

На правах рукописи

ВЛАСОВА Ирина Михайловна

**ПРИМЕНЕНИЕ ОПТИКО – СПЕКТРАЛЬНЫХ МЕТОДОВ В
ИССЛЕДОВАНИЯХ КОМПОНЕНТОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ**

01.04.05 - оптика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва-2005

Работа выполнена на кафедре общей физики физического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

Научный руководитель: доктор физико-математических наук,
профессор А.М. Салецкий,
физический факультет МГУ
им. М.В. Ломоносова

Официальные оппоненты: доктор физико-математических наук,
профессор В.З. Пащенко,
биологический факультет МГУ
им. М.В. Ломоносова;
доктор химических наук,
профессор Г.В. Мельников,
Саратовский Государственный
Технический Университет

Ведущая организация: Институт химической физики
им. Н.Н. Семенова Российской академии наук

Защита состоится « 18 » « мая » 2005 г. в « 15.00 » час. на заседании Специализированного совета Д 501.001.45 при Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова по адресу: 119992, г. Москва, Ленинские горы, ГСП-2, НИИЯФ МГУ, 19 корпус, аудитория 2-15.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИИЯФ МГУ.

Автореферат разослан « 14 » « апреля » 2005 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 501.001.45
доктор физико-математических наук

А.Н. Васильев

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Быстрое развитие оптико – спектральных методов в последние годы послужило причиной появления огромного количества направлений в физике, химии, биологии и медицине. В настоящее время оптико – спектральные методы являются незаменимыми при решении широкого круга исследовательских и прикладных задач. Данная диссертационная работа посвящена применению оптических методов для исследования биологических объектов – компонентов сыворотки крови. Внедрение методов оптики и спектроскопии в исследовательские задачи биологических систем является одной из важнейших задач современной физики.

Корреляционная спектроскопия квазиупруго рассеянного света (метод динамического светорассеяния) занимает прочное место в качестве стандартного способа измерения размера рассеивающих частиц. Метод статического рэлеевского рассеяния света является удобным способом определения молекулярного веса биологических объектов. Комбинационное рассеяние (КР) света, обширно используемое для исследования функций и структуры биологических молекул, имеет большой потенциал для применения его в биологической и медицинской областях науки. Изучение вида спектров люминесценции, их интенсивности нашло широкое применение в медицинских и биологических исследованиях. По интенсивности люминесценции можно судить об электронно-энергетическом состоянии биологических макромолекул, клеток и тканей организма.

Одним из объектов исследования в данной работе является сывороточный альбумин человека. Сывороточный альбумин человека представляет собой глобулярный белок, выполняющий в плазме крови транспортные функции. Многие лекарственные препараты в кровеносном русле связываются с альбумином. Поэтому его агрегация в большие белковые комплексы в присутствии солей тяжелых металлов может вызывать серьезные

фармакокинетические последствия. Следовательно, результаты исследования методами лазерной спектроскопии квазиупруго рассеянного света размеров, формы молекул альбумина при агрегации этого белка в зависимости от количества хлорида цезия (CsCl) представляют интерес не только с точки зрения развития оптико – спектральных методов изучения сложных макромолекулярных систем, но и с точки зрения биологических и медицинских проблем. Особое внимание в работе посвящено выяснению аминокислотного механизма агрегации альбумина в присутствии соли тяжелого металла методом КР – спектроскопии.

Исследования денатурации сывороточного альбумина методами лазерной спектроскопии не только представляют интерес в прикладной биохимии белков, но и показывают широкие возможности применения оптических методов исследования в биологических системах. Многие биологические и фармацевтические системы содержат белки и детергенты. Проведённые исследования размеров и формы сывороточного альбумина в зависимости от концентрации денатурирующего агента (додецилсульфата натрия) при различных значениях рН буферных растворов важны с точки зрения прикладных биологических и медицинских проблем. Денатурация белков приводит к потере их нативности, и современная фундаментальная биология уделяет огромное внимание нарушению нативной конформации белков, связывая с нею важнейшие свойства клеток. В работе также изучен вопрос термической денатурации белков, который имеет ценность в связи с большим интересом в последнее время к вопросам термотерапии ряда онкологических заболеваний.

Большое внимание в работе посвящено вопросу применения оптико - спектральных методов для исследования повреждающего действия ишемии на компоненты сыворотки крови, в частности, на липопротеины низкой плотности. Полученные в работе результаты говорят о перспективности

использования оптико-спектральных методов (спектроскопии квазиупруго рассеянного света, спектроскопии комбинационного рассеяния света, люминесцентной спектроскопии) для оценки ишемических повреждений. В развитии многих патологических состояний, в частности, вследствие ишемического воздействия, в организме животных принимают непосредственное участие свободнорадикальные реакции активных форм кислорода. Изучение свободнорадикальных окислительных повреждений компонентов крови при ишемии оптико – спектральными методами помогает проникнуть в механизм этих реакций и, следовательно, понять, как их можно контролировать. По этой причине исследование влияния ишемии на сыворотку крови оптическими методами значимо не только в области теоретической биологии и физики, но и в медицине.

Цель работы и задачи исследования. Цель диссертационной работы состояла в исследовании компонентов сыворотки крови (сывороточного альбумина крови человека и цельной сыворотки крови животных) оптико – спектральными методами: методами лазерной спектроскопии квазиупруго рассеянного света (динамическое и статическое светорассеяние), методами спектроскопии комбинационного рассеяния света, методами люминесцентного анализа.

В частности, в задачи диссертационной работы входило:

1. изучение агрегации сывороточного альбумина человека в присутствии хлорида цезия – определение структурных особенностей образующихся белковых агрегатов в зависимости от рН раствора и концентрации соли (с помощью лазерной корреляционной спектроскопии), анализ аминокислотного механизма комплексообразования молекул альбумина (методом КР - спектроскопии).
2. исследование процессов денатурации (тепловой и в присутствии ионного детергента додецилсульфата натрия) сывороточного альбумина в зависимости

от pH растворов (с помощью метода спектроскопии квазиупруго рассеянного света).

3. изучение влияния ишемии головного мозга на физические (размер и форму) параметры (методом спектроскопии квазиупруго рассеянного света) и химическую структуру компонентов сыворотки крови (с помощью КР – спектроскопии и люминесцентного анализа).

Научная новизна.

1. Методом КР – спектроскопии впервые исследован аминокислотный механизм агрегации молекул сывороточного альбумина человека в присутствии хлорида цезия.

2. Впервые исследованы размер и форма агрегатов сывороточного альбумина человека, образующихся в присутствии соли тяжелого металла (хлорида цезия), в зависимости от pH раствора методом лазерной корреляционной спектроскопии.

3. Определена величина денатурации молекул сывороточного альбумина человека в присутствии додецилсульфата натрия в зависимости от значения pH раствора и концентрации додецилсульфата натрия (ДСН) методом динамического светорассеяния.

4. Исследована тепловая денатурация сывороточного альбумина человека в зависимости от значения pH раствора методом лазерной корреляционной спектроскопии.

5. Методами спектроскопии рассеянного света впервые установлено изменение размеров и плотности липопротеинов низкой плотности сыворотки крови животных вследствие ишемии головного мозга.

6. Подтверждена с помощью метода КР – спектроскопии и люминесцентного анализа предложенная теория свободнорадикального повреждения липопротеинов низкой плотности сыворотки крови вследствие окислительного стресса после ишемии головного мозга.

Научная и практическая значимость результатов.

Результаты исследований методами лазерной спектроскопии квазиупруго рассеянного света, спектроскопии комбинационного рассеяния света, люминесцентного анализа повреждающего воздействия ишемии на сыворотку крови животных говорят о перспективности использования оптико – спектральных методов для оценки ишемических повреждений компонентов крови.

Результаты исследования агрегации сывороточного альбумина человека в присутствии соли тяжелого металла представляют интерес не только с точки зрения биологических и медицинских проблем (многие лекарственные препараты в кровеносном русле связываются с альбумином, и поэтому его агрегация в большие белковые комплексы может вызывать серьезные фармакокинетические последствия), но и с точки зрения развития оптико-спектральных методов изучения сложных макромолекулярных систем.

Полученные результаты изучения денатурации сывороточного альбумина в зависимости от концентрации ДСН при различных значениях рН буферных растворов, а также результаты исследований тепловой денатурации альбумина интересны не только для специалистов в области биохимии, но и показывают широкие возможности применения оптических методов в биологических системах.

Основные защищаемые положения.

1. Присутствие хлорида цезия (CsCl) вызывает агрегацию молекул сывороточного альбумина человека. Размер образующихся белковых агрегатов возрастает прямо пропорционально концентрации соли. Зависимость гидродинамического радиуса белковых комплексов от рН буферного раствора в пределах каждого значения концентрации CsCl имеет параболический вид с максимумом в изоэлектрической точке белка. Наибольшая агрегация альбумина имеет место вблизи его изоэлектрической точки. Добавление хлорида цезия

приводит к слипанию молекул альбумина в агрегаты практически сферической формы. Определен аминокислотный механизм CsCl-индуцированной агрегации и выяснены агрегационные химические связи, возникающие между цепями аминокислот сывороточного альбумина.

2. Определена величина денатурации молекул сывороточного альбумина человека в присутствии ионного отрицательно заряженного детергента додецилсульфата натрия (ДСН) в зависимости от значения рН раствора и концентрации детергента. Большая денатурация белка в присутствии ДСН имеет место при значениях рН буферного раствора, меньших изоэлектрической точки альбумина.

3. Денатурация сывороточного альбумина человека под влиянием температуры зависит от рН раствора. Для выбранных значений рН тепловая денатурация происходит сильнее при тех значениях рН буферного раствора белка, которые более близки к изоэлектрической точке данного белка.

4. Размер липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) сыворотки животных после ишемии головного мозга больше размера ЛПНП контрольной здоровой сыворотки. Плотность ЛПНП после ишемии меньше плотности контрольных здоровых ЛПНП. Увеличение размеров ЛПНП и уменьшение их плотности после ишемии по сравнению с контрольными здоровыми ЛПНП объясняется разрыхлением фосфолипидного амфипатического слоя ЛПНП под действием свободнорадикальных продуктов, появляющихся вследствие ишемии.

5. Интенсивность люминесценции сыворотки крови животных после ишемии сильно возрастает по сравнению с интенсивностью люминесценции здоровой сыворотки крови. Увеличение интенсивности люминесценции сыворотки крови после ишемии головного мозга однозначно отражает повышенную концентрацию свободнорадикальных липидных соединений в фосфолипидном слое постишемических ЛПНП. Добавление флуоресцентных зондов (родамина 6Ж, нильского синего) в сыворотку крови подтверждает различие физико-

химических свойств ЛПНП сыворотки крови животных до и после ишемической процедуры.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы были представлены на следующих конференциях:

1. Международная конференция студентов и аспирантов по фундаментальным наукам «Ломоносов-2004» (Москва, Россия, 2004 г.);
2. III Международная конференция молодых ученых и специалистов «Оптика-2003» (Санкт-Петербург, Россия, 2003 г.);
3. Международная конференция «Advanced Laser Technologies-ALT'04» (Рим, Фраскати, Италия, 2004 г.);
4. XI Всероссийская конференция «Структура и динамика молекулярных систем – Яльчик - 2004» (Яльчик, Россия, 2004 г.);
5. III Международная конференция «Фундаментальные проблемы оптики-2004» (Санкт-Петербург, Россия, 2004 г.).

Публикации: по материалам диссертации опубликовано 10 печатных работ.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, пяти глав, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 184 страницах, содержит 42 рисунка, 6 таблиц и список цитируемой литературы из 200 наименований.

Во *введении* рассматривается актуальность поставленных задач и обсуждаются цели настоящей работы.

Первая глава, состоящая из шести параграфов, посвящена обзору литературы, относящейся к исследованию биологических макромолекул с помощью оптических методов (динамического и статического светорассеяния, комбинационного рассеяния света, люминесцентного анализа).

Вторая глава посвящена методической части экспериментов: представлены методики приготовления биологических образцов, описаны экспериментальные методы исследования.

В главах с третьей по пятую представлены и обсуждены полученные экспериментальные результаты.

В заключение отдельным пунктом вынесены *основные результаты и выводы* работы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во *введении* обоснована актуальность работы, сформулированы цель и задачи исследований, показана новизна и научно-практическая значимость результатов, изложены основные защищаемые положения диссертации.

Глава 1, состоящая из шести параграфов, посвящена описанию строения белковых молекул (§1.1.), описанию состава плазмы (сыворотки) крови высших млекопитающих и функций основных её компонентов (§1.2.), обзору литературы, относящейся к исследованию биологических макромолекул с помощью оптических методов: динамического (§1.3.) и статического (§1.4.) светорассеяния, комбинационного рассеяния света (§1.5.), люминесцентного анализа (§1.6.).

Глава 2 посвящена методической части экспериментов: представлены методики приготовления биологических образцов (растворы сывороточного альбумина человека, растворы сыворотки крови животных, описание ишемической процедуры) (§2.1.), описаны экспериментальные методы исследования: динамическое и статическое светорассеяние (§2.2.), комбинационное рассеяние света (§2.3.), люминесцентно-спектральный анализ (§2.4.).

Глава 3 посвящена исследованию агрегации молекул сывороточного альбумина человека в присутствии соли тяжелого металла (хлорида цезия CsCl) методами лазерной спектроскопии.

В параграфе §3.1. представлены результаты исследований методом лазерной корреляционной спектроскопии рассеянного света размера, формы молекул сывороточного альбумина человека при его агрегации в присутствии соли тяжелого металла в зависимости от pH буферных растворов белка и концентрации соли (хлорид цезия CsCl).

На основании полученных данных заключено, что белковые агрегаты, образующиеся в присутствии хлорида цезия, имеют практически сферическую форму. В отсутствие CsCl в буферных растворах белковые молекулы не взаимодействуют друг с другом и имеют форму эллипсоидов вращения.

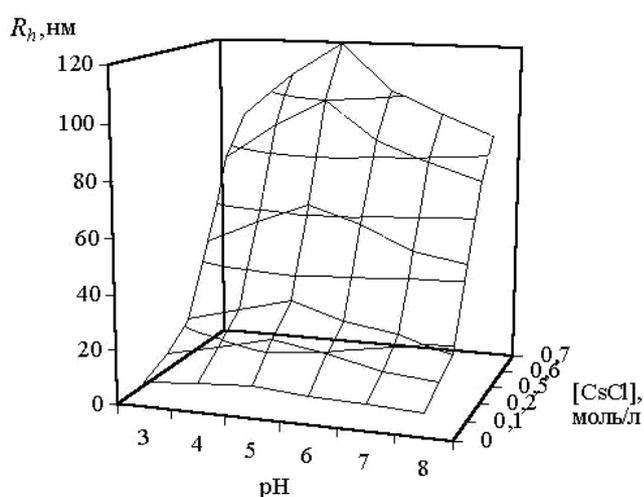


Рис.1. Зависимость гидродинамического радиуса R_h агрегатов молекул альбумина от концентрации CsCl и pH буферного раствора.

Получена зависимость гидродинамического радиуса белковых комплексов от концентрации хлорида цезия при различных значениях pH буферного раствора (рис.1). Видно, что гидродинамический радиус рассеивающих свет частиц возрастает прямо пропорционально концентрации

хлорида цезия (CsCl), что свидетельствует о слипании молекул альбумина в белковые агрегаты. Для каждой концентрации CsCl гидродинамический радиус агрегатов максимален при pH 5,0 (вблизи изоэлектрической точки альбумина).

В параграфе §3.2. представлены результаты исследования аминокислотного механизма агрегации сывороточного альбумина в присутствии CsCl методом спектроскопии комбинационного рассеяния света.

Из сравнения полученных КР - спектрограмм буферных растворов альбумина (до и после добавления CsCl) видно, что наибольшее количество агрегационных химических связей разных типов между аминокислотными остатками возникает при добавлении соли при значении рН 5,0 буферного раствора, т.е. при наиболее близком к изоэлектрической точке (рI) альбумина значении рН раствора. При рН 5,0 происходит разрыв наибольшего количества химических связей между аминокислотными радикалами по сравнению с другими неизоэлектрическими значениями рН. Наибольшая агрегация альбумина имеет место вблизи его изоэлектрической точки, т.е. при рН 5,0.

Глава 4 посвящена исследованию ДСН – вызванной и тепловой денатурации сывороточного альбумина человека методом корреляционной спектроскопии рассеянного света.

В параграфе §4.1. представлены результаты исследований (проведенных с

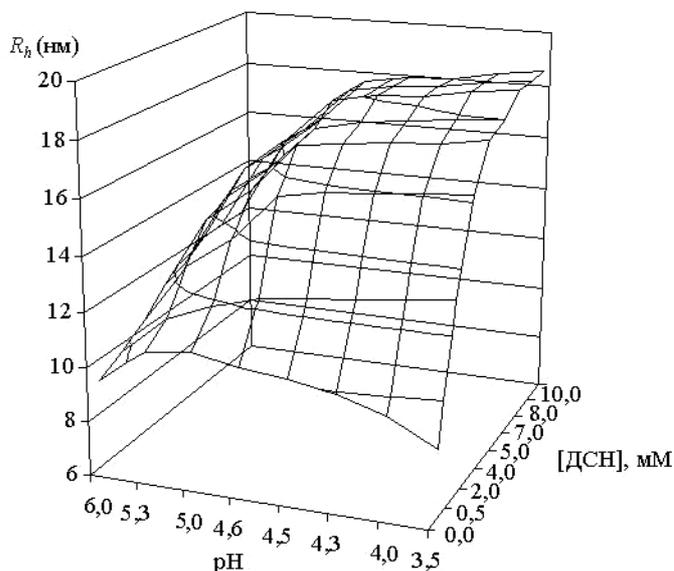


Рис. 2. Зависимость гидродинамического радиуса R_h молекул сывороточного альбумина от концентрации ДСН и рН раствора.

помощью метода лазерной корреляционной спектроскопии квазиупруго рассеянного света) размера, формы молекул сывороточного альбумина крови человека при денатурации под воздействием денатурирующего агента ДСН (додecilсульфата натрия) при различных значениях рН растворов. Зависимость

гидродинамического радиуса молекул альбумина от концентрации ДСН и величины рН буферного раствора представлена на рис.2.

Из рис.2 видно, что происходит увеличение размера белка (т.е. его денатурация) при увеличении концентрации ДСН до значения 7 мМ, после

которого, несмотря на дальнейшее добавление ДСН, размер белка остаётся неизменной величиной. Т.е. при достижении данной (7мМ) концентрации детергента происходит насыщение «посадочных» для мицелл детергента мест на белке. Как следует из рис.2, ДСН, как отрицательно заряженный детергент, лучше связывается с белком при значениях рН буферного раствора, меньших величины изоэлектрической точки альбумина (рI 4,7), то есть в той области рН, в которой белок заряжен положительно. Следовательно, большая денатурация белка в присутствии ДСН имеет место при значениях рН раствора, меньших изоэлектрической точки альбумина.

В параграфе §4.2. методом лазерной корреляционной спектроскопии рассеянного света изучена тепловая денатурация сывороточного альбумина человека при различных значениях рН раствора.

Показано, что до температуры, равной 45⁰С, гидродинамический радиус молекул альбумина практически не меняется. Увеличение размера белковых молекул начинается при температуре свыше 45⁰С (в области температур 45⁰С-48⁰С происходит денатурация белка). Показано, что денатурация молекул альбумина происходит сильнее при рН, лежащих ближе к изоэлектрической точке этого белка (рI 4,7). Чем больше значение рН раствора удалено от изоэлектрической точки, тем денатурация белка происходит слабее.

Глава 5 посвящена исследованию **повреждающего действия ишемии на компоненты сыворотки крови животных опико – спектральными методами**.

В параграфе §5.1. представлены результаты исследований с помощью метода лазерной корреляционной спектроскопии квазиупруго рассеянного света размеров, формы компонентов сыворотки крови животных и влияния на них ишемического воздействия. При исследовании влияния ишемии головного мозга на сыворотку крови крыс были обнаружены изменения в зоне, соответствующей по диаметру липопротеинам низкой плотности (ЛПНП).

С помощью метода динамического рассеяния света зарегистрировано, что размер ЛПНП сыворотки животных после ишемии головного мозга больше размера ЛПНП здоровой сыворотки примерно на 20-30% для различных значений рН буферного раствора разведения сыворотки.

Согласно литературным данным, здоровые ЛПНП представляют собой сферические частицы. Для определения формы ЛПНП ишемической сыворотки при разных значениях рН были получены зависимости диффузного уширения Γ от квадрата синуса половины угла рассеяния $\sin^2(\theta/2)$. Диффузное уширение спектра рассеянного света для ЛПНП ишемической сыворотки линейно зависит от квадрата синуса половины угла рассеяния, следовательно, несмотря на увеличение радиуса ЛПНП вследствие ишемии их форма остается сферической.

В параграфе §5.2. представлены исследования (методом статического рэлеевского рассеяния света) по определению молекулярной массы и плотности ЛПНП. Была получена масса ЛПНП, равная 2,5 млнДа при всех значениях рН, одинаковая для обеих групп (до и после ишемии) животных. Были рассчитаны значения плотности контрольных ЛПНП и ЛПНП сыворотки после ишемии при различных значениях рН. При увеличении размеров ЛПНП ишемической сыворотки относительно размеров ЛПНП здоровой сыворотки происходит уменьшение плотности ишемических ЛПНП по сравнению с плотностью здоровых ЛПНП в 1,75-2,30 раз.

Зарегистрированные изменения ЛПНП, произошедшие вследствие ишемии головного мозга, объясняются в рамках свободнорадикальной теории окислительного стресса разрыхлением фосфолипидного амфипатического слоя ЛПНП под действием свободнорадикальных продуктов, появившихся вследствие ишемии.

В параграфе §5.3. представлено исследование повреждающего действия ишемии на компоненты сыворотки крови методом спектроскопии

комбинационного рассеяния света, т.е. за счет определения изменения молекулярной структуры ЛПНП.

После ишемической процедуры пропадают пики рамановского смещения, отвечающие за двойные связи (C=C) в ненасыщенных жирных кислотах, входящих в состав фосфолипидов ЛПНП. На спектрограммах ишемической сыворотки появляются пики, соответствующие окислению жирных кислот в фосфолипидах ЛПНП по ненасыщенным двойным связям. В спектрограммах ишемической сыворотки появляются пики, соответствующие образованию липоперекисных продуктов, пероксикислот и пероксиэфиров вследствие окисления жирных кислот в фосфолипидах ЛПНП.

Основным субстратом свободнорадикального окисления в ЛПНП служат, как видно из спектрограмм комбинационного рассеяния, полиненасыщенные жирные кислоты фосфолипидного слоя. Свободнорадикальное окисление ЛПНП приводит к изменению их химического состава, что характеризуется снижением в них содержания свободных жирных кислот (LH) и значительным повышением содержания продуктов окисления (липоперекисей LOOH, диалкилперекисей LOOL', пероксикислот LCOOH, пероксиэфиров LCOOL'). Таким образом, методом комбинационного рассеяния света получено подтверждение высказанной в работе гипотезы, объясняющей изменения ЛПНП после ишемии в рамках свободнорадикальной окислительной теории.

В параграфе §5.4. представлено исследование повреждающего действия ишемии на компоненты сыворотки крови методами люминесцентного анализа. Продукты свободнорадикальных реакций, образующиеся при ишемическом повреждении сыворотки крови, обладают способностью к фотолюминесценции. Как видно из рис.3, после ишемической процедуры интенсивность люминесценции сыворотки крови возрастает (в 5,3 раза) по сравнению с интенсивностью люминесценции здоровой сыворотки крови ($\lambda_{возб} = 350$ нм). В норме в здоровой сыворотке крови концентрация свободных радикалов очень

мала, поэтому мала и интенсивность люминесценции (рис.3). Увеличение

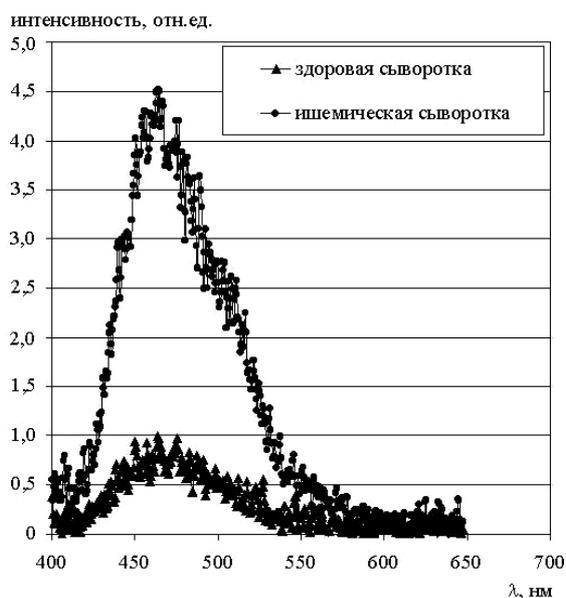


Рис.3. Люминесценция контрольной (здоровой) сыворотки крови и сыворотки крови после ишемии.

люминесценции после ишемии обусловлено наличием неспаренных электронов в свободнорадикальных соединениях ишемической сыворотки, и, соответственно, большей вероятностью возбуждения молекул этих соединений при облучении светом. Таким образом, с помощью методов люминесцентно – спектрального анализа подтверждается предложенная гипотеза об определяющей роли

свободнорадикального окисления в повреждениях ЛПНП при ишемии.

Липоперекисное свободнорадикальное окисление фосфолипидов амфипатического слоя ЛПНП после ишемической процедуры подтверждено в данной работе также при помощи использования флуоресцентных зондов (родамина бЖ, нильского синего). Зарегистрировано, что интенсивность люминесценции родамина при добавлении его в ишемическую сыворотку больше аналогичной интенсивности родамина, добавленного в здоровую сыворотку (примерно в 1,5 раза). Данное увеличение интенсивности связано с тем, что родамин бЖ выступает в данной системе как флуоресцентный зонд, принимающий на себя энергию с возбужденных липидных свободнорадикальных соединений в составе фосфолипидного слоя ЛПНП, появляющихся по причине ишемического окислительного повреждения фосфолипидного слоя ЛПНП.

При исследовании люминесценции нильского синего, добавленного в образцы сыворотки крови, показано, что интенсивность люминесценции нильского синего при добавлении его в ишемическую сыворотку больше

аналогичной интенсивности нильского синего, добавленного в здоровую сыворотку крови (примерно на 30 %). Данное увеличение интенсивности люминесценции нильского синего объясняется тем, что нильский синий проникает в фосфолипидный слой ЛПНП, который после ишемии становится разрыхлённым, и связывается с ненасыщенными жирными кислотами фосфолипидов ЛПНП. После ишемии в составе фосфолипидов ЛПНП присутствуют липидные свободнорадикальные соединения, которые при возбуждении их светом, передают свою энергию возбуждения на связавшиеся с ними молекулы нильского синего.

В заключительной части диссертации отдельным пунктом вынесены *основные результаты и выводы* работы.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Методом динамического светорассеяния показано, что присутствие соли тяжелого металла (хлорида цезия CsCl) вызывает агрегацию молекул сывороточного альбумина человека. При этом размер образующихся белковых агрегатов возрастает прямо пропорционально концентрации этой соли. Зависимость гидродинамического радиуса образующихся белковых комплексов от pH буферного раствора в пределах каждого значения концентрации CsCl имеет параболический вид с максимумом в изоэлектрической точке белка. Показано, что наибольшая агрегация альбумина имеет место вблизи его изоэлектрической точки. Установлено, что добавление хлорида цезия приводит к слипанию молекул альбумина в агрегаты практически сферической формы.
2. Методом комбинационного рассеяния света получено свидетельство агрегации сывороточного альбумина человека в присутствии соли тяжёлого металла (CsCl), зарегистрировано, что наибольшая агрегация сывороточного альбумина человека имеет место вблизи его изоэлектрической точки (т.е. при pH 5,0), а при удалении от изоэлектрической точки (как в сторону возрастания

значения рН, так и в сторону убывания рН) степень агрегации молекул альбумина уменьшается. Объяснен аминокислотный механизм CsCl-индуцированной агрегации и выяснены агрегационные химические связи, возникающие между цепями аминокислот сывороточного альбумина.

3. Методом динамического рассеяния света показано, что присутствие мицелл ионного отрицательно заряженного детергента ДСН приводит к денатурации молекул альбумина, при этом в работе определена величина денатурации белковых молекул в зависимости от значения рН раствора и концентрации детергента. Определена концентрация насыщения сывороточного альбумина человека детергентом (7 мМ ДСН). Зарегистрировано, что большая денатурация белка в присутствии ДСН имеет место при значениях рН буферного раствора, меньших изоэлектрической точки альбумина, что объясняется электростатическими причинами.

4. Методом динамического светорассеяния исследована денатурация сывороточного альбумина человека под влиянием температуры в зависимости от рН раствора. Установлено, что тепловая денатурация сывороточного альбумина зависит от рН раствора. Показано, что для рассмотренных в работе значений рН тепловая денатурация происходит сильнее при значениях рН буферного раствора белка, близких к изоэлектрической точке данного белка.

5. Методами лазерной корреляционной спектроскопии рассеянного света зарегистрированы отличия в сыворотке крови животных, перенёсших ишемию головного мозга, по сравнению с сывороткой контрольной группы здоровых животных: размер ЛПНП сыворотки животных после ишемии больше размера ЛПНП здоровой сыворотки; плотность ишемических ЛПНП значительно меньше плотности здоровых ЛПНП.

6. Методом комбинационного рассеяния света получено подтверждение выдвинутой теории, объясняющей увеличение размеров ЛПНП и уменьшение их плотности после ишемии по сравнению с контрольными здоровыми ЛПНП

разрыхлением фосфолипидного амфипатического слоя ЛПНП под действием свободнорадикальных продуктов, появляющихся вследствие ишемии.

7. С помощью применения люминесцентно – спектрального анализа подтверждена предложенная теория об определяющей роли свободнорадикального окисления в повреждениях ЛПНП при ишемии. Показано, что интенсивность люминесценции сыворотки после ишемии сильно возрастает по сравнению с интенсивностью люминесценции здоровой сыворотки крови. Увеличение интенсивности люминесценции сыворотки крови после ишемии однозначно отражает повышенную концентрацию свободнорадикальных липидных соединений в фосфолипидном слое ишемических ЛПНП. Добавление флуоресцентных зондов (родамина 6Ж, нильского синего) в сыворотку крови подтверждает различие физико-химических свойств ЛПНП сыворотки крови животных до и после ишемической процедуры.

СПИСОК РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Баранов А.Н., Власова И.М., Салецкий А.М. Исследование процессов агрегации сывороточного альбумина. ЖПС, 2004, т. 71, № 2, с. 204-207.
2. Власова И.М., Потапов А.В. Применение методов корреляционной спектроскопии для определения размеров и формы молекул сывороточного альбумина. В сборнике трудов III Международной конференции молодых ученых и специалистов “Оптика-2003”, Санкт-Петербург: СпбГУ ИТМО, 2003, с. 292-293.
3. Vlasova I.M., Mikrin V.E., Saletsky A.M. Investigation of CsCl-induced aggregation of serum albumin depending on pH by Raman spectroscopy method. Laser Physics Letters, 2005, v. 2, № 4, p. 204-207.
4. Баранов А.Н., Власова И.М., Микрин В.Е., Салецкий А.М. Лазерная корреляционная спектроскопия процессов денатурации сывороточного альбумина. ЖПС, 2004, т. 71, № 6, с. 831-835.

5. Власова И.М., Микрин В.Е., Салецкий А.М. Применение методов лазерной спектроскопии динамического светорассеяния при исследовании денатурации сывороточного альбумина плазмы крови человека. В сборнике трудов Третьего межд. оптического конгресса «Оптика-XXI век», Третьей межд. конференции «Фундаментальные проблемы оптики-2004», Санкт-Петербург: СПбГУ ИТМО, 2004, с. 291-292.
6. Vlasova I.M., Dolmatova E.V., Koshelev V.B., Saletsky A.M. Investigation of ischemia damaging action on blood serum structure by laser spectroscopy methods. *Laser Physics Letters*, 2004, v. 1, № 8, p. 417-420.
7. Власова И.М., Микрин В.Е. Регистрация повреждающего действия ишемии на компоненты сыворотки крови методами спектроскопии динамического и статического светорассеяния. В сборнике тезисов межд. конференции «Ломоносов-2004», секция «Физика», МГУ, физ.ф-т, 2004, с. 209.
8. Власова И.М., Салецкий А.М. Регистрация ишемических изменений сыворотки крови методами лазерной спектроскопии. В сборнике тезисов докладов и сообщений на XI Всероссийской конференции «Структура и динамика молекулярных систем-Яльчик-2004», Москва-Йошкар-Ола-Уфа-Казань, 2004, с. 64.
9. Saletsky A.M., Vlasova I.M. Application of laser spectroscopy methods for investigation of ischemia damaging action on blood serum. ALT04. Conference “Advanced Laser Technologies”, Scientific programme, Rome and Frascati, 2004, p. 106.
10. Baranov A.N., Vlasova I.M., Saletsky A.M. Investigation of ischemia damaging action on blood serum by Raman spectroscopy method. *Laser Physics Letters*, 2004, v. 1, № 11, p. 555-559.

ООП Физ. ф-та МГУ. Заказ 50-100-05