

Санкт-Петербургский государственный университет

ГОРНЯЯ София Борисовна

Выпускная квалификационная работа

Водные дисперсии белковых агрегатов: образование и поверхностные свойства

Уровень образования: магистратура

Направление 04.04.01 «Химия»

Основная образовательная программа ВМ.5512.2021 «Химия»

Научный руководитель:
кафедра коллоидной химии,
к.х.н, доцент, Акентьев
Александр Владимирович

Рецензент: ассистент кафедры
общей и биорганической химии
Первого Санкт-Петербургского
государственного медицинского
университета им. акад. И.П.
Павлова, Глеб Олегович Юрьев

Санкт-Петербург
2023

Оглавление

Оглавление.....	2
Список условных сокращений	4
Введение	5
1. Обзор литературы.....	7
1.1. Амилоидные фибриллы	7
1.2. Структура фибрилл	8
1.3. Нативный белок БСА	10
1.3.1. Агрегация БСА	11
1.3.2. Синтез амилоидных фибрилл бычьего сывороточного альбумина	11
1.3.3. Ингибирование фибрилляции	18
1.4. Поверхностные свойства растворов нативного белка БСА	20
1.5. Нативный белок лизоцим куриного белка.....	22
1.5.1. Поверхностные свойства лизоцима куриного белка	24
1.5.2. Получение и поверхностные свойства амилоидных фибрилл лизоцима	26
2. Экспериментальные методы и методика измерения	28
2.1. Получение амилоидных фибрилл	28
2.1.1. Получение амилоидных фибрилл бычьего сывороточного альбумина.....	28
2.1.2. Другие методы синтеза амилоидов БСА.....	29
2.1.3. Получение амилоидных фибрилл лизоцима куриного белка	31
2.2. Очистка дисперсий фибриллярных агрегатов	31
2.2.1. Очистка фибрилл бычьего сывороточного альбумина.....	32
2.2.2. Очистка фибрилл лизоцима куриного белка	33
2.3. Анализ синтезированных фибрилл.....	33
2.3.1. Метод атомно-силовой микроскопии.....	33
2.3.2. Метод гравиметрии	34
2.3.3. Микроскопия при угле Брюстера (БАМ).....	34
2.4. Методы поверхностной реологии.....	35

2.4.1. Определение поверхностного натяжения методом пластинки Вильгельми ...	37
2.4.2. Определение динамической поверхностной упругости методом осциллирующего барьера	37
3. Результаты и обсуждение	39
3.1. Полученные фибриллярные агрегаты	39
3.2. Результат очистки фибриллярных агрегатов	40
3.3. Адсорбционные пленки амилоидных фибрилл БСА и лизоцима	43
3.4. Нанесенные пленки амилоидных фибрилл БСА и лизоцима	49
3.4.1. Нанесенные пленки БСА и его фибрилл	49
3.4.2. Нанесенные пленки лизоцима куриного белка и его фибрилл	56
Выводы	60
4. Благодарности	61
5. Список литературы	62

Список условных сокращений

γ – поверхностное натяжение;

$\delta\gamma$ – изменение поверхностного натяжения;

ε – модуль динамической поверхностной упругости;

ε_{Re} – действительная часть комплексной динамической поверхностной упругости;

ε_{Im} – мнимая часть комплексной динамической упругости;

φ – фазовый сдвиг между колебаниями площади поверхности и поверхностного натяжения;

ω – угловая частота;

A – площадь поверхности;

A_0 – начальная площадь поверхности;

δA – изменение площади поверхности;

G' – модуль запаса;

АСМ – атомно-силовая микроскопия;

БАМ – микроскопия при угле Брюстера;

БСА – бычий сывороточный альбумин;

ПАВ – поверхностно-активные вещества;

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия.

Введение

Амилоидные фибриллы – особая форма белковых агрегатов, представляющих собой длинные волокна, устойчивые с течением времени. Адсорбция фибрилл и других белковых наноагрегатов приводит к образованию плотных пленок, которые встречаются в природных и биологических системах. Хорошо известно, что образование и накопление амилоидных фибрилл в клетках человека ответственно за развитие нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, Паркинсона и диабета 2 типа [1–5]. Амилоидные скопления формируются на мембранах клеток – межфазных границах в биологических системах. Несмотря на подобную биологическую активность, лишь сравнительно недавно амилоидные фибриллы нашли применение в современной биотехнологии и материаловедении в качестве основ для выращивания клеточных культур, агентов доставки лекарств в живых организмах, материалов для фотовольтаических ячеек, фотолюминесцентных меток, биосенсоров, адгезионных и композитных материалов [6–13]. На данный момент одно из перспективных направлений использования белков и их наноагрегатов – стабилизация пен и эмульсий при помощи как можно меньшего количества поверхностно-активных веществ (ПАВ), и фибриллярные агрегаты белков представляются многообещающими стабилизаторами [6,9,14–19].

Как упоминалось выше, амилоидные фибриллы распространены в природных системах. Кроме болезнетворных фибрилл, существуют также и функциональные амилоиды [20,21], которые играют роль в специфических процессах жизнедеятельности животных, бактерий и человека. Например, за прочность и эластичность паутины ответственны именно фибриллярные нити, а в меланосомах человека формируются амилоидные фибриллы, на которых плотно упаковывается предшественник меланина, тем самым ускоряя процесс его превращения в меланин [6,21].

Белковые амилоиды крайне полиморфны: их размер, внутренняя структура и форма сильно зависят от условий синтеза. Для результативного изучения методов ингибирования фибрилляции необходимо разработать метод синтеза, позволяющий получать фибриллы, аналогичные таковым из живых организмов.

Нужно отметить, что объемные свойства растворов белков и их агрегатов исследуются часто, и, хотя в подобных системах многие процессы происходят на границах раздела фаз, работ по адсорбции на поверхности таких систем значительно меньше.

Для исследования микро- и наногетерогенных адсорбционных пленок в системах с биомакромолекулами и определения механизма адсорбции в данной работе используется подход, основанный на использовании дилатационной поверхностной реологии в совокупности с оптическими методами, в том числе с различными видами микроскопии.

Основная цель работы заключается в определении механизма формирования адсорбционного слоя амилоидных фибрилл глобулярных белков бычьего сывороточного альбумина (БСА) и лизоцима куриного белка. В частности, предполагается оценить различия структуры и свойств поверхностного слоя фибрилл и нативных глобулярных белков у межфазной границы водный раствор-воздух. Для этих целей, кроме методов дилатационной поверхностной реологии, будут использованы зондовая микроскопия и микроскопия при угле Брюстера.

Поставлены следующие задачи:

1. Синтезировать фибриллы бычьего сывороточного альбумина и лизоцима
2. Найти эффективный доступный способ очистки
3. Рассмотреть влияние внешних условий при проведении синтеза на формирование агрегатов глобулярных белков (БСА и лизоцима) в водных растворах
4. Получить кинетические зависимости поверхностных свойств фибриллярных агрегатов при разных значениях рН и ионной силы
5. На основе полученных данных предложить модель поверхностного слоя растворов фибриллярных агрегатов глобулярных белков.

1. Обзор литературы

1.1. Амилоидные фибриллы

В 1854 году Рудольф Вирхов обнаружил макроскопическую аномалию ткани, которая показала положительную реакцию окрашивания йодом, предполагающую присутствие крахмала или амилина (от *amyllum* на латыни и *amylon* по-гречески) [22]. Он предположил, что аномальные отложения могут иметь целлюлозное происхождение, и ввёл термин «амилоид». Фридрих и Кекуле в 1859 году показали, что отложения на самом деле представляют собой белковые агрегаты, но это название прижилось и используется до сих пор [20]. В дальнейшем с появлением электронной микроскопии обнаружили, что амилоиды — это жесткие, линейные фибриллы без ответвлений толщиной до 10 нм. Они склонны к накоплению вне клеток, образуя некоторые пучки или связки. Впоследствии ученые заметили, что разворачивание белков сопровождается множеством болезней. Одним из таких повсеместных и распространенных заболеваний можно назвать болезнь Альцгеймера [23]. В 1984-1985 годах Гленнер впервые выделил и описал белок, образующий амилоидные фибриллы при данной патологии [24]. На настоящий момент под амилоидозами понимают заболевание, вызванное накоплением амилоидных фибрилл различных белков в специальные коллективные структуры вне клеток. Амилоидоз может быть локальным, когда отложения появляются в одном органе, или системным, «задевающим» соседние ткани и кровеносные сосуды [25]. Кроме того, амилоидозы делят на наследственные и приобретенные [26]. Лишь 23 белка могут формировать амилоидные фибриллы в живом организме, *in vivo*: их объединяет схожий механизм агрегации и близкие условия протекания процесса [20].

Преобладающая в настоящий момент концепция в химии амилоидов состоит в том, что фибрилляция — генетическое свойство полипептидной цепи, и результирующая амилоидная фибрилла содержит перекрестную β -структуру независимо от аминокислотной последовательности [25].

К амилоидогенным белкам относят многие белки человека, животных и растений, способных к образованию амилоидных фибрилл. БСА и лизоцим, β -лактоглобулин, κ -казеин, овальбумин – типичные примеры таких белков [25].

1.2. Структура фибрилл

Амилоидные фибриллы в основном состоят из β -листов, которые собираются в перекрестную β -структуру с межцепочечным расстоянием около 4.8 Å и расстоянием между листами 6-12 Å. Эта перекрестная β -структура вытягивается в протофиламенты (протофибриллы), а затем скручивается в многоцепочечные спиральные зрелые амилоидные фибриллы. Уникальная стабильность амилоидов обусловлена двойной структурой β -слоя, некоторой стерической «застежкой-молнией». Термин «стерическая молния» используется потому, что встречные боковые цепи выглядят как зубцы молнии, если смотреть вниз по оси фибриллы [6]. Одиночные β -слои, стабилизированные водородными связями основной цепи, могут легко образовываться и разрушаться, но встречные двойные β -слои стабилизируются дополнительными силами, которые включают ван-дер-ваальсовы взаимодействия и чрезвычайно прочные водородные связи. Квантово-механический расчет показывает, что водородная связь в амилоидных фибриллах прочнее, чем у льда [27].

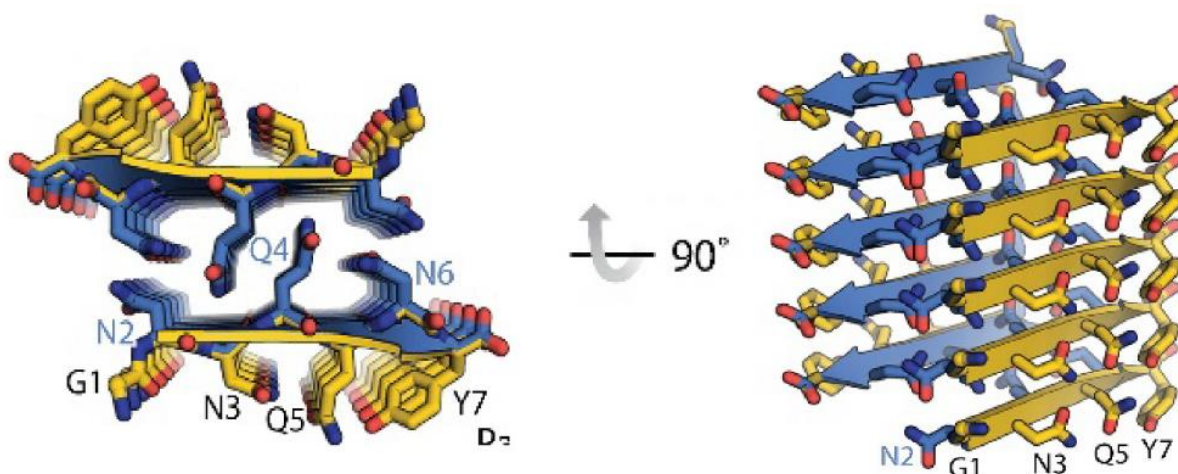


Рис.1. Схема перекрестной β -структуры амилоидных фибрилл [6].

Амилоидные фибриллы, образованные из разных полипептидов, имеют общую перекрестную β -структуру. Тем не менее, фибриллярные агрегаты, сформированные из одного и того же полипептида, могут встречаться в ряде

структурно различных архитектур [20]. Их гетерогенность обычно принято называть полиморфизмом, который разделяют на структурный и молекулярный [6]. Структурный полиморфизм возникает из-за сборки протофиламентов, тогда как молекулярный полиморфизм вызывается расположением молекул внутри одного протофиламента. Молекулярный полиморфизм может выступать следствием различия в конформации или упаковке составляющих пептидов. В целом, полиморфизм *in vitro* возникает в результате чрезвычайной чувствительности белков к условиям агрегации, таким как температура, кислотность среды, ионная сила, механические воздействия в процессе синтеза (перемешивание и его скорость).

Морфология зрелых фибрилл чрезвычайно разнообразна и включает в себя скрученные ленты, спиральные ленты, нанотрубки и кристаллические полиморфы [7,20,25]. Атомно-силовая микроскопия (АСМ) позволяет визуализировать фибриллы различных белков и даже выяснить число составляющих протофиламентов. В большинстве случаев фибриллы скручены из 2-12 протофиламентов [28], этот процесс можно моделировать методом молекулярной динамики. По данным расчетов можно определить расстояние между «сегментами цепи» и число скрученных протофиламентов (рис. 2). Такие модели легко сравнивать с визуализациями реальных фибрилл, полученными методом атомно-силовой микроскопии.

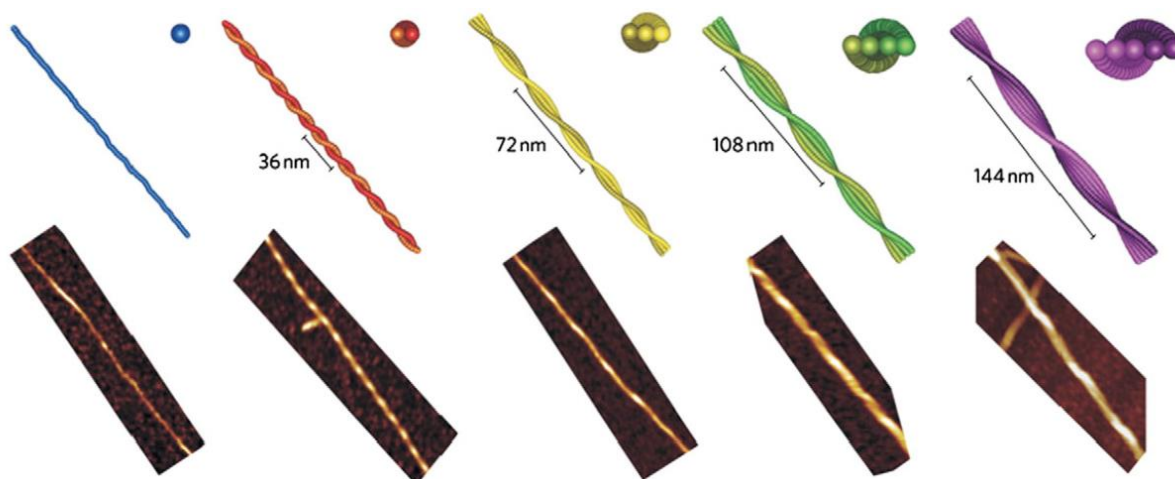


Рис.2. Модели скрученных фибрилл и их реальные прототипы [28].

В настоящий момент изучение фибрилл тормозится тем фактом, что морфология фибрилл в условиях *in vitro*, синтезированных искусственно, не

соответствует реальной морфологии фибрилл, извлеченных из амилоидных отложений больных [23]. Потому немаловажно найти те методы, которые позволят получить амилоиды, близкие к настоящим болезнетворным агрегатам.

1.3. Нативный белок БСА

Бычий сывороточный альбумин (БСА) – представитель животных белков, принадлежащих к классу сывороточных альбуминов. Эти белки выполняют функции переносчиков различных веществ по системе кровообращения и в большом количестве содержатся в плазме крови (концентрация до 50 г/л) [29]. С точки зрения биологической роли, сывороточные альбумины, в том числе и БСА, – белки-носители, которые участвуют в связывании и транспорте жирных кислот, гормонов, метаболитов, эндогенных лигандов и поддерживают коллоидно-осмотическое кровяное давление [30]. Человеческий сывороточный альбумин участвует в процессах доставки лекарств по системе кровообращения [31]. БСА и человеческий сывороточный альбумин имеют 76% общих гомологических последовательностей и обладают сходными доменами и субдоменами, но различаются по количеству остатков триптофана [32]. По этой причине БСА зачастую используют как модельный белок в различных научных исследованиях. Кроме того, методики выделения БСА достаточно просты и стабильны, белок коммерчески доступен.

Макроскопически, глобула БСА содержит три гомологичных домена, организованных в сердцевидную структуру. В разрезе глобула напоминает эллипс размерами 4x14 нм. Бычий сывороточный альбумин состоит из 583 (582) аминокислотных остатков, его глобулярная структура поддерживается семнадцатью дисульфидными мостиками [29]. В процессах агрегации и димеризации участвует один неспаренный остаток цистеина (он имеет свободную тиольную группу), который, связываясь с другими соединениями, может замедлять агрегацию или выступать её инициатором.

Изоэлектрическая точка у БСА наблюдается при рН 4,7. При рН ниже данного значения глобула белка преимущественно имеет отрицательный заряд, а при рН выше 4,7 молекула претерпевает конформационный переход и приобретает частичный положительный заряд.

1.3.1. Агрегация БСА

Как и многие другие белки, бычий сывороточный альбумин агрегирует при помещении его в какую-либо благоприятную для данного процесса среду. Так, БСА способен к димеризации, олигомеризации и образованию более крупных агрегатов – амилоидных фибрилл и сферулитов. Формы и структуры, образующиеся в результате агрегации достаточно разнообразны, так как белок, преимущественно состоящий из α -спиралей, может агрегировать при различных температурах [33] и значениях рН. Наиболее перспективным считается изучение нейтрального диапазона рН, с которым сывороточные альбумины сталкиваются в плазме, и кислого, преимущественно возникающего возле клеточных мембран. Отмечено, что в сильнокислых средах с рН меньше 3 агрегация белков α -структуры к β -структуре замедляется [29].

Для бычьего сывороточного альбумина известно 5 конформеров, переход между которыми зависит от рН среды [34,35]. При рН меньше 4 БСА обратимо теряет свою α -спиральную структуру и переходит в «вытянутую» конформацию большей длины (26.7 нм), чем «нормальное» компактное состояние (8.3 нм) при рН от 4 до 9 [36].

1.3.2. Синтез амилоидных фибрилл бычьего сывороточного альбумина

В большинстве случаев все синтезы фибрилл амилоидогенных белков сводятся к инкубации раствора нативного белка в буферном растворе при заданном рН и температуре (таблица 1). Времена синтезов варьируются от часов до недель и месяцев. В результате синтеза в растворах наблюдается помутнение и сильно увеличивается вязкость. Часть авторов [29,30] связывают увеличение вязкости растворов с превращением белка в амилоидные фибриллы и считают величину модуля запаса G' пропорциональной количеству превращенного белка.

Многие авторы перед процедурой синтеза описывают проведение дополнительной очистки белка диализом в течение нескольких суток. После синтеза также предлагается проводить очистку продукта от непрореагировавшего белка, полипептидов – чаще всего диализом, фильтрацией или центрифугированием.

Наиболее продуктивными считаются методы синтеза амилоидов БСА в сильноокислой среде [37]. Предположительно, при низких значениях рН сывороточный альбумин частично разворачивается уже при комнатной температуре до состояния «расплавленной» глобулы [36]. Происходит открытие гидрофобных участков, что облегчает формирование β -листных структур. Будет ли процесс образования фибрилл необратимым при последующей инкубации, скорее всего, зависит от условий синтеза. В некоторых работах действительно замечено прекращение агрегации и возвращение глобулярной структуры при последующем нагревании [29]. Более длительное воздействие высоких температур (100 и 145 часов) при рН 2.0 и 90 °С дополнительно увеличивает длину фибрилл [38]. При значениях рН, близких к изоэлектрической точке, БСА склонен образовывать неупорядоченные аморфные агрегаты, так как в этих условиях не происходит изменений вторичной структуры. При значениях рН, равных и превышающих 7.4, ионные отталкивающие взаимодействия могут привести к более упорядоченному протеканию агрегации БСА и образованию мягких червеобразных фибрилл. А при промежуточных значениях рН (4.7-7.4) литературные данные показывают, что образуются смеси аморфных и фибриллярных агрегатов вне зависимости от условий нагревания [36].

Таблица 1. Методы синтеза фибриллярных агрегатов БСА.

Источник	рН	Т, °С	Время
[38]	2 (вода и соляная кислота)	90	145 часов
[32]	3 (глицин-HCl)	65	4 часа
[32]	3 (глицин-HCl) + 5% фибрилл лизоцима	37	50 часов
[30]	7.4 (трис-HCl)	70	4 суток
[29]	2 (вода и соляная кислота)	60	10 часов
[39]	7.4 (фосфатный солевой буфер)	80	1 час

Для подтверждения наличия фибрилл в растворах после синтеза чаще всего используется визуализация различными видами микроскопии (АСМ, СЭМ). Как было сказано выше, атомно-силовая микроскопия позволяет определять структуру фибрилл, степень скручивания и число протофиламентов в одной нити. Тем не менее, более простым и дешевым способом считается взаимодействие фибрилл с красителем до появления специфической окраски. К данным методам относятся флуоресценция с тиофлавином Т или окрашивание с конго красным [20]. Красители специфически связываются с амилоидными фибриллами и вследствие этого меняют цвет (конго красный) или проявляют более выраженную флуоресценцию (тиофлавин Т). Это свойство не позволяет определить концентрацию фибрилл флуоресцентной спектроскопией, но может указать на их существование. Раствор тиофлавина Т имеет максимум поглощения 482 нм и коэффициент экстинкции 36000 л/моль·см [20,40]. На данный момент доказано [6], что за связывание с красителем ответственны именно параллельные β -листы, которые имеются и в фибриллярных протофиламентах, и в зрелых фибриллах. Таким образом, проводя анализ с тиофлавином Т, нельзя быть полностью уверенным, что в растворе присутствуют конечные фибриллы. Тем не менее, в литературе встречается, что исследователи ограничиваются только вторым методом, не визуализируя результат.

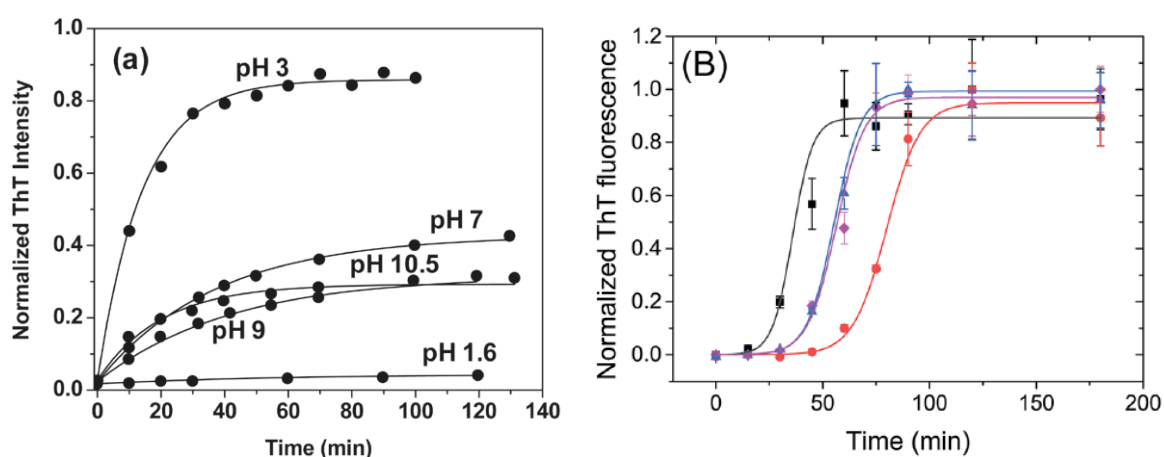


Рис.3. А) Кинетические зависимости интенсивности флуоресценции фибрилл БСА при разных рН [33]. В) Примеры кинетических зависимостей интенсивности флуоресценции из работы [41] для растворов фибрилл лизоцима с наночастицами золота: черный – без наночастиц, красный – 0.07мг/л, синий 0.33 мг/л, розовый 3.1 мг/л.

С другой стороны, флуоресценция с тиофлавином Т позволяет наблюдать и фиксировать кинетику фибрилляции. Так как данный метод достаточно изучен и

широко распространен, в работе [41] описали стандартную кривую интенсивности флуоресценции (рис. 3). Так, на ней можно выделить 3 участка, соответствующих фазам формирования фибриллярных агрегатов: фаза задержки – плоский участок, фаза роста и конечная фаза плато. Согласно данным исследователей, первичная фаза задержки отвечает денатурации белка, разворачиванию α -спиралей. Фазе роста соответствует зарождение протофиламентов и их рост, затем на фазе плато достигается максимальное количество β -листов (данная фаза чаще всего проявляется уже на втором часу инкубации). В частности, есть работы, в которых сравниваются скорости фибрилляции по данным таких кривых [33,41].

Одним из самых распространенных методов синтеза фибриллярных агрегатов бычьего сывороточного альбумина служит подход, предложенный в работах [38,42]. Сосуд с 6%-ным по массе раствором бычьего сывороточного альбумина при рН 2 выдерживали при высокой температуре (90°C) на масляной бане с перемешиванием 145 часов. Визуализацию фибрилл осуществляли методом атомно-силовой микроскопии. Авторы статьи на разных этапах инкубации обнаруживали фибриллы различной морфологии, причем почти полный переход от глобулярного белка к фибриллярным агрегатам происходил уже по прошествии первых 6 часов: зафиксировали образование коротких гибких фибрилл. В течение 40 часов происходило увеличение их числа и длины. После 70 часов инкубации образовывался новый тип жестких фибрилл, сосуществующих с предыдущими агрегатами. После 100 часов фибриллы росли до определенной длины, затем формировали пространственные сети, сильно увеличившие вязкость раствора. В общем, за все 145 часов наблюдения авторы зафиксировали несколько различных по морфологии видов фибрилл (рис. 4), но первые гибкие агрегаты сформировались за время от 6 до 40 часов.

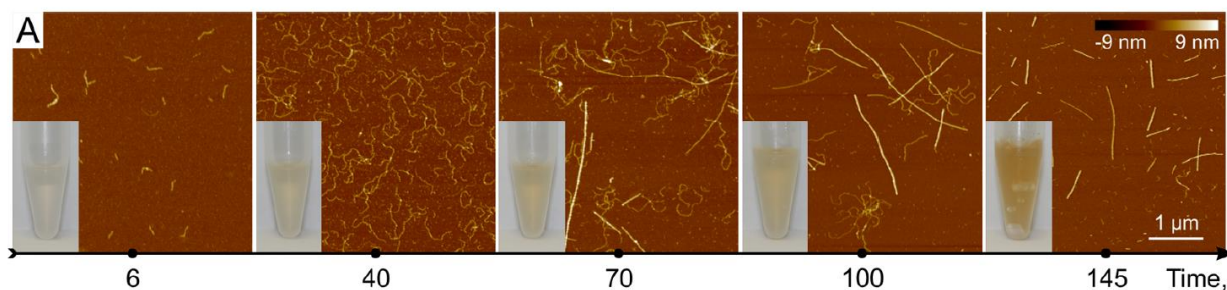


Рис.4. АСМ-изображения фибриллярных агрегатов БСА в процессе синтеза [38].

Необходимо отметить, что фибриллы БСА чаще всего выстраиваются именно в гибкие червеобразные агрегаты («worm-like fibrils»), которые не похожи на фибриллярные нити других белков [30,32]. Основное отличие таких червеобразных агрегатов состоит в наличии в фибриллах БСА помимо прочного каркаса из β -листов большого количества α -спиралей, которые выступают в качестве стерических блоков и препятствуют образованию структур более высокого порядка [30].

Как и для многих других глобулярных белков [43], в литературе можно найти различные условия для фибрилляции бычьего сывороточного альбумина. Например, работа [29] исследует агрегацию БСА при рН 2 и разной ионной силе (0.2-0.3 М) и времени нагревания до 10 часов (температура 60-65°C). Концентрации нативного белка при инкубации менялись от 1 до 8% по массе, и задача [29] состояла в нахождении некоторой критической концентрации белка, при которой происходит агрегация. Так как выше и ниже рН изоэлектрической точки и механизмы агрегации разнятся, то и концентрации перколяции оказываются различными. При рН 7 (выше изоэлектрической точки) это 5-6%, в то время как для агрегации БСА при рН 2 в растворе той же концентрации требуется существенное увеличение ионной силы. При рН 2 концентрация перколяции линейно уменьшается с увеличением ионной силы растворов. Для определения концентрации БСА после инкубации использовали турбидиметрию (при агрегации растворы белков обыкновенно мутнеют). Увеличение времени нагрева с 1 до 10 ч также приводило к удлинению фибриллярных агрегатов.

В работе [33] более подробно рассмотрен механизм агрегации бычьего сывороточного альбумина. Для этого был применен синтез в кислой среде рН 3 при температуре 65°C. При разных рН и ионных силах раствора, и при различном нагревании и времени инкубации механизмы образования фибрилл различны. Впрочем, фибрилляция может протекать различными путями, которые в процессе одного синтеза могут конкурировать между собой. При рН от 2 до 10 при всех значениях ионной силы и температуры наблюдался рост интенсивности флуоресценции тиофлавина Т с фибриллами с течением времени синтеза (рис. 3). Особенностью БСА по сравнению с другими амилоидогенными белками служит

полное отсутствие первой фазы – фазы задержки (рис. 3). В более ранних исследованиях [30] было обнаружено, что фаза задержки в случае БСА не появляется вне зависимости от концентрации белка или затравки. Соответственно, либо зародыш формируется очень быстро, либо наблюдаемый процесс агрегации не представляет собой классическую фибрилляцию, основанную на зародышеобразовании. В соответствии с этим наблюдением авторы [33] предложили вероятный молекулярный механизм фибрилляции БСА (рис. 5). При комнатной температуре и низком pH белок образует состояние расплавленной глобулы, что приводит к появлению свободных гидрофобных областей при низкой концентрации белка. Так формируются олигомеры, и при повышенной температуре облегчается конформационное преобразование α -спиралей и случайных клубков в β -структуры. Также авторы [33] варьировали величины ионной силы в растворах синтеза: скорость фибрилляции оказалась выше при больших ионных силах, так как добавление соли экранирует отталкивание между белковыми молекулами и облегчает агрегацию.

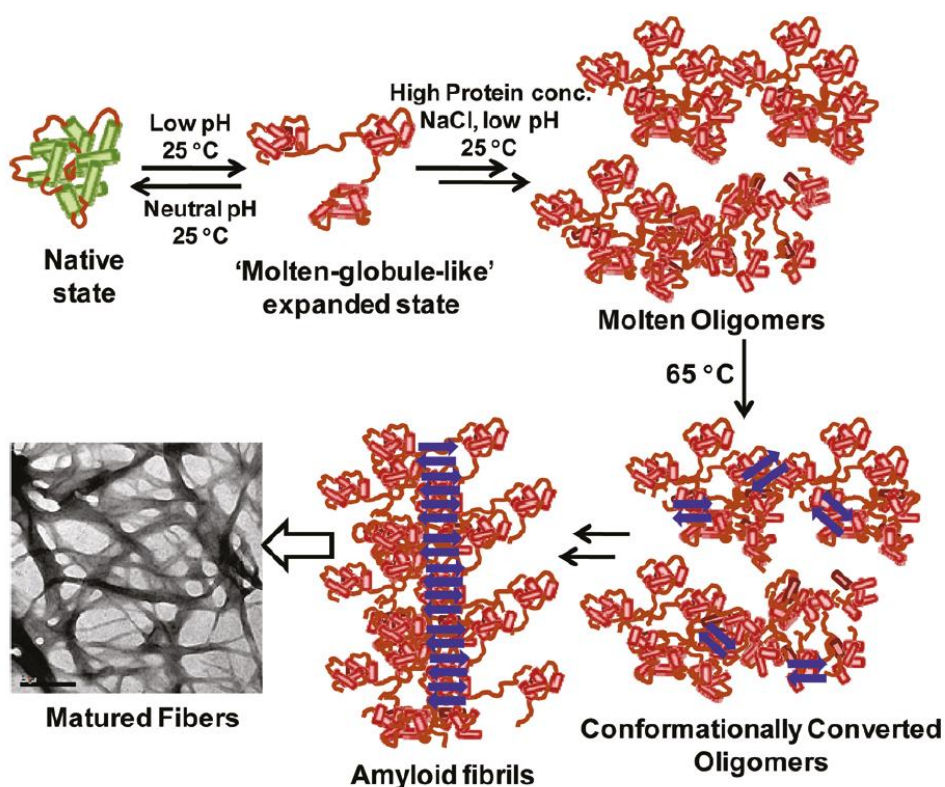


Рис.5. Механизм агрегации БСА в кислой среде [33].

Нестандартный вариант синтеза фибрилл бычьего сывороточного альбумина предложили индийские коллеги [32]. В данной работе показано, что можно

инициировать фибрилляцию БСА при помощи зародышей фибриллярных агрегатов лизоцима куриного белка. Утверждается, что присутствие в растворе уже сформированных β -структур существенно облегчает формирование фибрилл из сывороточных альбуминов и допускает их образование при физиологических условиях. Под физиологическими условиями понимают достаточно низкую температуру синтеза – $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (как видно из таблицы 1, в других случаях используются температуры выше $60\text{ }^{\circ}\text{C}$). При этом методика проведения эксперимента такая же – инкубация с перемешиванием в термостате, но с добавлением до 5% амилоидного посева лизоцима. Раствор зародышей фибрилл лизоцима куриного белка синтезировали отдельно: лизоцим растворяли в буфере для агрегации 0,5 М Глицин-HCl, pH 2.0 и инкубировали при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 7 дней при перемешивании. Так, наблюдалось значительное уменьшение времен синтеза агрегатов БСА по сравнению с фибриллами лизоцима. Сам синтез фибрилл БСА в присутствии зародышей предлагается осуществлять в том же буфере, но при pH 3. Длительность синтеза составляет 50 часов, причем по прошествии данного времени фибриллы лизоцима не претерпевают никаких изменений. Таким же способом исследователям [32] удалось получить фибриллы амилоидогенных белков в паре человеческий сывороточный альбумин/человеческий лизоцим. Для последнего синтеза авторы отмечают необходимость увеличения времени инкубации до 80 часов. Для сравнения авторы также рассмотрели кинетику образования фибрилл БСА без зародышей лизоцима. Согласно их данным, наиболее эффективными для проведения синтеза фибриллярных агрегатов БСА без добавок служат следующие условия: буфер глицин-HCl pH 3, $65\text{ }^{\circ}\text{C}$, перемешивание в течение 4 часов.

Значительно реже в литературе предлагаются методы синтеза фибрилл БСА при pH выше изоэлектрической точки. Одним из самых первых синтезов в данных условиях служит метод, рассмотренный в работе [30]. Используется инкубация нативного белка в буферном растворе Трис-HCl с pH 7.4 без перемешивания. Наиболее эффективным в данном случае указывается температурный режим от 65 до $70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Электронные микрофотографии полученных фибриллярных агрегатов представлены на рис. 6. Так, БСА способен образовывать хорошо упорядоченные агрегаты, богатые β -слоями, которые, тем не менее, не обладают такой же

структурной жесткостью, как классические фибриллы. Также в работе рассмотрен вариант синтеза фибрилл с заранее сформированным посевом зародышей фибрилл БСА. По сути, предварительный синтез зародышей сводится к укороченному времени синтеза в тех же условиях и последующей обработке ультразвуком для диспергирования агрегатов. Однако значительного ускорения агрегации в присутствии зародышей при 60–70 °С не наблюдалось. При 55 °С в отсутствие амилоидного посева агрегация не происходит, и добавление затравки не способно инициировать процесс фибрилляции.

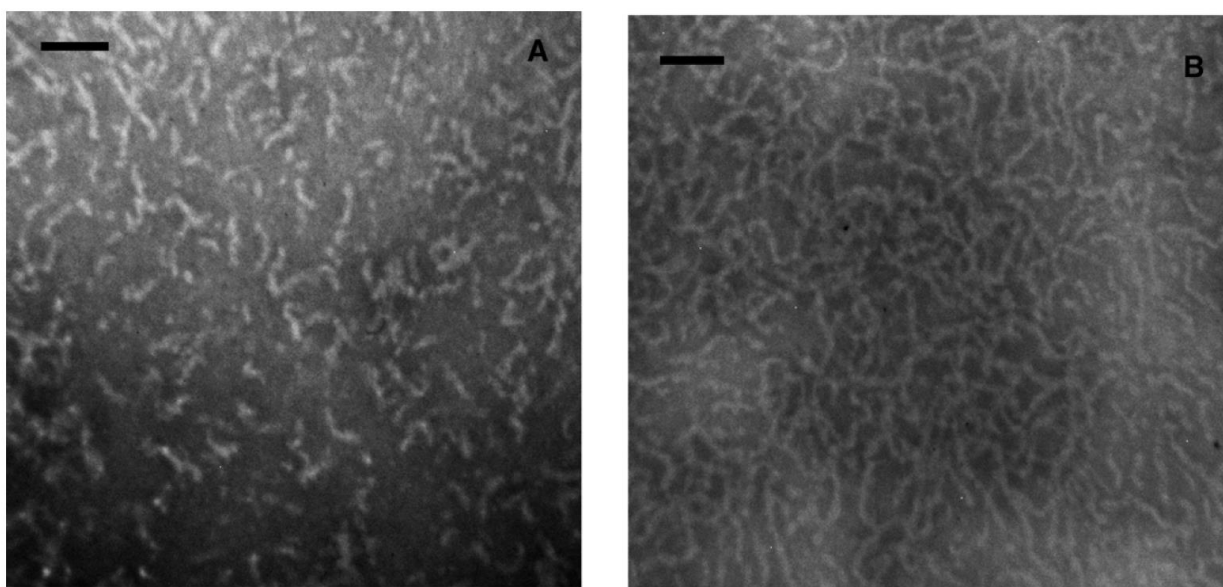


Рис.6. Изображения фибрилл БСА, приготовленных при 70 °С в течение (А) 2 и (В) 96 часов [30]. Масштаб 100 нм.

1.3.3. Ингибирование фибрилляции

Помимо вопросов характеристики и синтеза амилоидов на современном этапе развития медицины крайне важными считаются вопросы селективного ингибирования процессов фибрилляции. Так как агрегация белков – сложный многостадийный процесс, то невозможно представить лекарство, которое бы подействовало на определенной стадии и прекратило бы развитие болезни. Несмотря на это, медициной предложено 3 подхода к ингибированию агрегации амилоидогенных белков [26]. Первый подход – чисто биологический, это иммунотерапия, активирующая механизмы агрегативной чистки.

Второй подход – использование малых молекул. Малый размер позволяет активному веществу проникать внутрь фибрилл и разрушать водородные связи,

формирующие β -листы, и гидрофобные взаимодействия между аминокислотными остатками. Например, такой молекулой служит 4-аминофенол, ингибирующий фибрилляцию, но механизм его действия малоизучен.

Третьим подходом служит контролирование изменений в белке, ведущих к разворачиванию и, соответственно, к агрегации. В частности, предложено использовать производные индола: они связываются с нативным белком и предотвращают фибрилляцию, а индольное кольцо взаимодействует с гидрофобными остатками и разрушает уже сформированные протофибриллы. Также, соединения на основе акридина способны блокировать взаимодействие между двумя β -листами белка, предотвращая его превращение в фибриллы. Исследователями из разных стран предложено множество соединений, обладающих схожими механизмами ингибирования процесса: аргинин, некоторые амфифильные ПАВ, производные глюкозы, читотриоза (на основе этого олигосахарида уже разрабатывается лекарство). При этом любопытно, что комплекс додецилсульфата натрия с лизоцимом при малых концентрациях ПАВ способен к образованию фибрилл [26]. На процессы фибрилляции белков, в том числе и БСА, можно влиять при помощи веществ, содержащихся в цитоплазме – осмолитов [44]. Осмолиты – вещества, регулирующие физические свойства цитоплазмы. Они играют решающую роль в защите клетки путем поддержания её объема и водного баланса, а также повышения термодинамической стабильности белка. В частности, они помогают контролировать вязкость и ионную силу, что способствует поддержанию белков в нужной конформации. Фибрилляция БСА проводилась в фосфатном буфере с 0.1М NaCl при pH 7.4 в диапазоне температур 20-60 °C. Согласно данным флуоресценции с тиофлавином Т, наиболее эффективное превращение достигается при температуре 60 °C, а процесс термической агрегации БСА в данном случае оказался необратимым. Увеличение концентрации осмолитов в растворе инкубации приводит к ингибированию фибрилляции: достигается меньшее содержание β -листов и интенсивность флуоресценции с тиофлавином Т падает. Исследование кинетики фибрилляции выявило, что наиболее быстро прекращает фибрилляцию БСА гидроксипролин. В результате такой искаженной агрегации образуются аморфные агрегаты-олигомеры денатурированного БСА размером около 15 нм, что подтверждается методами

просвечивающей электронной микроскопии и динамического рассеяния света. На основании проведенных исследований предложен поэтапный механизм фибрилляции. Осмолиты-ингибиторы могут действовать на каждом из этапов, и ингибирование агрегации белка может быть достигнуто за счет: 1) стабилизации нативной структуры белка, 2) взаимодействия с любой из морфологий или сборок, образующихся в процессе фибрилляции.

1.4. Поверхностные свойства растворов нативного белка БСА

В большинстве случаев, белки за счет своего строения и наличия в своем составе групп разного заряда и разной степени гидрофобности способны адсорбироваться на границах раздела фаз. Они образуют устойчивые пленки различного строения в зависимости от свойств белка и внешних условий. В настоящее время исследования поверхностных свойств растворов белков достаточно востребованы из-за их биологической активности и способности формировать устойчивые пленки на границе раствор/воздух. Кроме того, добавление белков может служить надежным методом стабилизации дисперсных систем, например пен и эмульсий. Известно множество методов изучения белков в растворах, но не все дают исчерпывающую информацию о вышеупомянутых адсорбционных пленках глобулярных и неглобулярных белков. Чаще всего они исследуются посредством измерения межфазного натяжения, с использованием радиоактивных меток, эллипсометрией, отражением нейтронных и рентгеновских лучей, измерением ИК-отражения и спектроскопией кругового дихроизма [45]. Однако зачастую даже использование комбинации из нескольких вышеперечисленных методов неспособно предоставить достоверные результаты о конформации белковых молекул в поверхностном слое и степени их разворачивания из-за экспериментальных трудностей.

Наиболее информативными в случае рассмотрения адсорбционных пленок на поверхности растворов биомолекул представляются методы дилатационной поверхностной реологии. В работе [45] с помощью данных методов рассмотрены конформационные переходы в растворах неглобулярных и глобулярных белковых молекул и описан возможный процесс формирования монослоя в растворах белков.

Динамическая поверхностная упругость растворов глобулярных белков монотонно возрастает с течением времени и приходит к некоторому постоянному значению. Постоянные значения могут колебаться даже для растворов одного белка при изменении водородного показателя раствора: глобулы меняют форму, заряд и размер. В частности, для БСА известны пять конформеров [34], три из которых имеют схожие с нейтральным раствором кинетические кривые поверхностной упругости, а остальные два появляются в сильнокислой и сильнощелочной средах и демонстрируют более медленное достижение равновесия до значений примерно вдвое ниже. Известно, что добавление неограниченных солей увеличивает ионную силу раствора и, как следствие, сильно ускоряет адсорбцию полиэлектролитов за счет экранирования электростатического отталкивания между адсорбирующимися молекулами и поверхностью жидкости. Таким образом, на поверхностные свойства раствора глобулярного белка в значительной степени влияет изменение ионной силы раствора.

Действие денатурирующих агентов может сильно менять динамические поверхностные свойства адсорбционных слоев глобулярных белков [34,46]. Показано, что малые добавки сильных денатурантов действуют в большей степени как неорганические электролиты, но при увеличении их концентрации наблюдается ожидаемое различие свойств: увеличивается скорость адсорбции белка и устанавливаются более высокие поверхностные давления, по сравнению с добавкой индифферентного электролита. Далее, при превышении некоторого критического значения концентрации денатуранта свойства поверхности резко меняются и возникает локальный максимум на кинетической зависимости динамической поверхностной упругости. Это говорит о смене механизма адсорбции белка и его более плотной упаковке в поверхностном слое. Этот факт указывает на сходство раствора денатурированного белка с растворами неглобулярных белков. Третичная структура белка разрушена, и цепочки приобрели большую подвижность, что позволило белку образовать дальнюю область поверхностного слоя с петлями и хвостами, погруженными в объемную фазу. Что характерно, дальнейшее увеличение концентрации денатурирующего агента не вызывает сильных изменений в кинетике адсорбции, а значит третичная структура белка при критическом значении концентрации разрушается полностью.

На зависимости поверхностной упругости от давления появляется всего один максимум, отвечающий формированию хвостов и петель в объемной фазе.

Поверхностным свойствам водных растворов глобулярного белка БСА посвящена работа [34]. Методами дилатационной поверхностной реологии изучено поведение БСА в поверхностном слое при различных значениях рН и его денатурация посредством гидрохлорида гуанидина. Были исследованы пять растворов БСА, соответствующих пяти известным конформерам данного белка, существующих при различных уровнях рН. Высокая динамическая поверхностная упругость исследуемых растворов объясняется формированием в поверхностном слое плотной структуры и сетки из сильно взаимодействующих глобулярных молекул. Далее, при добавлении денатурирующего агента появляются локальные максимумы на кинетических зависимостях поверхностной упругости, что, как говорилось ранее в работе [45], свидетельствует о смене механизма адсорбции. При этом определено, что денатурация белка в поверхностном слое достигается при меньшей концентрации соли, чем требуется для этого процесса в объеме раствора. Изменение ионной силы растворов сильно сказывается на форме кинетических зависимостей динамической поверхностной упругости для различных конформеров, что свидетельствует о разворачивании белка на поверхности, которое происходит в разы быстрее, чем адсорбция белковых глобул. Весьма информативными оказываются также и полученные зависимости поверхностного давления от времени, которые указывают, что по достижении значения поверхностного давления 12 мН/м молекулы образуют петли и хвосты. Таким образом, авторами статьи показана связь между поверхностными реологическими свойствами растворов БСА и структурой, и формой нахождения белковых молекул в поверхностном слое, от адсорбции жестких глобулярных структур до их разворачивания, заполнения площади поверхности и образования петель и хвостов.

1.5. Нативный белок лизоцим куриного белка

Вторым объектом нашего исследования служит водорастворимый глобулярный белок лизоцим куриного белка. Глобула лизоцима состоит из одной полипептидной цепи массой 14.3 кДа [47], содержащей 129 аминокислотных остатков с четырьмя внутримолекулярными дисульфидными мостиками. Помимо

значительно меньшей молекулярной массы, лизоцим отличается и изоэлектрической точкой (таблица 2): она смещена в щелочную область рН 11.3 [26].

Глобула лизоцима по форме близка к форме эллипса, потому при адсорбции на поверхности раздела фаз белок может находиться в разных ориентациях. Если главная полуось эллипса параллельна поверхности, такая ориентация называется «side-on». В противном случае, когда главная полуось перпендикулярна границе раздела, говорят о формировании жидко-растянутого слоя и ориентации «end-on». Изменение ориентации глобулы отражается на толщине поверхностного слоя и поверхностном натяжении в системе [48].

Таблица 2. Сравнение некоторых свойств белков согласно данным работы [47].

Некоторые характеристики исследуемых белков	Бычий сывороточный альбумин	Лизоцим куриного белка
Число аминокислотных остатков	583	129
Молекулярная масса, г/моль	67 000	14500
Процент α -спиралей	50	44
Число дисульфидных мостиков в молекуле	17	4
Третичная структура	Глобулярная	Глобулярная
Максимальная температура денатурации, $^{\circ}\text{C}$ (с привязкой к рН)	65 (рН 6.4)	72 (рН 7.6)

Как упоминалось ранее, лизоцим, также как и БСА, – амилоидогенный белок. Человеческий лизоцим, с которым лизоцим куриного белка имеет более 60% общей аминокислотной последовательности, вызывает наследственный амилоидоз. Это заболевание сугубо наследственное, причем передается по аутосомно-доминантному механизму (пациенты гетерозиготны по данному гену) [23]. К

счастью, не все типы лизоцима в организме пациента способны к агрегации и медицине известны наиболее подверженные мутациям типы белков. Данный вид амилоидоза протекает тяжело и сопровождается отложением фибрилл лизоцима в большом количестве в почках, желудочно-кишечном тракте, лимфатических узлах, кровеносных сосудах, селезенке и печени.

В настоящее время лизоцим – один из самых популярных белков, используемых химиками во всем мире. Этот белок известен с 1922 года как антибактериальный компонент и потому всесторонне изучен. Четвертичная структура лизоцима куриного белка, его форма и функции очень схожи с человеческим лизоцимом, а его широкая доступность и хорошая растворимость говорят в его пользу как подходящего объекта для исследования фибрилл.

1.5.1. Поверхностные свойства лизоцима куриного белка

Адсорбция нативного белка лизоцима на различных поверхностях раздела фаз исследуются на протяжении последних 40 лет. Рассмотрим одну из ранних работ по адсорбции лизоцима куриного белка на межфазной границе раствор-воздух [49]. Здесь применяется радиометрический метод детектирования поверхностно-активных веществ, каковыми служат глобулы белков. В основе этого метода лежит пропорционально меньшее излучение β -радионуклида в толще воды по сравнению с излучением на поверхности. Так, адсорбированные меченые вещества вносят пропорционально больший вклад в излучение, фиксируемое детектором над раствором. Метод позволяет получить информацию о скоростях адсорбции и десорбции, однако внесение радиоактивной метки в молекулу белка влечет за собой изменение конформации и гидрофобности. Авторы [49] получили изотерму адсорбции лизоцима на поверхности раствора фосфатного буфера с pH 7, охватывающую шесть порядков по объемной концентрации белка (рис. 7).

Изотерма адсорбции лизоцима имеет 3 характерные области, как показано на рис. 7. Авторы [49] предложили трехстадийный механизм адсорбции глобулярного лизоцима, в соответствии с этими тремя областями. При низких объемных концентрациях белка (область 1) величина адсорбции увеличивается до тех пор, пока не достигается плато 1.6 мг/м^2 при концентрации около 2×10^{-6} массовых процентов. Молекулы белка располагаются в поверхностном слое в ориентации

“side-on” (большая полуось глобулы параллельна поверхности). Плато соответствует насыщению монослоя и распространяется до 1×10^{-5} массовых процентов в объеме. Дальнейшее увеличение поверхностной концентрации белка в начале области 2 указывает на изменение механизма адсорбции ($1-2 \times 10^{-5}$ массовых процентов). Рост поверхностной концентрации возобновляется, так как молекулы в уже насыщенном поверхностном монослое изменяют ориентацию с side-on на end-on (большая полуось перпендикулярна поверхности). Дальнейший рост поверхностной концентрации на этапе 3 обусловлен протеканием конкурирующих процессов насыщения монослоя и образования разреженного второго слоя, ориентация молекул в котором произвольна.

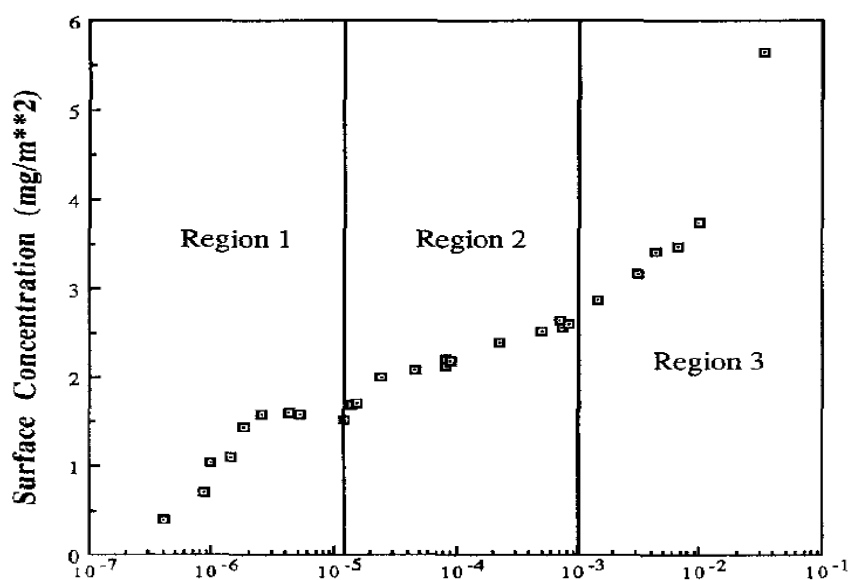


Рис.7. Изотерма адсорбции лизоцима по данным работы [49].

Необходимо отметить, что данная модель достаточно примитивна, так как исключает из рассмотрения денатурацию белка в поверхностном слое. На данный момент большинство авторов склоняются к тому, что белки в процессе адсорбции претерпевают изменение конформации и частично денатурируют, что подтверждается экспериментальными данными [34,45,46,50].

Что касается обратимости адсорбции на границе жидкость-газ, то, согласно данным работы [49], молекулы лизоцима, адсорбированные в первом слое, практически не обмениваются с молекулами лизоцима в объеме раствора. Также авторы привели данные по кинетике адсорбции лизоцима, равновесие для большинства концентраций достигалось в среднем за 7 часов, поверхностное

давление достигало 20 мН/м при объемной концентрации 10^{-2} массовых процентов [51].

Современные взгляды на адсорбцию лизоцима представлены в работе [46]. В рамках данного рассмотрения изучены поверхностные свойства растворов лизоцима в смеси с денатурирующими агентами: гидрохлоридом гуанидина и мочевиной. Основные закономерности поведения глобулярных белков в присутствии денатурантов описаны ранее в разделе 1.4, здесь отметим только конкретные результаты касательно адсорбции лизоцима на поверхности водных растворов. В поверхностном слое растворов мочевины глобулы лизоцима постепенно переходят в состояние расплавленных глобул, как это происходит и в объемной фазе при повышении концентрации денатурирующего агента. Однако при адсорбции нативного белка на границе раздела фаз такой денатурации не происходит. Авторы [46] связывают это с особой стабилизирующей ролью дисульфидных мостиков. В молекулах других белков они соединяют соседние аминокислотные остатки и тем самым не сильно ограничивают гибкость развернутых макромолекул.

1.5.2. Получение и поверхностные свойства амилоидных фибрилл лизоцима

Амилоидные фибриллы лизоцима достаточно жесткие, состоят из 4-6 протофиламентов и имеют длину порядка нескольких микрометров. Они хорошо изучены и имеют стандартные методы получения [26,43]. Большинство методов синтеза амилоидных фибрилл лизоцима куриного белка описано в обзоре [43], где разнообразные методики занесены в удобные для сравнения таблицы.

В нашей работе синтез фибрилл лизоцима проводился по методике, предложенной в [53]. Данная работа посвящена непосредственно синтезу фибрилл лизоцима куриного белка, продукты синтеза были исследованы атомно-силовой микроскопией, статическим рассеянием света, спектроскопией кругового дихроизма и гель-электрофорезом в полиакриламидном геле. При помощи статического рассеяния света оценили, что быстрее всего в условиях нагревания до 57°C агрегация проходит при pH 2, по принципу: чем ниже pH, тем менее стабилен белок. Более интенсивное нагревание до 80°C приводит к немедленной агрегации,

причем вместе с фибриллами образуются также сферические и аморфные агрегаты (при рН 3 и 4 исключительно сферические), заметные на АСМ-изображениях. Показано, что средняя длина фибриллы, полученной данным методом, больше 5 микрометров. Наблюдаются преимущественно толстые фибриллы, состоящие из более коротких субъединиц длиной около 30 нм. Данные спектроскопии кругового дихроизма также свидетельствуют о наиболее эффективном формировании β -структур при нагревании до 57 °С при рН 2. Чтобы установить, идет ли гидролиз лизоцима при рН 2, к полученным дисперсиям был применен метод гелелектрофореза. Как оказалось, гидролиз действительно протекает, но не оказывает критического воздействия на процесс фибрилляции. В целом, для всех рассмотренных температур ниже 80 °С наблюдалась предшествующая агрегации фаза задержки, её длительность регулируется концентрацией нативного белка.

Благодаря обширному запасу теоретических знаний об адсорбции нативного лизоцима куриного белка на межфазных поверхностях стало возможным исследовать поверхностные свойства агрегатов лизоцима, в том числе и амилоидных фибрилл.

В отличие от БСА, в литературе есть несколько работ, посвященных поверхностным свойствам растворов фибриллярных агрегатов лизоцима на границах раздела фаз [52]. Так, в работе [52] рассмотрены стабилизирующие свойства амилоидных фибрилл лизоцима на межфазной границе вода-гексадекан. Нужно обратить внимание на интересный результат их синтеза. Он проводился при рН 2 и непрерывно перемешивался магнитной мешалкой. Опыты с разной скоростью перемешивания обнаружили различие между полученными агрегатами. При меньшей скорости вращения мешалки получили длинные фибриллы, а при большей – короткие и жёсткие. Так авторы изучали обе морфологии фибрилл в сравнении с нативным лизоцимом. Оказалось, присутствие амилоидов на межфазной границе не так сильно понижает межфазное натяжение, как наличие там глобул лизоцима. Также согласно данным этой работы модуль дилатационной поверхностной упругости для растворов с фибриллами оказывается несколько выше, чем для мономеров при рН = 7 и рН = 3,5.

2. Экспериментальные методы и методика измерения

Для приготовления всех растворов использовалась тридистиллированная вода для уменьшения содержания возможных поверхностно-активных примесей. Работы проводились при 23 °С, рН растворов регулировалось малыми добавками концентрированной соляной кислоты марки ХЧ (Вектон, Россия). Необходимая ионная сила была достигнута при помощи предварительно прокаленной поваренной соли (Вектон, Россия).

2.1. Получение амилоидных фибрилл

В данной работе в лабораторных условиях были синтезированы амилоидные фибриллы двух глобулярных белков – бычьего сывороточного альбумина и лизоцима куриного белка.

2.1.1. Получение амилоидных фибрилл бычьего сывороточного альбумина

Успешный синтез проведен по методике, предложенной в [30]. Для предварительной очистки 1.25 г белка бычьего сывороточного альбумина (Sigma-Aldrich, M_w 66000 кДа) растворили в 10 мл буфера Трис-НСl (рН 7.4, 20 мМ) и оставили в холодильнике для растворения. Затем переместили раствор в подготовленные диализные мешочки (Sigma-Aldrich) и провели диализ в течение 3 суток при температуре 4 °С. Раствором для диализа также служил буферный раствор Трис-НСl рН 7.4, его меняли после первого часа, затем через 3 часа, затем один раз в сутки. В процессе диализа объем раствора увеличился до 15 мл, его отфильтровали через фильтр МФАС-Б4 (Владипор, Россия). Пермеат поместили в мерную колбу и довели объем раствора буфером Трис-НСl рН 7.4 до 50 мл (итоговая концентрация белка составила около 2.5 г/л). Колбу плотно закрыли и установили в термостате без перемешивания при температуре 70 °С. Инкубацию раствора проводили в течение 96 часов, затем помещали колбу в лед для прекращения агрегации.

Раствор приобрел заметную вязкость и помутнел (рис. 8). Его хранили в холодильнике при температуре 4 °С, приготовленная дисперсия расслаивается по истечении 3 месяцев после синтеза. Приготовленные фибриллы лучше хранятся

разбавленными в воде с рН 2 (добавили HCl), так их дисперсия устойчива более 5 месяцев. Все эксперименты по измерению поверхностных свойств проводились в течение месяца после синтеза агрегатов. Качество дисперсии контролировалось с помощью АСМ.

Очистку фибриллярных агрегатов проводили в буфере приготовления Трис-HCl. Для дальнейшего исследования фибриллярный гель после центрифугирования решили растворить в разных условиях: в воде с рН 2 или в исходном буфере. Так, 1 мл дисперсии растворяли в 2.5 мл воды с рН 2 или буфером Трис-HCl. Было замечено, что процесс растворения фибриллярного геля проходил достаточно медленно, потому перед последующими необходимыми операциями ждали сутки и более.



Рис.8. Полученные растворы фибриллярных агрегатов БСА (слева) и лизоцима (справа) после синтеза.

2.1.2. Другие методы синтеза амилоидов БСА

Были проведены попытки получения фибрилл БСА другими методами (таблица 1). Они окончились неудачей, что указывает на сложность образования амилоидных агрегатов из БСА.

Согласно работам [38,42] образования амилоидных фибрилл бычьего сывороточного альбумина можно добиться инкубацией белка при высокой температуре 90°C. Перед приготовлением провели процедуру диализа 6%-го раствора БСА в воде с рН 2, затем отфильтровали. Полученный раствор инкубировали в течение 40 часов, затем поместили в лёд. Для проверки результата синтеза нанесли образцы АСМ, на них видно, что образовались только короткие продолговатые агрегаты (рис. 9). Согласно данным [38], похожие агрегаты

формировались за первые 4 часа синтеза (рис. 4). Попытка увеличить время инкубации до 100 часов в нашем случае не привела к улучшению результата (рис. 9Б).

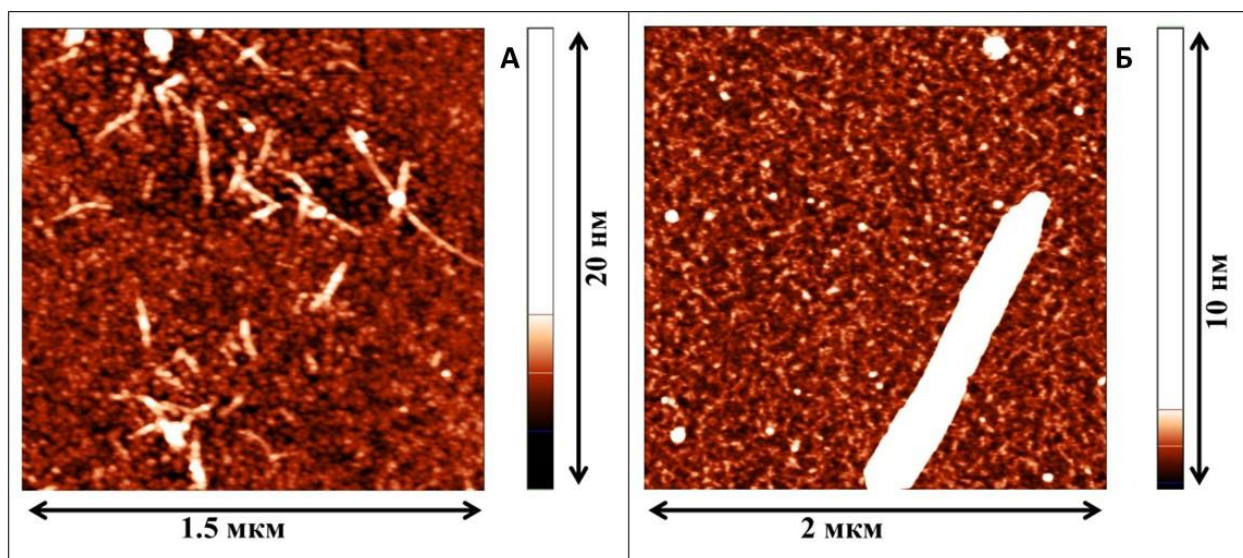


Рис.9. Агрегаты БСА, полученные по методике [38]. А – после 44 часов инкубации, Б – после 100 часов.

Следующим способом провели агрегацию БСА в присутствии зародышей фибрилл лизоцима, опираясь на статью индийских коллег [32]. Для этого приготовили раствор БСА с концентрацией 1 мМ в фосфатном буфере рН 7, диализ же провели в буфере глицин-НСl рН 3. Далее, к раствору прибавили 300 мкл полученной ранее дисперсии фибрилл лизоцима (приготовление 2.1.2) и довели объем колбы до 50 мл. Инкубацию провели при температуре 37 °С с перемешиванием 50 часов. По полученным АСМ, заметной агрегации белка не произошло, а фибриллы лизоцима сохранились. Продление эксперимента ещё на 4 суток не дало результатов.

Кроме предыдущего способа, в работе [32] представлен вариант синтеза без добавок фибриллярных агрегатов лизоцима. Отличие состоит в повышенной температуре инкубации – 65 °С и отсутствии перемешивания. Поэтому приготовленный и очищенный диализом раствор БСА (1 мМ) в фосфатном буфере рН 7 разбавили в 10 раз буфером глицин-НСl рН 3 и установили в термостат с заданной температурой на 44 часа. К сожалению, данный вариант синтеза также оказался нерезультативным.

2.1.3. Получение амилоидных фибрилл лизоцима куриного белка

Как указывалось ранее, лизоцим – хорошо исследованный белок, и в литературе встречается много способов приготовления его фибриллярных агрегатов. Для предотвращения влияния посторонних веществ, остающихся в растворе после синтеза, в нашей работе использовался метод, включающий минимальные их добавки.

1 грамм лизоцима куриного белка (Hen Egg White Lysozyme фирмы Sigma Aldrich, Германия, с молекулярной массой 14300 а. е. м. и чистотой более 90%) растворили в воде с рН 2. Затем, как в случае БСА, раствор подвергли диализу, с тем только отличием, что в качестве раствора для диализа использовалась вода с рН 2. Во время диализа происходило естественное разбавление в полтора раза. Очищенный раствор отфильтровали через мембрану МФАС-Б4 (Владипор, Россия).

Непосредственно синтез фибрилл лизоцима проводили в термостате при температуре 58 °С при непрерывном перемешивании. Инкубация проводилась без остановки на протяжении 14 суток. По истечении этого срока колбу поместили в лёд, наблюдали образование опалесцирующего геля с большой вязкостью (рис. 8). Фибриллы лизоцима обладают повышенной стабильностью, поэтому они хранились при температуре 4 °С весь период исследований и не претерпели изменений.

2.2. Очистка дисперсий фибриллярных агрегатов

В процессе синтеза не все молекулы белка агрегируют, они могут сохраняться или разрушаться, оставляя полипептидные цепочки различной длины. В литературе пока нет однозначного ответа на вопрос о методах очистки растворов фибрилл от несвязанных в агрегаты молекул белка и побочных продуктов синтеза без разрушения структуры. Для исследования кинетики адсорбции фибрилл важно понимать, что на поверхности раствора отсутствуют примеси, которые могут вносить существенные изменения в строение и свойства поверхностного слоя адсорбированных фибрилл. Обычно в качестве способов очистки растворов белковых агрегатов предлагается их фильтрация, диализ и центрифугирование.

Подбор размера пор фильтра или условий центрифугирования (скорость, время) для максимальной очистки агрегатов с сохранением их характеристик представляет также одну из важных задач данной работы.

2.2.1. Очистка фибрилл бычьего сывороточного альбумина

Нам удалось найти оптимальный метод очистки фибриллярных агрегатов БСА – это центрифугирование в течение часа при 55000g. Центрифугирование проводилось на оборудовании ресурсного центра СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий». В результате часть раствора образовала очень малое количество плотного геля на дне пробирки. Разбавление и дальнейшее хранение фибрилл БСА осуществлялось в двух растворах: с одной стороны, фибриллы были приготовлены в буфере при pH 7,4, но, как оказалось, в данном случае они не устойчивы во времени. С другой стороны, опыт других амилоидных агрегатов показывает, что большинство из них стабильны и хорошо хранятся при pH 2. Пробирки после центрифугирования разделили на 2 группы, чтобы провести растворение в pH 2 или в Трис-HCl буфере. В каждой пробирке раствор над гелем слили, а поверхность геля и стенки пробирок промыли либо буфером, либо водой с pH 2. К осадку прилили 2 мл соответствующего растворителя и оставили расходить на несколько суток. Необходимо отметить, что в pH 2 гель диффундирует немного быстрее.

Использование центрифугирования в некоторых случаях может привести к разрушению агрегатов (раздел 3.2.1), и весь осадок будет образован кусочками фибрилл. Поэтому данную процедуру нужно проводить с большой аккуратностью, начиная от переноски раствора и заканчивая растворением геля, не допуская встряхивания.

При попытке проведения менее интенсивного центрифугирования при 16000g ожидаемого разделения не произошло. Кроме того, мы пробовали и менее деструктивные методы, а именно фильтрацию. Были проведены пробные опыты с мембраной 50 нм МФАС-Б1 (Владипор, Россия) с промывкой буфером и без. Предполагалось сконцентрировать фибриллярный гель на поверхности мембраны, а затем аккуратно смыть его буферным раствором. Однако, в ретентате фибрилл не обнаружилось.

2.2.2. Очистка фибрилл лизоцима куриного белка

Очистка дисперсии фибрилл лизоцима проводилась центрифугированием в течение 7 часов при скорости 16000 g. В результате, на дне центрифужной пробирки образовалось примерно такое же количество плотного геля, как в случае очистки фибриллярных агрегатов БСА. Гель был растворен в воде с pH 2.

Также была опробована трехкратная очистка с растворением и центрифугированием. Данные агрегаты оказались гораздо более прочными по сравнению с фибриллами БСА – ни центрифугирование, ни последующая интенсивная встряска пробирки при растворении геля не приводили к их разрушению.

2.3. Анализ синтезированных фибрилл

В основном, подтверждением положительного результата синтеза служат АСМ-изображения амилоидов. По ним также можно рассчитать среднюю длину и толщину фибриллярных агрегатов и увидеть их структуру.

2.3.1. Метод атомно-силовой микроскопии

В основе работы атомно-силового (зондового) микроскопа лежит взаимодействие острия иглы с поверхностью образца. В зависимости от силы этого взаимодействия возникает пропорциональное отклонение предварительно откалиброванного кантилевера от горизонтального положения. Система обратной связи фиксирует эту величину. В каждой точке образца игла перемещается перпендикулярно поверхности так, чтобы уравнивать значение параметра взаимодействия с заранее откалиброванной величиной. Система детектирования построена таким образом, что излучение полупроводникового лазера фокусируется на зондовом датчике, и отраженный пучок лучей попадает в центр чувствительной области фотоприемника. В зависимости от величины отклонения балки, будут задействованы разные области фотоприемника.

Метод АСМ мы использовали не только для визуализации продуктов синтеза, но и для определения морфологии и состава поверхностных пленок исследуемых растворов. В первом случае капля разбавленного раствора помещалась на свежесколотую поверхность слюды, избыток раствора аккуратно

удалялся фильтровальной бумагой, пластинка помещалась в эксикатор для сушки. При изучении морфологии и состава поверхностного слоя пленку с водной поверхности на поверхность слюды перемещали с помощью метода Ленгмюра-Шеффера. Предварительно очищенную слюдяную пластинку опускали параллельно плоскости поверхности, и, после касания жидкости, аккуратно поднимали, переворачивали образец и снимали излишек водного раствора с помощью фильтровальной бумаги. Исследования атомно-силовой микроскопией проводились в ресурсном центре СПбГУ «Центр диагностики функциональных материалов для медицины, фармакологии и электроники».

2.3.2. Метод гравиметрии

Гравиметрия – один из старейших и наиболее точных методов количественного химического анализа [54]. Он совмещает простоту исполнения и прецизионность. Гравиметрия основана на точном измерении массы образца до и после нагрева до некоторой допустимой температуры. Так можно выяснить массу летучего компонента и/или рассчитать точную концентрацию вещества.

В нашем случае метод гравиметрии использовался именно для определения концентрации вещества в продукте синтеза. Для этого 1 мл дисперсии амилоидов при помощи дозатора наливали в предварительно взвешенный бюкс и повторно взвешивали с веществом. Затем его помещали в нагретый до 60 °С сушильный шкаф, снабженный вентилятором, и жидкость выпаривалась в течение суток, после чего емкость повторно взвешивали. Полученное в итоге значение массы в граммах – масса сухого вещества в заданном объеме раствора – позволяет определить концентрацию фибрилл и сухого вещества буфера. Затем производился пересчет для вычета массы буфера и уточнения концентрации агрегатов. Для контроля полноты выпаривания бюкс с веществом помещался в те же условия ещё на одни сутки. Однако повторное взвешивание показало, что весь растворитель в бюксе испарился в течение первых суток эксперимента.

2.3.3. Микроскопия при угле Брюстера (БАМ)

Для определения макроскопической структуры поверхности используется микроскопия под углом Брюстера. Угол Брюстера – угол падения света, при

котором не происходит его отражение, если свет направлен на поверхность чистого растворителя. Любые изменения оптических свойств или свойств поверхности на границе раздела фаз приводят к отражению. Это явление лежит в основе микроскопии при угле Брюстера. Например, если на поверхности жидкости сформирован монослой, то закон Брюстера не выполняется, и можно наблюдать слабое отражение. Если увеличить интенсивность падающего луча, то возрастёт контрастность между покрытой и непокрытой областями поверхности.

В нашем случае при помощи микроскопии под углом Брюстера осуществлялась визуализация адсорбционных и нанесенных пленок фибриллярных агрегатов белков на установке VAM1 (Nanofilm Technology, Germany). Для этого в ванне Ленгмюра с одним барьером создавали исследуемую пленку (нанесением или адсорбцией) в нужном растворе. Далее в контакт с жидкостью приводили пластинку Вильгельми (раздел 2.4.1), подвешенную на микровесы. Это позволяло контролировать поверхностное натяжение раствора. На дно ванны Ленгмюра помещали черную пластинку для поглощения преломленного луча. Над ванной располагалась камера, подключенная к ПК, поэтому при включении лазера изображение поверхности было представлено на экране ПК в режиме live on. При необходимости поверхность искусственно деформировали путем движения барьера (сжатие-растяжение поверхностного слоя) или нарушали целостность слоя острой палочкой.

2.4. Методы поверхностной реологии

Поверхностная реология – наука, которая изучает влияние механических воздействий на структуру и свойства поверхностного слоя. В методах поверхностной реологии в результате деформаций поверхности жидкости возникает отклик системы, который измеряется с помощью различных методов коллоидной химии и позволяет рассчитать основные реологические параметры поверхностного слоя. К настоящему моменту вышло достаточно много обзорных работ, посвященных применению поверхностной реологии к изучению сложных жидкостей [55–60]. Существует два вида деформаций поверхности, а именно, деформация всестороннего растяжения-сжатия (дилатация) и деформация сдвига. В данной работе методами дилатационной поверхностной реологии получены

кинетические зависимости фундаментального поверхностного свойства – комплексной дилатационной динамической поверхностной упругости растворов фибриллярных агрегатов и нативных белков (БСА и лизоцима), и на основе полученных данных рассмотрены основные релаксационные процессы в поверхностных слоях этих систем, предложена их вероятная структура.

При определении комплексной динамической поверхностной упругости $\varepsilon(\omega)$ механические деформации поверхности осуществлялись посредством гармонических колебаний площади поверхности растворов веществ с помощью подвижных барьеров δA , а отклик системы фиксировался с помощью измерения поверхностного натяжения $\delta\gamma$. Если A_0 – начальная площадь поверхности, то комплексную динамическую поверхностную упругость можно записать как:

$$\varepsilon(\omega) = \frac{A_0 \delta\gamma}{\delta A}, \quad (1)$$

где ω – угловая частота.

Как комплексная величина, динамическая поверхностная упругость состоит из действительной и мнимой частей:

$$\varepsilon = \varepsilon_{Re} + i\varepsilon_{Im} \quad (2)$$

Мнимая часть динамической поверхностной упругости появляется, когда между деформацией площади поверхности жидкости и откликом системы – колебаниями поверхностного натяжения в данном случае, возникает фазовый сдвиг:

$$\varepsilon_{Im} = |\varepsilon| \sin\varphi, \quad (3)$$

где φ – сдвиг фазы между колебаниями площади поверхности и поверхностного натяжения. Если данный фазовый сдвиг достаточно велик, то мнимая часть упругости также имеет отличные от нуля значения и пленка на поверхности жидкости называется вязкоупругой. Для многих систем, однако, величина φ незначительна и поверхностную пленку можно считать чисто упругой.

2.4.1. Определение поверхностного натяжения методом пластинки Вильгельми

В данном методе измеряется сила, необходимая для удержания пластинки малой толщины (пластинки Вильгельми) в контакте с жидкостью. Пластика 1 (рис. 10) подвешивается на электронные весы (KSV Nima, Finland) так, чтобы её нижняя грань располагалась строго параллельно поверхности и вровень с ней, тогда возле края пластинки образуются мениски, устойчивые на протяжении всего опыта. Показания прибора – поверхностное натяжение – зависят и от свойств самой пластинки, от её материала и периметра нижней грани. В нашем случае использовалась металлическая пластинка, градуированная по тридистиллированной воде, так как поверхностное натяжение воды известно и равно 72,8 мН/м при 25 °С.

2.4.2. Определение динамической поверхностной упругости методом осциллирующего барьера

Измерение динамической поверхностной упругости методом осциллирующего барьера включает в себя измерение поверхностного натяжения исследуемой жидкости при дилатационных деформациях поверхности.

Во всех измерениях значения мнимой части поверхностной упругости не превосходили 5% от значений действительной части и в работе не приводятся, и на всех рисунках представлены значения модуля упругости. Точность определения данной величины составляет 3%.

Измерения проводились на межфазном сдвиговом реометре Interfacial Shear Rheometer (KSV Nima, Finland). Прибор состоит из фторопластовой кюветы (ванны Ленгмюра) с известным объемом и двух фторопластовых барьеров 2 (рис. 10), соприкасающихся с поверхностью жидкости. С их помощью можно менять площадь поверхности внутри кюветы, и, в частности, создавать её колебания. Автоматизированное управление перемещениями барьера позволяет задать определенные амплитуду и частоту. Обязательное условие метода осциллирующего барьера – частота подобных колебаний фторопластового барьера не должна превышать 0.2 Гц, тогда длина продольной поверхностной волны,

вызываемой деформацией поверхности жидкости, будет иметь значение много больше рабочей длины кюветы. В данной работе амплитуда составляла 2 или 5% от площади поверхности измерительной кюветы, частота – 0.03 Гц, потому колебания поверхностного натяжения можно считать однородными. Варьирование амплитуды не приводило к существенным изменениям поверхностных свойств. Колебания барьеров вызывают изменение поверхностной концентрации вещества и, следовательно, поверхностного натяжения $\delta\gamma$. Таким образом, одновременное получение данных о фазе изменения поверхностного натяжения, площади поверхности и амплитуде делает возможным расчет комплексной динамической поверхностной упругости ϵ по уравнению (3).

Для устранения примесей малорастворимых поверхностно-активных веществ и частиц пыли перед каждым измерением поверхность жидкости тщательно очищалась пипеткой, соединенной с водоструйным насосом.

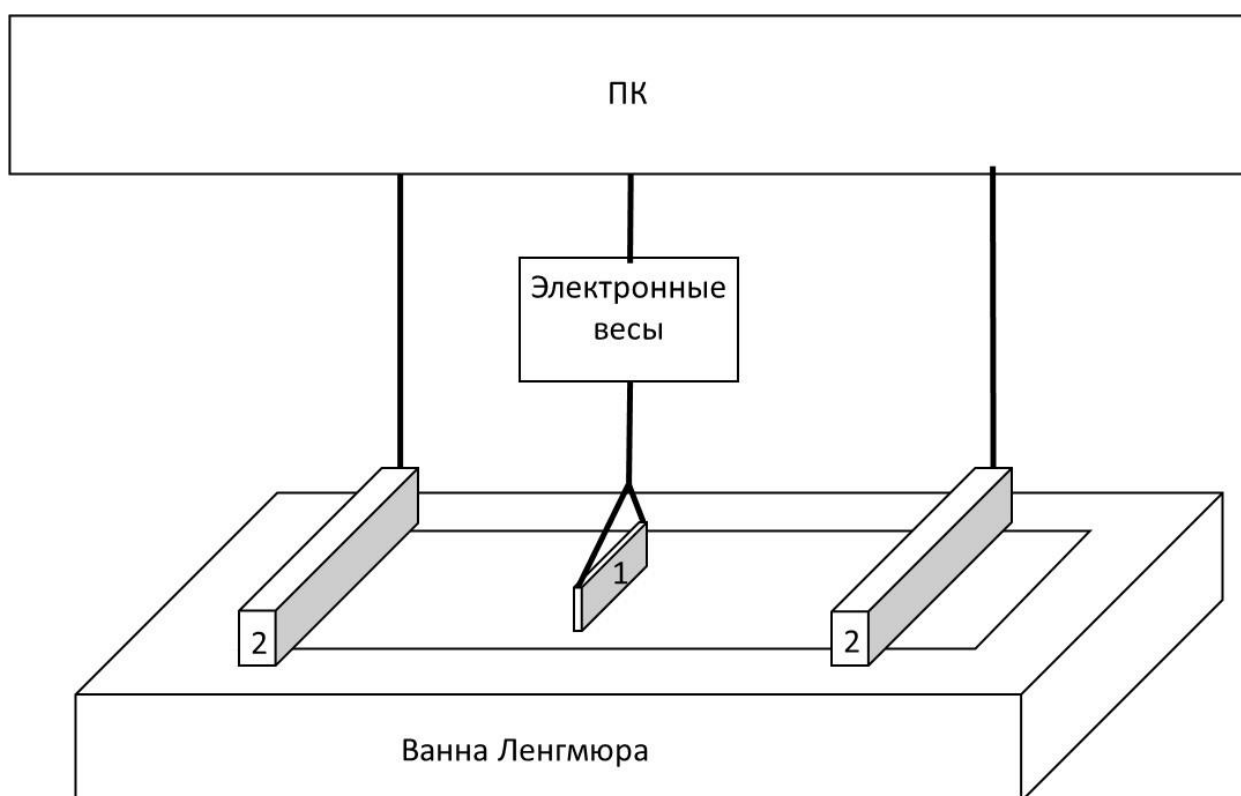


Рис.10. Установка для измерения динамической поверхностной упругости: 1 – пластинка Вильгельми, 2 – осциллирующие барьеры.

3. Результаты и обсуждение

3.1. Полученные фибриллярные агрегаты

Методика получения фибриллярных агрегатов БСА, использованная нами (раздел 2.1.1), не предполагает перемешивания раствора белка в процессе инкубации. С одной стороны, перемешивание способствует более эффективному столкновению молекул белка между собой, но с другой стороны интенсивное перемешивание или встряхивание колбы способно разрушить полученные фибриллярные агрегаты.

Рассмотрим полученные нами фибриллярные агрегаты бычьего сывороточного альбумина. Итого, для подтверждения результатов синтеза были сделаны 4 образца для атомно-силовой микроскопии: разбавление в 20 и в 200 раз буфером Трис-НСI и водой с рН 2. Необходимо отметить, что нанесение полученных образцов на слюду производили через сутки после разбавления, так как дисперсия расходилась по объему медленно. На рис. 11 представлены АСМ-изображения полученных образцов при разбавлении водой с рН 2, так как изображения в буфере оказались малоинформативны из-за высыхания чистого вещества буфера на слюде.

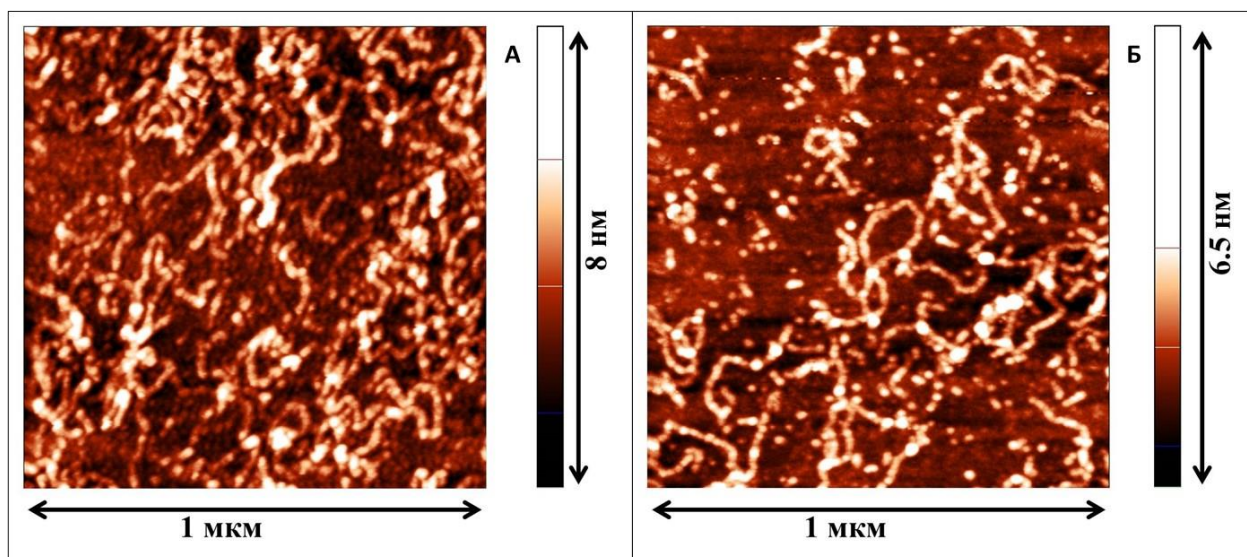


Рис.11. АСМ-изображения фибрилл БСА после синтеза и разбавления в воде с рН 2: А - разбавление в 20 раз, Б - в 200 раз.

На рисунке можно видеть длинные изогнутые нити – искомые фибриллы БСА, но кроме того заметно большое количество сторонних мелких

нефибриллярных агрегатов. Потому для качественного дальнейшего исследования потребовалась очистка дисперсии. В процессе агрегации белок БСА формирует гибкие выющиеся фибриллы. В целом, результат соответствует описанному в литературе (рис. 6). Помимо БСА, к формированию такого рода агрегатов склонны некоторые другие белки, например, овальбумин [61].

Фибриллярные агрегаты лизоцима куриного белка представляют собой принципиально другой класс фибрилл – заметно более длинных и жестких. Вариантов получения червеобразных амилоидов в литературе не встречается, и можно сказать, что агрегация лизоцима всегда имеет результатом жесткие фибриллы. Перед нанесением на слюду для микроскопии дисперсии разбавили в 40 раз водой с рН 2. Полученные нами фибриллярные агрегаты представлены на рис.12.

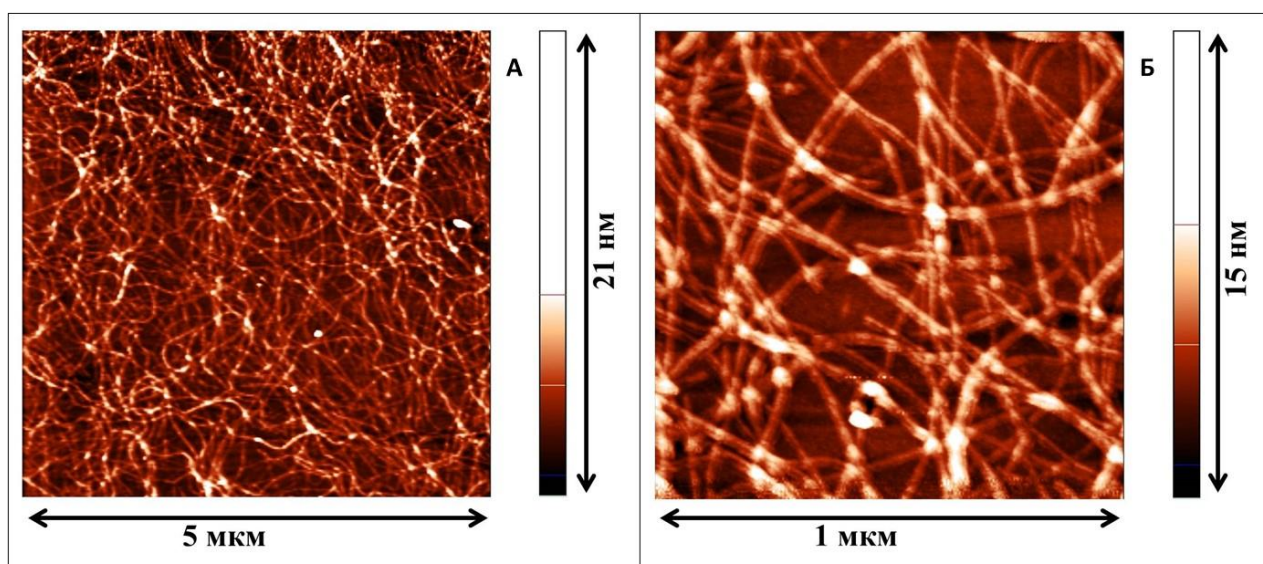


Рис.12. АСМ-изображение фибриллярных агрегатов лизоцима после синтеза в разном масштабе (разбавление в 40 раз).

Фибриллам лизоцима свойственна большая персистентная длина, чем фибриллам бычьего сывороточного альбумина. Данные амилоиды гораздо более устойчивы при хранении, а также менее чувствительны к условиям синтеза.

3.2. Результат очистки фибриллярных агрегатов

Как показано в разделе 2.2, оптимальным вариантом очистки в обоих случаях служит центрифугирование.

На рисунке 13 представлены АСМ-изображения очищенных фибрилл БСА, разбавленных водой с рН 2. В данном случае потребовался более длительный промежуток времени для растворения осадка – 3-4 суток, так как полученный осадок крайне медленно переходил в раствор. Разбавление также проводили в буфере Трис-НСl и в воде с рН 2. Из рисунка 13 можно видеть, что результаты АСМ в буфере немного хуже из-за слоя Трис-НСl, частично перекрывшего фибриллярные агрегаты. Результаты очистки удовлетворительные, заметно уменьшение числа сторонних агрегатов (рис. 13) по сравнению с дисперсией до очистки (рис. 11), фибриллы не разрушились.

Так как данный тип фибрилл довольно неустойчив, при неосторожном пипетировании или переносе вещества агрегаты могут быть разрушены, как показано на рис. 14. В данном случае приведены АСМ-изображения разного масштаба, на рис. 14Б можно видеть короткие обрывки фибриллярных нитей длиной до 100 нм. Возможно, они разрушились при попытке механического воздействия на пробирку при перемешивании вручную. В процессе центрифугирования оказалось важным подобрать правильную скорость, чтобы не повредить агрегаты и в то же время не осадить примеси.

Согласно проведенной гравиметрии, концентрация фибрилл в конечном очищенном растворе с рН 2 после очистки составила 0.0143 г/л.

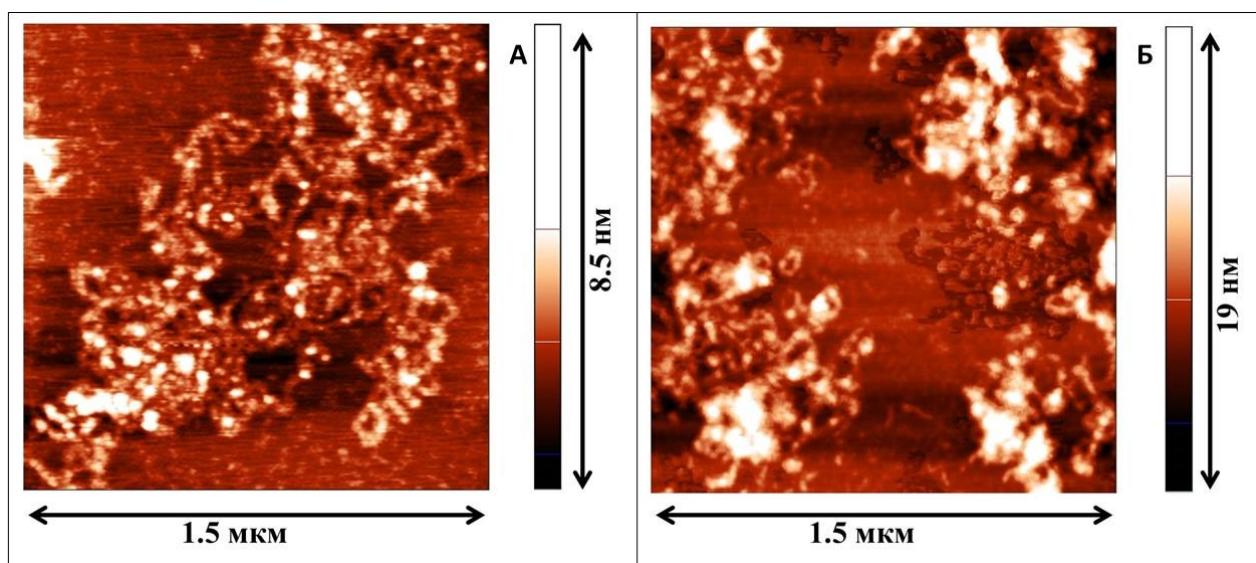


Рис.13. АСМ-изображение очищенных фибрилл БСА: А - редиспергированных в воде с рН 2, Б - редиспергированных в буфере Трис-НСl.

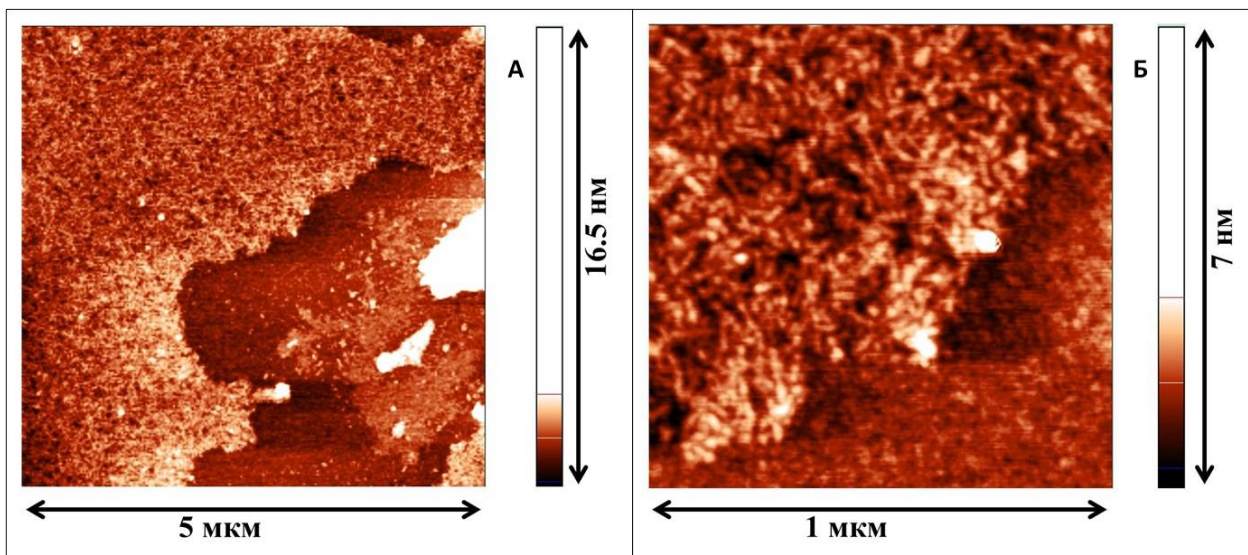


Рис.14. АСМ-изображение разрушенных в результате центрифугирования фибрилл БСА в разном масштабе.

Главное затруднение при подборе оптимальной скорости вращения центрифуги состоит в том, чтобы произошло осаждение фибрилл без примесных полипептидов. Для очистки фибрилл лизоцима была применена скорость 16000g. Как видно из рисунка 15, этой скорости хватило, в отличие от БСА, для успешного отделения фибриллярного геля. После центрифугирования амилоиды вполне сохранили свою целостность, на рисунке 15 видны как целые нити, так и более короткие агрегаты. После редиспергирования они расходились значительно быстрее амилоидов БСА. После процедуры очистки их концентрация в воде с рН 2 составила 0.02 г/л.

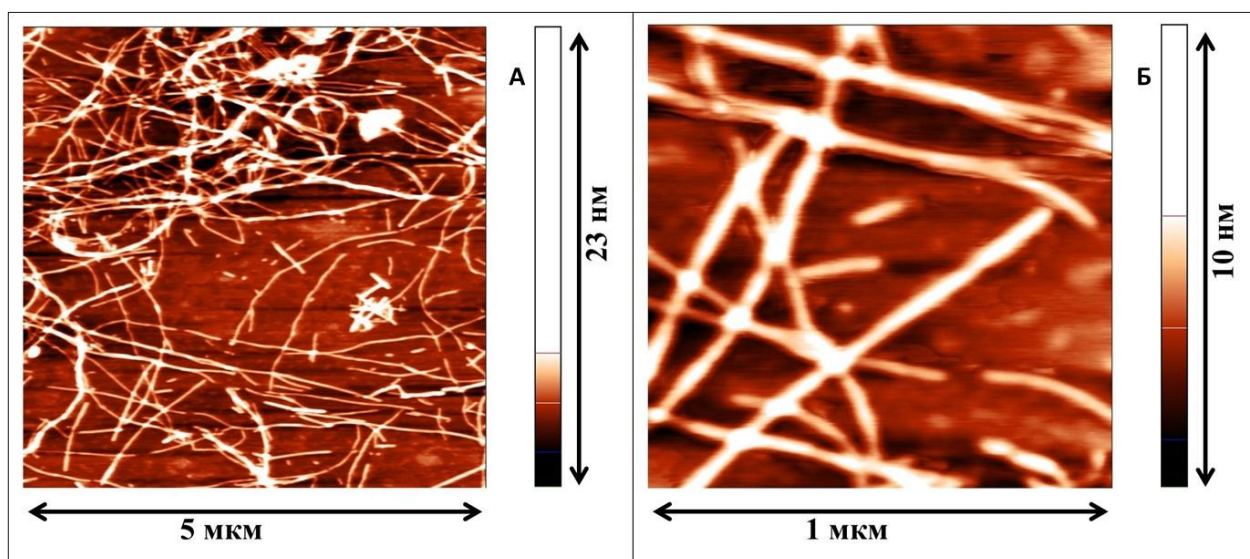


Рис.15. Очищенные фибриллы лизоцима куриного белка.

3.3. Адсорбционные пленки амилоидных фибрилл БСА и лизоцима

Рассмотрим адсорбционные пленки фибриллярных агрегатов бычьего сывороточного альбумина на границе водный раствор/воздух. Кинетические зависимости поверхностного натяжения и динамической поверхностной упругости дисперсий фибриллярных агрегатов БСА (до и после очистки) и нативного белка представлены на рис. 16, концентрация всех растворов составила 0.014 г/л. Измерения проводились в 0.1 М растворе NaCl при рН подложки 5.5. Для поверхностных свойств фибриллярных агрегатов БСА после очистки характерно наличие индукционного периода около одного часа перед началом изменения поверхностных свойств, после которого поверхностное натяжение медленно падает до 61.5 мН/м, а динамическая поверхностная упругость растет до 44 мН/м. Постоянные значения поверхностной упругости всех систем достигаются быстрее постоянных значений поверхностного натяжения. В случае неочищенных фибриллярных агрегатов ускорение изменения поверхностных свойств и сокращение индукционного периода можно объяснить наличием в растворе полипептидов с более низкой по сравнению с фибриллами молекулярной массой и высокой поверхностной активностью. Замедление скорости роста поверхностной упругости и падения поверхностного натяжения для дисперсии очищенных фибрилл в данном случае указывает на эффективную очистку растворов фибриллярных агрегатов БСА с помощью центрифугирования, в результате которой значительное количество примеси было отделено от основного продукта.

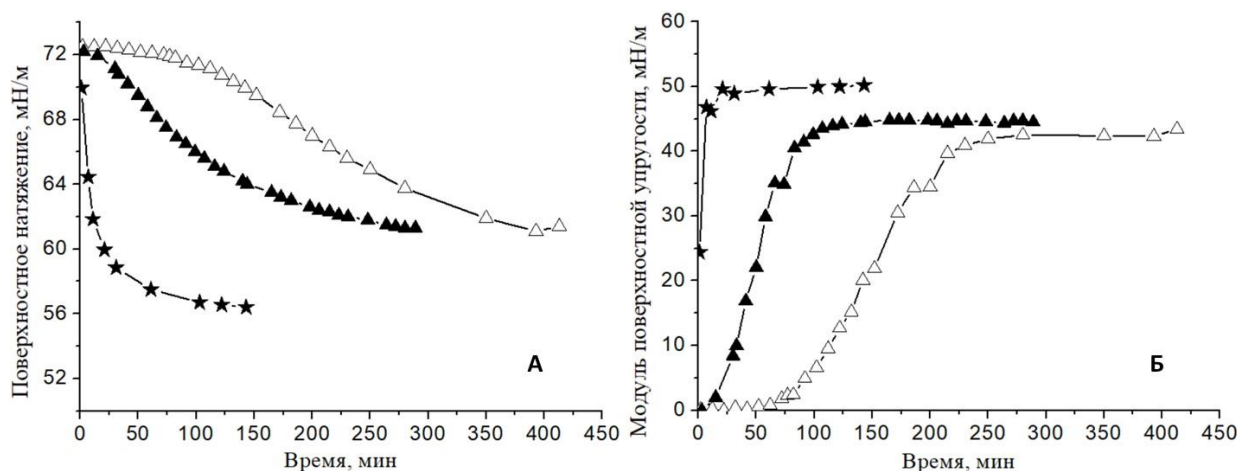


Рис. 16. Кинетические зависимости поверхностных свойств дисперсий разных форм белка БСА (поверхностного натяжения – А, динамической поверхностной упругости – Б) нативного белка (звезды), неочищенных фибрилл (заполненные треугольники) и очищенных фибрилл (пустые треугольники). Концентрация растворов 0.014 г/л.

Для кинетических зависимостей поверхностных свойств в растворах нативного белка при данной концентрации вещества характерно отсутствие индукционного периода. Постоянные значения поверхностных свойств устанавливаются в течение 30 минут после начала эксперимента. Подобные кинетические зависимости поверхностного натяжения и поверхностной упругости для нативного белка БСА были представлены ранее в работе [50].

Значения плато поверхностных свойств нативного БСА и его фибриллярных агрегатов также несколько отличаются. Если для раствора нативного белка с концентрацией 0.014г/л поверхностное натяжение падает до 56.5 мН/м, а динамическая поверхностная упругость вырастает до 50 мН/м, то в дисперсиях фибрилл эти значения равны 61.5 и 42-44 мН/м, соответственно. Эти различия выходят за пределы ошибки измерений поверхностного натяжения и динамической поверхностной упругости (0.5 мН/м и 3%, соответственно).

Полученные результаты существенно отличаются от кинетических зависимостей поверхностных свойств растворов лизоцима (рис. 17). Плато поверхностного натяжения в данном случае находится на уровне 55 мН/м, что немного ниже, чем у фибрилл БСА. При этом динамическая поверхностная упругость в растворах как лизоцима, так и его амилоидов существенно выше таковых для бычьего сывороточного альбумина. Скорее всего, такое различие объясняется разницей молекулярных масс данных белков, в связи с чем образуется более плотная упаковка поверхностного слоя.

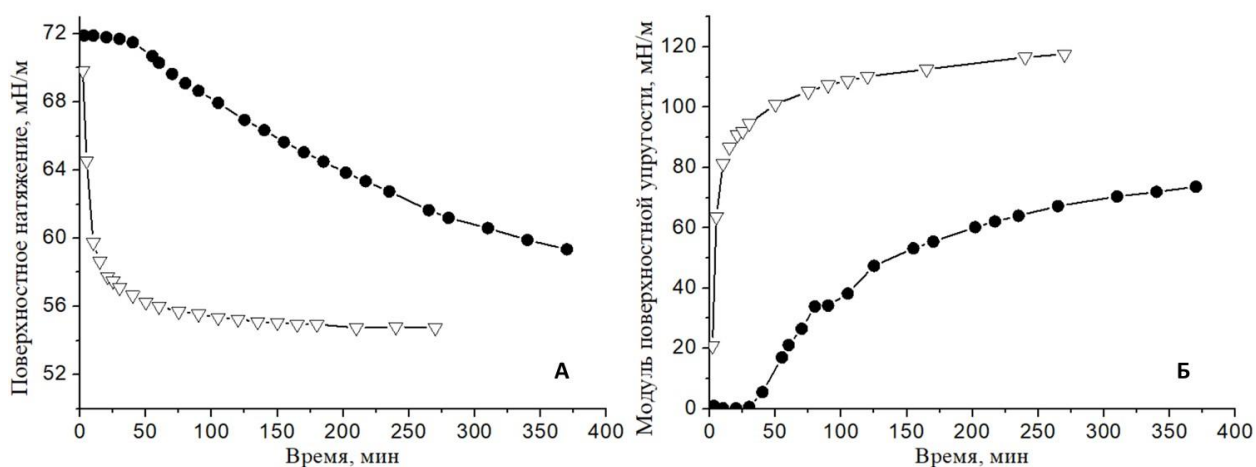


Рис.17. Кинетические зависимости поверхностного натяжения А и модуля поверхностной упругости Б для нативного белка лизоцима (черные кружки) и его фибрилл (пустые треугольники) в 0.1 М NaCl (концентрация фибрилл и белка 0.06 г/л).

В целом для агрегатов лизоцима наблюдается более быстрое изменение поверхностного натяжения и упругости в растворах фибрилл по сравнению с нативным белком, а для бычьего сывороточного альбумина наблюдается обратная зависимость. Замедление изменения поверхностных свойств в дисперсии фибриллярных агрегатов БСА по сравнению с белком может быть связано как с увеличением размера частиц, так и с неполной очисткой агрегатов. Крупные фибриллярные агрегаты обладают большим коэффициентом диффузии, что приводит к медленной адсорбции. Наличие примесей в дисперсиях неочищенных фибрилл приводит к ускорению адсорбции, но, видимо, поверхностная активность или концентрация этих примесей недостаточно велика, чтобы скорость изменения поверхностных свойств дисперсии агрегатов БСА была сравнима с системой, включающей нативный белок.

Полученные результаты можно представить в виде зависимости динамической поверхностной упругости от поверхностного давления (рис. 18), чтобы наглядно увидеть возможные отличия в процессах адсорбции. В широкой области поверхностных давлений для данных систем ход зависимостей совпадает и для обеих дисперсий амилоидов, и для белка. Это означает, что при адсорбции компонентов раствора нативного белка и дисперсий фибриллярных агрегатов количество гидрофобных участков макромолекул на поверхности жидкости оказывается примерно одинаковым в обоих случаях. Только при высоких поверхностных давлениях (более 12 мН/м) в растворе нативного БСА изменения поверхностных свойств продолжают, тогда как для дисперсий фибрилл наступает плато. Рост поверхностного давления и поверхностной упругости в растворах нативного БСА при давлениях выше 12 мН/м может быть объяснен меньшими размерами молекул по сравнению с его агрегатами, что дает возможность образовывать более плотные и упругие адсорбционные пленки.

Сжатие адсорбционной пленки нативного белка БСА и его фибриллярных агрегатов в четыре раза со скоростью 5 мм/мин приводит к разным значениям предельного поверхностного давления (рис. 19). Если при сжатии пленки нативного белка давление увеличивается до 26.7 мН/м, то при сжатии пленки фибриллярных агрегатов БСА давление растет до 35.3 мН/м. Это может быть следствием образования плотной сетки фибрилл на поверхности воды, которая при

сжатии еще больше уплотняется и остается у поверхности раствора. Молекулы нативного белка при сильном сжатии поверхности переходят в подповерхностный слой. Глобула БСА меньше и компактнее фибриллы, потому она в состоянии покинуть поверхностный слой, что может выразиться в более низких значениях поверхностного давления при сжатии пленки. Данные выводы были подтверждены при помощи АСМ-изображений (рис. 20).

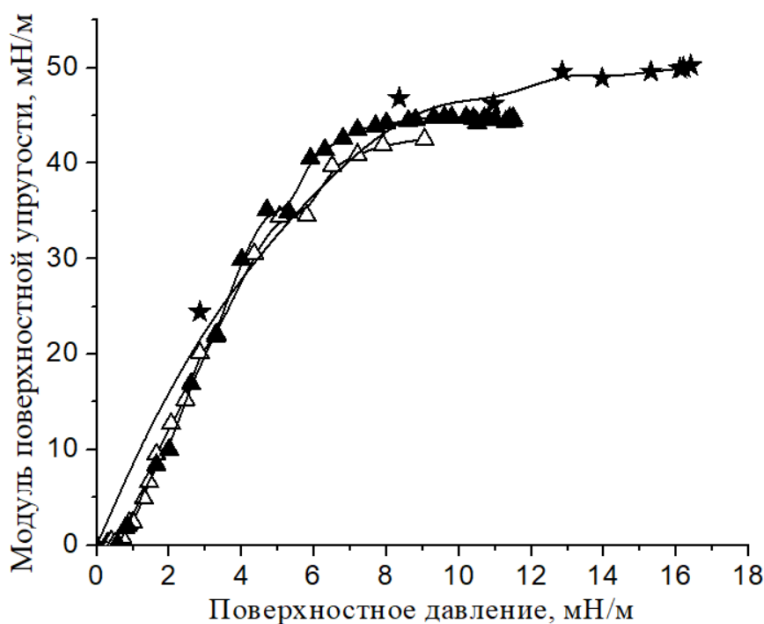


Рис.18. Зависимости поверхностной упругости от давления для обсуждаемых систем: пленки нативного белка БСА (звезды) в сравнении с очищенными (пустые треугольники) и неочищенными (заполненные треугольники) фибриллами.

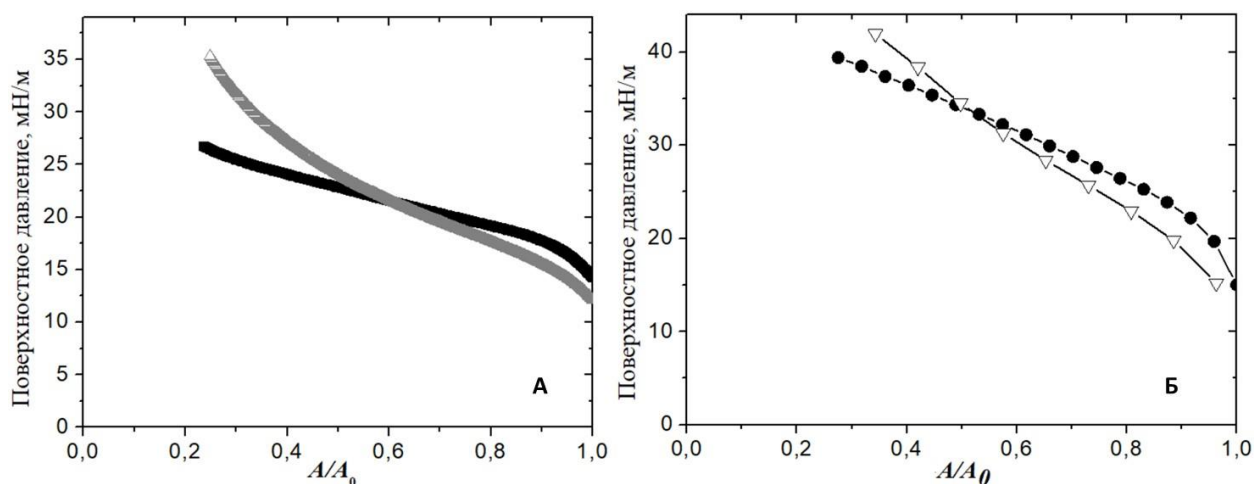


Рис.19. Изотермы сжатия адсорбционных пленок: А) белка БСА (заполненные квадраты) и его фибрилл (серые треугольники); Б) белка лизоцима (заполненные кружки) и его фибрилл (пустые треугольники).

Как видно из рис. 19, для поверхностных пленок белка лизоцима и его фибрилл не наблюдается большой разницы между значениями поверхностного натяжения при максимальном сжатии поверхности.

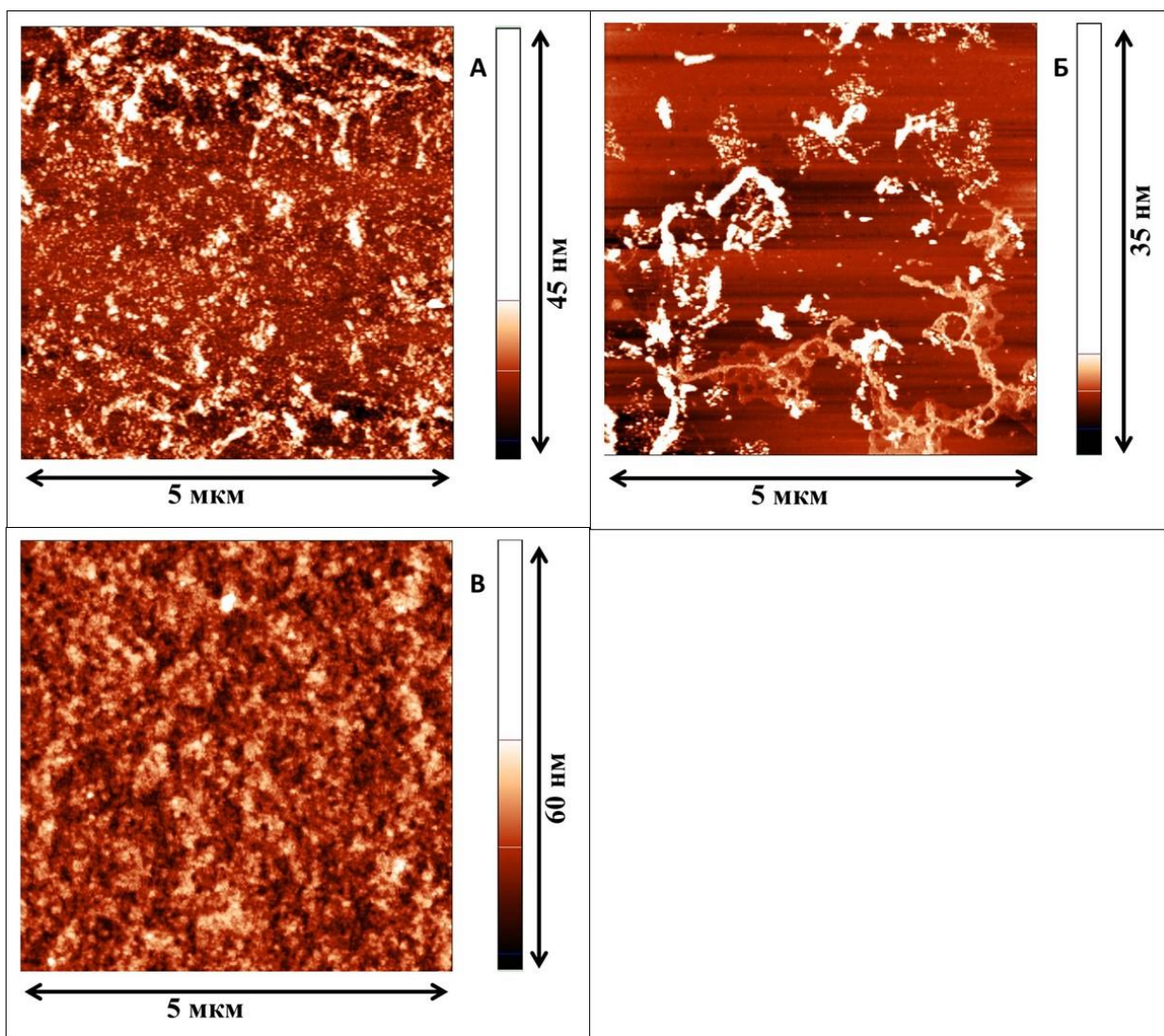


Рис.20. АСМ-изображения адсорбционной пленки фибриллярных агрегатов БСА, перенесенных с поверхности водного раствора 0.1 М NaCl методом Ленгмюра-Шеффера при: А,Б - $A/A_0 = 1$ (поверхностное давление 10 мН/м); В - $A/A_0 = 0.25$ (поверхностное давление 38 мН/м).

АСМ-изображения адсорбционных пленок фибриллярных агрегатов БСА на поверхности водного раствора хлорида натрия при относительной площади $A/A_0=1$, т.е. равновесной пленки перед сжатием, представлены на рис. 20 А, Б. АСМ-изображения полученные в данной серии, можно условно разделить на два вида: в первом случае (рис. 20А) присутствует плотная пленка, состоящая из большого количества червеобразных нитей, переплетенных между собой; во втором случае (рис. 20Б) видны отдельные разветвленные скопления нитей фибриллярных агрегатов, отделенные друг от друга. Наличие в пленке участков с разной плотностью агрегатов указывает на ее неоднородность. Возможно, с течением времени данная неоднородность пленки исчезает, но в представляемой работе

достоверных результатов по времени равномерного распределения вещества по поверхности дисперсии получить не удалось. Сжатие пленки в четыре раза до относительной площади $A/A_0=0.25$ приводит к толстому и плотному слою, однородному по всей пленке без больших агрегатов (рис. 20В).

Подобные структуры адсорбционных слоев наблюдались также для адсорбционных пленок фибриллярных агрегатов лизоцима (рис. 21). Хорошо видно, что в данных системах сжатие поверхности приводит только к уплотнению поверхностного слоя и уменьшению свободной площади. Возможно, и гибкие фибриллы БСА, и жесткие фибриллы лизоцима не склонны покидать поверхность при критическом увеличении поверхностных напряжений.

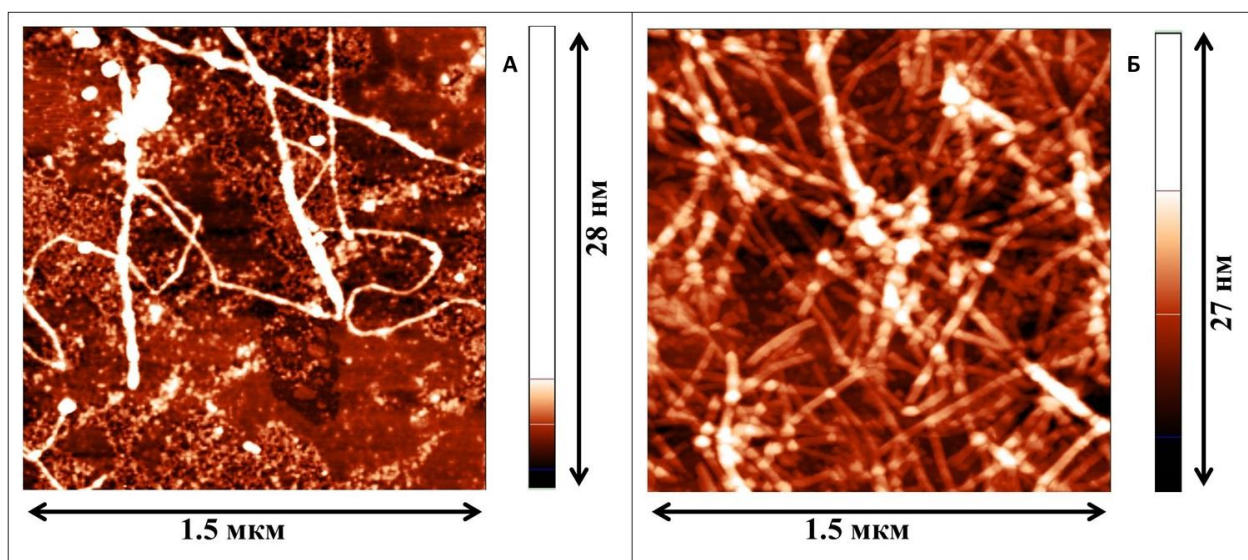


Рис.21. АСМ-изображения адсорбционной пленки фибриллярных агрегатов лизоцима, перенесенных с поверхности водного раствора 0.1 М NaCl методом Ленгмюра-Шеффера А – до сжатия, Б – после сжатия.

На кинетику изменения поверхностных свойств фибриллярных агрегатов БСА большое влияние оказывает ионная сила раствора. Индукционный период на кинетических зависимостях поверхностных свойств дисперсии фибрилл БСА в 0.1 М NaCl, в 0.02 М TrisHCl и в воде при концентрации 0.014 г/л (рис. 22) не менялся и составлял один час. Однако, при уменьшении ионной силы раствора при приближении к постоянным значениям скорость изменения поверхностных свойств уменьшалась. Для дисперсии фибрилл в воде зависимости не вышли на плато в течение восьми часов после начала эксперимента. Наличие соли уменьшает электростатический барьер адсорбции, который возникает вследствие электростатических взаимодействий между белковыми агрегатами. Одноименно

заряженные частицы отталкиваются друг от друга в поверхностном слое, что препятствует адсорбции частиц к поверхности водного раствора. В случае солевого раствора, фибриллы способны к более плотной укладке в поверхностном слое из-за отсутствия отталкивания.

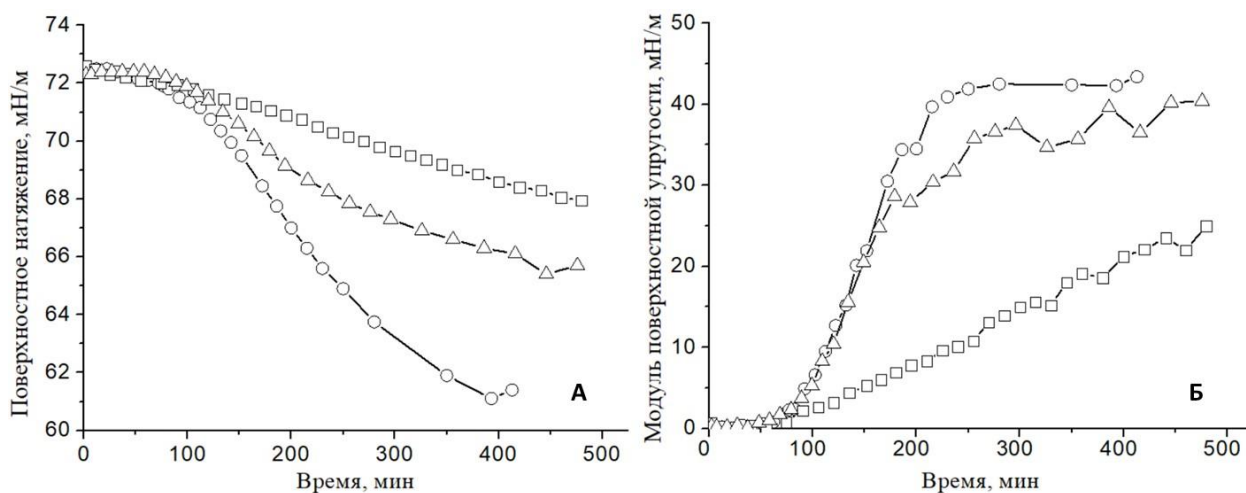


Рис.22. Кинетические зависимости поверхностных свойств растворов фибрилл БСА в различных растворителях: в воде (пустые квадраты), в 0.1М соли (пустые кружки), в буфере ТрисНСI (пустые треугольники).

3.4. Нанесенные пленки амилоидных фибрилл БСА и лизоцима

В работе [62] было показано, что наличие примесей более существенно отражается на свойствах адсорбционных пленок, по сравнению с нанесенными. Это объясняется тем, что при адсорбции из объема раствора сначала сорбируются обладающие меньшим размером и высокой поверхностной активностью полипептиды, образующиеся в ходе синтеза фибриллярных агрегатов. Хотя центрифугирование дисперсии приводит к значительному сокращению концентрации примеси, большая часть из оставшихся загрязнений при адсорбции переходит в пленку, что приводит к росту ее относительной концентрации в поверхностном слое. При нанесении же пленки на поверхность раствора локальные концентрации примеси и основного компонента дисперсии предположительно остаются неизменными, что приводит к уменьшению влияния полипептидов на свойства пленки.

3.4.1. Нанесенные пленки БСА и его фибрилл

В случае нанесенных пленок подложка сильно влияет как на саму пленку, так и на процесс нанесения. Так, оказалось невозможным нанести пленку фибрилл

на поверхность воды без добавок электролита, так как капли дисперсии не растекаются, а сразу тонут, таким образом не изменяя поверхностных свойств воды. При добавлении большого количества дисперсии показания приборов начинают меняться, но это вызвано начавшимся процессом адсорбции к поверхности из-за сильного увеличения концентрации вещества в объеме раствора. Таким образом, создать нанесенные пленки фибриллярных агрегатов БСА удалось на растворе соли и на буфере ТрисНСI, в то время как фибриллы лизоцима способны к растеканию и по поверхности тридистиллированной воды.

Важно отметить, что нанесение маленьких порций дисперсии фибрилл проводилось до тех пор, пока введение очередной добавки не оказывало влияния на значения поверхностных свойств. В таком случае формирование слоя считалось завершенным.

Зависимость модуля динамической поверхностной упругости от поверхностного натяжения для нанесенных пленок нативного белка БСА и его амилоидов представлена на рис. 23. В данном случае отдельные точки на зависимостях соответствуют локальному установлению постоянных значений поверхностных свойств после каждой добавки капли дисперсии. При таком нанесении пленки фибрилл БСА на 0.1 М водный раствор NaCl поверхностное давление растет до 4 мН/м, а поверхностная упругость – до 38 мН/м (рис. 23, пустые треугольники). Если сравнить эти результаты с зависимостью для адсорбционных пленок на рис. 18, можно увидеть, что достигаются разные постоянные значения поверхностного давления. Скорее всего, данные различия вызваны остаточными примесями в дисперсии фибрилл после очистки, которые вследствие своей высокой поверхностной активности вызывают более сильное увеличение поверхностного давления в случае адсорбционных пленок. Следует отметить, что после нанесения каждой порции дисперсии на поверхность жидкости поверхностные свойства устанавливались в течение длительного времени (более одного часа), что указывает на медленное распространение компонентов дисперсии по поверхности.

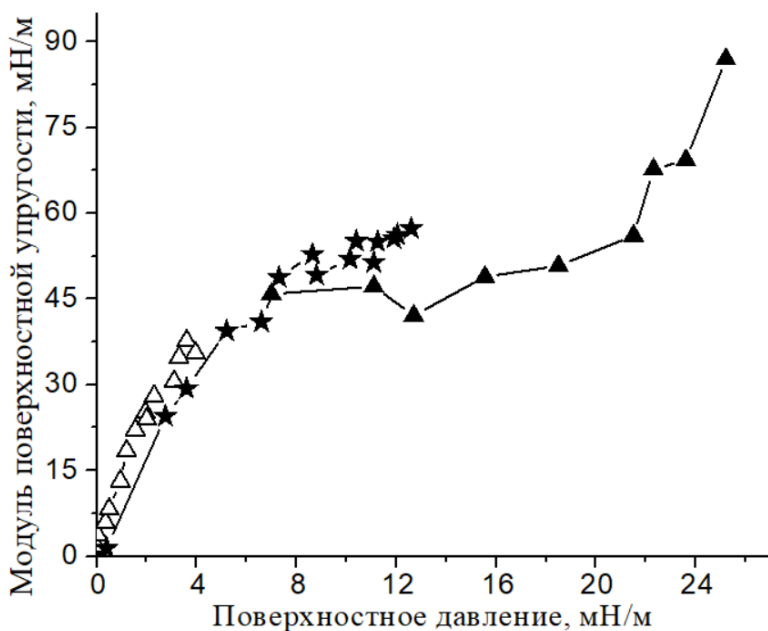


Рис.23. Зависимость динамической поверхностной упругости от поверхностного давления нанесенных пленок нативного БСА (звезды) и дисперсий фибриллярных агрегатов БСА при: прикапывании дополнительных порций дисперсии (пустые треугольники); сжатии нанесенной пленки (заполненные треугольники).

Дальнейшее изменение поверхностной концентрации фибриллярных агрегатов в нанесенной пленке осуществлялось посредством уменьшения рабочей площади ванны Ленгмюра (рис. 23, заполненные треугольники). Для этого с контролируемой скоростью сближали барьеры (рис. 10) на фиксированные расстояния. В данном случае, как и при изменении концентрации посредством прикапывания, после каждого сжатия поверхности ждали установления постоянных значений поверхностных свойств. На начальных этапах сжатия пленки происходил только рост поверхностного давления при практическом постоянстве динамической поверхностной упругости. Она резко увеличивается лишь при достаточно сильном сжатии поверхностного слоя, при поверхностных давлениях выше 18 мН/м.

Предположение о сильном влиянии примесей на свойства адсорбционных пленок подтверждаются тем фактом, что поверхностные свойства адсорбционных и нанесенных пленок нативного белка совпадают. В обоих случаях для приготовления растворов нативного БСА использовался один и тот же чистый белок. Последовательное сжатие пленок нативного белка с последующим установлением равновесных свойств приводило к небольшому росту динамической поверхностной упругости и поверхностного давления.

Изотерма сжатия-растяжения нанесенной пленки фибриллярных агрегатов БСА на солевой раствор представлена на рис. 24. Сближение барьеров происходило поэтапно, после каждого этапа сжатия пленки проводились измерения поверхностного давления и упругости, которые в течение примерно одного часа выходили на постоянные значения. Также на нескольких этапах сжатия пленки проводили снятие АСМ-образцов методом Ленгмюра-Шеффера (пустые кружки на рис. 24).

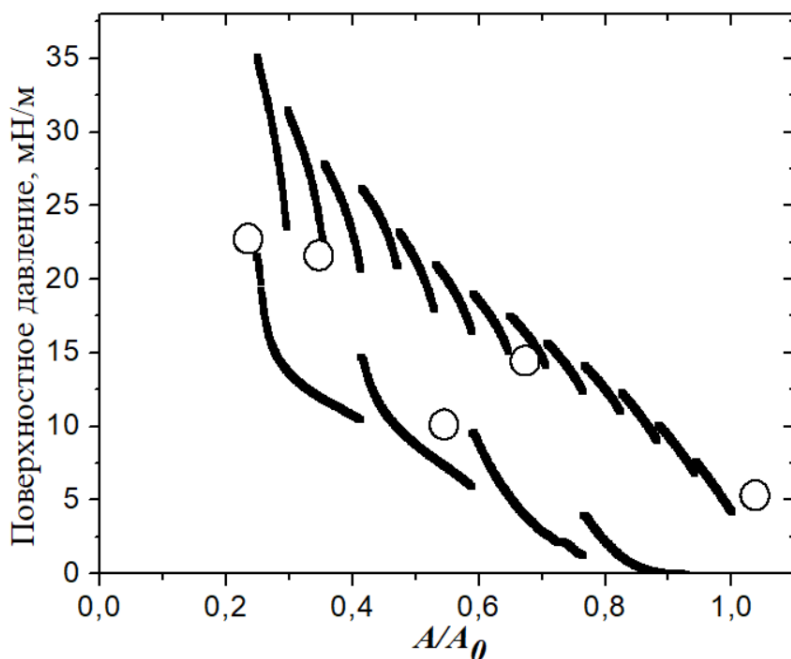


Рис.24. Изотерма последовательного сжатия-растяжения нанесенной пленки фибрилл БСА. Пустыми кружками обозначены поверхностные давления, при которых осуществлялось снятие АСМ-образцов.

Характер изменения поверхностных свойств нанесенных пленок фибрилл БСА позволяет предположить их структуру. При нанесении дисперсии на поверхность жидкости фибриллы постепенно распространяются по ней, образуя рыхлую пленку с большим количеством пустот между компонентами, которая характеризуется относительно низким поверхностным давлением и ростом поверхностной упругости. При достижении поверхностного давления 4 мН/м поверхность оказывается полностью занятой такой пленкой и добавление дополнительных порций дисперсии не приводит к распространению фибрилл вдоль поверхности и изменению поверхностных свойств. Постепенное сжатие пленки вызывает увеличение концентрации гидрофобных частей фибриллярных агрегатов в поверхностном слое, при этом постоянство поверхностной упругости указывает на сохранение рыхлой структуры пленки с пустотами между компонентами. За

счет таких пустот и осуществляется релаксация поверхностных напряжений. Когда поверхностное давление достигает 18 мН/м, пленка сильно уплотняется, вся поверхность оказывается занятой фибриллярными агрегатами, и упругость начинает резко увеличиваться при сжатии поверхностного слоя.

Таблица 3. Описание процесса сжатия-растяжения нанесенной пленки агрегатов БСА в соответствии с АСМ-изображениями поверхностного слоя.

АСМ	Поверхностное давление, мН/м	Относительная площадь A/A_0	Описание
А, Б	4	1	рыхлая пленка с протяженными пустотами между скоплениями агрегатов
В, Г	15	0.72	пленка фибрилл покрывает всю поверхность жидкости, на ней видны отдельные нити, между которыми присутствуют пустоты
Д, Е	22	0.44	сплошной слой, фибриллярные структуры практически не просматриваются, количество и размер пустот становятся меньше, с этого момента начинается рост упругости
Ж, З	24	0.25	плотная пленка фибриллярных агрегатов без пустот, на ней появляются складки
И, К	10	0.6	пленка сплошная, без разрывов, но менее плотная, появляются пустоты

Выводы, сделанные на основании измерения поверхностных свойств, были подтверждены с помощью АСМ-изображений (рис. 25), сделанных при разных степенях сжатия поверхности (круги на рис. 24). На рис. 25 АСМ-изображения

приведены в двух масштабах для большей наглядности. Описание полученных АСМ-изображений и соответствие значениям поверхностных свойств приведены в таблице 3.

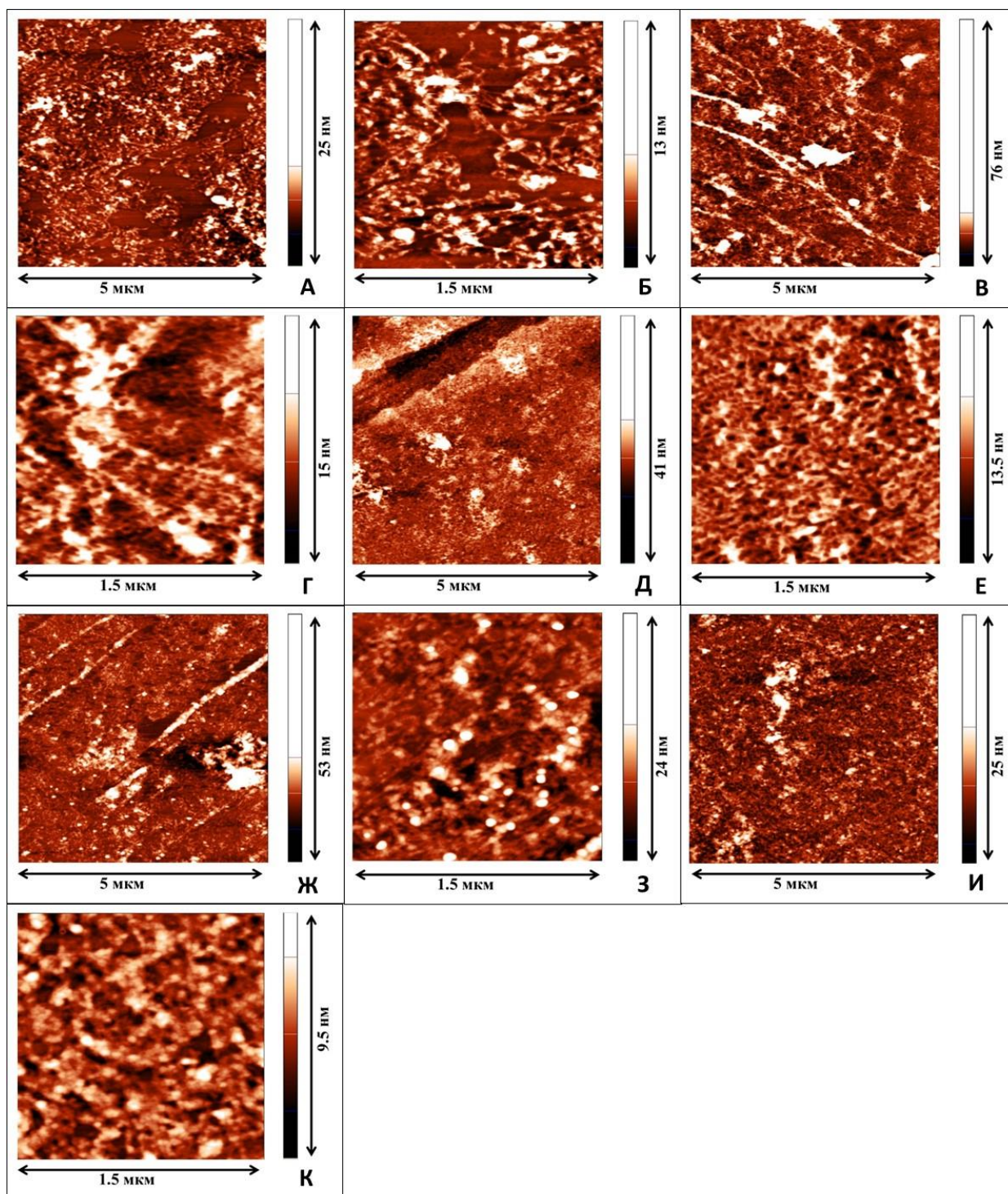


Рис.25. АСМ-изображения нанесенной пленки фибриллярных агрегатов БСА, перенесенных с поверхности водного раствора 0.1 М NaCl методом Ленгмюра-Шеффера при разных степенях сжатия-растяжения поверхности. Сжатие: А, Б - $A/A_0 = 1$; В, Г - $A/A_0 = 0.72$; Д, Е - $A/A_0 = 0.44$; Ж, З - $A/A_0 = 0.25$. Растяжение: И, К - $A/A_0 = 0.6$.

При максимальном сжатии пленки до $A/A_0=0.25$ (рис. 25 Ж-3) на поверхности находится плотная пленка фибриллярных агрегатов без пустот, на ней появляются складки. Это отражается в высоких значениях динамической поверхностной упругости (более 100 мН/м). После максимального сжатия пленку оставили на ночь, и через 12 часов эта величина снизилась до 88 мН/м. При растяжении пленки до $A/A_0=0.6$ пропадают складки, появляются пустоты, она становится тоньше и походит на пленку на рис. 25 В-Г. Дальнейшее растяжение до начальной площади приводит к падению поверхностной упругости до нуля, но с течением времени упругость вернулась к своим постоянным значениям до сжатия.

Таким образом, пленка фибриллярных агрегатов БСА не разрушается при сжатии поверхности на $\frac{3}{4}$ и последующем возвращении к начальной площади, её толщина практически не меняется. Пленка становится более плотной и однородной при сжатии, что отражается в изменении ее поверхностных свойств, и не разрушается на отдельные участки при растяжении.

Нанесенную пленку фибрилл БСА на поверхность 0.1 М NaCl рассмотрели под микроскопом при угле Брюстера (рис. 26). Данный вид микроскопии позволяет представить пленку в мезоскопическом масштабе. На изображении до сжатия (рис. 26А) можно увидеть сплошную однородную пленку, сжатие которой практически не отражается на структуре пленки. После механического воздействия на пленку острой палочкой появляется неоднородность (рис. 26Б), которая достаточно быстро зарастает (рис. 26В). Растяжение пленки не приводит к разрушению, пленка однородная и нет разрывов (рис. 26 Г).

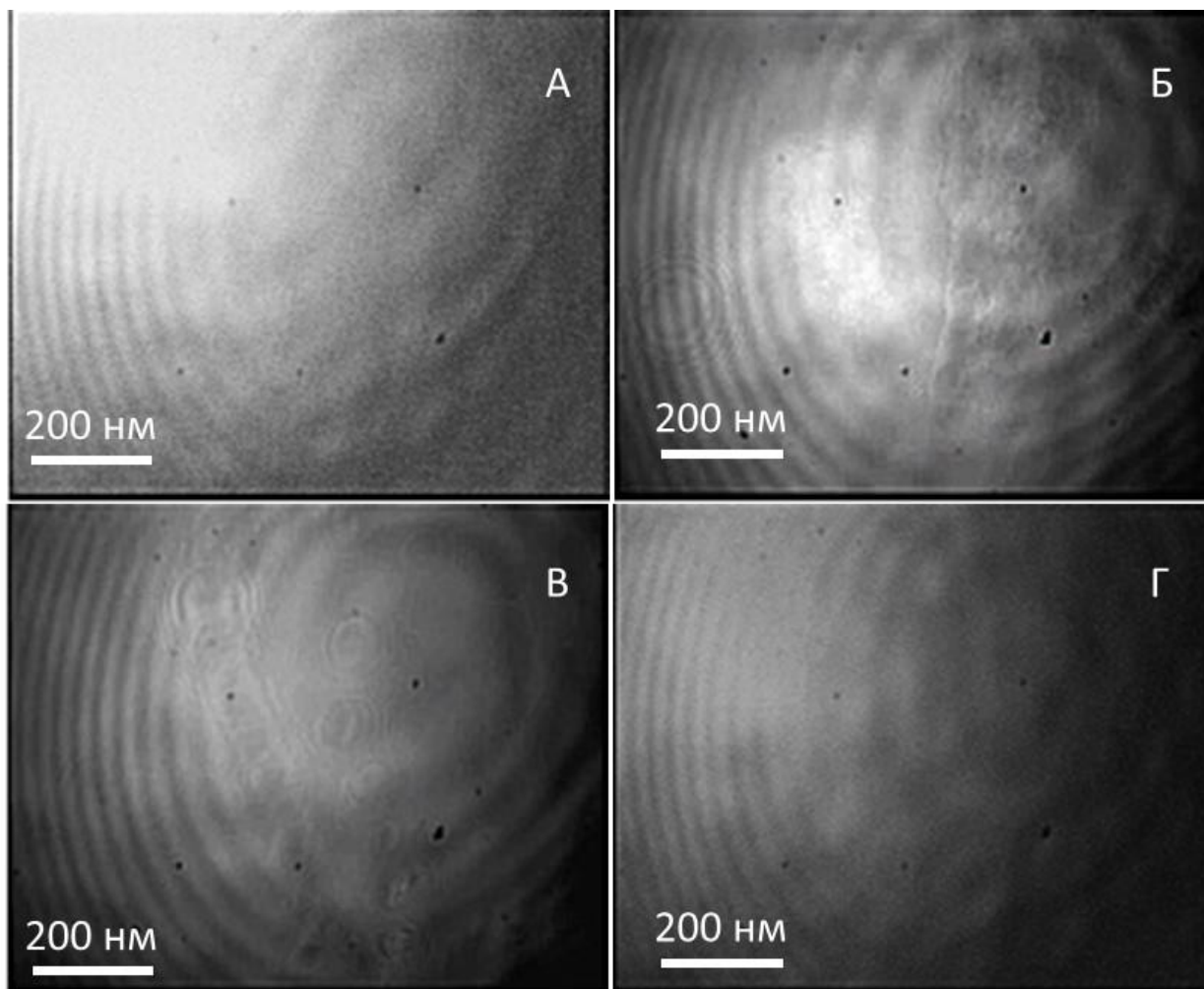


Рис.26. БАМ-изображения нанесенной пленки фибриллярных агрегатов БСА на поверхность водного раствора 0.1 М NaCl при разных степенях сжатия-растяжения поверхности: А) равновесная пленка до сжатия; Б) растянутая до начальной площади пленка после механического воздействия; В) пленка через 5 минут после механического воздействия; Г) растянутая пленка.

3.4.2. Нанесенные пленки лизоцима куриного белка и его фибрилл

Рассмотрим нанесенные пленки лизоцима куриного белка и его фибрилл. В отличие от дисперсии фибриллярных агрегатов БСА, амилоиды лизоцима удаётся успешно наносить на поверхность воды в отсутствие электролитов. На рис. 27 представлены зависимости динамической поверхностной упругости от поверхностного натяжения для амилоидных фибрилл лизоцима в сравнении с нативным белком. При нанесении агрегатов лизоцима достигаются значительно большие значения поверхностных свойств, чем для белка. Так, постоянная поверхностная упругость нанесенной пленки фибрилл на соль достигает очень больших значений (140-160 мН/м), что недостижимо для всех систем БСА. В то же

время, поверхностные давления меняются в тех же пределах, что и у фибрилл БСА (рис. 23).

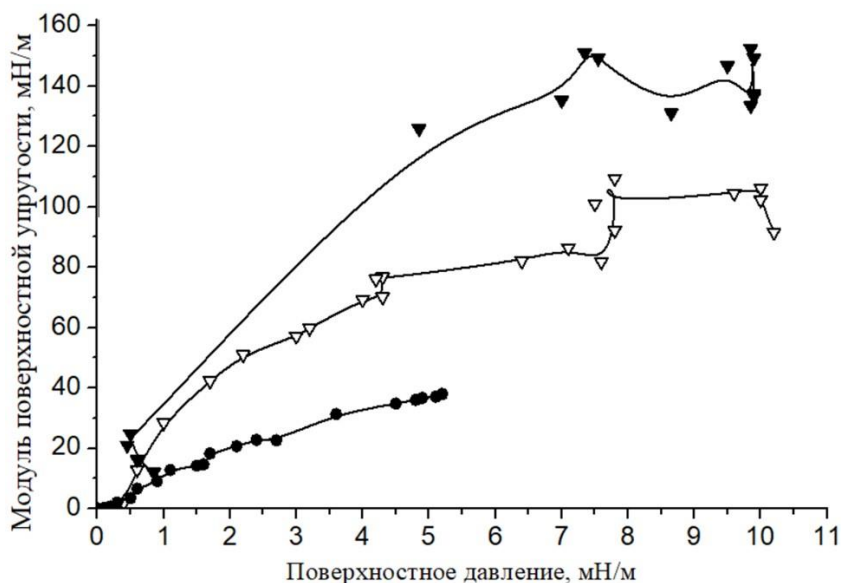


Рис.27. Зависимость модуля динамической поверхностной упругости от поверхностного натяжения для нативного белка лизоцима, нанесенного на раствор соли (черные кружки), фибрилл лизоцима на раствор соли (заполненные треугольники) и на воду (пустые треугольники).

Изотермы сжатия нанесенных пленок лизоцима аналогичны таковым для адсорбционной пленки (рис. 19), достигаются те же значения поверхностных давлений.

АСМ-изображения нанесенной пленки фибрилл лизоцима представлены на рис. 28. Как и в случае нанесенной пленки амилоидов БСА, фибриллы лизоцима образуют плотную пленку на поверхности раствора, которая при сжатии уплотняется и пустоты между агрегатами практически исчезают.

Более информативными оказались БАМ-изображения нанесенных пленок фибриллярных агрегатов лизоцима (рис. 29). Макроскопическая структура такой пленки практически не отличается от представленной ранее пленки амилоидов БСА (рис. 29А). Нанесенную пленку фибрилл лизоцима сжали и растянули, после чего пленка потеряла целостность и появились разрывы (рис. 29Б).

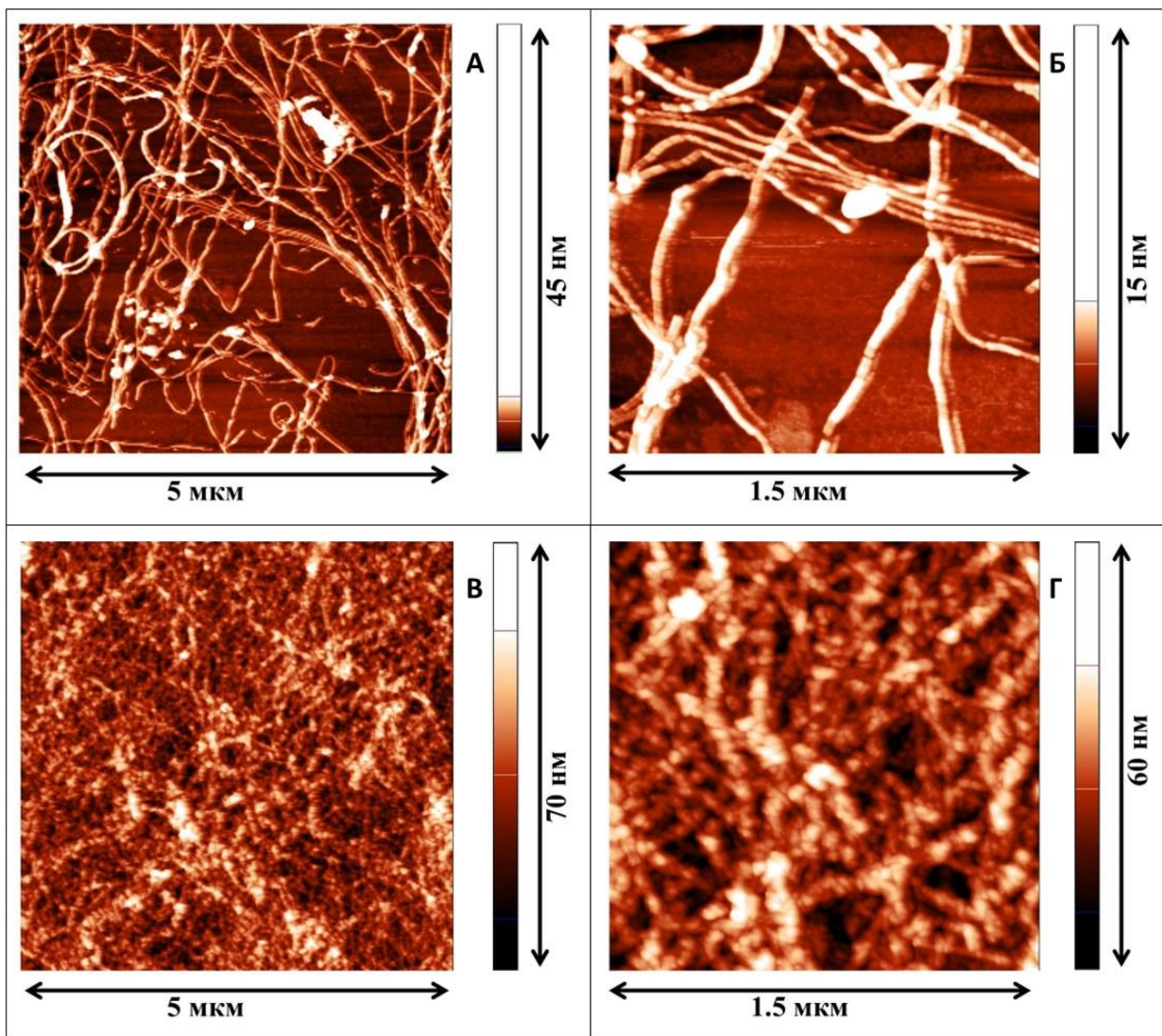


Рис.28. АСМ-изображения нанесенной пленки фибрилл лизоцима на 0.1 М NaCl до сжатия (А, Б) и при максимальном сжатии (В, Г).

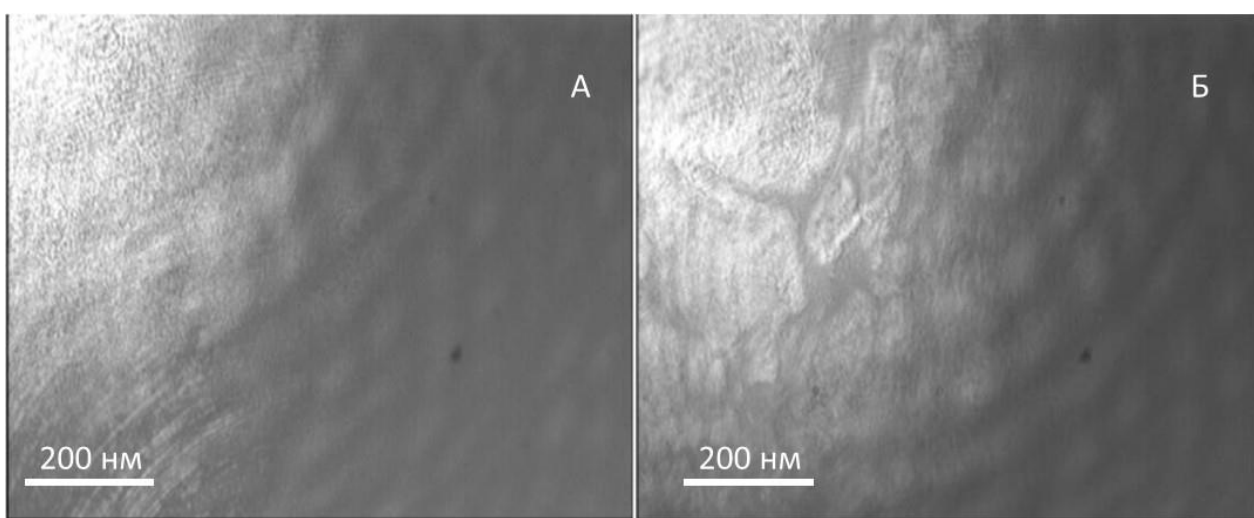


Рис.29. БАМ-изображения пленки нанесенных фибриллярных агрегатов лизоцима на 0.1 М NaCl при поверхностных давлениях: А – 1 мН/м, Б – 10 мН/м.

Таким образом, фибриллы БСА и лизоцима на поверхности раствора соли образуют плотные пленки, состоящие из фибриллярных нитей. Однако, пленка агрегатов лизоцима менее устойчива к внешним воздействиям, и при растяжении не растягивается, а рвется.

Выводы

1. Получены фибриллярные агрегаты двух глобулярных белков – бычьего сывороточного альбумина и лизоцима куриного белка. Фибриллы БСА более мягкие и изогнутые, чем фибриллы лизоцима, и имеют меньшую персистентную длину.

2. Подобраны оптимальные условия очистки полученных агрегатов методом центрифугирования. Замедление процесса адсорбции фибрилл после центрифугирования свидетельствует о достаточной степени очистки.

3. Фибриллы БСА и лизоцима образуют устойчивые плотные пленки на поверхности растворов. При сильном уменьшении площади поверхности данные агрегаты не склонны покидать поверхностный слой. Нанесенные пленки фибриллярных агрегатов БСА не разрушаются при сжатии поверхности на $\frac{3}{4}$ и последующем возвращении к начальной площади, в отличие от пленки фибрилл лизоцима.

4. Ионная сила растворов влияет на адсорбционные и нанесенные пленки фибрилл обоих белков. При нанесении на раствор соли фибриллы способны к более плотной укладке в поверхностном слое из-за уменьшения электростатического барьера адсорбции.

4. Благодарности

Автор данной работы выражает благодарность ресурсным центрам Научного Парка СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий» и «Центр диагностики функциональных материалов для медицины, фармакологии и нанoeлектроники» за предоставленное оборудование, оперативную работу и помощь в интерпретации результатов.

5. Список литературы

- [1] Christopher M. Dobson, Protein misfolding, evolution and disease, *Trends Biochem Sci.* 24 (1999) 329–332.
- [2] F. Chiti, C.M. Dobson, Protein misfolding, functional amyloid, and human disease, *Annu Rev Biochem.* 75 (2006) 333–366. doi:10.1146/annurev.biochem.75.101304.123901.
- [3] D. Eisenberg, M. Jucker, The amyloid state of proteins in human diseases, *Cell.* 148 (2012) 1188–1203. doi:10.1016/j.cell.2012.02.022.
- [4] C.M. Dobson, The amyloid phenomenon and its links with human disease, *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 9 (2017). doi:10.1101/cshperspect.a023648.
- [5] J. Guo, T. Arai, J. Miklossy, P.L. McGeer, A β and tau form soluble complexes that may promote self aggregation of both into the insoluble forms observed in Alzheimer ' s disease, *Proc Natl Acad Sci.* 103 (2005) 1953–1958.
- [6] Y. Cao, R. Mezzenga, Food protein amyloid fibrils: Origin, structure, formation, characterization, applications and health implications, *Adv Colloid Interface Sci.* 269 (2019) 334–356. doi:10.1016/j.cis.2019.05.002.
- [7] C. Lendel, N. Solin, Protein nanofibrils and their use as building blocks of sustainable materials, *RSC Adv.* 11 (2021) 39188–39215. doi:10.1039/d1ra06878d.
- [8] J. Song, C. Sun, Y. Xiang, Y. Xie, A. Mata, Y. Fang, Fabrication of Composite Structures of Lysozyme Fibril-Zein using Antisolvent Precipitation: Effects of Blending and pH Adjustment Sequences, *J Agric Food Chem.* 68 (2020) 11802–11809. doi:10.1021/acs.jafc.0c03757.
- [9] Y. Meng, Z. Wei, C. Xue, Protein fibrils from different food sources: A review of fibrillation conditions, properties, applications and research trends, *Trends Food Sci Technol.* 121 (2022) 59–75. doi:10.1016/j.tifs.2022.01.031.
- [10] T.P.J. Knowles, R. Mezzenga, Amyloid fibrils as building blocks for natural and artificial functional materials, *Adv Mater.* 28 (2016) 6546–6561. doi:10.1002/adma.201505961.

- [11] X. Wang, Y. Li, C. Zhong, Amyloid-directed assembly of nanostructures and functional devices for bionanoelectronics, *J Mater Chem B*. 3 (2015) 4953–4958. doi:10.1039/c5tb00374a.
- [12] Y.K. Manea, A.M.T. Khan, M. Qashqoosh, A.A. Wani, M. Shahadat, Ciprofloxacin-supported chitosan/polyphosphate nanocomposite to bind bovine serum albumin: Its application in drug delivery, *J Mol Liq.* (2019) 111337. doi:10.1016/j.molliq.2019.111337.
- [13] V. Sharma, A. Kumar, P. Ganguly, A.M. Biradar, V. Sharma, A. Kumar, P. Ganguly, A.M. Biradar, Highly sensitive bovine serum albumin biosensor based on liquid crystal Highly sensitive bovine serum albumin biosensor based on liquid crystal, 104 (2014) 043705. doi:10.1063/1.4863740.
- [14] D. Oboroceanu, L. Wang, E. Magner, M.A.E. Auty, Fibrillization of whey proteins improves foaming capacity and foam stability at low protein concentrations, *J Food Eng.* 121 (2014) 102.
- [15] M. Mohammadian, A. Madadlou, Technological functionality and biological properties of food protein nanofibrils formed by heating at acidic condition, *Trends Food Sci Technol.* 75 (2018) 115–128. doi:10.1016/j.tifs.2018.03.013.
- [16] C. Li, R. Qin, R. Liu, S. Miao, P. Yang, Functional amyloid materials at surfaces/interfaces, *Biomater Sci.* 6 (2018) 462–472. doi:10.1039/c7bm01124e.
- [17] X. Wang, C. Yue, H. Xu, C. Guan, R. Guo, X. Yang, C. Ma, M. Shao, Comparison of emulsifying properties of fibrils formed from whey protein concentrate following induction by nuclei and nuclei fragments, *Int Dairy J.* 123 (2021) 105166. doi:10.1016/j.idairyj.2021.105166.
- [18] Y. Fan, G. Peng, X. Pang, Z. Wen, J. Yi, Physicochemical, emulsifying, and interfacial properties of different whey protein aggregates obtained by thermal treatment, *Lwt.* 149 (2021) 111904. doi:10.1016/j.lwt.2021.111904.
- [19] S. Lam, K.P. Velikov, O.D. Velev, Pickering stabilization of foams and emulsions with particles of biological origin, *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 19 (2014) 490–500. doi:10.1016/j.cocis.2014.07.003.

- [20] Z.L. Almeida, R.M.M. Brito, Structure and aggregation mechanisms in amyloids, *Molecules*. 25 (2020). doi:10.3390/molecules25051195.
- [21] D.M. Fowler, A. V. Koulov, W.E. Balch, J.W. Kelly, Functional amyloid - from bacteria to humans, *Trends Biochem Sci*. 32 (2007) 217–224. doi:10.1016/j.tibs.2007.03.003.
- [22] J.D. Sipe, A.S. Cohen, Review: History of the amyloid fibril, *J Struct Biol*. 130 (2000) 88–98. doi:10.1006/jsbi.2000.4221.
- [23] A.C. Brorsson, J.R. Kumita, I. MacLeod, B. Bolognesi, E. Speretta, L.M. Luheshi, T.P.J. Knowles, D.A. Lomas, C.M. Dobson, D.C. Crowther, Methods and models in neurodegenerative and systemic protein aggregation diseases, *Front Biosci*. 15 (2010) 373–396. doi:10.2741/3626.
- [24] G.G. Glenner, C.W. Wong, Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein, *Biochem Biophys Res Commun*. 120 (1984) 885–890. doi:10.1016/S0006-291X(84)80190-4.
- [25] L.M.T.R. Lima, T. Sisnande, Nutrient-sensing amyloid metastasis, *BioFactors*. 48 (2022) 552–574. doi:10.1002/biof.1825.
- [26] R. Swaminathan, V.K. Ravi, S. Kumar, M.V.S. Kumar, N. Chandra, Lysozyme: A model protein for amyloid research, 2011. doi:10.1016/B978-0-12-386483-3.00003-3.
- [27] K. Tsemekhman, L. Goldschmidt, D. Eisenberg, D. Baker, Cooperative hydrogen bonding in amyloid formation, *Protein Sci*. 16 (2007) 761–764. doi:10.1110/ps.062609607.
- [28] J. Adamcik, R. Mezzenga, Study of amyloid fibrils via atomic force microscopy, *Curr Opin Colloid Interface Sci*. 17 (2012) 369–376. doi:10.1016/j.cocis.2012.08.001.
- [29] C. Veerman, L.M.C. Sagis, J. Heck, E. Van Der Linden, Mesostucture of fibrillar bovine serum albumin gels, *Int J Biol Macromol*. 31 (2003) 139–146. doi:10.1016/S0141-8130(02)00074-0.

- [30] N.K. Holm, S.K. Jespersen, L. V. Thomassen, T.Y. Wolff, P. Sehgal, L.A. Thomsen, G. Christiansen, C.B. Andersen, A.D. Knudsen, D.E. Otzen, Aggregation and fibrillation of bovine serum albumin, *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics*(1) 1774 (2007) 1128–1138. doi:10.1016/j.bbapap.2007.06.008.
- [31] N.K. Pandey, S. Ghosh, S. Dasgupta, Effect of surfactants on preformed fibrils of human serum albumin, *Int J Biol Macromol.* 59 (2013) 39–45. doi:10.1016/j.ijbiomac.2013.04.014.
- [32] S. Nirwal, V. Bharathi, B.K. Patel, Amyloid-like aggregation of bovine serum albumin at physiological temperature induced by cross-seeding effect of HEWL amyloid aggregates, *Biophys Chem.* 278 (2021) 106678. doi:10.1016/j.bpc.2021.106678.
- [33] M. Bhattacharya, N. Jain, S. Mukhopadhyay, Insights into the mechanism of aggregation and fibril formation from bovine serum albumin, *J Phys Chem B.* 115 (2011) 4195–4205. doi:10.1021/jp111528c.
- [34] B.A. Noskov, A.A. Mikhailovskaya, S. Lin, G. Loglio, R. Miller, Bovine Serum Albumin Unfolding at the Air / Water Interface as Studied by Dilational Surface Rheology, *Langmuir.* 26 (2010) 17225–17231. doi:10.1021/la103360h.
- [35] R.P. Putra, Y. Ikumura, H. Horino, A. Hori, I.I. Rzeznicka, Adsorption and Conformation of Bovine Serum Albumin with Blue-Emitting Gold Nanoclusters at the Air/Water and Lipid/Water Interfaces, *Langmuir.* 35 (2019) 16576–16582. doi:10.1021/acs.langmuir.9b02831.
- [36] M.A. Lambrecht, K.J.A. Jansens, I. Rombouts, K. Brijs, F. Rousseau, J. Schymkowitz, J.A. Delcour, Conditions Governing Food Protein Amyloid Fibril Formation. Part II: Milk and Legume Proteins, *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 18 (2019) 1277–1291. doi:10.1111/1541-4337.12465.
- [37] R. Su, W. Qi, Z.H. Å, Y. Zhang, F. Jin, Multilevel structural nature and interactions of bovine serum albumin during heat-induced aggregation process, *Food Hydrocoll.* 22 (2008) 995–1005. doi:10.1016/j.foodhyd.2007.05.021.
- [38] I. Usov, J. Adamcik, R. Mezzenga, Polymorphism complexity and handedness inversion in serum albumin amyloid fibrils, *ACS Nano.* 7 (2013) 10465–10474. doi:10.1021/nn404886k.

- [39] E. Dahal, M. Choi, N. Alam¹, A. Bhirde, S. L. Beaucage, A. Badano Structural evaluation of an amyloid fibril model using small-angle x-ray scattering *Phys. Biol.* 14 (2017) 046001. doi:10.1088/Phys. Biol. 14 (2017) 046001 1478-3975/aa776a.
- [40] P. Meena, N. Kishore, Potential of tetradecyltrimethylammonium bromide in preventing fibrillation/aggregation of lysozyme: biophysical studies, *J Biomol Struct Dyn.* 0 (2021) 1–14. doi:10.1080/07391102.2021.1987989.
- [41] H.R. Barros, M. Kokkinopoulou, I.C. Riegel-vidotti, Gold nanocolloid – protein interactions and their impact on β -sheet amyloid fibril formation, *RSC Adv.* 8 (2018) 980–986. doi:10.1039/C7RA11219J.
- [42] I. Usov, J. Adamcik, R. Mezzenga, Polymorphism in bovine serum albumin fibrils: Morphology and statistical analysis, *Faraday Discuss.* 166 (2013) 151–162. doi:10.1039/c3fd00083d.
- [43] K.J.A. Jansens, M.A. Lambrecht, I. Rombouts, M. Monge Morera, K. Brijs, F. Rousseau, J. Schymkowitz, J.A. Delcour, Conditions Governing Food Protein Amyloid Fibril Formation—Part I: Egg and Cereal Proteins, *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 18 (2019) 1256–1276. doi:10.1111/1541-4337.12462.
- [44] M. Dasgupta, N. Kishore, Selective inhibition of aggregation / fibrillation of bovine serum albumin by osmolytes: Mechanistic and energetics insights, *PLOS.* (2017) 1–26. doi:10.1371/journal.pone.0172208.
- [45] B.A. Noskov, Protein conformational transitions at the liquid-gas interface as studied by dilational surface rheology, *Adv Colloid Interface Sci.* 206 (2014) 222–238. doi:10.1016/j.cis.2013.10.024.
- [46] M.M. Tihonov, O.Yu. Milyaeva, B.A. Noskov, Dynamic surface properties of lysozyme solutions. Impact of urea and guanidine hydrochloride, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 129 (2015) 114–120. doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.03.034
- [47] D.E. Graham, M.C. Phillips, Proteins at liquid interfaces. I. Kinetics of adsorption and surface denaturation, *J Colloid Interface Sci.* 70 (1979) 403–414. doi:10.1016/0021-9797(79)90048-1.

[48] S. Sundaram, J.K. Ferri, D. Vollhardt, K.J. Stebe, Surface Phase Behavior and Surface Tension Evolution for Lysozyme Adsorption onto Clean Interfaces and into DPPC Monolayers : Theory and Experiment, *Langmuir*. 14 (1998) 1208–1218.

[49] J.R. Hunter, P.K. Kilpatrick, R.G. Carbonell, Lysozyme Adsorption at the Air/Water Interface, *J Colloid Interface Sci*. 137 (1990) 462–482.

[50] B. Noskov, A. Mikhailovskaya, Adsorption kinetics of globular proteins and protein/surfactant complexes at the liquid–gas interface, *Soft Matter*. 9 (2013) 9392. doi:10.1039/c3sm51357b.

[51] D.E. GRAHAM, M.C. PHILLIPS, Proteins at Liquid Interfaces II. Adsorption Isotherms, *J Colloid Interface Sci*. 70 (1979) 415–426.

[52] N.P.K. Humblet-Hua, E. Van Der Linden, L.M.C. Sagis, Surface rheological properties of liquid-liquid interfaces stabilized by protein fibrillar aggregates and protein-polysaccharide complexes, *Soft Matter*. 9 (2013) 2154–2165. doi:10.1039/c2sm26627j.

[53] L.N. Arnaudov, R. De Vries, Thermally induced fibrillar aggregation of hen egg white lysozyme, *Biophys J*. 88 (2005) 515–526. doi:10.1529/biophysj.104.048819.

[54] А.А. Белюстин, Аналитическая химия : учебник для студентов высших учебных заведений, обучающихся по специальности “Химия,” 2008.

[55] B.A. Noskov, G. Loglio, R. Miller, Dilational surface visco-elasticity of polyelectrolyte/surfactant solutions: Formation of heterogeneous adsorption layers, *Adv Colloid Interface Sci*. 168 (2011) 179–197. doi:10.1016/j.cis.2011.02.010.

[56] Измайлова В.Н., Ямпольская Г.П., Сумм Б.Д., Поверхностные явления в белковых системах, *Металлоорганическая Химия*. 240 (1988) 240.

[57] B.A. Noskov, Dynamic surface elasticity of polymer solutions, *Colloid Polym Sci*. 273 (1995) 263–270. doi:10.1007/BF00657833.

[58] B.A. Noskov, A.Y. Bilibin, A. V. Lezov, G. Loglio, S.K. Filippov, I.M. Zorin, R. Miller, Dynamic surface elasticity of polyelectrolyte solutions, *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp*. 298 (2007) 115–122. doi:10.1016/j.colsurfa.2006.12.003.

[59] B.A. Noskov, A.V. Akentiev, A.Y. Bilibin, I.M. Zorin, R. Miller, Dilational surface viscoelasticity of polymer solutions, *Adv Colloid Interface Sci.* 104 (2003) 245–271. doi:10.1016/S0001-8686(03)00045-9.

[60] B.A. Noskov, A.G. Bykov, Dilational surface rheology of polymer solutions, *Russ Chem Rev.* 84 (2015) 634–652. doi:10.1016/j.cocis.2010.01.006.

[61] J. M. D. Kalapothakis, R. J. Morris, J. Szavits-Nossan, K. Eden, S. Covill, S. Tabor, C. E. MacPhee, A kinetic study of ovalbumin fibril formation: the importance of fragmentation and end-joining, *Biophysical Journal.* 108(9) (2015) 2300–2311. doi:10.1016/j.bpj.2015.03.021

[62] B.A. Noskov, A. V. Akentiev, A.G. Bykov, G. Loglio, R. Miller, O.Y. Milyaeva, Spread and adsorbed layers of protein fibrils at water – air interface, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 220 (2022) 112942. doi:10.1016/j.colsurfb.2022.112942.