

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри супрамолекулярної хімії
проф. Рябухін Сергій Вікторович
№ _____ засідання кафедри
від “ _____ ” _____ 20__ р.

**СТАБІЛЬНІСТЬ ОСНОВНИХ ПРОТЕЇНІВ ПЛАЗМИ КРОВІ У
ФІЗІОЛОГІЧНОМУ ІНТЕРВАЛІ ТЕМПЕРАТУР: ФОТОННО-
КОРЕЛЯЦІЙНА СПЕКТРОСКОПІЯ ТА МІКРО-ВІСКОЗИМЕТРІЯ**

Випускна кваліфікаційна робота магістра
студента спеціальності
102 Хімія
ОП «Кафедра супрамолекулярної хімії»
Нагацького Романа Валентиновича

Науковий керівник від кафедри
Старший науковий співробітник
Кафедри молекулярної фізики
к.ф.-м.н. **Бардик Віталій Юрійович**

Робота виконана на кафедрі молекулярної фізики
КНУ ім Т. Шевченка під керівництвом к.ф.-м.н.
Бардик В.Ю.

Оцінка захисту роботи

Київ – 2022 р.

АНОТАЦІЯ

НАГАЦКИЙ Р. В. СТАБІЛЬНІСТЬ ОСНОВНИХ ПРОТЕЇНІВ ПЛАЗМИ КРОВІ У ФІЗІОЛОГІЧНОМУ ІНТЕРВАЛІ ТЕМПЕРАТУР: ФОТОННО-КОРЕЛЯЦІЙНА СПЕКТРОСКОПІЯ ТА МІКРО-ВІСКОЗИМЕТРІЯ

Кваліфікаційна робота магістра за спеціальністю 102 – Хімія, спеціалізація «Хімія.» - Київський національний університет імені Тараса Шевченка, фізичний факультет, кафедра молекулярної фізики. - Київ 2022.

Науковий керівник: канд.фіз.-мат. наук, ст.н.с. кафедри молекулярної фізики Бардик В.Ю.

Методами фотонної кореляційної спектроскопії та мікрівіскозиметрії досліджува «інтенсивність-інтенсивність», температурні залежності коефіцієнта дифузії та гідродинамічного радіусу макромолекул. Результати мікрівіскозиметричних експериментів узгоджуються з даними для гідродинамічного радіусу отриманого методами ФКС.

На основі проведених експериментів було встановлено, що розміри макролекул зберігають , що розміри макромолекул зберігають зміна гідродинамічного радіусу в досліджуваному інтервалі температур є двох стадійний процес з точкою локального мінімуму $T = 420\text{C}$, що пов'язано з динамічними властивостями води.

Ключові слова: фотонна кореляційна спектроскопія, мікро-віскозиметрія, гідродинамічний радіус, альбумін, фібріноген, D-димер.

SUMMARY

Rozhylo K.V. Research of the temperature influence on stability of fibrinogen macromolecules in aqueous solution.

Qualification bachelor work on specialty 102-chemistry, specialization „Chemistry”. - Taras Shevchenko National University of Kyiv, Department of Molecular Physics. - Kyiv, 2022.

Research supervisor: c.s.w.of the dep. of molecular physics, PhD of Physics and mathematics Bardik V.Y.

The macromolecule size and stability of major blood plasma proteins have been studied on the basis of photon correlation spectroscopy and micro-viscometry techniques. Time dependences of the second order correlation functions ("intensity-intensity"), diffusion coefficients and hydrodynamic radii were defined in the temperature interval 35 ÷ 500C. The processing of the experimental data produced the temperature dependence of the macromolecular hydrodynamic radius. The results of micro-viscometry experiments are fully consistent with the photon correlation spectroscopy data.

Key words: dynamic light scattering, hydrodynamic radius.

ЗМІСТ

| | |
|---|----|
| Вступ | 5 |
| Розділ 1..... | 6 |
| Огляд літератури..... | 6 |
| 1.1. Структура та основні характеристики альбуміну..... | 7 |
| 1.2 структура та динаміка макромолекули фібриногену..... | 9 |
| 1.3. Основні характеристики d-димеру..... | 12 |
| Розділ 2 експериментальні методи досліджень | 14 |
| 2.1 фотонна кореляційна спектроскопія | 14 |
| 2.2. Віскозиметрія | 16 |
| Розділ 3 експериментальні дані. Аналіз отриманих результатів..... | 19 |
| 3.1. Температурний вплив на розміри макромолекули d-димеру..... | 19 |
| 3.2. Гідродинамічний радіус..... | 22 |
| 3.3. Стабільність макромолекули фібриногену в стадії преденатурації.... | 23 |
| 3.4. Стабільність макромолекули альбуміну | 28 |
| 3.5. Дослідження стабільності альбуміну на основі мікро віскозиметрії... 32 | |
| Висновки | 37 |
| Список використаних джерел..... | 38 |

ВСТУП

У зв'язку з важливими біологічними функціями полімерних молекул, дослідження явища гідратації та впливу водного оточення на розміри та структуру молекул представляють собою особливу цікавість. Конформація білків та їх динаміка (також стабільність макромолекул як один з аспектів динамічних властивостей) визначають їх біологічне функціонування. Інтенсивні дослідження молекулярних механізмів конформаційних змін проведені за останні роки не дають відповіді на основне питання: на якому етапі процесу преденатурації білків ключову роль грають динамічні властивості водного оточення, а на якому внутрішні властивості самої макромолекули? В роботі [1] було показано, що більшість конформаційних змін спричиняється змінами в гідратній сфері та об'ємі розчинника, в той час, як молекула білка сама забезпечує так звану «активну матрицю», необхідну для орієнтування динаміки води на відповідні біологічні конформаційні зміни. В роботі [2] було продемонстровано як зміна динамічних властивостей води в околі 20 Å поблизу молекули білка впливає на конформаційні властивості. Велика кількість експериментальних та теоретичних робіт підтверджують факт зв'язку між динамічними властивостями води та унікальними конформаційними рухами білка [1-4].

Мета роботи: дослідити методами фотонної кореляційної спектроскопії та мікро-віскозиметрії стабільність та дифузійні властивості основних білків плазми крові: фібріногену, альбуміну та фрагменту макромолекули фібрину – D-димеру, у фізіологічному інтервалі температур 25-42⁰С.

Об'єкт дослідження: температурний вплив на розміри макромолекул у водному розчині.

Предмет дослідження: температурні залежності гідродинамічного радіусу, коефіцієнту динамічної в'язкості та дифузії.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Плазма крові

На Рис.1.9. схематично показані три основних водних простори організму: внутрішньо-судинно, міжклітинне і внутрішньоклітинне. Міжклітинна рідина служить зовнішнім середовищем для більшості клітин організму. Обмін речовинами між плазмою крові й міжклітинною рідиною відбувається через велику поверхню стінок капілярів, високопроникних для води й іонів. Обмін водою й невеликими молекулами між плазмою й міжклітинною рідиною відбувається дуже швидко, тому склад останньої, незважаючи на суттєві зміни в поглинанні й виділенні різних речовин клітинами, коливається незначно.

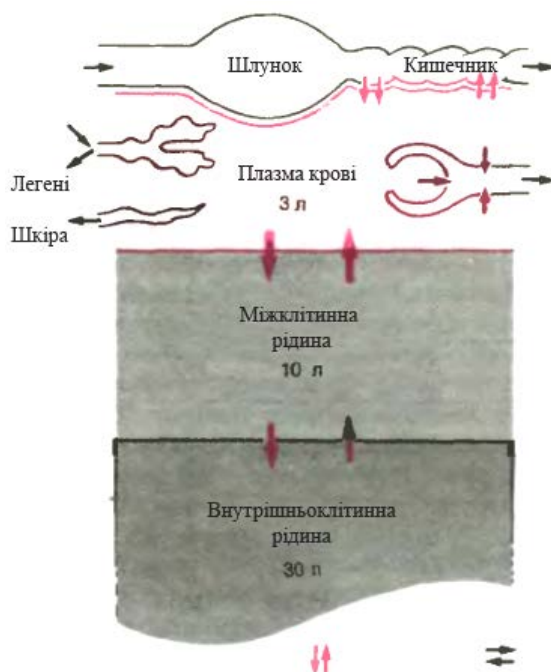
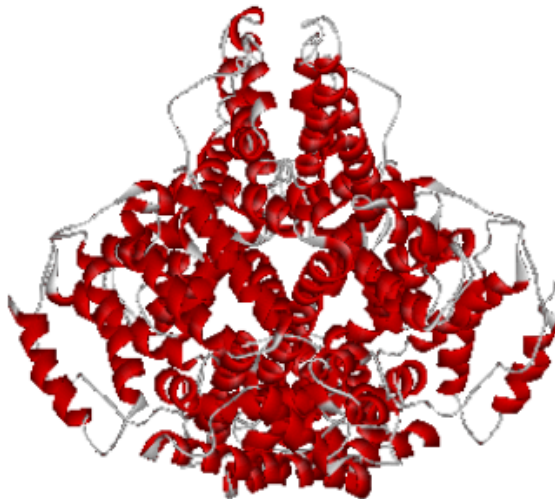


Рис.1.1. Схема рідинних просторів організму
Представлені округлені значення для людини
масою 70 кг

Так, у досвідах з важкою водою D_2O (мічений дейтерієм) було показано, що більше 70% всієї рідини плазми обмінюється з міжклітинним простором за 1 хв. Склад плазми й міжклітинної рідини істотно розрізняється лише по концентрації білків, тому що їхні великі молекули не можуть вільно проходити через стінки капілярів. Взагалі білки є важливою складовою плазми крові, їх вміст складає 7–8% від її маси (65–85 г/л).

1.1. Структура та основні характеристики альбуміну

Альбумін складає 4–5% плазми крові (35–40 г/л). Він забезпечує 80% онкотичного тиску, що пов'язано з його відносно малою молекулярною масою (65–70 кдальтон) і великою кількістю молекул в плазмі крові. Цей ефект досягається високою здатністю молекул альбуміну зв'язувати воду – 18 мл/г, що відповідає 26–28 мм рт. ст.



Мал.1.1.1 Вигляд глобулярного альбуміну

Полімерний ланцюг альбуміну складається, в основному з аланіна, аспаргинової кислоти, гліцину, і цистеїна, що чергуються в певному порядку. Третинна структура альбуміну містить α -спіралі (Рис.1.8.), з'єднані одиночними ланцюгами.

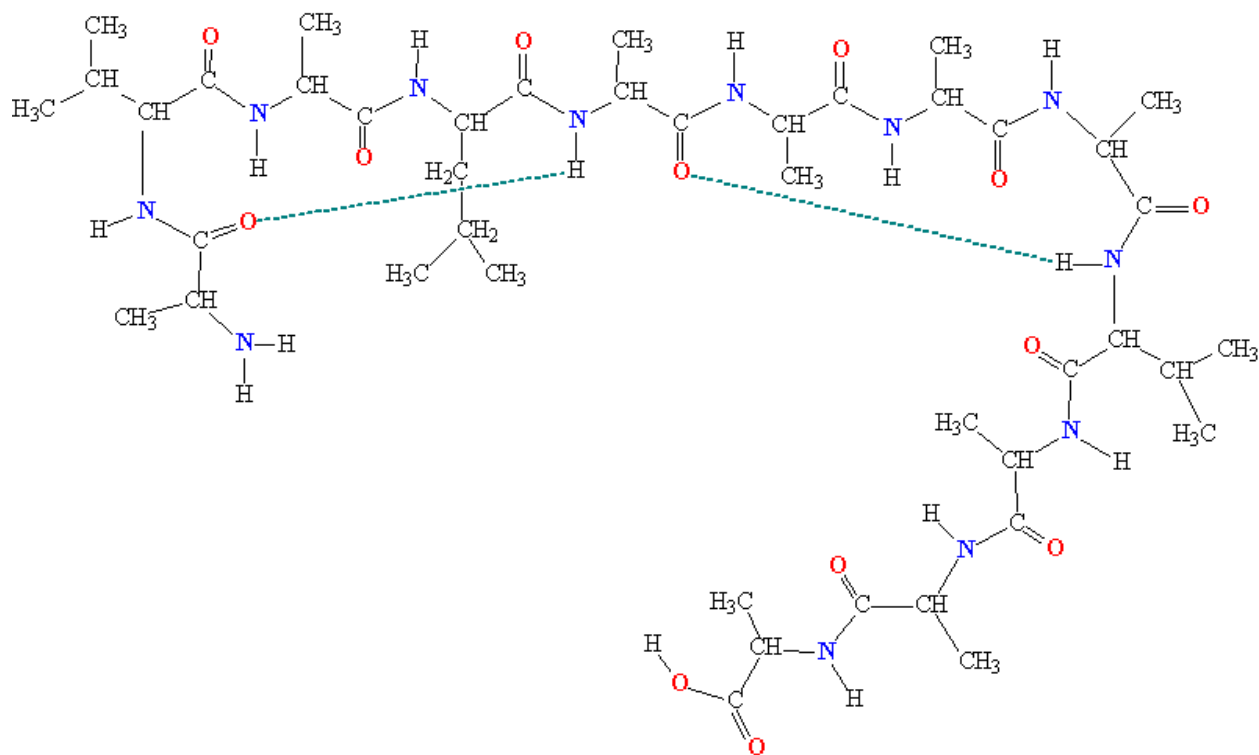


Рис.1.1.2. α -спіралі реалізується за допомогою водневих зв'язків усередині однієї полімерної молекули.

Структура HSA була визначена методом рентгенівської кристалографії з високою роздільною здатністю [5]. На його структуру та динаміку можуть впливати декілька факторів, таких як рН, температура тощо [6]. HSA відіграє особливу роль у транспортуванні метаболітів і молекул ліків по всій судинній системі, а також у підтримці осмотичного тиску плазмових кислот, метаболітів і зв'язування різних лігандів [7–10]. HSA – це одноланцюговий білок з 585 амінокислотними залишками з переважною α -спіральною структурою у формі серця [8,10].

1.2 Структура та динаміка макромолекули фібриногену

Одним з найважливіших білків плазми крові є фібриноген. Ще у 1686 році M.Malpighi описав структурну основу кров'яного згустку як білу фібрилярну речовину, яку можна побачити після миття червоного кров'яного згустку водою. У 1797 році Chaptal запропонував для цієї речовини термін «фібрин». На основі останніх досліджень почалось планомірне вивчення фізико-хімічних процесів і молекулярних перетворень, які лежать в основі трансформації фібриногена у тривимірну сітку фібрину.

Фібриноген – це сироватковий багатоланцюговий білок, який при активації агрегується з утворенням фібрину, одного з основних компонентів тканини крові. Фібриноліз контролює розчинення згустку крові під дією ферменту плазміну, який розщеплює фібрин у певних місцях. Хоча основні біохімічні фактори, що беруть участь у утворенні та лізисі фібрину, були визначені, чіткої механістичної картини того, як ці процеси відбуваються, поки немає. Ця картина була б важливою, наприклад, для розробки вдосконалених тромболітичних або антигеморагічних стратегій, а також матеріалів з покращеною біосумісністю. Тут ми представляємо обширне молекулярно-динамічне моделювання фібриногену, яке виявляє великі згинальні рухи з центром у шарнірних ділянках молекули. Ця особливість, ймовірно, збережена у хребетних, згідно з нашим аналізом, пропонує пояснення механізму впливу лізису ділянок розщеплення плазміну в області фібриногену. Це також пояснює конформаційну мінливість фібриногену, що спостерігається під час його адсорбції на неорганічних поверхнях, і передбачається, що він відіграє важливу роль у визначенні гідродинамічних властивостей фібриногену. Крім того, моделювання припускає, як динаміка D-області фібриногену може сприяти алостеричної регуляції каскаду згортання крові через динамічне з'єднання між

a- та b-отворами, важливими для полімеризації фібрину, та сайтом зв'язування інтегрину P1.

Фібриноген (Fg) — це багатоланцюговий глікопротеїн масою 340 кД, який може полімеризуватися у фібрин, один з основних компонентів тромбів. Утворення і лізис фібрину (фібриноліз) є жорстко контрольованими процесами вздовж шляху, що веде до коагуляції [11]. Після активації Fg тромбіном, який розщеплює фібринопептиди А і В (FpA, FpB), відкриваються специфічні А- і В-ручки, які зв'язуються з відповідними a- і b-отворами сусідніх молекул Fg і ініціюють процес полімеризації фібрину. Пізніше фібрин стабілізується за допомогою додаткових нековалентних і ковалентних взаємодій. Взаємодіючи з іншими компонентами крові через сайти зв'язування інтегрину, фібрин відіграє важливу роль у регуляції згортання та імунної відповіді. На фібриноліз, з іншого боку, впливає плазмін, який розщеплює фібрин на певних точках розщеплення у чітко визначеній часовій послідовності [12–14].

Подовжена структура Fg людини, як показують кристалографічні дані [15], утворена двома симетричними одиницями, які димеризуються через центральну кулясту область E. Кожна симетрична одиниця (протомер) складається з 3 пептидних ланцюгів $A\alpha$, $B\beta$ і γ , які відходять від своєї N-кінцевої області (область E), утворюють витягнуту ділянку спіралі і закінчуються двома глобулярними доменами, утворюючи область D (рис. 1). C-кінцевий сегмент ланцюга $A\alpha$, тобто область αC , а також N-кінцеві частини ланцюга $A\alpha$ і $B\beta$, включаючи FpA і FpB, здебільшого неупорядковані (таким чином, не розділені в кристалі).

Fg, у полімеризованій формі фібрину, являє собою структуру, яка піддається механічному натягу. З цієї причини рання моделювальна робота на Fg була зосереджена на його механічних властивостях під впливом зовнішнього напруження [16–19]. Тут замість цього ми повідомляємо про результати розширеного моделювання молекулярної динаміки (MD), виконаного на Fg в

розчині. Моделювання дозволяє ідентифікувати великі згинальні рухи з центром у точці шарніра на ділянці згорнутої спіралі Fg. Ми також представляємо обширний аналіз послідовності Fg серед організмів хребетних, який свідчить про те, що згинальні рухи, пов'язані з шарніром, відіграють одну або кілька функціональних ролей. Моделювання показує, що одна з цих ролей може полягати в оголенні ділянок розщеплення плазміну на ділянці згорнутої спіралі. На основі результатів моделювання ми будуємо спрощене уявлення внутрішньої гнучкості Fg і використовуємо його для відповідності та пояснення експериментальних даних щодо конформаційного розподілу молекули, адсорбованої на слюді. Результати відповідності вказують на асиметрію адсорбційних властивостей різних сторін Fg, що можна пояснити наявністю великих заряджених плям, які нерівномірно розподілені на поверхні глобулярних доменів молекули. Крім того, дані моделювання дозволяють нам охарактеризувати динамічні властивості D-області Fg, що бере участь у формуванні фібрину та імунній відповіді, підкреслюючи наявність пов'язаних рухів між a- та b-отворами та сайтом зв'язування інтегрину P1.

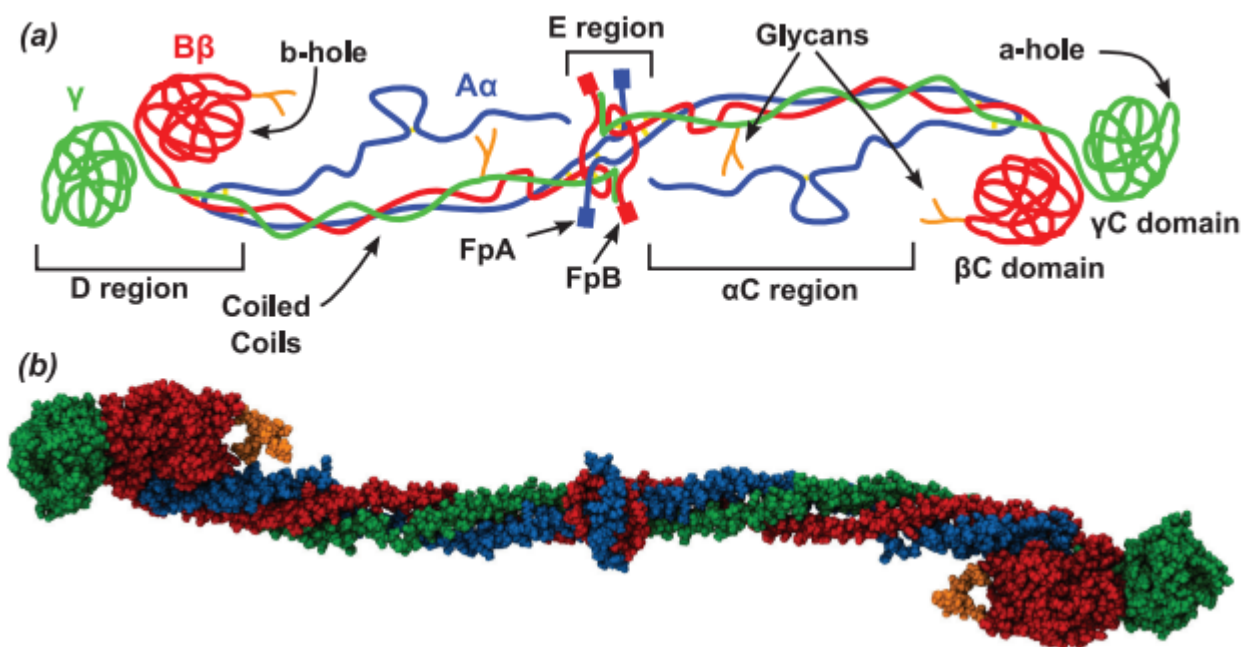


Рис 1.2.1. Молекула фібриногену. (а) Схематичне зображення молекули фібриногену. Три ланцюга F γ , A α , B β і γ показані синім, червоним і зеленим відповідно. (b) Відображення Ван-дер-Ваальса кристалографічної структури (pdb 3GHG) F γ із кольоровим кодуванням, як у (а). Вуглеводи в апельсині. Область α C і пептиди F γ A і F γ B не були розділені в кристалічній структурі.

1.3. Основні характеристики D-димеру

Для комплексного дослідження та розуміння впливу водного оточення на молекулярні механізми конфірмаційних змін у таких важливих білків як фібриноген та фібрин необхідно проаналізувати не тільки поведінку самої макромолекули, а й її фрагментів, одним з яких є D-димер.

D-димер – це продукт розпаду фібрину, невеликий фрагмент білка, наявний в крові після руйнації тромбу (процес фібринолізу). Він називається «димер», оскільки містить два з'єднаних D фрагмента білка фібриногену [21-23]. Для діагностики тромбоза можна визначити концентрацію D-димерів в крові, тобто зробити тест на D-димери. З появою у 90-ті роки тест на D-димери став важливим дослідом для пацієнтів з підозрою на тромботичні порушення.

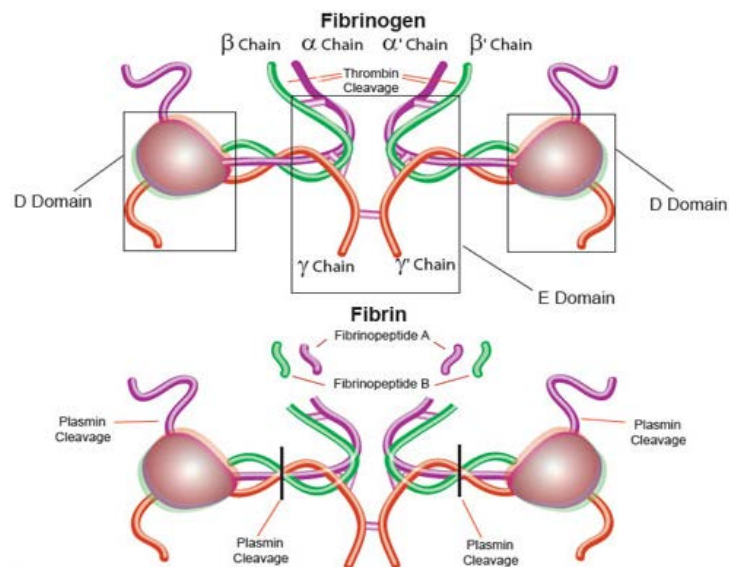


Рис. 1.3.1

В той час як негативний результат практично виключає тромбоз, позитивний результат може бути спричиненим як тромбозом, так і іншими чинниками. Його головна користь, таким чином, полягає у виключенні тромбоемболії. Крім того, він використовується в діагностиці такого порушення, як синдром внутрішньо судинного згортання.

Історично так склалося, що центральний регіон молекули фібриногена називають E-доменом, а периферичні – D-доменами, хоч пізніше було показано, що кожен з цих доменів складається з двох структурованих «субдоменів». Останні є C-кінцевими ділянками B β - та γ -ланцюгів та утворюють компактні структури, що були названі β C- та γ C-доменами. β C-домени знаходяться з різних сторін сигмоїдальної вісі молекули. PCA D-фрагмента фібриногена та D-димера фібрина людини з роздільною здатністю 2.9 Å дозволив встановити просторову структуру β C- та γ C-доменів.

РОЗДІЛ 2

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Фотонна кореляційна спектроскопія

В процесі дослідження, для визначення значень гідродинамічного радіусу макромолекул у фізіологічному інтервалі температур застосовувався метод фотонної кореляційної спектроскопії (ФКС) [24]. Даний метод має широке застосування при дослідженнях водних розчинів протеїнів, ДНК [25], поліетеленгліколю [26], трегалози [27–29], спиртів та напіврозведених розчини полімерів [30–32], кластероутворенню у водних розчинах сахаридів, склоутворюючих водних розчинів глюкози. Порівняльні дослідження ФКС та даних некогерентного квазіеластичного розсіяння нейтронів на водневих системах, таких як полімерні водні розчини, спирти та гомологічні дисахариди представлені в роботах. На основі ФКС було показано, що вода представляє хороший розчинник і забезпечує зміну гідратаційного числа із зміною температури.

Методика ФКС заснована на вимірах інтенсивності світла, що пройшло через середовище рухомих (броунівських) частинок. Довжина хвилі розсіяного світла має той самий порядок, що і розміри вимірюваних частинок. При проходженні пучка світла через розчин виникає його пружне (релеївське) розсіяння. У методиці ФКС використовують лазерне когерентне та монохроматичне опромінення. В процесі вимірювання ми отримуємо кореляційну функцію другого порядку або так звану нормалізовану автокореляційну функцію «інтенсивність інтенсивності», що визначається як

$$G^2(\tau) = \langle I(0)I(\tau) \rangle / \langle I \rangle^2, \quad (1)$$

де, $I(0)$ та $I(\tau)$ – інтенсивності розсіяного світла у початковий момент часу та через час детектування τ , відповідно. Повна інформація, що стосується дифузійних рухів частинок відображена в кореляційній кривій. Функція $G^2(\tau)$ нормалізована таким чином, що $G^2(\tau \rightarrow \infty) \rightarrow 1$, для монохроматичного лазерного випромінювання ця умова накладає значення верхньої границі – 2, для $G^2(0)$, та нижню, як 1, для $G^2(\infty)$. Верхня границя корелєлограми приблизно дорівнює 1,8–1,9. Електричне поле світлової хвилі, розсіяне в розчині, що містить дифузійні монодисперсні сферичні частинки, характеризується гаусовою статистикою та кореляційною функцією першого порядку у вигляді

$$G^1(\tau) = A \exp\{-q^2 D \tau\}, \quad (2)$$

де, $q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$, A – стала величина що залежить від просторової когерентності, та D – коефіцієнт дифузії, λ – довжина хвилі лазерного випромінювання та θ – кут розсіювання.

Для гасової статистики загальна теорія дає співвідношення для кореляційних функцій першого та другого порядків у вигляді

$$G^2(\tau) = 1 + A \exp\{-q^2 D \tau\}. \quad (3)$$

На основі співвідношення (3) та рівняння Стокса-Ейнштейна розраховується гідродинамічний радіус частинки за формулою

$$R_H = \frac{kT}{6\pi\eta D}, \quad (4)$$

де k – константа Больцмана, T – температура, та η – в'язкість розтворювача. В результаті розсіяння ми маємо сигнал з гаусовою статистикою та лоренцевою формою спектральної лінії.



Рис.2.1.1. Пристрій Zetasizer Nano S90 (Malvern).

Для отримання температурної залежності гідродинамічного радіусу використовувалась установка Zetasizer Nano S90 (Malvern) (Рис.3). Zetasizer Nano S90 включає в себе дві технології в одному компактному пристрої, а також має ряд опцій та аксесуарів для оптимізації і спрощення вимірювання різних типів зразків.

2.2. Віскозиметрія

Метод мікро-віскозиметрії використовувався для того, щоб порівняти експериментально визначені значення гідродинамічного радіусу досліджуваних протеїнів зі значеннями визначеними на основі обрахування коефіцієнту дифузії.

В'язкість водних розчинів протеїнів визначалась віскозиметром (Anton Paar Lovis 2000 ME). Дана методика заснована на принципі Гепплера - падаючої кульки, що вимірює час падіння кульки у в'язкій рідині (Рис.4) [33-35].

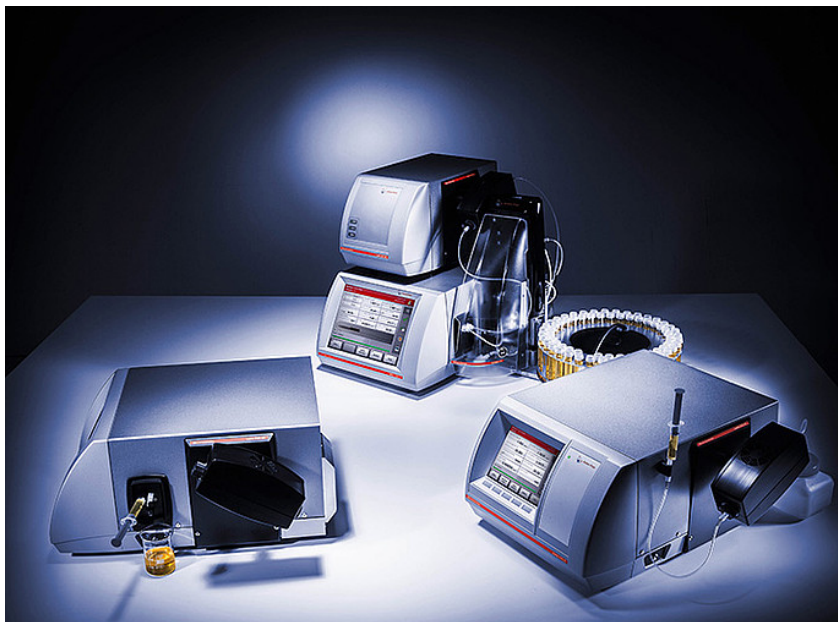


Рис.4. Прилад Anton Paar Lovis 2000 ME.

Точність варіювання вимірів - 0.5%, виміри проводились триразово, результати надаються у вигляді динамічної та кінематичної в'язкості.

Для аналізу залежності коефіцієнту дифузії від температури та концентрації використовувалось рівняння Стокса-Ейнштейна (4).

На основі вимірів динамічної в'язкості, знаходились значення характеристичної в'язкості, що визначається при низькій концентрації макромолекул у розчині наступним чином

$$\lim_{c \rightarrow 0} \frac{\ln \eta_{\text{відн}}}{c} = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{\text{пит}}}{c} = [\eta], \quad (5)$$

де, $\eta_{\text{відн}}$ та $\eta_{\text{пит}}$ - відносна та питома в'язкості відповідно, c – концентрація. Для обчислення значень характеристичної в'язкості проводиться графічна екстраполяція, основана на тому, що відносна в'язкість розчину $\frac{\eta}{\eta_0}$, (η -

в'язкість розчину, η_0 - в'язкість розчинника), може бути функцією $[\eta] \cdot c$, де c – концентрація, а $[\eta] \cdot c$ - безрозмірна величина. Тоді, вираз для відносної в'язкості можна представити у вигляді полінома

$$\frac{\eta}{\eta_0} = 1 + [\eta] \cdot c + k' \cdot [\eta^2] \cdot c^2 + \dots \quad (6)$$

та вводячи питому в'язкість $\eta_{\text{пит}} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0}$ то для рівняння:

$$\frac{\eta_{\text{пит}}}{c} = [\eta] + k \cdot [\eta^2] \cdot c, \quad (7)$$

$$\frac{\ln \eta_{\text{відн}}}{c} = [\eta] - \beta \cdot [\eta^2] \cdot c \quad (8)$$

Для обчислення $[\eta]$ немає необхідності обчислювати константи k і β для рівнянь (7) та (8), на основі експериментальних даних за виміром зсувної в'язкості побудувати графіки залежностей величин $\frac{\ln \eta_{\text{відн}}}{c}$ і $\frac{\eta_{\text{пит}}}{c}$ від концентрацій розчину. Точка перетину залежностей дасть значення характеристичної в'язкості розчину.

Ланцюгові макромолекули в першому наближенні можуть розглядатися як жорсткі статистичні клубки та за умови непроникності клубка для розчинника, з використанням формули Флорі

$$[\eta] = \Phi \frac{(h^2)^{\frac{3}{2}}}{M} \quad (9)$$

та формули

$$R_s = \left(\frac{3M[\eta]}{4\pi\nu N_A} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (10)$$

можна досліджувати температурний вплив на розміри та форму макромолекули, де M – молекулярна маса, а константа Φ не залежить від температури, величини макромолекули та природи розчинника. Таким чином, формула Флорі встановлює зв'язок між середніми розмірами клубка $(h^2)^{1/2}$ та величиною характеристичної в'язкості. Крім того, формула (10) дає зв'язок такого

геометричного параметра клубка, як радіус еквівалентної сфери R_s з характеристичною в'язкістю.

РОЗДІЛ 3

ЕКСПЕРЕМЕНТАЛЬНІ ДАНІ. АНАЛІЗ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

3.1. Температурний вплив на розміри макромолекули D-димеру

Водний розчин з фрагментом макромолекули фібрину (D-димером) при концентрації 1 мг/мл досліджувався в температурному інтервалі 30-55 °С. В результаті експерименту були отримані кореляційні функції першого та другого порядків для кожної температурної точки з інтервалом 1°С. На Рис. 3.1 представлена часова залежність автокореляційної функції другого порядку (інтенсивність-інтенсивність) $G^{(2)}(\tau)$ при температурі 35°С .

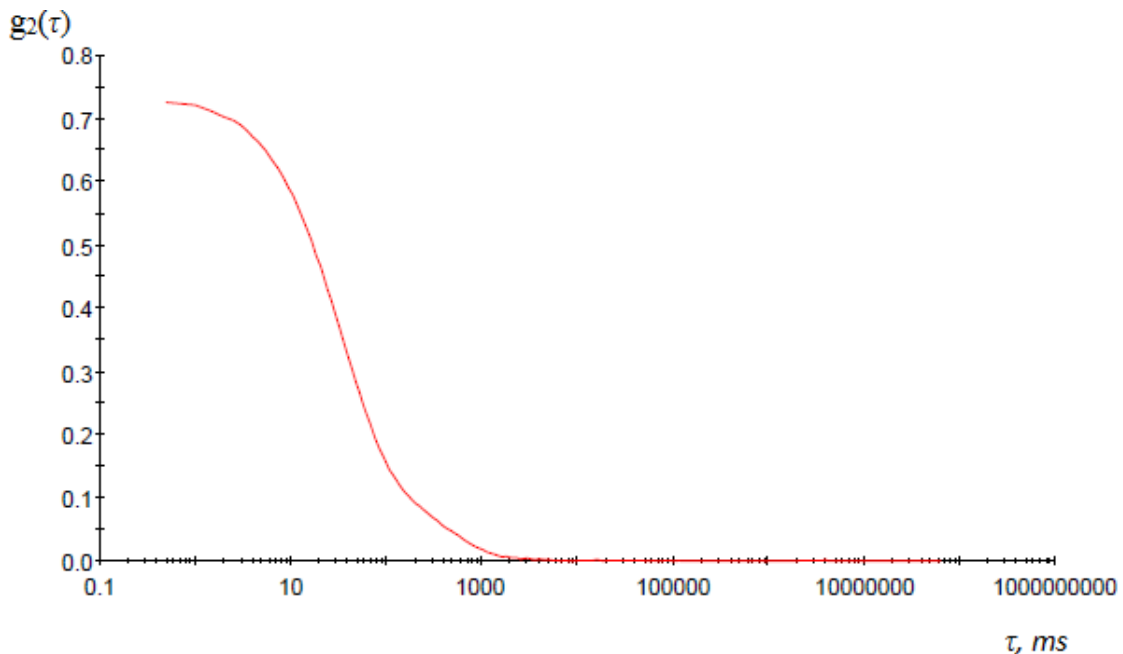


Рис. 3.1 Часова залежність $g_2(\tau)$ (кореляційна функція інтенсивність-інтенсивність) при температурі 35°С. Концентрація D-димеру 1 мг/мл

Аналіз та обробка експериментальних фотонної кореляційної спектроскопії проводилась на основі кумулянтного аналізу [11] з використанням формули (8) для кореляційної функції першого порядку $g_1(\tau)$ визначеної формулою (4). Інтервал часів в якому автокореляційна функція $g_1(\tau)$ апроксимується експоненціальною залежністю складає приблизно 10-100 мс (Рис. 3.1). Таким чином, для отримання значення коефіцієнту дифузії та гідродинамічного радіусу можна використовувати співвідношення Зігерта (12), що дає зв'язок функції $g_2(\tau)$ та $g_1(\tau)$.

На основі аналізу короллелогограм отримано розподіл інтенсивностей за розмірами частинок та розподіл розмірів частинок в об'ємі. Аналізуючи графіки розподілів інтенсивності за розмірами частинок можна побачити два піки, що відповідають даним у таблиці 3.1 при певних температурах. Аналіз температурного представлення кореляційних функцій дав температурну залежність гідродинамічного радіусу, обчисленого за формулами (2) та (3).

Таблиця 3.1

Розподіл інтенсивностей за розміром частинок при температурі 35 °С

| | r, nm | I, % |
|---------------|--------------|-------------|
| Peak 1 | 5,794 | 67,4 |
| Peak 2 | 12,63 | 32,6 |

Таблиця 3.1

Розподіл розмірів частинок за об'ємом при температурі 35 °С

| | r, nm | V, % |
|---------------|--------------|-------------|
| Peak 1 | 5,51 | 99,6 |
| Peak 2 | 20,91 | 0,4 |

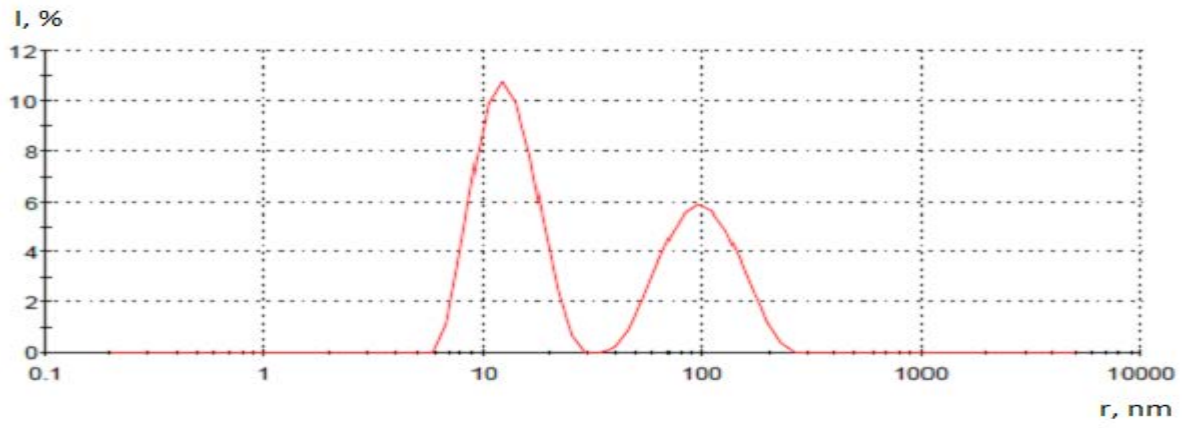


Рис. 3.2 Розподіл інтенсивності за розміром частинок у розчині

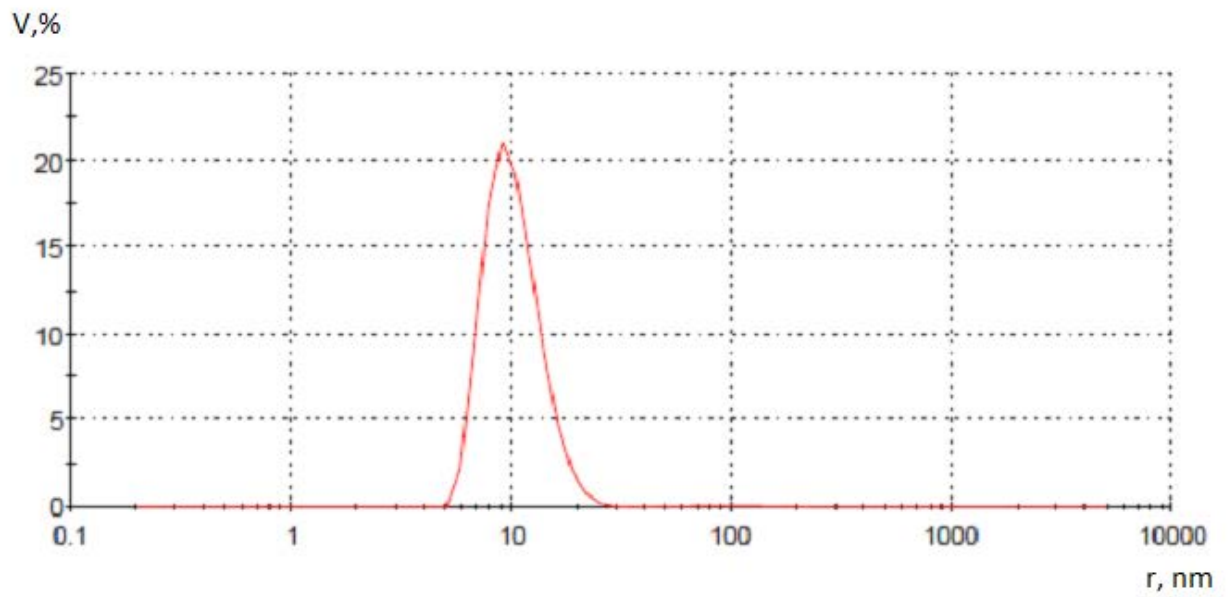
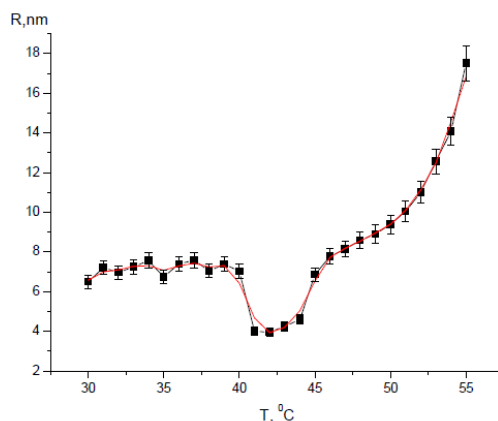


Рис. 3.3 Розподіл розмірів частинок за об'ємом при температурі 35 °С

3.2. Гідродинамічний радіус

На основі даних, отриманих в ході експерименту по динамічному світлорозсіюванню білкового водного розчину проаналізовано температурні залежності вказаних величин. В околі точки $T=42^{\circ}\text{C}$ спостерігається локальний мінімум величини



Температурна залежність гідродинамічного радіусу D-димеру

Таким чином, проведене в даній роботі дослідження водного розчину фрагмента фібрину D-димера показує існування певного зв'язку динамічних властивостей води з конфірмаційними властивостями D-димера в околі температурної точки 42°C , що інтерпретувалась [36] як температура динамічного переходу оскільки при ній відбувався розпад просторово впорядкованої сітки водневих зв'язків на ансамблі слабо взаємодіючих кластерів, з іншого боку є температурною границею існування багатьох теплокровних організмів, при якій внутріклітинна вода, що оточує білкову макромолекулу розпадається на, як вже казалося вище, ансамблі слабо взаємодіючих димерів, тримерів, тетраметрів. У зв'язку з цим динамічний перехід у воді розглядається як необхідна умова для денатурації протеїнів, але остаточні молекулярні механізми ще не з'ясовані та потребують подальшого комплексного дослідження, що повинно комбінувати як оптично-спектроскопічні, так і високоточне комп'ютерне моделювання конформаційної динаміки білка.

Таким чином, одержані:

- часові залежності кореляційних функцій першого та другого порядків
- розподіл об'єму та інтенсивностей за розмірами частинок

Обчислена температурна залежність гідродинамічного радіуса в температурному інтервалі 30 – 55⁰С.

На основі отриманих результатів, можна сказати:

- Зміна розмірів D-димерів має плавну залежність від температури
- При наближенні до точки 42⁰С спостерігається різке зменшення гідродинамічного радіусу макромолекули
- Після температурної точки 42⁰С спостерігається різке зростання розмірів D-димеру, що пояснюється незворотніми змінами в конфірмаційній динаміці

3.3. Стабільність макромолекули фібриногену в стадії преденатурації

Водний розчин фібриногена при концентраціях 1мг/мл та 2 мг/мл був досліджений в температурному інтервалі 30⁰С–50⁰С. В результаті обробки даних експерименту були отримані кореляційні функції першого та другого порядку (інтенсивність-інтенсивність) для кожної температурної точки. Для наочності на Рис.3.1. представлена корелелогограма при температурі 40⁰С.

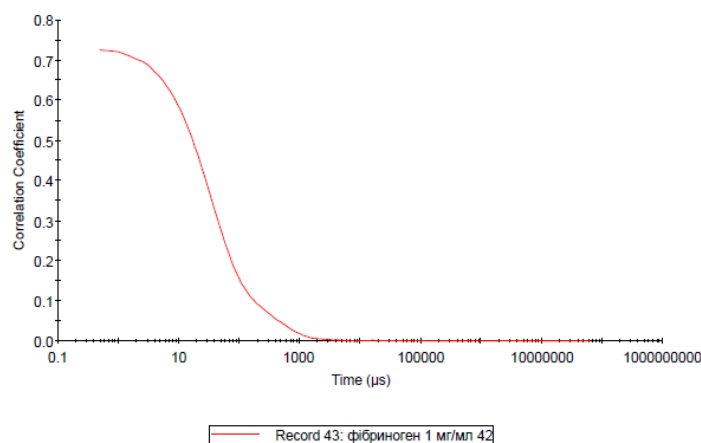


Рис.3.1. Часова залежність автокореляційної функції другого порядку (інтенсивність-інтенсивність) $G^{(2)}(\tau)$ при температурі 40⁰С.

Обробка даних на основі кумулянтного аналізу (27) дає можливість наблизити $\ln(G^1(\tau))$ поліноміальною залежністю

$$\ln(G^1(\tau)) = a + b\tau + c\tau^2 + d\tau^3 + \dots, \quad (8)$$

де значення параметра b визначається як кумулянт другого порядку або середній коефіцієнт дифузії, що перераховується у розмір (гідродинамічний радіус) з використанням формули (6). На Рис.3.2. представлений графік $G^1(\tau)$ в інтервалі часів від 10 до 100 мкс.

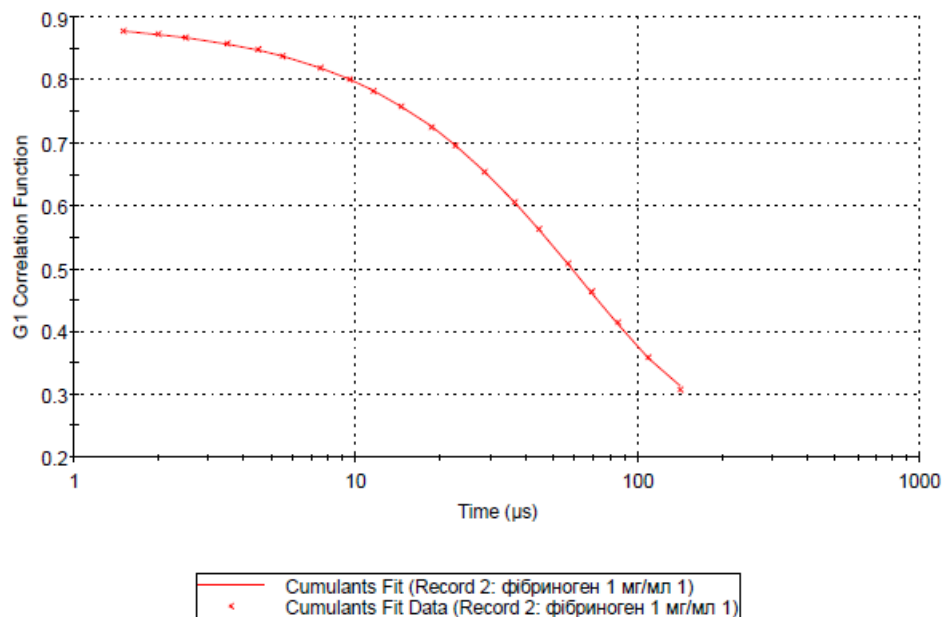


Рис.3.2. Часова залежність автокореляційної функції першого порядку $G^1(\tau)$ при температурі 40°C .

В даному інтервалі часів $G^1(\tau)$ добре апроксимується експоненціальною залежністю у вигляді формули (5) :

Кумулянтний аналіз короллелограм дав можливість отримати розподіл інтенсивностей за розмірами частинок та розподіл розмірів частинок за об'ємом. Аналізуючи графіки розподілів інтенсивності за розмірами частинок

можна побачити три піки (Рис.3.3). Для наочності дані розподілу інтенсивності за розмірами при $T=35^{\circ}\text{C}$ представлені в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1.

| | Size (d,nm) | Intensity (%) |
|--------|-------------|---------------|
| Peak 1 | 25,91 | 71,4 |
| Peak 2 | 270,3 | 26,5 |
| Peak 3 | 5377 | 2,0 |

Співставляючи графіки розподілу інтенсивності за розмірами частинок (Рис. 3.3.) і графіків розподілу розмірів за об'ємами (Рис. 3.4.) бачимо, що основна доля припадає на частинки з розмірами 13,5 нм, що відповідає розмірам молекули фібриногену при температурі 35°C (фізіологічно активний інтервал температур).

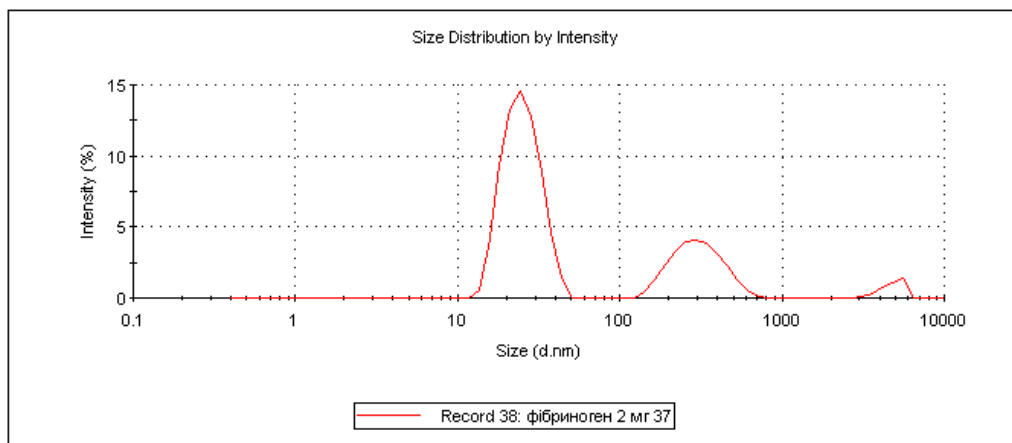


Рис.3.3. Розподіл інтенсивності за розмірами частинок при температурі 35°C .

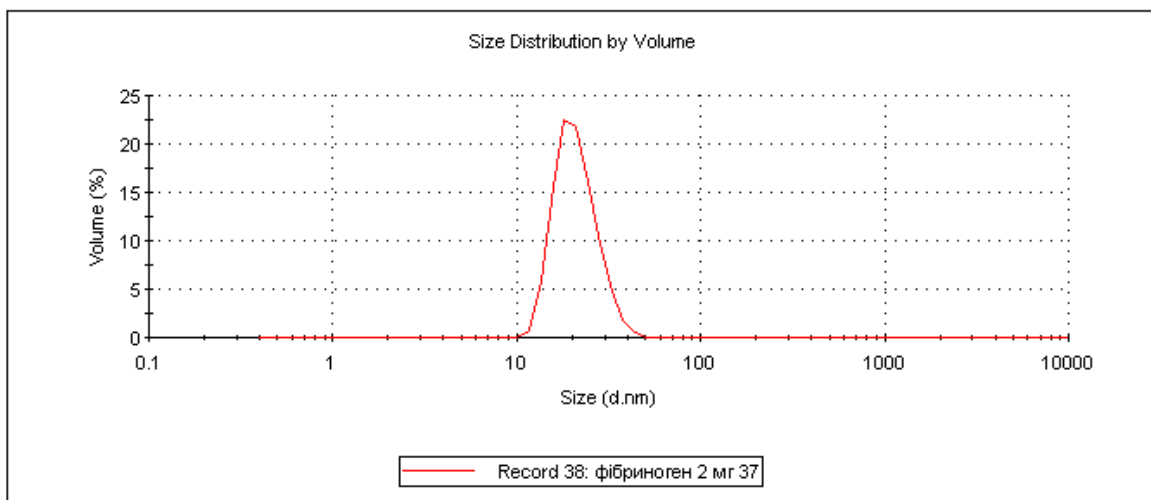


Рис. 3.4. Розподіл розмірів частинок за об'ємами

Подальший аналіз температурного представлення кореляційних функцій на основі якого було одержано температурну залежність гідродинамічного радіусу був проведений для частинок з початковими розмірами 13,5 нм.

В таблицках () представлені розрахунки середньоквадратичного відхилення для гідродинамічного радіусу макромолекули фібриногену

| Виміри | R_i | $\bar{R} - R_i$ | $(\bar{R} - R_i)^2$ |
|----------|-------------------------------------|-----------------|-----------------------|
| 1 | 13,98 | -0,482 | 0,232324 |
| 2 | 12,91 | 0,588 | 0,345744 |
| 3 | 13,59 | -0,092 | 0,008464 |
| 4 | 13,39 | 0,108 | 0,011664 |
| 5 | 13,62 | -0,122 | 0,014884 |
| Σ | $\frac{1}{n} \sum_i^n R_i = 13,498$ | | $\sigma \approx 0,16$ |

| Виміри | R_i | $\bar{R} - R_i$ | $(\bar{R} - R_i)^2$ |
|----------|-------------------------------------|-----------------|-----------------------|
| 1 | 12,87 | 0,106 | 0,011236 |
| 2 | 12,82 | 0,156 | 0,024336 |
| 3 | 13,05 | -0,074 | 0,005476 |
| 4 | 12,64 | 0,336 | 0,112896 |
| 5 | 13,5 | -0,524 | 0,274576 |
| Σ | $\frac{1}{n} \sum_i^n R_i = 12,976$ | | $\sigma \approx 0,13$ |

| Виміри | R_i | $\bar{R} - R_i$ | $(\bar{R} - R_i)^2$ |
|----------|-------------------------------------|-----------------|-----------------------|
| 1 | 12,38 | 0,592 | 0,350464 |
| 2 | 12,82 | 0,152 | 0,023104 |
| 3 | 13,21 | -0,238 | 0,056644 |
| 4 | 13,04 | -0,068 | 0,004624 |
| 5 | 13,41 | -0,438 | 0,191844 |
| Σ | $\frac{1}{n} \sum_i^n R_i = 12,972$ | | $\sigma \approx 0,15$ |

На Рис. 3.5 (а,б) представлені температурні залежності гідродинамічного радіусу фібриногену в температурному інтервалі 30-50 °С з концентрацією 1 та 2 мг/мл відповідно.

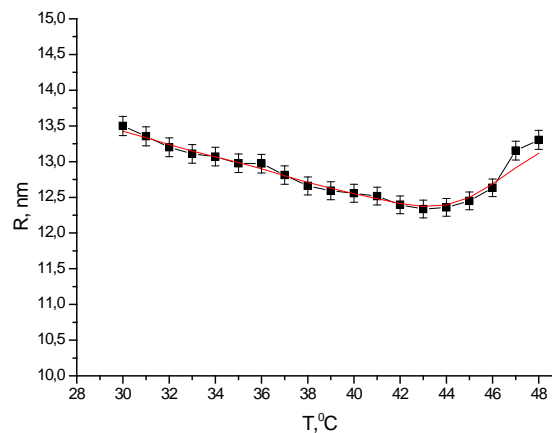
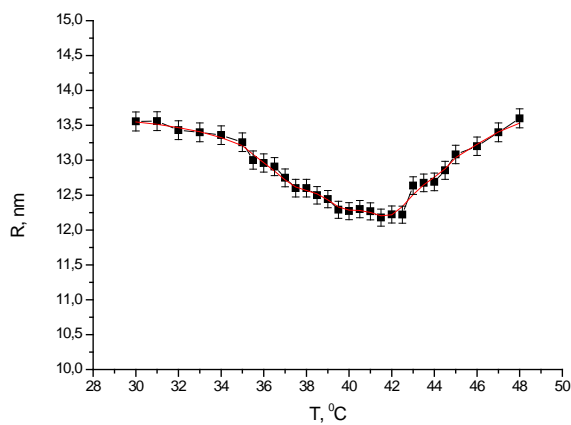


Рис. 3.5. Температурна залежність гідродинамічного радіусу макромолекули фібриногену у водному розчині

На основі одержаних результатів, можна сказати, що розміри макромолекули фібриногену в досліджуваному інтервалі температур достатньо стабільні при цьому мінімум гідродинамічного радіусу спостерігається в температурному інтервалі 40-42⁰С, при концентрації - 1 мг/мл, та 43-44⁰С, при концентрації - 2 мг/мл, глибина мінімуму ΔR сягає приблизно 1-1,2 нм, що дорівнює трьом молекулярним діаметрам води, таким чином можлива інтерпретація даних результатів полягає в тому, що руйнується зовнішній кластер водного оточення.

3.4. Стабільність макромолекули альбуміну

В результаті експерименту було досліджено водний розчин альбуміну при концентраціях 1 та 2 мг/мл в температурному інтервалі 30-60⁰С з кроком 1⁰С.

На рис 3.6. представлена кореляційна функція другого порядку в температурному інтервалі 30-60⁰С.

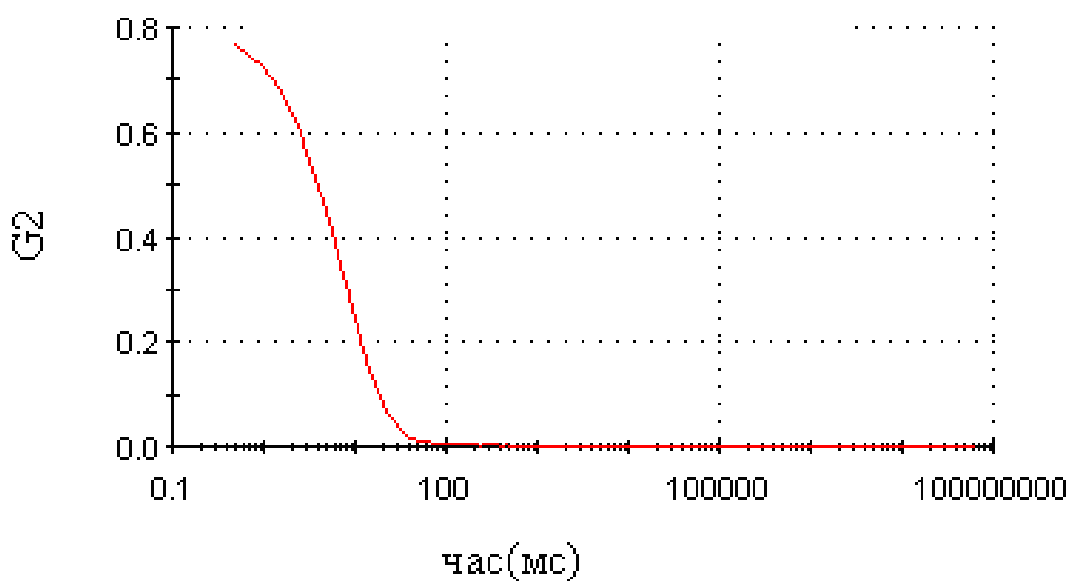


Рис 3.6. Кореляційна функція 2-го порядку в температурному інтервалі 30-60⁰С

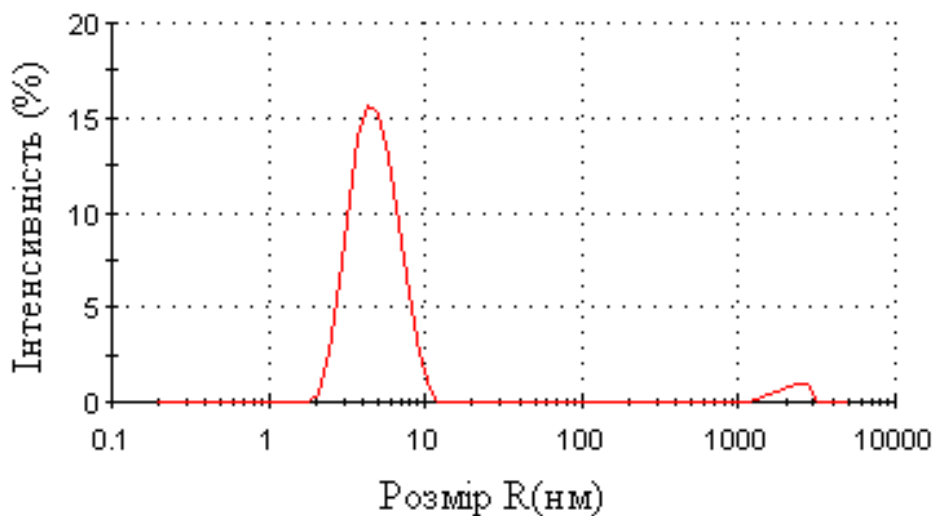


Рис.3.7.Розподіл інтенсивностей за розмірами частинок

Аналіз експериментальних даних для автокореляційних функцій білкового розчину дав значення коефіцієнта дифузії рівняння Стокса-Ейнштейна (4) розрахувати значення гідродинамічного радіуса.

Як показано на рис.3.7. розподіл інтенсивностей за розмірами частинок, який чітко показує, що найбільша інтенсивність припадає на макромолекули з розмірами представленими в таблиці. 3.2.

| T(°C) | Z(СЕРЕ ДНЄ) | RH(НМ) (ІНТЕНСИВ НІСТЬ) | RH(НМ) (ОБ'ЄМ) | % (ІНТЕНСИВ НІСТЬ) | % (ОБ'ЄМ) |
|-------|----------------|-------------------------------|-------------------|--------------------------|------------------|
| 40 | 15,3693 | 4,5943 | 3,696 | 97,8 | 99,96 |
| 45 | 8,8116 | 4,5308 | 3,709 | 99,1 | 100 |
| 50 | 4,5363 | 4,6564 | 3,687 | 98,1 | 99,98 |

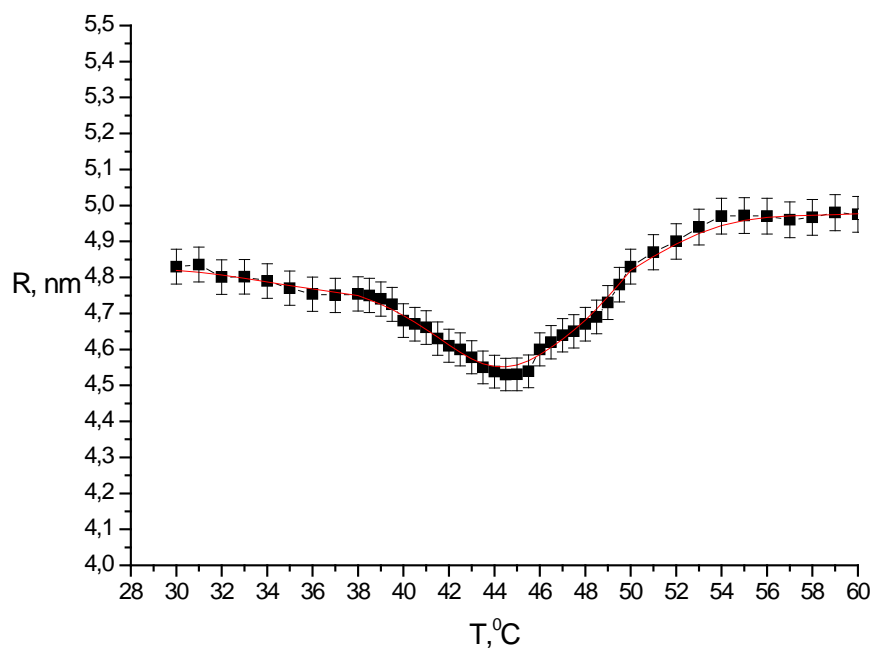
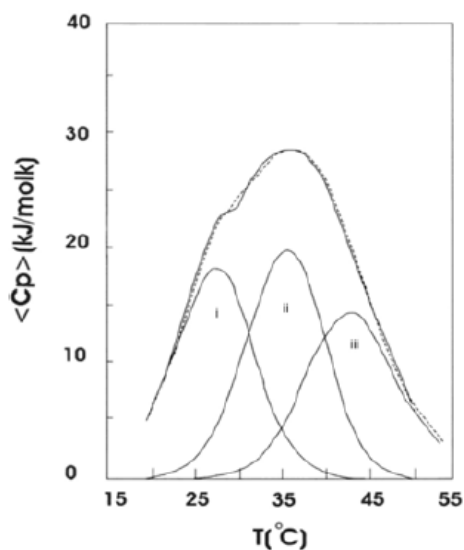


Рис.3.8. Температурна залежність гідродинамічного радіуса

Таким чином, проаналізовано температурні залежності середніх розмірів макромолекул. В температурній точці $T=44^{\circ}\text{C}$ спостерігався локальний мінімум величини гідродинамічного радіуса від температури. Порівняння отриманих результатів з даними роботи [37], частково співпадає. В роботі, було показано, що процес коформаційних змін макромолекули альбуміну при температурному

зростанні складається з трьох підпереходів. Автори показали, що ці переходи розділені температурним інтервалом приблизно 9°C Рис 3.9. Температура останнього підпереходу дорівнювала 42°C , що наближається до значення температури 44°C одержаного в нашій роботі.

Рис 3.9. Конформаційні зміни молекули альбуміну в температурному інтервалі $25 - 55^{\circ}\text{C}$ [37]



Підсумовуючи, можна виділити такі основні результати:

- зміна розмірів макромолекули в досліджуваному інтервалі температур є двостадійним процесом

- мінімум гідродинамічного радіуса спостерігається в околі температурної точки 44⁰С
- зміна гідродинамічного радіусу в околі мінімуму має значення, що приблизно дорівнює розмірам першої гідратної оболонки.

3.5. Дослідження стабільності альбуміну на основі мікро віскозиметрії

Обчислення значень характеристичної в'язкості альбуміну проводилось в температурному інтервалі 25-45⁰С К з шагом 1⁰С. Для наочності на Рис.3.10. продемонстровано екстраполяцію значень при температурі 37⁰С.

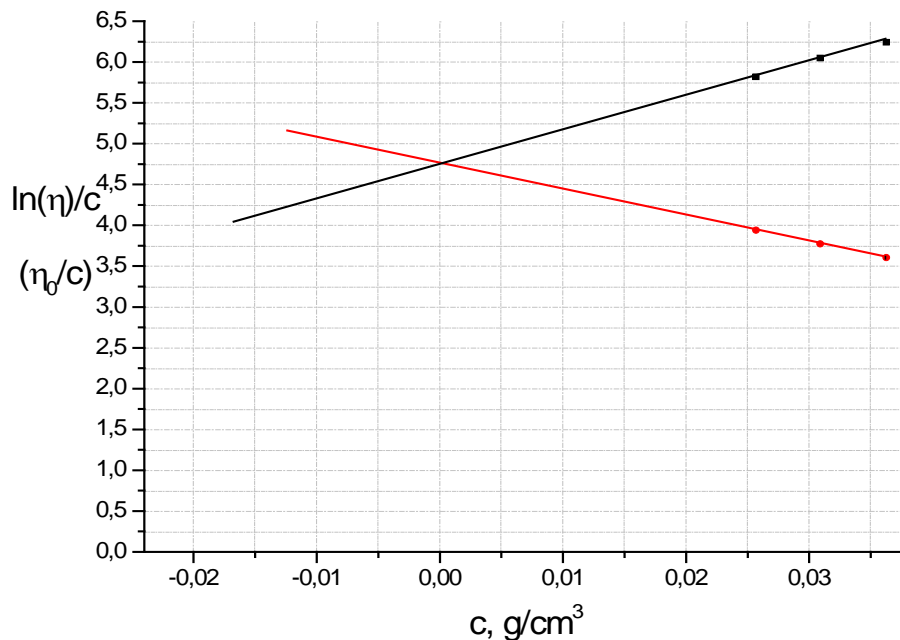


Рис.3.10. Графічний аналіз характеристичної в'язкості $[\eta]$ при температурі 37⁰С

Результати обчислень $\eta_{від}$, η_{nut} , а також $\ln(\eta_{від}/c)$, η_{nut}/c для заданого інтервалу температур приведені у таблицях (Таб.1-7):

(Таблиця 1)

1%

| $\eta_{\text{від}}$ | $\eta_{\text{пит}}$ | $\eta_{\text{пит}}/c$ | $\ln(\eta_{\text{відн}}/c)$ | T, K |
|---------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------------|------|
| 1,081933 | 0,081933459 | 8,111413 | 4,673869541 | 293 |
| 1,082496 | 0,082495673 | 8,167072 | 4,674389044 | 298 |
| 1,06866 | 0,068659814 | 6,797322 | 4,661525214 | 303 |
| 1,068236 | 0,068236008 | 6,755365 | 4,661128557 | 308 |
| 1,080278 | 0,080277629 | 7,947485 | 4,672337932 | 313 |
| 1,044018 | 0,044018183 | 4,3578 | 4,638196766 | 318 |

(Таблиця 2)

| 1,5% | | | | |
|---------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------------|------|
| $\eta_{\text{від}}$ | $\eta_{\text{пит}}$ | $\eta_{\text{пит}}/c$ | $\ln(\eta_{\text{відн}}/c)$ | T, K |
| 1,093958 | 0,093957805 | 6,169896 | 4,2743936 | 293 |
| 1,10972 | 0,109720404 | 7,204973 | 4,288699562 | 298 |
| 1,089409 | 0,089408599 | 5,871165 | 4,270226446 | 303 |
| 1,087207 | 0,087207275 | 5,726611 | 4,268203741 | 308 |
| 1,092938 | 0,092938301 | 6,102949 | 4,273461224 | 313 |
| 1,061041 | 0,061041148 | 4,008369 | 4,243842108 | 318 |

(Таблиця 3)

| 2% | | | | |
|---------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------------|------|
| $\eta_{\text{від}}$ | $\eta_{\text{пит}}$ | $\eta_{\text{пит}}/c$ | $\ln(\eta_{\text{відн}}/c)$ | T, K |
| 1,122407 | 0,122406536 | 5,99792 | 4,007295384 | 293 |

| | | | | |
|----------|-------------|----------|-------------|-----|
| 1,145724 | 0,145723891 | 7,140471 | 4,027856967 | 298 |
| 1,122948 | 0,122948047 | 6,024454 | 4,007777723 | 303 |
| 1,108154 | 0,108153506 | 5,299522 | 3,994515434 | 308 |
| 1,102429 | 0,102428543 | 5,018999 | 3,989335824 | 313 |
| 1,082669 | 0,082669283 | 4,050795 | 3,971249861 | 318 |

(Таблиця 4)

| 2,5% | | | | |
|---------------------|---------------------|-----------------------|----------------------------|------|
| $\eta_{\text{від}}$ | $\eta_{\text{пит}}$ | $\eta_{\text{пит}}/c$ | $\ln(\eta_{\text{від}}/c)$ | Т, К |
| 1,151734 | 0,151734281 | 5,917637 | 3,804830509 | 293 |
| 1,18619 | 0,186190181 | 7,261417 | 3,834308275 | 298 |
| 1,159933 | 0,159932561 | 6,23737 | 3,811923499 | 303 |
| 1,160497 | 0,160496628 | 6,259368 | 3,812409673 | 308 |
| 1,150179 | 0,150178553 | 5,856963 | 3,803478826 | 313 |

(Таблиця 5)

| 3% | | | | |
|---------------------|---------------------|-----------------------|----------------------------|------|
| $\eta_{\text{від}}$ | $\eta_{\text{пит}}$ | $\eta_{\text{пит}}/c$ | $\ln(\eta_{\text{від}}/c)$ | Т, К |
| 1,186418 | 0,186418404 | 6,027528 | 3,647037716 | 293 |
| 1,225868 | 0,225867663 | 7,303054 | 3,679747581 | 298 |

| | | | | |
|----------|-------------|----------|-------------|-----|
| 1,205147 | 0,205147157 | 6,633091 | 3,662700373 | 303 |
| 1,209543 | 0,209543311 | 6,775234 | 3,666341551 | 308 |
| 1,197921 | 0,197921388 | 6,399458 | 3,656686569 | 313 |
| 1,154809 | 0,154809282 | 5,0055 | 3,620033898 | 318 |

(Таблиця 6)

| 3,5% | | | | |
|---------------------|---------------------|-----------------------|----------------------------|------|
| $\eta_{\text{від}}$ | $\eta_{\text{пит}}$ | $\eta_{\text{пит}}/c$ | $\ln(\eta_{\text{від}}/c)$ | Т, К |
| 1,226248 | 0,226247561 | 6,237968 | 3,520738784 | 293 |
| 1,275485 | 0,275485197 | 7,59552 | 3,560106694 | 298 |
| 1,255227 | 0,25522691 | 7,036971 | 3,544096402 | 303 |
| 1,270631 | 0,270631303 | 7,461692 | 3,556293907 | 308 |
| 1,296514 | 0,296514234 | 8,175321 | 3,576459346 | 313 |
| 1,268577 | 0,268576979 | 7,405051 | 3,554675825 | 318 |

(Таблиця 7)

| 4% | | | | |
|---------------------|---------------------|-----------------------|----------------------------|------|
| $\eta_{\text{від}}$ | $\eta_{\text{пит}}$ | $\eta_{\text{пит}}/c$ | $\ln(\eta_{\text{від}}/c)$ | Т, К |
| 1,290697 | 0,290697358 | 6,976737 | 3,433236482 | 293 |

| | | | | |
|----------|-------------|----------|-------------|-----|
| 1,32413 | 0,324130314 | 7,779127 | 3,458809699 | 298 |
| 1,307266 | 0,307266237 | 7,37439 | 3,445991937 | 303 |
| 1,344027 | 0,344026789 | 8,256643 | 3,473723997 | 308 |
| 1,405232 | 0,405232132 | 9,725571 | 3,51825633 | 313 |
| 1,387233 | 0,387233195 | 9,293597 | 3,505365079 | 318 |

На основі даних динамічної та характеристичної в'язкості, а також ФКС (формула (4)) були отримані значення коефіцієнту дифузії та оцінено на основі формули Флорі такі параметри як середньо квадратична відстань між кінцями ланцюга $(\bar{h}^2)^{1/2}$ або довжина головної осі еліпсоїду (формула (13)), що апроксимує макромолекулярний комплекс (Рис.3.11).

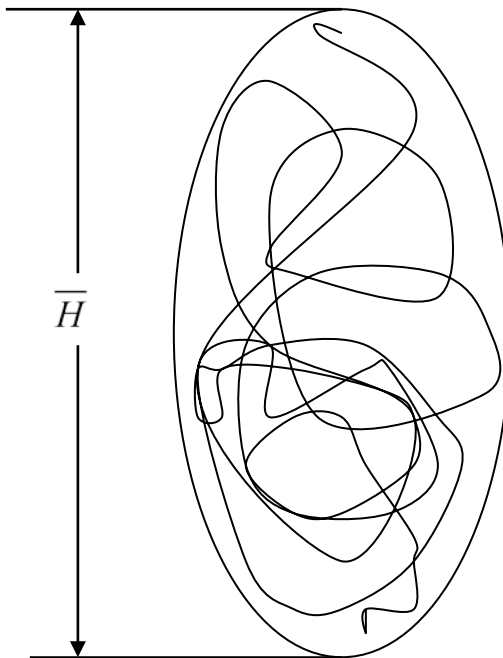


Рис.3.11. Гнучка ланцюжкова молекула згорнута в клубок

$$V = \frac{\pi}{24} \overline{H}^3, \quad (12)$$

де V - об'єм еліпсоїда, апроксимуючого макромолекулу; H – довжина головної осі еліпсоїда.

$$[\eta] = 0,38 \cdot N_A \frac{(\overline{H})^3}{M} \quad (13)$$

Знаючи молекулярну масу макромолекули, число Авогадро, можна оцінити розміри головної осі еліпсоїда H та її залежність від температури.

Обробка даних віскозиметрії дала значення головної осі еліпсоїду приблизно 10 нм, що узгоджується зі значеннями гідродинамічного радіусу отриманого методами ФКС, ця величина є сталою в досліджуваному інтервалі температур, що вказує на стабільність макромолекули при фізіологічних температурах.

ВИСНОВКИ

- При наближенні до точки 42⁰С спостерігається локальний мінімум гідродинамічного радіусу макромолекули D-димеру
- Після температурної точки 42⁰С спостерігається різке зростання розмірів D-димеру, що пояснюється незворотними змінами в конформаційній динаміці
- Розміри макромолекули фібриногену в досліджуваному інтервалі температур достатньо стабільні
- Мінімум гідродинамічного радіусу макромолекули фібриногену спостерігається в температурному інтервалі 40-42⁰С, при концентрації - 1 мг/мл, та 43-44⁰С, при концентрації - 2 мг/мл, глибина мінімуму ΔR сягає приблизно 1-1,2 нм
- Можлива інтерпретація результатів для фібриногену полягає в тому, що руйнується зовнішній кластер водного оточення.
- Значення головної осі еліпсоїду макромолекули альбуміну, одержане методами мікро-віскозиметрії, дорівнює приблизно 10 нм.
- Результати мікро-віскозиметрії узгоджується зі значеннями гідродинамічного радіусу отриманого методами ФКС

- Розміри макромолекули альбуміну стабільні в досліджуваному інтервалі температур.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. H. Frauenfelder, G. Chen, J. Berendzen, P.W. Fenimore, H. Jansson, B.H. McMahon, I.R. Stroe, J. Swenson, and R.D. Young. A unified model of protein dynamics. // Proc Natl Acad Sci, 106 (13), 5129-34 (2009).
2. S. Ebbinghaus, S.J. Kim, M. Heyden, X. Yu, U. Heugen, M. Gruebele, D.M. Leitner, M. Havenith. An extended dynamical hydration shell around proteins. // Proc Natl Acad Sci, 104 (52), 20749-52(2007).
3. B. Born, H. Weingartner, E. Brundermann, M. Havenith, Solvation dynamics of model peptides probed by terahertz spectroscopy. Observation of the onset of collective network motions. // J. Am. Chem. Soc. , 131 (10), 3752-5 (2009).
4. T.V. Lokotosh, N. P. Malomuzh, K. N. Pankratov. Thermal Motion in Water + Electrolyte Solutions According to Quasi-Elastic Incoherent Neutron Scattering Data. // J. Chem. Eng. Data, 55, 2021-29 (2010).
5. S. Sugio, A. Kashima, S. Mochizuki, M. Noda, K. Kobayashi, Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution, Protein Eng. 12 (1999) 439–446.

6. J.R. Brown, in: V.M. Rosenoer, M. Oratz, M.A. Rothschild (Eds.), *Albumin Structure, Function and Uses*, Pergamon Press, Oxford, UK, 1977.
7. M.A. Rothschild, M. Oratz, S.S. Schreiber, Serum albumin, *Hepatology* 8 (1988) 385–401.
8. D.C. Carter, J.X. Ho, Structure of serum albumin, *Adv. Protein Chem.* 45 (1994) 153–203.
9. F. Kratz, Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles, *J. Control. Release* 132 (2008) 171–183.
10. M. Rozga, W. Bal, The Cu(II)/A β /human serum albumin model of control mechanism for copper-related amyloid neurotoxicity, *Chem. Res. Toxicol.* 23 (2010) 298–308
11. Weisel JW. Structure of fibrin: impact on clot stability. *J Thromb Haemost.* 2007 Jul; 5 Suppl 1:116–124. doi: 10.1111/j.1538-7836.2007.02504.x PMID: 17635717
12. Takagi T, Doolittle RF. Amino acid sequence studies on the α chain of human fibrinogen. Location of four plasmin attack points and a covalent cross-linking site. *Biochemistry.* 1975; 14(23):5149–5156. doi: 10.1021/bi00694a020 PMID: 127612
13. Takagi T, Doolittle RF. Amino acid sequence studies on plasmin-derived fragments of human fibrinogen. Amino-terminal sequences of intermediate and terminal fragments. *Biochemistry.* 1975; 14(5): 940–946. doi: 10.1021/bi00676a010 PMID: 123758
14. Mihalyi E. Kinetics and molecular mechanism of the proteolytic fragmentation of fibrinogen. *Ann NY Acad Sci.* 1983 Jun; 408:60–70. doi: 10.1111/j.1749-6632.1983.tb23234.x PMID: 6223561

15. Kollman J, Pandi L, Sawaya M, Riley M, Doolittle R. Crystal Structure of Human Fibrinogen. *Biochemistry*. 2009; 48:3877–3886. doi: 10.1021/bi802205g PMID: 19296670
16. Lim BBC, Lee EH, Sotomayor M, Schulten K. Molecular Basis of Fibrin Clot Elasticity. *Structure*. 2008; 16:449–459. doi: 10.1016/j.str.2007.12.019 PMID: 18294856
17. Zhmurov A, Brown AX, Litvinov R, Dima R, Weisel J, Barsegov V. Mechanism of Fibrin(ogen) Forced Unfolding. *Structure*. 2011; 19(11):1615–1624. doi: 10.1016/j.str.2011.08.013 PMID: 22078561
18. Deng M, Karniadakis GE. Coarse-grained modeling of protein unfolding dynamics. *Multiscale Model Simul*. 2014; 12(1):109–118. doi: 10.1137/130921519 PMID: 25400515
19. Averett RD, Menn B, Lee EH, Helms CC, Barker T, Guthold M. A modular fibrinogen model that captures the stress-strain behavior of fibrin fibers. *Biophys J*. 2012; 103:1537–1544. doi: 10.1016/j.bpj. 2012.08.038 PMID: 23062346
20. Marsh JJ, Guan HS, Li S, Chiles PG, Tran D, Morris TA. Structural insights into fibrinogen dynamics using amide hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Biochemistry*. 2013 Aug; 52(32): 5491–5502. doi: 10.1021/bi4007995 PMID: 23875785
21. Луговской Э.В., Макогоненко Е.М., Комисаренко С.В. Молекулярные механизмы образования и разрушения фибрина. Киев: Наукова думка, 2013. – 230 с.
22. Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost*. 2005 Aug; 3(8):1894-904.
23. J.W. Weisel, Y. Veklich, O. Gorkun. The Sequence of Cleavage of Fibrinopeptides from Fibrinogen Is Important for Protofibril Formation and Enhancement of Lateral Aggregation in Fibrin Clots. *J Mol Biol*. 1993 Jul

- 5;232(1):285-97. Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost.* 2005 Aug;3(8):1894-904.
- 24.H.Z. Cummins, E.R. Pike, *Photon Correlation and Light Beating Spectroscopy*, Plenum Press, New York and London, 1974 (Published in cooperation with NATO Scientific Affairs Division).
- 25.S. Magazu, G. Maisano, F. Mallamace, N. Micali, Growth of fractal aggregates in water solutions of macromolecules by light scattering, *Phys. Rev. A* 39 (1989) 4195–4200.
- 26.D.I. Donato, M.P. Janelli, S. Magazu, G. Maisano, D. Majolino, P. Migliardo, R. Ponterio, Viscosity and photon correlation spectroscopy measurements in aqueous solutions of poly (ethylene glycol), *J. Mol. Struct.* 381 (1996) 213–217.
- 27.S. Magazù, G. Maisano, P. Migliardo, V. Villari, Experimental simulation of macromolecules in trehalose aqueous solutions: a photon correlation spectroscopy study, *J. Chem. Phys.* 111 (1999) 9086–9092.
- 28.C. Branca, S. Magazù, G. Maisano, P. Migliardo, V. Villari, A.P. Sokolov, the fragile character and structure-breaker role of alpha, alpha trehalose: viscosity and Raman scattering findings, *J. Phys. Condens. Matter* 11 (1999) 3823–3832.
- 29.S. Magazù, G. Maisano, P. Migliardo, E. Tettamanti, V. Villari, Transport phenomena and anomalous glass-forming behaviour in alpha, alpha-trehalose aqueous solutions, *Mol. Phys.* 96 (1999) 381–387.
- 30.M.P. Jannelli, S. Magazu, P. Migliardo, U. Wanderlingh, Chain length dependence and H-bond effects on diffusive processes of alcohols by IQENS, DLS and NMR, *Phys. B Condens. Matter* 234 (1997) 355–356.
- 31.M.P. Jannelli, S. Magazu, P. Migliardo, F. Aliotta, E. Tettamanti, Transport properties of liquid alcohols investigated by IQENS, NMR and DLS studies, *J. Phys. Condens. Matter* 8 (1996) 8157–8171.

32. A. Faraone, S. Magazu, G. Maisano, R. Ponterio, V. Villari, Experimental evidence of slow dynamics in semidilute polymer solutions, *Macromolecules* 32 (1999) 1128–1133.
33. Monkos, K. A. Comparison of the Activation Energy of Viscous Flow for Hen Egg-white Lysozyme Obtained on the Basis of Different Models of Viscosity for Glass-forming Liquids. *Curr. Top. Biophys* 2011, 34, 1-9
34. Monkos, K. A. Comparison of the Activation Energy of Viscous Flow for Hen Egg-white Lysozyme Obtained on the Basis of Different Models of Viscosity for Glass-forming Liquids. *Curr. Top. Biophys* 2011, 34, 1-9
35. Monkos, K. A. Comparison of the Activation Energy of Viscous Flow for Hen Egg-white Lysozyme Obtained on the Basis of Different Models of Viscosity for Glass-forming Liquids. *Curr. Top. Biophys* 2011, 34, 1-9
36. V. Bardik, A. Fisenko, S. Magazu, N. Malomuzh. The crucial role of water in the formation of the physiological temperature range for warm-blooded organisms. // *Journal of Molecular Liquids*, Volume 306, 15 May, 2020, 112818
37. Conformational Study of Human Serum Albumin in Pre-denaturation Temperatures by Differential Scanning Calorimetry, Circular Dichroism and UV Spectroscopy // M. Rezaei-Tavirani, S. H. Moghaddamnia, B. Ranjbar, M. Amani and S.A. Marashi. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 39, No. 5, 530-536 (2006).