

Министерство образования и науки Российской Федерации  
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего  
образования  
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФИЗИКИ

Кафедра медицинской физики

Направление 03.04.02 – физика

Профиль: медицинская физика

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

СПЕЦИФИКА МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В РАСТВОРАХ  
ГЛОБУЛЯРНОГО БЕЛКА ПО ДАННЫМ ТРАНСЛЯЦИОННОЙ ДИФФУЗИИ

Студент 2 курса  
группы 06-919  
«15» июня 2021г.

Исхакова А.К.

Научный руководитель:  
доцент, к.ф.-м.н.  
«15» июня 2021г.

Блохин Д.С.

Научный консультант  
д.х.н., профессор  
«15» июня 2021г.

Зуев Ю.Ф.

Научный консультант  
м.н.с.  
«15» июня 2021г.

Кусова А.М.

Зав. Кафедры медицинской физики  
д.х.н., профессор  
«15» июня 2021г.

Аганов А.В.

Казань – 2021

## Содержание

Введение	3
1. Литературный обзор	5
1.1. Глобулярные белки	5
1.1.1. Транспортные свойства белков	7
1.1.2. Сывороточный альбумин человеческий	8
1.1.3. Физические и биологические свойства альбумина	9
1.1.4. Комплексообразование системы ионы металлов-альбумин	10
1.2. Диффузия белков в растворе	14
1.2.1. Ядерный магнитный резонанс с импульсным градиентом магнитного поля	15
1.3. Физические модели для описания самодиффузии	19
1.3.1. Гидродинамическая модель Токуямы и Оппенгейма	19
1.3.2. Фрикционный формализм неравновесной термодинамики	20
2. Материалы и методы	22
2.1. Объекты исследования	22
2.2. Определение концентрации УФ	23
2.3. ЯМР эксперименты	24
3. Результаты и обсуждения	25
3.1. Аппроксимация концентрационных зависимостей моделью жестких сфер	29
3.2. Анализ концентрационных зависимостей с помощью феноменологического подхода Винка	32
3.3. Сравнение экспериментов альбумина с ионами металлов в воде/фосфатном буфере	37
Выводы	40
Список публикаций по теме выпускной квалификационной работы	41
Благодарности	42
Список литературы	43

## Введение

Оценка межбелковых взаимодействий при низких и высоких концентрациях макромолекул важны для понимания биологических процессов *in vivo* и *in vitro*, а также для разработки и оптимизации биотехнологических процессов [1-3]. Роль межмолекулярных взаимодействий резко возрастает в концентрированных белковых растворах, где они влияют на структуру и конформацию, растворимость и агрегацию, функционирование белков, а также на термодинамику и кинетику явлений, происходящих в клетке [4].

Практически для всех биосистем большое значение имеет поведение белков в растворах. Белки имеют способность связывать обширный круг органических и неорганических лигандов. Одной из основных функций белков является транспорт физиологических метаболитов [5].

Трансляционная диффузия – это одно из фундаментальных явлений, описывающих подвижность молекул [6]. Важнейшая физико-химическая характеристика белковой молекулы, характеризующая данные о размерах, форме и информацию о белковых межмолекулярных взаимодействиях, коэффициент самодиффузии (КСД) [7].

В данной работе был применен метод ядерного магнитного резонанса с импульсным градиентом магнитного поля (ЯМР ИГМП) для сравнения диффузионной подвижности глобулярного белка – сывороточного альбумина человеческого (САЧ) с диффузионной подвижностью альбумина в присутствии низкомолекулярных лигандов в широком диапазоне концентраций. Полученные концентрационные зависимости коэффициентов самодиффузии альбумина и альбумина в присутствии низкомолекулярных лигандов были проанализированы в рамках феноменологического подхода. Так же, для оценки межмолекулярных взаимодействий, были проведены необходимые расчеты гидродинамических коэффициентов трения белок-белок и белок-растворитель и гидродинамических радиусов альбумина и альбумина в присутствии лигандов.

Целью настоящей работы является оценка влияния низкомолекулярных лигандов на трансляционную диффузию сывороточного альбумина человеческого по данным ядерного магнитного резонанса с импульсным градиентом магнитного поля.

Были поставлены следующие задачи:

1. Получить концентрационные зависимости коэффициентов самодиффузии альбумина и альбумина в присутствии низкомолекулярных лигандов методом ядерного магнитного резонанса с импульсным градиентом магнитного поля (ЯМР ИГМП).
2. Проанализировать полученные зависимости в рамках феноменологического подхода, основанного на фрикционном формализме неравновесной термодинамики (подход Винка).
3. Оценить влияние низкомолекулярных лигандов на межмолекулярные взаимодействия белок-белок и белок-растворитель в изучаемых системах.

Работа выполнена в лаборатории биофизической химии наносистем Казанского института биохимии и биофизики КазНЦ РАН.

# 1. Литературный обзор

## 1.1. Глобулярные белки

Белки – это высокомолекулярные соединения, состоящие из большого числа аминокислот. Большая часть всех органических веществ, которые содержатся в живой клетке, складываются из белков [8]. Молекулы белка состоят из одной или нескольких полипептидных цепей, организованных в характерную трехмерную структуру. Белки имеют определенный химический состав. Их молекулярные массы охватывают интервал от 6000 до более миллиона дальтон (ДА) [9]. Белки, по структуре, могут быть упорядоченные, которые имеют жесткую структуру, и неупорядоченные. Неупорядоченные белки включают в себя хаотичное расположение белковой цепи и, в свою очередь, могут находиться в нескольких различных конформационных состояниях в зависимости от присутствия определенных ионов, значениях рН и взаимодействия с белками-партнерами [10].

Существует несколько уровней организации белков: первичная, вторичная, третичная и четвертичная структуры (рис.1).

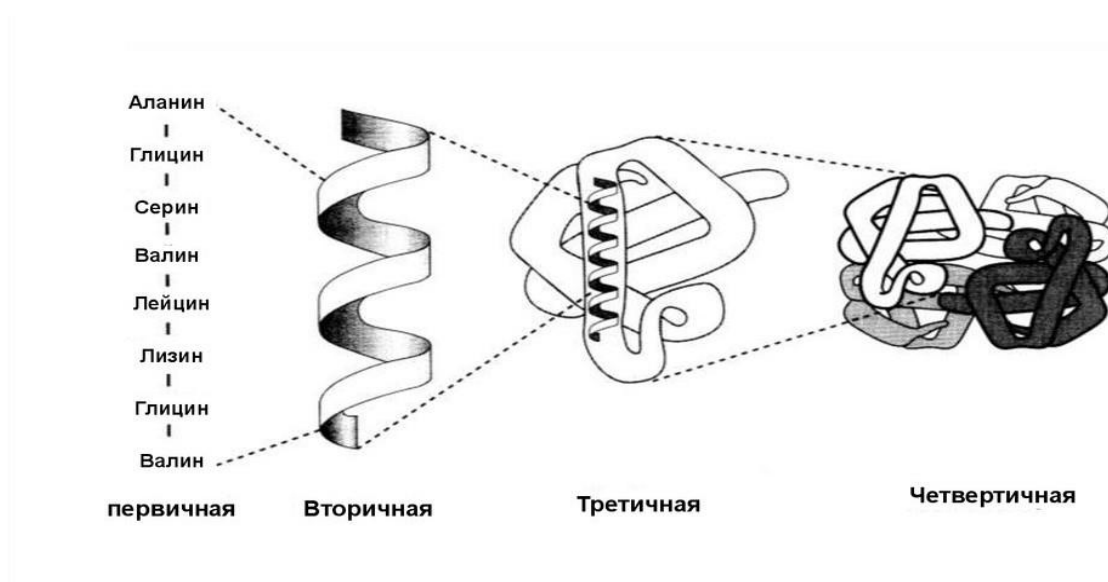


Рисунок 1 – Уровни структурной организации белков: первичная (аминокислотная последовательность), вторичная, третичная (глобула) и четвертичная структуры

Первичная структура – это последовательность аминокислотных остатков полипептидной цепи. Следующий уровень организации более высокий – это вторичная структура, т.е. пространственная, которая имеет  $\alpha$ -спирали и  $\beta$ -складчатые листы, повороты и петли [11]. Молекулы белка на различных участках имеют разную структуру и могут изменять её, в зависимости от внешних условий [12].

Аминокислотные последовательности, участки которых организованы во вторичные структуры, могут быть упорядочены на уровне выше, при этом образуя глобулу, клубок или фибриллу [13]. Так возникает третичная структура – сложная трехмерная конфигурация. У некоторых третично упорядоченных белков полипептидные цепи могут образовывать молекулярный комплекс, образующий четвертичную структуру (рис.1) [14].

Так же белки принято разделять на три основные группы: глобулярные, фибриллярные и мембранные белки (рис.2) [15].

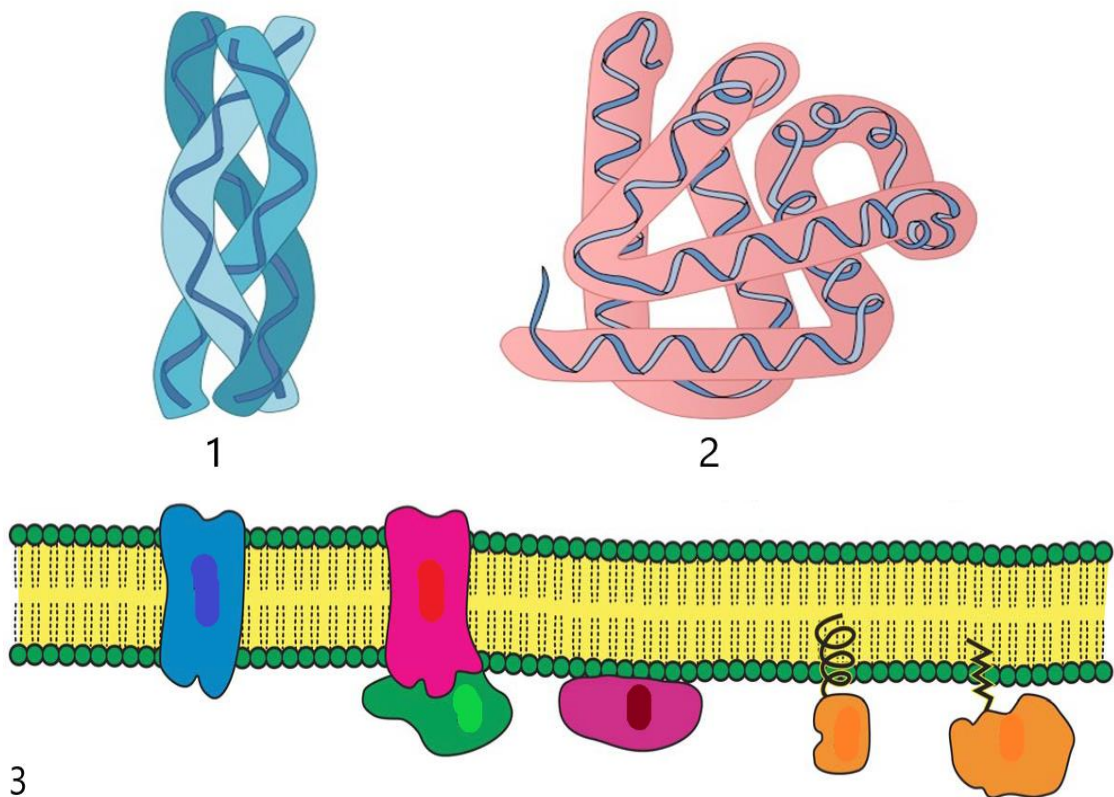


Рисунок 2 – Структура: 1 – фибриллярного, 2 – глобулярного и 3 – мембранного белков

Глобулярные белки названы исходя из их приблизительно сферической формы и являются наиболее распространенными белками в природе [16]. Практически все глобулярные белки содержат значительное количество  $\alpha$ -спиралей и  $\beta$ -листов, свернутых в компактную структуру, которая стабилизируется как полярными, так и неполярными взаимодействиями [17].

Глобулярная трехмерная структура формируется спонтанно и сохраняется в результате взаимодействий между боковыми цепями аминокислот. Чаще всего боковые цепи гидрофобных аминокислот скрыты, плотно упакованы внутри белка, вне контакта с водой [18]. Боковые цепи гидрофильных аминокислот находятся на поверхности глобулярных белков, контактирующих с водой [19]. Следовательно, белки обычно хорошо растворяются в водных растворах. В зависимости от своей структуры, белки выполняют такие функции, как: катализ, связывание с различными органическими и неорганическими лигандами и регуляцию химических реакций, которые протекают в организме [20].

Глобулярные белки имеют компактные складчатые структуры, которые обычно стабильны в водном растворе [21]. Эти белки стабильны, потому что, свободная энергия, высвобождаемая при свертывании белка в его нативную конформацию, относительно энергии, высвобождаемой при разворачивании, мала [22]. Это связано с тем, что сворачивание белка требует энтропийных затрат [23]. Поскольку первичная последовательность полипептидной цепи может образовывать многочисленные конформации, нативная глобулярная структура незначительно ограничивает ее, а гидрофобные взаимодействия стабилизируют структуру [24]. Разность свободной энергии между развернутым и свернутым состояниями белка зависит от изменений энтальпии и энтропии, об этом говорит второй закон термодинамики [25].

### ***1.1.1. Транспортные свойства белков***

Транспортный белок, так же его еще называют трансмембранным насосом, сопроводительным белком, катионным или анионным транспортным

белком, транспортером – это белок, который выполняет функцию перемещения других веществ в организме [26]. Транспортные белки жизненно важны для роста и жизни всех живых существ [27]. Белки - транспортеры связывают, активно и избирательно переносят определенные молекулы, аминокислоты и различные ионы внутрь и наружу клетки [28].

Ионные каналы участвуют в движении ионов, малых молекул или макромолекул, таких как другой белок, через биологическую мембрану [29]. Белки могут способствовать перемещению веществ путем облегченной диффузии, т.е. пассивного переноса, или активного переноса. Эти механизмы движения известны как транспорт, опосредованный перевозчиком [30].

### ***1.1.2. Сывороточный альбумин человеческий***

Сывороточный альбумин человека – это глобулярный белок плазмы крови, который имеет жесткую структуру [31]. Это самый распространенный белок в плазме крови человека, он составляет около половины сывороточного белка – концентрированной смеси глобулярных белков. Вырабатывается в печени [32]. Альбумин растворим в воде и является мономерным [33]. Данный белок также может включать в себя альбумины яичного белка (авидин, кональбумин, овальбумин), С-реактивный белок, лактальбумин (альфа-лактальбумин), парвальбумин, рицин и бычий сывороточный альбумин [34]. Альбумин переносит гормоны, жирные кислоты ионы металлов и другие соединения, буферизует рН и поддерживает онкотическое давление [35]. В сыворотке диапазон концентраций альбумина составляет примерно 35–50 г/л [36].

Общая площадь поверхности молекулы альбумина очень велика, поэтому данный белок больше всего подходит для выполнения функции переносчиков многих веществ, которые транспортируются кровью и плохо растворяются в воде [37]. Исходя из этого сывороточный альбумин так же называют "молекула-такси" [38].

### *1.1.3. Физические и биологические свойства САЧ*

Альбумины помимо воды, так же растворимы в кислотах, солевых растворах, щелочах; при гидролизе молекулы данного белка распадаются на различные аминокислотные остатки [39]. Их относительная молекулярная масса составляет примерно 65000 дальтон [40].

Различные методы выделения и очистки белков основаны на физических свойствах белков, таких как ионизация, гидратация и растворимость [41]. Белки содержат способные к ионизации аминокислотные остатки, такие как аргинин, лизин и глутаминовая кислота, следовательно, они являются полиэлектролитами. При определенном рН количество отрицательно и положительно заряженных частиц становится одинаковым, такое состояние называется изоэлектрическим – полный заряд молекулы равен нулю [42]. Значение рН, при котором белок находится в изоэлектрическом состоянии, называется изоэлектрической точкой (рI) [43]. У альбумина изоэлектрическая точка составляет  $pI = 4.9$  [44].

Полярные группы белка способны гидратироваться, т.е. взаимодействовать с водой. На поверхности молекулы альбумина гидрофильных групп значительно больше, чем внутри, существует такое понятие, как «гидратная оболочка» - это слой воды, которым окружена молекула белка [45]. Также растворимость белка в воде зависит от формы и размеров молекулы, от величины суммарного заряда белка и от количества гидрофильных групп. Растворимость белков в изоэлектрическом состоянии обычно бывает снижена, это обусловлено тем, что молекулы белка в таком состоянии электронейтральны и между ними отсутствуют силы взаимного отталкивания, в этом случае они могут «слипаться» за счет ван-дер-ваальсовых сил, ионных и водородных связей и гидрофобных взаимодействий [46].

Также, растворимость может зависеть от присутствия каких-либо растворенных веществ. Определенные белки растворяются в присутствии малых концентраций нейтральных солей, но не могут растворяться в дистиллированной воде. Это объясняется тем, что ионы солей, взаимодействуя с противоположно

заряженными группами молекул белков, разрушают солевые мостики между молекулами белков. Повышение концентрации солей (увеличение ионной силы раствора) оказывает обратное действие [47].

При денатурации происходит снижение растворимости белков. Поэтому денатурацию часто используют для удаления белков из растворов [48].

Основными биологическими функциями альбумина являются транспорт молекул и резерв аминокислот [49]. Проявляют высокую связывающую способность по отношению к различным низкомолекулярным соединениям [50].

#### ***1.1.4. Комплексообразование системы ионы металлов – альбумин***

В основе функционирования многих белков лежит образование комплексов между различными веществами – лигандом – и центрами связывания, лежащими на молекуле белка [51]. Лигандами могут выступать низкомолекулярные вещества и макромолекулы [52]. Взаимодействие белка с лигандом высокоспецифично и обратимо, что определяется строением центра связывания белка. Активный центр белков - участок, находящийся в углублении молекулы белка, сформирован радикалами аминокислотных остатков полипептидной цепи, которые собраны на определенном пространственном участке при формировании третичной структуры, и способный связываться с лигандами [53]. Даже небольшие нарушения общей конформации альбумина в ходе направленных изменений его первичной структуры или же определенных условий окружающей среды приводят к изменению функциональных и химических свойств радикалов, которые в свою очередь формируют активный центр, и затем к нарушению функции лиганда [54]. Центр связывания белка с лигандом располагается между – радикалами аминокислот. Определенные радикалы белка могут перемещаться относительно друг друга при взаимодействии с лигандом, это облегчает дальнейшее функционирование белка [55]. Основное свойство белков, лежащее в основе их функционирования – это избирательность присоединения специфических лигандов к определённым

участкам молекулы белка [56]. Активный центр белков разрушается, это происходит за счет денатурации, что приводит к утрате биологической активности. Очень часто формирование активного центра происходит таким образом, что к функциональным группам его радикалов доступ воды ограничен, т.е. создаются условия для связывания лиганда с радикалами аминокислот [57].

Отдельные специфичные центры связывания соответствуют различным структурным классам связываемых веществ на молекуле альбумина [58]. Многим лигандам альбумина известна направленность их транспорта в организме от одних органов и тканей к другим. К примеру, ионы тяжелых металлов, необходимы быть доставлены в соответствующие органы выделения [59]. В ряде случаев, лиганд выборочно высвобождается в капиллярах определенных тканей, но при всем этом "разгрузка" должна быть быстрой и полной [60]. Простейшая избирательность "адреса доставки" может быть достигнута снижением равновесной концентрации свободного лиганда в тканях-адресатах, за счет быстрого всасывания и регуляции связывания лигандов с альбумином структурами самой ткани [61].

Механизм изменения в организме определенных физико-химических характеристик, таких как рН, ионная сила, ионный состав и температура, то есть направленное отклонение от среднего отдельных компонентов гомеостаза крови и межклеточной жидкости, способствует регуляции скорости, прочности и емкости связывания отдельных классов транспортируемых альбумином лигандов [62]. Механизм регуляции имеется в свойствах самого белка-транспортера [63]. У сывороточных альбуминов имеются изменения структурных и физико-химических свойств в области средних физиологических значений рН и температуры (структурная перестройка происходит при 30° - 40°С) [64]. Известно и влияние этих переходов на связывание некоторых классов лигандов. Эти переходы могут служить предпосылкой для механизма регуляции транспорта [65].

Однако даже в нормальном физиологическом состоянии значения температуры и рН могут подвергаться значительным отклонениям от средних

значений в межклеточном пространстве отдельных тканей. Причинами отклонений могут служить, например, процессы ионного обмена на поверхности клеток [66]. Высокой эффективности ионообменных процессов способствует значительное отношение поверхности к объему в межклеточных щелях, по сравнению с крупными сосудами [67].

Альбумин играет важную роль в распределении метаболитов, гормонов, лекарств и основных ионов переходных металлов в организме человека. Это достигается наличием в его молекуле нескольких специфических сайтов связывания [68]. Эти участки также используются токсичными ионами металлов, попадающими в кровь человека.

В человеческом организме различные металлы играют весьма важную роль [69]. Основными из них являются натрий, калий, кальций, магний, которые содержатся в человеческом теле в количестве от десятых долей до нескольких процентов [70]. Металлы, такие как кобальт, молибден, цинк присутствуют в организме в гораздо меньших концентрациях и существуют в связанном состоянии с ферментами. Совокупное содержание данных металлов составляет менее процента [71].

Взаимодействие иона с поверхностью белка происходит с участием их гидратных оболочек [72]. Эффективное уменьшение поверхностного заряда белка происходит в результате прочного связывания с ионами металлов большего радиуса. Это приводит к тому, что основным видом взаимодействия между белковыми молекулами станет диполь-дипольное притяжение [73].

Человеческий сывороточный альбумин является важным физиологическим транспортером основного иона металла  $\text{Cu}^{2+}$ . Основная роль меди заключается в катализе метаболических окислений и переносе электронов (например, в цитохромоксидазе, ключевом элементе дыхательной цепи) [74]. Альбумин контролирует распределение меди между внутренними органами. В крови человека содержится около 15% меди, связанной с альбумином как  $\text{Cu(II)}$  [75].

Ион металла, взаимодействуя с белковой поверхностью, прочно связывается с отрицательно заряженной группой на белке и может образовывать комплекс на макромолекуле белка с общей гидратной оболочкой [76]. В этом случае металлические ионы полностью компенсируют локальный поверхностный заряд на молекуле белка [77]. В небольших концентрациях повышают растворимость белков [78]. При уменьшении значения кислотности раствора, заряд молекулы альбумина в присутствии ионов металлов растет, чем вызывает разворачивание белковой молекулы за счет электростатического отталкивания различных участков полипептидной цепи друг от друга, в результате чего увеличивается гидродинамический радиус [79].

## 1.2. Диффузия белков в растворе

Диффузия белковых молекул в водных растворах представляет большой интерес для изучения, обусловленный необходимостью понимания механизмов функционирования и состояния разных белковых молекул во внутренней среде организма, таких как лимфа, тканевая жидкость и кровь [80]. В данный момент имеется огромный экспериментальный материал по самодиффузии глобулярных белковых молекул в зависимости от кислотности, концентрации ионов и белка, а также других характеристик водных растворов [81].

По литературным данным мы можем найти информацию о самодиффузии различных белковых молекул по размеру и структуре в зависимости от конформации, а также от агрегации белков [82].

В растворах поведение белков различается по сравнению с низкомолекулярными веществами. Белковая молекула в различных растворах, находится в определенном конформационном состоянии, когда могут происходить изменения формы и размера белка, следовательно, и коэффициента диффузии [83].

Процессы агрегации имеют особое значение для белковых систем, поскольку они происходят при патологических состояниях и при нормальном функционировании. Изменение коэффициента самодиффузии может быть информативным для изучения агрегации, которая связана с изменением размеров молекул в растворе [84]. Наиболее информативный метод для изучения самодиффузии белков в растворах является метод ядерного магнитного резонанса с импульсным градиентом магнитного поля (ЯМР ИГМП). Для эффективного использования ЯМР, также при исследовании конкретных систем обязательным является учитывать особенности данного метода, которые позволяют наблюдать сигнал от белковой молекулы и динамику белка [85].

### 1.2.1. Ядерный магнитный резонанс с импульсным градиентом магнитного поля.

Трансляционная диффузия является наиболее фундаментальной формой транспорта в химических и биохимических системах [86]. ЯМР ИГМП представляет собой удобный и неинвазивный способ измерения поступательного движения [87]. В этом методе ослабление эхо-сигнала от последовательности импульсов спин-эхо Хана, содержащей импульс градиента магнитного поля в каждом периоде между двумя импульсами  $\tau$  используется для измерения смещения наблюдаемых спинов [88].

Применение метода ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля для измерения коэффициента самодиффузии молекул (КСД) основано на потере фазовой когерентности ядерных спинов за счет трансляционных перемещений молекул в таком поле. Метод ЯМР был разработан Стейскалом и Таннером [89].

Из уравнения :

$$\omega_{eff}(n, r) = n * (\omega_0 + \gamma * (g * r)) \quad (1)$$

где  $g$  определяется градусом градиентной компоненты поля, параллельной  $B_0$ , обеспечивая основу для измерения диффузии [90]. Наиболее распространенный подход заключается в использовании простой модификации последовательности спин-эхо-импульсов Хана, в которой равные прямоугольные градиентные импульсы длительностью  $\delta$  вставляются в каждый период  $\tau$ , последовательность «Стейскала и Таннера» или «последовательность PFG». (Рис.3) [91]. Применение градиента магнитного поля в импульсах позволяет обойти ряд экспериментальных ограничений: (а) Поскольку во время получения данных градиент отключен, ширина линии не увеличивается из-за градиента, и, таким образом, метод подходит для измерения нескольких коэффициентов диффузии одновременно. (б) Для градиентно-расширенного спектра РЧ-мощность не должна увеличиваться. (в) Время, в течение которого измеряется диффузия, четко определено, поскольку градиент применяется импульсами; это особенно важно для исследований ограниченной

диффузии [92]. Поскольку градиент применяется импульсами, можно отделить эффекты диффузии от спин-спиновой релаксации [93]. Как правило, применяемые градиентные импульсы намного сильнее любых фоновых градиентов, которые могут присутствовать, в результате градиенты фона (например, из-за различий в восприимчивости в образце, неоднородностей в основном магнитном поле и т. д.) не будут учитываться в анализе, приведенном ниже. Механизм работы метода ЯМР схематически показан на рис.3. Допустим, что есть ансамбль диффундирующих спинов в равновесии (т.е. суммарная намагниченность ориентирована вдоль оси  $z$ ). Применяется РЧ-импульс  $\pi/2$ , который поворачивает макроскопическую намагниченность с оси  $z$  в плоскость  $x$ - $y$  (т.е. перпендикулярно статическому полю). В течение первого периода  $\tau$  в момент времени  $t_1$  применяется градиентный импульс длительностью  $\delta$  и величиной  $g$ , так что в конце первого периода  $\tau$  спин  $i$  испытывает фазовый сдвиг:

$$\varphi_i(\tau) = \gamma B_0 * \tau + \gamma * G \int_{t_1}^{t_1+\delta} z_i(t) dt \quad (2)$$

где первый член представляет собой фазовый сдвиг из-за основного поля, а второй из-за градиента.

Уравнение 2 берет в рассмотрение градиент постоянной амплитуды, поэтому величину градиентного импульса  $g$  целесообразно было убрать из уравнения.

По сравнению с уравнением 3:

$$\varphi(t) = \gamma * B_0 * t + \gamma \int_t^0 g(t') * z(t') dt \quad (3)$$

В конце первого периода  $\tau$  подается РЧ-импульс  $\pi$ , который имеет эффект реверсирования знака прецессии, т.е. знака фазового угла или, аналогично знак применяемых градиентов и статического поля. В момент времени  $t_1+\Delta$  применяется второй градиентный импульс такой же величины и длительности ( $\pi$  - импульс имеет эффект изменения знака первого градиентного импульса, это

приводит к идее «эффективного» градиента поля). Если спины не претерпели какого-либо поступательного движения относительно оси  $z$ , эффекты двух приложенных градиентных импульсов компенсируются и все спины рефокусируются [94].

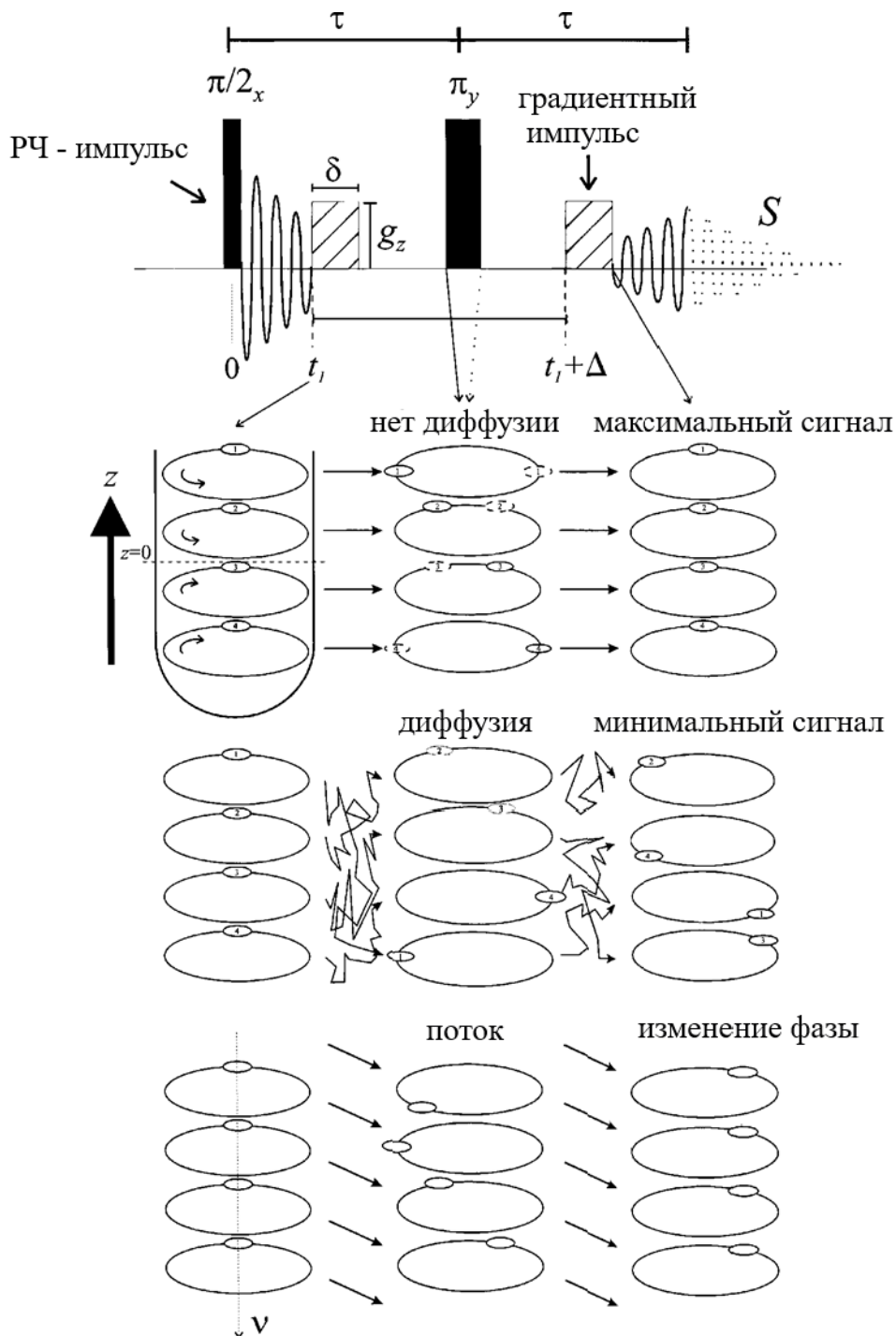


Рисунок 3 – Ядерный магний резонанс с импульсным градиентом магнитного поля (ЯМР с ИГМП).

При сдвигах вращения степень рефазировки из-за примененного градиента пропорциональна смещению в направлении градиента (т.е. в направлении  $z$ ) в периоде  $\Delta$  (т. е. длительность между передними фронтами градиентных импульсов). Таким образом, в конце последовательности эхо-сигналов полный фазовый сдвиг спина  $i$  относительно положения  $z = 0$  определяется выражением:

$$\varphi_i(2\tau) = \gamma g \left\{ \int_{t_1}^{t_1+\delta} z_i(t) dt - \int_{t_1+\delta}^{t_1+\Delta+\delta} z_i(t') dt' \right\} \quad (4)$$

Проводя серию экспериментов при варьировании одного из двух параметров  $\delta$  или  $g$  при постоянных временных характеристиках эксперимента, в координатах  $\lg [A/A_0]$  от  $\gamma^2 g^2 \delta^2 t_d$  получают, так называемые, кривые диффузионных затуханий - сигнала стимулированного спинового эха (рис.4) [95]. В простейшем случае в многофазных системах, характеризующихся различными КСД  $D_i$  и временами релаксации  $T_{1i}$  и  $T_{2i}$ , диффузионное затухание стимулированного эхо описывается выражением вида:

$$A(2\tau, \tau_1, g^2) = \frac{A(0)}{2} \sum_{i=1}^N p_i \exp[-\gamma^2 \delta^2 g^2 D_i t_d] \quad (5)$$

где  $p_i$  – вес компоненты, характеризующейся КСД  $D_i$  и временами релаксации  $T_{1i}$  и  $T_{2i}$ .

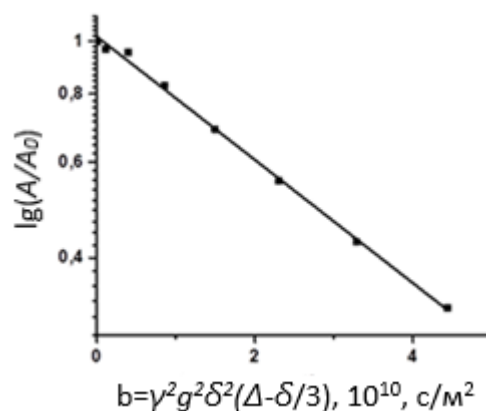


Рисунок 4 – Диффузионный спад интенсивности затухания САЧ.

### 1.3. Физические модели для описания самодиффузии

В теории, для описания самодиффузии, выделяют несколько моделей.

Первые модели имеют феноменологический характер, которые основываются на эффекте пространственных помех, теории свободного объема и гидродинамике. Они точно описывают экспериментальные данные. Феноменологические модели включают в себя один тип взаимодействия частиц. И главный принцип таких моделей – это согласованность полученных экспериментальных данных с физическими принципами [96].

Следующий тип модели, это полуфеноменологический. Данный подход, основан на формализме Стокса-Энштейна, связывает коэффициент трения  $f$  и КСД диффундирующей частицы  $D_s$ .

Коэффициент трения это функция формы частицы, ее размера и вязкости раствора  $\eta$  [97]. Зависимость вязкости раствора от молярной концентрации  $C$  выражается зависимостью, которая имеет феноменологический характер:

$$\eta = \eta_s (1 + [\eta]C + k_H [\eta]^2 C^2) \quad (6)$$

где  $k_H$  – коэффициент Хаггинса,  $[\eta]$  – внутренняя вязкость белка,  $\eta_s$  – вязкость растворителя.

#### 1.3.1. Гидродинамическая модель Токуямы и Оппенгейма

Эта гидродинамическая модель для твердых сфер основана на решении уравнений Навье-Стокса [98]. Случай твердых сфер подходит для описания глобулярных белков [99]:

$$\frac{D_s}{D_s^0} = \frac{1 - 9\varphi/32}{1 + H(\varphi) + \left(\frac{\varphi}{\varphi_0}\right) / \left(1 - \frac{\varphi}{\varphi_0}\right)^2} \quad (7)$$

где  $\varphi_0 = 0,572$  – концентрация плотной упаковки сфер.

$$H(\varphi) = \frac{2b^2}{1-b} - \frac{c}{1+2c} - \frac{bc(2+c)}{(1+c)(1-b+c)} \quad (8)$$

$$b = (9/8)^{1/2}, \quad c = 11\varphi/16$$

Данная модель не учитывает межмолекулярные взаимодействия. Масштаб её применения ограничен геометрической формой молекул. Но, эта модель даёт точное описание полученных экспериментальных данных коэффициента самодиффузии.

### 1.3.2. Фрикционный формализм неравновесной термодинамики

Данный подход, в более точной и абсолютной форме был сформулирован Винком, базирующийся на фрикционном формализме неравновесной термодинамики [100]. Основу феноменологического подхода составляют базовые принципы неравновесной термодинамики для кинетических коэффициентов, связанных с соотношениями Онзагера [101,102]. Данный подход Винка пользуется коэффициентами гидродинамического трения между растворителем и растворенным веществом, а также между молекулами растворенного вещества, и в тоже время рассматривает и связывает коэффициенты самодиффузии с коэффициентами трения белок-белок [103].

Этим образом, такой подход содержит так называемые феноменологические параметры, которые, в свою очередь могут быть объяснены другими, более сложными и углубленными теориями [104]. Мы рассматриваем данную теорию в применении к глобулярным белкам.

Подход Винка для КСД частицы белка дает:

$$\frac{D_s}{D_s^0} = \frac{f_{12}c_1}{f_{12}c_1 + f_{22}c_2} \quad (9)$$

где  $D_s^0$  – коэффициент самодиффузии частицы при бесконечном разбавлении,  $f_{12}$  – молярный коэффициент трения между растворителем и растворенным

веществом,  $f_{22}$  – молярный коэффициент трения между молекулами растворенного вещества,  $c_1$  – молярная концентрация растворителя,  $c_2$  – молярная концентрация растворенного вещества.

Сумма объемных фракций растворенного вещества и растворителя равна 1, мы получаем:

$$c_1v_1+c_2v_2=1 \quad (10)$$

где  $v_1$  – парциальный объем молекулы растворителя,  $v_2$  – парциальный объем растворенного вещества.

Теперь, если обозначить:

$$\rho = f_{22}v_1/f_{12}v_2 \text{ и } \varphi = cv_2 \quad (11)$$

в таком случае уравнение (7) примет вид:

$$\frac{D_s}{D_s^0} = \frac{1}{1 + \rho \frac{\varphi}{1 - \varphi}} \quad (12)$$

где  $\rho$  – безразмерный параметр аппроксимации – который определяет связь коэффициента самодиффузии с гидродинамическими коэффициентами трения,  $\varphi$  – объемная доля концентрации вещества.

Выражение (12) содержит безразмерные параметры и используется для описания концентрационных зависимостей коэффициента самодиффузии белковых молекул в растворе.

## 2. Материалы и методы

### 2.1. Объект исследования

В качестве материала для исследования был выбран глобулярный белок: сывороточный альбумин человеческий (САЧ) с молекулярной массой  $M = 65$  кДа (рис. 5). Для измерения концентрационных зависимостей коэффициента самодиффузии (КСД) альбумина, образцы были приготовлены в водном растворе ( $H_2O + D_2O / 90\% + 10\%$ ),  $pH = 6.9$ . Концентрации белковых растворов определяли с помощью метода ультрафиолетовой спектрофотометрии. Растворы с альбумином готовили различных концентраций, перед смешиванием растворов альбумина и солей металлов, белок прошел очистку методом ультрацентрифугирования, при этом использовали колонки марки Zeba Spin Desalting Columns and Plates, 40K MWCO. Для экспериментов брали соли металлов высокой чистоты:  $CuCl_2$ ,  $MgCl_2$ . В пропорции альбумин – хлорид металла (1:10). Для альбумина с ионами меди  $pH = 5.4$ , с ионами магния  $pH = 6.3$ . При разных концентрациях  $pH$  стабильно. Для сравнения результатов были приготовлены аналогичные образцы в Na – фосфатном буфере (25 ммоль) со значением  $pH = 7.4$ . Приготовление буфера проходило следующим образом, брали две соли  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  (0.752 г.) и  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$  (0.078 г.) и растворяли в  $\mu q$  – воде.

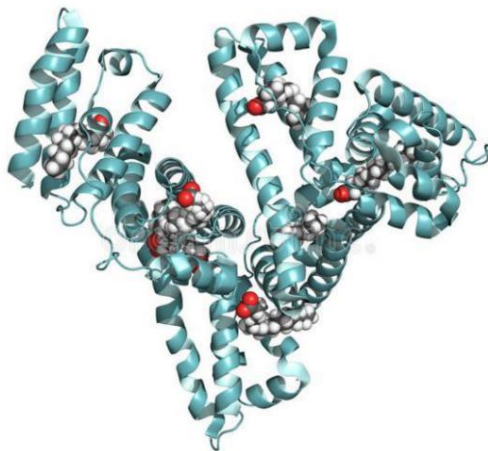


Рисунок 5 – Пространственная структура САЧ.

## 2.2. Определение концентрации методом УФ

Концентрацию белка определяли с помощью ультрафиолетовой спектрофотометрии на длине волны 280 нм, распределение длин волн которого, находится в диапазоне от ультрафиолетового (УФ) до видимого света. Получаем УФ – спектры (рис.6). По ним определяем интенсивность и базовую линию. Затем по формуле рассчитываем концентрацию нашего образца:

$$C = (I / \varepsilon) * M \quad (13)$$

где  $I$  – интенсивность,  $\varepsilon$  - коэффициент экстинкции =  $36600 \text{ моль}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ,  
 $M$  - молярная масса =  $65000 \text{ г/моль}$ .

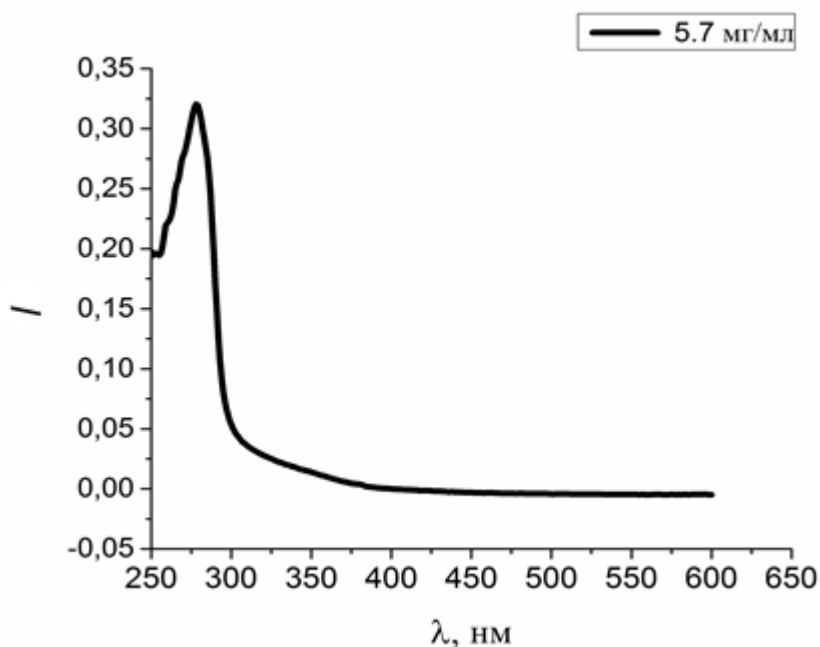


Рисунок 6 –.УФ-спектр. Максимум интенсивности поглощения света САЧ

### 2.3. ЯМР – эксперименты

Эксперименты проводились на ЯМР спектрометре Bruker AVANCE III (600 МГц), датчик которого имеет градиентную катушку, которая создает максимальный градиент магнитного поля 55 Гс/см (рис.7). Для измерения КСД (коэффициент самодиффузии) белка мы использовали импульсную последовательность «спин-эхо» с биполярными градиентами. Так же использовали экспериментальные параметры такие как, время между повторами 2-5 с, длительность  $90^\circ$  импульса 10-13 мкс, ширина спектра 13 ppm. Амплитуда градиента поля изменялась от 2% до 95% от его максимального значения с шагом 8-32 при постоянном времени диффузии ( $\Delta = 0,05$  с) и длительности градиента ( $\delta = 3000 - 8000$  мс). Измеряли КСД на ядрах протонов  $^1\text{H}$ . Обработывали данные с помощью программного обеспечения Bruker Topspin 3.5.



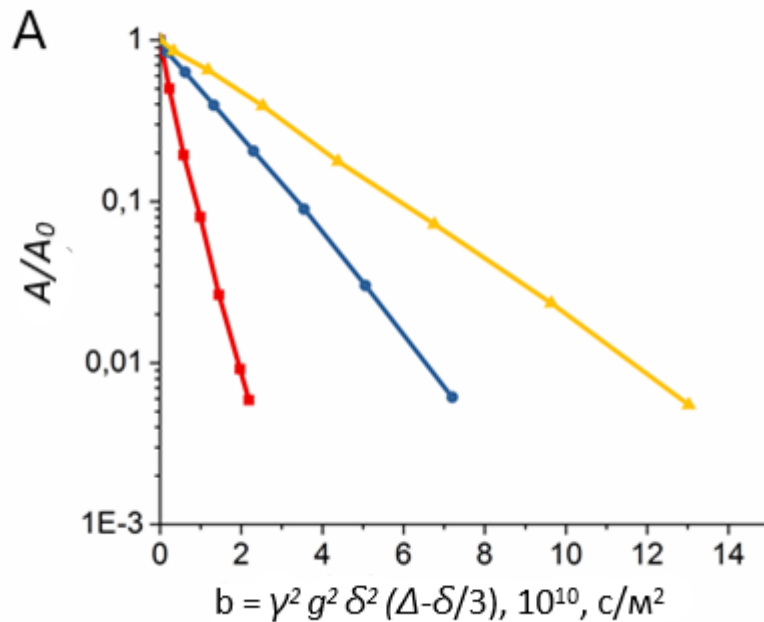
Рисунок 7 – ЯМР спектрометр Bruker AVANCE.

### 3. Результаты и обсуждения

В широком диапазоне концентраций белка в водном растворе наблюдались моноэкспоненциальные диффузионные спады (рис. 8). Амплитуда спинового эха  $A(g)$ , для диффузионного спада, с увеличением градиента магнитного поля  $g$  описывалась уравнением:

$$\frac{A(g)}{A(0)} = \exp(-D_s \gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \frac{\delta}{3})) \quad (14)$$

где  $\Delta$  – время диффузии,  $A(0)$  – амплитуда спинового эха,  $\delta$  – длительность градиентного поля,  $\gamma$  – гиромагнитное отношение для протонов.



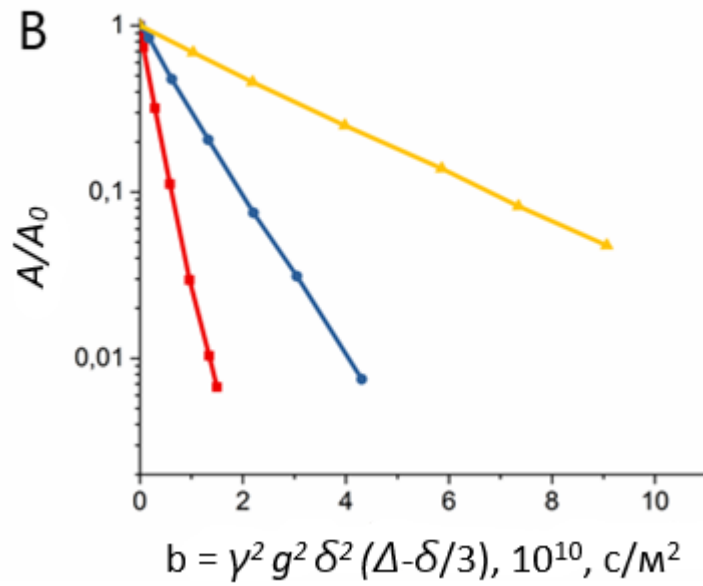
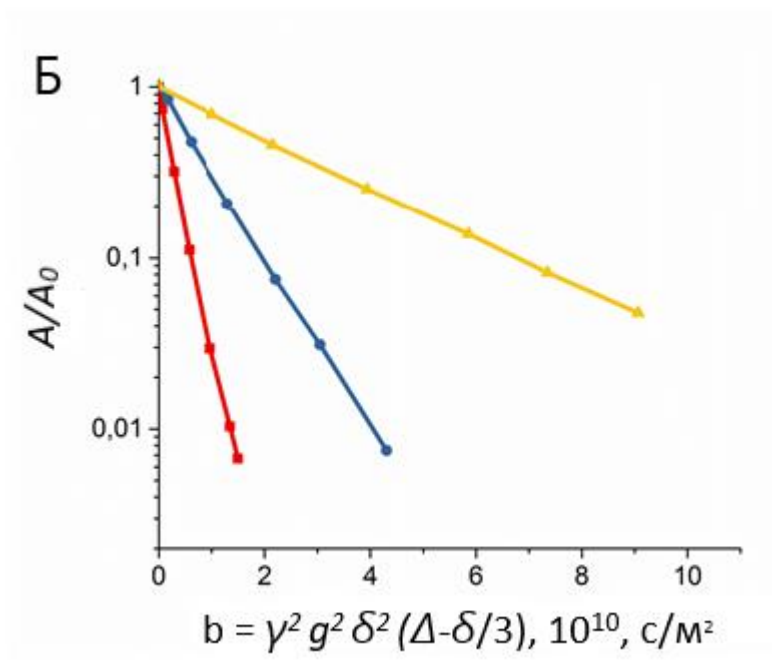


Рисунок 8 – Диффузионные спады: А- альбумин, Б - альбумин в присутствии ионов меди, В - альбумин в присутствии ионов магния при разных концентрациях 8.3 мг/мл (красная), 22.1 мг/мл (синяя) и 65 мг/мл (желтая).

Моноэкспоненциальные диффузионные спады наблюдаются во всем изучаемом концентрационном диапазоне альбумина, что свидетельствует об одном типе диффундирующих частиц.

Здесь КСД определяется по наклону затухания интенсивности сигнала, соответствующие уравнению (14).

Были получены гидродинамические радиусы альбумина и альбумина в присутствии ионов меди и альбумина в присутствии ионов магния (таблица 1), радиусы были рассчитаны по уравнению Стокса-Энштейна:

$$D = \frac{KT}{6\pi\eta R} \quad (15)$$

где  $T$  – абсолютная температура,  $\eta$  – вязкость среды,  $K$  – постоянная Больцмана,  $R$  – радиус диффундирующей молекулы,  $D$  – коэффициент диффузии.

Это уравнение (15) применяется для описания самодиффузии молекулы, которая представляет собой жесткую, несжимаемую частицу.

Таблица 1 – Гидродинамические радиусы альбумина и альбумина в присутствии ионов меди и ионов магния в воде и буферном растворе

Образец	$D_s \cdot 10^{-11}, \text{ м}^2/\text{с}$	$R, \text{ нм(в воде)}$	$D_s \cdot 10^{-11}, \text{ м}^2/\text{с}$	$R, \text{ нм(в буферном растворе)}$
САЧ	9.7	3.3	9.5	3.5
САЧ с медью	8.7	3.1	8.7	3.2
САЧ с магнием	8	3.0	8.6	3.1

Из таблицы 1, мы видим незначительное уменьшения среднего размера белка в пределах погрешности, это говорит нам о том, что размер диффундирующей частицы не меняется при добавлении низкомолекулярных лигандов.

Полученные коэффициенты самодиффузии альбумина и альбумина в присутствии ионов металлов представлены на рисунках 9 – без нормировки и 10 – нормированная.

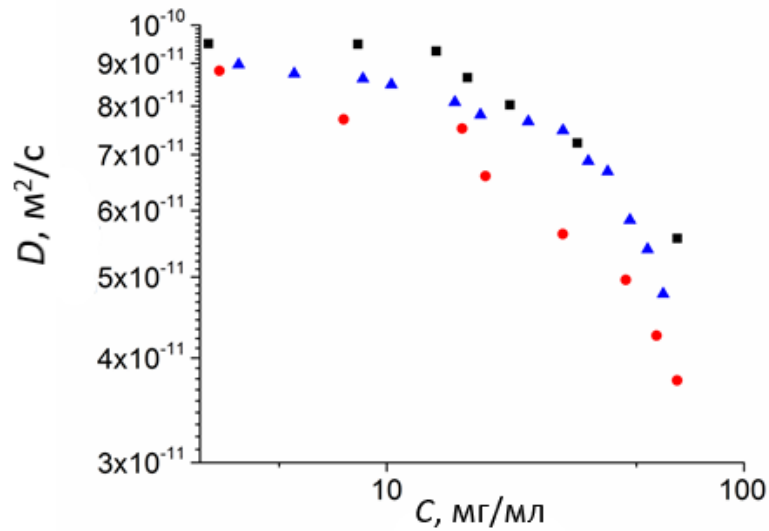


Рисунок 9 – Концентрационная зависимость КСД альбумина (квадраты) и альбумина в присутствии ионов меди (круги) и ионов магния (треугольники) (без нормировки).

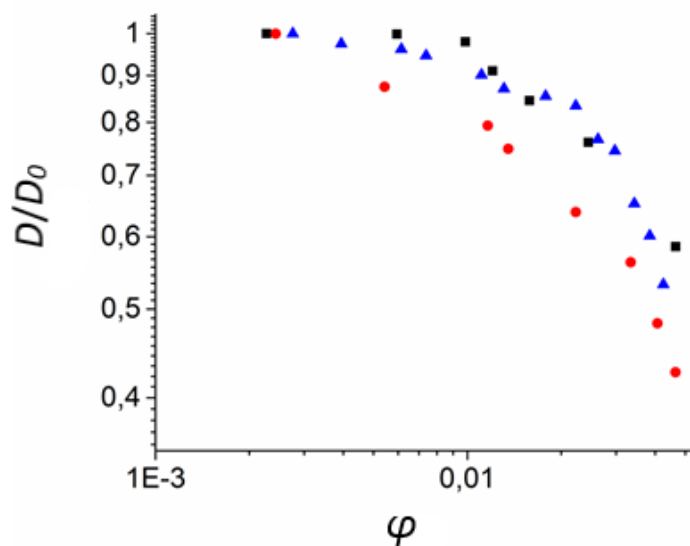


Рисунок 10 – Обобщенная концентрационная зависимость КСД альбумина (квадраты) и альбумина в присутствии ионов меди (круги) и ионов магния (треугольники) (нормированная).

Значения коэффициентов самодиффузии при бесконечном разбавлении  $D_0 = 9.658 \times 10^{-11}$  м<sup>2</sup>/с (альбумин),  $D_0 = 8.979 \times 10^{-11}$  м<sup>2</sup>/с (альбумин с ионами меди),  $D_0 = 8.676 \times 10^{-11}$  м<sup>2</sup>/с (альбумин с ионами магния) были получены с помощью экстраполяции экспериментальных данных на нулевую концентрацию белка.

### 3.1. Аппроксимация концентрационных зависимостей моделью жестких сфер

Для теоретического описания полученных результатов мы использовали гидродинамическую модель твердых сфер Токуямы и Оппенгейма [105]. Чтобы выполнить описание экспериментальных данных моделью жестких сфер, мы выполнили нормировку для построения кривой [106]. Нам надо определить границу между концентрированными и разбавленными растворами - некоторую критическую концентрацию  $\hat{\phi}$ , у альбумина она составляет 0.05, с помощью которой, мы нормализуем объемную фракцию белка, для того, чтобы учесть индивидуальные свойства белка (рис.11). Критическая концентрация определяется по пересечению двух прямых на концентрационной зависимости  $D_s$ . Одна из прямых основана на экстраполяции данных в области высоких концентраций с сильными белок-белковыми взаимодействиями, вторая - в области разбавленных растворов, где имеются незначительные взаимодействия между белковыми молекулами [107]. Затем был определен феноменологический параметр ( $\xi = (\hat{\phi}_0 / \hat{\phi})$ ), он показывает насколько поведение жесткой сферы отличается от поведения белковой молекулы. Для альбумина был получен параметр  $\xi = 1.1$ .

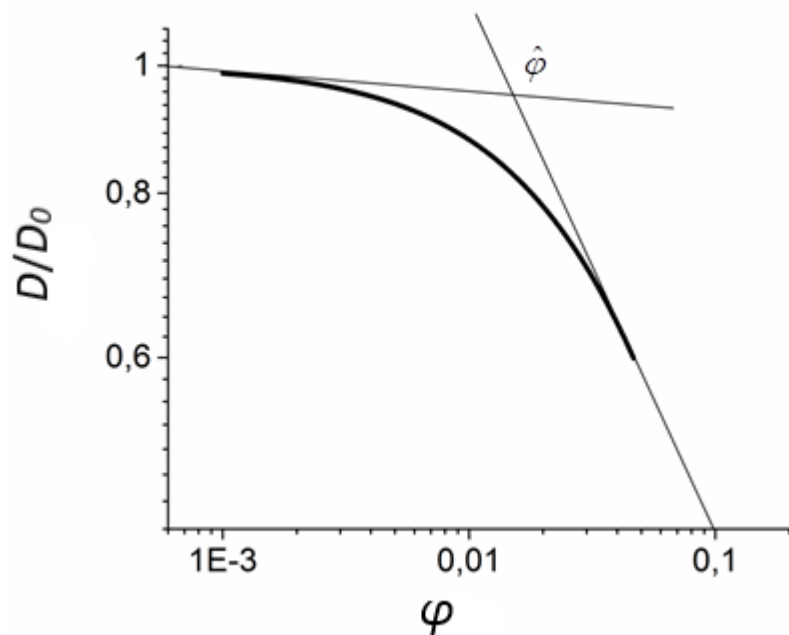


Рисунок 11 – Определение критической концентрации на примере концентрационной зависимости КСД альбумина.

Данный подход для анализа концентрационной зависимости КСД альбумина, имеет некоторые неточности в определении прямых. В области высокой концентрации неточности связаны с растворимостью альбумина, а в области разбавленных растворов точность определения прямой ограничивается чувствительностью метода ядерного магнитного резонанса.

На рисунке 12, мы можем наблюдать, что полученные нами экспериментальные данные для альбумина не согласуются с поведением жестких сфер. Отметим, что граница перехода между концентрированными и разбавленными растворами у альбумина меньше, чем у модели жестких сфер, но при этом, подход жестких сфер по форме кривой, описывающей теоретические данные, приблизительно имеет сходства с формой кривой, описывающей экспериментальные данные, полученные для альбумина.

Исходя из выше сказанного, мы можем сделать вывод о том, что диффузионные свойства молекулы альбумина частично схожи с поведением жестких сфер. Параметр  $\hat{\phi}$  зависит от белковых свойств в растворах, на

основании полученных данных для альбумина значение критической концентрации составило 0.05.

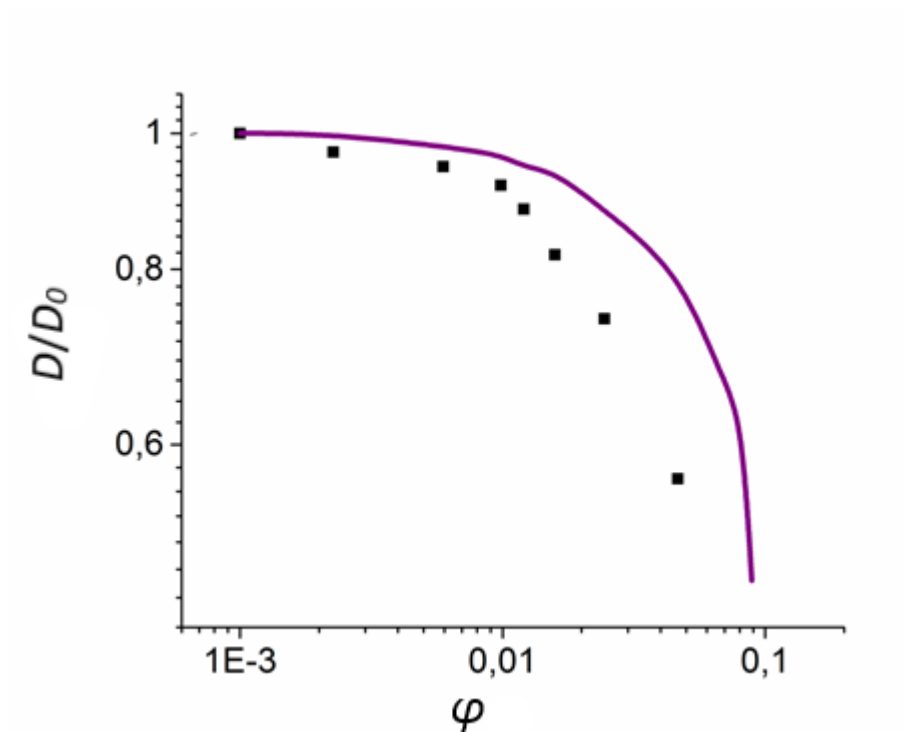


Рисунок 12 – Сравнение обобщенной концентрационной зависимости КСД альбумина с моделью КСД жесткой сферы (сплошная линия).

Теоретическая кривая в малой степени описывает полученные экспериментальные данные для альбумина. На основе этого, мы можем сделать вывод, что диффузионные свойства альбумина не совсем близки к поведению жестких сфер. Так же, можем сделать заключение о том, что критическая концентрация, определяющая переход в концентрированные системы от разбавленных растворов, зависит от определенных свойств молекулы альбумина в растворе.

### 3.2. Анализ концентрационных зависимостей с помощью феноменологического подхода Винка.

Данные по самодиффузии мы проанализировали с помощью феноменологического подхода Винка, который основан на фрикционном формализме неравновесной термодинамики (формула 12) [108].

Проводим описание экспериментальных данных, полученных для образцов альбумина и альбумина в присутствии ионов магния и ионов меди (рис 13).

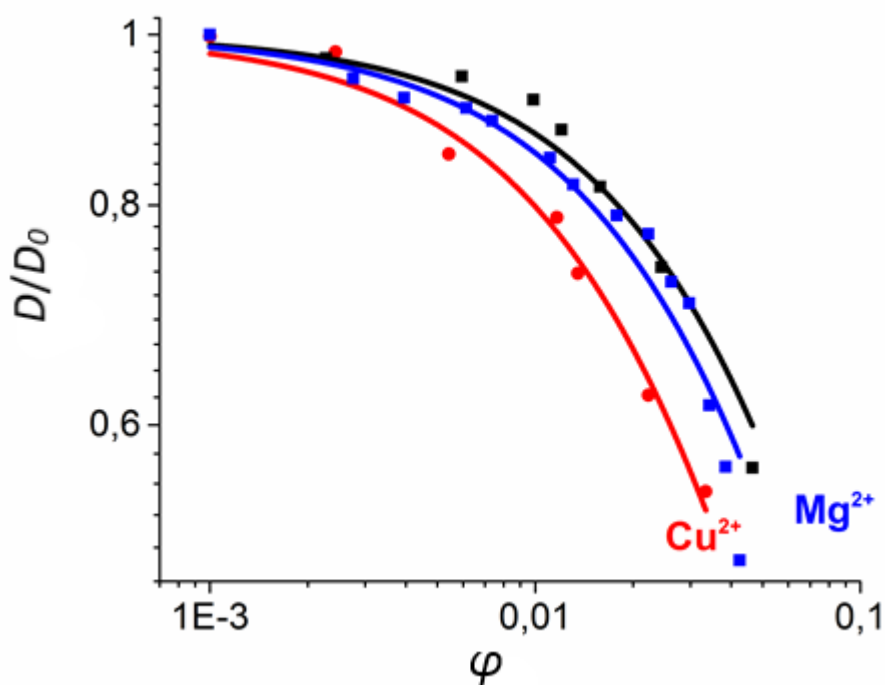


Рисунок 13 – Обобщенная концентрационная зависимость КСД альбумина, альбумина с ионами меди и альбумина с ионами магния (нормированная и аппроксимированная методом Винка).

На рисунке 13 видно, что подход Винка дает хорошее и точное описание экспериментальных данных, полученных для чистого альбумина и альбумина в присутствии ионов металлов в широком диапазоне концентраций в соответствии с формулой (14). Результат данной аппроксимации заключается в величине безразмерного параметра  $\rho$ , который характеризует относительный вклад

коэффициентов трения для среды белок – белок ( $f_{12}$ ) и среды белок – растворитель ( $f_{22}$ ) в коэффициент самодиффузии альбумина. Значения безразмерного параметра составило для альбумина 13.7, альбумина в присутствии ионов меди 25, альбумина в присутствии ионов магния 16.5. Чтобы оценить вклад коэффициентов трения в КСД альбумина мы сделаем необходимые расчеты.

Для начала определим коэффициент трения между растворителем и растворенным веществом [109]:

$$f_{12} = \frac{M(1 - \tau_2 \lambda)}{N_A S} \quad (16)$$

где  $N_A$  - постоянная Авогадро,  $M$  – молекулярная масса альбумина,  $S$  – коэффициент седиментации,  $\lambda$  – плотность растворителя.

Затем, через параметр аппроксимации  $\rho$ , который определяет связь с коэффициентами трения, мы определили коэффициент трения между молекулами растворенного вещества, по формуле (17):

$$\rho = f_{22} v_1 / f_{12} v_2 \quad (17)$$

Все необходимые данные для уравнения (16) мы взяли из литературы [113]. В таблице 2 показаны значения  $f_{22}$ , рассчитанные для образцов при малой концентрации альбумина ( $C = 2.29$  мг/мл), альбумина в присутствии ионов меди ( $C = 2.2$  мг/мл) и ионов магния ( $C = 2.3$  мг/мл).

Таблица 2 – Параметр  $\rho$ , гидродинамический радиус, гидродинамический коэффициент трения белок-белок  $f_{22}$ , гидродинамический коэффициент трения белок-растворитель  $f_{12}$  для малых концентраций.

Образец	$\rho$	$f_{12}, 10^{-10}$ кг/с	$f_{22}, 10^{-6}$ кг/с	$R$ , нм
Альбумин	13.7	4.4	12.3	3.33
Альбумин с $\text{CuCl}_2$	25	5.1	26.1	3.14
Альбумин с $\text{MgCl}_2$	16.5	4.6	15.5	3.08

$R = 3.3 - 4.3$  нм – теоретическое значение гидродинамического радиуса альбумина человеческого [110].

Таблица 3 – Рассчитанные значения коэффициентов трения ( $f_{12}$ ,  $f_{22}$ ) белок-растворитель и белок-белок альбумина, альбумина в присутствии ионов меди и ионов магния.

Образец	$C$ , мг/мл	$f_{12}, 10^{-10}$ , кг/с	$f_{22}, 10^{-6}$ , кг/с
САЧ	3.17	4.4	12.3
	8.31	4.4	12.3
	16.82	4.49	12.6
САЧ_ $\text{Cu}^{2+}$	3.4	5.1	26.1
	7.58	5.4	27.6
	16.25	5.5	28.1
САЧ_ $\text{Mg}^{2+}$	3.85	4.6	15.5
	8.58	4.8	16.2
	15.5	5.17	17.4

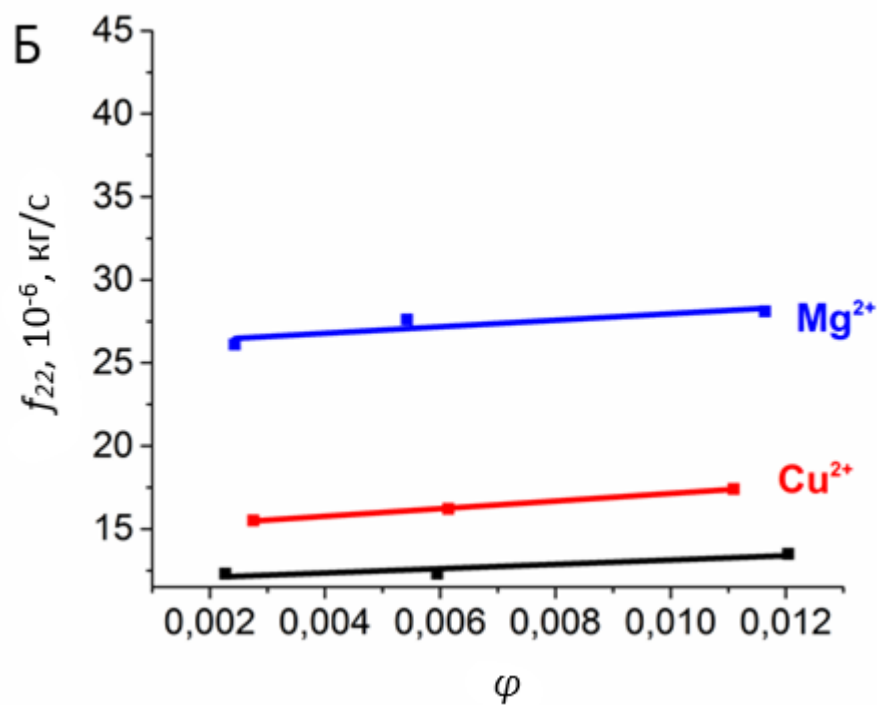
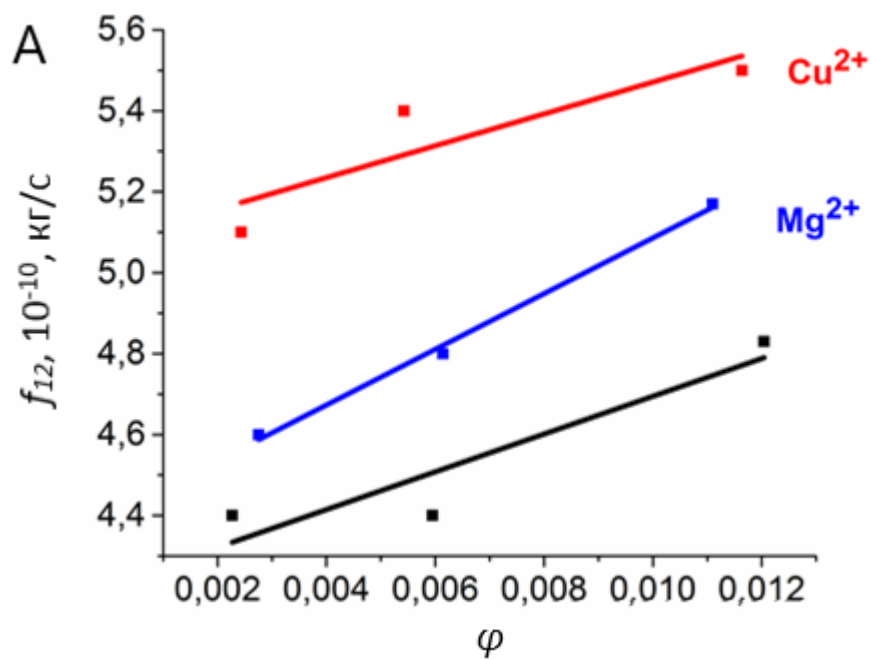


Рисунок 14 – Зависимость коэффициентов трения: А - белок-растворитель ( $f_{12}$ ), Б - белок-белок ( $f_{22}$ ) альбумина, альбумина в присутствии ионов меди и альбумина в присутствии ионов магния от концентраций (таблица 3)

Анализируя, полученные данные, мы можем отметить, что большее значение  $\rho$  показывает, что для растворов коэффициент трения между молекулами растворенного вещества  $f_{22}$  больше, чем коэффициент трения между молекулами растворителя  $f_{12}$  (рис.14). Это обусловлено размером, формой и внутренней структурой белка. Белковые молекулы - это огромные объекты по сравнению с молекулами растворителя. Поверхность белка не является гладкой и имеет тенденцию взаимодействовать друг с другом, обеспечивая более высокий коэффициент трения белок-белок по сравнению с коэффициентом трения белок-растворитель.

Оценка белок-белковых коэффициентов трения для изучаемых систем показала, что коэффициент трения белок-белок в присутствии ионов металлов увеличивается, по нашим предположениям, это связано с тем, что при добавлении ионов металлов в раствор альбумина, возникает процесс образования короткоживущих димеров между молекулами альбумина. Процесс димеризации характеризуется более высоким трением в среде белок-белок [111-113].

Постоянство гидродинамического радиуса альбумина в присутствии низкомолекулярных лигандов, и также в отсутствии лигандов связано с тем, что при усреднении по времени наблюдения альбумин характеризуется, как мономер, но литературные данные и полученные коэффициенты трения, говорят о присутствии процесса димеризации.

### 3.3. Сравнение экспериментов альбумина с ионами металлов в воде/буферном растворе

Для определения влияния буферного растворителя на коэффициент диффузии альбумина и альбумина в присутствии ионов металлов, мы провели ЯМР – исследования альбумина в Na-фосфатном буфере и для сравнения в воде. На рисунке 15 приведены, обобщенные концентрационные зависимости альбумина и альбумина в присутствии ионов металлов в воде и буферном растворе.

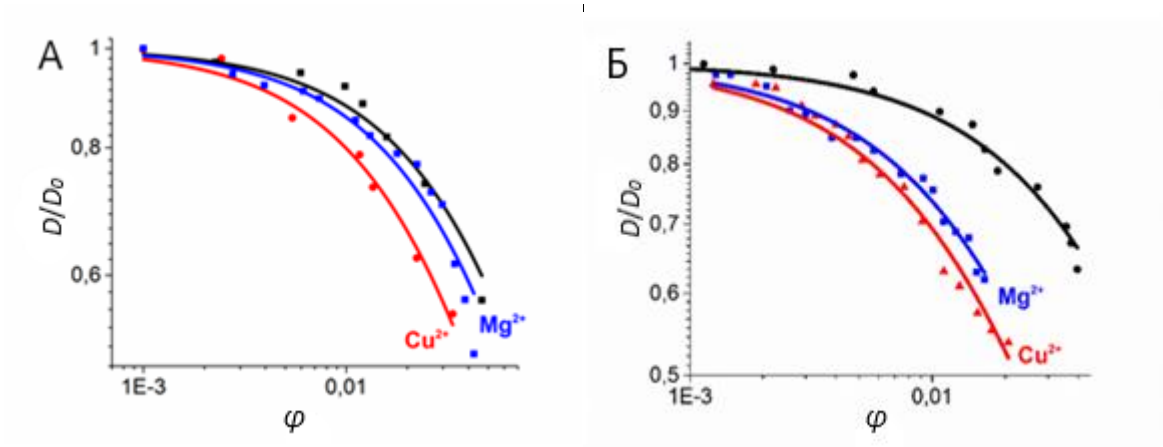


Рисунок 15 – Обобщенная концентрационная зависимость КСД альбумина, альбумина с ионами металлов А - в воде (pH = 6.9), Б – в фосфатном буфере (pH = 7.4).

Анализируя концентрационные зависимости, мы видим, что в буферном растворе зависимости альбумина в присутствии ионов металлов имеют более резкие наклоны кривых. Это объясняется тем, что низкомолекулярные лиганды оказывают влияние на трансляционную диффузию альбумина, уменьшая его подвижность при значительных концентрациях, в отличие от водного раствора.

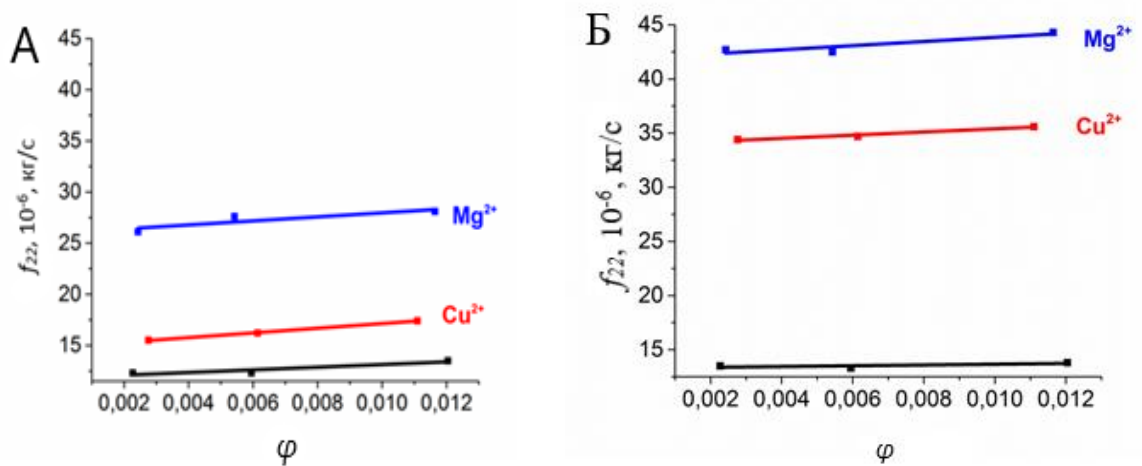


Рисунок 16 – Зависимость коэффициентов трения ( $f_{22}$ ) альбумина, альбумина в присутствии ионов меди и альбумина в присутствии ионов магния от концентраций А - в воде, Б – в буферном растворе (таблица 4)

Таблица 4 – Рассчитанные значения коэффициентов трения белок-растворитель и белок-белок альбумина и альбумина в присутствии ионов металлов.

Образец	$C$ , мг/мл	$f_{12}$ , $10^{-10}$ , кг/с	$f_{22}$ , $10^{-6}$ , кг/с
САЧ	1.59	5.3	13.3
	3.08	5.44	13.6
	5.9	5.5	13.8
САЧ_ $Cu^{2+}$	1.74	4.71	42.5
	2.61	4.91	44.3
	4.03	5.03	45.4
САЧ_ $Mg^{2+}$	1.79	4.74	34.4
	2.88	4.9	35.6
	3.6	5.04	36.6

Сравнивая зависимости белок-белковых коэффициентов трения в буферном и водном растворах (рис.16), мы видим, что в буферном растворе значение коэффициента трения белок-белок в присутствии ионов магния и ионов меди, значительно больше, чем в водном растворе. Димеризация в буферном растворе происходит интенсивнее, чем в воде. Это обусловлено тем, что буферный раствор оказывает большее влияние на процесс димеризации, чем вода. Первое, раствор буфера воздействует на гидратную оболочку альбумина – слой воды, которым окружена молекула белка, что приводит к изменению поверхностного заряда молекулы белка альбумина. Во вторых, скорость димеризации зависит от ионной силы раствора, в буферном растворе ионная сила значительно выше, чем в водном, т.е. концентрация растворенных солей в буфере достаточно велика, что приводит к более сильному взаимодействию между присутствующими молекулами, чем в воде. Такое взаимодействие в буфере существенно изменяет термодинамические свойства раствора, эти свойства определяют взаимодействия между молекулами в растворе.

## Выводы

1. Концентрационные зависимости коэффициента самодиффузии альбумина были проанализированы в рамках феноменологического подхода Винка. Были получены фрикционные коэффициенты, характеризующие межмолекулярные взаимодействия белков.
2. Низкомолекулярные лиганды оказывают влияние на трансляционную диффузию альбумина, уменьшая его подвижность при значительных концентрациях. В присутствии ионов металлов коэффициент трения белок-белок увеличивается, мы предполагаем, что в присутствии ионов металлов возникает процесс образования короткоживущих димеров, характеризующийся более высоким коэффициентом трения белок-белок.
3. Было показано, что буферные соли оказывают влияние на процесс димеризации, таким образом, что димеризация альбумина в буферном растворе происходит интенсивнее, чем в воде.

## Список публикаций

1. **Iskhakova A.K.** Inter-Protein Molecular Interactions in Solutions of Human Serum Albumin, Studied by NMR-Diffusometry and Dynamic Light Scattering / A.K. Iskhakova, A. M. Kusova, A. E. Sitnitsky, Yu. F. Zuev // MDMR 2020, Abstracts of the international conference and workshop «Diamond-Based quantum systems for sensing and quantum information», Kazan. – 2020. – P. 154.
2. **Исхакова А.К.** Оценка межмолекулярных взаимодействий альбумина по данным трансляционной диффузии и модели «пористой» частицы / А.К. Исхакова, А.М. Кусова, Ю.Ф. Зуев, А.Е. Ситницкий // II Школа-конференция для молодых ученых «Супрамолекулярные стратегии в химии, биологии и медицине: фундаментальные проблемы и перспективы» (с международным участием) (Казань, 2020): тезисы докладов. – Казань: ИОФХ им. А.Е. Арбузова ФИЦ КазНЦ РАН, 2020. – С. 77.
3. **Исхакова А.К.** Влияние низкомолекулярных лигандов на трансляционную диффузию альбумина по данным ЯМР / А.К. Исхакова // Итоговая научно-образовательная конференция студентов Казанского федерального университета 2021 года: сб. Тезисов. Казань: Издательство Казанского Университета (в печати).
4. Zueva O.S. Reciprocal effects of multi-walled carbon nanotubes and oppositely charged surfactants in bulk water and at interfaces / O.S. Zueva, A.M. Kusova, A.O. Makarova, A. Turanov, **A.K. Iskhakova**, V.V. Salnikov, Yu.F. Zuev // Colloids and Surfaces A. – 2020. – V. 603. – P. 125296-125304.

## **Благодарности**

*Выражаю благодарность своему научному руководителю Блохину Дмитрию Сергеевичу за помощь на всех этапах выполнения дипломной работы.*

*Так же благодарю своих научных консультантов Кусову Александру Михайловну и Зуева Юрия Федоровича за советы и помощь в написании дипломной работы.*

*Хочу поблагодарить сотрудников лаборатории биофизической химии наносистем Казанского института биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН за помощь и поддержку при выполнении работы.*

## Список литературы

1. Gaigalas, A.K. Diffusion of Bovine Serum Albumin in Aqueous Solutions / A.K. Gaigalas, J. B. Hubbard, M. McCurley, Sam Woo. – Текст: непосредственный // J. Phys. Chem. – 1992. – V.96. – P. 2355–2359.
2. Zimmerman, S.B. Estimation of macromolecule concentrations and excluded volume effects for the cytoplasm of Escherichia coli / S.B. Zimmerman, S.O. Trach. – Текст: непосредственный // Journal of molecular biology. – 1991. – V. 222. – P. 599-620.
3. Ellis, R.J. Cell biology: Join the crowd / R.J. Ellis, A.P. Minton. – Текст: непосредственный // Nature. – 2003. – V. 425. P. 27-28.
4. Roosen-Runge, F. Protein self-diffusion in crowded solution / F. Roosen-Runge, Marcus Henning, Fajun Zhang, Robert M. J. Jacobs, Michael Sztucki, Helmut Schober, Tilo Seyde, Frank Schreiber. – Текст: непосредственный // PNAS. – 2011. – V.189. – P. 11815–11820.
5. Warren, H. The concentration dependence of the diffusion coefficient for bovine pancreatic trypsin inhibitor: A dynamic light scattering study of a small protein / H. Warren, Clare K. Woodward. – Текст: непосредственный // Biopolymers. – 1989. – V. 245. – P. 365.
6. Price, W.S. NMR Studies of Translational Motion. Principles and Application / W.S. Price. – Текст: непосредственный // Cambridge University Press: Cambridge, 2009. – P. 383.
7. Kuznetsova, I.M. What macromolecular crowding can do to a protein / I.M. Kuznetsova, K.K. Turoverov, V.N. Uversky. – Текст: непосредственный // Int. J. Mol. Sci. – 2014. – V. 15. – P. 23090-23140.

8. Аминокислоты. Пептиты. Белки / Х.Д. Якубке, Х. Ешкайт, Ю.В. Митина. - Москва: «Мир», 1985. – 78 с. – Текст: непосредственный.
9. Структура и свойства малых белков теплового шока. Молекула и болезни / Н.Б. Гусев. – МФК, 2013. – 134 с. – Текст: непосредственный.
10. Физика белка / А.В. Финкельштейн, О.Б. Птицын. – 3-е изд. – М.: КДУ, 2005. – 465 с. – Текст: непосредственный.
11. Taylor, J. P. Toxic Proteins in Neurodegenerative Disease / J. P. Taylor, J. Hardy, К.Н. Fischbeck. – Текст: непосредственный // Science – 2002. – V. 296. – P. 1991.
12. Andreeva, A. SCOP2 prototype: a new approach to protein structure mining / A. Andreeva, D. Howorth, C. Chothia, E. Kulesha, A.G. Murzin. – Текст: непосредственный // Nucleic Acids Research, – 2014. – V.42. – P. 310.
13. Richards, F. M. The interpretation of protein structures: total volume, group volume, distributions and packing density / F.M. Richards. – Текст: непосредственный // J. Mol. Biol. – 1974. – V. 82. – P. 1–15.
14. Faendrich, M. On the structural definition of amyloid fibrils and other polypeptide aggregates / M. Faendrich. – Текст: непосредственный // Cell. Mol. Life Sci – 2007. – V. 64. – P. 2066 – 2078.
15. Klapper, M. H. On the nature of the protein interior / М.Н. Klapper. – Текст: непосредственный // Biochim. Biophys. Acta – 1971. – V. 229. – P. 557–566.
16. Ross, C. A. Protein aggregation and neurodegenerative disease / C. A. Ross, M. Poirier. – Текст: непосредственный // Nature Medicine – 2004. – V. 10. – P. S10–S17.
17. Dockal M. Conformational transitions of the three recombinant domains of human serum albumin depending on pH / M. Dockal, D.C. Carte, F. Ruker. – Текст: непосредственный // Journ. Biological Chemistry, 2000. – V.5. – P. 3042–3050.

18. Perrin, F. The brownian movement of an ellipsoide. I Dielectric dispersion of an ellipsoidal molecule / F. Perrin. – Текст: непосредственный // J. Phys. Radium – 1934. – V. 5. – P. 497–511.
19. Harmonisation of Reference Intervals, pathologyharmony.co.uk. Pathology Harmony: [Электронный ресурс]. Archived from the original, 2013.
20. Richards, F. M. The interpretation of protein structures: total volume, group volume, distributions and packing density / F.M. Richards. – Текст: непосредственный // J. Mol. Biol. – 1974. – V. 82. – P. 1–15.
21. Hypoalbuminemia: Background, Pathophysiology, Etiology, Medscape Reference. [Электронный ресурс]. 2019.
22. Torre, J. G. Hydration from hydrodynamics. General considerations and applications of bead modelling to globular proteins / J.G. Torre. – Текст: непосредственный // Biophysical Chemistry – 2001. – V. 93. – P. 159–170.
23. Садава Д. Жизнь и биологическая наука / Д. Садава. – Текст: непосредственный // Издательство: Macmillan Publishers, 2009. – V.1. – С. 119.
24. Le Bon, C. Self-diffusion and cooperative diffusion of globular proteins in solution / C. Le Bon, T. Nicolai. – Текст: непосредственный // J. Phys. Chem. B. – 1999. – V.103. – P. 10294-10299.
25. Stejskal, E.O. Spin Diffusion Measurements: Spin Echoes in the Presence of a Time-Dependent Field Gradient / E.O. Stejskal, J. E. Tanner. – Текст: непосредственный // J. Chem. Phys., – 1965. – V.42. – P. 288–292.
26. Stejskal, E.O. Use of Spin Echoes in a Pulsed Magnetic-Field Gradient to Study Anisotropic Restricted Diffusion and Flow / E.O. Stejskal. – Текст: непосредственный // J. Chem. Phys., – 1965. – V.43. – P. 3597–3603.
27. Tanner, J.D. Restricted Self-Diffusion of Protons in Colloidal Systems by the Pulsed-Gradient, Spin-Echo Method / J.D. Tanner, E. O. Stejskal. – Текст: непосредственный // J. Chem. Phys., – 1968. – V.49. – P. 1768–1777.

28. Тихонова, Т.Н. Образование дипольных нанокластеров в растворах основных белков сыворотки крови, содержащих ионы европия и калия [Текст] / Т.Н. Тихонова, Г.П. Петров, Ю.М. Петрусевич, К.В. Федорова, В.В. Кашин // Физика. Астрономия, – 2011. – V.2. – 82-87 с. – Текст: непосредственный.
29. Squire, P.G. The Hydrodynamic Properties of Bovine Serum Albumin Monomer and Dimer / P.G. Squire, P. Moser, C.T. O’Konski. – Текст: непосредственный // Biochemistry – 1968. – V.7. – P.12.
30. Travaglini-Allocatelli C. Folding and stability of globular proteins and implications for function / C. Travaglini-Allocatelli, Y. Ivarsson, P. Jemth, S. Gianni. – Текст: непосредственный // Current Opinion in Structural Biology. – 2009. – V.19. – P. 3–7.
31. Shen, C. Gene Expression: Translation of the Genetic Code / C. Shen. – Текст: непосредственный // Diagnostic Molecular Biology. – 2019.
32. Халиуллина А.В. Исследование самодиффузии белков в растворе методом ЯМР [Текст] / А.В. Халиуллина, А.В. Филлипов // Учебно-методическое пособие для студентов специализации «Медицинская физика» и «Биофизика» Института физики, Казань. – 2013. – 47с. – Текст: непосредственный.
33. Kragh-Hansen, U. Human serum albumin isoforms: genetic and molecular aspects and functional consequences / U. Kragh-Hansen, L. Minchiotti, M. Galliano, Jr. T. Peters. – Текст: непосредственный // Biochim. Biophys. Acta. — 2013. — V.1830. — P. 5405-17.
34. Fanali, G. Human serum albumin: From bench to bedside / M. Alessandra, V. Trezza, M. Marino, P. Ascenzi. – Текст: непосредственный Molecular Aspects of Medicine. – 2012. – V.33. – P. 209–290.
35. Capuano, F. Diffusion in ternary aqueous systems containing HSA and precipitants of different classes / F. Capuano, L. Paduano, G. D’Errico, G. Mangiapia,

R. Sartrorio. – Текст: непосредственный // Chem. Phys., – 2011. – V.13. – P. 3319–3327.

36. Lamanna, R. Water proton self-diffusion and hydrogen bonding in aqueous HSA / R. Lamanna, S. Cannistraro. – Текст: непосредственный // Chemical Physics Letters, – 1989. – V.164. – P. 653– 656.

37. Gaigalas, A.K. Diffusion of BSA in aqueous solution / A.K. Gaigalas, J. B. Hubbard, M. Mc Curley, Sam Woo. – Текст: непосредственный // J. Phys. Chem., – 1992. – V.96. – P. 2355-2359.

38. Muramatsu, N. Tracer diffusion of globular proteins in concentrated protein solution / N. Muramatsu, A.P. Minton. – Текст: непосредственный // Biophysics, – 1988. – V.85. – P. 2984-2988.

39. Hong, L. Protein's / L. Hong, S. Xingcan, J. Zhiliang. – Текст: непосредственный // Science in China, – 2000. – V.6. – P. 600.

40. Roosen-Runge, F. Protein self-diffusion in crowded solution / F. Roosen-Runge, Marcus Henning, Fajun Zhang, Robert M. J. Jacobs, Michael Sztucki, Helmut Schober, Tilo Seydel, Frank Schreiber. – Текст: непосредственный // PNAS. – 2011. – V.189. – P. 11815–11820.

41. Barisas, B.G. Fluorescence photobleaching recovery measurement of protein absolute diffusion constants / B.G Barisas, M.D. Leuther. – Текст: непосредственный // Biophysical Chemistry, – 1979. – V.10. – P.221–229.

42. O'Leary, T.J. Concentration dependence of protein diffusion / T.J. O'Leary. – Текст: непосредственный // Biophys. J., – 1987. – V.52. – P. 137–139.

43. Grimaldo, M. Diffusion and Dynamics of  $\gamma$ -Globulin in Crowded Aqueous Solutions / M. Grimaldo, F. Roosen-Runge, F. Zhang, T. Seydel, F. Schreiber. – Текст: непосредственный // J. Phys. Chem. B. – 2014. – V.118. – P. 7203–7209.

44. Wang, H. The Self-diffusion Coefficients of Water and Ovalbumin in Aqueous Ovalbumin Solutions at 10' / H. Wang, B. A. Chirsian, M. P. Polestra. – Текст: непосредственный // J. Phys. – 1954. – P. 4763–4765.
45. Raj, T. Diffusion studies of BSA by quasielastic Light Scattering / T. Raj, W.H. Flygare. – Текст: непосредственный // Biochemistry. – 1974. – V.13. – P. 3336–3340.
46. Price, W.S. Pulsed-Field Gradient Nuclear Magnetic Resonance as a Tool for Studying Translational Diffusion: Part 1. Basic Theory / W.S. Price. – Текст: непосредственный // Water Research Institute. – 1997. – V.298. – P. 586186.
47. Петрова, Г.П. Взаимодействие основных белков сыворотки крови (альбумина и  $\gamma$ -глобулина) с ионами  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  / Г.П. Петрова, Ю.М. Петрусевич. – Текст: непосредственный // Физика. Астрономия, – 2006. – V.6. – С. 58-59.
48. Carter, D.C. Adv. Protein Chem / D.C. Carter, J.X. Ho. – Текст: непосредственный // J. Phys., – 1994. – V.45. – P. 153.
49. Peters, T. / T. Peters. – Текст: непосредственный //Jr.Adv. Protein Chem., – 1985. – V.37. – P. 161.
50. Narsinga Rao, M.S. Metal protein interactions in buffer solutions. Part III. Interaction of  $\text{CuII}$ ,  $\text{ZnII}$ ,  $\text{CdII}$ ,  $\text{CoII}$  (and  $\text{NiII}$ ) with native and modified bovine serum albumins / M.S. Narsinga Rao, H. Lal. – Текст: непосредственный // J. Am. Chem. Soc. – 1958. – V.80. – P. 3226–3235.
51. Sadler, P.J. European / P.J. Sadler, A. Tucker, J.H. Viles. – Текст: непосредственный // J. Biochem. – 1994. – V.220. – P.193.
52. Cotton, F.A. Basic Inorganic Chemistry / F.A. Cotton, G. Wilkinson, P.L. Gaus. – Текст: непосредственный // 3rd ed. Wiley, 1995.
53. Appelton, D.W. / D.W. Appelton, B. Sarkar. – Текст: непосредственный // J. Biol. Chem. – 1971. – V.246. – P. 5040.

54. Silva, A.M.N. Influence of non-enzymatic post-translation modifications on the ability of human serum albumin to bind iron. implications for non-transferrinbound iron speciation / A.M.N. Silva, R.C. Hider. – Текст: непосредственный // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2009. – V.1794. – P. 1449–1458.
55. Cazzola, M. Transferrin saturation, plasma iron turnover, and transferrin uptake in normal humans / M. Cazzola, H.A. Huebers, M.H. Sayers, P. MacPhail, M. Eng, C.A. Finch. – Текст: непосредственный // *Blood.* – 1985. – V.66. – P. 935–939.
56. Dickson, P.N. Coordination chemistry of gold(I) with cyanide and 1-methylpyridine-2-thione. Kinetics and thermodynamics of ligand exchange at gold(I) in aqueous solution. – Текст: непосредственный / P.N. Dickson, A. Wehrli, G. Geier // *Inorg. Chem.* – 1988. – V.27. – P. 2921–2925.
57. Robb, W. Kinetics and mechanisms of reactions of gold(III) complexes. I. The equilibrium hydrolysis of tetrachlorogold(III) in acid medium. – Текст: непосредственный / W. Robb // *Inorg. Chem.* – 1967. – P. 382–386.
58. Berners-Price, S.J. Gold compounds as therapeutic agents for human diseases / S.J. Berners-Price, A. Filipovska. – Текст: непосредственный // *Metallomics.* – 2011. – V. 3. – P. 863–873.
59. Сергеева, И.А. Молекулярная подвижность частиц в растворах белков, содержащих ионы металлов с различными ионными радиусами / И.А. Сергеева, Н.В. Сокол, М.С. Иванова, Г.П. Петрова, Ю.М. Петрусевич. – Текст: непосредственный // *Физика. Астрономия.* – 2009. – №4. – P. 85-88.
60. Gibizova, V.V. Serum albumin molecular mobility in water solutions, containing iron chloride III / V.V Gibizova, V.A. Sapozhnikov, K.V. Fedorova, G.P. Petrova. – Текст: непосредственный // *Journal of Biomedical Photonics and Engineering.* – 2016. – V. 2. – P. 1-5.

61. Carter, D.C. Structure of serum albumin // D.C. Carter, J.X. Ho. – Текст: непосредственный // *Adv. Protein Chem.* – 1994. – V. 45. – P. 153–203.
62. Majorek, K.A. Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins / K.A. Majorek, P.J. Porebski, A. Dayal, M.D. Zimmerman, K. Jablonska, A.J. Stewart, M. Chruszcz, W. Minor. – Текст: непосредственный // *Mol. Immunol.* – 2012. – V. 52. – P. 174–182.
63. He, X.M. Atomic structure and chemistry of human serum albumin / X.M. He, D.C. Carter. – Текст: непосредственный // *Nature.* – 1992. – V. 358. – P. 209–215.
64. Hahn, E.L. Spin Echoes / E.L. Hahn. – Текст: непосредственный // *Phys. Re.* – 1950. – V. 80. – P. 580-594.
65. Rubino, J.T. Coordination chemistry of copper proteins: how nature handles a toxic cargo for essential function / J.T. Rubino, K.J. Franz. – Текст: непосредственный // *J. Inorg. Biochem.* – 2012. – V. 107. – P. 129–143.
66. Curry, S. Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites / S. Curry, H. Mandelkow, P. Brick, N. Franks. – Текст: непосредственный // *Nat. Struct. Biol.* – 1998. – V. 5. – P. 827–835.
67. Banci, L. Affinity gradients drive copper to cellular destinations / L. Banci, I. Bertini, S. Ciofi-Baffoni, T. Kozyreva, K. Zovo, P. Palumaa. – Текст: непосредственный // *Nature.* – 2010. – V. 465. – P. 645.
68. Zaitseva, I. The X-ray structure of human serum ceruloplasmin at 3.1 Å: nature of the copper centres / I. Zaitseva, V. Zaitsev, G. Card, K. Moshkov, B. Vax, A. Ralph, P. Lindley. – Текст: непосредственный // *J. Biol. Inorg. Chem.* – 1996. – V. 1. – P. 15–23.

69. Carr, H.Y. Effects of Diffusion on Free Precession in Nuclear Magnetic Resonance Experiments / H.Y. Carr, E. M. Purcell. – Текст: непосредственный // Phys. Re. – 1954. – V. 94. – P. 630–638.
70. Avent, A.G. Spin Echo Spectroscopy of Liquid Samples, in Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance / A.G. Avent, D. M. Grant and R. K. Harris, Eds. Wiley. – Текст: непосредственный // New York. – 1996. – P.4524–4530.
71. Stejskal, E.O., Self-diffusion measurements: spin-echoes in presence of a time dependent field gradient / E.O. Stejskal, J. E. Tanner. – Текст: непосредственный // J. Chem. Phys. – 1965. – V. 42. – P. 288–292.
72. Маклаков А.И. Самодиффузия в растворах и расплавах полимеров / А.И. Маклаков, В. Д. Скирда, Н.Ф. Фаткуллин – Казань: Изд-во Казанского гос. ун-та., 1987. – 224 с. – Текст: непосредственный.
73. Perozzo, R. Thermodynamics of protein-ligand interactions: History, presence, and future aspects / R. Perozzo, G. Folkers, L. Scapozza. – Текст: непосредственный // J. Recept. Signal. Transduct. Res. – 2004. – V. 24. – P. 1–52.
74. Torre, J. G. HYDRONMR: Prediction of NMR Relaxation of Globular Proteins from Atomic-Level Structures and Hydrodynamic Calculations / J. G. Torre, M. L. Huertas, B. Carrasco. – Текст: непосредственный // J.Magn.Reson. – 2000. – V. 147. – P. 138–146.
75. Zhou, H.-X. A unified picture of protein hydration: prediction of hydrodynamic properties from known structures / H. X. Zhou. – Текст: непосредственный // Biophys. Chem. – 2001. – V. 93. – P. 171–179.
76. Krishnan, V. Determination of Oligomeric State of Proteins in Solution from Pulsed-Field-Gradient Self-Diffusion Coefficient Measurements. A Comparison of Experimental, Theoretical, and Hard-Sphere Approximated Values / V. Krishnan. – Текст: непосредственный // J. Magn. Reson. – 1997. – V. 124. – P. 468.

77. Tokuyama, M. Dynamics of hard-sphere suspensions / M. Tokuyama, I. Oppenheim. – Текст: непосредственный // *Phys. Rev.* – 1994. – V. 50. – P. 16–19.
78. Han, J. Macromolecular Diffusion in Crowded Solutions / J. Han, J. Herzfeld. – Текст: непосредственный // *Biophysical J.* – 1993. – V. 65. – P. 1155–1161.
79. Hanna, S. Self-diffusion of spherical Brownian particles with hard-core interaction / S. Hanna, W. Hess, R. Klein. – Текст: непосредственный // *Physica* – 1982. – V. 111A. – P. 181–199.
80. Ptitsyn, O. B. Molten globule and protein folding / O.B. Ptitsyn. – Текст: непосредственный // *Adv. Protein Chem.* – 1995. – V. 47. – P. 83–229.
81. Wilkins, D. K. Hydrodynamic radii of native and denatured proteins measured by pulse field gradient NMR techniques / D. K. Wilkins, S. B. Grimshaw, V. Receveur, C. M. Dobson. – Текст: непосредственный // *Biochemistry* – 1999. – V. 38. – P. 16424–16431.
82. Coffman, J. L. Protein diffusion in porous chromatographic media studied by proton and fluorine PFG-NMR / J.L. Coffman, E.N. Lightfoot, T.W. Root. – Текст: непосредственный // *J. Phys. Chem.* – 1997. – V. 101. – P. 2218–2223.
83. Stejskal, E. O. Self-diffusion measurements: spin-echoes in presence of a time dependent field gradient / E. O. Stejskal, J.E. Tanner. – Текст: непосредственный // *J. Chem. Phys.* – 1965. – V. 42. – P. 288–292.
84. Nesmelova, I. V. Generalized Concentration Dependence of Globular Protein Self-Diffusion Coefficients in Aqueous Solutions / I. V. Nesmelova, V. D. Skirda, V.D. Fedotov. – Текст: непосредственный // *Biopolymers* – 2002. – V. 63. – P. 132–140.
85. Skirda, V. D. On the generalized concentration and molecular mass dependence of macromolecular self-diffusion in polymer solutions / V. D. Skirda, V. I. Sundukov, A.

- I. Maklakov, O. E. Zgzdzai. – Текст: непосредственный // *Polymer* – 1988. – V. 2. – P. 1294–1300.
86. Bal, W. Binding of transition metal ions to albumin: sites, affinities and rates / W. Bal, M. Sokolowska, E. Kurowska, P. Faller. – Текст: непосредственный // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2013. – V. 12. – P. 1– 12.
87. Petrova, G.P. / G.P. Petrova, Yu.M. Petrusevich, A.N. Evseevicheva. – Текст: непосредственный // *Gen. Physiol. And Biophys.* – 1998. – V. 17. – P. 97.
88. Петрова Г.П. [Текст] / Г.П. Петрова, Ю.М. Петрусевич, А.Н. Евсеевичева // *Вестн. Моск. ун-та. Физ. Астрон.* – 1998. – V. 4. – 71 с. – Текст: непосредственный.
89. Friedberg, F. Albumin as the major metal transport agent in blood / F. Friedberg. – Текст: непосредственный // *FEBS LETTERS*. – 1975. – V. 59. – P. 2.
90. Bal, W. Multi-metal binding site of serum albumin / W. Bal, J. Christodoulou, P. J. Sadler, A. Tucker. – Текст: непосредственный // *Journal of Inorganic Biochemistry*. – 1998. – V. 70. – P. 33-39.
91. Masaro, L. Physical models of diffusion for polymer solutions, gel and solids / L. Masaro, X. X. Zhu. – Текст: непосредственный // *Prog. Polym. Sci.* – 1999. – V. 24. – P. 731-775.
92. Padding, J. T. Rheology of wormlike micellar fluids from Brownian and molecular dynamics simulation / J. T. Padding, E.S. Boek, W.J. Briels. – Текст: непосредственный // *J.Phys.: Condens. Matter*. – 2005. – V. 17. – P. 3347-3353.
93. Tokuyama, M. Dynamics of hard-sphere suspensions / M. Tokuyama, I. Oppenheim. – Текст: непосредственный // *Phys. Rev.* – 1994. – V. 50. – P. 16-19.
94. Shaqfeh, E.S.G. The hydrodynamic stress in a suspension of rods / E.S.G Shaqfeh, G.H. Fredrickson. – Текст: непосредственный // *Physics of Fluids A: Fluid Dynamics*. – 1990. – V. 2. – P. 7-24.

95. Dhont, J.K.G. Viscoelasticity of suspensions of long, rigid rods / J.K.G. Dhont, W.J. Briels. – Текст: непосредственный // *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.* – 2003. V. 212. – P. 131-156.
96. Dhont, J.K.G. Gradient and vortcity banding / J.K.G. Dhont, W.J. Briels. – Текст: непосредственный // *Rheologica Acta.* – 2008. – V. 47. – P. 257-281.
97. Гибизова, В.В. Особенности рассеяния света в растворах глобулярных белков сыворотки крови с металлосодержащими соединениям / В.В. Гибизова. – Текст: непосредственный // автореферат, 2017.
98. Vink, H. Mutual diffusion and self-diffusion in the frictional formalism of nonequilibrium thermodynamics / H. Vink. – Текст: непосредственный // *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* – 1985. – V. 81. – P. 1725-1730.
99. Tyrrell, H. J. V., Diffusion in liquids / H. J. V. Tyrrell, K. R. Harris. – Текст: непосредственный // Butterworth, Cambridge, 1984. – P. 464.
100. Mazo, R.M. Brownian motion: fluctuations, dynamics, and applications / R.M. Mazo. – Текст: непосредственный // Claredon Press, Oxford. – 2002.
101. Le Bon, C. Self-diffusion and cooperative diffusion of globular proteins in solution / C. Le Bon, T. Nicolai, M.E. Kuil, J.G. Hollander. – Текст: непосредственный // *J. Phys. Chem. B.* – 1999. – V. 103, P. 10294-10299.
102. Keller, K.H. Tracer and mutual diffusion coefficients of proteins / K.H. Keller, E.R. Canales, S.I. Yum. – Текст: непосредственный // *J. Phys. Chem.* – 1971. V. 75. – P. 379-387.
103. Padding, J.T. Theory of Polymers Dynamics / J.T. Padding. – Текст: непосредственный // University of Cambridge: UK, – 2005. – P. 56.
104. Perkins, S.J. Protein volumes and hydration effects / S. J. Perkins. – Текст: непосредственный // *European journal of biochemistry.* – 1968. – V. 157. – P. 169-179.

105. Levashov, A.V. Enzymes entrapped into reserved micelles in organic solvents: sedimentation analysis of the protein – aerosol OT-H<sub>2</sub>O-Octane system / A.V. Levashov, Y. L. Khmel'nitsky, N. L. Klyachko, V. Ya. Chernyak, K. Martinek. – Текст: непосредственный // J. Coll. Interface Sci. – 1982. – V. 88. – P. 444-457.
106. Siegel, L. M. Determination of molecular weights and frictional ratios of proteins in impure systems by use of gel filtration and density gradient centrifugation. Application to crude preparations of sulfite and hydroxylamine reductases / L. M. Siegel K. J. Monty. – Текст: непосредственный // Biochim. Biophys. Acta. – 1966. – V. 112. – P. 346-362.
107. Hawe, A. Taylor Dispersion Analysis Compared to Dynamic Light Scattering for the Size Analysis of Therapeutic Peptides and Proteins and Their Aggregates / A. Hawe, Wendy L. Hulse, W. Jiskoot, R. Forbes. – Текст: непосредственный // J. Phys. – 2011. – №28. – P. 2302-2310.
108. Hawe, A. Taylor Dispersion Analysis Compared to Dynamic Light Scattering for the Size Analysis of Therapeutic Peptides and Proteins and Their Aggregates / A. Hawe, Wendy L. Hulse, W. Jiskoot, R. Forbes. – Текст: непосредственный // J. Phys. – 2011. – №28. – P. 2302-2310.
109. Levashov, A.V. Enzymes entrapped into reserved micelles in organic solvents: sedimentation analysis of the protein – aerosol OT-H<sub>2</sub>O-Octane system / A.V. Levashov, Y. L. Khmel'nitsky, N. L. Klyachko, V. Ya. Chernyak, K. Martinek. – Текст: непосредственный // J. Coll. Interface Sci. – 1982. – V. 88. – P. 444-457.
110. Siegel, L. M. Determination of molecular weinghts and frictional ratios of proteins in impure systems by use of gel filtration and density gradient centrifugation. Application to crude preparations of sulfite and hydroxylamine reductases / L. M. Siegel K. J. Monty. – Текст: непосредственный // Biochim. Biophys. Acta. – 1966. – V. 112. – P. 346-362.

111. Ruso, M.J. A Study of the Interaction of the Amphiphilic Penicillins Cloxacillin and Dicloxacillin with Human Serum Albumin in Aqueous Solution / M.J. Ruso, D. Attwood, M. Garcí'a, P. Taboada, L. M. Varela, V. Mosquera. – Текст: непосредственный // *Langmuir*. – 2001. – V.17. – P. 5189-5195.
112. Sollenne, N.P. Disruption of the tryptophan binding site in the human serum albumin dimer / N.P. Sollenne, H.L. Wu, G.E. Means. – Текст: непосредственный // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 1981. – V. 207. – P. 264-269.
113. Sogami, M. Dimerization of bovine plasma albumin in low pH region / M. Sogami, S. Ogura, K.B. Itoh, S. Sakata, S. Nagaoka. – Текст: непосредственный // *Biochimica and Biophysica Acta (BBA) – Protein Structure*. – 1972. – V. 278. – P. 501-504.
114. Edelhoich, H. Dimerization of serum mercaptalbumin presence of mercurials. I. kinetic and Equilibrium studies with mercuric salts<sup>1a,b,c</sup> / H. Edelhoich. – Текст: непосредственный // *J. Aim. Chem. Doc.* – 1953. – V. 75. – P. 5058-5072.

