

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Пеньков Никита Викторович

Молекулярная организация водных растворов биомолекул

Специальности: 1.5.2 – Биофизика, 1.1.10 – Биомеханика и биоинженерия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

доктора физико-математических наук

Москва – 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук».

**Официальные
оппоненты**

Лобышев Валентин Иванович, доктор физико-математических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», физический факультет, кафедра биофизики, профессор.

Волков Александр Александрович, доктор физико-математических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук», отдел субмиллиметровой спектроскопии, главный научный сотрудник.

Погорелов Александр Григорьевич, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, главный научный сотрудник, и.о. заведующего лабораторией функциональной микроскопии биоструктур.

Защита диссертации состоится «23» 12 2022 г. в 15:30 часов на заседании диссертационного совета МГУ.011.1 Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 2, Физический факультет МГУ, ауд. 5-68

E-mail: *info@physics.msu.ru*

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский пр-т, д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/503461595>

Автореферат разослан «21» 10 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

кандидат технических наук

А. Э. Сидорова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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. Основополагающей 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 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») 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.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

В **Главе 1** проведён анализ литературы, посвящённой изучению молекулярной организации водных растворов биомолекул. В рамках данной весьма обширной темы можно выделить три основных направления исследований: гидратация биомолекул, структура биомолекул в водном окружении, характеристики гетерогенности растворов биомолекул.

Вопрос гидратации является наименее изученным и наиболее сложным, поэтому ему уделён обширный раздел. Перечислены основные типы структуры и динамики воды, реализующиеся на разных временных масштабах. Проведён обзор данных о влиянии различных типов биомолекул на структурно-динамические характеристики воды в ближайшем окружении, в чём и заключается гидратация. В следующем разделе обсуждается вопрос влияния гидратации на структуру различных типов биомолекул, которая может сильно отличаться от дегидратированных форм. Описаны различные процессы, приводящие к изменению характеристик гетерогенности растворов биомолекул. Показано, что анализ распределений по размерам биомолекул может давать важную информацию о происходящих процессах биологического и физико-химического толка. Также сделан краткий обзор по теме нанопузырьков, являющихся неотъемлемой частью водных растворов и часто приводящих к наличию артефактов в измеряемых распределениях по размерам биомолекул.

Также в **Главе 1** дан краткий обзор структурных методов исследования водных растворов биомолекул. Отдельный раздел посвящён малоизвестной разновидности ИК спектроскопии – спектроскопии собственного излучения. Описаны преимущества и сложности использования данного метода для исследования растворов биомолекул. Ещё один раздел посвящён детальному описанию метода динамического светорассеяния, который широко применяется для анализа распределений по размерам биомолекул в растворах, а также их зарядовых характеристик и молекулярного веса. Следующий раздел посвящён описанию специфики метода ТГц спектроскопии применительно к исследованию водных растворов и гидратных оболочек биомолекул. Отдельно описан принцип одной из разновидностей метода ТГц спектроскопии – время-разрешённой ТГц спектроскопии (THz-TDS), которая позволяет определять спектры комплексной диэлектрической проницаемости. Рассматривается вопрос разделения вкладов биомолекул и водной фазы при анализе спектров диэлектрической проницаемости (ДП) раствора биомолекул с использованием моделей эффективной среды.

Глава 2 посвящена разработке и применению методического подхода для исследования 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.
2. Затем с помощью моделей эффективной среды, используя ϵ_s^* и ϵ_i^* , из спектров раствора биомолекул вычитается вклад самих биомолекул, что позволяет рассчитать спектры комплексной ДП водной фазы раствора ϵ_w^* .
3. После этого из спектров ϵ_w^* и ϵ_w^{0*} рассчитываются параметры, характеризующие межмолекулярную структуру и динамику водной фазы раствора биомолекул и растворителя.
4. Проводится сравнение значений параметров водной фазы раствора биомолекул со значениями параметров растворителя на предмет выявления отличий. Искомые отличия обусловлены тем, что водная фаза раствора биомолекул неоднородна. Её часть 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.

Следующий раздел посвящён описанию процедуры измерения спектров растворов в ТГц области. Для этого использовался метод THz-TDS, с помощью которого измерялись спектры в

диапазоне 10-110 см⁻¹ с разрешением 4 см⁻¹. Применялся нестандартный алгоритм измерения спектров с использованием двух кювет разной толщины, который позволяет избежать практически всех оптико-спектральных артефактов. Метод THz-TDS позволяет одновременно измерять спектры пропускания $T(\omega)$ и коэффициента преломления $n(\omega)$, из которых прямо рассчитываются спектры комплексной ДП растворов согласно соотношениям:

$$\begin{aligned}\varepsilon'(\nu) &= n^2(\nu) - \left[\frac{\ln Tr(\nu)}{4\pi\nu l} \right]^2 \\ \varepsilon''(\nu) &= -\frac{n(\nu) \ln Tr(\nu)}{2\pi\nu l}\end{aligned}\quad (1)$$

где ε' и ε'' – действительная и мнимая части ДП, а $\nu = \frac{\omega}{2\pi c}$ – волновое число (ω – циклическая частота, c – скорость света в вакууме), которое наиболее часто используется для выражения частотной характеристики в ТГц диапазоне. Помимо спектров растворов биомолекул, измерялись также спектры растворителя (аналогичного раствора, но без биомолекул) и сухого вещества биомолекул (в виде плёнок или порошков), для которых аналогичным образом рассчитывались ДП.

В следующем разделе описана процедура расчёта ДП водной фазы растворов биомолекул ε_w^* путём вычитания диэлектрического вклада биомолекул ε_i^* из ДП их растворов ε_s^* . Данная процедура реализовывалась с использованием моделей эффективной среды. Для растворов моносахаридов и АТФ (см. далее) использовалась модель Максвелла Гарнетта:

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

где f_i – объёмная доля биомолекул в растворе. Для растворов белка и фосфолипидных липосом (см. далее) использовалась модель Бруггемана:

$$f_i \frac{\varepsilon_i^* - \varepsilon_s^*}{\varepsilon_i^* + 2\varepsilon_s^*} + (1 - f_i) \frac{\varepsilon_w^* - \varepsilon_s^*}{\varepsilon_w^* + 2\varepsilon_s^*} = 0. \quad (3)$$

Для растворов протяжённых биополимеров, таких как ДНК и полисахариды (см. далее), в электродинамике не существовало подходящих моделей. В связи с этим в настоящей работе была разработана теоретическая модель эффективной среды, применимая для растворов протяжённых биомолекул, что детально описано в следующем разделе.

Рассматривается двухфазный диэлектрик, сначала в статическом электрическом поле, а затем проводится обобщение на переменные поля в ТГц области частот с соответствующими обоснованиями. В основу данной теории заложены базовые соотношения электродинамики сплошных сред [1]:

$$\mathbf{P} = \alpha \mathbf{E}, \quad \mathbf{D} = \mathbf{E} + 4\pi \mathbf{P}, \quad \mathbf{D} = \varepsilon \mathbf{E}, \quad (4)$$

где \mathbf{E} – напряжённость электрического поля, \mathbf{P} – поляризация, α – поляризуемость, \mathbf{D} – электрическая индукция, ε – диэлектрическая проницаемость.

Эффективная диэлектрическая проницаемость ε_{eff} двухфазного диэлектрика определяется следующим образом:

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

$$\frac{1}{V} \int \varepsilon_1 \mathbf{E}_1(\mathbf{r}) dV_1 + \frac{1}{V} \int \varepsilon_2 \mathbf{E}_2(\mathbf{r}) dV_2 = \varepsilon_{eff} \frac{1}{V} (\int \mathbf{E}_1(\mathbf{r}) dV_1 + \int \mathbf{E}_2(\mathbf{r}) dV_2), \quad (5)$$

где ε_1 и ε_2 – ДП обеих фаз; $\mathbf{E}_1(\mathbf{r})$ и $\mathbf{E}_2(\mathbf{r})$ – электрическое поле в каждой из фаз, в общем случае зависящее от координаты \mathbf{r} ; интегрирование проводится по объёму каждой фазы V_1 и V_2 (общий рассматриваемый объём $V = V_1 + V_2$), Далее решается задача получения зависимости ε_{eff} от ε_1 , ε_2 и других параметров.

В данной теории рассматривается сплошная среда ε_1 с однородными включениями нитевидной формы ε_2 , характеризующимися плавными изгибами и неизменной толщиной по всей длине. При рассмотрении поля в любой точке такого включения можно выделить фрагмент с длиной много больше толщины и с равноудалёнными от этой точки концами (рисунок 1). Ввиду описанных характеристик включений, всегда можно выбрать такой фрагмент, чтобы его форму можно было в первом приближении считать цилиндрической. Направление оси выделенного цилиндра описывается углом θ относительно направления электрического поля в среде \mathbf{E}_1 .

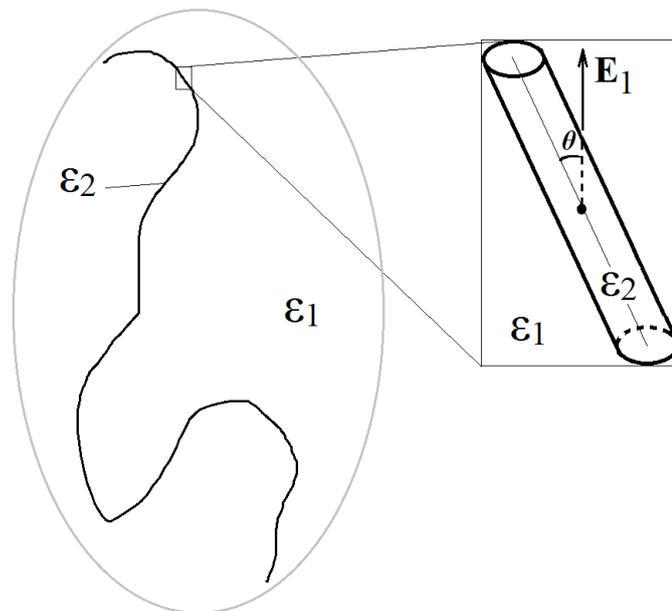


Рисунок 1. Выделение длинного приблизительно цилиндрического фрагмента нитевидного диэлектрического включения ε_2 , находящегося в однородном диэлектрике ε_1 с напряжённостью электрического поля \mathbf{E}_1 .

Решение задачи для электрического поля \mathbf{E}_2 в длинном диэлектрическом цилиндре выглядит следующим образом:

$$\mathbf{E}_2 = E_1 * \cos \theta * \mathbf{l} + E_1 * \frac{2\varepsilon_1}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2} * \sin \theta * \mathbf{n}, \quad (6)$$

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 .

При хаотическом расположении включений можно считать, что в рассматриваемой системе все направления выделяемых цилиндров равноправны. Также очевидно, что усреднённое по объёму включений поле $\overline{\mathbf{E}_2}$ будет сонаправлено единственному выделенному направлению в системе \mathbf{E}_1 . Проводится усреднение проекции вектора \mathbf{E}_2 на вектор \mathbf{E}_1 по всем направлениям оси цилиндров, что позволяет из формулы (5) получить соотношение:

$$(1 - f_2)\varepsilon_1 + \frac{f_2\varepsilon_2}{3} \left(\frac{5\varepsilon_1 + \varepsilon_2}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2} \right) = \varepsilon_{eff} \left(1 - f_2 + \frac{f_2}{3} \left(\frac{5\varepsilon_1 + \varepsilon_2}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2} \right) \right), \quad (7)$$

где f_2 – объёмная доля включений. Также в работе получена, но не применяется более общая формула для случая, когда диэлектрические проницаемости в поле, поперечном ε_2^n и продольном ε_2^t относительно оси нитевидного включения, отличаются. В случаях малых концентраций включений может использоваться упрощённый вариант формулы (7):

$$\varepsilon_{eff} \approx \varepsilon_1 + f_2 \frac{(\varepsilon_2 - \varepsilon_1)(5\varepsilon_1 + \varepsilon_2)}{3(\varepsilon_1 + \varepsilon_2)}. \quad (8)$$

Далее полученная модель эффективной среды для статического поля обобщается на случай переменных полей путём введения комплексной диэлектрической проницаемости, которая способна учитывать диэлектрические потери и частотно зависимый сдвиг фаз между векторами \mathbf{E} , \mathbf{P} и \mathbf{D} в соотношениях (4). Обосновывается правомерность такого обобщения для растворов протяжённых биомолекул. Дополнительно была проведена экспериментальная проверка полученной модели эффективной среды на примере водного раствора ДНК в ТГц области, которая показала высокую точность.

В следующем разделе **Главы 2** представлена методика расчёта параметров, описывающих структурно-динамические характеристики воды в анализируемых растворах. Для этого производился фитинг модельной ДП воды к экспериментальным ДП водной фазы растворов биомолекул и растворителей. Модельная ДП строилась с учётом всех основных процессов молекулярной динамики воды, ответственных за наличие областей дисперсии в ТГц области (рисунок 2):

$$\varepsilon_w^* = \frac{\Delta\varepsilon_1}{1 - i\omega\tau_1} + \frac{\Delta\varepsilon_2}{1 - i\omega\tau_2} + \frac{A_1}{\omega_1^2 - \omega^2 - i\omega\gamma_1} + \varepsilon_\infty + i \frac{\sigma_0}{\varepsilon_0\omega}. \quad (9)$$

Первый член (9) описывает ориентационную релаксацию связанных молекул воды (Дебаевская релаксация) [2-4]. Они могут быть связаны водородными связями в структуре невозмущённой воды или под влиянием кулоновского поля ионов в гидратных оболочках. Параметр τ_1 отражает характерное время существования молекул воды в связанном состоянии, а $\Delta\varepsilon_1$ определяет вклад данного процесса в общую поляризацию. Второй член (9) описывает более быстрый молекулярно-динамический процесс в водных растворах, который относят к ориентационной релаксации свободных молекул воды [5-8]. Под свободными понимаются молекулы, не связанные ни одной водородной связью и не находящиеся в сильном кулоновском поле ионов. Возможно, данная фракция молекул содержит некоторую примесь слабо связанных молекул воды, например, молекул с одной сильно искажённой водородной связью, но данный вопрос пока открыт в мировой науке. Далее в тексте эти молекулы воды будут называться «свободными» без дополнительных уточнений. Параметр τ_2 характеризует время переориентации свободных молекул воды, а $\Delta\varepsilon_2$ определяет вклад данного процесса в общую поляризацию. Третий член формулы (9) соответствует продольным трансляционным межмолекулярным колебаниям молекул воды, связанных водородными связями [9-11]. Параметры A_1 , ω_1 и γ_1 – амплитуда, резонансная частота и ширина данной колебательной полосы, соответственно. ε_∞ – высокочастотная ДП (характерная ДП воды в области частот выше ω_1), ω – циклическая частота, i – мнимая единица. Последний член описывает диэлектрические потери, связанные с ионной проводимостью (σ_0 – проводимость в постоянном электрическом поле, ε_0 – электрическая постоянная).

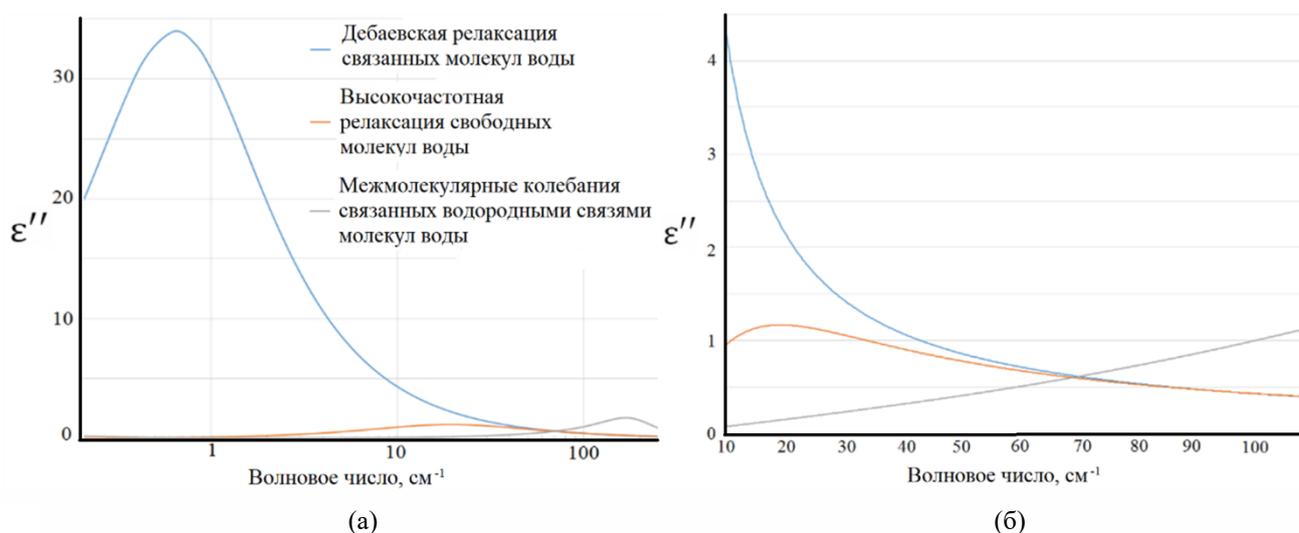


Рисунок 2. Разложение на полосы мнимой части ДП воды при 25°C: (а) в широкой области частот, (б) в области измеряемых спектров (10-110 см⁻¹).

Отдельно стоит отметить, что математическая запись релаксационных и колебательных молекулярных процессов в формуле (9) является стандартным выражением, взятым из теории

диэлектрической спектроскопии. В ряде случаев в дебаевский член добавляют дополнительные степенные параметры, однако в настоящей работе они существенно увеличили бы неопределённость в расчётах и не привели к увеличению информативности.

Модельная диэлектрическая проницаемость (9) содержит 9 параметров: $\Delta\varepsilon_1$, τ_1 , $\Delta\varepsilon_2$, τ_2 , A_1 , ω_1 , γ_1 , ε_∞ , σ_0 , но некоторые исключались из рассмотрения. Параметр σ_0 определялся с помощью прямых измерений проводимости. Параметр высокочастотной диэлектрической проницаемости ε_∞ приравнивался величине 2.5, соответствующей действительной части ДП воды около 300 см^{-1} .

Как известно, при усилении связанности молекул воды (например, в гидратных оболочках) происходит уменьшение амплитуды дебаевской полосы $\Delta\varepsilon_1$ и сдвиг максимума в сторону меньших частот (возрастает время релаксации τ_1). В анализируемой частотной области выполняется соотношение $\omega\tau_1 \gg 1$, значит по первому члену модельная ДП (9) зависит от отношения $\Delta\varepsilon_1/\tau_1$. Из этого следует, что изменение спектра с уменьшением $\Delta\varepsilon_1$ аналогично увеличению τ_1 , и при этом обе тенденции обладают одинаковым смыслом – усиление связанности воды. Поэтому в процессе фитинга варьировался параметр $\Delta\varepsilon_1$, а параметр τ_1 фиксировался на значении для чистой воды при заданной температуре. В итоге, в модели (9) остались следующие варьлируемые параметры: $\Delta\varepsilon_1$, $\Delta\varepsilon_2$, τ_2 , A_1 , ω_1 , γ_1 , которые рассчитывались.

В следующем разделе **Главы 2** описаны интерпретации каждого из рассчитываемых параметров модельной ДП (9). Поскольку в настоящей работе анализ гидратации биомолекул проводится на основе сравнения значений параметров водной фазы раствора биомолекул и растворителя, то и интерпретации имеет смысл приводить в контексте изменения значения каждого параметра при переходе от растворителя к раствору биомолекул. Напомним, поскольку часть водной фазы раствора биомолекул содержит гидратные оболочки, то и все отличия от растворителя обусловлены изменением состояния воды в них, следовательно, характеризуют их. Так, уменьшение $\Delta\varepsilon_1$ свидетельствует о наличии более сильно связанных молекул воды в гидратных оболочках. Увеличение/уменьшение $\Delta\varepsilon_2$, как и параметра n , отражает наличие большего/меньшего количества свободных молекул воды в гидратных оболочках. Увеличение/уменьшение τ_2 означает замедление/ускорение переориентации свободных молекул воды. Увеличение/уменьшение ω_1 говорит о большей/меньшей средней энергии водородных связей, а увеличение/уменьшение γ_1 – о большей/меньшей ширине распределения энергий водородных связей. Увеличение/уменьшение значения A_1 , при постоянном ω_1 , свидетельствует о большем/меньшем среднем количестве водородных связей между молекулами воды. При этом важно отметить, что параметры A_1 и ω_1 взаимосвязаны. По смыслу параметр A_1 связан не только с числом водородных связей, но и со средней амплитудой

межмолекулярных колебаний, а она зависит от их средней энергии [12]. Чем больше энергия водородной связи, тем больше частота ω_1 и меньше амплитуда. Поэтому изменение параметров A_1 и ω_1 необходимо рассматривать в комплексе. 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.

В следующем разделе **Главы 2** проводится теоретическое рассмотрение процесса ориентационной поляризации фракции свободных молекул в составе жидкой воды, с учётом экранировки со стороны всех более быстрых поляризационных процессов. В итоге такого рассмотрения получена формула для расчёта доли свободных молекул воды n в растворе с использованием параметров ДП (9):

$$n = \frac{3\Delta\varepsilon_2}{(\Delta\varepsilon_2 + A_1/\omega_1^2 + \varepsilon_\infty + 2)(A_1/\omega_1^2 + \varepsilon_\infty + 2)} * \frac{9kT\varepsilon_0}{Np^2}, \quad (10)$$

где kT – тепловая энергия, N – число молекул воды в единице объёма, p – дипольный момент молекулы воды, смысл остальных параметров аналогичен формуле (9). Доля свободных молекул воды в растворе является информативным параметром, поэтому он используется в дальнейшем, наряду с другими параметрами.

В следующем разделе **Главы 2** с использованием описанного выше подхода анализируется гидратация белка на примере бычьего сывороточного альбумина (БСА) с концентрацией 50 мг/мл в водном растворе при следующих значениях pH: 2.5, 4.2, 6, 8, 10. Для БСА установлено, что при каждом из указанных pH белок сохраняет стабильность, но имеет отличную от остальных конформацию. В таблице 1 даны значения параметров модельной ДП (9), рассчитанные для всех изученных растворов БСА и растворителей.

Таблица 1*. Параметры модельной ДП (9) водной фазы растворов БСА и растворителей (аналогичных водных растворов, но без БСА) при разных значениях pH.

Образец	$\Delta\varepsilon_1$	$\Delta\varepsilon_2$	τ_2 , пс	ω_1 , см ⁻¹	$\frac{A_1}{1000}$, см ⁻²	γ_1 , см ⁻¹
pH 2.5	69.4±1.0	2.55±0.05	0.308±0.005	189±4	50.2±3.1	177±10
БСА pH 2.5	68.1±0.5	2.69±0.05	0.308±0.007	185±3	50.7±2.0	175±7
pH 4.2	69.9±0.6	2.60±0.04	0.310±0.004	185±5	50.2±3.6	170±9
БСА pH 4.2	67.5±0.7	2.63±0.06	0.310±0.007	181±5	47.1±3.3	170±10
pH 6	68.7±0.5	2.61±0.04	0.313±0.005	186±3	50.8±2.2	173±6
БСА pH 6	68.2±0.5	2.66±0.04	0.310±0.006	184±3	49.5±1.7	174±6
pH 8	70.1±0.5	2.56±0.04	0.311±0.005	186±3	50.9±2.1	173±8

БСА рН 8	68.7±0.7	2.58±0.07	0.303±0.009	188±6	52.1±5.2	180±10
рН 10	68.7±0.7	2.58±0.05	0.309±0.005	182±3	46.3±1.9	168±6
БСА рН 10	65.6±0.6	2.88±0.03	0.332±0.003	185±4	50.6±3.2	181±8

*Результаты представлены в виде парных сравнений по каждому параметру водной фазы раствора БСА и растворителя при одинаковом рН. Температура всех растворов 25°C. Погрешность представляет собой 95% доверительные интервалы среднего с объёмом выборок 25. В первой колонке указано значение рН раствора, а также наличие или отсутствие БСА в нём. Жирным шрифтом отмечены пары сравниваемых значений параметров, между которыми обнаружена значимая разница.

Из таблицы 1 видно, что имеются отличия между водной фазой раствора белка и растворителем по разным параметрам, и для каждой конформации белка (определяемой рН) отличия свои. Это означает, что влияние молекулы белка на водную фазу отличается при различных конформациях. Говоря о влиянии белка на водную фазу, имеется в виду, что часть водной фазы раствора белка занята гидратными оболочками, которые по своей молекулярной организации отличаются от невозмущённой воды, такой как в растворителе или вдали от молекулы белка. 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.

Интересно отметить, что наименее выраженная гидратация белка реализуется в его нативной конформации (при рН 6), поскольку ни по одному параметру не обнаружено значимых отличий между водной фазой раствора белка и растворителем. При рН 4.2 и 8 гидратация белка характеризуется уменьшением параметра $\Delta\varepsilon_1$, что свидетельствует об усилении связанности воды в гидратных оболочках при этих конформациях. При рН 2.5 главной характеристикой гидратации белка является увеличение параметра $\Delta\varepsilon_2$, что говорит о повышенном количестве свободных молекул воды в гидратных оболочках. Данный результат объясняется тем, что при рН 2.5 белок в растворе пребывает в форме расплавленной глобулы, у которой гидрофобные участки молекулы частично экспонируются в воду, способствуя разрушению её структуры и увеличению количества свободных молекул воды.

Судя по величинам изменения параметров (таблица 1), наиболее сильные эффекты гидратации наблюдаются для конформации белка при рН 10. Поскольку это единственная конформация, сопряжённая с частичной агрегацией белка, возможно, наблюдаемые эффекты относятся к гидратации внутри агрегатов. Кроме существенно больших, чем у других конформаций, отличий по параметрам $\Delta\varepsilon_1$ и $\Delta\varepsilon_2$ между водной фазой раствора и растворителем, также зарегистрировано значимое увеличение по параметру τ_2 . Этот результат труднообъясним на основании только имеющихся данных. Однако, исходя из общих соображений, можно высказать предположение. Гидратная оболочка белка содержит молекулы воды разной степени связанности, в том числе, некоторую долю свободных. Существование свободной молекулы воды в жидкой фазе возможно только если она пребывает в некоторой

полости, «стенки» которой состоят из молекул с полностью занятыми вакансиями водородных связей. Чем меньше размер такой молекулярной полости, тем большее замедляющее воздействие она оказывает на ориентационную релаксацию свободных молекул. Предположительно, в гидратных оболочках БСА при pH 10 в среднем эти полости более компактны, чем в невозмущённой воде, что и выражается в увеличении времени τ_2 . Однако для полноценного прояснения данного вопроса необходимы дополнительные исследования, возможно, с использованием молекулярного моделирования.

Как следует из таблицы 1, наряду с отличиями гидратации белка в разных конформациях, видны и некоторые общие закономерности. Если судить по средним значениям параметров, для каждой конформации у раствора БСА наблюдается меньшее значение $\Delta\varepsilon_1$ и большее значение $\Delta\varepsilon_2$ по сравнению с растворителем. Уменьшение величины $\Delta\varepsilon_1$ в растворе белка свидетельствует об увеличении связанности молекул воды в гидратной оболочке, но одновременно с этим увеличение $\Delta\varepsilon_2$ говорит об увеличении доли свободных молекул воды. На первый взгляд, эти две тенденции вступают в противоречие друг с другом. Объяснение данного явления 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 сильного связывания молекул воды белком. То есть условно можно говорить о двухслойной гидратной оболочке: сильно связанная (первичная) и частично разрушенная (вторичная). Можно предположить, что описанная специфика молекулярной организации гидратных оболочек белков является одной из фундаментальных характеристик протяжённых динамических гидратных оболочек, зарегистрированных методом ТГц спектроскопии во многих работах [13-16]. В дальнейшем будет показано, что указанная характеристика гидратации прослеживается и для других типов биомолекул: АТФ (таблица 3), ДНК (таблица 4), сахаров (таблица 5), то есть является одной из универсальных характеристик гидратации биомолекул.

В следующем разделе **Главы 2** анализируется гидратация фосфолипидов на модели водной суспензии больших однослойных DPPC липосом с концентрацией 20 мг/мл в трёх фазовых состояниях, определяемых температурой [17]: фаза гель ($L_{\beta'}$) при 30°C, риппл-фаза ($P_{\beta'}$) при 40°C и жидкий кристалл (L_{α}) при 45°C. В таблице 2 даны параметры водной фазы исследованных суспензий фосфолипидов и их буферного раствора при трёх температурах.

Таблица 2*. Параметры модельной ДП (9) водной фазы суспензии DPPC липосом и буферного раствора при разных температурах, а также процент свободных молекул воды n в них.

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	203±9	67±11	180±20	3.27±0.08
DPPC (гель) 30°C	70.6±0.1	2.11±0.07	0.252±0.008	183±7	46±6	159±16	3.49±0.08
Буфер 40°C	67.2±0.1	2.06±0.02	0.264±0.004	187±2	50±2	183±5	3.38±0.02
DPPC (рипл-фаза) 40°C	67.4±0.1	1.84±0.06	0.248±0.007	192±5	53±4	193±10	3.11±0.07
Буфер 45°C	65.7±0.2	1.98±0.11	0.257±0.015	183±6	46±5	177±13	3.32±0.12
DPPC (жидкий кристалл) 45°C	65.8±0.1	1.84±0.02	0.243±0.004	199±3	58±2	211±9	3.07±0.03

*Результаты представлены в виде парных сравнений значений 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.

Из таблицы 2 следует, что при температуре 30°C в гидратных оболочках липосом в фазе гель обнаруживается ослабление энергии водородного связывания молекул воды (ω_1 меньше) и уменьшение числа водородных связей (A_1 меньше) по сравнению с невозмущённой водой (в буферном растворе). Также гидратные оболочки липосом характеризуются большим количеством свободных молекул воды n . Очевидно, все три тенденции согласуются друг с другом: молекулы воды связаны слабее, поэтому образуется больше свободных молекул.

При температуре 40°C наблюдается противоположное влияние липосом в риппл-фазе на гидратную оболочку, по сравнению с влиянием фазы гель (при 30°C). 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): $\Delta\varepsilon_1$ увеличивается, а $\Delta\varepsilon_2$ уменьшается примерно на 0.2 (таблица 2), что может быть интерпретировано как переход части свободных молекул воды в состояние связанных в результате гидратации. Кроме того, гидратация липосом в риппл-фазе характеризуется уменьшением τ_2 . Данная тенденция для липосом противоположна гидратации белка в частично агрегированной форме (таблица 1), для которой характерно увеличение параметра τ_2 . Как и в случае с белком детальное объяснение этого эффекта требует дополнительных данных.

При температуре 45°C гидратация липосом в жидкокристаллической фазе, также как в риппл-фазе, характеризуется уменьшением количества свободных молекул воды n . Дополнительно отмечаются большие значения параметров A_1 , ω_1 и γ_1 . Это означает, что в гидратных оболочках липосом в жидкокристаллической фазе реализуется большее количество водородных связей (судя по A_1) и их большая средняя энергия (судя по ω_1), чем в невозмущённой воде. Из этого следует, что связывание воды в гидратных оболочках липосом в

жидкокристаллической фазе является более сильным, чем в случае риппл-фазы. Большая ширина энергетического распределения водородных связей (γ_1) в совокупности с отмеченной большей средней энергией (ω_1) свидетельствует о наличии в гидратных оболочках фракции более сильных водородных связей (по сравнению с невозмущённой водой), приводящих к уширению энергетических распределений в сторону больших энергий.

Анализ гидратации DPPC липосом при трёх температурах показывает, что с ростом температуры от 30 до 45°C влияние липосом на гидратную оболочку меняется от ослабления межмолекулярного водородного связывания до противоположного – усиления. Судя по параметру n видно, что смена знака эффекта происходит в области предперехода (гель – риппл-фаза). Это особенно интересно в связи с тем, что данный полиморфный переход принято считать второстепенным по сравнению с основным фазовым переходом (риппл-фаза – жидкий кристалл). Энтальпия основного фазового перехода в 7 раз больше, чем энтальпия предперехода, то есть основной переход термодинамически намного более значим. Тем не менее, оказывается, что именно предпереход приводит к принципиальным изменениям в структурно-динамических характеристиках гидратной оболочки липосом, а основной переход лишь количественно усиливает тенденции, наметившиеся после предперехода.

Полученные данные могут быть использованы для оценки толщины гидратных оболочек липосом. Рассмотрим данные таблицы 2 при 40°C, где зарегистрировано максимальное отличие доли свободных молекул воды n с учётом погрешности. Суспензия липосом отличается от буферного раствора по величине n как минимум на 0.18% в меньшую сторону, при этом в буферном растворе $n \approx 3.38\%$. Поскольку таблица 2 содержит значения параметров, усреднённые по объёму, то для водной фазы суспензии липосом мы имеем усреднённое значение с учётом гидратной и не гидратной воды. Проводится расчёт минимальной объёмной доли гидратной воды, обеспечивающей снижение среднего процента свободных молекул на 0.18% от значения 3.38%. В предельном предположении полного отсутствия свободных молекул в гидратных оболочках, расчёт даёт минимальную объёмную долю гидратной воды 5.3%. Зная объёмную долю фосфолипида в растворе (2%) и толщину фосфолипидного бислоя (4 нм), можно рассчитать общую площадь гидрофильной поверхности липосом в единице объёма суспензии: 10^5 см^2 в 1 мл. Распределив весь объём гидратной воды 53 мкл по этой площади, получаем минимальную протяжённость гидратных оболочек липосом 5.3 нм. Это минимальное расстояние от поверхности липосомы, до которого использующийся подход на основе ТГц спектроскопии косвенно регистрирует изменение структурно-динамических характеристик водной фазы.

В некоторых работах оценивали толщину гидратных оболочек с использованием ТГц спектроскопии для растворов моно- и дисахаридов – 0.3-0.6 нм [18], белков – 1-2 нм [13,16]. Полученное значение для липосом (более 5 нм) является минимальной оценкой, но даже оно превышает указанные значения для сахаров и белков. Это, по-видимому, связано с размером объекта, возле которого формируется гидратная оболочка. Можно видеть, как с ростом размера – моносахарид, белок, липосома – возрастает толщина гидратации.

Следующий раздел **Главы 2** посвящён изучению гидратации АТФ. Рассматривались следующие водные образцы: 1) вода; 2) раствор 40 мМ АТФ; 3) раствор 40 мМ MgCl₂; 4) раствор, содержащий АТФ и MgCl₂ по 40 мМ. Константа связывания АТФ с Mg²⁺ очень велика, около 9550 М⁻¹, поэтому подавляющее большинство молекул АТФ в последнем растворе пребывает в виде комплекса Mg·АТФ. То есть изучение гидратации АТФ в растворе MgCl₂ сводится, в сущности, к изучению гидратации Mg·АТФ. Хорошо известно, что практически во всех биологически значимых реакциях участвует именно комплекс Mg·АТФ. То есть сравнение гидратации АТФ и Mg·АТФ представляет непосредственный интерес для молекулярной биофизики. Параметры указанных растворов приведены в таблице 3.

Таблица 3*. Параметры модельной ДП (9) водной фазы растворов АТФ и 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	68.9±0.8	2.69±0.04	0.316±0.006	207±4	197±11	1.70±0.02
АТФ в воде	66.5±0.8	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	1.710±0.016
АТФ в растворе MgCl ₂ (Mg·АТФ)	66.4±0.7	2.75±0.03	0.318±0.005	215±4	216±10	1.748±0.017

*Представлено попарное сравнение растворов АТФ с используемыми растворителями – вода и раствор 40 мМ MgCl₂. Температура всех растворов 25°C. Разброс покрывает 95% доверительные интервалы среднего с объёмом выборок 30. Жирным шрифтом выделены пары значений, между которыми зарегистрированы значимые отличия.

Из таблицы 3 следует, что гидратация АТФ проявляется в уменьшении параметра $\Delta\epsilon_1$. При гидратации Mg·АТФ значимого уменьшения $\Delta\epsilon_1$ не обнаружено, но регистрируется увеличение A_1/ω_1^2 . Полученные отличия по параметру $\Delta\epsilon_1$ объясняются зарядовой структурой АТФ. Молекула АТФ содержит три фосфатные группы и в данных экспериментальных условиях находится, большей частью, в виде четырёхзарядного иона АТФ⁴⁻. Как известно, фосфатные группы сильно связывают воду, что и выражается в уменьшении величины $\Delta\epsilon_1$ при гидратации АТФ. При связывании АТФ с Mg²⁺ заряд фосфатов сильно экранируется, в результате связывание молекул воды с Mg·АТФ оказывается существенно слабее. Видимо, поэтому для Mg·АТФ нет значимого уменьшения по параметру $\Delta\epsilon_1$. Скорее всего, при гидратации Mg·АТФ параметр $\Delta\epsilon_1$ тоже уменьшается, но гораздо слабее (попадает в пределы погрешности), по сравнению с АТФ в воде. Увеличение параметра A_1/ω_1^2 как характеристика

гидратации $Mg \cdot AT\Phi$ позволяет утверждать о наличии большего количества водородных связей в гидратных оболочках $Mg \cdot AT\Phi$ по сравнению с невозмущённой водой.

Полученные данные показывают, что гидратация $AT\Phi$ и $Mg \cdot AT\Phi$ принципиально отличается. $AT\Phi$ искажает структуру воды за счёт её сильного связывания, тогда как $Mg \cdot AT\Phi$, наоборот, структуру воды упорядочивает, способствуя образованию дополнительных водородных связей в гидратных оболочках. Этот вывод косвенно подтверждается результатами измерений размера (гидродинамического диаметра) $AT\Phi$ (в воде) и $Mg \cdot AT\Phi$ ($AT\Phi$ в растворе $MgCl_2$) методом динамического светорассеяния. Оказалось, что размер $Mg \cdot AT\Phi$ (1.46 ± 0.05 нм) примерно в полтора раза больше, чем $AT\Phi$ (0.98 ± 0.27 нм). Это может означать, что гидратная оболочка $Mg \cdot AT\Phi$ обладает большей жёсткостью или большей протяжённостью, что согласуется со сделанными выше заключениями о большем количестве водородных связей в гидратных оболочках $Mg \cdot AT\Phi$.

Из представленных данных о размерах молекул следует, что гидратная оболочка $Mg \cdot AT\Phi$ примерно на 0.25 нм толще, чем у $AT\Phi$. Это соответствует 1-2 дополнительным слоям молекул воды. По-видимому, такая оценка занижена, поскольку при слабом отличии свойств гидратной оболочки от невозмущённой воды нельзя говорить о чёткой границе между ними. Более вероятно, что при удалении от $Mg \cdot AT\Phi$ свойства воды постепенно уравниваются со свойствами невозмущённой воды, а 0.25 нм – это характерный размер, регистрируемый методом динамического светорассеяния.

Обсуждаются две гипотезы о физических принципах, лежащих в основе описанного влияния Mg^{2+} на гидратацию $AT\Phi$: экранировка заряда фосфатных групп и изменение дипольного момента всей молекулы $AT\Phi$. Однако сделать выбор в пользу одного из вариантов не представляется возможным на основании только имеющихся данных.

В следующем разделе **Главы 2** проводится изучение гидратации ДНК на примере плазмидной ДНК рЕТ-11с в кольцевой (релаксированной) форме с концентрацией 25 мг/мл. Растворы ДНК готовили в трёх водных растворителях: вода, 40 мМ $MgCl_2$ и 150 мМ KCl . В таблице 4 приведены значения параметров водной фазы растворов ДНК и их растворителей.

Таблица 4*. Параметры модельной ДП (9) водной фазы растворов ДНК и их растворителей, а также процент свободных молекул воды n в них.

Образец	$\Delta\varepsilon_1$	$\Delta\varepsilon_2$	τ_2 , пс	ω_1 , cm^{-1}	A_1/ω_1^2	γ_1 , cm^{-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). Температура всех растворов 25°C. Разброс представляет собой 95% доверительные интервалы среднего с числом повторов 35. Жирным шрифтом обозначены пары сравниваемых значений, между которыми обнаружены значимые отличия.

На основании данных таблицы 4 можно выделить общие закономерности гидратации ДНК для всех использованных растворителей. Гидратация ДНК характеризуется усилением связывания воды (уменьшение $\Delta\varepsilon_1$), увеличением количества свободных молекул воды (увеличение $\Delta\varepsilon_2$ и n), увеличением количества водородных связей (увеличение A_1/ω_1^2), а также увеличением времени релаксации свободных молекул (τ_2). Проявления гидратации ДНК по параметрам $\Delta\varepsilon_1$, n и $\Delta\varepsilon_2$, A_1/ω_1^2 могут быть истолкованы как наличие трёх структурных фракций воды в гидратной оболочке ДНК, отличающих её от невозмущённой воды: более сильно связанные молекулы, область с большим числом свободных молекул и область с повышенным количеством водородных связей.

Рассмотрен вопрос распределения указанных трёх фракций относительно молекулы ДНК (рисунок 3). Известно, что наиболее сильное связывание молекул воды происходит вблизи фосфатных групп. Как уже обсуждалось применительно к белку, за пределом сильно связанного первичного гидратного слоя может формироваться область с бóльшим содержанием свободных молекул воды, в данном случае расположенная вдоль сахарофосфатного остова.

Фракция молекул воды с повышенным количеством водородных связей, по-видимому, находится в желобках молекулы ДНК. В области желобков имеется множество доноров и акцепторов водородных связей со стороны азотистых оснований (эндоциклические атомы азота, экзоциклические кетогруппы и аминокетогруппы), способствующих водородному связыванию воды. Формирование особого структурированного слоя молекул воды в желобках ДНК было показано во множестве работ, в частности, известно такое понятие как «хребет гидратации». Увеличение количества водородных связей было отмечено также для гидратных оболочек Mg·АТФ (таблица 3) и будет показано для моносахаридов (таблица 5). То есть это одно из универсальных проявлений гидратации биомолекул.

Проанализировано влияние ионов Mg²⁺ и K⁺ на гидратные оболочки ДНК. Как было отмечено выше, гидратация ДНК может быть охарактеризована изменением параметров $\Delta\varepsilon_1$, n ,

A_1/ω_1^2 , τ_2 (при переходе от растворителя к водной фазе раствора ДНК). Как следует из таблицы 4, каждый из указанных параметров однонаправленно изменяется для всех трёх растворителей. 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 водой и раствором $MgCl_2$. Очевидно, это не может объясняться отличием в ионной силе использующихся растворителей, а причина кроется в специфическом влиянии катионов Mg^{2+} и K^+ .

На рисунке 3 схематично показаны различия гидратации ДНК при наличии и отсутствии Mg^{2+} в растворе. Хорошо известно, что ионы Mg^{2+} связываются преимущественно с фосфатными группами, поэтому при умеренных концентрациях ионы Mg^{2+} сосредоточены вблизи них. В отсутствие Mg^{2+} каждая фосфатная группа обладает зарядом -1 . При этом реализуется ион-дипольное и частично водородное связывание отрицательно заряженной фосфатной группы с положительными сайтами молекулы воды. При связывании фосфата с Mg^{2+} его заряд меняется с -1 на $+1$ и реализуется похожее взаимодействие с отрицательными сайтами молекулы воды. То есть связывание фосфатов с Mg^{2+} приводит только к изменению ориентации молекул воды в первичной гидратной оболочке. При этом сильно связанный с фосфатами первичный гидратный слой и область с большим количеством свободных молекул воды за его пределами не претерпевают существенных изменений при появлении в растворе Mg^{2+} . Будучи локализованы вблизи фосфатных групп, ионы Mg^{2+} не способны сильно влиять и на характеристики воды в желобках, ввиду удалённости. Поэтому фракция молекул воды с повышенным количеством водородных связей в желобках также не изменяется под действием Mg^{2+} . В итоге, гидратные оболочки ДНК в рамках анализируемых критериев не должны сильно отличаться в воде и растворе $MgCl_2$, что согласуется с экспериментальными данными.

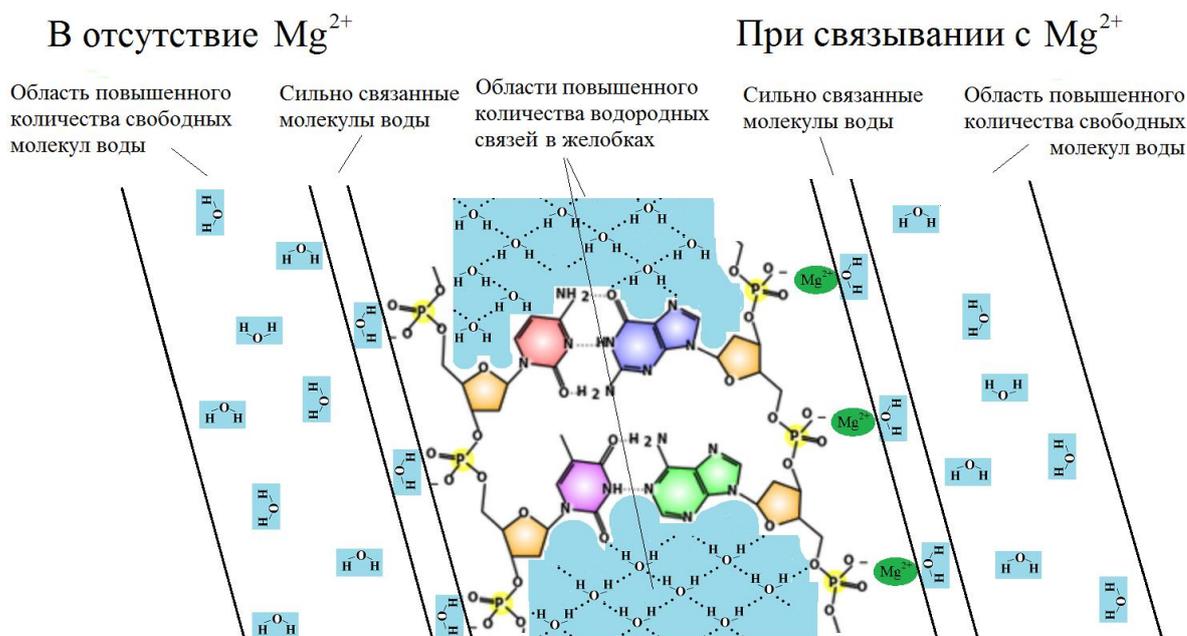


Рисунок 3. Схематичное изображение ДНК с указанием возможного распределения трёх фракций гидратации: сильно связанных молекул, область с большим количеством свободных молекул и область с повышенным числом водородных связей. Показано отсутствие принципиальной разницы в гидратации при наличии и отсутствии катионов Mg^{2+} .

Катионы K^+ , в отличие от Mg^{2+} , не имеют преимущественных сайтов связывания с ДНК, поэтому способны эффективно проникать в гидратную оболочку ДНК как вблизи сахарофосфатного остова, так и в желобках. K^+ является ионом с отрицательной гидратацией, то есть он способен навязывать водному раствору частично разрушенную структуру своих гидратных оболочек. Из этого следует, что ионы K^+ способствуют ослаблению выраженности всех трёх описанных фракций гидратной воды и уменьшению её отличий от не гидратной воды. Описанные характеристики гидратации ДНК и их специфическая зависимость от катионов могут иметь и биологический смысл. Не исключено, что описанное действие K^+ с внутриклеточной концентрацией (150 мМ) на гидратную оболочку ДНК является одним из факторов, важных для молекулярно-биологических процессов.

Было также проведено сравнение обсуждаемых закономерностей гидратации ДНК (таблица 4) и АТФ (таблица 3). Гидратация АТФ в воде и растворе $MgCl_2$ характеризуется уменьшением $\Delta\epsilon_1$ и увеличением $\Delta\epsilon_2$, A_1/ω_1^2 (судя по средним значениям этих параметров). Для ДНК в воде и растворе $MgCl_2$ регистрируются изменения тех же параметров в тех же направлениях. Однако изменения указанных параметров для ДНК оказывается в 1.5-8 раз больше, чем для АТФ (в пересчёте на одинаковую молярность 40 мМ растворов по нуклеотидам). Это, очевидно, объясняется кооперативными эффектами гидратации, то есть если один нуклеотид определённым образом модифицирует состояние воды вблизи себя, то

нуклеотиды, объединённые в протяжённый полимер ДНК, приводят к тем же изменениям, но более выраженным и в большем объёме.

В следующем разделе **Главы 2** описано изучение гидратации сахаров, указанных на рисунке 4. Растворы всех сахаров были уравнены по концентрации моносахаридов – 277.5 мМ, что позволяло проводить корректное сравнение характеристик гидратации между ними.

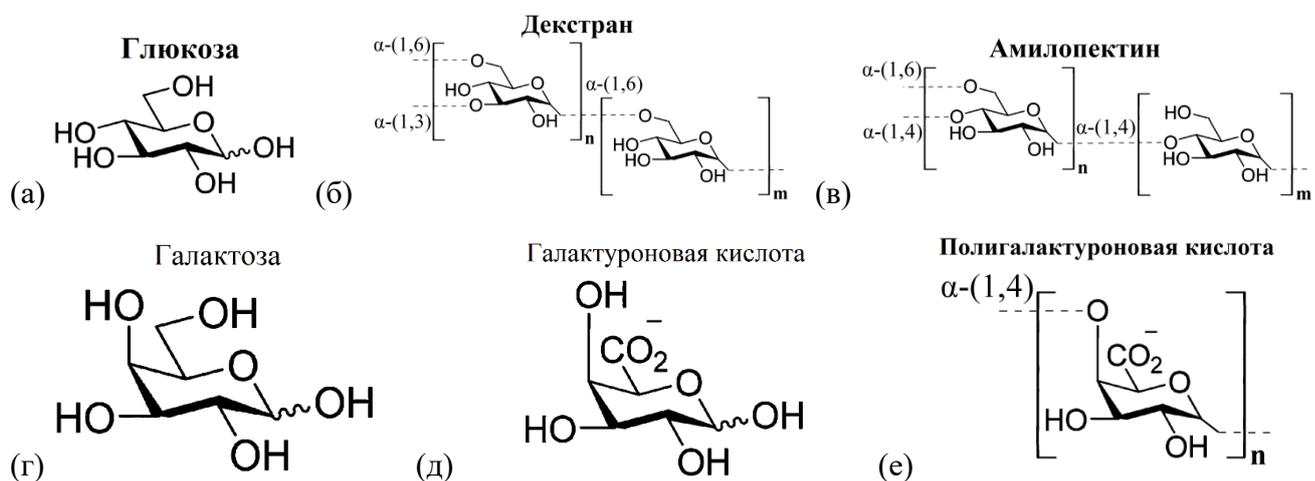


Рисунок 4. Структурные формулы изучаемых сахаров: (а) глюкоза; (б) декстран и (в) амилопектин (полисахариды на основе глюкозы); (г) галактоза (стереоизомер глюкозы); (д) галактуроновая кислота; (е) полигалактуроновая кислота (полисахарид галактуроновой кислоты).

Для расчёта ДП водной фазы растворов моносахаридов использовалась модель эффективной среды Максвелла Гарнетта (2), а для полисахаридов – разработанная в настоящей работе модель (7). Измерение ДП сухих полисахаридов производилось в смеси с порошком полиэтилена в виде таблеток, спрессованных под давлением 7.5 кбар. ДП сухих моносахаридов измерялись в виде аморфных плёнок, полученных с помощью специально разработанной в настоящей работе процедуры стеклования. Аморфное состояние необходимо для корректного применения модели эффективной среды, в которой нужно использовать ДП сухих образцов с хаотическим расположением молекул (как в растворе). Без процедуры стеклования моносахариды пребывают в виде кристаллов, ДП которых содержат фоновые полосы, отсутствующие у молекул в растворе. Значения параметров водной фазы растворов сахаров и воды содержатся в таблице 5.

Таблица 5. Значения параметров модельной ДП (9) и процент свободных молекул воды n , рассчитанные для водной фазы растворов сахаров и воды при 25°C.

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 35.

Из таблицы 5 следует, что независимо от типа молекул сахаров, для водной фазы их растворов характерно меньшее значение параметра $\Delta\epsilon_1$ по сравнению с водой. Это свидетельствует об усилении связанности воды в гидратных оболочках, что объясняется гидрофильной природой рассматриваемых сахаров. По остальным параметрам наблюдается большое разнообразие отличий в зависимости от молекулярной структуры сахара.

Для гидратных оболочек моносахаридов – глюкозы, галактозы, галактуроновой кислоты – отмечаются большие значения параметров $\Delta\epsilon_2$, τ_2 , ω_1 , A_1/ω_1^2 , n по сравнению с водой. Большие значения $\Delta\epsilon_2$ и n свидетельствуют о наличии в гидратных оболочках моносахаридов большего количества свободных молекул воды по сравнению с невозмущённой водой. Аналогичное проявление гидратации для белка (таблица 1) и ДНК (таблица 4) объяснялось наличием частично разрушенного слоя отдалённой гидратации, что уместно обобщить и для данного случая. Большее значение ω_1 свидетельствует об усилении водородных связей в гидратных оболочках. Это подтверждается известными данными [19,20] о большей энергии водородных связей молекул воды с ОН-группами сахаров, чем связей вода-вода. Большее значение параметра A_1/ω_1^2 свидетельствует о большем количестве водородных связей в гидратных оболочках моносахаридов, что, очевидно, связано с наличием пяти ОН-групп у каждого моносахарида. Увеличение τ_2 свидетельствует о замедлении ориентационной релаксации свободных молекул воды в гидратных оболочках моносахаридов. Изменение данного параметра при гидратации было также обнаружено для молекул белка в частично агрегированной форме (таблица 1), DPPC липосом в риппл-фазе (таблица 2), ДНК (таблица 4).

Рассматривается отличие гидратации глюкозы и галактозы по параметру γ_1 . Эти два стереоизомера отличаются только ориентацией ОН(4) группы: у глюкозы она экваториальная (рисунок 4а), а у галактозы – аксиальная (Рисунок 4г). При этом параметр γ_1 , характеризующий ширину распределения энергии водородных связей, существенно больше для раствора галактозы, чем для раствора глюкозы или воды (таблица 5). Раствор галактуроновой кислоты, обладающей аксиальной ориентацией ОН(4) группы, тоже характеризуется значимо большим

значением γ_1 по сравнению с раствором глюкозы и водой. В ряде работ на основании данных ЯМР и сжимаемости было показано, что от взаимной ориентации ОН-групп моносахарида сильно зависят характеристики гидратации. В настоящей работе с использованием предлагаемого подхода на основе ТГц спектроскопии это тоже обнаружено.

Из таблицы 5 видно, что растворы полисахаридов декстрана и амилопектина, в сравнении с раствором составляющего их моносахарида глюкозы, существенно меньше отличаются от воды по всем параметрам. Похожая закономерность прослеживается при сравнении растворов галактуроновой и полигалактуроновой кислоты. Меньшие отличия от воды растворов полисахаридов по сравнению с эквимольными растворами моносахаридов означают, что полисахариды формируют менее выраженные гидратные оболочки, чем моносахариды. Это можно объяснить тем, что в полисахариде каждая связь между моносахаридами образуется с потерей двух ОН-групп. Очевидно, для сахаров ОН-группы являются основным фактором гидратации, а при снижении их количества гидратация ослабевает. Это принципиально отличает характеристики гидратации сахаров от гидратации нуклеиновых кислот. Как было показано выше, ДНК проявляет кооперативные эффекты гидратации.

Из таблицы 5 видно также значимое отличие между амилопектином и декстраном по связанности воды ($\Delta\epsilon_1$). Эти два полисахарида идентичного состава (на основе глюкопиранозы) отличаются только типом гликозидных связей. Из этого следует, что связанность воды в гидратных оболочках полисахаридов зависит, в том числе, от типа гликозидных связей.

Описанный в **Главе 2** подход на базе метода THz-TDS позволяет изучать гидратацию биомолекул, анализируя отличия водной фазы их раствора от растворителя. Для этого используется набор физических параметров, интерпретируемых в терминах межмолекулярной структуры и динамики воды. Часть полученных результатов согласуется с известными данными, полученными другими методами, что подтверждает объективность подхода. Также получены новые данные о гидратации всех основных типов биомолекул. Развивая данный подход, при достижении достаточной точности определения значений параметров и накоплении достаточного объёма данных, могут быть определены удельные значения параметров гидратации для каждого типа биомолекул в растворе при различных условиях. В перспективе возможна и постановка обратной задачи: используя определяемые значения параметров гидратации анализировать структурные характеристики самих биомолекул в растворах. Метод THz-TDS при использовании описанных подходов к измерению, обработке и анализу спектров может быть развит до уровня полноценного метода исследования водных растворов биомолекул, как ЯМР и ИК спектроскопия. Только вместо химического сдвига и

полос поглощения, подход на основе ТГц спектроскопии должен оперировать параметрами ДП водной фазы изучаемых растворов. При этом уже сейчас понятно, что ТГц спектроскопия обладает явными преимуществами перед указанными методами по информативности при изучении гидратации биомолекул в растворах.

Глава 3 посвящена разработке метода ИК спектроскопии собственного излучения (эмиссионной ИК спектроскопии), позволяющего измерять спектры излучения образца без какого-либо возбуждения и применимого для анализа структурных характеристик биомолекул в водных растворах. Система измерения спектров излучения представлена на рисунке 5. Основа системы регистрации – вакуумный ИК спектрометр с Фурье-преобразованием (в настоящей работе использовался Vertex 80v (Bruker, Германия)). Спектры измерялись в области 400-7500 см^{-1} с разрешением 8 см^{-1} .

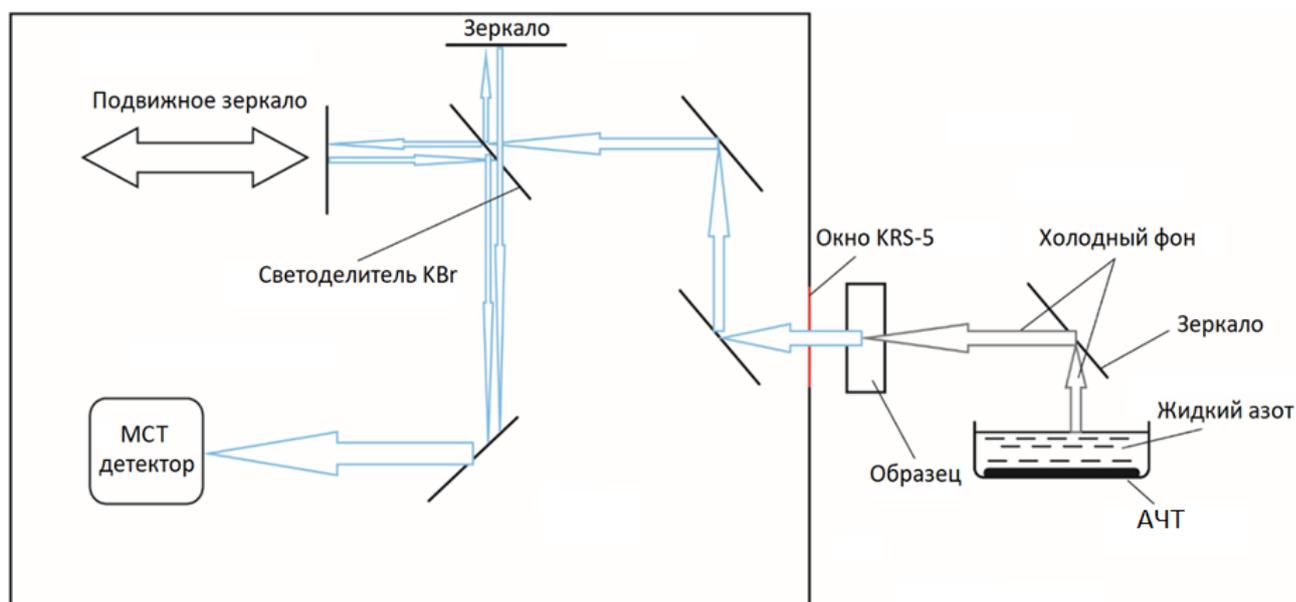


Рисунок 5. Система измерения ИК спектров собственного излучения.

Спектрометр настраивается таким образом, что его фокус (точка, изображение которой проецируется на чувствительный элемент детектора) находится вблизи входного окна с внешней стороны спектрометра. Изучаемый образец помещается в этот фокус. Принципиальным условием для измерения собственного излучения без возбуждения образца является различие температур образца и окружения. В отличие от обычной практики нагрева образца [21], реализуется экранировка окружающего теплового излучения. Для этого на фоне образца устанавливается ёмкость, наполненная жидким азотом. На дне ёмкости помещается черная пластина, имитирующая абсолютно чёрное тело (АЧТ). Площадь АЧТ должна полностью перекрывать входную апертуру спектрометра. Таким образом, в качестве фонового излучения выступает излучение АЧТ при температуре кипения азота. Описанная экранировка внешнего теплового излучения в настоящей работе называется холодным фоном.

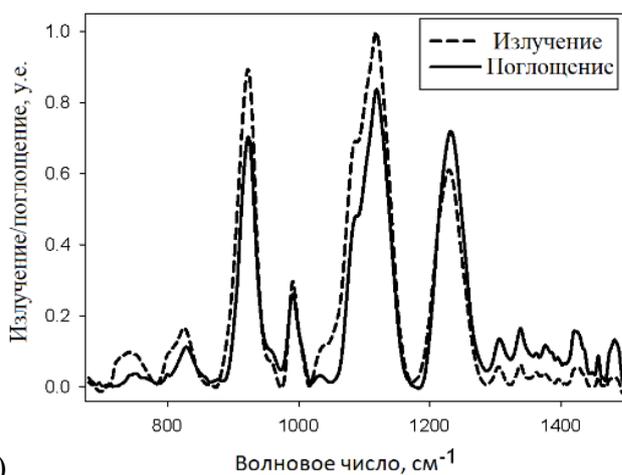
Ещё одним принципиальным условием регистрации излучения от не нагретых объектов является использование высокочувствительных охлаждаемых детекторов (использовался МСТ-детектор). Отдельно рассматривается методический вопрос подбора оптимальной глубины вакуума в спектрометре для получения качественных спектров. Показано, что без учёта этого спектры излучения зашумлены полосами паров воды и CO_2 . Описана также важность подбора оптимальной толщины образца. При слишком малой толщине снижается интенсивность полос, а значит чувствительность метода. При слишком большой толщине образец экранирует излучение холодного фона и собственное излучение, что приводит к искажению полос излучения. Для водных растворов оптимальная толщина составляет 5-10 мкм. Подробно описано устройство кюветы для жидких образцов, оснащённой термостатирующей рубашкой и окнами из KRS-5.

Измеренный спектр излучения образца в кювете может быть скорректирован с целью устранения паразитного излучения и поглощения окон кюветы следующим образом:

$$I_s = (I_{\text{exp}} - I_w * T_s * T_w) / T_w, \quad (11)$$

где I_{exp} – измеренный спектр излучения образца в кювете; I_w – спектр излучения окна кюветы; T_s , T_w – спектры пропускания образца и окна кюветы, соответственно; I_s – скорректированный спектр излучения раствора. Член $I_w * T_s * T_w$ позволяет из измеренного спектра вычесть излучение окна, ослабленное прохождением через слой образца и второе окно. Знаменатель T_w учитывает ослабление излучения образца при прохождении через окно кюветы. Спектры пропускания T_s и T_w измерялись с использованием того же ИК спектрометра, но в стандартном абсорбционном режиме.

На примере спектра собственного излучения воды показано, что положение полос в спектре излучения совпадает с положением полос в спектре поглощения. Указанное соответствие позволяет объяснить физическую суть 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 с основного на возбуждённые уровни. Из этого следует, что частоты полос в спектрах излучения и поглощения должны совпадать. То есть спектры собственного излучения с холодным фоном содержат характеристические полосы вещества и могут быть использованы для анализа молекулярной структуры.



(в)

Рисунок 6. (а) Разностный спектр излучения раствора БСА (1 мг/мл в H_2O) и H_2O в частотной области амидных полос. (б) Разностные спектры излучения суспензии DMPC (1 мг/мл в D_2O) и D_2O при двух значениях температуры в области полосы валентных колебаний C=O групп. (в) Представлены два спектра, измеренные при 25°C : 1) разностный спектр излучения раствора АТФ (1 мг/мл в H_2O) и H_2O ; 2) разностный спектр поглощения того же раствора АТФ и H_2O .

На рисунке 6б представлены спектры излучения DMPC липосом в D_2O при температурах 10°C и 35°C в области полосы валентных колебаний C=O групп. При указанных температурах DMPC липосомы находятся в двух разных фазах: гель при 10°C и жидкий кристалл при 35°C . Можно видеть, что при 35°C положение максимума полосы смещено (на 6 см^{-1}) в сторону меньших частот по сравнению с 10°C . Аналогичное смещение полосы в абсорбционной ИК спектроскопии объясняется фактом сильного увеличения гидратации C=O групп, которое происходит при фазовом переходе фосфолипида гель – жидкий кристалл. Полученный результат демонстрирует, что эмиссионная ИК спектроскопия с холодным фоном может применяться для анализа фазового состояния фосфолипида в водных растворах.

На рисунке 6в дан спектр излучения АТФ в воде в спектральной области отпечатков пальцев. При сравнении со спектром поглощения видно, что положения всех спектральных полос дублируют друг друга. Это в очередной раз подтверждает, что спектроскопия собственного излучения с холодным фоном позволяет определять характеристические спектры. Из приведённых примеров следует, что предложенный метод эмиссионной ИК спектроскопии с холодным фоном применим для анализа структурных характеристик биомолекул в водных растворах при температурах, соответствующих нативной конформации.

Далее рассматриваются преимущества и недостатки метода ИК спектроскопии собственного излучения с холодным фоном перед классической абсорбционной спектроскопией. Обсуждается достижение более высокого соотношения сигнал/шум. Показана в несколько раз более высокая чувствительность. К преимуществам эмиссионной

спектроскопии с холодным фоном также относится неинвазивность, поскольку не требуется каким-либо образом возбуждать исследуемый образец. Это позволяет изучать чувствительные к внешнему воздействию, в том числе ИК излучению, объекты. Рассматриваемый в настоящей работе интервал частот $400\text{-}3600\text{ см}^{-1}$ несколько уже, чем диапазон абсорбционной спектроскопии, но он покрывает практически всю область основных колебательных частот, по которым проводят анализ молекулярной структуры. Также в работе показано, что наибольшая чувствительность эмиссионной спектроскопии для образцов при комнатной температуре достигается в области отпечатков пальцев $500\text{-}1700\text{ см}^{-1}$ – интервале наибольшей информативности при молекулярном анализе. Также обсуждаются пути расширения спектрального диапазона в дальнюю ИК область (менее 400 см^{-1}), где расположены полосы межмолекулярных колебаний воды, несущие информацию о гидратации биомолекул.

Глава 4 посвящена изучению гетерогенности водных растворов биомолекул. Основной характеристикой гетерогенности коллоидных систем является распределение по размерам. В случае растворов биомолекул речь идёт о распределении биомолекул по размерным фракциям. Наиболее информативным и широко применяемым методом, позволяющим определять распределения по размерам (гидродинамическим диаметрам), является динамическое светорассеяние. Измерительный диапазон данного метода лежит от долей нанометра до микрометров, что покрывает размеры практически всех биомолекул.

В **Главе 4** приведены результаты исследований множества процессов, при которых изменяются размерные характеристики биомолекул в растворах: агрегация, реагрегация, олигомеризация и тепловая денатурация белков; изменение размера фосфолипидных липосом в результате их дробления, агрегации и слияния под влиянием различных веществ и др. На приведённых примерах показано, что во всех случаях при анализе наноразмерных ($\sim 1\text{-}10\text{ нм}$) биомолекул и биомолекулярных структур их распределения по размерам содержат дополнительную фракцию с размерами порядка сотен нанометров. Как правило, эту фракцию относят к посторонним примесям или агрегатам и исключают из рассмотрения. Однако закономерность её присутствия практически в любом водном образце заставляет задуматься о существовании некоторой естественной гетерогенности водных растворов. Как показано в последующих разделах **Главы 4**, данная фракция может относиться к нанопузырькам [23]. Это пузырьки воздуха, которые спонтанно образуются и пребывают в водных растворах. Они обладают стабильными размерами и равновесной концентрацией (таблица 6), определяющимися типом и концентрацией ионов.

Нанопузырьки могут в разной степени искажать измеряемые распределения по размерам биомолекул. Например, в растворах белков в мономерной или олигомерной форме

размеры белковой фракции (~10 нм) много меньше размеров фракции нанопузырьков (100-600 нм), поэтому можно её не брать в расчёт и анализировать только область размеров белков. В то же время при исследовании, например, процессов агрегации размер белковой фракции может попадать в область сотен нм. Поэтому важно уметь отличать нанопузырьки от фракции биомолекул. Для этого в настоящей работе предлагается следующая методика. Если интенсивность рассеяния растворителя (аналогичного раствора без биомолекул) существенно меньше интенсивности рассеяния субмикронной фракции, то можно утверждать, что эта фракция относится к изучаемому объекту. Это могут быть агрегаты биомолекул, либо посторонние примеси – данный вопрос решается в зависимости от наличия дополнительной информации об образце, но исключается версия нанопузырьков. Если указанные интенсивности соизмеримы, то субмикронная фракция относится к нанопузырькам.

В последнем случае артефактную фракцию можно устранить из распределений по размерам несколькими способами. Во-первых, можно использовать растворы биомолекул более высоких концентраций, что увеличивает вклад реальной фракции биомолекул. Во-вторых, математически преобразовать распределения по размерам на основе интенсивности (исходный формат, получаемый методом динамического светорассеяния) к распределениям по объёму или числу частиц, что снижает вклад высокоразмерной фракции. В-третьих, можно провести фильтрацию. В работе приведены примеры применения каждого из трёх подходов.

Далее в **Главе 4** проводится детальное рассмотрение физических характеристик нанопузырьков в более простых растворах неорганических солей. На рисунке 7 показано характерное распределение по размерам нанопузырьков в водно-солевых растворах, полученное с помощью метода динамического светорассеяния.



Рисунок 7. Характерное распределение по размерам нанопузырьков в водных растворах неорганических солей, измеренное методом динамического светорассеяния.

В таблице 6 содержатся размеры и числовая концентрация нанопузырьков, рассчитанная по данным метода динамического светорассеяния, для различных солевых растворов. Из таблицы видно, что средний размер нанопузырьков зависит от типа ионов и лежит в диапазоне

100-600 нм. Равновесная концентрация пузырьков варьирует от 10^6 до 10^7 см^{-3} . Отдельно было показано, что с ростом концентрации солей концентрация нанопузырьков возрастает.

Таблица 6. Размеры и равновесная числовая концентрация нанопузырьков в растворах солей с концентрацией 0.1 М.

Соль	Гидродинамический диаметр нанопузырьков, нм	Числовая концентрация нанопузырьков* 10^{-6} , см^{-3}
Вода	480±320	<1.0
KI	260±70	1.0±0.6
KBr	300±90	5.0±0.7
NaCl	250±50	4.0±0.7
KCl	220±30	6.0±0.6
NaNO ₃	270±40	1.4±0.5
CsCl	310±50	3.4±0.6
CaCl ₂	370±50	1.2±0.3
MgCl ₂	480±90	2.0±0.3
Na ₂ SO ₄	190±80	5.0±1.0
NaF	200±60	2.4±0.6
MgSO ₄	430±80	1.1±0.3
NaOH	205±50	12.0±1.8
LiOH	220±90	3.7±0.7

*Погрешность представляет собой стандартное отклонение при числе повторов 10.

Также представлены результаты исследования распределений по размерам пузырьков, образующихся в растворах электролитов под действием электролиза в разных режимах. После прекращения генерации размер пузырьков стабилизировался в характерном для них субмикронном диапазоне. Изучено влияние типа газа (CO, CO₂, O₂, N₂, Ar) и давления насыщения на параметры образующихся в растворах нанопузырьков. Обнаружена слабая зависимость равновесной концентрации нанопузырьков от типа газа, при этом наблюдается существенный рост концентрации пузырьков с увеличением концентрации газа и ионов.

Далее в **Главе 4** рассматривается влияние механического воздействия (сопровождающегося образованием большого количества пузырьков) на гетерогенность водного раствора биомолекул на примере иммуноглобулина G. Большая часть образовавшихся после воздействия пузырьков быстро всплывает, однако часть задерживается в растворе. С помощью методов динамического светорассеяния и фазовой микроскопии показано, что после механического воздействия в растворе обнаруживаются стабильные агрегаты белка с нанопузырьками с размерами ~1 мкм. Это позволяет предположить, что биомолекулы,

обладающие поверхностно-активными свойствами, могут образовывать комплексы с присутствующими в растворе нанопузырьками и без механического воздействия. В таком случае при содержании биомолекул в растворе менее 1 мкг/мл их объёмная концентрация становится сопоставима с равновесной концентрацией нанопузырьков, и значительная часть биомолекул может пребывать в комплексе с ними. На сегодняшний день неизвестно, как изменяется активность тех или иных биомолекул при связывании с поверхностью пузырька. Данный вопрос требует отдельной проработки, так как это может быть важно при работе с растворами биомолекул малых концентраций, тем более в режимах, сопровождающихся механическими воздействиями, при которых концентрация пузырьков может сильно возрастать.

В **Заключении** подводятся итоги работы, и проводится обобщение описанных результатов. 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 изучать гидратацию биомолекул в водных растворах. С его помощью были получены новые данные о гидратации всех основных типов биомолекул: белка, фосфолипида, АТФ, ДНК и сахаров. Разработанный метод ИК спектроскопии собственного излучения с холодным фоном может применяться для неинвазивного изучения структурных характеристик биомолекул в растворах в условиях их нативного состояния. Показано, что в распределениях по размерам биомолекул в водных растворах может проявляться фракция нанопузырьков, всегда присутствующих в водных растворах. Описана методика на основе метода динамического светорассеяния, позволяющая выявить и исключить эту артефактную фракцию.

В контексте основной идеи исследования водных растворов биомолекул с объединением трёх аспектов (структура биомолекул, гидратация, характеристики гетерогенности) полученные 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 водородное 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. Например, гидратные оболочки поли- и моносахаридов по структурно-динамическим характеристикам похожи, однако у моносахаридов гидратация выражена сильнее. У ДНК наблюдается обратная зависимость: гидратная оболочка полимера ДНК более выражена, чем у отдельных нуклеотидов. Приведённые примеры для сахаров и ДНК демонстрируют явную связь характеристик гетерогенности их растворов (размера биомолекул) как со структурой биомолекул, так 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. Landau L.D., Lifshitz E.M., Pitaevskii L.P. *Electrodynamics of continuous media* // Pergamon press. 2nd ed. Butterworth–Heinemann, 1984. Vol. 8. 475 p.
2. 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.
3. 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.
4. Lyashchenko A., Lileev A. Dielectric relaxation of water in hydration shells of ions // *J. Chem. Eng. Data.* 2010. Vol. 55, № 5. P. 2008–2016.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. Юхневич Г.В. *Инфракрасная спектроскопия воды.* Наука / ред. Грибов Л.А. Москва: Наука, 1973. 207 с.
12. Scheiner S. *Hydrogen bonding: a theoretical perspective.* 1997. 375 p.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.

17. Koynova R., Tenchov B. Phase transitions and phase behavior of lipids // Encyclopedia of Biophysics. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. P. 1841–1854.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. Bernath P.F. Infrared fourier transform emission spectroscopy // Chem. Soc. Rev. 1996. Vol. 25, № 2. P. 111–115.
22. Barth A. Infrared spectroscopy of proteins // Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg. 2007. Vol. 1767, № 9. P. 1073–1101.
23. Бункин Н.Ф., Бункин Ф.В. Бабстонная структура воды и водных растворов электролитов // УФН. 2016. Том 86, № 9. С. 933–952.

**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., Уграйская 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 // Chemicobiological 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., Izorkina 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 по 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 по 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 по 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 по 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 по 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 по 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.bbmem.2020.183383. IF по 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 по Scopus 3,329.
27. 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 and Surfaces B: Biointerfaces*, 2019. Vol. 183, p. 110426. Q1 DOI: 10.1016/j.colsurfb.2019.110426. IF по 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 по 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 по 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 по 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 по 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 по 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 по 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 по 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 Ca^{2+} 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 по 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 по 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. Шарাপов 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.bbmem.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 IV всероссийской конференции с международным участием "Физика водных растворов". Москва. С. 41. 2021 г.
2. Болоцкова П.Н., Бункин Н.Ф., Козлов В.А., Окунева М.А., **Пеньков Н.В.** Набухание полимерной мембраны в водных суспензиях аминокислот в зависимости от изотопного состава. Сборник трудов IV всероссийской конференции с международным участием "Физика водных растворов". Москва. С. 53. 2021 г.
3. **Пеньков Н.В.** Измерение спектров собственного излучения растворов биологических макромолекул в инфракрасном диапазоне. Сборник трудов III всероссийской конференции "Физика водных растворов". Москва. С. 40. 2020 г.
4. **Пеньков Н.В.** Временная динамика свойств рассеяния деионизированной воды. Сборник трудов II всероссийской конференции "Физика водных растворов". Москва. С. 13. 2019 г.
5. **Пеньков Н.В.** Терагерцовая спектроскопия временного разрешения в применении к исследованию гидратных оболочек белков. VI съезд биофизиков России. С. 388. 2019 г.
6. 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. С. 391. 2019 г.
7. 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. С. 51. 2019 г.
8. 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". Москва. С. 40. 2019 г.
9. 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". Москва. С. 44. 2019 г.
10. **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». Москва. С. 11. 2018 г.
11. 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». Москва. С. 9. 2018 г.
12. 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». Москва. С. 9. 2018 г.
13. Шарапов М.Г., **Пеньков Н.В.**, Новосёлов В.И. Исследование термостабильности пероксиредоксинов. V съезд биофизиков России. С. 128. 2015 г.

ПАТЕНТЫ НА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пат. RU 2698903 C1, 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 C1, 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 C1, 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.