

**Федеральное государственное автономное образовательное  
учреждение высшего образования  
«Казанский (Приволжский) федеральный университет»**

*На правах рукописи*

**МАГСУМОВ ТИМУР ИЛЬНУРОВИЧ**

**ПОДАВЛЕНИЕ ГИДРОФОБНОГО ЭФФЕКТА  
ОРГАНИЧЕСКИМИ СОРАСТВОРИТЕЛЯМИ**

1.4.4. Физическая химия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Казань – 2022

Работа выполнена на кафедре физической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Научный руководитель: доктор химических наук, доцент  
**Седов Игорь Алексеевич**

Официальные оппоненты: **Батов Дмитрий Вячеславович**,  
доктор химических наук, ведущий научный сотрудник  
объединенного физико-химического центра растворов  
ИХР РАН и ИГХТУ, Федеральное государственное  
бюджетное учреждение науки Институт химии  
растворов им. Г.А. Крестова Российской академии наук

**Селиванова Наталья Михайловна**,  
доктор химических наук, доцент, профессор кафедры  
физической и коллоидной химии, Федеральное  
государственное бюджетное образовательное  
учреждение высшего образования «Казанский  
национальный исследовательский технологический  
университет»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение  
науки Институт химической кинетики и горения  
им. В.В. Воеводского Сибирского отделения  
Российской академии наук, г. Новосибирск

Защита диссертации состоится «13» апреля 2022 года в 14 часов 30 минут на заседании диссертационного совета 24.1.225.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук» по адресу: 420088, г. Казань, ул. Академика Арбузова, д. 8, ИОФХ им. А.Е. Арбузова ФИЦ КазНЦ РАН, большой конференц-зал.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ИОФХ им. А.Е. Арбузова ФИЦ «Казанский научный центр Российской академии наук» и на сайте [www.iopc.ru](http://www.iopc.ru).

Отзывы на автореферат (в 2-х экземплярах) просим направлять по адресу: 420088, г. Казань, ул. Академика Арбузова, д. 8, ИОФХ им. А.Е. Арбузова ФИЦ КазНЦ РАН, ученому секретарю диссертационного совета (e-mail: [toropchina@iopc.ru](mailto:toropchina@iopc.ru)).

Автореферат разослан «\_\_» февраля 2022 года

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат химических наук

Торопчина А.В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность работы.** Низкая растворимость малополярных соединений, устойчивость трехмерной структуры белков, образование мицелл и бислоев и многие другие физико-химические феномены в водных растворах связаны с проявлениями гидрофобного эффекта. Добавление смешивающихся с водой органических растворителей обычно вызывает ослабление его влияния. Это приводит, в частности, к увеличению растворимости малополярных соединений, разрушению мицелл и понижению стабильности нативной структуры белков вплоть до их денатурации.

Водно-органические смеси используются в процессах разделения и экстракции различных веществ как в лабораторном, так и в промышленном масштабе, что объясняет необходимость детального изучения их сольватационных свойств. В водно-органических смесях могут быть хорошо растворимы как малополярные органические молекулы, так и неорганические соли, что делает их средами, пригодными для проведения химических синтезов в гомогенных условиях. Кроме того, использование водно-органических смесей позволяет изменять селективность ферментов, а также проводить ферментативные реакции с плохо растворимыми в воде субстратами. Однако при этом следует учитывать снижение стабильности и каталитической активности белка. Поэтому исследование влияния различных растворителей на процессы денатурации белков также является актуальной задачей.

**Цель работы.** Основной целью работы является установление закономерностей подавления гидрофобного эффекта в водно-органических смесях в зависимости от природы и концентрации органического соразтворителя на примере процессов сольватации неполярных соединений и снижения термической стабильности белков. Для реализации этой цели были поставлены следующие задачи:

получение новых экспериментальных данных по коэффициентам активности и энтальпиям растворения малополярных соединений в водно-органических смесях;

разработка молекулярных моделей изучаемых водно-органических смесей и расчет термодинамических функций образования полости с использованием метода молекулярной динамики;

получение новых экспериментальных данных по термической стабильности белков в водно-органических смесях различного состава;

установление связи между термической стабильностью белков в водно-органических смесях, сольватационными свойствами этих смесей и подавлением гидрофобного эффекта;

исследование влияния органических растворителей на механизм термически индуцированного разрушения нативной структуры белка экспериментальными и теоретическими методами.

**Научная новизна.** В работе измерены ранее неизвестные величины термодинамических функций растворения и сольватации неполярных соединений в смесях воды с различными органическими соразтворителями в

широком диапазоне составов смесей. Показано, что добавление даже небольших количеств органического растворителя приводит к подавлению гидрофобного эффекта.

На основе рассчитанных значений термодинамических функций образования полости в водно-органических смесях показано, что подавление гидрофобного эффекта обусловлено изменением термодинамических параметров процесса образования полости при добавлении органического растворителя.

Изучена термическая стабильность модельного белка лизоцима в смесях воды с различными органическими растворителями при однородных условиях проведения эксперимента. Впервые предложен ряд растворителей по их денатурирующей способности, мерой которой выступает величина изменения температуры денатурации белка.

Показана связь между денатурирующей способностью водно-органических смесей и их сольватационными свойствами по отношению к малополярным соединениям.

Показано, что в присутствии различных органических растворителей не только снижается термическая стабильность лизоцима, но и изменяется механизм термически индуцированного разрушения его нативной структуры. Во многих случаях при этом разрушение элементов вторичной структуры продолжается после исчезновения нативной третичной структуры, в то время как в чистой воде эти процессы происходят синхронно.

#### **Теоретическая и практическая значимость.**

Полученные значения коэффициентов активности и энтальпий растворения, а также термодинамические функции образования полости могут быть использованы для параметризации расчетных моделей растворимости.

Полученные данные о денатурирующей способности растворителей могут быть использованы для выбора наиболее подходящего растворителя при проведении ферментативных реакций.

Фундаментальное значение имеют выводы о связи между подавлением гидрофобного эффекта различными растворителями, их влиянием на термодинамику сольватации низкомолекулярных малополярных соединений и процесс денатурации белков в водно-органических смесях.

#### **Основные положения, выносимые на защиту.**

Новые экспериментальные данные по термодинамическим функциям сольватации углеводов в смесях воды с различными органическими соразтворителями;

новые данные о термодинамических функциях образования полостей в различных растворителях;

определяющая роль вклада образования полости в подавлении гидрофобного эффекта в водно-органических смесях;

шкала органических растворителей по денатурирующей способности;

связь между денатурирующей способностью и сольватационными свойствами смесей органических растворителей с водой;

частичное сохранение вторичной структуры белка после разрушения третичной при термической денатурации белков в водно-органических смесях; неодностадийный механизм денатурации лизоцима.

**Достоверность результатов** подтверждается использованием современного оборудования и апробированных методик исследования, воспроизводимостью полученных экспериментальных и расчетных данных и их согласием с описанными ранее в литературе результатами.

**Личный вклад автора.** Автором получены все экспериментальные данные, представленные в работе; проведен анализ литературы, математическая обработка экспериментальных и литературных данных; расчеты методом молекулярной динамики; анализ и обобщение полученных результатов.

**Апробация работы.** Основные результаты работы были представлены на XX Международной конференции по химической термодинамике в России (Нижний Новгород, 2015), XXIII международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2016» (Москва, 2016), XX Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Екатеринбург, 2016), XIII и XIV Международных конференциях «Проблемы сольватации и комплексообразования в растворах» (Суздаль, 2018 и Иваново, 2021), 14-й Международной конференции по фундаментальным и прикладным аспектам физической химии (Белград, Сербия, 2018), 4- и 5-ой Центрально- и Восточно-Европейской конференциях по термическому анализу и калориметрии (Кишинев, Молдавия, 2017 и Рим, Италия, 2019), X и XI Международных конференциях молодых ученых по химии «Менделеев-2017» и «Менделеев-2019» (Санкт-Петербург, 2017 и 2019), XII Всероссийской школы-конференции молодых ученых «Теоретическая и экспериментальная химия жидкофазных систем» (Иваново, 2019), а также на научных конференциях Казанского федерального университета (2015 и 2017).

**Публикации.** Основные результаты диссертационного исследования изложены в 9 статьях [1–9] в рецензируемых научных журналах, индексируемых в WoS и Scopus, а также в 13 тезисах докладов на международных и российских научных конференциях.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация состоит из введения, 5 глав, перечня основных результатов и выводов, списка литературы из 277 источников. Работа изложена на 173 страницах, содержит 17 таблиц и 50 рисунков.

**Работа выполнена** на кафедре физической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет» при поддержке гранта РФФИ по проекту № 19-33-90185 «Характеристика сольватационных свойств индивидуальных и смешанных растворителей на основе термодинамических функций образования полости», а также программы повышения конкурентоспособности Казанского Федерального университета.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В **первой главе** приводится феноменологическое описание гидрофобного эффекта. Особое внимание уделяется процессу сольватации малополярных соединений в воде. Подробно обсуждается использование концепции образования полости, широко применяемой для интерпретации различий термодинамики процесса сольватации соединений в воде и других растворителях. Также описывается использование соотношений между термодинамическими функциями сольватации для качественной и количественной характеристики гидрофобного и сольвофобных эффектов. В конце главы рассмотрены примеры явлений, в которых гидрофобный эффект играет ключевую роль: самосборка амфифильных молекул, фолдинг белков, белок-лигандные взаимодействия.

Во **второй главе** обсуждаются полученные ранее результаты, связанные с подавлением гидрофобного эффекта органическими соразтворителями. Приводятся закономерности, наблюдаемые для определенных ранее в литературе термодинамических функций сольватации в водно-органических смесях. Описываются результаты теоретических исследований процесса сольватации в смесях воды с органическими соразтворителями. Отдельное внимание уделяется явлению, которое напрямую связано с подавлением гидрофобного эффекта – изменению термической стабильности белков в присутствии органических растворителей. Изложены упоминающиеся в литературе закономерности для процесса денатурации в водно-органических смесях.

В **третьей главе** подробно описываются методики, использованные при проведении экспериментов и расчетов. Термодинамические функции растворения и сольватации углеводов в водно-органических смесях были определены с помощью метода газохроматографического анализа равновесного пара и изотермической титрационной калориметрии. Расчет термодинамических функций сольватации одноатомных газов и образования полостей был проведен с использованием методов молекулярной динамики и вставки пробных частиц Видома. Денатурация модельного белка лизоцима в воде и ее смесях с органическими соразтворителями была изучена методами дифференциальной сканирующей калориметрии, спектроскопии кругового дихроизма и комбинацией флуоресцентной спектроскопии и метода остановленной струи. Теоретическое исследование разрушения нативной структуры белка в водно-органических смесях различного состава было проведено методом молекулярной динамики.

В **четвертой главе** представлено обсуждение полученных величин термодинамических функций сольватации углеводов в водно-органических смесях и их зависимостей от состава смесей. Проанализированы зависимости рассчитанных значений термодинамических функции образования полости в водно-органических смесях и состав их сольватного окружения. Показана ключевая роль вклада процесса образования полости в подавление гидрофобного

эффекта и термодинамические функции сольватации малополярных соединений в водно-органических смесях.

**Пятая глава** посвящена полученным результатам исследования влияния органического растворителя на процесс денатурации белков. Получен ряд растворителей по их денатурирующей способности, показана связь между термодинамическими функциями процессов денатурации белков и сольватации в водно-органических смесях. На основе экспериментальных результатов и данных моделирования методом молекулярной динамики проанализировано влияние органического соразтворителя на процесс разрушения нативной структуры белка лизоцима. Показано, что в водно-органических смесях с большой концентрацией органического компонента потеря вторичной структуры белка происходит постепенно при более высоких температурах, чем температура разрушения третичной структуры, в то время как в чистой воде эти процессы протекают при одной и той же температуре и часто сравниваются с фазовым переходом.

## Сольватация малополярных соединений в водно-органических смесях (Глава 4)

### Термодинамические функции сольватации неполярных соединений в водно-органических смесях

Зависимости энергии Гиббса сольватации углеводов от состава водно-органической смеси для всех изученных смесей имеют нелинейный вид и выпуклы вниз (рисунок 1). Это дает возможность предположить, что сольватная оболочка растворенного вещества обогащена органическим соразтворителем. Из рассмотренных растворителей наименьшие отклонения от линейности проявляются для смесей воды с метанолом, который имеет близкий к воде размер и проще всего встраивается в сетку водородных связей воды. Наибольшие отклонения наблюдаются для смесей воды с тетрагидрофураном, 1,4-диоксаном, изопропанолом и трет-бутанолом.

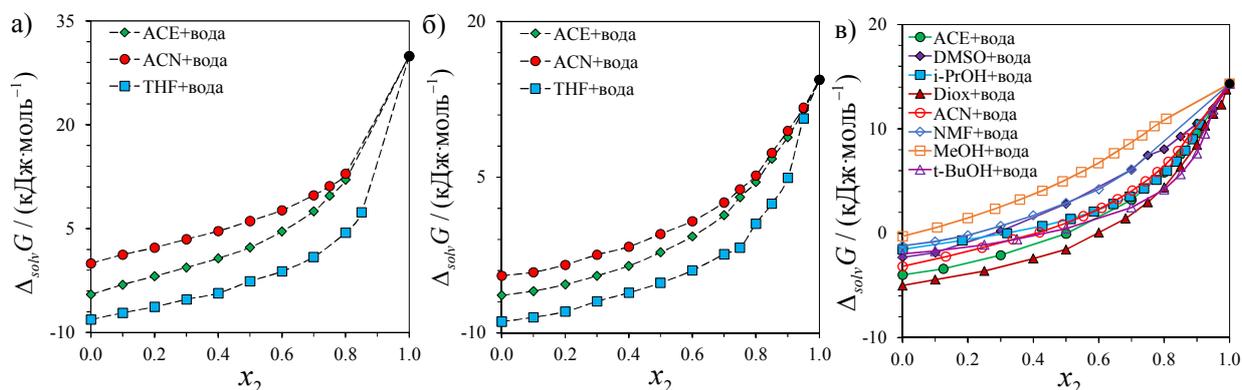


Рисунок 1. Энергии Гиббса сольватации октана (а), толуола (б) и бензола (в) в водно-органических смесях при 298,15 К. Здесь и далее сокращения обозначают: ACN – ацетонитрил, ACE – ацетон, THF – тетрагидрофуран, DiOx – диоксан, DMSO – диметилсульфоксид, NMF – N-метилформамид, MeOH – метанол, i-PrOH – изопропанол, t-BuOH – трет-бутанол. Здесь и далее  $x_2$  соответствует мольной доле воды.

Для зависимостей энтальпий сольватации от состава водно-органических смесей (рисунок 2) практически во всех системах растворенное вещество – растворитель наблюдается следующая тенденция: при увеличении концентрации воды в смеси происходит медленный рост энтальпии сольватации, которая достигает максимума при высоких концентрациях воды, порядка 0,8–0,95 мольных долей. После достижения максимума энтальпии сольватации падают и стремятся к значениям в чистой воде. Для смеси ацетонитрил-вода зависимости имеют несколько иной вид: для них также наблюдаются максимумы при  $x_2 = 0,8-0,9$ , но им предшествует снижение величины энтальпии сольватации (небольшое для аренов и значительное для октана) при мольной доле воды 0,4–0,7.

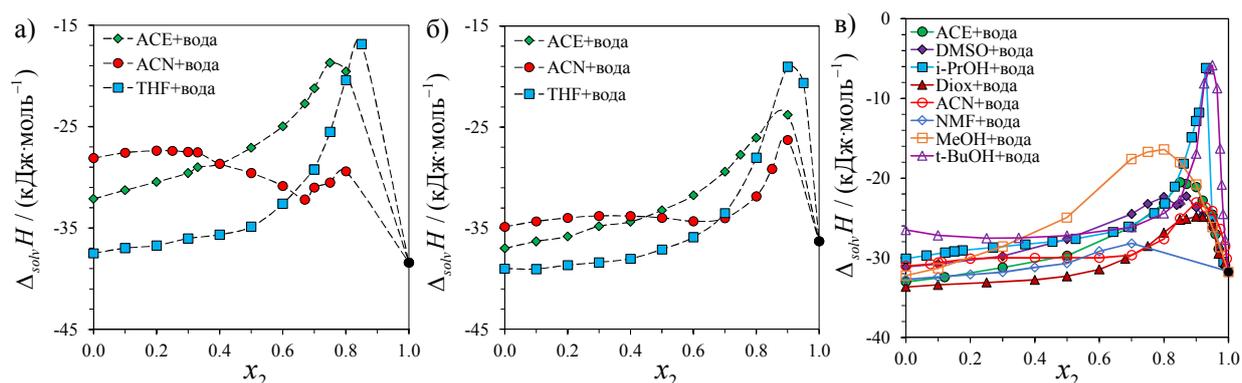


Рисунок 2. Энтальпии сольватации октана (а), толуола (б) и бензола (в) в водно-органических смесях при 298,15 К.

Экспериментальные термодинамические функции сольватации для алканов при мольных долях воды выше 0,4 ранее получены не были. Предложенные в литературе экстраполяции предсказывали либо слабо выраженные максимумы для энтальпии сольватации  $\Delta_{sol}H$ , либо их отсутствие, т.е. практически постоянные значения  $\Delta_{sol}H$  в широком диапазоне составов смеси с постепенным снижением до значений в чистой воде. Таким образом, факт наличия ярко выраженных максимумов для зависимости энтальпии сольватации алканов от состава водно-органических смесей экспериментально доказан впервые.

На основе данных по энергиям Гиббса и энтальпиям сольватации были рассчитаны значения энтропий сольватации (рисунок 3). Для большинства изученных смесей увеличение концентрации воды до 80-95 мольных процентов не приводит к существенному уменьшению энтропии сольватации, т.е. не приближает энтропию сольватации к значениям в чистой воде. Лишь в случае смеси ацетонитрил-вода наблюдается медленное снижение значений энтропии начиная с мольной доли воды 0,4-0,5. Для смесей воды с тетрагидрофураном, изопропанолом и трет-бутанолом при высоких концентрациях воды ( $x_2 = 0,9-0,95$ ) снижению энтропии до значений в чистой воде предшествует резкий рост. Хорошо известно, что низкие значения энтропии сольватации связаны с гидрофобным эффектом. Тот факт, что в водно-органических смесях энтропии сольватации мало изменяются или даже растут с увеличением концентрации воды, свидетельствует о подавлении гидрофобного эффекта даже небольшими количествами органического соразтворителя.

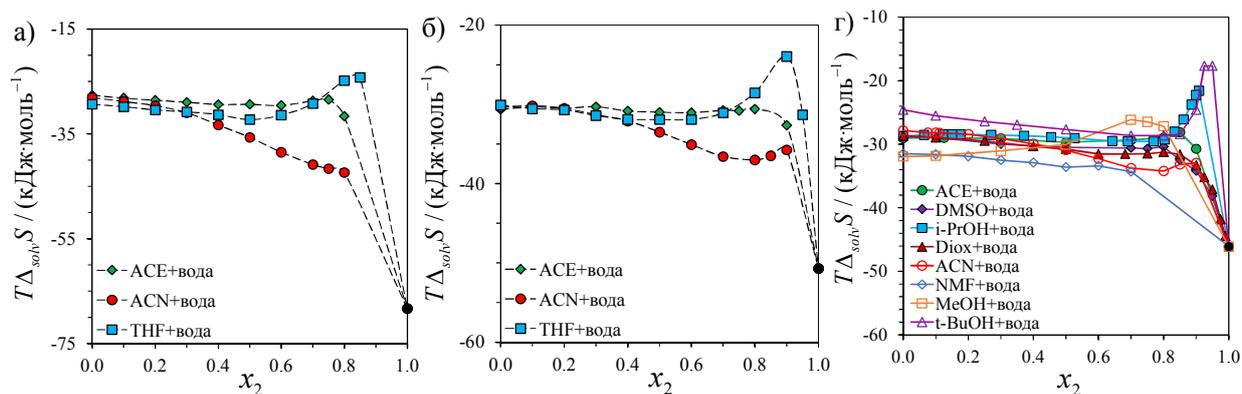


Рисунок 3. Энтропии сольватации октана (а), толуола (б) и бензола (в) в водно-органических смесях при 298,15 К.

### Соотношения между энергией Гиббса и энтальпией сольватации неполярных соединений в водно-органических смесях

При рассмотрении проявлений гидрофобного эффекта в водно-органических смесях помимо зависимостей термодинамических функций сольватации от состава смеси интерес представляют соотношения между энергией Гиббса и энтальпией сольватации. Ранее была обнаружена линейная корреляция между энергией Гиббса и энтальпией сольватации различных соединений в неассоциированных растворителях [Sedov, Solomonov. *J Struct Chem*, 2013, 54, 262]. Отклонение от корреляции было предложено считать качественным критерием, а его величину – количественной мерой силы сольвофобных и, в частности, гидрофобного эффектов.

Добавление воды к органическому растворителю должно приводить к увеличению смещения термодинамических функций сольватации от корреляции в сторону более высоких энергий Гиббса. Тем не менее, для большинства смесей это смещение если и наблюдается, то остается незначительным в широком диапазоне составов смеси (рисунок 4). Лишь при высоких концентрациях воды наблюдается резкий загиб в сторону точки, соответствующей значениям термодинамических функций сольватации в чистой воде.

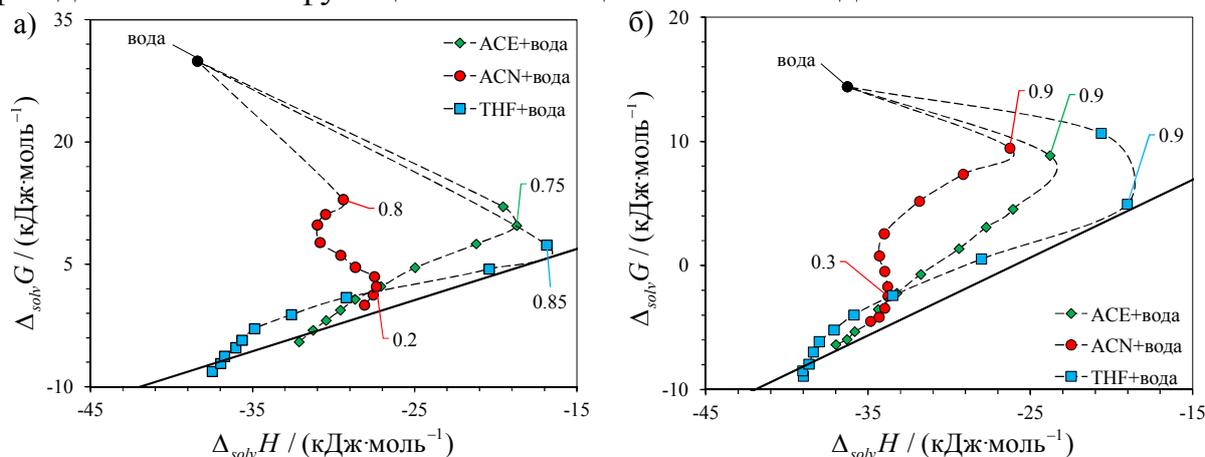


Рисунок 4. Соотношения между энергией Гиббса и энтальпией сольватации октана (а) и толуола (б) в водно-органических смесях при 298,15 К. Сплошная линия соответствует линейной корреляции для апротонных растворителей. Числами обозначены мольные доли воды в смесях.

Сохранение линейной корреляции между энергией Гиббса и энтальпией означает, что в присутствии органического растворителя происходит подавление гидрофобного эффекта. При этом растворители подавляют гидрофобный эффект с различной эффективностью. Об этом можно судить как по величине отклонения термодинамических функций сольватации от корреляции, так и по различным значениям концентрации органического соразтворителя, при которой происходит загиб.

### ***Термодинамические функции образования полости в водно-органических смесях***

Процесс сольватации часто разделяют на два гипотетических этапа: 1) образование в растворителе полости, способной вместить молекулу растворяемого вещества, и 2) перенос молекулы растворяемого вещества из газовой фазы в эту полость с последующим «включением» взаимодействий растворитель-растворяемое вещество. Вклад процесса образования полости учитывает только взаимодействия между молекулами растворителя. С помощью методов компьютерного моделирования нами было показано, что вода и другие ассоциированные растворители, такие как глицерин, этиленгликоль и формамид, характеризуются более высокими энергиями Гиббса и более низкими энтропиями образования полости по сравнению с апротонными растворителями. Можно сделать вывод, что как гидрофобный, так и сольвофобные эффекты напрямую связаны с термодинамикой процесса образования полости.

С помощью методов молекулярной динамики и вставки пробных частиц Видома были рассчитаны термодинамические функции сольватации инертных газов ( $\Delta_{solv}f$ ) и образования полости ( $\Delta_{cav}f$ ) в водно-органических смесях. Увеличение содержания органического соразтворителя в смеси приводит к снижению величин энергии Гиббса образования полости и сольватации инертных газов. Значения энергий Гиббса образования полости лежат ниже линии, соединяющей величины термодинамических функций в чистых растворителях. Как и в случае с сольватацией реальных молекул, напрашивается вывод об образовании полости преимущественно в обогащенных органическим соразтворителем областях пространства.

Данный вывод подтверждается результатами расчетов доли объема ячейки, занятого каждым соразтворителем, и вероятности образования полости в непосредственной близости от молекул органического соразтворителя и воды. Практически во всех рассмотренных смесях вероятность образования полости выше в области раствора рядом с молекулами органического растворителя. Сильнее всего это проявляется для смеси тетрагидрофуран-вода с  $x_2 = 0,9$ : на окружение молекул тетрагидрофурана, которые занимают лишь 29% объема раствора, приходится 69% полостей размера, соответствующего атому ксенона.

Анализ состава сольватной оболочки ксенона в смесях с различным содержанием органического соразтворителя также показал, что доля молекул органического соразтворителя в сольватном окружении ксенона превышает долю растворителя в смеси в целом.

Зависимости энтропий образования полости от состава смеси (рисунок 5а-б) тоже проявляют воспроизводящие поведения энтропий сольватации (см. рисунок 3) тенденции: небольшие изменения при низких концентрациях воды и резкий спад при высоких. Энтальпии образования полости и сольватации инертных газов в смесях воды с ацетоном и тетрагидрофураном от состава (рисунок 5в-г) имеют ярко выраженные максимумы при высоких концентрациях воды. Для смесей диметилсульфоксид-вода максимумы выражены слабо, а для смесей воды с ацетонитрилом они вообще отсутствуют. Таким образом, и для энтальпии наблюдаются аналогии с поведением экспериментальных термодинамических функций сольватации углеводов (см. рисунок 2).

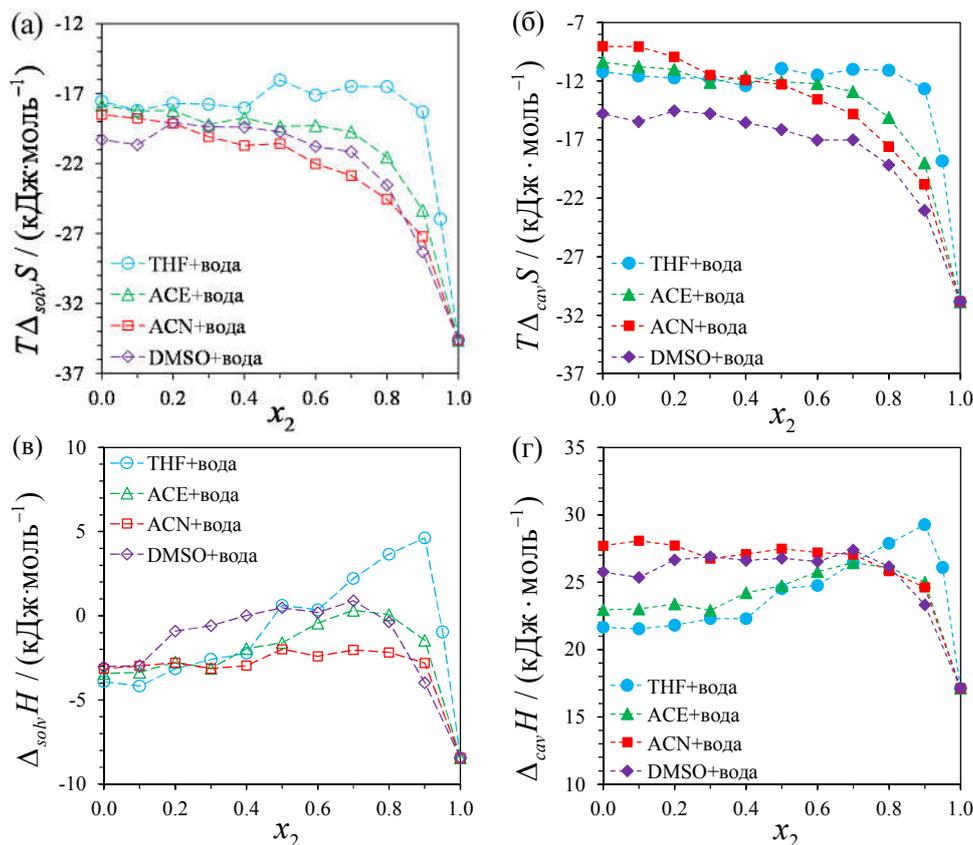


Рисунок 5. Зависимости расчетных значений энтропии (а, б) и энтальпии (в, г) сольватации ксенона (а, в) и образования полостей радиусом 0,345 нм (б, г) в водно-органических смесях от их состава при 298 К.

Связь между поведением экспериментальных термодинамических функций сольватации в водно-органических смесях и расчетных значений термодинамических функций образования полости также хорошо прослеживается на графиках  $\Delta_{cav}G$  против  $\Delta_{cav}H$  (рисунок 6). Для смесей воды с тетрагидрофураном и ацетоном в широком диапазоне составов увеличение концентрации воды не приводит к смещению термодинамических функций образования полости и сольватации инертного газа к их значениям в чистой воде – сохраняется компенсация между энергией Гиббса и энтальпией образования полости, справедливая для процесса сольватации неполярных соединений в апротонных растворителях. Для смесей диметилсульфоксид-вода линейная корреляция между энергией Гиббса и энтальпией образования полости

сохраняется в более узком диапазоне составов, а в случае смесей воды с ацетонитрилом корреляция наблюдается лишь при концентрации воды 10-30 мол. %.

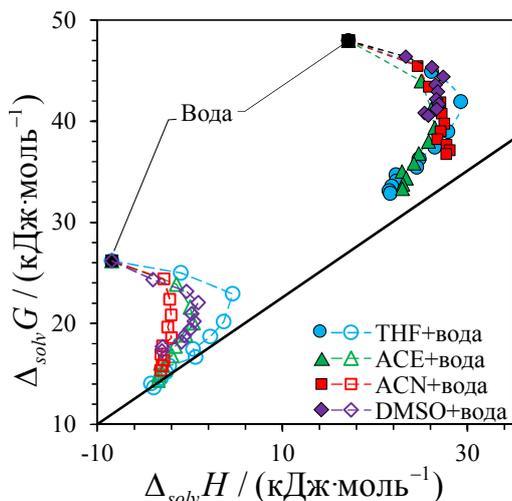


Рисунок 6. Соотношения между  $\Delta_{cav}G$  и  $\Delta_{cav}H$  для полости радиусом 0,345 нм (закрашенные символы) и соотношения между  $\Delta_{solv}G$  и  $\Delta_{solv}H$  для ксенона (пустые символы) в водно-органических смесях при 298 К. Прямая линия соответствует экспериментальной линейной корреляции для процесса сольватации в апротонных растворителях.

Высокие значения (максимумы) энтальпий образования полости и сольватации, наблюдаемые для смесей с высоким содержанием воды, могут быть объяснены с точки зрения энергетических затрат на реорганизацию растворителя вокруг полости или растворенной молекулы. Движущей силой такой реорганизации является снижение энергии Гиббса за счет преимущественной сольватации растворенного вещества органическим соразтворителем. В ходе реорганизации происходит нарушение водородных связей между молекулами воды, что приводит к высоким положительным изменениям энтальпии. Значения энтальпий образования полости одного и того же размера коррелируют с внутренним давлением водно-органических смесей  $P_i$ , которое отражает изменение внутренней энергии растворителя с ростом его объема при постоянной температуре.

### **Влияние органического соразтворителя на процесс денатурации белка (Глава 5)**

Другим проявлением подавления гидрофобного эффекта при добавлении большинства органических растворителей является снижение стабильности нативной структуры белковых молекул.

#### ***Влияние органического соразтворителя на термическую стабильность лизоцима***

Все исследованные органические соразтворители, а именно, ацетон, ацетонитрил, 1,4-диоксан, диметилсульфоксид, диметилформамид, метанол, изопропанол, трет-бутанол и тетрагидрофуран, действуют как денатурирующие агенты, снижая температуру денатурации лизоцима  $T_d$  (рисунок 7). Добавление всего 5 мольных процентов тетрагидрофурана или трет-бутанола приводит к снижению значения температуры денатурации на 20-25 °С, тогда как та же доля метанола или диметилсульфоксида изменяет  $T_d$  всего на 3-5 °С.

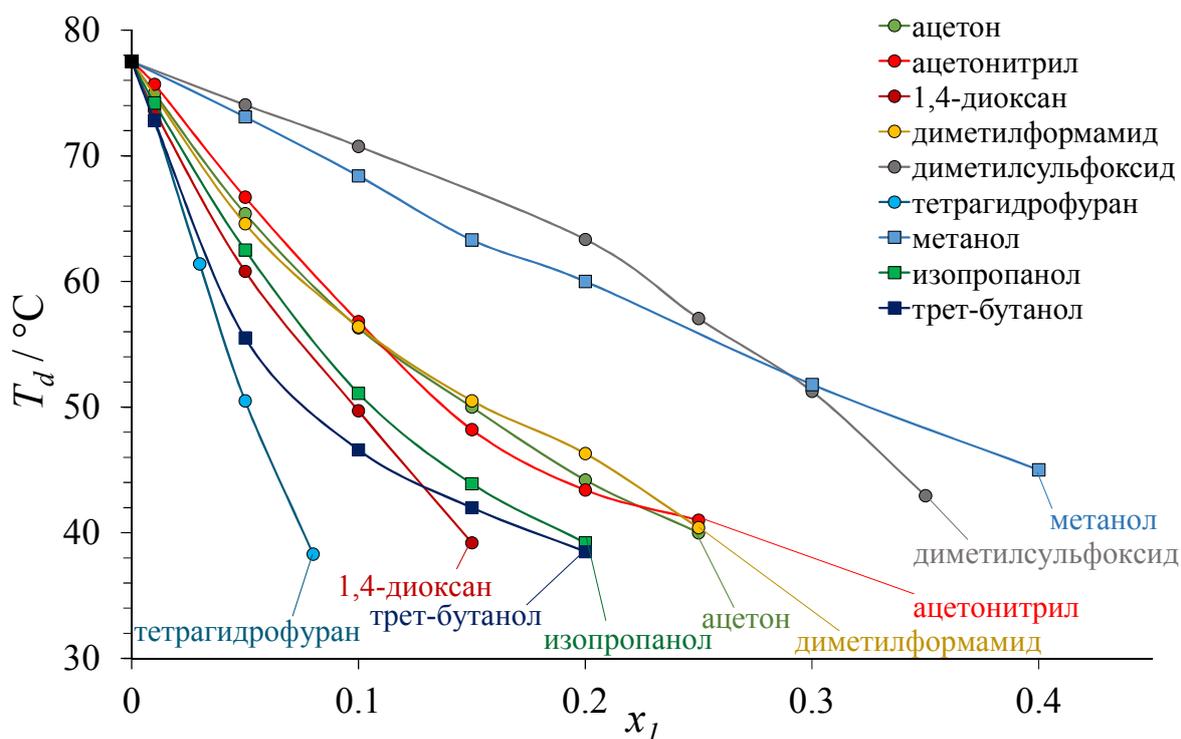


Рисунок 7. Зависимость температуры денатурации лизоцима  $T_d$  в водно-органических смесях от мольной доли органического соразтворителя  $x_1$  по данным дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) при скорости нагревания  $0,5 \text{ K} \cdot \text{мин}^{-1}$ . Линии приведены для наглядности.

Начальный участок зависимости  $T_d$  от мольной доли органического соразтворителя при низких значениях  $x_1$  в первом приближении можно описать линейным уравнением  $T_d = T_d(\text{вода}) - k \cdot x_1$  (1), где  $T_d(\text{вода})$  – температура денатурации лизоцима в чистой воде. Угловым коэффициентом этой прямой  $k = -\left(\frac{\partial T_d}{\partial x_1}\right)_{x_1 \rightarrow 0}$  является мерой денатурирующей способности соразтворителя по отношению к белку.

Изученные нами соразтворители по относительной денатурирующей способности можно расположить в следующий ряд:

диметилсульфоксид < метанол < ацетонитрил, диметилформамид, ацетон < изопропанол < 1,4-диоксан < трет-бутанол < тетрагидрофуран

Если пренебречь влиянием буферов и солей, эту серию можно дополнить несколькими другими соразтворителями на основе литературных данных по температурам денатурации различных белков, полученных методом дифференциальной сканирующей калориметрии. Расширенный ряд растворителей по относительной денатурирующей способности будет выглядеть следующим образом:

глицерин < этиленгликоль < вода < диметилсульфоксид < метанол < этанол < формамид < ацетонитрил, диметилформамид, ацетон < изопропанол < 1,4-диоксан < трет-бутанол < 1-пропанол < тетрагидрофуран < 2-бутанол < 1-бутанол.

## Денатурирующая способность и сольватационные свойства водно-органических смесей

Неоднократно подчеркивалась связь между снижением стабильности нативной структуры белка и ослаблением гидрофобного эффекта в присутствии органических соразтворителей. Нами были сопоставлены денатурирующая способность органических соразтворителей и термодинамические свойства растворов малополярных соединений в бинарных водно-органических смесях, которые напрямую зависят от способности соразтворителя подавлять гидрофобный эффект.

Полученные с помощью метода ДСК величины  $-\frac{\partial T_d}{\partial x}$  были выражены через эмпирический параметр  $m$ , также отражающий «денатурирующую способность» денатуранта в изотермических условиях, а именно, его влияние на энергию Гиббса денатурации белка [Greene, Pace. *J Biol Chem.* 1974, 249, 5388]:

$$m = -\left(\frac{\partial \Delta_d G}{\partial c}\right)_T = -\frac{\frac{\partial T_d}{\partial x} \Delta_d S}{55,6} = -\frac{\frac{\partial T_d}{\partial x} \Delta_d H}{55,6 T_d} \quad (2)$$

Для процесса сольватации углеводов при малых значениях мольной доли органического соразтворителя  $x_1$  (до 0,1–0,15) зависимость энергии Гиббса сольватации  $\Delta_{solv} G$  от  $x_1$  также близка к линейной:

$$\Delta_{solv} G(x_1) = \Delta_{solv} G(x_1 = 0) - a x_1, \quad (3)$$

Угловым коэффициентом этой зависимости  $a$  равен  $-\left(\frac{\partial \Delta_{solv} G}{\partial x_1}\right)_T$ .

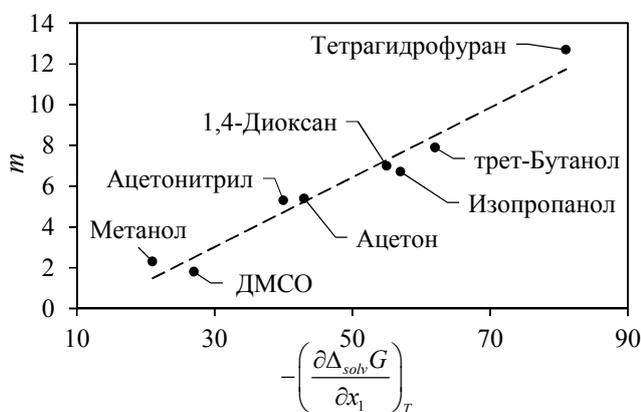


Рисунок 8. Соотношение между величиной  $m$  для лизоцима и величиной  $-\left(\frac{\partial \Delta_{solv} G}{\partial x_1}\right)_T$  для бензола в присутствии различных органических соразтворителей.

Линейная корреляция между параметрами  $m$  и  $-\left(\frac{\partial \Delta_{solv} G}{\partial x_1}\right)_T$  (рисунок 8)

означает, что процессы сольватации неполярных остатков вносят большой вклад в энергию Гиббса денатурации. Органические соразтворители способны к предпочтительной сольватации неполярных фрагментов, что приводит к образованию вокруг них сольватной оболочки, обогащенной молекулами органического соразтворителя. Этот эффект более выражен для соразтворителей с более крупными алкильными группами, таких как изомерные бутанола. Те же соразтворители оказываются наиболее сильными денатурирующими агентами из-за благоприятной предпочтительной сольватации неполярных боковых цепей белка.

## Энтальпии денатурации лизоцима в водно-органических смесях

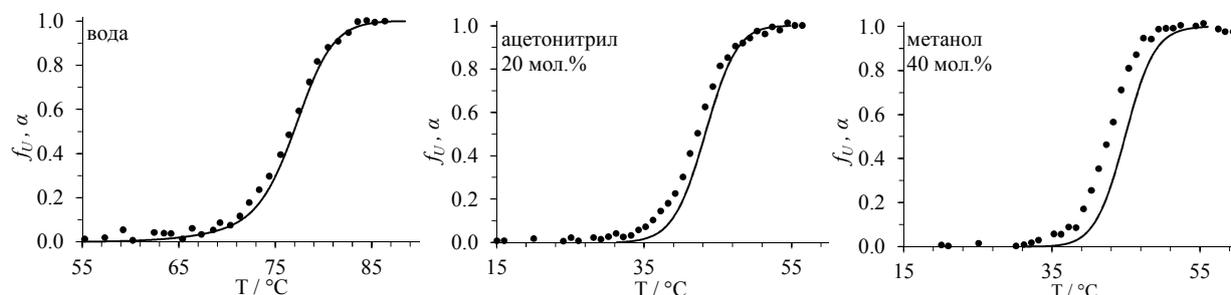
Во всех смесях, кроме смесей с 1,4-диоксаном и диметилформамидом, добавление небольших количеств органического соразтворителя приводит к заметному увеличению энтальпий денатурации лизоцима с максимумом в диапазоне мольных долей 0,01–0,1. При добавлении большего количества соразтворителя происходит монотонное уменьшение энтальпии денатурации. Это коррелирует с резким ростом энтальпий сольватации углеводов в водно-органических смесях при добавлении до 10-20 мольных процентов органического соразтворителя, что обусловлено эффектами предпочтительной сольватации. Таким образом, на вид зависимости энтальпий денатурации от концентрации соразтворителя-денатуранта большое влияние оказывает вклад сольватации неполярных боковых цепей, которые в ходе денатурации становятся доступны растворителю.

## Влияние органического соразтворителя на механизм термически индуцированного разрушения нативной структуры лизоцима

*Термическая стабильность третичной структуры лизоцима в водно-органических смесях*

По температурной зависимости сигнала кругового дихроизма (КД) в ближней УФ-области были определены температуры  $T_{CD}$ , соответствующие максимуму производной доли молекул лизоцима с утраченной третичной структурой  $f_U$  по температуре ( $\frac{df_U}{dT}$ ). Полученные величины  $T_{CD}$  были сопоставлены с температурами  $T_d$  максимума пика ДСК.

Сравнение результатов двух методов было проведено для широкого круга растворителей. На рисунке 9 приведено сравнение  $f_U$  по данным КД и степени превращения лизоцима  $\alpha$ , выраженная как доля поглощенного тепла при денатурации в ДСК-эксперименте при температуре  $T$  (при той же скорости нагревания), в различных водно-органических смесях. Концентрация соразтворителей была выбрана таким образом, чтобы денатурация наблюдалась в удобном для измерений диапазоне температур 35-50 °С.



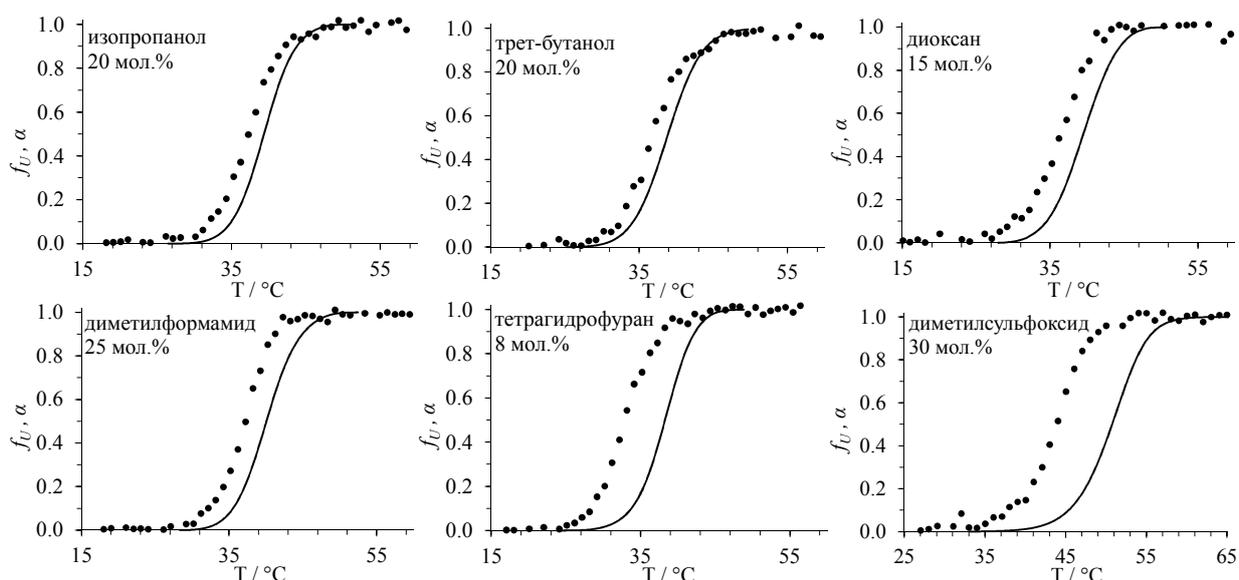


Рисунок 9. Температурные зависимости доли молекул лизоцима с утраченной третичной структурой  $f_U$  по данным КД (кружки) и степени превращения  $\alpha$  лизоцима по данным ДСК (сплошная линия) в воде и в водно-органических смесях.

Для денатурации лизоцима в воде  $T_{CD}$  примерно равна  $T_d$ . В случае водно-органических смесей расхождение между  $T_{CD}$  и  $T_d$  варьируется в зависимости от природы соразтворителя. Для смесей с ацетонитрилом эти две температуры почти одинаковы. Небольшая разница  $T_d - T_{CD}$  (от 2 до 3 °С) наблюдается для смесей, содержащих метанол, изопропанол, трет-бутанол, 1,4-диоксан и диметилформамид. Разница  $T_d - T_{CD}$  достигает 5,5 °С для смеси, содержащей 8 мол. % тетрагидрофурана, и 7 °С для 30 мол. % диметилсульфоксида. С увеличением концентрации органического соразтворителя  $T_{CD}$  все больше отличается от  $T_d$ .

В смесях, для которых температуры денатурации по данным КД и ДСК различаются, только часть общего тепла денатурации поглощается при достижении  $T_{CD}$ . Это означает, что процессы, вызывающие изменение сигнала КД на длине волны 290 нм, сопровождаются небольшими тепловыми эффектами. На ранней стадии разворачивания соразтворители могут проникать в определенные области нативного белка и нарушать взаимодействия между хромофорами, которые влияют на сигнал КД. Вероятно, наблюдаемое падение эллиптичности соответствует началу потери третичной структуры лизоцима, в то время как пики ДСК соответствуют разрушению как третичной, так и части вторичной структуры. При увеличении концентрации ДМСО и тетрагидрофурана можно ожидать ускорения проникновения их молекул в белковые глобулы, что приводит к появлению пика КД задолго до того, как произойдет полная денатурация молекулы лизоцима.

## Термическая стабильность вторичной структуры лизоцима в водно-органических смесях

Возможное различие в термической стабильности третичной и вторичной структуры лизоцима может быть выявлено путем сравнения температурных зависимостей сигналов КД в дальней и ближней УФ-областях. Изменение вторичной структуры белков можно отслеживать по изменению сигнала эллиптичности в дальней УФ-области (длины волн меньше 250 нм). К сожалению, многие из исследованных соразтворителей (ацетон, диметилсульфоксид, диметилформамид и диоксан) обладают высоким поглощением в этой области, что не позволяет наблюдать изменения.

Результаты для смесей, содержащих спирты или тетрагидрофуран (рисунок 10), показывают, что уменьшение абсолютного значения эллиптичности, которое, как предполагается, отражает потерю вторичной структуры, продолжается выше температуры, при которой заканчивается скачок сигнала третичной структуры.

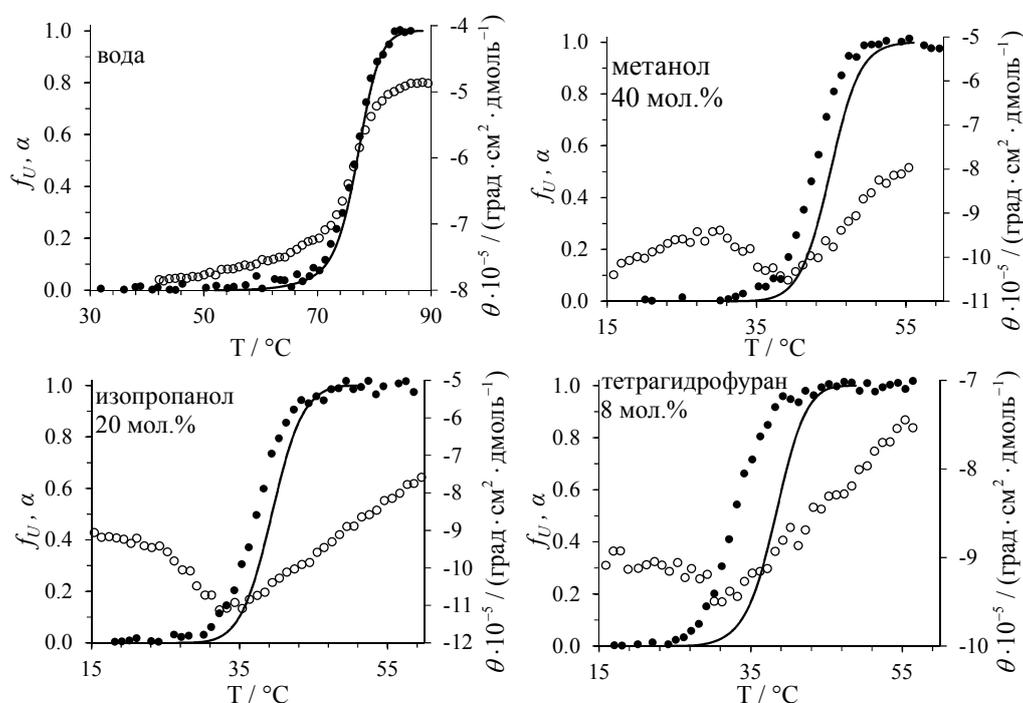


Рисунок 10. Сравнение температурных зависимостей сигнала КД при 222 нм, отражающего изменения вторичной структуры лизоцима (пустые кружки), доли молекул лизоцима с утраченной третичной структурой  $f_U$  (темные кружки) и степени превращения  $\alpha$  из экспериментов ДСК (сплошная линия) в воде и водно-органических смесях.

Это наблюдение говорит в пользу гипотезы о более высокой термической стабильности вторичной структуры по сравнению с третичной в водно-органических смесях. Изменения вторичной структуры происходят в широком диапазоне температур выше  $T_{CD}$ . На термограммах ДСК нет отдельного пика, характеризующего поглощения теплоты в результате этих изменений, так как непрерывное поглощение тепла будет выглядеть так же, как изменение базовой линии. Максимум пика ДСК ( $T_d$ ) смещается в сторону более высоких температур

от  $T_{CD}$ , но в большинстве случаев остается довольно близким к нему. В водно-спиртовых смесях росту сигнала КД при 222 нм из-за нарушения вторичной структуры предшествует его падение при температурах ниже  $T_{CD}$ , что приводит к максимуму абсолютного значения эллиптичности около  $T_{CD}$  и указывает на увеличение доли  $\alpha$ -спиральных элементов вблизи температуры денатурации.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что в ходе термической денатурации лизоцима в присутствии органических соразтворителей образуется расплавленная глобула с нарушенными третичными контактами и увеличенной спиральной структурой. Дальнейшее нагревание приводит к разрушению вторичной структуры расплавленной глобулы.

### ***Механизм денатурации лизоцима в водно-органических смесях***

Возможность существования промежуточных состояний белка при денатурации является ключевой проблемой для анализа экспериментальных данных, связанных с кинетикой денатурации белков. Нами показано, что разрушение нативной структуры лизоцима в воде и ее смесях с органическими соразтворителями происходит по-разному. В смесях во многих случаях как минимум часть третичной структуры теряется до разрушения вторичной структуры. Совершенно очевидно, что мы не можем рассматривать денатурацию лизоцима в присутствии многих органических растворителей, например, ДМСО или тетрагидрофурана, как одностадийный процесс. Следует различать как минимум две стадии разворачивания. Вторая стадия, сопровождающаяся полным разрушением нативной структуры, протекает значительно медленнее и при более высоких температурах.

Вероятно, что даже в чистой воде разворачивание лизоцима нельзя рассматривать как одностадийный процесс. Аргументом в пользу многоступенчатого механизма является зависимость положения пика ДСК от скорости сканирования. Увеличение скорости нагревания приводит к смещению пика денатурации в сторону более высоких температур, что связано с кинетикой процесса денатурации. Результаты численного моделирования кривых ДСК для гипотетического обратимого одностадийного процесса денатурации в чистой воде показывают, что смещение максимума пика при увеличении скорости нагревания от 0,5 до 2  $\text{K}\cdot\text{мин}^{-1}$  не должно превышать 0,02  $^{\circ}\text{C}$ . Сдвиг пика более чем на 1  $^{\circ}\text{C}$ , наблюдаемый экспериментально, происходил бы, если бы разница между энергиями активации прямого и обратного процессов была небольшой, что возможно только при низкой энтальпии денатурации и не соответствует реальному положению дел. В случае двух- или многоступенчатого разворачивания белка наличие ступени, удовлетворяющей одному из этих условий, может привести к наблюдаемому сдвигу. Полученные нами результаты дают еще больше свидетельств неоднотайного механизма разворачивания.

## Влияние органического соразтворителя на кинетику разрушения нативной структуры лизоцима

На примере смесей с высоким содержанием диметилсульфоксида с помощью методов остановленной струи и спектрофлуориметрии было изучено влияние органического соразтворителя на кинетику разрушения нативной структуры лизоцима. Как и в случае сигнала спектра кругового дихроизма в ближней УФ-области, изменение интенсивности флуоресценции связано с изменением третичной структуры белка. Таким образом, кинетику разрушения третичной структуры можно изучить, проследив зависимость интенсивности флуоресценции лизоцима от времени при постоянной температуре.

Изучение изменения интенсивности флуоресценции лизоцима во времени в смесях ДМСО-вода может дать информацию только о кинетике начальной стадии процесса разворачивания, сопровождающейся разрывом по крайней мере части третичных контактов в нативной структуре лизоцима. Эту стадию можно рассмотреть как обратимый переход нативного состояния  $N$  в интермедиат  $I$  по схеме  $N \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} I$ . Описание зависимости интенсивности флуоресценции от времени экспоненциальной функцией позволяет найти сумму констант скорости прямого и обратного процессов ( $k_1 + k_{-1}$ ). Кажущаяся энергия активации в общем случае будет рассчитываться согласно следующему уравнению:

$$E_a = -R \frac{d \ln(k_1 + k_{-1})}{d(1/T)} = \frac{k_1 E_1 + k_{-1} E_{-1}}{k_1 + k_{-1}}. \quad (4)$$

Отношение  $k_1 / k_{-1}$  будет расти с температурой и должно достигать 1 при равных количествах нативной и денатурированной форм белка. При более высоких температурах  $k_{-1}$  становится меньше  $k_1$ . Величина экспериментальной энергии активации  $E_a$  будет изменяться с повышением температуры от энергии активации обратного процесса  $E_{-1}$  при  $k_1 / k_{-1} \ll 1$  до энергии активации прямого процесса  $E_1$  при  $k_1 / k_{-1} \gg 1$ . Для определения энергии активации разрушения третичной структуры  $E_1$  по температурной зависимости суммы констант учитывались только значения ( $k_1 + k_{-1}$ ), измеренные выше  $T_{CD}$ . Полученные зависимости  $k_1 + k_{-1}$  от обратной температуры  $1/T$  показаны на рисунке 11.

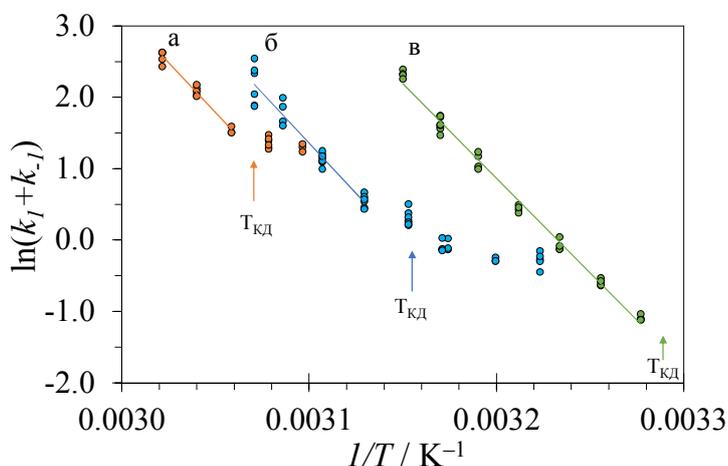


Рисунок 11. Графики Аррениуса для процесса разрушения третичной структуры лизоцима в смесях ДМСО-вода различного состава (а –  $x_1 = 0,25$ , б –  $x_1 = 0,30$  и в –  $x_1 = 0,35$ ).

Энергии активации, полученные при различных высоких концентрациях ДМСО, близки друг к другу (222-233 кДж·моль<sup>-1</sup>) и литературному значению в чистой воде (259 кДж·моль<sup>-1</sup>). Это означает, что разница между энергиями переходного и нативного состояний слабо зависит от концентрации ДМСО. Сходные значения энергий активации были получены и для разрушения третичной структуры лизоцима в смесях вода-изопропанол при рН = 2.

Таким образом, вероятно, что пространственная структура первого переходного состояния денатурации и состав его сольватной оболочки останутся близкими к таковым в нативном состоянии. Механизм дальнейшего процесса денатурации, как было показано выше, различается в воде и водно-органических смесях. Полностью денатурированное состояние при высоком содержании ДМСО становится более энергетически выгодным по сравнению с нативным состоянием из-за подавления гидрофобного эффекта и предпочтительной сольватации неполярных аминокислотных остатков органическим соразстворителем.

### **Молекулярно-динамическое моделирование разрушения нативной структуры лизоцима в воде и в смесях диметилсульфоксид-вода**

Метод молекулярной динамики использовался нами для изучения влияния органического соразстворителя на молекулярный механизм разрушения нативной структуры лизоцима на примере смесей диметилсульфоксид-вода.

Для сравнения скорости разворачивания лизоцима в смесях различного состава было использовано время разворачивания, усредненное по 10 отдельным запускам ( $\langle t_u \rangle$ ). Скорость разрушения третичной структуры отслеживалась по изменениям различных структурных параметров: среднеквадратичного отклонения  $\alpha$ -углеродов ( $Ca\text{-RMSD}$ ), радиуса инерции ( $R_g$ ), площади доступной растворителю гидрофобной поверхности ( $hSASA$ ), доли нативных контактов ( $FNC$ ) и суммы расстояний между остатками His15-Thr89 и Arg21-Ser100 ( $D$ ). Для каждого параметра было выбрано критическое значение, момент превышения которого считался временем  $t_u$  разрушения нативной структуры. Результаты для  $\langle t_u \rangle$ , полученные с использованием различных структурных параметров, в целом согласуются друг с другом (рисунок 12). Время разворачивания уменьшается с увеличением мольной доли ДМСО до 0,2–0,3 и существенно не изменяется в смесях с большим содержанием ДМСО.

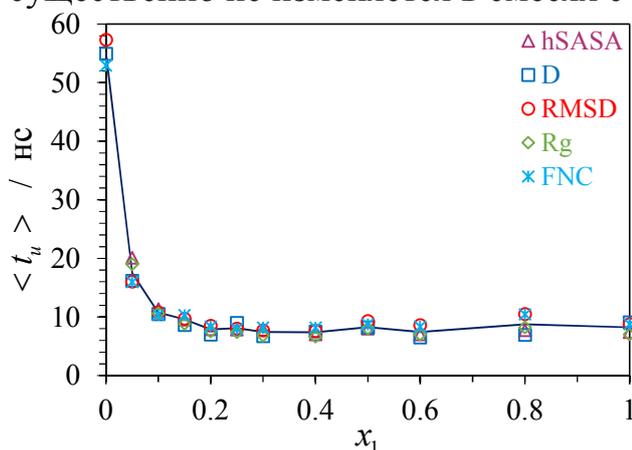


Рисунок 12. Зависимости  $\langle t_u \rangle$  от мольной доли ДМСО  $x_1$  в МД-моделировании, определенные с использованием критических значений для различных параметров. Сплошная линия соединяет средние значения  $\langle t_u \rangle$  для каждой концентрации, усредненные по всем пяти методам расчета.

Добавление всего 5% ДМСО приводит к разрушению компактной структуры лизоцима в течение 30 нс, что проявляется в достижении критических значений для параметров  $hSASA$  и  $R_g$ . В чистой воде глобулярная структура лизоцима сохраняется даже после 130 нс моделирования, и параметры  $hSASA$  и  $R_g$  не достигают критических значений.

Для определения и подсчета числа аминокислотных остатков, участвующих в образовании элементов вторичной структуры в лизоциме, использовался алгоритм DSSP. Анализировалось общее содержание аминокислотных остатков, принадлежащих  $\alpha$ - и  $3_{10}$ -спиралям. Из рисунка 13 хорошо видно, что, как и третичная структура, вторичная структура в чистой воде разрушается гораздо медленнее, чем в смесях с ДМСО. Анализ траекторий показал, что при любом составе растворителя значительная часть вторичной структуры сохраняется после начала разрушения третичной структуры, а некоторые элементы могут сохраняться как минимум на протяжении всех 30 нс моделирования.

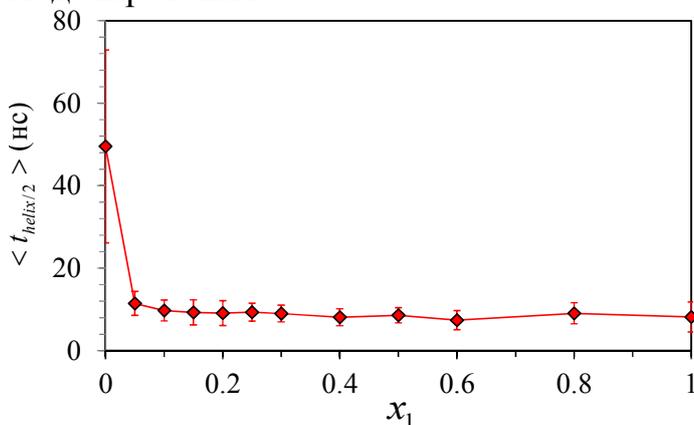


Рисунок 13. Зависимость среднего «периода полураспада» вторичной спиральной структуры лизоцима  $\langle t_{helix/2} \rangle$  от мольной доли ДМСО  $x_1$  в МД-моделировании.

Можно предположить, что при моделировании в воде нами наблюдался кинетически стабильный глобулярный интермедиат с частично разрушенной вторичной структурой, который через некоторое время должен потерять компактность. В подтверждение этому предположению можно добавить, что при помещении в ячейку с чистой водой при 600 К белок разворачивался в случайные состояния с большим радиусом инерции в течение 5 нс.

Наиболее простое объяснение более высокой термодинамической стабильности компактной глобулярной структуры в воде по сравнению со смесями с ДМСО состоит в том, что ее разрушение увеличивает площадь гидрофобной поверхности, что невыгодно в водных растворах, в то время как в смешанном растворителе ДМСО может предпочтительно сольватировать гидрофобные боковые цепи. Увеличение предпочтительной сольватации переходного состояния процесса разворачивания молекулами ДМСО по сравнению с исходным нативным состоянием может также объяснить кинетический эффект ускорения денатурации через снижение энергии Гиббса активации процесса.

Мы проанализировали состав сольватной оболочки различных структур (нативное, частично и полностью развернутые состояния, полученные при моделировании в смесях ДМСО-вода и в чистой воде) в эквимольной смеси ДМСО-вода. Анализ показал, что доля молекул воды в сольватной оболочке

уменьшается в процессе разворачивания в ряду «нативное» > «частично развернутое» > «развернутое состояние в смеси», в то время как сольватация ДМСО в этом ряду становится более предпочтительной из-за увеличения площади гидрофобной поверхности. Промежуточное компактное состояние, образующееся в воде, взаимодействует с ДМСО относительно неблагоприятным образом и легко разворачивается в смесях ДМСО-вода.

В целом полученные методом молекулярной динамики результаты хорошо согласуются с данными эксперимента. Как и в эксперименте, увеличение концентрации органического соразтворителя (ДМСО) приводит к дестабилизации нативной структуры белка и ускорению процесса разворачивания. Также согласуются выводы о более высокой стабильности вторичной структуры лизоцима по сравнению с третичной в смесях с высоким содержанием ДМСО.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Методами газовой хроматографии и калориметрии растворения экспериментально изучен процесс сольватации в водно-органических смесях различного состава. Получены неизвестные ранее значения энергий Гиббса и энтальпий сольватации ряда малополярных соединений в смесях воды с органическими растворителями в широком диапазоне концентраций. Показано, что различные органические растворители подавляют гидрофобный эффект с разной силой.
2. Методами молекулярной динамики и вставки частиц Видома получены новые данные о значениях термодинамических функций образования полостей в различных водно-органических смесях. Показано, что ослабление гидрофобного эффекта при добавлении органического растворителя связано с изменением термодинамики процесса образования полости – уменьшением энергии Гиббса и увеличением энтальпии за счет реорганизации растворителя вокруг полости.
3. На основе результатов исследования термической стабильности лизоцима в смесях воды с различными органическими растворителями впервые предложен ряд растворителей по их денатурирующей способности, мерой которой выступает величина изменения температуры денатурации белка при добавлении растворителя.
4. Показана корреляция между денатурирующей способностью органических соразтворителей и их сольватационными свойствами. Предпочтительная сольватация неполярных остатков органическим соразтворителем играет важную роль в стабилизации денатурированного состояния и снижении термической стабильности белков.
5. Комплексом экспериментальных методов изучено влияние органических соразтворителей на механизм денатурации лизоцима. При термической денатурации в присутствии органического соразтворителя третичная

структура белка разрушается раньше, чем вторичная, в то время как в воде эти процессы происходят синхронно.

6. На примере смесей ДМСО-вода показано, что даже большие концентрации органического денатуранта не приводят к значительным изменениям энергии активации разрушения третичной структуры.
7. Методом молекулярной динамики показано, что при денатурации в чистой воде достаточно долго сохраняется компактное глобулярное состояние лизоцима, а в присутствии органического растворителя (ДМСО) наблюдается быстрое разрушение третичной глобулярной структуры. Продемонстрировано, что в ходе разрушения глобулярной структуры вместе с увеличением площади гидрофобной поверхности увеличивается доля ДМСО в сольватном окружении белка.

**Основное содержание работы изложено в следующих публикациях:**

1. Sedov, I.A. Thermodynamic Functions of Solvation of Hydrocarbons, Noble Gases, and Hard Spheres in Tetrahydrofuran–Water Mixtures / I.A. Sedov, **T.I. Magsumov** // The Journal of Physical Chemistry B. – 2015. – Vol. 119. – № 28. – P. 8773-8780.
2. Sedov, I.A. Solvation of hydrocarbons in aqueous-organic mixtures / I.A. Sedov, **T.I. Magsumov**, B.N. Solomonov // The Journal of Chemical Thermodynamics. – 2016. – Vol. 96. – P. 153-160.
3. Sedov, I.A. Thermodynamic functions of solvation of benzene in various binary aqueous-organic solvents / I.A. Sedov, **T.I. Magsumov**, B.N. Solomonov // Journal of Molecular Liquids. – 2016. – Vol. 224. – P. 1205-1209.
4. Sedov, I.A. Standard molar Gibbs free energy and enthalpy of solvation of low polar solutes in formamide derivatives at 298K / I.A. Sedov, **T.I. Magsumov**, M.A. Stolov, B.N. Solomonov // Thermochemica Acta. – 2016. – Vol. 623. – P. 9-14.
5. Sedov, I.A. Molecular dynamics study of unfolding of lysozyme in water and its mixtures with dimethyl sulfoxide / I.A. Sedov, **T.I. Magsumov** // Journal of Molecular Graphics and Modelling. – 2017. – Vol. 76. – P. 466-474.
6. Magsumov, T. The Effect of Dimethyl Sulfoxide on the Lysozyme Unfolding Kinetics, Thermodynamics, and Mechanism / **T. Magsumov**, A. Fatkhutdinova, T. Mukhametzhanov, I. Sedov // Biomolecules. – 2019. – Vol. 9. – № 10. – P. 547.
7. Magsumov, T. Comparative study of the protein denaturing ability of different organic cosolvents / **T. Magsumov**, L. Ziying, I. Sedov // International Journal of Biological Macromolecules. – 2020. – Vol. 160. – P. 880-888.
8. Sedov, I. The Gibbs free energy of cavity formation in a diverse set of solvents / I. Sedov, **T. Magsumov** // The Journal of Chemical Physics. – 2020. – Vol. 153. – № 13. – P. 134501.
9. Magsumov, T. Thermodynamics of cavity formation in different solvents: Enthalpy, entropy, and the solvophobic effects / **T. Magsumov**, I. Sedov // Journal of Molecular Liquids. – 2021. – Vol. 331. – P. 115738.
10. **Магсумов, Т.И.** Термостабильность лизоцима в смесях вода-диметилсульфоксид // Материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2016» (Москва), М.: МАКС Пресс. – 2016.
11. Магсумов, Т.И. Молекулярно-динамическое моделирование денатурации лизоцима в смесях ДМСО-вода / **Т.И. Магсумов**, И.А. Седов // X Международной

конференции молодых учёных по химии «Менделеев-2017»: Сборник тезисов докладов (Санкт-Петербург). – 2017. – С. 399.

12. Magsumov, T.I. The critical solvent composition for solvation properties of different aqueous-organic solvents / **T.I. Magsumov**, I.A. Sedov // The 4th Central and Eastern European Conference on Thermal Analysis and Calorimetry (CEEC-TAC4): Book of Abstract (Chisinau, Moldova). – 2017. – P. 74.

13. Магсумов, Т.И. Кинетика денатурации лизоцима в смесях диметилсульфоксида с водой / **Т.И. Магсумов**, И.А. Седов // Кластер конференций 2018: XIII Международная научная конференция «Проблемы сольватации и комплексообразования в растворах» (Тезисы докладов) (Суздаль). – 2018. – С. 159.

14. Magsumov, T.I. Influence of dimethyl sulfoxide on the unfolding mechanism of hen egg-white lysozyme: a theoretical study / **T.I. Magsumov**, I.A. Sedov // 14th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry: proceedings. Vol. 2 (Belgrad, Serbia). – 2018. – P. 917-920.

15. Magsumov, T.I. Thermal stability of hen egg-white lysozyme in aqueous-organic mixtures / **T.I. Magsumov**, I.A. Sedov // Book of abstracts of the 5th Central and Eastern European Conference on Thermal Analysis (Rome, Italy). – 2019. – P. 170.

16. Магсумов, Т.И. Термодинамические функции образования полости в моделях растворителей / **Т.И. Магсумов**, И.А. Седов // XII Всероссийская школа - конференция молодых ученых «Теоретическая и экспериментальная химия жидкофазных систем» (Крестовские чтения – 2019) (Тезисы докладов) (Иваново). – 2019. – С. 20.

17. Магсумов, Т.И. Термодинамические функции образования полости в водно-органических смесях / **Магсумов Т.И.**, Седов И.А // Кластер конференций 2021: XIV Международная научная конференция «Проблемы сольватации и комплексообразования в растворах» (Тезисы докладов) (Иваново). – 2021. – С. 61.