы Mg^{2+} слабо влияют на гидратную оболочку ДНК, тогда как ионы K^+ в концентрации близкой к внутриклеточной её частично разрушают.
- 6) Показано, что ДНК оказывает аналогичное по характеристикам, но более сильное модифицирующее влияние на гидратную оболочку, чем отдельные нуклеотиды.
- 7) На основе предлагаемого подхода с использованием ТГц спектроскопии временного разрешения установлен ряд особенностей гидратации сахаров с различной молекулярной структурой. Растворимые сахара проявляют усиление связывания воды в гидратных оболочках.

Гидратные оболочки моносахаридов отличаются от невозмущённой воды увеличением четырёх параметров: количества водородных связей и их средней энергии, количества свободных молекул воды и их времени релаксации. Аксиальная ориентация ОН(4) группы моносахарида, в отличие от экваториальной, способствует уширению распределения энергий водородных связей в гидратной оболочке. Гидратация полисахарида выражена слабее, чем у составляющих моносахаридов, и зависит от типа гликозидных связей.

8) Разработан метод эмиссионной ИК спектроскопии с холодным фоном, не требующий какого-либо возбуждения исследуемых образцов. Данный метод является альтернативой классической абсорбционной ИК спектроскопии, позволяя проводить молекулярный анализ, в том числе, биомолекул в растворе. Метод прошёл успешную проверку при определении вторичной структуры белка (БСА) в растворе на основе анализа амидных полос в спектре излучения. На примере суспензии DMPC липосом показано, что анализ полосы излучения карбонильных групп фосфолипида позволяет корректно определять его фазовое состояние. Определены характеристические полосы излучения АТФ в растворе. Метод покрывает всю область основных частот молекулярных колебаний и в несколько раз превосходит традиционную ИК спектроскопию поглощения по чувствительности. Не требуя источника возбуждения, метод может применяться для анализа любых образцов, в том числе и чувствительных к ИК излучению.

9) При измерении распределений по размерам биомолекул в водных растворах методом динамического светорассеяния возможно появление артефактной фракции с субмикронными размерами, относящейся к нанопузырькам, являющимся естественной гетерогенностью любых водных растворов. Впервые предложен алгоритм, позволяющий определить принадлежность данной фракции к нанопузырькам на основе сравнения её интенсивности рассеяния с интенсивностью рассеяния растворителя.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Френкель Я.И. Кинетическая теория жидкости. Наука / ред. Семенов Н.Н., Глауберман А.Е. Ленинград, 1975. 592 с.
2. Фишер И.З. Статистическая теория жидкостей. Физматгиз. Москва, 1961. 280 с.
3. Глебов А.Н., Буданов А.Р. Структурно-динамические свойства водных растворов электролитов // СОЖ. 1996. Том 9. С. 72–78.
4. Arunan E., Desiraju G.R., Klein R.A., Sadlej J., Scheiner S., Alkorta I., Clary D.C., Crabtree R.H., Dannenberg J.J., Hobza P., Kjaergaard H.G., Legon A.C., Mennucci B., Nesbitt, D.J. Defining the hydrogen bond: an account (IUPAC Technical Report) // Pure Appl. Chem. 2011. Vol. 83, № 8. P. 1619–1636.
5. Chumaevskii N.A., Rodnikova M.N. Some peculiarities of liquid water structure // J. Mol. Liq. 2003. Vol. 106, № 2–3. P. 167–177.
6. Tanaka H., Ohmine I. Large local energy fluctuations in water // J. Chem. Phys. 1987. Vol. 87, № 10. P. 6128–6139.
7. Cowan M.L., Bruner B.D., Huse N., Dwyer J.R., Chugh B., Nibbering E.T.J., Elsaesser T., Miller R.J.D. Ultrafast memory loss and energy redistribution in the hydrogen bond network of liquid H₂O // Nature. 2005. Vol. 434, № 7030. P. 199–202.
8. Ohmine I., Tanaka H. Fluctuation, relaxations, and hydration in liquid water. Hydrogen-bond rearrangement dynamics // Chem. Rev. 1993. Vol. 93, № 7. P. 2545–2566.
9. Ohmine I., Tanaka H., Wolynes P.G. Large local energy fluctuations in water. II. Cooperative motions and fluctuations // J. Chem. Phys. 1988. Vol. 89, № 9. P. 5852–5860.
10. Kaatz U. Complex permittivity of water as a function of frequency and temperature // J. Chem. Eng. Data. 1989. Vol. 34, № 4. P. 371–374.
11. von Hippel A.R. The dielectric relaxation spectra of water, ice, and aqueous solutions, and their interpretation. I. Critical survey of the status-quo for water // IEEE Trans. Electr. Insul. 1988. Vol. 23, № 5. P. 801–816.
12. von Hippel A.R. The dielectric relaxation spectra of water, ice and aqueous solutions, and their interpretation. II. Tentative interpretation of the relaxation spectrum of water in the time and frequency domain // IEEE Trans. Electr. Insul. 1988. Vol. 23, № 5. P. 817–823.
13. Perticaroli S., Nakanishi M., Pashkovski E., Sokolov A.P. Dynamics of hydration water in sugars and peptides solutions // J. Phys. Chem. B. 2013. Vol. 117, № 25. P. 7729–7736.
14. Самойлов О.Я. Структура водных растворов электролитов и гидратация ионов. Изд-во АН. Москва, 1957. 180 с.
15. Anonymous. The works of Franz Hofmeister and his pupils // Erg. Physiol. Biol. Chemie Exp. Pharm. 1923. Vol. 22. P. 39–50.
16. Parsons D.F., Boström M., Nostro P.Lo, Ninham B.W. Hofmeister effects: interplay of hydration, nonelectrostatic potentials, and ion size // Phys. Chem. Chem. Phys. 2011. Vol. 13, № 27. P. 12352.
17. Hofmeister F. Zur lehre von der wirkung der salze // Arch. für Exp. Pathol. und Pharmakologie. 1888. Vol. 24, № 4–5. P. 247–260.
18. Collins K.D., Washabaugh M.W. The Hofmeister effect and the behaviour of water at interfaces // Q. Rev. Biophys. 1985. Vol. 18, № 4. P. 323–422.
19. Wyttenbach T., Bowers M.T. Hydration of biomolecules // Chem. Phys. Lett. 2009. Vol. 480, № 1–3. P. 1–16.

20. Laage D., Elsaesser T., Hynes J.T. Water dynamics in the hydration shells of biomolecules // *Chem. Rev.* 2017. Vol. 117, № 16. P. 10694–10725.
21. Sheu S.-Y., Liu Yu-C., Zhou J.-K., Schlag E.W., Yang D.-Y. Surface topography effects of globular biomolecules on hydration water // *J. Phys. Chem. B.* 2019. Vol. 123, № 32. P. 6917–6932.
22. Laage D., Hynes J.T. A molecular jump mechanism of water reorientation // *Science.* 2006. Vol. 311, № 5762. P. 832–835.
23. Volkov A.A., Artemov V.G., Volkov A.A., Sysoev N.N. Possible mechanism of molecular motion in liquid water from dielectric spectroscopy data // *J. Mol. Liq.* 2017. Vol. 248. P. 564–568.
24. Artemov V.G., Volkov A.A. Water and ice dielectric spectra scaling at 0°C // *Ferroelectrics.* 2014. Vol. 466, № 1. P. 158–165.
25. Волков А.А., Артемов В.Г., Пронин А.В. О происхождении диэлектрических свойств воды // *Доклады Академии наук.* 2014. Том 455, № 1. С. 26–29.
26. Volkov A.A., Artemov V.G., Pronin A.V. A radically new suggestion about the electrodynamics of water: Can the pH index and the Debye relaxation be of a common origin? // *EPL (Europhysics Lett.).* 2014. Vol. 106, № 4. P. 46004.
27. Артёмов В.Г., Волков А.А., Сысоев Н.Н., Волков А.А. Проявление теплового движения ионов в спектре динамической проводимости жидкой воды // *Известия Российской академии наук. Серия физическая.* 2015. Том 79, № 12. С. 1642–1645.
28. Артемов В.Г., Волков А.А., Сысоев Н.Н., Волков А.А. О переносе заряда в водных растворах электролитов HCl, NaOH и NaCl // *Доклады Академии наук.* 2015. Том 464, № 3. С. 297–301.
29. Artemov V.G., Volkov A.A., Sysoev N.N., Volkov A.A. Conductivity of aqueous HCl, NaOH and NaCl solutions: Is water just a substrate? // *EPL (Europhysics Lett.).* 2015. Vol. 109, № 2. P. 26002.
30. Артёмов В.Г., Волков А.А., Сысоев Н.Н., Волков А.А. Об автоионизации и pH жидкой воды // *Доклады Академии наук.* 2016. Том 466, № 2. С. 154–157.
31. Волков А.А., Васин А.А., Волков А.А. Релаксационно-резонансные свойства диэлектрического отклика воды // *Известия Российской академии наук. Серия физическая.* 2020. Том 84, № 9. С. 1241–1245.
32. Васин А.А., Волков А.А. Положение дел в понимании свойств жидкой воды: возможная альтернатива // *Биофизика.* 2021. Том 66, № 5. С. 837–844.
33. Lyashchenko A.K., Dunyashev V.S. Dielectric and radio-brightness changes in aqueous solutions of electrolytes and biological effects at millimeter waves // *Phys. Wave Phenom.* 2021. Vol. 29, № 2. P. 169–173.
34. Yada H., Nagai M., Tanaka K. Origin of the fast relaxation component of water and heavy water revealed by terahertz time-domain attenuated total reflection spectroscopy // *Chem. Phys. Lett.* 2008. Vol. 464, № 4–6. P. 166–170.
35. Пеньков Н.В., Швирст Н.Э., Яшин В.А., Фесенко Е.Е. Об особенностях молекулярной релаксации в водных растворах // *Биофизика.* 2013. Том 58, № 6. С. 933–941.
36. Barthel J., Bachhuber K., Buchner R., Hetzenauer H. Dielectric spectra of some common solvents in the microwave region. Water and lower alcohols // *Chem. Phys. Lett.* 1990. Vol. 165, № 4. P. 369–373.
37. Buchner R., Barthel J., Stauber J. The dielectric relaxation of water between 0°C and 35°C //

- Chem. Phys. Lett. 1999. Vol. 306, № 1–2. P. 57–63.
38. Zasetsky A.Y. Dielectric relaxation in liquid water: two fractions or two dynamics? // *Phys. Rev. Lett.* 2011. Vol. 107, № 11. P. 117601.
 39. Shiraga K., Ogawa Y., Kondo N., Irisawa A., Imamura M. Evaluation of the hydration state of saccharides using terahertz time-domain attenuated total reflection spectroscopy // *Food Chem.* 2013. Vol. 140, № 1–2. P. 315–320.
 40. Пеньков Н.В., Яшин В.А., Фесенко Е.Е. (мл.), Фесенко Е.Е. Расчет количества свободных молекул воды в водных растворах с помощью спектральных параметров из терагерцовой области с учётом процессов экранировки // *Биофизика.* 2014. Том 59, № 3. С. 428–431.
 41. Shiraga K., Suzuki T., Kondo N., De Baerdemaeker J., Ogawa Y. Quantitative characterization of hydration state and destructuring effect of monosaccharides and disaccharides on water hydrogen bond network // *Carbohydr. Res.* 2015. Vol. 406. P. 46–54.
 42. Cherkasova O.P., Nazarov M.M., Konnikova M., Shkurinov A.P. THz spectroscopy of bound water in glucose: direct measurements from crystalline to dissolved state // *J. Infrared, Millimeter, Terahertz Waves.* 2020. Vol. 41, № 9. P. 1057–1068.
 43. Лященко А.К., Новскова Т.А. Структурно- кинетические характеристики жидкостей с диполь – дипольным взаимодействием и высокочастотные диэлектрические свойства // *Журн. физ. химии.* 2002. Том 76, № 11. С. 1965–1971.
 44. Лященко А.К., Новскова Т.А. Ориентационная динамика и диэлектрический спектр воды // *Журн. физ. химии.* 2004. Том 78, № 7. С. 1175–1181.
 45. Lyashchenko A.K., Novskova T.A. Structural dynamics of water and its dielectric and absorption spectra in the range 0–800 cm⁻¹ // *J. Mol. Liq.* 2006. Vol. 125. P. 130–138.
 46. Лященко А.К., Новскова Т.А. Структурная динамика и спектры ориентационной поляризации воды и других жидкостей // *Структурная самоорганизация в растворах и на границе раздела фаз. ЛКИ / ред. Цивадзе А.Ю. Москва, 2008. С. 417–500.*
 47. Новскова Т.А., Лященко А.К. Миллиметровые волны в медицине и биологии // *12 Российский симпозиум с международным участием. ИРЭ РАН. Москва, 2000. С. 130–132, 138–141.*
 48. Lyashchenko A.K., Novskova T.A., Lileev A.S., Zasetsky A. Yu., Gaiduk V.I. Orientational relaxation in hydrogen bonded systems: aqueous solutions of electrolytes // *J. Chem. Soc. Farad. Trans.* 1993. Vol. 89, № 12. P. 1985–1991.
 49. Юхневич Г.В. Инфракрасная спектроскопия воды. Наука / ред. Грибов Л.А. Москва: Наука, 1973. 207 с.
 50. Walrafen G.E., Fisher M.R., Hokmabadi M.S., Yang W.-H. Temperature dependence of the low- and high- frequency Raman scattering from liquid water // *J. Chem. Phys.* 1986. Vol. 85, № 12. P. 6970–6982.
 51. Hasted J.B., Husain S.K., Frescura F.A.M., Birch J.R. Far-infrared absorption in liquid water // *Chem. Phys. Lett.* 1985. Vol. 118, № 6. P. 622–625.
 52. Nielsen O.F. Chapter 2. Low-frequency spectroscopic studies of interactions in liquids // *Annu. Reports Sect. “C” (Physical Chem.).* 1993. Vol. 90. P. 3–44.
 53. Nielsen O.F. Chapter 3. Low-frequency spectroscopic studies and intermolecular vibrational energy transfer in liquids // *Annu. Reports Sect. “C” (Physical Chem.).* 1996. Vol. 93. P. 57–99.
 54. Rønne C., Keiding S.R. Low frequency spectroscopy of liquid water using THz-time domain spectroscopy // *J. Mol. Liq.* 2002. Vol. 101, № 1–3. P. 199–218.
 55. Agmon N. Tetrahedral displacement: the molecular mechanism behind the Debye relaxation in

- water // *J. Phys. Chem.* 1996. Vol. 100. P. 1072–1080.
56. Walrafen G.E. Raman spectral studies of the effects of temperature on water structure // *J. Chem. Phys.* 1967. Vol. 47, № 1. P. 114–126.
 57. Ball P. Water as an active constituent in cell biology // *Chem. Rev.* 2008. Vol. 108, № 1. P. 74–108.
 58. Levy Y., Onuchic J.N. Water mediation in protein folding and molecular recognition // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2006. Vol. 35, № 1. P. 389–415.
 59. Chaplin M. Do we underestimate the importance of water in cell biology? // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006. Vol. 7, № 11. P. 861–866.
 60. Fenimore P.W., Frauenfelder H., McMahon B.H., Parak F.G. Slaving: solvent fluctuations dominate protein dynamics and functions // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002. Vol. 99, № 25. P. 16047–16051.
 61. Lewin S. Water extrusion in biological reactions // *J. theor. Biol.* 1970. Vol. 26, № 3 P. 481–495.
 62. Jahn S., Klein J. Hydration lubrication: the macromolecular domain // *Macromolecules.* 2015. Vol. 48, № 15. P. 5059–5075.
 63. Teeter M.M. Water-protein interactions: theory and experiment // *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 1991. Vol. 20, № 1. P. 577–600.
 64. Qiu W., Kao Y.-T., Zhang L., Yang Y., Wang L., Stites W.E., Zhong D., Zewail A.H. Protein surface hydration mapped by site-specific mutations // *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2006. Vol. 103, № 38. P. 13979–13984.
 65. Pal S.K., Peon J., Bagchi B., Zewail A.H. Biological water: femtosecond dynamics of macromolecular hydration // *J. Phys. Chem. B.* 2002. Vol. 106, № 48. P. 12376–12395.
 66. Лобышев В.И., Калиниченко Л.П. Изотопные эффекты D₂O в биологических системах. Изд. “Наука” М., 1978, 215 с.
 67. Nandi N., Bagchi B. Dielectric relaxation of biological water // *J. Phys. Chem. B.* 1997. Vol. 101, № 50. P. 10954–10961.
 68. Pal S.K., Peon J., Zewail A.H. Biological water at the protein surface: dynamical solvation probed directly with femtosecond resolution // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002. Vol. 99, № 4. P. 1763–1768.
 69. Jungwirth P. Biological water or rather water in biology? // *J. Phys. Chem. Lett.* 2015. Vol. 6, № 13. P. 2449–2451.
 70. Comez L., Lupi L., Morresi A., Paolantoni M., Sassi P., Fioretto D. More is different: experimental results on the effect of biomolecules on the dynamics of hydration water // *J. Phys. Chem. Lett.* 2013. Vol. 4, № 7. P. 1188–1192.
 71. Chalikian T.V., Sarvazyan A.P., Breslauer K.J. Hydration and partial compressibility of biological compounds // *Biophys. Chem.* 1994. Vol. 51, № 2–3. P. 89–109.
 72. Perkins S.J. Protein volumes and hydration effects. The calculations of partial specific volumes, neutron scattering matchpoints and 280-nm absorption coefficients for proteins and glycoproteins from amino acid sequences // *Eur. J. Biochem.* 1986. Vol. 157, № 1. P. 169–180.
 73. Durchschlag H., Zipper P. Comparative investigations of biopolymer hydration by physicochemical and modeling techniques // *Biophys. Chem.* 2001. Vol. 93, № 2–3. P. 141–157.
 74. Biswas A.D., Barone V., Amadei A., Daidone I. Length-scale dependence of protein hydration-shell density // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2020. Vol. 22, № 14. P. 7340–7347.

75. Born B., Kim S.J., Ebbinghaus S., Gruebele M., Havenith M. The terahertz dance of water with the proteins: the effect of protein flexibility on the dynamical hydration shell of ubiquitin // *Faraday Discuss.* 2009. Vol. 141. P. 161–173.
76. Rani P., Biswas P. Local structure and dynamics of hydration water in intrinsically disordered proteins // *J. Phys. Chem. B.* 2015. Vol. 119, № 34. P. 10858–10867.
77. Bagchi B. Water dynamics in the hydration layer around proteins and micelles // *Chemical Reviews.* 2005. Vol. 105, № 9. P. 3197–3219.
78. Chandramouli B., Zazza C., Mancini G., Brancato G. Boundary condition effects on the dynamic and electric properties of hydration layers // *J. Phys. Chem. A.* 2015. Vol. 119, № 21. P. 5465–5475.
79. Heyden M., Ebbinghaus S., Havenith M. Terahertz spectroscopy as a tool to study hydration dynamics // *Encyclopedia of Analytical Chemistry* / ed. Meyers R.A. Chichester, UK: John Wiley and Sons, Ltd, 2010. P. 1–19.
80. Cheung M.S., Garcia A.E., Onuchic J.N. Protein folding mediated by solvation: water expulsion and formation of the hydrophobic core occur after the structural collapse // *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2002. Vol. 99, № 2. P. 685–690.
81. Pal S., Zewail A.H. Dynamics of water in biological recognition // *Chem. Rev.* 2004. Vol. 104, № 4. P. 2099–2124.
82. Zhong D., Pal S.K., Zewail A.H. Biological water: a critique // *Chem. Phys. Lett.* 2011. Vol. 503, № 1–3. P. 1–11.
83. Halle B. Protein hydration dynamics in solution: a critical survey // *Philos. Trans. R. Soc. London. Ser. B Biol. Sci.* / ed. Daniel R.M., Finney J.L., Stoneham M. 2004. Vol. 359, № 1448. P. 1207–1224.
84. Helms V. Protein dynamics tightly connected to the dynamics of surrounding and internal water molecules // *Chem.Phys.Chem.* 2007. Vol. 8, № 1. P. 23–33.
85. Jana B., Pal S., Bagchi B. Hydration dynamics of protein molecules in aqueous solution: Unity among diversity // *J. Chem. Sci.* 2012. Vol. 124, № 1. P. 317–325.
86. Fogarty A.C., Laage D. Water dynamics in protein hydration shells: the molecular origins of the dynamical perturbation // *J. Phys. Chem. B.* 2014. Vol. 118, № 28. P. 7715–7729.
87. Bizzarri A.R., Cannistraro S. Molecular dynamics of water at the protein– solvent interface // *J. Phys. Chem. B.* 2002. Vol. 106, № 26. P. 6617–6633.
88. Рубцова Е.В., Соловей А.Б., Лобышев В.И. Статистические характеристики гидратных оболочек белков. Компьютерное моделирование // *Вестник Московского университета. Серия 3. Физика. Астрономия.* 2015. № 5. С. 33–38.
89. Рубцова Е.В., Соловей А.Б., Лобышев В.И. Распределение внутренних параметров структуры гидратной оболочки белков // *Биофизика.* 2014. Том 59, № 6. С. 1071–1078.
90. Rupley J.A., Careri G. Protein hydration and function // *Advances in Protein Chemistry.* 1991. Vol. 41, № C. P. 37–172.
91. Bellissent-Funel M., Hassanali A., Havenith M., Henchman R., Pohl P., Sterpone F., van der Spoel D., Xu Y., Garcia, A.E. Water determines the structure and dynamics of proteins // *Chem. Rev.* 2016. Vol. 116, № 13. P. 7673–7697.
92. Charkhesht A., Regmi C.K., Mitchell-Koch K.R., Cheng S., Vinh N.Q. High-precision megahertz-to-terahertz dielectric spectroscopy of protein collective motions and hydration dynamics // *J. Phys. Chem. B.* 2018. Vol. 122, № 24. P. 6341–6350.
93. Halle B., Davidovic M. Biomolecular hydration: From water dynamics to hydrodynamics //

- Proc. Natl. Acad. Sci. 2003. Vol. 100, № 21. P. 12135–12140.
94. Frauenfelder H., Fenimore P.W., Chen G., McMahon B.H. Protein folding is slaved to solvent motions // Proc. Natl. Acad. Sci. 2006. Vol. 103, № 42. P. 15469–15472.
 95. Qin Y., Wang L., Zhong D. Dynamics and mechanism of ultrafast water–protein interactions // Proc. Nat. Acad. Sci. 2016. Vol. 113, № 30. P. 8424–8429.
 96. Suzuki M., Shigematsu J., Kodama T. Hydration study of proteins in solution by microwave dielectric analysis // J. Phys. Chem. 1996. Vol. 100, № 17. P. 7279–7282.
 97. Yokoyama K., Kamei T., Minami H., Suzuki M. Hydration study of globular proteins by microwave dielectric spectroscopy // J. Phys. Chem. B. 2001. Vol. 105, № 50. P. 12622–12627.
 98. Modig K., Liepinsh E., Otting G., Halle B. Dynamics of protein and peptide hydration // J. Am. Chem. Soc. 2004. Vol. 126, № 1. P. 102–114.
 99. Nandi N., Bagchi B. Anomalous dielectric relaxation of aqueous protein solutions // J. Phys. Chem. A. 1998. Vol. 102, № 43. P. 8217–8221.
 100. Kabir S.R., Yokoyama K., Mihashi K., Kodama T., Suzuki M. Hyper-mobile water is induced around actin filaments // Biophys. J. 2003. Vol. 85, № 5. P. 3154–3161.
 101. Penkov N., Yashin V., Fesenko E., Manokhin A., Fesenko E. A study of the effect of a protein on the structure of water in solution using terahertz time-domain spectroscopy // Appl. Spectrosc. SAGE Publications Inc., 2018. Vol. 72, № 2. P. 257–267.
 102. Oleinikova A., Sasisanker P., Weingärtner H. What can really be learned from dielectric spectroscopy of protein solutions? A case study of ribonuclease A // J. Phys. Chem. B. 2004. Vol. 108, № 24. P. 8467–8474.
 103. Kaieda S., Halle B. Internal water and microsecond dynamics in myoglobin // J. Phys. Chem. B. 2013. Vol. 117, № 47. P. 14676–14687.
 104. Halle B. Water in biological systems: the NMR picture // Hydration Processes in Biology: Theoretical and Experimental Approaches. IOS Press / ed. Bellissent-Funel M.-C. Dordrecht, The Netherlands, 1999. Vol. 305. P. 233–249.
 105. Nandi N., Bhattacharyya K., Bagchi B. Dielectric relaxation and solvation dynamics of water in complex chemical and biological systems // Chem. Rev. 2000. Vol. 100, № 6. P. 2013–2046.
 106. Halle B., Denisov V.P. Water and monovalent ions in the minor groove of B-DNA oligonucleotides as seen by NMR // Biopolymers. 1998. Vol. 48, № 4. P. 210–233.
 107. Pal S., Maiti P.K., Bagchi B. Anisotropic and sub-diffusive water motion at the surface of DNA and of an anionic micelle CsPFO // J. Phys. Condens. Matter. 2005. Vol. 17, № 49. P. S4317–S4331.
 108. Saha D., Supekar S., Mukherjee A. Distribution of residence time of water around DNA base pairs: governing factors and the origin of heterogeneity // J. Phys. Chem. B. 2015. Vol. 119, № 34. P. 11371–11381.
 109. Falk M., Hartman K.A., Lord R.C. Hydration of deoxyribonucleic acid. I. A gravimetric study // J. Am. Chem. Soc. 1962. Vol. 84, № 20. P. 3843–3846.
 110. Falk M., Hartman K.A., Lord R.C. Hydration of deoxyribonucleic acid. II. An infrared study // J. Am. Chem. Soc. 1963. Vol. 85, № 4. P. 387–391.
 111. Falk M., Poole A.G., Goymour C.G. Infrared study of the state of water in the hydration shell of DNA // Can. J. Chem. 1970. Vol. 48, № 10. P. 1536–1542.
 112. Qian Y.Q., Otting G., Wuethrich K. NMR detection of hydration water in the intermolecular interface of a protein-DNA complex // J. Am. Chem. Soc. 1993. Vol. 115, № 3. P. 1189–1190.

113. Michalarias I., Gao X., Ford R.C., Li J. Recent progress on our understanding of water around biomolecules // *J. Mol. Liq.* 2005. Vol. 117, № 1–3. P. 107–116.
114. Chalikian T.V., Sarvazyan A.P., Plum G.E., Breslauer K.J. Influence of base composition, base sequence, and duplex structure on DNA hydration: apparent molar volumes and apparent molar adiabatic compressibilities of synthetic and natural DNA duplexes at 25⁰C // *Biochemistry.* 1994. Vol. 33, № 9. P. 2394–2401.
115. Duboué-Dijon E., Fogarty A.C., Hynes J.T., Laage D. Dynamical disorder in the DNA hydration shell // *J. Am. Chem. Soc.* 2016. Vol. 138, № 24. P. 7610–7620.
116. Schneider B., Patel K., Berman H.M. Hydration of the phosphate group in double-helical DNA // *Biophys. J.* 1998. Vol. 75, № 5. P. 2422–2434.
117. Furse K.E., Corcelli S.A. The dynamics of water at DNA interfaces: computational studies of hoechst 33258 bound to DNA // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. Vol. 130, № 39. P. 13103–13109.
118. Phan A.T., Leroy J.-L., Guéron M. Determination of the residence time of water molecules hydrating B' -DNA and B -DNA, by one-dimensional zero-enhancement nuclear overhauser effect spectroscopy // *J. Mol. Biol.* 1999. Vol. 286, № 2. P. 505–519.
119. Furse K.E., Corcelli S.A. Effects of an unnatural base pair replacement on the structure and dynamics of DNA and neighboring water and ions // *J. Phys. Chem. B.* 2010. Vol. 114, № 30. P. 9934–9945.
120. Saenger W., Hunter W.N., Kennard O. DNA conformation is determined by economics in the hydration of phosphate groups // *Nature.* 1986. Vol. 324, № 6095. P. 385–388.
121. Pal S., Maiti P.K., Bagchi B. Exploring DNA groove water dynamics through hydrogen bond lifetime and orientational relaxation // *J. Chem. Phys.* 2006. Vol. 125, № 23. P. 234903.
122. Denisov V.P., Carlström G., Venu K., Halle B. Kinetics of DNA hydration // *J. Mol. Biol.* 1997. Vol. 268, № 1. P. 118–136.
123. Jóhannesson H., Halle B. Minor groove hydration of DNA in solution: dependence on base composition and sequence // *J. Am. Chem. Soc.* 1998. Vol. 120, № 28. P. 6859–6870.
124. Zhou D., Bryant R.G. Water molecule binding and lifetimes on the DNA duplex d(CGCGAATTCGCG)₂ // *J. Biomol. NMR.* 1996. Vol. 8, № 1. P. 77–86.
125. Jana B., Pal S., Maiti P.K., Lin Sh.-T., Hynes J.T., Bagchi B. Entropy of water in the hydration layer of major and minor grooves of DNA // *J. Phys. Chem. B.* 2006. Vol. 110, № 39. P. 19611–19618.
126. Yonetani Y., Kono H. What determines water-bridge lifetimes at the surface of DNA? Insight from systematic molecular dynamics analysis of water kinetics for various DNA sequences // *Bioph. Chem.* 2012. Vol. 160, № 1. P. 54–61.
127. Kubinec M.G., Wemmer D.E. NMR evidence for DNA bound water in solution // *J. Am. Chem. Soc.* 1992. Vol. 114, № 22. P. 8739–8740.
128. Liepinsh E., Otting G., Wüthrich K. NMR observation of individual molecules of hydration water bound to DNA duplexes: direct evidence for a spine of hydration water present in aqueous solution // *Nucleic Acids Res.* 1992. Vol. 20, № 24. P. 6549–6553.
129. Vlieghe D., Turkenburg J.P., Van Meervelt L. B-DNA at atomic resolution reveals extended hydration patterns // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 1999. Vol. 55, № 9. P. 1495–1502.
130. Drew H.R., Dickerson R.E. Structure of a B-DNA dodecamer // *J. Mol. Biol.* 1981. Vol. 151, № 3. P. 535–556.
131. Kuwabara S., Umehara T., Mashimo S., Yagihara S. Dynamics and structure of water bound to

- DNA // *J. Phys. Chem.* 1988. Vol. 92, № 17. P. 4839–4841.
132. Mashimo S., Umehara T., Kuwabara S., Yagihara S. Dielectric study on dynamics and structure of water bound to DNA using a frequency range 107-1010 Hz // *J. Phys. Chem.* 1989. Vol. 93, № 12. P. 4963–4967.
 133. Westhof E., Dumas P., Moras D. Hydration of transfer RNA molecules: a crystallographic study // *Biochimie.* 1988. Vol. 70, № 2. P. 145–165.
 134. Olsen G.L., Bardaro M.F., Echodu D.C., Drobny G.P., Varani G. Hydration dependent dynamics in RNA // *J. Biomol. NMR.* 2009. Vol. 45, № 1–2. P. 133–142.
 135. Kirillova S., Carugo O. Hydration sites of unpaired RNA bases: a statistical analysis of the PDB structures // *BMC Struct. Biol.* 2011. Vol. 11, № 1. P. 41.
 136. Egli M., Portmann S., Usman N. RNA hydration: a detailed look // *Biochemistry.* 1996. Vol. 35, № 26. P. 8489–8494.
 137. Kundu A., Schauss J., Fingerhut B.P., Elsaesser Th. Change of hydration patterns upon RNA melting probed by excitations of phosphate backbone vibrations // *J. Phys. Chem. B.* 2020. Vol. 124, № 11. P. 2132–2138.
 138. Burnett G., Kennedy E.P. The enzymatic phosphorylation of proteins // *J. Biol. Chem.* 1954. Vol. 211, № 2. P. 969–980.
 139. Levy M., Ellington A.D. ATP-dependent allosteric DNA enzymes // *Chem. Biol.* 2002. Vol. 9, № 4. P. 417–426.
 140. Bauer C.B., Fonseca M.V., Holden H.M., Thoden J.B., Thompson Th.B., Escalante-Semerena J.C., Rayment I. Three-dimensional structure of ATP: corrinoid adenosyltransferase from *Salmonella typhimurium* in its free state, complexed with MgATP, or complexed with hydroxycobalamin and MgATP // *Biochemistry.* 2001. Vol. 40, № 2. P. 361–374.
 141. Gordon J.L. Extracellular ATP: effects, sources and fate // *Biochem. J.* 1986. Vol. 233, № 2. P. 309–319.
 142. Surprenant A., Evans R.J. ATP in synapses // *Nature.* 1993. Vol. 362, № 6417. P. 211–212.
 143. Meurer F., Do H.T., Sadowski G., Held C. Standard Gibbs energy of metabolic reactions: II. Glucose-6-phosphatase reaction and ATP hydrolysis // *Biophys. Chem.* 2017. Vol. 223. P. 30–38.
 144. George P., Witonsky R. J., Trachtman M., Wu C., Dorwart W., Richman L., Richman W., Shurayh F., Lentz B. “Squiggle-H₂O”. An enquiry into the importance of solvation effects in phosphate ester and anhydride reactions // *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1970. Vol. 223, № 1. P. 1–15.
 145. Hofmann K.P., Zundel G. Large hydration structure changes on hydrolysing ATP // *Experientia.* 1974. Vol. 30, № 2. P. 139–140.
 146. Akola J., Jones R.O. ATP hydrolysis in water – a density functional study // *J. Phys. Chem. B.* 2003. Vol. 107, № 42. P. 11774–11783.
 147. Liao J.C., Sun S., Chandler D.O.G. The conformational states of Mg·ATP in water. // *Eur. Biophys. J.* 2004. Vol. 33, № 1. P. 29–37.
 148. Mogami G., Wazawa T., Morimoto N., Kodama T., Suzuki M. Hydration properties of adenosine phosphate series as studied by microwave dielectric spectroscopy // *Biophys. Chem.* 2011. Vol. 154, № 1. P. 1–7.
 149. Puzenko A., Levy E., Shendrik A., Talary M.S., Caduff A., Feldman Y. Dielectric spectra broadening as a signature for dipole-matrix interaction. III. Water in adenosine monophosphate/adenosine-5' -triphosphate solutions // *J. Chem. Phys.* 2012. Vol. 137, № 19. P.

- 194502.
150. Faizullin D., Zakharchenko N., Zuev Y., Puzenko A., Levy E., Feldman Y. Hydration of AMP and ATP molecules in aqueous solution and solid films // *Int. J. Mol. Sci.* 2013. Vol. 14, № 11. P. 22876–22890.
 151. Suzuki M. What is “hypermobile” water?: detected in alkali halide, adenosine phosphate, and F-actin solutions by high-resolution microwave dielectric spectroscopy // *Pure Appl. Chem.* 2014. Vol. 86, № 2. P. 181–189.
 152. Sohrabi-Mahboub M., Jahangiri S., Farrokhpour H. Molecular dynamics simulation of the hydration of adenosine phosphates // *J. Mol. Liq.* 2019. Vol. 283. P. 359–365.
 153. Tulub A.A., Stefanov V.E. The effect of the oxidative properties of [Mg(H₂O)₆] in the triplet and singlet states on the energetics of adenosine triphosphate cleavage // *Russ. J. Inorg. Chem.* 2009. Vol. 54, № 7. P. 1127–1134.
 154. Wang C., Huang W., Liao J.-L. QM/MM investigation of ATP hydrolysis in aqueous solution // *J. Phys. Chem. B.* 2015. Vol. 119, № 9. P. 3720–3726.
 155. Penkov N.V., Penkova N. Key differences of the hydrate shell structures of ATP and Mg-ATP revealed by terahertz time-domain spectroscopy and dynamic light scattering // *J. Phys. Chem. B.* 2021. Vol. 125, № 17. P. 4375–4382.
 156. Berkowitz M.L., Bostick D.L., Pandit S. Aqueous solutions next to phospholipid membrane surfaces: insights from simulations // *Chem. Rev.* 2006. Vol. 106, № 4. P. 1527–1539.
 157. Berkowitz M.L., Vácha R. Aqueous solutions at the interface with phospholipid bilayers // *Acc. Chem. Res.* 2012. Vol. 45, № 1. P. 74–82.
 158. Gruenbaum S.M., Skinner J.L. Vibrational spectroscopy of water in hydrated lipid multi-bilayers. I. Infrared spectra and ultrafast pump-probe observables // *J. Chem. Phys.* 2011. Vol. 135, № 7. P. 075101.
 159. Gruenbaum S.M., Pieniazek P.A., Skinner J.L. Vibrational spectroscopy of water in hydrated lipid multi-bilayers. II. Two-dimensional infrared and peak shift observables within different theoretical approximations // *J. Chem. Phys.* 2011. Vol. 135, № 16. P. 164506.
 160. Roy S., Gruenbaum S.M., Skinner J.L. Theoretical vibrational sum-frequency generation spectroscopy of water near lipid and surfactant monolayer interfaces. II. Two-dimensional spectra // *J. Chem. Phys.* 2014. Vol. 141, № 22. P. 22D505.
 161. Zhao W., Moilanen D.E., Fenn E.E., Fayer M.D. Water at the surfaces of aligned phospholipid multibilayer model membranes probed with ultrafast vibrational spectroscopy // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. Vol. 130, № 42. P. 13927–13937.
 162. Pasenkiewicz-Gierula M., Takaoka Y., Miyagawa H., Kitamura K., Kusumi A. Hydrogen bonding of water to phosphatidylcholine in the membrane as studied by a molecular dynamics simulation: location, geometry, and lipid–lipid bridging via hydrogen-bonded water // *J. Phys. Chem. A.* 1997. Vol. 101, № 20. P. 3677–3691.
 163. Jurkiewicz P., Cwiklik L., Jungwirth P., Hof M. Lipid hydration and mobility: an interplay between fluorescence solvent relaxation experiments and molecular dynamics simulations // *Biochimie.* 2012. Vol. 94, № 1. P. 26–32.
 164. Parasassi T., Krasnowska E.K., Bagatolli L., Gratton E. Laurdan and prodan as polarity-sensitive fluorescent membrane probes // *J. Fluoresc.* 1998. Vol. 8, № 4. P. 365–373.
 165. Lewis R.N., McElhaney R.N., Pohle W., Mantsch H.H. Components of the carbonyl stretching band in the infrared spectra of hydrated 1,2-diacylglycerolipid bilayers: a reevaluation // *Biophys. J.* 1994. Vol. 67, № 6. P. 2367–2375.

166. Zhang Z., Berkowitz M.L. Orientational dynamics of water in phospholipid bilayers with different hydration levels // *J. Phys. Chem. B*. 2009. Vol. 113, № 21. P. 7676–7680.
167. Tielrooij K.J., Paparo D., Piatkowski L., Bakker H.J., Bonn M. Dielectric relaxation dynamics of water in model membranes probed by terahertz spectroscopy // *Biophys. J.* 2009. Vol. 97, № 9. P. 2484–2492.
168. Gruenbaum S.M., Skinner J.L. Vibrational spectroscopy of water in hydrated lipid multi-bilayers. III. Water clustering and vibrational energy transfer // *J. Chem. Phys.* 2013. Vol. 139, № 17. P. 175103.
169. Piatkowski L., de Heij J., Bakker H.J. Probing the distribution of water molecules hydrating lipid membranes with ultrafast Förster vibrational energy transfer // *J. Phys. Chem. B*. 2013. Vol. 117, № 5. P. 1367–1377.
170. Salvador-Castell M., Demé, B., Oger Ph., Peters J. Structural characterization of an archaeal lipid bilayer as a function of hydration and temperature // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. Vol. 21, № 5. P. 1816.
171. Tarun O.B., Hanneschläger C., Pohl P., Roke S. Label-free and charge-sensitive dynamic imaging of lipid membrane hydration on millisecond time scales // *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2018. Vol. 115, № 16. P. 4081–4086.
172. Berntsen P., Svanberg C., Swenson J. Interplay between hydration water and headgroup dynamics in lipid bilayers // *J. Phys. Chem. B*. 2011. Vol. 115, № 8. P. 1825–1832.
173. Yamamoto N., Andachi T., Tamura A., Tominaga K. Temperature and hydration dependence of low-frequency spectra of lipid bilayers studied by terahertz time-domain spectroscopy // *J. Phys. Chem. B*. 2015. Vol. 119, № 29. P. 9359–9368.
174. Tiwari N., Rai R., Sinha N. Water-lipid interactions in native bone by high-resolution solid-state NMR spectroscopy // *Solid State Nucl. Magn. Reson.* 2020. Vol. 107. P. 101666.
175. Binder H. Water near lipid membranes as seen by infrared spectroscopy // *Eur. Biophys. J.* 2007. Vol. 36, № 4–5. P. 265–279.
176. Scatchard G. The hydration of sucrose in water solution as calculated from vapor-pressure measurements // *J. Am. Chem. Soc.* 1921. Vol. 43, № 11. P. 2406–2418.
177. Sato Y., Miyawaki O. Analysis of hydration parameter for sugars determined from viscosity and its relationship with solution parameters // *Food Chem.* 2016. Vol. 190. P. 594–598.
178. Singh A.K., Morales J.A., Estrada N.A., Rodriguebz S.J.V., Castro-Camus E. Terahertz hydration dynamics in aqueous polysaccharides // 43rd International Conference on Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves (IRMMW-THz). IEEE, 2018. Vol. 2018-Sept. P. 1–2.
179. Shiraga K., Adachi A., Nakamura M., Tajima T., Ajito K., Ogawa Y. Characterization of the hydrogen-bond network of water around sucrose and trehalose: Microwave and terahertz spectroscopic study // *J. Chem. Phys.* 2017. Vol. 146, № 10. P. 105102.
180. Suggett A., Clark A.H. Molecular motion and interactions in aqueous carbohydrate solutions. I. Dielectric-relaxation studies // *J. Solut. Chem.* 1976. Vol. 5, № 1. P. 1–15.
181. Engelsen S. The hydration of sucrose // *Carbohydr. Res.* 1996. Vol. 292, № 1. P. 21–38.
182. Di Bari M., Cavatorta F., Deriu A., Albanese G. Mean square fluctuations of hydrogen atoms and water-biopolymer interactions in hydrated saccharides // *Biophys. J.* 2001. Vol. 81, № 2. P. 1190–1194.
183. Di Bari M., Deriu A., Albanese G., Cavatorta F. Dynamics of hydrated starch saccharides // *J. Chem. Phys.* 2003. Vol. 292, № 2–3. P. 333–339.
184. Aeberhardt K., Laumer J., Bouquerand P., Normand V. Ultrasonic wave spectroscopy study of

- sugar oligomers and polysaccharides in aqueous solutions: the hydration length concept // *Int. J. Biol. Macromol.* 2005. Vol. 36, № 5. P. 275–282.
185. Despond S., Espuche E., Cartier N., Domard A. Hydration mechanism of polysaccharides: a comparative study // *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* 2005. Vol. 43, № 1. P. 48–58.
 186. Heugen U., Schwaab G., Brundermann E., Heyden M., Yu X., Leitner D.M., Havenith M. Solute-induced retardation of water dynamics probed directly by terahertz spectroscopy // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2006. Vol. 103, № 33. P. 12301–12306.
 187. Lupi L., Comez L., Paolantoni M., Perticaroli S., Sassi P., Morresi A., Ladanyi B.M., Fioretto D. Hydration and aggregation in mono- and disaccharide aqueous solutions by gigahertz-to-terahertz light scattering and molecular dynamics simulations // *J. Phys. Chem. B.* 2012. Vol. 116, № 51. P. 14760–14767.
 188. Hunger J., Bernecker A., Bakker H.J., Bonn M., Richter R.P. Hydration dynamics of hyaluronan and dextran // *Biophys. J.* 2012. Vol. 103, № 1. P. L10–L12.
 189. Chen C., Li W.Z., Song Y.C., Weng L.D., Zhang N. Formation of water and glucose clusters by hydrogen bonds in glucose aqueous solutions // *Comput. Theor. Chem.* 2012. Vol. 984. P. 85–92.
 190. Mlčoch T., Kučerík J. Hydration and drying of various polysaccharides studied using DSC // *J. Therm. Anal. Calorim.* 2013. Vol. 113, № 3. P. 1177–1185.
 191. Grossutti M., Dutcher J.R. Hydration water structure, hydration forces, and mechanical properties of polysaccharide films // *Biomacromolecules.* 2020. Vol. 21, № 12. P. 4871–4877.
 192. Arikawa T., Nagai M., Tanaka K. Characterizing hydration state in solution using terahertz time-domain attenuated total reflection spectroscopy // *Chem. Phys. Lett.* 2008. Vol. 457, № 1–3. P. 12–17.
 193. Grossutti M., Dutcher J.R. Correlation between chain architecture and hydration water structure in polysaccharides // *Biomacromolecules.* 2016. Vol. 17, № 3. P. 1198–1204.
 194. Lerbret A., Bordat P., Affouard F., Descamps M., Migliardo F. How homogeneous are the trehalose, maltose, and sucrose water solutions? An insight from molecular dynamics simulations // *J. Phys. Chem. B.* 2005. Vol. 109, № 21. P. 11046–11057.
 195. Gharsallaoui A., Rogé B., Génotelle J., Mathlouthi M. Relationships between hydration number, water activity and density of aqueous sugar solutions // *Food Chem.* 2008. Vol. 106, № 4. P. 1443–1453.
 196. Starzak M., Mathlouthi M. Temperature dependence of water activity in aqueous solutions of sucrose // *Food Chem.* 2006. Vol. 96, № 3. P. 346–370.
 197. Holder G.M., Bowfield A., Surman M., Suepfle M., Moss D., Tucker C., Rudd T.R., Fernig D.G., Yates E.A., Weightman P. Fundamental differences in model cell-surface polysaccharides revealed by complementary optical and spectroscopic techniques // *Soft Matter.* 2012. Vol. 8, № 24. P. 6521–6527.
 198. Haxaire K., Maréchal Y., Milas M., Rinaudo M. Hydration of polysaccharide hyaluronan observed by IR spectrometry. I. Preliminary experiments and band assignments // *Biopolymers.* 2003. Vol. 72, № 1. P. 10–20.
 199. Ryden P., MacDougall A.J., Tibbits C.W., Ring S.G. Hydration of pectic polysaccharides // *Biopolymers.* 2000. Vol. 54, № 6. P. 398–405.
 200. Ishimura M., Uedaira H. Natural-abundance oxygen-17 magnetic relaxation in aqueous solutions of apolar amino acids and glycine peptides // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1990. Vol. 63, № 1. P. 1–5.

201. Lee S.L., Debenedetti P.G., Errington J.R. A computational study of hydration, solution structure, and dynamics in dilute carbohydrate solutions // *J. Chem. Phys.* 2005. Vol. 122, № 20. P. 204511.
202. Magazù S., Migliardo F., Telling M.T.F. Structural and dynamical properties of water in sugar mixtures // *Food Chem.* 2008. Vol. 106, № 4. P. 1460–1466.
203. Levy E., Puzenko A., Kaatze U., Ishai P.B., Feldman Y. Dielectric spectra broadening as the signature of dipole-matrix interaction. I. Water in nonionic solutions // *J. Chem. Phys.* 2012. Vol. 136, № 11. P. 114502.
204. Fuchs K., Kaatze U. Molecular dynamics of carbohydrate aqueous solutions. dielectric relaxation as a function of glucose and fructose concentration // *J. Phys. Chem. B.* 2001. Vol. 105, № 10. P. 2036–2042.
205. Mashimo S., Miura N., Umehara T. The structure of water determined by microwave dielectric study on water mixtures with glucose, polysaccharides, and L -ascorbic acid // *J. Chem. Phys.* 1992. Vol. 97, № 9. P. 6759–6765.
206. Behrends R., Kaatze U. Molecular dynamics and conformational kinetics of mono- and disaccharides in aqueous solution // *Chem.Phys.Chem.* 2005. Vol. 6, № 6. P. 1133–1145.
207. Sudo S. Dielectric properties of the free water in hydroxypropyl cellulose // *J. Phys. Chem. B.* 2011. Vol. 115, № 1. P. 2–6.
208. Shikata T., Takahashi R., Satokawa Y. Hydration and dynamic behavior of cyclodextrins in aqueous solution // *J. Phys. Chem. B.* 2007. Vol. 111, № 42. P. 12239–12247.
209. Kishikawa Y., Seki Y., Shingai K., Kita R., Shinyashiki N., Yagihara S. Dielectric relaxation for studying molecular dynamics of pullulan in water // *J. Phys. Chem. B.* 2013. Vol. 117, № 30. P. 9034–9041.
210. Yoshiba K., Teramoto A., Nakamura N., Shikata T., Miyazaki Y., Sorai M., Hayashi Y., Miura N. Water structures of differing order and mobility in aqueous solutions of schizophyllan, a triple-helical polysaccharide as revealed by dielectric dispersion measurements // *Biomacromolecules.* 2004. Vol. 5, № 6. P. 2137–2146.
211. Galema S.A., Blandamer M.J., Engberts J.B.F.N. Stereochemical aspects of hydration of carbohydrates in aqueous solutions. 2. Kinetic medium effects // *J. Org. Chem.* 1992. Vol. 57, № 7. P. 1995–2001.
212. Hoiland H., Holvik H. Partial molal volumes and compressibilities of carbohydrates in water // *J. Solution Chem.* 1978. Vol. 7, № 8. P. 587–596.
213. Galema S.A., Blandamer M.J., Engberts J.B.F.N. Stereochemical aspects of the hydration of carbohydrates. Kinetic medium effects of monosaccharides on a water-catalyzed hydrolysis reaction // *J. Am. Chem. Soc.* 1990. Vol. 112, № 26. P. 9665–9666.
214. Galema S.A., Hoiland H. Stereochemical aspects of hydration of carbohydrates in aqueous solutions. 3. Density and ultrasound measurements // *J. Phys. Chem.* 1991. Vol. 95, № 13. P. 5321–5326.
215. Sato Y., Miyawaki O. Relationship between proton NMR relaxation time and viscosity of saccharide solutions. // *Food Sci. Technol. Res.* 2000. Vol. 6, № 2. P. 136–139.
216. Branca C., Magazù S., Migliardo F., Migliardo P. Destructuring effect of trehalose on the tetrahedral network of water: a Raman and neutron diffraction comparison // *Phys. A Stat. Mech. its Appl.* 2002. Vol. 304, № 1–2. P. 314–318.
217. Heyden M., Bründermann E., Heugen U., Niehues G., Leitner D.M., Havenith M. Long-range influence of carbohydrates on the solvation dynamics of water—answers from terahertz absorption measurements and molecular modeling simulations // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. Vol.

- 130, № 17. P. 5773–5779.
218. Magazu S., Maisano G., Middendorf H.D., Migliardo P., Musolino A.M., Villari V. α,α -Trehalose–water solutions. II. Influence of hydrogen bond connectivity on transport properties // *J. Phys. Chem. B*. 1998. Vol. 102, № 11. P. 2060–2063.
 219. Branca C., Magazù S., Maisano G., Migliardo F., Migliardo P., Romeo G. α,α -Trehalose/Water solutions. 5. Hydration and viscosity in dilute and semidilute disaccharide solutions // *J. Phys. Chem. B*. 2001. Vol. 105, № 41. P. 10140–10145.
 220. Ebbinghaus S., Kim S.J., Heyden M., Yu X., Heugen U., Gruebele M., Leitner D.M., Havenith M. An extended dynamical hydration shell around proteins // *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2007. Vol. 104, № 52. P. 20749–20752.
 221. Bye J.W., Meliga S., Ferachou D., Cinque G., Zeitler J.A., Falconer R.J. Analysis of the hydration water around bovine serum albumin using terahertz coherent synchrotron radiation // *J. Phys. Chem. A*. 2014. Vol. 118, № 1. P. 83–88.
 222. Heyden M., Tobias D.J., Matyushov D. V. Terahertz absorption of dilute aqueous solutions // *J. Chem. Phys.* 2012. Vol. 137, № 23. P. 235103.
 223. Meister K., Ebbinghaus S., Xu Y., Duman J.G., DeVries A., Gruebele M., Leitner D.M., Havenith M. Long-range protein-water dynamics in hyperactive insect antifreeze proteins // *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2013. Vol. 110, № 5. P. 1617–1622.
 224. Nibali V.C., Havenith M. New insights into the role of water in biological function: terahertz absorption spectroscopy and molecular dynamics simulations studies of the solvation dynamics of biomolecules // *J. Am. Chem. Soc.* 2014. Vol. 136. P. 12800–12807.
 225. Xu Y., Bäumer A., Meister K., Bischak C.G., DeVries A.L., Leitner D.M., Havenith M. Protein–water dynamics in antifreeze protein III activity // *Chem. Phys. Lett.* 2016. Vol. 647. P. 1–6.
 226. Rothschild L.J., Mancinelli R.L. Life in extreme environments // *Nature*. 2001. Vol. 409, № 6823. P. 1092–1101.
 227. Falk M., Hartman K.A., Lord R.C. Hydration of deoxyribonucleic acid. III. A spectroscopic study of the effect of hydration on the structure of deoxyribonucleic acid // *J. Am. Chem. Soc.* 1963. Vol. 85, № 4. P. 391–394.
 228. Lindsay S.M., Lee S.A., Powell J.W., Weidlich T., Demarco C., Lewen G.D., Tao N.J., Rupprecht A. The origin of the A to B transition in DNA fibers and films // *Biopolymers*. 1988. Vol. 27, № 6. P. 1015–1043.
 229. Lavallo N., Lee S.A., Rupprecht A. Counterion effects on the physical properties and the A to B transition of calf-thymus DNA films // *Biopolymers*. 1990. Vol. 30, № 9–10. P. 877–887.
 230. Sugawara Y., Kamiya N., Iwasaki H., Ito T., Satow Y. Humidity-controlled reversible structure transition of disodium adenosine 5'-triphosphate between dihydrate and trihydrate in a single crystal state // *J. Am. Chem. Soc.* 1991. Vol. 113, № 14. P. 5440–5445.
 231. Koynova R., Caffrey M. Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines // *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* 1998. Vol. 1376, № 1. P. 91–145.
 232. Koynova R., Tenchov B. Phase transitions and phase behavior of lipids // *Encyclopedia of Biophysics*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. P. 1841–1854.
 233. Walde P., Giuliani A.M., Boicelli C.A., Luisi P.L. Phospholipid-based reverse micelles // *Chemi. Phys. Lipids*. 1990. Vol. 53, № 4. P. 265–288.
 234. Belosludtsev K.N., Penkov N.V., Tenkov K.S., Talanov E.Yu., Belosludtseva N.V., Agafonov A.V., Stepanova A.E., Starinets V.S., Vashchenko O.V., Gudkov S.V., Dubinin M.V.

- Interaction of the anti-tuberculous drug bedaquiline with artificial membranes and rat erythrocytes // *Chem.-Biol. Interact.* 2019. Vol. 299. P. 8–14.
235. Le-Deygen I.M., Skuredina A.A., Safronova A.S., Yakimov I.D., Kolmogorov I.M., Deygen D.M., Burova T.V., Grinberg N.V., Grinberg V.Y., Kudryashova E.V. Moxifloxacin interacts with lipid bilayer, causing dramatic changes in its structure and phase transitions // *Chem. Phys. Lipids.* 2020. Vol. 228. P. 104891.
236. Yaroslavov A.A., Efimova A.A., Kabanov V.A., Lobyshev V.I. Reversibility of structural rearrangements in the negative vesicular membrane upon electrostatic adsorption/desorption of the polycation // *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 2002. Vol. 1560, № 1–2. P. 14–24.
237. Kauzmann W. Some factors in the interpretation of protein denaturation // *Advances in Protein Chemistry.* 1959. Vol. 14, № C. P. 1–63.
238. Baldwin R.L. Dynamic hydration shell restores Kauzmann's 1959 explanation of how the hydrophobic factor drives protein folding // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2014. Vol. 111, № 36. P. 13052–13056.
239. Aznauryan M., Nettels D., Holla A., Hofmann H., Schuler B. Single-molecule spectroscopy of cold denaturation and the temperature-induced collapse of unfolded proteins // *J. Am. Chem. Soc.* 2013. Vol. 135, № 38. P. 14040–14043.
240. Makhatadze G.I., Privalov P.L. Contribution of hydration to protein folding thermodynamics // *J. Mol. Biol.* 1993. Vol. 232, № 2. P. 639–659.
241. Privalov P.L., Makhatadze G.I. Contribution of hydration to protein folding thermodynamics // *J. Mol. Biol.* 1993. Vol. 232, № 2. P. 660–679.
242. Levy Y., Onuchic J.N. Water and proteins: a love-hate relationship // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004. Vol. 101, № 10. P. 3325–3326.
243. Tanford C., Buzzell J.G. The viscosity of aqueous solutions of bovine serum albumin between pH 4.3 and 10.5. // *J. Phys. Chem.* 1956. Vol. 60, № 2. P. 225–231.
244. Foster J.F. Some aspects of the structure and conformational properties of serum albumin // *Albumin: Structure, Function and Uses.* Elsevier, 1977. P. 53–84.
245. Cao X.-L., Li H.-W., Yue Y., Wu Y. pH-induced conformational changes of BSA in fluorescent AuNCs@BSA and its effects on NCs emission // *Vib. Spectrosc.* 2013. Vol. 65. P. 186–192.
246. Guo M.Q., Hu X., Wang C., Ai L. Polysaccharides: structure and solubility // *Solubility of Polysaccharides.* InTech, 2017. P. 138.
247. Wang S., Li C., Copeland L., Niu Q., Wang S. Starch retrogradation: a comprehensive review // *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2015. Vol. 14, № 5. P. 568–585.
248. Mathlouthi M. X-ray diffraction study of the molecular association in aqueous solutions of d-fructose, d-glucose, and sucrose // *Carbohydr. Res.* 1981. Vol. 91, № 2. P. 113–123.
249. Immel S., Lichtenthaler F.W. Molecular modeling of saccharides. 7. The conformation of sucrose in water: a molecular dynamics approach // *Liebigs Ann.* 1995. Vol. 1995, № 11. P. 1925–1937.
250. Chen C., Li W.Z., Song Y. C., Yang J. Hydrogen bonding analysis of glycerol aqueous solutions: a molecular dynamics simulation study // *J. Mol. Liq.* 2009. Vol. 146, № 1–2. P. 23–28.
251. Belitz H.-D., Grosch W. *Carbohydrates* // *Food chemistry.* 1st ed. / ed. Belitz H.-D., Grosch W. Springer, 1987. P. 201–256.
252. Sprague-Piercy M.A., Wong E., Roskamp K.W., Fakhoury J.N., Freites J.A., Tobias D.J., Martin R.W. Human α B-crystallin discriminates between aggregation-prone and function-

- preserving variants of a client protein // *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 2020. Vol. 1864, № 3. P. 129502.
253. Zhang J., Topp E.M. Protein G, protein A and protein A-derived peptides inhibit the agitation induced aggregation of IgG // *Mol. Pharm.* 2012. Vol. 9, № 3. P. 622–628.
254. Kim N., Hada S., Thapa R., Jeong S.H. Arginine as a protein stabilizer and destabilizer in liquid formulations // *Int. J. Pharm.* 2016. Vol. 513, № 1–2. P. 26–37.
255. Patel T.R., Bernards C., Meier M., McEleney K., Winzor D.J., Koch M., Stetefeld J. Structural elucidation of full-length nidogen and the laminin–nidogen complex in solution // *Matrix Biol.* 2014. Vol. 33. P. 60–67.
256. Berthelot K., Lecomte S., Estevez Y., Couлары-Salin B., Bentaleb A., Cullin Ch., Deffieu A., Peruch F. Rubber elongation factor (REF), a major allergen component in hevea brasiliensis latex has amyloid properties // *PLoS One* / ed. Mitraki A. 2012. Vol. 7, № 10. P. e48065.
257. Gonzalez S., Gallier F., Kellouche S., Carreiras F., Novellino E., Carotenuto A., Chassaing G., Rovero P., Uziel J., Lubin-Germain N. Studies of membranotropic and fusogenic activity of two putative HCV fusion peptides // *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 2019. Vol. 1861, № 1. P. 50–61.
258. de Lange N., Leermakers F.A.M., Kleijn J.M. Self-limiting aggregation of phospholipid vesicles // *Soft Matter.* 2020. Vol. 16, № 9. P. 2379–2389.
259. Ertel A., Marangoni A.G., Marsh J., Hallett F.R., Wood J.M. Mechanical properties of vesicles. I. Coordinated analysis of osmotic swelling and lysis // *Biophys. J.* 1993. Vol. 64, № 2. P. 426–434.
260. Lichtenberg D., Ahyayauch H., Goñi F.M. The mechanism of detergent solubilization of lipid bilayers // *Biophys. J.* 2013. Vol. 105, № 2. P. 289–299.
261. Sigel H. Isomeric equilibria in complexes of adenosine 5'-triphosphate with divalent metal ions. Solution structures of M(ATP)₂- complexes // *Eur. J. Biochem.* 1987. Vol. 165, № 1. P. 65–72.
262. Raszka M., Kaplan N.O. Association by hydrogen bonding of mononucleotides in aqueous solution // *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1972. Vol. 69, № 8. P. 2025–2029.
263. Kimura T., Horiuchi K., Kurita K., Ono T., Yoshizawa H., Fujisato T., Kishida A. Characteristics of compacted plasmid DNA by high pressurization // *Nucleic Acids Symp. Ser.* 2007. Vol. 51, № 1. P. 343–344.
264. Donnamaria M.C., Howard E.I., Grigera J.R. Interaction of water with α,α -trehalose in solution: molecular dynamics simulation approach // *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 1994. Vol. 90, № 18. P. 2731–2735.
265. Lichtenthaler F.W., Peters S. Carbohydrates as green raw materials for the chemical industry // *Comptes Rendus Chim.* 2004. Vol. 7, № 2. P. 65–90.
266. Sarimov R.M., Binhi V.N., Matveeva T.A., Penkov N.V., Gudkov S.V. Unfolding and aggregation of lysozyme under the combined action of dithiothreitol and guanidine hydrochloride: optical studies // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22, № 5. P. 2710.
267. Yakupova E.I., Vikhlyantsev I.M., Bobyleva L.G., Penkov N.V., Timchenko A.A., Timchenko M.A., Enin G.A., Khutuzian S.S., Selivanova O.M., Bobylev A.G. Different amyloid aggregation of smooth muscles titin in vitro // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2018. Vol. 36, № 9. P. 2237–2248.
268. Mendez R., Banerjee S. Sonication-based basic protocol for liposome synthesis // *Methods in Molecular Biology.* 2017. P. 255–260.
269. Hansen S. Translational friction coefficients for cylinders of arbitrary axial ratios estimated by Monte Carlo simulation // *J. Chem. Phys.* 2004. Vol. 121, № 18. P. 9111–9115.

270. Bunkin N.F., Bunkin F.V. The new concepts in the optical breakdown of transparent liquids // *Laser Phys.* 1993. Vol. 3, № 1. P. 63–78.
271. Бункин Н.Ф., Бункин Ф.В. Бабстоны: стабильные микроскопические газовые пузыри в сильно разбавленных растворах электролитов // *ЖЭТФ.* 1992. Том 101. С. 512–527.
272. Bunkin N.F., Lobeyev A.V., Lyakhov G.A., Ninham B.W. Mechanism of low-threshold hypersonic cavitation stimulated by broadband laser pump // *Phys. Rev. E.* 1999. Vol. 60, № 2. P. 1681–1690.
273. Bunkin N.F., Ninham B.W., Babenko V.A., Suyazov N.V., Sychev A.A. Role of dissolved gas in optical breakdown of water: differences between effects due to helium and other gases // *J. Phys. Chem. B.* 2010. Vol. 114, № 23. P. 7743–7752.
274. Bunkin N.F., Shkirin A.V., Suyazov N.V., Babenko V.A., Sychev A.A., Penkov N.V., Belosludtsev K.N., Gudkov S.V. Formation and dynamics of ion-stabilized gas nanobubble phase in the bulk of aqueous NaCl solutions // *J. Phys. Chem. B.* 2016. Vol. 120, № 7. P. 1291–1303.
275. Bunkin N.F., Shkirin A.V., Penkov N.V., Goltayev M.V., Ignatiev P.S., Gudkov S.V., Izmailov A.Yu. Effect of gas type and its pressure on nanobubble generation // *Front. Chem.* 2021. Vol. 9. P. 630074.
276. Konovalov A.I., Ryzhkina I.S., Murtazina L.I., Kiseleva Y.V. Forming the nanosized molecular assemblies (nanoassociates) is a key to understand the properties of highly diluted aqueous solutions // *Biophys. (Russian Fed.).* 2014. Vol. 59, № 3. P. 421–427.
277. Рыжкина И.С., Муртазина Л.И., Киселева Ю.В., Коновалов А.И. Свойства супрамолекулярных наноассоциатов, образующихся в водных растворах низких и сверхнизких концентраций биологически активных веществ // *Доклады Академии наук.* 2009. Том 428, № 4. С. 487–491.
278. Бункин Н.Ф., Бункин Ф.В. Бабстонная структура воды и водных растворов электролитов // *УФН.* 2016. Том 86, № 9. С. 933–952.
279. Тытик Д.Л., Бусев С.А., Высоцкий В.В., Ревина А.А., Суворова О.В., Кузьмин В.И., Гадзаов А.Ф. Эффект рассеяния ультрафиолетового излучения деионизованной водой // *Журнал физической химии.* 2019. Том 93, № 12. С. 1865–1869.
280. Бункин Н.Ф., Виноградова О.И., Куклин А.И., Лобеев А.В., Мовчан Т.Г. К вопросу о наличии воздушных субмикрпузырей в воде; эксперимент по малоугловому рассеянию нейтронов // *Письма в ЖЭТФ.* 1995. Том 62, № 8. С. 659–662.
281. Yurchenko S.O., Shkirin A.V., Ninham B.W., Sychev A.A., Babenko V.A., Penkov N.V., Kryuchkov N.P., Bunkin N.F. Ion-specific and thermal effects in the stabilization of the gas nanobubble phase in bulk aqueous electrolyte solutions // *Langmuir.* 2016. Vol. 32, № 43. P. 11245–11255.
282. Bunkin N.F., Suyazov N.V., Shkirin A.V., Ignatiev P.S., Indukaev K.V. Nanoscale structure of dissolved air bubbles in water as studied by measuring the elements of the scattering matrix // *J. Chem. Phys.* 2009. Vol. 130, № 13. P. 134308.
283. Bunkin N.F., Suyazov N.V., Shkirin A.V., Ignat'ev P.S., Indukaev K.V. Cluster structure of stable dissolved gas nanobubbles in highly purified water // *J. Exp. Theor. Phys.* 2009. Vol. 108, № 5. P. 800–816.
284. Bunkin N.F., Ninham B.W., Ignatiev P.S., Kozlov V.A., Shkirin A.V., Starosvetskij A.V. Long-living nanobubbles of dissolved gas in aqueous solutions of salts and erythrocyte suspensions // *J. Biophotonics.* 2011. Vol. 4, № 3. P. 150–164.
285. Bunkin N.F., Yurchenko S.O., Suyazov N.V., Shkirin A.V. Structure of the nanobubble clusters

- of dissolved air in liquid media // *J. Biol. Phys.* 2012. Vol. 38, № 1. P. 121–152.
286. Bunkin N.F., Shkirin A.V. Nanobubble clusters of dissolved gas in aqueous solutions of electrolyte. II. Theoretical interpretation // *J. Chem. Phys.* 2012. Vol. 137, № 5. P. 054707.
287. Бункин Н.Ф., Бункин Ф.В. Экранировка сильнозаряженных макрочастиц в жидких растворах электролитов // *ЖЭТФ*. 2003. Том 123, № 4. С. 828–845.
288. Bunkin N.F., Bunkin F.V. Bubston structure of water and aqueous solutions of electrolytes // *Phys. Wave Phenom.* 2013. Vol. 21, № 2. P. 81–109.
289. Ushikubo F.Y., Furukawa T., Nakagawa R., Enari M., Makino Y., Kawagoe Y., Shiina T., Oshita S. Evidence of the existence and the stability of nano-bubbles in water // *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 2010. Vol. 361, № 1–3. P. 31–37.
290. Vehmas T., Makkonen L. Metastable nanobubbles // *ACS Omega*. 2021. Vol. 6, № 12. P. 8021–8027.
291. Тытик Д.Л. Моделирование гидратных оболочек растворенных в воде нанопузырьков газов // *ЖСХ*. 2021. Том 62, № 2. С. 219–234.
292. Dubochet J., Frank J., Henderson R. The Nobel Prize in Chemistry 2017 - NobelPrize.org [Electronic resource] // The Nobel Prize in Chemistry 2017. NobelPrize.org. Nobel Media AB 2019. Fri. 30 Aug 2019. 2017. URL: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2017/advanced-information>.
293. Drenth J. Principles of protein X-ray crystallography. 3rd ed. Heidelberg: Springer, 2007. 332 p.
294. Amann-Winkel K., Bellissent-Funel M., Bove L.E., Loerting Th., Nilsson A., Paciaroni A., Schlesinger D., Skinner L. X-ray and neutron scattering of water // *Chem. Rev.* 2016. Vol. 116, № 13. P. 7570–7589.
295. Finer-Moore J.S., Kossiakoff A.A., Hurley J.H., Earnest Th., Stroud R.M. Solvent structure in crystals of trypsin determined by X-ray and neutron diffraction // *Proteins Struct. Funct. Genet.* 1992. Vol. 12, № 3. P. 203–222.
296. Meisburger S.P., Pabit S.A., Pollack L. Determining the locations of ions and water around DNA from X-ray scattering measurements // *Biophys. J.* 2015. Vol. 108, № 12. P. 2886–2895.
297. Andreev K. The structural role of gangliosides: insights from X-ray scattering on model membranes // *Curr. Med. Chem.* 2020. Vol. 27, № 38. P. 6548–6570.
298. Fitter J., Gutberlet T., Katsaras J. Neutron scattering in biology: techniques and applications // New York. Heidelberg. Springer, 2006. Vol. 1st. 560 p.
299. Schirò G., Fichou Y., Gallat F.-X., Wood K., Gabel F., Moulin M., Härtlein M., Heyden M., Colletier J.-Ph., Orecchini A., Paciaroni A., Wuttke J., Tobias D.J., Weik M. Translational diffusion of hydration water correlates with functional motions in folded and intrinsically disordered proteins // *Nat. Commun.* 2015. Vol. 6, № 1. P. 6490.
300. Nakagawa H., Yonetani Y., Nakajima K., Ohira-Kawamura S., Kikuchi T., Inamura Y., Kataoka M., Kono H. Local dynamics coupled to hydration water determines DNA-sequence-dependent deformability // *Phys. Rev. E*. 2014. Vol. 90, № 2. P. 022723.
301. Frölich A., Gabel F., Jasnin M., Lehnert U., Oesterhelt D., Stadler A.M., Tehei M., Weik M., Wood K., Zaccai G. From shell to cell: neutron scattering studies of biological water dynamics and coupling to activity // *Faraday Discuss.* 2009. Vol. 141. P. 117–130.
302. Bryant R.G., Shirley W.M. Dynamical deductions from nuclear magnetic resonance relaxation measurements at the water-protein interface // *Biophys. J.* 1980. Vol. 32, № 1. P. 3–16.
303. Franck J.M., Ding Y., Stone K., Qin P.Z., Han S. Anomalously rapid hydration water diffusion dynamics near DNA surfaces // *J. Am. Chem. Soc.* 2015. Vol. 137, № 37. P. 12013–12023.

304. Stehle C.U., Abuillan W., Gompf B., Dressel M. Far-infrared spectroscopy on free-standing protein films under defined temperature and hydration control // *J. Chem. Phys.* 2012. Vol. 136, № 7. P. 075102.
305. Haris P.I. Infrared spectroscopy of protein structure // *Encyclopedia of Biophysics*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. P. 1095–1106.
306. Barron L.D., Hecht L., Blanch E.W., Bell A.F. Solution structure and dynamics of biomolecules from Raman optical activity // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2000. Vol. 73, № 1. P. 1–49.
307. Weidlich T., Lindsay S.M., Rui Qi, Rupprecht A., Peticolas W.L., Thomas G.A. A Raman study of low frequency intrahelical modes in A-, B-, and C-DNA // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1990. Vol. 8, № 1. P. 139–171.
308. Tsuboi M. Application of infrared spectroscopy to structure studies of nucleic acids // *Appl. Spectrosc. Rev.* 1970. Vol. 3, № 1. P. 45–90.
309. Wiercigroch E., Szafraniec E., Czamara K., Pacia M.Z., Majzner K., Kochan K., Kaczor A., Baranska M., Malek K. Raman and infrared spectroscopy of carbohydrates: A review // *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2017. Vol. 185. P. 317–335.
310. Oberg K.A., Ruyschaert J.-M., Goormaghtigh E. The optimization of protein secondary structure determination with infrared and circular dichroism spectra // *Eur. J. Biochem.* 2004. Vol. 271, № 14. P. 2937–2948.
311. Venyaminov S.Y., Kalnin N.N. Quantitative IR spectrophotometry of peptide compounds in water (H₂O) solutions. II. Amide absorption bands of polypeptides and fibrous proteins in α -, β -, and random coil conformations // *Biopolymers*. 1990. Vol. 30, № 13–14. P. 1259–1271.
312. Matthies M., Zundel G. Hydration and self-association of adenosine triphosphate, adenosine diphosphate, and their 1:1 complexes with magnesium(II) at various pH values: infrared investigations // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2.* 1977. № 14. P. 1824–1830.
313. Branca C., Magazù S., Maisano G., Migliardo P. α , α -Trehalose–Water solutions. 3. Vibrational dynamics studies by inelastic light scattering // *J. Phys. Chem. B.* 1999. Vol. 103, № 8. P. 1347–1353.
314. Kirchberg H., Thorwart M. Time-resolved probing of the nonequilibrium structural solvation dynamics by the time-dependent Stokes shift // *J. Phys. Chem. B.* 2020. Vol. 124, № 27. P. 5717–5722.
315. Furse K.E., Corcelli S.A. Dynamical signature of abasic damage in DNA // *J. Am. Chem. Soc.* 2011. Vol. 133, № 4. P. 720–723.
316. Andreatta D., Pérez Lustres J.L., Kovalenko S.A., Ernsting N.P., Murphy C.J., Coleman R.S., Berg M.A. Power-law solvation dynamics in DNA over six decades in time // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. Vol. 127, № 20. P. 7270–7271.
317. Zhang L., Wang L., Kao Y.-T., Qiu W., Yang Y., Okobiah O., Zhong D. Mapping hydration dynamics around a protein surface // *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2007. Vol. 104, № 47. P. 18461–18466.
318. King J.T., Arthur E.J., Brooks C.L., Kubarych K.J. Crowding induced collective hydration of biological macromolecules over extended distances // *J. Am. Chem. Soc.* 2014. Vol. 136, № 1. P. 188–194.
319. King J.T., Kubarych K.J. Site-specific coupling of hydration water and protein flexibility studied in solution with ultrafast 2D-IR spectroscopy // *J. Am. Chem. Soc.* 2012. Vol. 134, № 45. P. 18705–18712.
320. King J.T., Arthur E.J., Brooks C.L., Kubarych K.J. Site-specific hydration dynamics of globular proteins and the role of constrained water in solvent exchange with amphiphilic cosolvents // *J.*

- Phys. Chem. B. 2012. Vol. 116, № 19. P. 5604–5611.
321. Szyk Ł., Yang M., Nibbering E.T.J., Elsaesser Th. Ultrafast vibrational dynamics and local interactions of hydrated DNA // *Angew. Chemie Int. Ed.* 2010. Vol. 49, № 21. P. 3598–3610.
 322. Bruening E.M., Schauss J., Siebert T., Fingerhut B.P., Elsaesser Th. Vibrational dynamics and couplings of the hydrated RNA backbone: a two-dimensional infrared study // *J. Phys. Chem. Lett.* 2018. Vol. 9, № 3. P. 583–587.
 323. Mazur K., Heisler I.A., Meech S.R. Water dynamics at protein interfaces: ultrafast optical kerr effect study // *J. Phys. Chem. A.* 2012. Vol. 116, № 11. P. 2678–2685.
 324. Hithell G., González-Jiménez M., Greetham G.M., Donaldson P.M., Towrie M., Parker A.W., Burley G.A., Wynne K., Hunt N.T. Ultrafast 2D-IR and optical Kerr effect spectroscopy reveal the impact of duplex melting on the structural dynamics of DNA // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2017. Vol. 19, № 16. P. 10333–10342.
 325. El Khaled D., Castellano N., Gázquez J., Perea-Moreno A., Manzano-Agugliaro F. Dielectric spectroscopy in biomaterials: agrophysics // *Materials (Basel)*. 2016. Vol. 9, № 5. P. 310.
 326. Sato T., Buchner R. Dielectric relaxation processes in ethanol/water mixtures // *J. Phys. Chem. A.* 2004. Vol. 108, № 23. P. 5007–5015.
 327. Lobyshev V.I. Dielectric characteristics of highly diluted aqueous diclofenac solutions in the frequency range of 20 Hz to 10 MHz // *Phys. Wave Phenom.* 2019. Vol. 27, № 2. P. 119–127.
 328. Khodadadi S., Sokolov A.P. Atomistic details of protein dynamics and the role of hydration water // *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 2017. Vol. 1861, № 1. P. 3546–3552.
 329. Einfeldt J., Meißner D., Kwasniewski A. Comparison of the molecular dynamics of celluloses and related polysaccharides in wet and dried states by means of dielectric spectroscopy // *Macromol. Chem. Phys.* 2000. Vol. 201, № 15. P. 1969–1975.
 330. Kaminski K., Kaminska, E., Ngai, K. L., Paluch, M., Włodarczyk, P., Kasprzycka, A., Szeja, W. Identifying the origins of two secondary relaxations in polysaccharides // *J. Phys. Chem. B.* 2009. Vol. 113, № 30. P. 10088–10096.
 331. Schmidtke B., Rössler E.A. Depolarized light scattering spectra of molecular liquids: Described in terms of mode coupling theory // *J. Chem. Phys.* 2014. Vol. 141, № 4. P. 044511.
 332. Comez L., Paolantoni M., Sassi P., Corezzi S., Morresi A., Fioretto D. Molecular properties of aqueous solutions: a focus on the collective dynamics of hydration water // *Soft Matter*. 2016. Vol. 12, № 25. P. 5501–5514.
 333. Paolantoni M., Comez L., Fioretto D., Gallina M.E., Morresi A., Sassi P., Scarponi F. Structural and dynamical properties of glucose aqueous solutions by depolarized Rayleigh scattering // *J. Raman Spectrosc.* 2008. Vol. 39, № 2. P. 238–243.
 334. Dexheimer S.L. Terahertz spectroscopy // *Terahertz Spectroscopy: Principles and Applications*. 1st ed. / ed. Dexheimer S.L. CRC Press, 2008. 360 p.
 335. Heyden M., Havenith M. Combining THz spectroscopy and MD simulations to study protein-hydration coupling // *Methods*. 2010. Vol. 52, № 1. P. 74–83.
 336. Kim S.J., Born B., Havenith M., Gruebele M. Real-time detection of protein-water dynamics upon protein folding by terahertz absorption spectroscopy // *Angew. Chemie Int. Ed.* 2008. Vol. 47, № 34. P. 6486–6489.
 337. Polley D., Patra A., Mitra R.K. Dielectric relaxation of the extended hydration sheathe of DNA in the THz frequency region // *Chem. Phys. Lett.* 2013. Vol. 586. P. 143–147.
 338. Penkova N.A., Sharapov M.G., Penkov N.V. Hydration shells of DNA from the point of view of terahertz time-domain spectroscopy // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22, № 20. P. 11089–11104.

339. Penkov N.V., Yashin V.A., Belosludtsev K.N. Hydration shells of DPPC liposomes from the point of view of terahertz time-domain spectroscopy // *Appl. Spectrosc.* 2021. Vol. 75, № 2. P. 189–198.
340. Kawai H., Sakurai M., Inoue Y., Chûjô R., Kobayashi S. Hydration of oligosaccharides: anomalous hydration ability of trehalose // *Cryobiology.* 1992. Vol. 29, № 5. P. 599–606.
341. Fujita Y., Noda Y. Effect of hydration on the thermal stability of protein as measured by differential scanning calorimetry // *Int. J. Pept. Protein Res.* 2009. Vol. 18, № 1. P. 12–17.
342. Peran I., Martin E.W., Mittag T. Walking along a protein phase diagram to determine coexistence points by static light scattering // *Methods Mol. Biol.* 2020. Vol. 2141. P. 715–730.
343. Weber E.M.M., Kress T., Abergel D., Sewsum S., Azais T., Kurzbach D. Assessing the onset of calcium phosphate nucleation by hyperpolarized real-time NMR // *Anal. Chem.* 2020. Vol. 92, № 11. P. 7666–7673.
344. Li Z., Yang Y. Detection of immunoglobulin indexes by immunoturbidimetry: patients with chronic hepatitis B // *Minerva Med.* 2020. Vol. 111, № 5. P. 491–497.
345. Moutachakir M., Lamrani Hanchi A., Baraou A., Boukhira A., Chellak S. Immunoanalytical characteristics of C-reactive protein and high sensitivity C-reactive protein // *Ann. Biol. Clin. (Paris).* 2017. Vol. 75, № 2. P. 225–229.
346. Minton A.P. Recent applications of light scattering measurement in the biological and biopharmaceutical sciences // *Anal. Biochem.* 2016. Vol. 501. P. 4–22.
347. Adan A., Alizada G., Kiraz Y., Baran Y., Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications // *Crit. Rev. Biotechnol.* 2017. Vol. 37, № 2. P. 163–176.
348. Gekko K. Hydration—structure—function relationships of polysaccharides and proteins // *Food Hydrocoll.* 1989. Vol. 3, № 4. P. 289–299.
349. Magazù S., Migliardo P., Musolino A.M., Sciortino M.T. α,α -Trehalose–water solutions. 1. Hydration phenomena and anomalies in the acoustic properties // *J. Phys. Chem. B.* 1997. Vol. 101, № 13. P. 2348–2351.
350. Vranes M., Panic J., Tot A., Gadžuric S., Podlipnik C., Bester-Rogac M. How the presence of ATP affect caffeine hydration and self-aggregation? // *J. Mol. Liq.* 2020. Vol. 318. P. 113885.
351. Hong T., Iwashita K., Shiraki K. Viscosity control of protein solution by small solutes: a review // *Curr. Protein Pept. Sci.* 2018. Vol. 19, № 8. P. 746–758.
352. Liu Y., Bailey T.B., White P.J. Individual and interactional effects of β -glucan, starch, and protein on pasting properties of oat flours // *J. Agric. Food Chem.* 2010. Vol. 58, № 16. P. 9198–9203.
353. Бункин А.Ф., Першин С.М. Низкочастотная спектроскопия биомолекул в водных растворах с помощью четырехволнового смешения // *Квантовая электроника.* 2010. Том 40, № 12. С. 1098–1102.
354. Bunkin A.F., Pershin S.M. Study of hydration of biomolecules and nanoparticles in aqueous solutions and suspensions using coherent laser spectroscopy // *Phys. Wave Phenom.* 2019. Vol. 27, № 2. P. 149–156.
355. Smith A.L. Applied infrared spectroscopy: fundamentals techniques and analytical problem-solving / ed. Elving P.J. New York: New York : Wiley, 1979. 322 p.
356. Siebert F., Hildebrandt P. Vibrational spectroscopy in life science // *Vib. Spectrosc. Life Sci.* Wiley, 2007. 320 p.
357. Griffiths P.R., de Haseth J.A. Fourier transform infrared spectrometry // Wiley-Interscience. Second. Hoboken, NJ, USA: John Wiley and Sons, Inc., 2007. 535 p.

358. Benabou S., Ruckebusch C., Sliwa M., Aviñó A., Eritja R., Gargallo R., de Juan A. Study of light-induced formation of photodimers in the i-motif nucleic acid structure by rapid-scan FTIR difference spectroscopy and hybrid hard- and soft-modelling // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2018. Vol. 20, № 29. P. 19635–19646.
359. Furutani Y., Kimura T., Okamoto K. Development of a rapid buffer-exchange system for time-resolved ATR-FTIR spectroscopy with the step-scan mode // *Biophysics (Oxf)*. 2013. Vol. 9. P. 123–129.
360. Chalmers J.M., Griffiths P. Handbook of vibrational spectroscopy // *Handbook of Vibrational Spectroscopy* / eds. Chalmers J.M., Griffiths P.R. Chichester, UK: John Wiley and Sons, Ltd, 2001.
361. Herbst E. Chemistry in the interstellar medium // *Annu. Rev. Phys. Chem.* 1995. Vol. 46, № 1. P. 27–54.
362. Bacsik Z., Mink J., Keresztury G. FTIR spectroscopy of the atmosphere. I. Principles and methods // *Appl. Spectrosc. Rev.* 2004. Vol. 39, № 3. P. 295–363.
363. Bacsik Z., Mink J., Keresztury G. FTIR spectroscopy of the atmosphere. Part 2. Applications // *Appl. Spectrosc. Rev.* 2005. Vol. 40, № 4. P. 327–390.
364. Hvistendahl J., Rytter E., Øye H.A. IR emission spectroscopy of molten salts and other liquids using thick samples as reference // *Appl. Spectrosc.* 1983. Vol. 37, № 2. P. 182–187.
365. Deblase F.J., Compton S. Infrared emission spectroscopy: a theoretical and experimental review // *Appl. Spectrosc.* 1991. Vol. 45, № 4. P. 611–618.
366. Bernath P.F. Infrared emission spectroscopy // *Annu. Reports Sect. "C" (Physical Chem.)*. 2000. Vol. 96, № 1. P. 177–224.
367. Nemes L., Brown E.E., S.-C. Yang C., Hommerich U. Mid infrared emission spectroscopy of carbon plasma // *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2017. Vol. 170. P. 145–149.
368. Sancey L., Motto-Ros V., Kotb S., Wang X., Lux F., Panczer G., Yu J., Tillement O. Laser-induced breakdown spectroscopy: a new approach for nanoparticle's mapping and quantification in organ tissue // *J. Vis. Exp.* 2014. № 88. P. 51353.
369. Hinkle K.H., Cuberly R., Gaughan N., Heynssens J., Joyce R.R., Ridgway S., Schmitt P., Simmons J.E. Phoenix: a cryogenic high-resolution 1-5 micron infrared spectrograph // *Proc. SPIE*. 1998. Vol. 3354. P. 810–821.
370. Bernath P.F., Siquefield S.A., Baxter L.L., Sclipa G., Rohlffing C.M., Barfield M. In situ analysis of ash deposits from black liquor combustion // *Vibr. Spectrosc.* 1998. Vol. 16. P. 95–103.
371. Terpugov E.L., Degtyareva O.V., Savransky V.V. Possibility of light-induced mid-IR emission *in situ* analysis of plants // *J. Russ. Laser Res.* 2016. Vol. 37, № 5. P. 507–510.
372. Terpugov E., Degtyareva O. Infrared emission from photoexcited bacteriorhodopsin: studies by Fourier transform infrared spectroscopy // *J. Mol. Struct.* 2001. Vol. 565–566. P. 287–292.
373. Gagarinov A.G., Degtyareva O.V., Khodonov A.A., Terpugov E.L. Stimulated infrared emission in all-trans retinal and wild-type bacteriorhodopsin under CW optical pumping: Studies by FT-IR spectroscopy // *Vib. Spectrosc.* 2006. Vol. 42, № 2. P. 231–238.
374. Дегтярева О.В., Афанасьев В.Н., Хечинашвили Н.Н., Терпугов Е.Л. Структура и свойства L-лизина монохлорида и глицина в жидкой фазе при воздействии оптическим излучением низкой интенсивности // *Современные проблемы науки и образования*. 2013. Том 4. С. 1–9.

375. Penkov N., Penkova N. Measurement of the emission spectra of protein solutions in the infrared range. Description of the method and testing using solution of human interferon gamma as an example // *Front. Phys.* 2020. Vol. 8. P. 615917.
376. Penkov N., Penkova N. Analysis of emission infrared spectra of protein solutions in low concentrations // *Front. Phys.* 2020. Vol. 8. P. 624779.
377. Penkov N.V., Penkova N.A. Infrared emission spectroscopy for investigation of biological molecules in aqueous solutions // *Phys. Wave Phenom.* 2021. Vol. 29, № 2. P. 164–168.
378. Institute N.A.S. Photon correlation and light beating spectroscopy / eds. Cummins H.Z., Pike. E.R. Capri, Italy, 1973. 504 p.
379. Siegert A.J.F. On the fluctuations in signals returned by many independently moving scatterers. Cambridge, MA, USA: Massachusetts Institute of Technology, Radiation Laboratory Report, 1949. 465 p.
380. Provencher S.W., Štěpánek P. Global analysis of dynamic light scattering autocorrelation functions // *Part. Part. Syst. Charact.* 1996. Vol. 13, № 5. P. 291–294.
381. Johnson P.B., Christy R.W. Optical constants of Ag (Silver) [Electronic resource] // *Optical constants of the noble metals.* 1972. P. 4370–4379. URL: <https://refractiveindex.info/>.
382. McMeekin T.L., Groves M.L., Hipp N.J. Refractive indices of amino acids, proteins, and related substances // *Amino Acids and Serum Proteins.* American C / ed. Stekol J. Washington, 1964. P. 54–66.
383. Mie G. Beiträge zur optik trüber medien, speziell kolloidaler metallösungen // *Ann. Phys.* 1908. Vol. 330, № 3. P. 377–445.
384. Koppel D.E. Analysis of macromolecular polydispersity in intensity correlation spectroscopy: the method of cumulants // *J. Chem. Phys.* 1972. Vol. 57, № 11. P. 4814–4820.
385. ISO22412. Particle size analysis - dynamic light scattering (DLS) // *Br. Stand.* 2008. P. 34.
386. Stetefeld J., McKenna S.A., Patel T.R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences // *Biophys. Rev.* 2016. Vol. 8, № 4. P. 409–427.
387. Deo S., Patel T.R., Džananović E., Booy E.P., Zeid K., McEleney K., Harding S.E., McKenna S.A. Activation of 2' 5'-oligoadenylate synthetase by stem loops at the 5'-end of the west nile virus genome // *PLoS One* / ed. Jan E. 2014. Vol. 9, № 3. P. e92545.
388. Deo S., Patel T.R., Chojnowski G., Koul A., Džananović E., McEleney K., Bujnicki J.M., McKenna S.A. Characterization of the termini of the West Nile virus genome and their interactions with the small isoform of the 2' 5'-oligoadenylate synthetase family // *J. Struct. Biol.* 2015. Vol. 190, № 2. P. 236–249.
389. Patel T.R., Meier M., Li J., Morris G., Rowe A.J., Stetefeld J. T-shaped arrangement of the recombinant agrin G3 - IgG Fc protein // *Protein Sci.* 2011. Vol. 20, № 6. P. 931–940.
390. Dey J., Kumar S., Aswal V.K., Panicker L.V., Ismail K., Hassan P.A. Effect of sodium salicylate and sodium deoxycholate on fibrillation of bovine serum albumin: comparison of fluorescence, SANS and DLS techniques // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2015. Vol. 17, № 23. P. 15442–15451.
391. Perrin F. Mouvement brownien d'un ellipsoïde (II). Rotation libre et dépolarisation des fluorescences. Translation et diffusion de molécules ellipsoïdales // *J. Phys. le Radium.* 1936. Vol. 7, № 1. P. 1–11.
392. Landau L.D., Lifshitz E.M. Fluid mechanics. 2nd ed. Butterworth–Heinemann, 1987. Vol. 6. 539 p.
393. Bunkin N.F., Shkirin A.V., Penkov N.V., Chirikov S.N., Ignatiev P.S., Kozlov V.A. The

- physical nature of mesoscopic inhomogeneities in highly diluted aqueous suspensions of protein particles // *Phys. Wave Phenom.* 2019. Vol. 27, № 2. P. 102–112.
394. Bunkin N.F., Lyakhov G.A., Shkirin A.V., Krivokhizha S.V., Afonin A.A., Kobelev A.V., Penkov N.V., Fesenko E.E. Laser diagnostics of the mesoscale heterogeneity of aqueous solutions of polar organic compounds // *Phys. Wave Phenom.* 2018. Vol. 26, № 1. P. 21–35.
395. Bunkin N.F., Lyakhov G.A., Shkirin A.V., Ignatiev P.S., Kobelev A.V., Penkov N.V., Fesenko E.E. Mesodroplet heterogeneity of low-concentration aqueous solutions of polar organic compounds // *Phys. Wave Phenom.* 2019. Vol. 27, № 2. P. 91–101.
396. Bunkin N.F., Shkirin A.V., Lyakhov G.A., Kobelev A.V., Penkov N.V., Ugraitskaya S.V., Fesenko E.E. Droplet-like heterogeneity of aqueous tetrahydrofuran solutions at the submicrometer scale // *J. Chem. Phys.* 2016. Vol. 145, № 18. P. 184501.
397. Bunkin N.F., Lyakhov G.A., Shkirin A.V., Kobelev A.V., Penkov N.V., Ugraitskaya S.V., Fesenko E.E. (Jr.). Study of the submicron heterogeneity of aqueous solutions of hydrogen-bond acceptor molecules by laser diagnostics methods // *Phys. Wave Phenom.* 2015. Vol. 23, № 4. P. 241–254.
398. Molecular weight measurement using dynamic light scattering equipment [Electronic resource]. 2018. P. 5. URL: https://www.cordouan-tech.com/wp-content/uploads/2018/02/NT02-VASCO-Molecular-weight_EN_V01-.pdf.
399. Wattjes J., Niehues A., Cord-Landwehr S., Hoßbach J., David L., Delair T., Moerschbacher B.M. Enzymatic production and enzymatic-mass spectrometric fingerprinting analysis of chitosan polymers with different nonrandom patterns of acetylation // *J. Am. Chem. Soc.* 2019. Vol. 141, № 7. P. 3137–3145.
400. Ito T., Yoshida C., Murakami Y. Design of novel sheet-shaped chitosan hydrogel for wound healing: a hybrid biomaterial consisting of both PEG-grafted chitosan and crosslinkable polymeric micelles acting as drug containers // *Mater. Sci. Eng. C.* 2013. Vol. 33, № 7. P. 3697–3703.
401. Schleinitz M., Sadowski G., Brandebusch C. Protein-protein interactions and water activity coefficients can be used to aid a first excipient choice in protein formulations // *Int. J. Pharm.* 2019. Vol. 569. P. 118608.
402. De Sousa F.B., Lima A.C., Denadai Â.M.L., Anconi C.P.A., De Almeida W.B., Novato W.T.G., Dos Santos H.F., Drum C.L., Langer R., Sinisterra R.D. Superstructure based on β -CD self-assembly induced by a small guest molecule // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2012. Vol. 14, № 6. P. 1934–1944.
403. McFadden D.C., De Jesus M., Casadevall A. The physical properties of the capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* suggest features for capsule construction // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 281, № 4. P. 1868–1875.
404. Tao Y., Yan Y., Xu W. Shrinking factors of hyperbranched polysaccharide from fungus // *Carbohydr. Res.* 2009. Vol. 344, № 11. P. 1311–1318.
405. Delgado A.V., González-Caballero F., Hunter R.J., Koopal L.K., Lyklema J. Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena (IUPAC Technical Report) // *Pure Appl. Chem.* 2005. Vol. 77, № 10. P. 1753–1805.
406. Malvern Guides. Malvern instruments [Electronic resource] // *Measuring Zeta Potential – Laser Doppler Electrophoresis.* 2015. P. 1–2.
407. Nasiri F., Faghfour L., Hamidi M. Preparation, optimization, and in-vitro characterization of α -tocopherol-loaded solid lipid nanoparticles (SLNs) // *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2020. Vol. 46, № 1. P. 159–171.

408. Di Francesco M., Primavera R., Fiorito S., Cristiano M., Taddeo V., Epifano F., Di Marzio L., Genovese S., Celia C. Acronychiabaueri analogue derivative-loaded ultradeformable vesicles: physicochemical characterization and potential applications // *Planta Med.* 2016. Vol. 83, № 5. P. 482–491.
409. Carreras J.J., Tapia-Ramirez W.E., Sala A., Guillot A.J., Garrigues T.M., Melero A. Ultraflexible lipid vesicles allow topical absorption of cyclosporin A // *Drug Deliv. Transl. Res.* 2020. Vol. 10, № 2. P. 486–497.
410. Calvo A., Moreno E., Larrea E., Sanmartín C., Irache J.M., Espuelas S. Berberine-loaded liposomes for the treatment of *Leishmania infantum*-infected BALB/c mice // *Pharmaceutics.* 2020. Vol. 12, № 9. P. 858.
411. Turetskiy E.A., Koloskova O.O., Nosova A.S., Shilovskiy I.P., Sebyakin Yu.L., Khaitov M.R. Physicochemical properties of lipopeptide-based liposomes and their complexes with siRNA // *Biomeditsinskaya Khimiya.* 2017. Vol. 63, № 5. P. 472–475.
412. Shimada K., Miyagishima A., Sadzuka Y., Nozawa Y., Mochizuki Y., Ohshima H., Hirota S. Determination of the thickness of the fixed aqueous layer around polyethyleneglycol-coated liposomes // *J. Drug Target.* 1995. Vol. 3, № 4. P. 283–289.
413. Barkhudarov E.M., Kossyi I.A., Anpilov A.M., Ivashkin P.I., Artem'ev K.V., Moryakov I.V., Misakyan M.A., Christofi N., et al. New nanostructured carbon coating inhibits bacterial growth, but does not influence on animal cells // *Nanomaterials.* 2020. Vol. 10, № 11. P. 2130.
414. Rampino A., Borgogna M., Bellich B., Blasi P., Virgilio F., Cesàro A. Chitosan-pectin hybrid nanoparticles prepared by coating and blending techniques // *Eur. J. Pharm. Sci.* 2016. Vol. 84. P. 37–45.
415. Arpicco S., Lerda C., Dalla Pozza E., Costanzo C., Tsapis N., Stella B., Donadelli M., Dando I., Fattal E., Cattel L., Palmieri M. Hyaluronic acid-coated liposomes for active targeting of gemcitabine // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2013. Vol. 85, № 3 Pt A. P. 373–380.
416. Grisham D.R., Nanda V. Zeta potential prediction from protein structure in general aqueous electrolyte solutions // *Langmuir.* 2020. Vol. 36, № 46. P. 13799–13803.
417. Salgın S., Salgın U., Bahadır S. Zeta potentials and isoelectric points of biomolecules: the effects of ion types and ionic strengths // *Int. J. Electrochem. Sci.* 2012. Vol. 7. P. 12404–12414.
418. Lee Y.S. Principles of terahertz science and technology // *Principles of Terahertz Science and Technology.* Boston, MA: Springer US, 2009. 337 p.
419. Saeedkia D. Handbook of terahertz technology for imaging, sensing and communications. Woodhead Publishing Limited, 2013. 688 p.
420. Terahertz biomedical science and technology / ed. Son J.-H. CRC Press, 2014. 377 p.
421. Terahertz spectroscopy and imaging / eds. Peiponen K.-E., Zeitler A., Kuwata-Gonokami M. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. Vol. 171. 644 p.
422. Penkov N., Shvirst N., Yashin V., Fesenko E. (Jr.), Fesenko E. Terahertz spectroscopy applied for investigation of water structure // *J. Phys. Chem. B.* 2015. Vol. 119, № 39. P. 12664–12670.
423. Penkov N.V. Peculiarities of the perturbation of water structure by ions with various hydration in concentrated solutions of CaCl₂, CsCl, KBr, and KI // *Phys. Wave Phenom.* 2019. Vol. 27, № 2. P. 128–134.
424. Tikhonov V.I., Volkov A.A. Separation of water into its ortho and para isomers // *Science.* 2002. Vol. 296, № 5577. P. 2363–2363.
425. Бункин А.Ф., Першин С.М., Хусаинова Р.С., Потехин С.А. Спин-изомерная селективность молекул воды при гидратации ДНК // *Биофизика.* 2009. Том 54, № 3. С.

396–401.

426. Pershin S.M. Conversion of ortho-para H₂O isomers in water and a jump in erythrocyte fluidity through a microcapillary at a temperature of 36.6±0.3°C // *Phys. Wave Phenom.* 2009. Vol. 17, № 4. P. 241–250.
427. Першин С.М. Квантовые отличия орто и пара спиновых изомеров H₂O как физическая основа аномальных свойств воды // *Наноструктуры. Математическая физика и моделирование.* 2012. Том 7, № 2. С. 103–120.
428. Пищальников Р.Ю., Першин С.М., Бункин А.Ф. Квантовые отличия орто/пара спиновых изомеров H₂O как фактор модуляции фемтосекундных кинетик разделения заряда в реакционных центрах пурпурных бактерий // *Биофизика.* 2012. Том 57, № 6. С. 1000–1007.
429. Першин С.М. Влияние квантовых отличий орто- и пара- спин - изомеров H₂O на свойства воды: биофизический аспект // *Биофизика.* 2013. Том 58, № 5. С. 910–918.
430. Першин С.М., Исмаилов Э.Ш., Сулейманова З.Г., Абдулмагомедова З.Н., Загирова Д.З. Функциональные характеристики дрожжевых клеток в питательном растворе на воде, обогащенной орто-изомерами H₂O // *Биофизика.* 2014. Том 59, № 2. С. 408–413.
431. Brucherseifer M., Nagel M., Haring Bolivar P., Kurz H., Bosserhoff A., Buttner R. Label-free probing of the binding state of DNA by time-domain terahertz sensing // *Appl. Phys. Lett.* 2000. Vol. 77. P. 4049–4051.
432. Fischer B.M., Hoffmann M., Helm H., Wilk R., Rutz F., Kleine-Ostmann T., Koch M., Jepsen P.U. Terahertz time-domain spectroscopy and imaging of artificial RNA // *Opt. Express.* 2005. Vol. 13, № 14. P. 5205–5215.
433. Markelz A., Whitmire S., Hillebrecht J., Birge R. THz time domain spectroscopy of biomolecular conformational modes // *Phys. Med. Biol.* 2002. Vol. 47, № 21. P. 3797–3805.
434. Zhang C., Durbin S.M. Hydration-induced far-infrared absorption increase in myoglobin // *J. Phys. Chem. B.* 2006. Vol. 110, № 46. P. 23607–23613.
435. Falconer R.J., Markelz A.G. Terahertz spectroscopic analysis of peptides and proteins // *J Infrared Milli Terahz Waves.* 2012. Vol. 33. P. 973–988.
436. Ionescu A., Mernea M., Vasile I., Brandus C.A., Barbinta-Patrascu M.E., Tugulea L., Mihailescu D., Dascalu T. Study of supported phospholipid bilayers by THz-TDS // *Terahertz Emitters, Receivers, and Applications III* / ed. Razeghi M. et al. 2012. Vol. 8496. P. 849614.
437. Andachi T., Yamamoto N., Tamura A., Tominaga K. Low-frequency spectra of a phospholipid silayer studied by terahertz time-domain spectroscopy // *J. Infrared, Millimeter, Terahertz Waves.* 2014. Vol. 35, № 1. P. 147–157.
438. Chan T.L.J., Bjarnason J.E., Lee A.W.M., Celis M.A., Brown E.R. Attenuation contrast between biomolecular and inorganic materials at terahertz frequencies // *Appl. Phys. Lett.* 2004. Vol. 85, № 13. P. 2523–2525.
439. Wang H., Tsuchikawa S., Inagaki T. Terahertz time-domain spectroscopy as a novel tool for crystallographic analysis in cellulose: the potentiality of being a new standard for evaluating crystallinity // *Cellulose.* 2021. Vol. 28, № 9. P. 5293–5304.
440. Penkov N.V., Goltyaev M.V., Astashev M.E., Serov D.A., Moskovskiy M.N., Khort D.O., Gudkov S.V. The application of terahertz time-domain spectroscopy to identification of potato late blight and fusariosis // *Pathogens.* 2021. Vol. 10, № 10. P. 1336–1350.
441. Pickwell E., Wallace V.P. Biomedical applications of terahertz technology // *J. Phys. D Appl. Phys.* 2006. Vol. 39, № 17. P. R301–R310.

442. Cherkasova O., Nazarov M., Shkurinov A. Noninvasive blood glucose monitoring in the terahertz frequency range // *Opt. Quantum Electron.* 2016. Vol. 48, № 3. P. 217.
443. Sun L., Zhao L., Peng R.-Y. Research progress in the effects of terahertz waves on biomacromolecules // *Mil. Med. Res.* 2021. Vol. 8, № 1. P. 28.
444. Penkov N. Antibodies processed using high dilution technology distantly change structural properties of IFN γ aqueous solution // *Pharmaceutics.* 2021. Vol. 13, № 11. P. 1864.
445. Nazarov M.M., Cherkasova O.P., Shkurinov A.P. Study of the dielectric function of aqueous solutions of glucose and albumin by THz time-domain spectroscopy // *Quantum Electron.* 2016. Vol. 46, № 6. P. 488–495.
446. Penkov N.V. Relationships between molecular structure of carbohydrates and their dynamic hydration shells revealed by terahertz time-domain spectroscopy // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22, № 21. P. 11969–11988.
447. Fattinger C., Grischkowsky D. Terahertz beams // *Appl. Phys. Lett.* 1989. Vol. 54, № 6. P. 490–492.
448. van Exter M., Fattinger C., Grischkowsky D. Terahertz time-domain spectroscopy of water vapor // *Opt. Lett.* 1989. Vol. 14, № 20. P. 1128.
449. Kindt J.T., Schmuttenmaer C.A. Far-infrared dielectric properties of polar liquids probed by femtosecond terahertz pulse spectroscopy // *J. Phys. Chem.* 1996. Vol. 100, № 24. P. 10373–10379.
450. Basey-Fisher T.H., Hanham S.M., Andresen H., Maier S.A., Stevens M.M., Alford N.M., Klein N. Microwave Debye relaxation analysis of dissolved proteins: towards free-solution biosensing // *Appl. Phys. Lett.* 2011. Vol. 99, № 23. P. 233703.
451. Aspnes D.E. Local-field effects and effective-medium theory: a microscopic perspective // *Am. J. Phys.* 1982. Vol. 50, № 8. P. 704–709.
452. Choy T.C. *Effective medium theory: principle and applications.* 1st ed. UK: Oxford University Press, 2015. 200 p.
453. Sushko M.Y., Kris'kiv S.K. Compact group method in the theory of permittivity of heterogeneous systems // *Tech. Phys.* 2009. Vol. 54, № 3. P. 423–427.
454. Sihvola A. *Electromagnetic mixing formulas and applications* // *Electromagn. Mix. Formulas Appl.* London, UK: IET, 1999. 296 p.
455. Levy O., Bergman D.J. Clausius-Mossotti approximation for a family of nonlinear composites // *Phys. Rev. B.* 1992. Vol. 46, № 11. P. 7189–7192.
456. Maxwell-Garnett J.C. Colours in metal glasses and in metallic films // *Philos. Trans. R. Soc. London. Ser. A, Contain. Pap. a Math. or Phys. Character.* 1904. Vol. 203, № 359–371. P. 385–420.
457. Bruggeman D.A.G. Berechnung verschiedener physikalischer konstanten von heterogenen substanzen. I. Dielektrizitätskonstanten und leitfähigkeiten der mischkörper aus isotropen substanzen // *Ann. Phys.* 1935. Vol. 416, № 7. P. 636–664.
458. Nazarov M., Cherkasova O.P., Shkurinov A.P. Spectroscopy of solutions in the low frequency extended THz frequency range // *EPJ Web Conf.* / ed. Silaev A.A. 2018. Vol. 195. P. 10008.
459. Born B., Havenith M. Terahertz dance of proteins and sugars with water // *J. Infrared, Millimeter, Terahertz Waves.* 2009. Vol. 30, № 12. P. 1245–1254.
460. Leitner D.M., Gruebele M., Havenith M. Solvation dynamics of biomolecules: modeling and terahertz experiments // *HFSP J.* 2008. Vol. 2, № 6. P. 314–323.
461. Nagai M., Yada H., Arikawa T., Tanaka K. Terahertz time-domain attenuated total reflection

- spectroscopy in water and biological solution // *Int. J. Infrared Millimeter Waves*. 2007. Vol. 27, № 4. P. 505–515.
462. Looyenga H. Dielectric constants of heterogeneous mixtures // *Physica*. 1965. Vol. 31, № 3. P. 401–406.
463. Lisin R., Zion Ginzburg B., Schlesinger M., Feldman Y. Time domain dielectric spectroscopy study of human cells. I. Erythrocytes and ghosts // *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1996. Vol. 1280, № 1. P. 34–40.
464. Polevaya Y., Ermolina I., Schlesinger M., Ginzburg B., Feldman Y. Time domain dielectric spectroscopy study of human cells // *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1999. Vol. 1419, № 2. P. 257–271.
465. Glancy P. Concentration-dependent effects on fully hydrated DNA at terahertz frequencies // *J. Biol. Phys.* 2015. Vol. 41, № 3. P. 247–256.
466. Glancy P., Beyermann W.P. Dielectric response of suspended nucleotides at terahertz frequencies // *33rd International Conference on Infrared, Millimeter and Terahertz Waves. IEEE*, 2008. P. 1–2.
467. Kraszewski A., Kulinski S., Matuszewski M. Dielectric properties and a model of biphasic water suspension at 9.4 GHz // *J. Appl. Phys.* 1976. Vol. 47, № 4. P. 1275–1277.
468. Penkov N., Penkova N.A. Effective medium model applied to biopolymer solutions // *Appl. Spectrosc.* 2021. Vol. 75, № 12. P. 1510–1515.
469. Taschin A., Bartolini P., Tasseva J., Torre R. THz time-domain spectroscopic investigations of thin films // *Measurement*. 2018. Vol. 118. P. 282–288.
470. Landau L.D., Lifshitz E.M., Pitaevskii L.P. *Electrodynamics of continuous media* // Pergamon press. 2nd ed. Butterworth–Heinemann, 1984. Vol. 8. 475 p.
471. Kistner C., André A., Fischer T., Thoma A., Janke C., Bartels A., Gisler T., Maret G., Dekorsy T. Hydration dynamics of oriented DNA films investigated by time-domain terahertz spectroscopy // *Appl. Phys. Lett.* 2007. Vol. 90, № 23. P. 233902.
472. Wittlin A., Genzel L., Kremer F., Häsel S., Poglitsch A., Rupprecht A. Far-infrared spectroscopy on oriented films of dry and hydrated DNA // *Phys. Rev. A*. 1986. Vol. 34, № 1. P. 493–500.
473. Durchschlag H. Specific volumes of biological macromolecules and some other molecules of biological interest // *Thermodynamic Data for Biochemistry and Biotechnology* / ed. Hinz H.J. Berlin, Heidelberg: Springer, Berlin, Heidelberg, 1986. P. 45–128.
474. Glancy P., Beyermann W.P. Dielectric properties of fully hydrated nucleotides in the terahertz frequency range // *J. Chem. Phys.* 2010. Vol. 132, № 24. P. 245102.
475. Jastrzebska M., Kocot A. Ionic diffusion and space charge polarization in structural characterization of biological tissues // *Eur. Phys. J. E*. 2004. Vol. 14, № 2. P. 137–142.
476. Kurzweil-Segev Y., Popov I., Solomonov I., Sagit I., Feldman Y. Dielectric relaxation of hydration water in native collagen fibrils // *J. Phys. Chem. B*. 2017. Vol. 121, № 21. P. 5340–5346.
477. Hartl F.U., Hayer-Hartl M. Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2009. Vol. 16, № 6. P. 574–581.
478. Muntau A.C., Leandro J., Staudigl M., Mayer F., Gersting S.W. Innovative strategies to treat protein misfolding in inborn errors of metabolism: pharmacological chaperones and proteostasis regulators // *J. Inher. Metab. Dis.* 2014. Vol. 37, № 4. P. 505–523.
479. Buehler M.G., Kindle M.L., Carter B.P. Using dielectric relaxation spectroscopy to characterize

- the glass transition time of polydextrose // *J. Food Sci.* 2015. Vol. 80, № 6. P. E1243–E1252.
480. Lyashchenko A., Lileev A. Dielectric relaxation of water in hydration shells of ions // *J. Chem. Eng. Data.* 2010. Vol. 55, № 5. P. 2008–2016.
481. Kobelev A.V., Lileev A.S., Lyashchenko A.K. Microwave dielectric properties of aqueous potassium iodide solutions as a function of temperature // *Russ. J. Inorg. Chem.* 2011. Vol. 56, № 4. P. 652–659.
482. Nörtemann K., Hilland J., Kaatze U. Dielectric properties of aqueous NaCl solutions at microwave frequencies // *J. Phys. Chem. A.* 1997. Vol. 101, № 37. P. 6864–6869.
483. Barthel J., Buchner R., Eberspächer P.-N., Münsterer M., Stauber J., Wurm B. Dielectric relaxation spectroscopy of electrolyte solutions. Recent developments and prospects // *J. Mol. Liq.* 1998. Vol. 78, № 1–2. P. 83–109.
484. Asaki M.L.T., Redondo A., Zawodzinski T.A., Taylor A.J. Dielectric relaxation of electrolyte solutions using terahertz transmission spectroscopy // *J. Chem. Phys.* 2002. Vol. 116, № 19. P. 8469.
485. Ellison W.J. Permittivity of pure water, at standard atmospheric pressure, over the frequency range 0–25THz and the temperature range 0–100°C // *J. Phys. Chem. Ref. Data.* 2007. Vol. 36, № 1. P. 1–18.
486. Buchner R., Hefter G.T., May P.M. Dielectric relaxation of aqueous NaCl solutions // *J. Phys. Chem. A.* 1999. Vol. 103, № 1. P. 1–9.
487. Chandra A. Static dielectric constant of aqueous electrolyte solutions: Is there any dynamic contribution? // *J. Chem. Phys.* 2000. Vol. 113, № 3. P. 903–905.
488. Barthel J., Kleebauer M., Buchner R. Dielectric relaxation of electrolyte solutions in acetonitrile // *J. Solution Chem.* 1995. Vol. 24, № 1. P. 1–17.
489. Kaatze U. Dielectric effects in aqueous solutions of 1:1, 2:1, and 3:1 valent electrolytes: kinetic depolarization, saturation, and solvent relaxation // *Zeitschrift für Phys. Chemie.* 1983. Vol. 135, № 135. P. 51–75.
490. Scheiner S. Hydrogen bonding: a theoretical perspective. 1997. 375 p.
491. Пеньков Н.В. Особенности терагерцовых спектров поглощения воды и водных растворов электролитов: дис. ... канд. физ.-мат. наук : 03.01.02 - биофизика / Пеньков Никита Викторович. Пушино, 2014. 132 с.
492. Markelz A., Roitberg A., Heilweil E. Pulsed terahertz spectroscopy of DNA, bovine serum albumin and collagen between 0.1 and 2.0 THz // *Chem. Phys. Lett.* 2000. Vol. 320, № 1–2. P. 42–48.
493. Fischer H., Polikarpov I., Craievich A.F. Average protein density is a molecular-weight-dependent function // *Protein Sci.* 2009. Vol. 13, № 10. P. 2825–2828.
494. Sushko O., Dubrovka R., Donnan R.S. Sub-terahertz spectroscopy reveals that proteins influence the properties of water at greater distances than previously detected // *J. Chem. Phys.* 2015. Vol. 142, № 5. P. 055101.
495. Niehues G., Heyden M., Schmidt D.A., Havenith M. Exploring hydrophobicity by THz absorption spectroscopy of solvated amino acids // *Faraday Discuss.* 2011. Vol. 150. P. 193–207.
496. Bendzko P.I., Pfeil W.A., Privalov P.L., Tiktopulo E.I. Temperature-induced phase transitions in proteins and lipids // *Biophys. Chem.* 1988. Vol. 29, № 3. P. 301–307.
497. Hamelin J., Mehl J.B., Moldover M.R. The static dielectric constant of liquid water between 274 and 418 K near the saturated vapor pressure // *Int. J. Thermophys.* 1998. Vol. 19, № 5. P.

- 1359–1380.
498. Saviz M., Miladi H., Haqiqat khah M.H., Faraji-Dana R., Arab S. Dielectric spectroscopy of aqueous TRIS buffer solutions at microwave frequencies. 2013. P. 7.
 499. Parasassi T., De Stasio G., D'Ubaldo A., Gratton E. Phase fluctuation in phospholipid membranes revealed by Laurdan fluorescence // *Biophys. J.* 1990. Vol. 57, № 6. P. 1179–1186.
 500. Nagle J.F. Theory of the main lipid bilayer phase transition // *Annu. Rev. Phys. Chem.* 1980. Vol. 31, № 1. P. 157–196.
 501. Urabe H., Sugawara Y., Tsukakoshi M., Kasuya T. Low-frequency Raman spectra of guanosine and nucleotides in ordered states: Origin of the lowest-frequency mode // *J. Chem. Phys.* 1991. Vol. 95, № 8. P. 5519–5523.
 502. Urabe H., Sugawara Y., Kasuya T. Humidity-dependent structural transition of guanosine and disodium adenosine 5'-triphosphate crystals studied by low-frequency Raman spectroscopy // *Phys. Rev. B.* 1995. Vol. 51, № 9. P. 5666–5672.
 503. Takeuchi H., Murata H., Harada I. Interaction of adenosine 5'-triphosphate with Mg²⁺: vibrational study of coordination sites by use of ¹⁸O-labeled triphosphates // *J. Am. Chem. Soc.* 1988. Vol. 110, № 2. P. 392–397.
 504. Wilson J.E., Chin A. Chelation of divalent cations by ATP, studied by titration calorimetry // *Anal. Biochem.* 1991. Vol. 193, № 1. P. 16–19.
 505. Serec K., Babić S.D., Podgornik R., Tomić S. Effect of magnesium ions on the structure of DNA thin films: an infrared spectroscopy study // *Nucleic Acids Res.* 2016. Vol. 44, № 17. P. 8456–8464.
 506. Sigel H., Griesser R. Nucleoside 5'-triphosphates: self-association, acid–base, and metal ion-binding properties in solution // *Chem. Soc. Rev.* 2005. Vol. 34, № 10. P. 875–900.
 507. Djikaev Y.S., Ruckenstein E. Dependence of the number of hydrogen bonds per water molecule on its distance to a hydrophobic surface and a thereupon-based model for hydrophobic attraction // *J. Chem. Phys.* 2010. Vol. 133, № 19. P. 194105.
 508. Lampinen M.J., Nojonen T. Electric dipole theory and thermodynamics of actomyosin molecular motor in muscle contraction // *J. Theor. Biol.* 2005. Vol. 236, № 4. P. 397–421.
 509. Sambrook J., Russell D.W. *Molecular cloning: a laboratory manual (3-volume set)* // *Molecular cloning: a laboratory manual.* N.Y., 2001. P. 2100.
 510. Aaij C., Borst P. The gel electrophoresis of DNA // *Biochim. Biophys. Acta - Nucleic Acids Protein Synth.* 1972. Vol. 269, № 2. P. 192–200.
 511. Glasel J.A. Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios // *Biotechniques.* 1995. Vol. 18, № 1. P. 62–63.
 512. Koonin E. V., Dolja V. V. A virocentric perspective on the evolution of life // *Curr. Opin. Virol.* 2013. Vol. 3, № 5. P. 546–557.
 513. Yao N.Y., O'Donnell M.E. Evolution of replication machines // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2016. Vol. 51, № 3. P. 135–149.
 514. Wu S., Turner K.M., Nguyen N., Raviram R., Erb M., Santini J., Luebeck J., Rajkumar U., Diao Y., Li B., Zhang W., Jameson N. et al. Circular ecdNA promotes accessible chromatin and high oncogene expression // *Nature.* 2019. Vol. 575, № 7784. P. 699–703.
 515. Son H., Choi D.-H., Jung S., Park J., Park W.-Y., Kwon O.S., Park G.-S. Determination of relaxation time of DNA hydration water by THz-TDS // *37th International Conference on Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves. IEEE,* 2012. P. 1–2.
 516. Bartha F., Kapuy O., Kozmutza C., Van Alsenoy C. Analysis of weakly bound structures:

- hydrogen bond and the electron density in a water dimer // *J. Mol. Struct. THEOCHEM.* 2003. Vol. 666–667. P. 117–122.
517. Duguid J., Bloomfield V.A., Benevides J., Thomas G.J. Raman spectroscopy of DNA-metal complexes. I. Interactions and conformational effects of the divalent cations: Mg, Ca, Sr, Ba, Mn, Co, Ni, Cu, Pd, and Cd // *Biophys. J.* 1993. Vol. 65, № 5. P. 1916–1928.
518. Bugaenko L.T., Ryabykh S.M., Bugaenko A.L. A nearly complete system of average crystallographic ionic radii and its use for determining ionization potentials // *Moscow Univ. Chem. Bull.* 2008. Vol. 63, № 6. P. 303–317.
519. Koneshan S., Rasaiah J.C., Lynden-Bell R.M., Lee S.H. Solvent structure, dynamics, and ion mobility in aqueous solutions at 25 °C // *J. Phys. Chem. B.* 1998. Vol. 102, № 21. P. 4193–4204.
520. Yang Z. Hofmeister effects: an explanation for the impact of ionic liquids on biocatalysis // *J. Biotechnol.* 2009. Vol. 144, № 1. P. 12–22.
521. Parkinson G.N., Lee M.P.H., Neidle S. Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA // *Nature.* 2002. Vol. 417, № 6891. P. 876–880.
522. Zinchenko A.A., Yoshikawa K. Na⁺ shows a markedly higher potential than K⁺ in DNA compaction in a crowded environment // *Biophys. J.* 2005. Vol. 88, № 6. P. 4118–4123.
523. Savelyev A., Papoian G.A. Electrostatic, steric, and hydration interactions favor Na⁺ condensation around DNA compared with K⁺ // *J. Am. Chem. Soc.* 2006. Vol. 128, № 45. P. 14506–14518.
524. Walther M., Fischer B.M., Uhd Jepsen P. Noncovalent intermolecular forces in polycrystalline and amorphous saccharides in the far infrared // *Chem. Phys.* 2003. Vol. 288, № 2–3. P. 261–268.
525. Du C., Zhang X., Zhang Z. Quantitative analysis of ternary isomer mixtures of saccharide by terahertz time domain spectroscopy combined with chemometrics // *Vib. Spectrosc.* 2019. Vol. 100. P. 64–70.
526. Antal M.J., Mok W.S.L., Richards G.N. Mechanism of formation of 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde from d-fructose and sucrose // *Carbohydr. Res.* 1990. Vol. 199, № 1. P. 91–109.
527. Sonoda M.T., Skaf M.S. Carbohydrate clustering in aqueous solutions and the dynamics of confined water // *J. Phys. Chem. B.* 2007. Vol. 111, № 41. P. 11948–11956.
528. Kerins L., Byrne S., Gabba A., Murphy P.V. Anomer preferences for glucuronic and galacturonic acid and derivatives and influence of electron-withdrawing substituents // *J. Org. Chem.* 2018. Vol. 83, № 15. P. 7714–7729.
529. Kiyosawa K. The volumes of hydrated glucose, sucrose and raffinose molecules, and the osmotic pressures of these aqueous saccharide solutions as measured by the freezing-point-depression method // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1988. Vol. 61, № 3. P. 633–642.
530. Vettori M.H.P.B., Franchetti S.M.M., Contiero J. Structural characterization of a new dextran with a low degree of branching produced by *Leuconostoc mesenteroides* FT045B dextranase // *Carbohydr. Polym.* 2012. Vol. 88, № 4. P. 1440–1444.
531. Sandford P.A., Baird J. Industrial utilization of polysaccharides // *The Polysaccharides* / ed. Aspinall G.O. Elsevier, 1983. P. 411–490.
532. O'Sullivan A.C., Perez S. The relationship between internal chain length of amylopectin and crystallinity in starch // *Biopolymers.* 1999. Vol. 50, № 4. P. 381–390.
533. Upadhyaya P.C., Shen Y.C., Davies A.G., Linfield E.H. Far-infrared vibrational modes of polycrystalline saccharides // *Vib. Spectrosc.* 2004. Vol. 35, № 1–2. P. 139–143.

534. Zhang F., Wang H.-W., Tominaga K., Hayashi M., Hasunuma T., Kondo A. Application of THz vibrational spectroscopy to molecular characterization and the theoretical fundamentals: an illustration using saccharide molecules // *Chem. - An Asian J.* 2017. Vol. 12, № 3. P. 324–331.
535. Zhong J., Mori T., Fujii Y., Kashiwagi T., Terao W., Yamashiro M., Minami H. Tsujimoto M., Tanaka T., Kawashima H., Ito J., et al. Molecular vibration and Boson peak analysis of glucose polymers and ester via terahertz spectroscopy // *Carbohydr. Polym.* 2020. Vol. 232. P. 115789.
536. Max J., Chapados C. Isotope effects in liquid water by infrared spectroscopy. III. H₂O and D₂O spectra from 6000 to 0 cm⁻¹ // *J. Chem. Phys.* 2009. Vol. 131, № 18. P. 184505.
537. Barth A. Infrared spectroscopy of proteins // *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 2007. Vol. 1767, № 9. P. 1073–1101.
538. UniProtKB — P02769 (ALBU_BOVIN) [Electronic resource] // Консорциум ЮниПрот UniProt: универсальная база знаний о белках на 2021 год. 2021. URL: <https://www.uniprot.org/uniprot/P02769>.
539. Nagle J.F., Wilkinson D.A. Lecithin bilayers. Density measurement and molecular interactions // *Biophys. J.* 1978. Vol. 23, № 2. P. 159–175.
540. Janin J. Biomolecular structure and dynamics // *Biomolecular Structure and Dynamics*. 1st ed. / eds. Vergoten G., Theophanides T. Dordrecht: Springer Netherlands, 1997. 327 p.
541. Khalil F.L., Brown T.L. Infrared spectra of adenosine triphosphate complexes in deuterium oxide solution // *J. Am. Chem. Soc.* 1964. Vol. 86, № 23. P. 5113–5117.
542. Bernath P.F. Infrared fourier transform emission spectroscopy // *Chem. Soc. Rev.* 1996. Vol. 25, № 2. P. 111–115.
543. Rogalin V.E., Kaplunov I.A., Kropotov G.I. Optical materials for the THz range // *Opt. Spectrosc.* 2018. Vol. 125, № 6. P. 1053–1064.
544. Penkov N., Yashin V., Fesenko E., Manokhin A., Fesenko E. A study of the effect of a protein on the structure of water in solution using terahertz time-domain spectroscopy // *Appl. Spectrosc.* 2018. Vol. 72, № 2. P. 257–267.
545. Sharapov M.G., Novoselov V.I., Penkov N.V., Fesenko E.E., Vedunova M.V., Bruskov V.I., Gudkov S.V. Protective and adaptogenic role of peroxiredoxin 2 (Prx2) in neutralization of oxidative stress induced by ionizing radiation // *Free Radic. Biol. Med.* 2019. Vol. 134. P. 76–86.
546. Bobyleva L.G., Shumeyko S.A., Yakupova E.I., Surin A.K., Galzitskaya O.V., Kihara H., Timchenko A.A., Timchenko M.A., Penkov N.V., Nikulin A.D., et al. Myosin binding protein-C forms amyloid-like aggregates *in vitro* // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22, № 2. P. 731.
547. Dubinin M.V., Semenova A.A., Ilzorkina A.I., Mikheeva I.B., Yashin V.A., Penkov N.V., Vydrina V.A., Ishmuratov G.Yu., Sharapov V.A., Khoroshavina E.I., Gudkov S.V., Belosludtsev K.N. Effect of betulin and betulonic acid on isolated rat liver mitochondria and liposomes // *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 2020. Vol. 1862, № 10. P. 183383.
548. Dubinin M.V., Samartsev V.N., Stepanova A.E., Khoroshavina E.I., Penkov N.V., Yashin V.A., Starinets V.S., Mikheeva I.B., Gudkov S.V., Belosludtsev K.N. Membranotropic effects of ω-hydroxypalmitic acid and Ca²⁺ on rat liver mitochondria and lecithin liposomes. Aggregation and membrane permeabilization // *J. Bioenerg. Biomembr.* 2018. Vol. 50, № 5. P. 391–401.
549. Bobylev A.G., Kraevaya O.A., Bobyleva L.G., Khakina E.A., Fadeev R.S., Zhilenkov A.V., Mishchenko D.V., Penkov N.V., et al. Anti-amyloid activities of three different types of water-soluble fullerene derivatives // *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2019. Vol. 183. P. 110426.
550. Gudkov S.V., Penkov N.V., Baimler I.V., Lyakhov G.A., Pustovoy V.I., Simakin A.V., Sarimov R.M., Scherbakov I.A. Effect of mechanical shaking on the physicochemical properties of

- aqueous solutions // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. Vol. 21, № 21. P. 8033.
551. Penkov N.V. Temporal dynamics of the scattering properties of deionized water // *Phys. Wave Phenom.* 2020. Vol. 28, № 2. P. 135–139.
552. Bunkin N.F., Bolotskova P.N., Bondarchuk E.V., Gryaznov V.G., Kozlov V.A., Okuneva M.A., Ovchinnikov O.V., Penkov N.V., Smoliy O.P., Turkanov I.F. Dynamics of polymer membrane swelling in aqueous suspension of amino-acids with different isotopic composition; photoluminescence spectroscopy experiments // *Polymers (Basel)*. 2021. Vol. 13, № 16. P. 2635.
553. Liu K., Cruzan J.D., Saykally R.J. Water clusters // *Science*. 1996. Vol. 271, № 5251. P. 929–933.
554. Postnikov A.V., Uvarov I.V., Penkov N.V., Svetovoy V.B. Collective behavior of bulk nanobubbles produced by alternating polarity electrolysis // *Nanoscale*. 2018. Vol. 10, № 1. P. 428–435.
555. Bunkin N.F., Shkirin A.V., Ninham B.W., Chirikov S.N., Chaikov L.L., Penkov N.V., Kozlov V.A., Gudkov S.V. Shaking-induced aggregation and flotation in immunoglobulin dispersions: differences between water and water–ethanol mixtures // *ACS Omega*. 2020. Vol. 5, № 24. P. 14689–14701.

ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ В ЖУРНАЛАХ, ИНДЕКСИРУЕМЫХ В БАЗАХ ДАННЫХ WEB OF SCIENCE, SCOPUS, RSCI

1. **Penkov N.V.** Relationships between molecular structure of carbohydrates and their dynamic hydration shells revealed by terahertz time-domain spectroscopy // *Int. J. Mol. Sci.*, 2021. Vol. 22, N. 21, pp. 11969-11988. Q1 DOI: 10.3390/ijms222111969. IF по Scopus 5,838.
2. Penkova N.A., Sharapov M.G., **Penkov N.V.** Hydration shells of DNA from the point of view of terahertz time-domain spectroscopy // *Int. J. Mol. Sci.*, 2021. Vol. 22, N. 20, pp. 11089-11104. Q1 DOI: 10.3390/ijms222011089. IF по Scopus 5,838.
3. **Penkov N.V.**, Penkova N.A. Infrared emission spectroscopy for investigation of biological molecules in aqueous solutions // *Physics of Wave Phenomena*, 2021. Vol. 29, N. 2, pp. 164-168. Q3 DOI: 10.3103/S1541308X21020102. IF по Scopus 0,954.
4. Кобелев А.В., Шишова Н.В., Уграйцкая С.В., Заломова Л.В., Яшин В.А., **Пеньков Н.В.** и др. Влияние газов на целостность структуры льда, формирующегося при замораживании воды и криозащитных растворов: оптико-микроскопическое исследование // *Биофизика*, 2021. Том 66, № 5, с. 845–855. Q4 DOI: 10.31857/S0006302921050021. IF по Scopus 0,52.
5. Dubinin M.V., Semenova A.A., Ilzorkina A.I., Markelova N.Y., **Penkov N.V.**, et al. New quaternized pyridinium derivatives of betulin: synthesis and evaluation of membranotropic properties on liposomes, pro- and eukaryotic cells, and isolated mitochondria // *Chemico-Biological Interactions*, 2021. Vol. 349, p. 109678. Q1 DOI: 10.1016/j.cbi.2021.109678. IF по Scopus 4,512.
6. Bobkova N.V., Zhdanova D.Y., Belosludtseva N.V., **Penkov N.V.**, Mironova G.D. Intranasal administration of mitochondria improves spatial memory in olfactory bulbectomized mice // *Experimental Biology and Medicine*, 2021. Vol. 246, pp. 1-10. Q1 DOI: 10.1177/15353702211056866. IF по Scopus 3,438.
7. **Penkov N.V.**, Goltyaev M.V., Astashev M.E., Serov D.A., Moskovskiy M.N., et al. The application of terahertz time-domain spectroscopy to identification of potato late blight and fusariosis // *Pathogens*, 2021. Vol. 10, N. 10, pp. 1336-1350. Q2 DOI: 10.3390/pathogens10101336. IF по Scopus 3,406.
8. **Penkov N.V.** Antibodies processed using high dilution technology distantly change structural properties of IFN γ aqueous solution // *Pharmaceutics*, 2021. Vol. 13, N. 11, pp. 1864-1877. Q1 DOI: 10.3390/pharmaceutics13111864. IF по Scopus 6,072.
9. **Penkov N.V.**, Penkova N. Key differences of the hydrate shell structures of ATP and Mg-ATP revealed by terahertz time-domain spectroscopy and dynamic light scattering // *Journal of Physical*

- Chemistry B, 2021. Vol. 125, pp. 4375-4382. Q1 DOI: 10.1021/acs.jpcc.1c02276. IF по Scopus 2,994.
10. **Penkov N.V.**, Penkova N.A. Effective medium model applied to biopolymer solutions // *Applied Spectroscopy*, 2021. Vol. 75, N. 12, pp. 1510-1515. Q2 DOI: 10.1177/00037028211042027. IF по Scopus 2,158.
 11. Sarimov R.M., Binhi V.N., Matveeva T.A., **Penkov N.V.**, Gudkov S.V. Unfolding and aggregation of lysozyme under the combined action of dithiothreitol and guanidine hydrochloride: optical studies // *Int. J. Mol. Sci.*, 2021. Vol. 22, p. 2710. Q1 DOI: 10.3390/ijms22052710. IF по Scopus 5,838.
 12. Dubinin M.V., Semenova A.A., Ilzorkina A.I., **Penkov N.V.**, Nedopekina D.A., et al. Mitochondria-targeted prooxidant effects of betulinic acid conjugated with delocalized lipophilic cation F16 // *Free Radical Biology and Medicine*, 2021. Vol. 168, pp. 55–69. Q1 DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2021.03.036. IF по Scopus 6,857.
 13. Bunkin N.F., Bolotskova P.N., Bondarchuk E.V., Gryaznov V.G., Kozlov V.A., Okuneva M.A., Ovchinnikov O.V., **Penkov N.V.**, et al. Dynamics of polymer membrane swelling in aqueous suspension of amino-acids with different isotopic composition; photoluminescence spectroscopy experiments // *Polymers*, 2021. Vol. 13, p. 2635. Q1 DOI: 10.3390/polym13162635. IF по Scopus 4,35.
 14. Bunkin N.F., Shkirin A.V., **Penkov N.V.**, Goltayev M.V., Ignatiev P.S., et al. Effect of gas type and its pressure on nanobubble generation // *Frontiers in Chemistry*, 2021. Vol. 9, p. 630074. Q1 DOI: 10.3389/fchem.2021.630074. IF по Scopus 4,749.
 15. Slatinskaya O.V., Pyrkov Yu.N., Filatova S.A., Guryev D.A., **Penkov N.V.** Study of the effect of europium acetate on the intermolecular properties of water // *Front. Phys.*, 2021. Vol. 9, p. 641110. Q2 DOI: 10.3389/fphy.2021.641110. IF по Scopus 3,492.
 16. Bobyleva L.G., Shumeyko S.A., Yakupova E.I., Surin A.K., Galzitskaya O.V., Kihara H., Timchenko A.A., Timchenko M.A., **Penkov N.V.**, et al. Myosin binding protein-C forms amyloid-like aggregates *in vitro* // *Int. J. Mol. Sci.*, 2021. Vol. 22, N. 2, p. 731. Q1 DOI: 10.3390/ijms22020731. IF по Scopus 5,838.
 17. **Penkov N.V.**, Yashin V.A., Belosludtsev K.N. Hydration shells of DPPC liposomes from the point of view of terahertz time-domain spectroscopy // *Applied Spectroscopy*, 2021. Vol. 75, N. 2, pp. 189-198. Q2 DOI: 10.1177/0003702820949285. IF по Scopus 2,158.
 18. **Penkov N.**, Fesenko E. Development of terahertz time-domain spectroscopy for properties analysis of highly diluted antibodies // *Applied Sciences*, 2020. Vol. 10, N. 21, p. 7736. Q2 DOI: 10.3390/app10217736. IF по Scopus 3,104.

19. Barkhudarov E.M., Kossyi I.A., Anpilov A.M., Ivashkin P.I., Artem'ev K.V., Moryakov I.V., Misakyan M.A., Christofi N., Burmistrov D.E., Smirnova V.V., Ivanyuk V.V., Bunkin N.F., Kozlov V.A., **Penkov N.V.**, et al. New nanostructured carbon coating inhibits bacterial growth, but does not influence on animal cells // *Nanomaterials*, 2020. Vol. 10, N. 11, p. 2130. Q1 DOI: 10.3390/nano10112130. IF no Scopus 5,093.
20. Gudkov S.V., **Penkov N.V.**, Baimler I.V., Lyakhov G.A., Pustovoy V.I., et al. Effect of mechanical shaking on the physicochemical properties of aqueous solutions // *Int. J. Mol. Sci.*, 2020. Vol. 21, N. 21, p. 8033. Q1 DOI: 10.3390/ijms21218033. IF no Scopus 5,838.
21. **Penkov N.**, Penkova N. Measurement of the emission spectra of protein solutions in the infrared range. Description of the method and testing using solution of human interferon gamma as an example // *Frontiers in Physics*, 2020. Vol. 8, p. 615917. Q2 DOI: 10.3389/fphy.2020.615917. IF no Scopus 4,524.
22. **Penkov N.**, Penkova N. Analysis of emission infrared spectra of protein solutions in low concentrations // *Frontiers in Physics*, 2020. Vol. 8, p. 624779. Q2 DOI: 10.3389/fphy.2020.624779. IF no Scopus 4,524.
23. **Penkov N.V.** Temporal dynamics of the scattering properties of deionized water // *Physics of Wave Phenomena*, 2020. Vol. 28, N. 2, pp. 135–139. Q3 DOI: 10.3103/S1541308X20020132. IF no Scopus 0,954.
24. Bunkin N.F., Shkirin A.V., **Penkov N.V.**, Chirikov S.N., Chaikov L.L., et al. Characteristics of protein aggregation and flotation in water and alcohol-water mixture // *Physics of Wave Phenomena*, 2020. Vol. 28, N. 2, pp. 145–149. Q3 DOI: 10.3103/S1541308X20020043. IF no Scopus 0,954.
25. Dubinin M.V., Semenova A.A., Ilzorkina A.I., Mikheeva I.B., Yashin V.A., **Penkov N.V.**, et al. Effect of betulin and betulonic acid on isolated rat liver mitochondria and liposomes // *BBA – Biomembranes*, 2020. Vol. 1862, N. 10, p. 183383. Q1 DOI: 10.1016/j.bbamem.2020.183383. IF no Scopus 4,203.
26. Bunkin N.F., Shkirin A.V., Ninham B.W., Chirikov S.N., Chaikov L.L., **Penkov N.V.**, et al. Shaking-induced aggregation and flotation in immunoglobulin dispersions: differences between water and water–ethanol mixtures // *ACS Omega*, 2020. Vol. 5, N. 24, pp. 14689–14701. Q1 DOI: 10.1021/acsomega.0c01444. IF no Scopus 3,329.
27. Bobilev A.G., Kraevaya O.A., Bobileva L.G., Khakina E.A., Fadeev R.S., Zhilenkov A.V., Mishchenko D.V., **Penkov N.V.**, et al. Anti-amyloid activities of three different types of water-soluble fullerene derivatives // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2019. Vol. 183, p. 110426. Q1 DOI: 10.1016/j.colsurfb.2019.110426. IF no Scopus 5,003.

28. **Penkov N.V.** Peculiarities of the perturbation of water structure by ions with various hydration in concentrated solutions of CaCl₂, CsCl, KBr, and KI // *Physics of Wave Phenomena*, 2019. Vol. 27, N. 2, pp. 128–134. Q3 DOI: 10.3103/S1541308X19020079. IF no Scopus 0,954.
29. Bunkin N.F., Lyakhov G.A., Shkirin A.V., Ignatiev P.S., Kobelev A.V., **Penkov N.V.**, et al. Mesodroplet heterogeneity of low-concentration aqueous solutions of polar organic compounds // *Physics of Wave Phenomena*, 2019. Vol. 27, N. 2, pp. 91–101. Q3 DOI: 10.3103/S1541308X19020031. IF no Scopus 0,954.
30. Bunkin N.F., Shkirin A.V., **Penkov N.V.**, Chirikov S.N., Ignatiev P.S., et al. The physical nature of mesoscopic inhomogeneities in highly diluted aqueous suspensions of protein particles // *Physics of Wave Phenomena*, 2019. Vol. 27, N. 2, pp. 102–112. Q3 DOI: 10.3103/S1541308X19020043. IF no Scopus 0,954.
31. Kobelev A., Yashin V., **Penkov N.**, Shvirst N., Goltyaev M., et al. An optical microscope study of the morphology of xenon hydrate crystals: exploring new approaches to cryopreservation // *Crystals*, 2019. Vol. 9, p. 215. Q2 DOI: 10.3390/cryst9040215. IF no Scopus 2,584
32. Sharapov M.G., Novoselov V.I., **Penkov N.V.**, Fesenko E.E., Vedunova M.V., et al. Protective and adaptogenic role of peroxiredoxin 2 (Prx2) in neutralization of oxidative stress induced by ionizing radiation // *Free Radical Biology and Medicine*, 2019. Vol. 134, pp. 76-86. Q1 DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.12.032. IF no Scopus 6,857.
33. Belosludtsev K.N., **Penkov N.V.**, Tenkov K.S., Talanov E.Yu., Belosludtseva N.V., et al. Interaction of the anti-tuberculous drug bedaquiline with artificial membranes and rat erythrocytes // *Chemico-Biological Interactions*, 2019. Vol. 299, pp. 8-14. Q1 DOI: 10.1016/j.cbi.2018.11.017. IF no Scopus 4,512.
34. Zhalimov V., Sklifas A., Kaptsov V., **Penkov N.**, Temnov A., et al. The chemical structure of triblock copolymers and the adsorption capacity of perfluorocarbon—core nanoparticles stabilized by them // *Colloid and Polymer Science*, 2018. Vol. 296, N. 2, pp. 251–257. Q2 DOI: 10.1007/s00396-017-4245-z. IF no Scopus 1,882.
35. Dubinin M.V., Samartsev V.N., Stepanova A.E., Khoroshavina E.I., **Penkov N.V.**, et al. Membranotropic effects of ω-hydroxypalmitic acid and Ca²⁺ on rat liver mitochondria and lecithin liposomes. Aggregation and membrane permeabilization // *J. Bioenerg. Biomembr.*, 2018. Vol. 50, N. 5, pp. 391-401. Q3 DOI: 10.1007/s10863-018-9771-y. IF no Scopus 3,241.
36. Postnikov A.V., Uvarov I.V., **Penkov N.V.**, Svetovoy V.B. Collective behavior of bulk nanobubbles produced by alternating polarity electrolysis // *Nanoscale*, 2018. Vol. 10, N. 1, pp. 428–435. Q1 DOI: 10.1039/C7NR07126D. IF no Scopus 7,312.

37. Belosludtsev K.N., Belosludtseva N.V., Tenkov K.S., **Penkov N.V.**, Agafonov A.V., et al. Study of the mechanism of permeabilization of lecithin liposomes and rat liver mitochondria by the antimicrobial drug triclosan // *BBA – Biomembranes*, 2018. Vol. 1860, N. 2, pp. 264-271. Q1 DOI: 10.1016/j.bbamem.2017.09.018. IF по Scopus 4,203.
38. Bunkin N.F., Lyakhov G.A., Shkirin A.V., Krivokhizha S.V., Afonin A.A., Kobelev A.V., **Penkov N.V.**, et al. Laser diagnostics of the mesoscale heterogeneity of aqueous solutions of polar organic compounds // *Physics of Wave Phenomena*, 2018. Vol. 26, N. 1, pp. 21–35. Q3 DOI: 10.3103/S1541308X18010041. IF по Scopus 0,954.
39. Шарапов М.Г., **Пеньков Н.В.**, Гудков С.В., Гончаров Р.Г., Новоселов В.И. и др. Роль межмолекулярных дисульфидных связей в стабилизации структуры пероксиредоксинов // *Биофизика*, 2018. Том 63, № 2, с. 232–240. Q4 DOI: 10.1134/S0006350918020203. IF по Scopus 0,52.
40. Levina E.O., **Penkov N.V.**, Rodionova N.N., Tarasov S.A., Barykina D.V., et al. Hydration of the carboxylate group in anti-inflammatory drugs: atr-ir and computational studies of aqueous solution of sodium diclofenac // *ACS Omega*, 2018. Vol. 3, N. 1, pp. 302-313. Q1 DOI: 10.1021/acsomega.7b01034. IF по Scopus 3,329.
41. **Penkov N.**, Yashin V., Fesenko E. (Jr.), Manokhin A., Fesenko E. A study of the effect of a protein on the structure of water in solution using terahertz time-domain spectroscopy // *Applied Spectroscopy*, 2018. Vol. 72, N. 2, pp. 257–267. Q2 DOI: 10.1177/0003702817735551. IF по Scopus 2,158.
42. Yakupova E.I., Vikhlyantsev I.M., Bobyleva L.G., **Penkov N.V.**, Timchenko A.A., et al. Different amyloid aggregation of smooth muscles titin *in vitro* // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2018. Vol. 36, N. 9, pp. 2237-2248. Q2 DOI: 10.1080/07391102.2017.1348988. IF по Scopus 2,972.
43. Манаков А.Ю., **Пеньков Н.В.**, Родионова Т.В., Нестеров А.Н., Фесенко Е.Е. (мл.). Кинетика процессов образования и диссоциации газовых гидратов // *Успехи химии*, 2017. Том 86, № 9, с. 845-869. Q1 DOI: 10.1070/RCR4720. IF по Scopus 6,024.
44. Bunkin N.F., Shkirin A.V., Lyakhov G.A., Kobelev A.V., **Penkov N.V.**, et al. Droplet-like heterogeneity of aqueous tetrahydrofuran solutions at the submicrometer scale // *J. Chem. Phys.*, 2016. Vol. 145, N. 18, p. 184501. Q1 DOI: 10.1063/1.4966187. IF по Scopus 3,681.
45. Yurchenko S.O., Shkirin A.V., Ninham B.W., Sychev A.A., Babenko V.A., **Penkov N.V.**, et al. Ion-specific and thermal effects in the stabilization of the gas nanobubble phase in bulk aqueous electrolyte solutions // *Langmuir*, 2016. Vol. 32, N. 43, pp. 11245–11255. Q1 DOI: 10.1021/acs.langmuir.6b01644. IF по Scopus 3,886.

46. Bobylev A.G., Galzitskaya O.V., Fadeev R.S., Bobyleva L.G., Yurshenas D.A., Molochkov N.V., Dovidchenko N.V., Selivanova O.M., **Penkov N.V.**, et al. Smooth muscle titin forms *in vitro* amyloid aggregates // *Bioscience Reports*, 2016. Vol. 36, N. 3, pp. 1-12. Q1 DOI: 10.1042/BSR20160066. IF по Scopus 3,603.
47. Bunkin N.F., Shkirin A.V., Suyazov N.V., Babenko V.A., Sychev A.A., **Penkov N.V.**, et al. Formation and dynamics of ion-stabilized gas nanobubble phase in the bulk of aqueous NaCl solutions // *J. Phys. Chem. B*, 2016. Vol. 120, N. 7, pp. 1291–1303. Q1 DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b11103. IF по Scopus 2,994.
48. Dubinin M.V., Astashev M.E., **Penkov N.V.**, Gudkov S.V., Dyachenko I.A., et al. Effects of phospholipase A2 inhibitors on bilayer lipid membranes // *J. Membrane Biol.*, 2016. Vol. 249, N. 3, pp. 339–347. Q2 DOI: 10.1007/s00232-016-9872-7. IF по Scopus 2,078.
49. **Penkov N.**, Shvirst N., Yashin V., Fesenko E. (Jr.), Fesenko E. Terahertz spectroscopy applied for investigation of water structure // *J. Phys. Chem. B*, 2015. Vol. 119, N. 39, pp. 12664–12670. Q1 DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b06622. IF по Scopus 2,994.
50. Bunkin N.F., Lyakhov G.A., Shkirin A.V., Kobelev A.V., **Penkov N.V.**, et al. Study of the submicron heterogeneity of aqueous solutions of hydrogen-bond acceptor molecules by laser diagnostics methods // *Physics of Wave Phenomena*, 2015. Vol. 23, N. 4, pp. 241–254. Q3 DOI: 10.3103/S1541308X15040019. IF по Scopus 0,954.
51. Крассова Н.Е., Уграйцкая С.В., **Пеньков Н.В.**, Фесенко Е.Е. (мл.). О влиянии α -токоферола на активность протеинкиназы C *in vitro* // *Биофизика*, 2015. Том 60, № 5, с. 1036–1038. Q4 DOI: 10.1134/S0006350915050115. IF по Scopus 0,52.
52. Belosludtsev K.N., Belosludtseva N.V., Agafonov A.V., **Penkov N.V.**, Samartsev V.N., et al. Effect of surface-potential modulators on the opening of lipid pores in liposomal and mitochondrial inner membranes induced by palmitate and calcium ions // *Biochimica et Biophysica Acta*, 2015. Vol. 1848, N. 10, pp. 2200–2205. Q1 DOI: 10.1016/j.bbamem.2015.05.013. IF по Scopus 4,203.
53. Бобылёв А.Г., **Пеньков Н.В.**, Трошин П.А., Гудков С.В. Влияние разбавления на агрегацию наночастиц поликарбоксильного производного фуллерена C60 // *Биофизика*, 2015. Том 60, № 1, с. 38-43. Q4 DOI: 10.1134/S0006350915010078. IF по Scopus 0,52.
54. Belosludtsev K.N., Belosludtseva N.V., Dubinin M.V., Gudkov S.V., **Penkov N.V.**, et al. The influence of spermine on Ca²⁺-dependent permeability transition in mitochondria and liposomes induced by palmitic and α,ω -hexadecanedioic acids // *Biophysics*, 2014. Vol. 59, N. 5, pp. 727-731. Q4 DOI: 10.1134/S0006350914050042. IF по Scopus 0,52.

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ НА МЕЖДУНАРОДНЫХ И ВСЕРОССИЙСКИХ НАУЧНЫХ КОНФЕРЕНЦИЯХ

1. **Пеньков Н.В.** Отличия структуры гидратной оболочки АТФ в зависимости от связывания с Mg^{2+} . Сборник трудов четвертой всероссийской конференции с международным участием "Физика водных растворов". (2021) Москва. С. 41.
2. **Пеньков Н.В.** Измерение спектров собственного излучения растворов биологических макромолекул в инфракрасном диапазоне. Сборник трудов третьей всероссийской конференции "Физика водных растворов". (2020) Москва. С. 40.
3. **Пеньков Н.В.** Временная динамика свойств рассеяния деионизированной воды. Сборник трудов второй всероссийской конференции "Физика водных растворов". (2019) Москва. С. 13.
4. **Пеньков Н.В.** Терагерцовая спектроскопия временного разрешения в применении к исследованию гидратных оболочек белков. VI съезд биофизиков России. (2019) С. 388.
5. Саримов Р.М., Матвеева Т.А., **Пеньков Н.В.**, Гудков С.В., Бинги В.Н. Применение оптических методов для исследования процесса денатурации лизоцима. VI съезд биофизиков России. (2019) С. 391.
6. Бобылёв А.Г., Бобылёва Л.Г., Шумейко С.А., Якупова Э.И., Тимченко М.А., Тимченко А.А., **Пеньков Н.В.**, Молочков Н.В., Вихлянцев И.М. Особенности амилоидной агрегации миозин связывающего белка-С *in vitro*. VI съезд биофизиков России. (2019) С. 51.
7. Береза И.С., Боликов Н.Г., Бункин Н.Ф., Ву М.Т., Гудков С.В., Козлов В.А., Молчанов И.И., **Пеньков Н.В.**, Сафроненков Р.С., Шкирин А.В. Динамика набухания нафiona в воде с различной концентрацией дейтерия. Десятая всероссийская конференция "Необратимые процессы в природе и технике". (2019) Москва. С. 40.
8. Башкина Ю.А., Береза И.С., Боликов Н.Г., Бункин Н.Ф., Ву М.Т., Гудков С.В., Козлов В.А., Молчанов И.И., **Пеньков Н.В.**, Шкирин А.В. Изотопические эффекты вблизи поверхности нафiona. Десятая всероссийская конференция "Необратимые процессы в природе и технике". (2019) Москва. С. 44.
9. **Пеньков Н.В.**, Яшин В.А., Швирст Н.Э., Фесенко Е.Е. Терагерцовая спектроскопия как метод исследования структуры водных растворов. Сборник тезисов конференции «Физика водных растворов». (2018) Москва. С. 11.
10. Бункин Н.Ф., Шкирин А.В., Гудков С.В., **Пеньков Н.В.**, Чириков С.Н., Козлов В.А. Физическая природа мезоскопических неоднородностей в высокоразбавленных водных суспензиях белковых частиц. Сборник тезисов конференции «Физика водных растворов». (2018) Москва. С. 9.

11. Бункин Н.Ф., Ляхов Г.А., Шкирин А.В., Кобелев А.В., **Пеньков Н.В.**, Фесенко Е.Е. (мл.) Мезокапельная гетерогенность водных растворов полярных органических соединений при низких концентрациях. Сборник тезисов конференции «Физика водных растворов». (2018) Москва. С. 9.
12. Шарапов М.Г., **Пеньков Н.В.**, Новосёлов В.И. Исследование термостабильности пероксиредоксинов. V съезд биофизиков России. (2015) С. 128.

ПАТЕНТЫ НА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пат. RU 2698903 С1, Способ криоконсервации биологических объектов при одновременной гомогенной нуклеации кристаллов льда и клатрата ксенона / **Пеньков Н.В.**, Фесенко Е.Е., Манохин А.А., Крассова Н.Е., Семёнов В.С., Яшин В.А.; опубл. 30.08.2019.
2. Пат. RU 2688331 С1, Способ криоконсервации биологических образцов под давлением и устройство для его осуществления / Кобелев А.В., **Пеньков Н.В.**, Гольтяев М.В., Бирюков С.В., Гагаринский Е.Л., Каурова С.А., Швирст Н.Э., Уграицкая С.В., Шишова Н.В., Фесенко Е.Е.; опубл. 2019.
3. Пат. RU 2668322 С1, Способ подбора условий для криоконсервации биологических объектов в вязких средах с использованием гидратообразующих газов и устройство для его осуществления / Бирюков С.В., Крассова Н.Е., **Пеньков Н.В.**, Фесенко Е.Е., Швирст Н.Э.; опубл. 28.09.2018.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарит коллег – д.ф.-м.н. Н.Ф. Бункина (МГТУ им. Н.Э. Баумана), д.б.н. К.Н. Белослудцева (ИТЭБ РАН), д.б.н. С.В. Гудкова (ИОФ РАН), д.б.н. М.Г. Шарапова (ФИЦ ПНЦБИ РАН), к.б.н. А.Г. Бобылёва (ИТЭБ РАН) – за проведение интересных совместных работ и возможность применения описанных в настоящей диссертационной работе собственных методик к их объектам исследования.

Значительное влияние на автора и его научный путь оказали член-корр. РАН Е.Е. Фесенко и В.А. Яшин. Автор искренне благодарен им за создание условий для реализации данного диссертационного исследования и научного роста в целом.