



VILNIAUS UNIVERSITETAS
CHEMIJOS IR GEOMOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS INSTITUTAS
FIZIKINĖS CHEMIJOS KATEDRA

Narvydas Dėnas

Chemija

Magistro baigiamasis darbas

ELEKTROCHEMINIŲ METODŲ TAIKYMAS BALTYMŲ
AGREGATŲ NUSTATYMOI

Darbo vadovė
prof. dr. Aušra Valiūnienė

Vilnius 2024

TURINYS

SANTRUMPOS	4
ĮVADAS	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA	6
1.1. Elektrocheminio impedanso spektroskopija	6
1.1.1. Elektrocheminio impedanso spektroskopijos pagrindai	6
1.1.2. Elektrocheminio impedanso duomenų pateikimas	7
1.1.3. Elektrocheminio impedanso atsako stiprinimas	8
1.2. Tioflavinas T	8
1.2.1. Tioflavino T savybės	9
1.2.2. Tioflavino T stabilumas	9
1.2.3. Tioflavino T panaudojimas	10
1.2.4. Tioflavino T koncentracijos nustatymas	10
1.3. Baltymų agregatai	11
1.3.1. Baltymai	11
1.3.2. Baltymų tretinė ir ketvirtinė struktūros	11
1.3.3. Baltymų agregatai	12
1.3.4. Baltymų agregatų susidarymas	12
1.3.5. Baltymų agregatų nustatymo aktualumas	13
1.3.6. Analitiniai baltymų agregatų nustatymo būdai	13
1.3.7. Baltymų agregatų nustatymo būdai pasinaudojant dažais	14
2. EKSPERIMENTINIO TYRIMO METODIKA	15
2.1. Tyrimams naudota aparatūra ir tirpalai	15
2.1.1. Tyrimams naudotos medžiagos	15
2.1.2. Tyrimams naudota aparatūra	15
2.1.3. Tyrimams reikalingų tirpalų gaminimas	15
2.2. Ciklinės voltamperometrijos ir impedimetrinio tyrimo metodika ir rezultatų apdorojimas TFT koncentracijos nustatymui	16
2.2.1. Ciklinės voltamperometrijos tyrimo metodika TFT koncentracijos nustatymui	16
2.2.2. Impedimetrinio tyrimo metodika	16
2.3. Ciklinės voltamperometrijos ir impedimetrinio tyrimo metodika ir rezultatų apdorojimas agregato koncentracijos nustatymui	16
2.3.1. Ciklinės voltamperometrijos tyrimo metodika	16
2.3.2. Elektrocheminio impedanso spektroskopijos tyrimo metodika	17

3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	18
3.1. TFT koncentracijos nustatymas.....	18
3.1.1. TFT koncentracijos nustatymas ciklinės voltamperometrijos metodu.....	18
3.1.2. TFT koncentracijos nustatymas elektrocheminio impedanso spektroskopijos metodu.....	21
3.2. Lizocimo agregato koncentracijos nustatymas.....	25
3.2.1. Lizocimo agregato koncentracijos nustatymas ciklinės voltamperometrijos metodu.....	25
3.2.2. Lizocimo agregato koncentracijos nustatymas pasitelkiant EIS metodą	29
IŠVADOS.....	33
SANTRAUKA	34
SUMMARY	35
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	36

SANTRUMPOS

EIS – elektrocheminio impedanso spektroskopija;

CV – ciklinė voltamperometrija;

TFT – tioflavinas T;

PBS – fosfatinis buferinis tirpalas;

KBV – kvadratinių bangų voltamperometrija;

SEC – dydžio išskyrimo chromatografija;

BMR – branduolių magnetinis rezonansas;

DPV – diferencinė pulsinė voltamperometrija;

AUC – analitinis ultracentrifugavimas;

ĮVADAS

Baltymų agregacija žmogaus kūne laikoma pagrindiniu veiksmu, lemiančiu neurodegeneracinių ligų, tokių, kaip Parkinsono ir Alzheimerio ligos, patogenezę [1]. Nepaisant daugybės mokslinių tyrimų, skirtų rasti veiksmingas neurodegeneracinių ligų gydymo priemones, efektyvus šių ligų gydymas iki šiol sunkiai pasiekiamas [1,2]. Siekiant sukurti veiksmingas neurodegeneracinių ligų gydymo ir prevencijos priemones, daug dėmesio skiriama baltymų, pvz.: amiloidinių baltymų, agregacijos tyrimams ir baltymų agregaciją slopinančių medžiagų paieškoms [2,3].

Baltymų agregacijos tyrimai neretai atliekami detektuojant susidarančius agregatus fluorescencinės analizės būdu [2–4], tačiau naudojant fluorescencinę detekciją neretai pasitaiko būdingi trūkumai – fluorescencijos gesinimo efektas, taip pat dažų, naudojamų fluorescencinės detekcijos metu, grįžtamas hidrosilinimas fiziologiniame pH, darantis įtaką dažo optinėms savybėms [4].

Baltymų agregatų koncentracijos taip pat dažnai nustatinėjamos panaudojant dydžio išskyrimo chromatografijos (SEC) metodą [5–7]. Šis metodas yra greitas, jautrus ir tikslus [6,7]. Visgi, SEC metodas baltymų agregatų nustatymui turi trūkumų, tokių kaip ribotas nustatomų dalelių dydžio diapazonas, baltymų gebėjimas nespecifiškai jungtis prie chromatografinės kolonėlės ir didelė matricos įtaka tyrimo tikslumui. Išvardinti SEC metodo trūkumai prastina agregatų nustatymo tikslumą [5,7].

Siekiant pagerinti baltymų agregatų nustatymo tikslumą, agregatai galėtų būti nustatomi elektrocheminiais metodais (pvz.: ciklinė voltamperometrija (CV) ir/ar elektrocheminio impedanso spektroskopija (EIS)) naudojant elektrochemiškai aktyvias žymas (pvz., metileno mėlynojo, Kongo raudonojo ar pan.). Elektrocheminių metodų privalumas yra tai, kad jie pasižymi dideliu jautrumu ir gebėjimu nustatyti skirtingą redukcijos potencialą turinčias analites keičiant elektrodui užduodamą potencialą [8]. Taigi, pH sąlygoti elektrocheminės žymos redukcijos potencialo pokyčiai turėtų būti mažiau reikšmingi analizės patikimumui nei pH įtaka optinės žymos fluorescencinėms savybėms. Taip pat, elektrocheminiai metodai nenaudoja chromatografinių kolonėlių, todėl baltymų agregatai negali prie jų jungtis ir taip mažinti agregatų nustatymo tikslumą. Dėl šių priežasčių, elektrocheminių procedūrų kūrimas turi didelę svarbą siekiant tiksliau ir patikimiau įvertinti baltymų agregaciją ir agregavusių baltymų kiekį.

Šio magistro baigiamojo darbo tikslas – sukurti elektrocheminiais metodais pagrįstą procedūrą, skirtą nustatyti lizocimo baltymų agregatų koncentracijas mėginyje, pasinaudojant tioflavino T (TFT) elektrocheminiais virsmis.

Magistro baigiamojo darbo uždaviniai:

- Sukurti tioflavino T (TFT) koncentracijos nustatymo mėginyje procedūrą, panaudojant ciklinės voltamperometrijos (CV) metodą;
- Sukurti TFT koncentracijos nustatymo metodiką, pasinaudojant elektrocheminio impedanso spektroskopijos (EIS) metodu;
- Pritaikyti sukurta CV metodiką lizocimo baltymo agregatų koncentracijos nustatymui;
- Pritaikyti sukurta EIS metodiką lizocimo baltymo agregatų koncentracijos nustatymui;
- Išanalizuoti gautus rezultatus, nustatyti TFT ir lizocimo agregato tiesinės koncentracijos intervalus ir palyginti gautus duomenis su literatūroje pateiktais panašiais tyrimais.

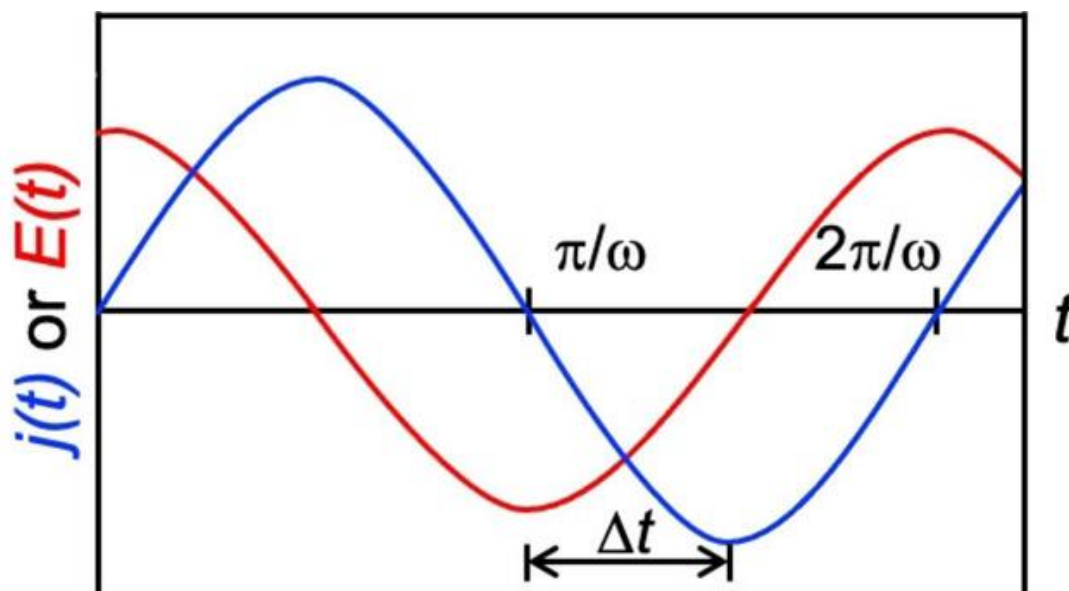
1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Elektrocheminio impedanso spektroskopija

Elektrocheminė impedanso spektroskopija (EIS) yra galingas ir labai komplikotas metodas, naudojamas analizuojant tarpfazines savybes, susijusias su elektrodo paviršiuje vykstančiais biologinio atpažinimo įvykiais, tokiais kaip antikūno ir antigeno atpažinimas, substrato ir fermento sąveika arba visos ląstelės fiksavimas [9]. Šis metodas taip pat yra plačiai taikomas charakterizuoti įvairias medžiagas, tokias kaip elektrinė ir struktūrinė keramika, magnetiniai feritai, puslaidininkiai, membranos, polimerinės medžiagos ir apsauginės dažų plėvelės [10].

1.1.1. Elektrocheminio impedanso spektroskopijos pagrindai

Atliekant tipinį EIS eksperimentą, elektrocheminei sistemai taikoma nedidelė sinusinė įtampa $E(t)$. Kaip atsakas į šį sinusoidinį kitimą yra gaunamas linijinis srovės tankis $j(t)$, kuris yra tokio pat dažnio, kaip ir įėjimo dažnis, tačiau jo fazė ir amplitudė gali skirtis (1 pav.). Šių dydžių santykis yra impedansas, $Z(t)$ (1 lygtis) [11].



1 pav. Grafikas, apibūdinantis ryšį tarp įėjimo įtampos $E(t)$ ir išėjimo srovės, $j(t)$ (arba atvirkščiai), kurios santykis lemia varžą [11].

$$Z(t) = \frac{E(t)}{j(t)} \quad (1)$$

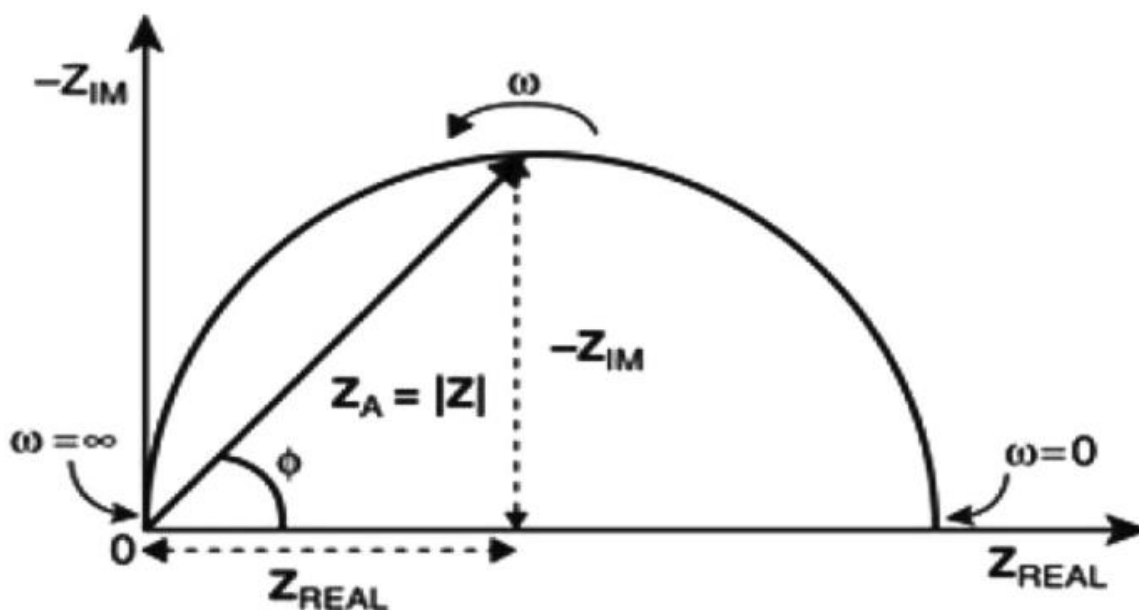
Keičiant dažnį, galima stebėti skirtingo greičio procesus. Esant dideliems dažniams, galima reaguoti tik į greičiausius procesus, pavyzdžiui, jonų migraciją, o lėti reiškiniai, pavyzdžiui, difuzija, dominuoja esant žemiems dažniams [11].

Įprastoje elektrocheminėje celėje materijos (redokso rūšių) ir elektrodo sąveika apima elektroaktyvių rūšių koncentraciją, krūvio pernašą ir masės pernašą iš tirpalo tūrio į elektrodo paviršių. Kiekvienai iš šių savybių būdinga elektros grandinė, kurią sudaro varžos, kondensatoriai arba pastovios fazės elementai, sujungti lygiagrečiai arba nuosekliai, kad sudarytų ekvivalentinę

grandinę. Todėl EIS gali būti naudojamas tiriant masės pernašos, krūvio pernašos ir difuzijos procesus [11,12].

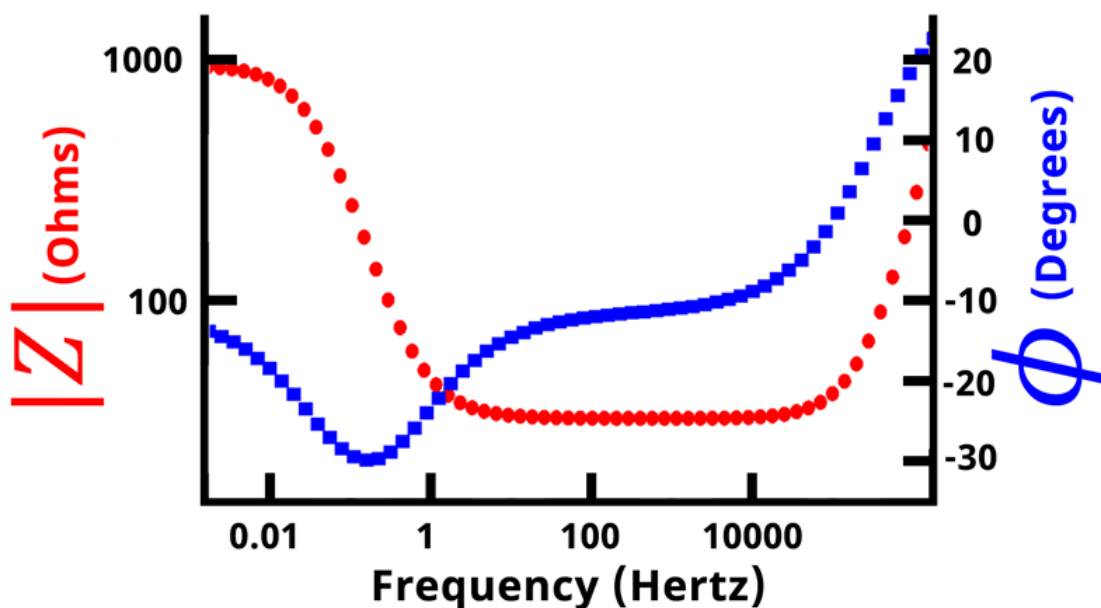
1.1.2. Elektrocheminio impedanso duomenų pateikimas

Impedanso išraiška dalijama į realiąją ir įsivaizduojamąją dalis. Kai realioji dalis (Z') nubraižoma X ašyje, o įsivaizduojamoji dalis (Z'') - Y ašyje, sudaromas Nyquist grafikas (2 pav.). Kiekvienas Nyquist grafiko taškas yra impedanso vertė dažnio taške. Ties X ašimi, dešinėje diagramos pusėje esantys taškai yra žemi dažniai, o, esant aukštesniems dažniams, jų sukurtos impedanso reikšmės slenkasi į kairę pusę. Be to, Nyquist diagramoje impedansą galima pavaizduoti kaip vektorių (rodyklę), kurio ilgis $|Z|$. Kampas tarp šios rodyklės ir X ašies vadinamas "fazės kampu" [9].



2 pav. Nyquist koordinatinių pavaizdavimas [12].

Kitas būdas impedanso rezultatams išreikšti - naudoti vadinamąjį Bode grafiką (3 pav.), kurį sudaro du atskiri logaritminiai grafikai: dydžio priklausomybė nuo dažnio ir fazės priklausomybė nuo dažnio [9]. Šio grafiko pranašumas tas, kad kiekviename taške galima matyti naudojamą dažnį, kuris yra „paslėptas“ duomenis pateikiant Nyquist grafike.



3 pav. Bode grafiko pavaizdavimas [13].

1.1.3. Elektrocheminio impedanso atsako stiprinimas

Nepaisant tiesioginio ryšio nustatymo galimybių, daugelis tarpfazinių impedimetrinių tyrimų susiduria su trūkumu, kad generuojami signalai (CPE talpa ir (arba) R_{ct} pokyčiai) yra palyginti maži. Dėl to buvo sukurtos kelios signalo stiprinimo strategijos, kurios padėtų fiksuoti didesnę EIS signalo pokytį, keičiant sistemos konstrukciją ar naudojant papildomas medžiagas [14].

Siekiant padidinti talpos pokytį dėl pakitusios dielektrinės konstantos, atpažinimo elementų fiksavimui gali būti panaudotos polimerinės membranos. Jų pridėjimas gali pakeisti CPE talpą, kas gali būti panaudota pastiprinto signalo generavimui [15].

EIS metodo generuojamą mažą signalą, taip pat, galima išspręsti naudojant nanodaleles. Galima išskirti du skirtingus metodus. Pirma, nanodalelės buvo naudojamos elektrodams modifikuoti prieš prijungiant atpažinimo elementą. Šiuo atveju įrodyta, kad signalo padidėjimą daugiausia lemia padidėjusi analitės paviršiaus koncentracija. Antruoju atveju dalelės buvo naudojamos kaip biomolekulių žymekliai, kas irgi lėmė signalo sustiprėjimą [16,17].

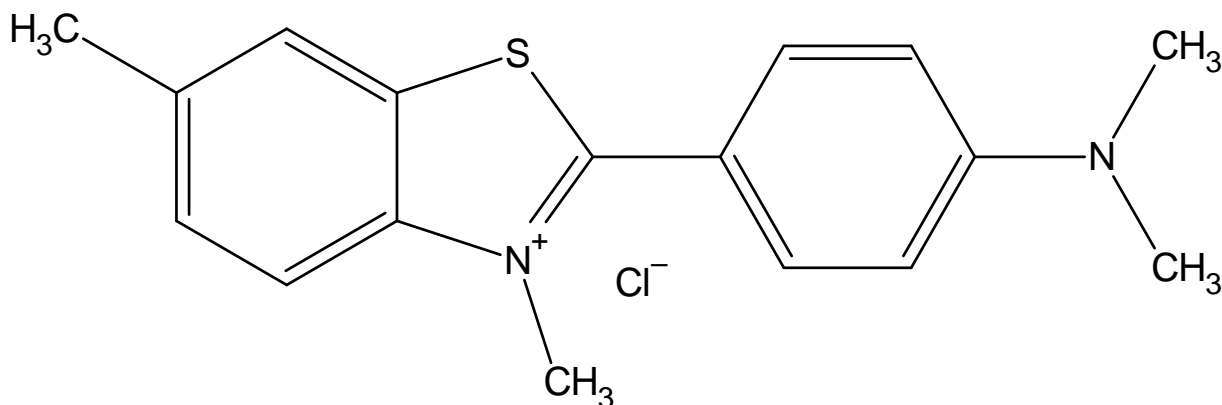
Be biocheminio stiprinimo, pats keitklis taip pat suteikia galimybę dar labiau padidinti jautrumą. Vietoj vieno darbinio elektrodo galima taikyti plokštuminę geometriją, kai naudojami du arti vienas kito esantys elektrodai. Šioje geometrijoje pasinaudojama pastebėtomis pakitusiomis sąlygomis, kai srovės srautas daugiausia teka labai arti paviršiaus ir todėl pasižymi daug didesniu jautrumu paviršiaus pokyčiams, palyginti su įprastine konstrukcija. Biologinio atpažinimo elementas gali būti imobilizuotas ant vieno iš elektrodų, tarpelyje tarp elektrodų arba ant abiejų elektrodų. Tokia elektrodų konstrukcija turi papildomą privalumą: ruošiant elektrodus luste, visa elektrocheminė sąranka jau yra integruota ir nereikia jokių išorinių elektrodų [14].

1.2. Tioflavinas T

Tioflavinas T (TFT) yra vandenyje tirpus benzotiazolo dažas, kuris dažnai yra naudojamas, kaip tradicinis dažas netirpiems fibriliniams agregatams aptikti.

1.2.1. Tioflavino T savybės

Tioflavino T struktūra yra matoma 4 pav. Ši struktūra turi hidrofobinį galą su dimetilamino grupe, kuri prijungta prie fenilinės grupės sujungtos su poliškesne benzotiazolo grupe, turinčia polinius N ir S atomus. Yra prielaidų, kad dažiklio tiazolo azotas ir audinių struktūrų hidroksilo grupės sudaro vandenilinius ryšius, kurie lemia specifinį šių dažiklių molekulių prisijungimą prie amiloido ir kitų audinių struktūrų [18,19].



4 pav. Tioflavino T struktūra.

Grynas TFT turi stiprią absorbcijos smailę, kurios centras yra ties 412 nm, ir mažą fluorescencijos emisiją ties 487 nm, kai sužadinas 412 nm bangos ilgio spinduliuote [20]. Susijungus su amiloidinėm fibrilėm, absorbcijos maksimumas pasislenka iki 442 nm, o TFT su amiloidiniais kompleksais skleidžia stiprią fluorescenciją ties 478 nm bangos ilgio spinduliuote, kai sužadinas 442 nm bangos ilgio spinduliuote [19].

Prieš tai minėtas polinių ir hidrofobinių sričių derinys sudaro galimybę tioflavino T molekulėms vandeniniame tirpale sudaryti micles, kurių vidus hidrofobinis, o teigiamai įkrauta N dalis nukreipta į tirpiklį. Nustatyta, kad tioflavinas T vandeniniuose tirpaluose dažniausiai egzistuoja micelių pavidalu, taip yra todėl, kad tioflavino T kritinė micelių koncentracija yra 4,0 μM [18]. Tioflavino T fluorescencijos sužadimo ir emisijos pokyčiai taip pat priklauso ir nuo micelių susidarymo, o TFT sudaromas micelės yra nestabilios šarminėje aplinkoje [18].

1.2.2. Tioflavino T stabilumas

Esant šarminiam pH ir aukštai temperatūrai (35–55 °C), TFT tirpalai greitai praranda įprastą geltoną spalvą. Šis procesas yra grįžtamas ir nėra priklausomas nuo tioflavino T koncentracijos. Šis spalvos praradimas yra siejamas su OH⁻ jonų buvimu tirpale, o toks TFT hidroksilinimas gali smarkiai paveikti TFT fluorescencijos intensyvumą nustatant amiloido fibriles [4].

Tioflaviną T apšvietus UV spinduliais arba tiesiog laikymo metu yra stebimi trys TFT dariniai (dTFT-1, dTFT-2 ir dTFT-3). dTFT-1 yra oksiduota TFT forma, kuri pasižymi didele fluorescencijos kvantine išeiga ir charakteringa emisija ties 450 nm bangos ilgiu. Kiti du gaunami junginiai, dTFT-2 ir dTFT-3, yra tioflavino T demetilinimo produktai, praradę 1 arba 2 metilo grupes iš aminobenzono dalies. Šie po TFT skilimo gauti junginiai pasižymi mažesne fluorescencija negu grynas tioflavinas. Tai lemia, kad tioflavino T laikymo metu fluorescencijos intensyvumas pastebimai sumažėja [20].

1.2.3. Tioflavino T panaudojimas

TFT fluorescencinės savybės lemia, kad jis puikiai tinka nustatant nukleorūgštis, baltymus ir mažas molekules ar matuojant fermentų aktyvumą.

Atsižvelgiant į tai, kad TFT geba surišti komplementarią DNR ir RNR ir tai padidina fluorescencijos intensyvumą, jis tapo patikima nukleino rūgščių aptikimo priemone [21]. Palyginti su kitais DNR aptikimo junginiais, TFT pasižymi dideliu jautrumu savo taikiniams ir vis dažniau įtraukiamas į pažangias eksperimentines programas. Jis gali būti naudojamas ne tik dirbtinei ir sintetinei DNR aptikti, bet ir su ligomis susijusioms DNR biožymenims nustatyti. Tioflavino T suteikiamas reikšmingas fluorescencijos intensyvumo pokytis taip pat gali būti taikomas nustatant tikslinės DNR seką [22].

Dėl tioflavino T prisijungimo prie amiloidinių fibrilių specifškumo, taip pat dėl TFT stiprios fluorescencijos ir fluorescencijos maksimumo pasislinkimo prisijungus amiloidinėm fibrilėm, jis yra plačiai taikomas baltymų ir jų agregatų nustatymui [21,23]. Atliekant baltymų tyrimus, tioflavinas T dažniausiai yra naudojamas kaip dažas, leidžiantis aptikti baltymų agregatus pagal spektroskopinius pokyčius [4,18,20,24]. Be spektroskopinių matavimų, baltymų koncentraciją, pasitelkus TFT, taip pat bandoma nustatyti pasitelkiant elektrocheminius metodus, tokius kaip tirpalų laidumą, diferencinę pulsinę voltamperometriją (DPV) ar elektrocheminio impedanso spektroskopija [18,25,26].

Siekiant pašalinti žymėjimo reikalavimo ir daug laiko reikalaujančių procedūrų trūkumus, fermentų aktyvumui aptikti ir išmatuoti yra naudojamas tioflavinas T [21]. Pavyzdžiui tioflavinas T gali būti naudojamas acetilcholinesterazės fermento nustatymui diferencinės pulsinės voltamperometrijos metodu. Šio metodo pranašumas yra tas, kad lyginant su kitais acetilcholinesterazės nustatymo būdais, šis metodas naudoja daug mažesnius reagentų kiekius ir pasižymi didesniu jautrumu [23].

Sunkiųjų metalų jonai, pavyzdžiui, gyvsidabrio (Hg^{2+}), švino (Pb^{2+}) ar kadmio (Cd^{2+}), paprastai yra labai toksiški gamtoje ir yra vieni iš pagrindinių aplinkos taršą lemiančių veiksnių [27]. Remiantis fluorescenciniais ir kolorimetriniais tyrimais, yra sukurta daug metalo jonų aptikimo strategijų [28]. Tioflavino T naudojimas kartu su metalų specifinių DNR fermentais yra patogus ir tinkamas būdas, kuriuo galima stebėti metalo jonų aptikimą realiuoju laiku. Pavyzdžiui, naudojant Pb^{2+} jonams specifinį DNR fermentą ir esant tirpale TFT, galima stebėti Pb^{2+} jonų koncentraciją mėginyje [29]. Tuo tarpu, norint nustatyti Hg^{2+} jonų koncentracijas mėginyje, galima naudoti tioflaviną T ir treonino ir glicino amino rūgščių turintį DNR [30].

1.2.4. Tioflavino T koncentracijos nustatymas

Kaip aprašyta ankstesniame skyriuje, tioflavinas T dažnai naudojamas kaip pagalbinė medžiaga kitų junginių nustatymui, tačiau literatūroje minimas ir pačio tioflavino T nustatymas mėginiuose.

Tioflavinas T dažniausiai yra nustatinėjimas spektroskopiniais metodais, dėl savo specifinio ir lengvai fiksuojamo adsorbcijos maksimumo. Tačiau TFT taip pat gali būti nustatytas pasitelkus įvairius elektrocheminius metodus, tokius kaip DPV ar elektrinis tirpalų laidumas [18,23,24].

Nustatinėjant tioflaviną T fluorescencijos metodu, mažiausia nustatoma tioflavino T koncentracija yra maždaug lygi jo micelių susidarymo koncentracijai (maždaug nuo 5 μM). Taip yra todėl, kadangi tioflavino T fluorescencijos intensyvumas pradeda didėti tik esant TFT micelėms tirpale. O didžiausia koncentracija yra maždaug 500 μM , nes prie šios koncentracijos fluorescencijos intensyvumas artėja prie konstantos [19].

Nustatinėjant TFT koncentracijas pagal tirpalo laidumą, matavimai atliekami dejonizuotame vandenyje. Šiuo metodu tioflavino T koncentracijas galima nustatyti intervale nuo 10 μM iki 200 μM [18].

Tuo tarpu matuojant diferencinės ciklinės voltamperometrijos kreives ant stiklo-anglies elektrodo, buvo gaunamas tioflavino T sukeltas pikas ties 0,87 V (palyginus su Ag/AgCl palyginamuoju elektrodu). Šio piko padėtis yra priklausoma nuo tirpalo pH vertės. Esant buferio pH vertei 4, TFT pikas yra ties 0,95 V, o tuo tarpu matuojant buferyje, kurio pH 9, oksidacinis pikas pasislenka iki 0,82 V. Naudojant šį metodą buvo gauta gerokai mažesnė minimali nustatoma TFT koncentracija negu prieš tai minėtų fluorescencijos ir tirpalo laidumo matavimų metu. Nustatinėjant tioflavino T koncentracijas DPV metodu, gautas tiesinės koncentracijos intervalas yra nuo 40 nM iki 400 nM tioflavino T [23].

1.3. Baltymų agregatai

Baltymų agregavimas – tai baltymų jungimasis į didesnes, paprastai netirpias agregatines struktūras. Tai atsitinka esant normalioms fiziologinėms sąlygoms ir reaguojant į amžiaus ar pašalinių veiksnių sukeltą baltymų neteisingą susilankstymą ir denatūravimą [31].

1.3.1. Baltymai

Baltymai yra linijinės molekulės, sudarytos iš aminorūgščių grandinių, kurios gali susilankstyti į vieną ar daugiau specifinių trimačių formų. Jie gali būti skirtingo ilgio ir būti sudaryti iš ne daugiau nei 30 000 aminorūgščių. Kai kurie iš jų susilanksto į struktūras, kurios yra stabilios visą gyvavimą, o kiti baltymai yra lankstesni, todėl juos galima sulankstyti ir pertvarkyti. Baltymai – tai įvairios gyvybės molekulės, sudarančios tiek mechanizmus, tiek pagrindinius ląstelių ir kūnų struktūrinius komponentus. Daugelis jų yra tirpios citozolio sudedamosios dalys, kitos yra integruotos į membranas, o kai kurios nusėda ląstelėse ir audiniuose kaip netirpūs agregatai.[29].

1.3.2. Baltymų tretinė ir ketvirtinė struktūros

Struktūriškai besiformuojantis polipeptidas yra nestabilus darinys, esantis aplinkoje, kuri ne visada yra palanki tinkamam jo susilankstymui ir dažnai gali jį destabilizuoti [32,33]. Baltymų tyrimai rodo, kad kelias nuo išskleistos polipeptidinės grandinės iki sulenktos natūralios būsenos yra atsitiktinis procesas, vykstantis gana plokščiam energetiniame diapazone [34,35]. Kaip ir bet kuriame atsitiktiniame procese, polipeptidams yra ribota galimybė susilankstyti ir įgyti netipines būsenas, kuriose jie gali būti bent laikinai stabilūs (kinetiniai spąstai). Baltymai gali įvairiais būdais atsidurti nenatūralioje būsenoje, pavyzdžiui, kaip iš dalies sulankstyti tarpiniai produktai arba dėl sąveikos su kitomis molekulėmis ar baltymais, turinčiais tą pačią ar skirtingą seką [36].

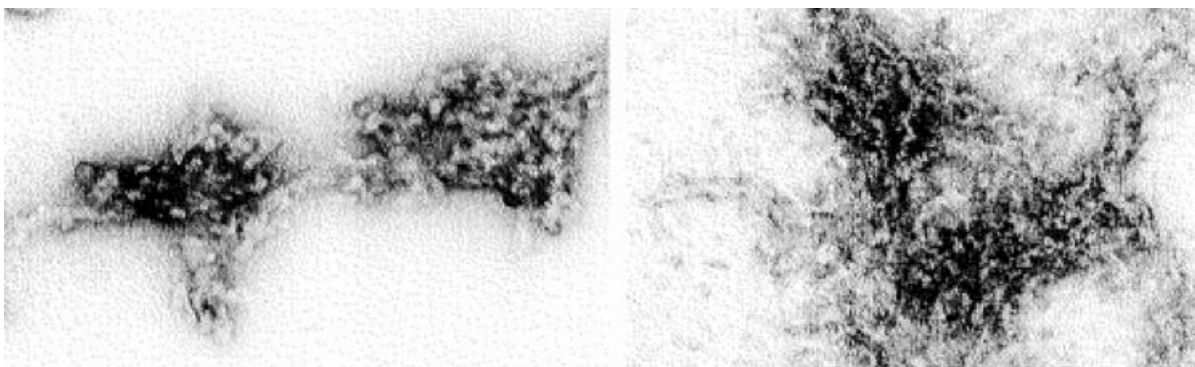
Kadangi atskiros pirminės sekos aminorūgštys gali sąveikauti tarpusavyje formuojant antrines struktūras, tokias kaip, spiralės ar lakštai, o atskiros aminorūgštys iš nutolusių dalių gali sąveikauti tarpusavyje dėl krūvio, hidrofobinių, disulfidinių ar kitų sąveikų, šie ryšiai ir sąveikos keičia viso baltymo formą. Galutinis tam tikro polipeptido sulankstymas yra tretinė struktūra [37]. Trimačę tretinę baltymų struktūrą palaiko joniniai ryšiai, vandenilio ryšiai, sieros tilteliai, van der Waalso jėgos ir hidrofobinės sąveikos [38]. Laikoma, kad hidrofobinė sąveika yra pagrindinis baltymų konformacijos palaikymo veiksnys. Hidrofobinės sąveikos atsiranda dėl nepolinių šoninių grandinių polinkio sąveikauti su kitomis nepolinėmis šoninėmis grandinėmis, o ne su vandeniu. Tokios sąveikos

gali apimti skirtingų gretimų molekulių šonines grandines arba gali atsirasti tarp tos pačios baltymo molekulės šoninių grandinių [38].

Ketvirtinė struktūra egzistuoja baltymuose, sudarytuose iš dviejų ar daugiau identiškų arba skirtingų polipeptidinių grandinių (subvienetų). Šie baltymai vadinami oligomerais, nes turi du ar daugiau subvienetų. Ketvirtinė struktūra apibūdina būdą, kaip subvienetai yra išdėstyti natūraliame baltyme. Subvienetus kartu laiko nekovalentinės jėgos, dėl to oligomeriniai baltymai gali patirti greitus konformacinius pokyčius. Daugeliui baltymų, kad jie taptų aktyvūs, reikia surinkti kelis polipeptidinius subvienetus [33,37,38].

1.3.3. Baltymų agregatai

Pagal apibrėžimą agregatas yra visuma, sudaryta sujungiant keletą atskirų elementų. Baltymų molekulinį agregatą galima apibrėžti kaip daugelio atskirų baltyminių vienetų sanglaudą. Tai iš vieno tipo baltymų monomerų arba skirtingų tipų mišinio sudarytas agregatas. Agregatai gali skirtis dydžiu (svyruoja nuo nm iki μm skersmens), morfologija (gali būti nuo maždaug sferinės iki fibrilinės formos), baltymo struktūros (natūralaus ir denatūruoto), tarpmolekulinio ryšio tipo (kovalentinio ir nekovalentinio) ir agregavimo grįžtamumu [39,40]. 5 pav. pateikiamas amorfinių agregatų atvaizdas, gautas matuojant elektroniniu mikroskopu.



5 pav. Amorfinių baltymų agregatai, matuota elektroniniu mikroskopu [40].

Dažnai manoma, kad agregatai randami tik kaip baltymų gumulėliai, kurių negalima ištirpinti tam tikrame tirpiklyje ar buferyje. Tačiau visi baltymai, susidedantys iš daugiau nei vienos polipeptidinės grandinės ir dėl to turintys ketvirtinę baltymų struktūrą, kurioje sąveikauja baltymų subvienetai, yra tam tikros rūšies agregatai. Atsižvelgiant į tai, baltyminiai mechanizmai, sudaryti iš kelių skirtingų subvienetų, yra baltyminiai agregatai, pavyzdžiui, ribosomos, polimerazės, baltyminiai kanalai ar proteasomos [40].

1.3.4. Baltymų agregatų susidarymas

Baltymų agregatai gali susidaryti dėl temperatūros svyravimų, šviesos, kratymo, sąveikos su paviršiumi, pH keitimo ir t. t. [41,42]. Be to, kai kuriais atvejais baltymų agregatus gali sukelti pašalinės dalelės, pavyzdžiui nerūdijančiojo plieno ar gumos dalelės, druskos kristalai, stiklo dalelės [43]. Baltymų agregaciją taip pat gali lemti arba paskatinti cheminis skilimas ar cheminės reakcijos, pvz.: oksidacija [39].

Baltymų agregacijos metu susidaro nauji cheminiai ryšiai. Agreguotų baltymų tarpmolekulinės jungtys iš tikrųjų yra to paties tipo kaip nekovalentiniai intramolekuliniai ryšiai atskirose baltymų molekulėse. Vandenilinės jungtys susidaro tarp peptidinių grupių ir šoninių grandinių grupių, kurios gali susidaryti tarp neutralių polinių grupių, tokių kaip OH grupės ir =O grupės, taip pat tarp įkrautų grupių. Hidrofobiniai ryšiai randami tarp dviejų nepolinių grupių, kurios gali būti šoninės grandinės arba pagrindinės grupės. Visi šie pavieniai ryšiai yra atskiri silpni ryšiai, tačiau susidarius daugeliui ryšių matoma kooperatyvinė sąveika. Kad būtų toks pat stiprus kaip vienas kovalentinis ryšys, reikia maždaug šimto hidrofobinių arba Van der Waalso jungčių. Joninių ir vandenilio jungčių stiprumas yra tarp kovalentinių ir hidrofobinių [40].

Ryšiai priklauso nuo buferio ir pH, joninės jėgos, temperatūros ir tirpiklio sudėties. Agreguotų baltymų laisvoji energija gali būti mažesnė nei tirpių baltymų monomerų. Pavyzdžiui, baltymams susijungus laisvoji energija gali atsirasti dėl vandenilinių ryšių susidarymo tarp asocijuojančių šoninių grandinių grupių, kaip pastebėta formuojantis polimerui iš fibrino monomerų [44].

1.3.5. Baltymų agregatų nustatymo aktualumas

Baltymų agregacijos sutrikimai – tai grupė ligų, kurios atsiranda dėl vieno ar kelių baltymų klaidingo susilankstymo ir agregacijos arba yra su tuo susijusios. Manoma, kad jie atsiranda dėl to, kad baltymai nepasiekia aktyvios būsenos arba dėl nenormaliai susilanksčiusių baltymų akumuliacijos. Baltymai, kaip pagrindiniai ląstelės efektoriai, atlieka pagrindinį vaidmenį visuose biologiniuose procesuose. Todėl nenuostabu, kad lygiagrečiai su naujų baltymų atradimu ir jų funkciniu apibūdinimu, daugėja ligų, kurios identifikuojamos kaip baltymų agregavimo sutrikimai [36].

Baltymų agregatai, neatsižvelgiant į biocheminę sudėtį, turi bendrą savybę pažeisti audinius dėl toksinio aktyvumo padidėjimo arba biologinės funkcijos praradimo. Pavyzdžiui, beveik visi neurodegeneraciniai sutrikimai yra susiję su nenormaliu neuronų baltymų apdorojimu [45]. Nepaisant stipraus ryšio tarp klaidingo baltymų susilankstymo ir agregacijos bei ligos, nėra suprantama, kaip tai sukelia ligą. Atrodo, kad kai kuriais atvejais baltymų agregatų nusėdimas gali fiziškai sutrikdyti konkrečių organų veiklą. Kitais atvejais atrodo, kad dėl funkcinių baltymų trūkumo, nes jie išsitraukia į agregatus, sutrinka esminiai ląsteliniai procesai [46]. Tačiau tikėtina, kad neurodegeneracinių ligų, tokių kaip Alzheimerio liga (AD), Parkinsono liga (PD) ar prionų liga, simptomai atsiranda dėl ląstelių sunaikinimo dėl „toksinės funkcijos įgijimo“, kuri atsiranda dėl agregacijos proceso (oligomerai, protofibrilės, amiloidinės fibrilės ar kiti tarpiniai produktai) arba dėl šios toksinės funkcijos padidėjimo ir normalios baltymo funkcijos praradimo [47,48].

1.3.6. Analitiniai baltymų agregatų nustatymo būdai

Pramonėje baltymų agregatai dažniausiai nustatinėjami dydžio išskyrimo chromatografijos (SEC) metodu [49]. Nors šis metodas greitas, tačiau šiame metode matricos sąveika gali pakeisti agregatų pasiskirstymą chromatografinėje kolonėlėje ir apsunkinti kiekybinį ir dydžio nustatymą [5,49]. Taip pat SEC metodu yra aptinkamo agregato dydžio viršutinė riba, nes didesnius agregatus gali išfiltruoti pati kolonėlė [49].

Dar vienas labai populiarus agregatų nustatymo metodas yra natrio dodecilsulfato kapiliarinė elektroforezė. Šis metodas suteikia informacijos apie apytikrą molekulių svorį ir kiekį, kiekybiniam įvertinimui naudojant UV absorbciją. Šiam metodui yra reikalingi maži mėginio kiekiai ir greitas atlikimo laikas [49].

Agregatų koncentracija gali būti nustatinėjama pritaikius analitinio ultracentrifugavimo (AUC) analizę. AUC yra galinga technika makromolekulių agregatų buvimui tirpale charakterizuoti, pasižyminti kiekybiniu agregatų įvertinimu ir galimybe išmatuoti agregatų pasiskirstymą buferyje [5,50]. Tačiau šio metodo pakartojamumas dažnai yra santykinai prastas, o nustatyti aptikimo ar nustatymo ribą agregatų aptikimui naudojant AUC yra sudėtinga. Dėl šios priežasties reikalingas reguliarus įrangos kalibravimas ir intensyvi sistemos ir jos priedų priežiūra, siekiant užtikrinti tinkamą agregatų koncentracijos nustatymo tikslumą [51].

1.3.7. Baltymų agregatų nustatymo būdai pasinaudojant dažais

Dažniausiai baltymų agregatų koncentracijos nustatymui naudojami dažai yra Kongo raudonasis ar tioflavinas T. Pasinaudojant dažais, baltymų agregatų koncentracijos gali būti nustatytos pasinaudojant fluorescencijos, elektrocheminio impedanso spektroskopijos ar diferencinės pulsinės voltamperometrijos metodais [19,25,26,52].

Pavyzdžiui, amiloidinių agregatų, tokių kaip A β 40, A β 42 ar mielių priono baltymo Ure2 koncentracijos gali būti nustatytos pasinaudojus fluorescencijos metodą, kaip fluoresuojantį dažą naudojant tioflaviną T (TFT). Šiuo metodu gautas tiesinis koncentracijos intervalas gali būti gaunamas esant įvairioms tioflavino T koncentracijoms (didėjant TFT koncentracijai didėja ir metodo jautrumas). A β 40 ir mielių priono baltymo Ure2 koncentracijos gali būti nustatytos intervale nuo 0,5 μ M iki 10 μ M. Tuo tarpu tiriant A β 42 baltymo agregato koncentracijas, gaunamas tiesinis intervalas yra siauresnis ir yra nuo 1 μ M iki 8 μ M [19].

Galima stebėti lizocimo agregato koncentracijos kitimą, kaip dažą naudojant TFT, pasinaudojus elektrocheminio impedanso spektroskopijos metodu. Gautiems rezultatams pritaikius ekvivalentinę schemą, buvo gautos sigmoidinės formos tirpalo varžos ir krūvio pernašos varžos priklausomybės nuo lizocimo agregato koncentracijos. Autoriai teigia, kad galima naudoti šiuos EIS parametrus kaip patogų įrankį fibrilių formavimosi kinetikai tirti ir lizocimo agregato koncentracijai įvertinti [26].

Naudojant diferencinę pulsinę voltamperometriją, buvo galima stebėti skirtumus tarp gryno TFT ir TFT su A β -42 agregatais. Šiuo atveju matavimams buvo naudojama šilkografijos būdu atspausdinta anglies juostelė, o matavimai atliekami 50 mM PBS (pH 7,40). Šiuo metodu tiriant TFT ir TFT su baltymų agregatais buvo pastebėta, kad TFT koncentracija tirpale per inkubacijos procesą išlieka apytiksliai pastovi, o tai padidina TFT kaupimąsi ant fibrilių, kur jie tampa labiau prieinami elektrodų paviršiui, tokiu būdu didinant TFT oksidacijos signalą. Autoriai teigia, kad jų gauti rezultatai rodo, kad benzotiazolinių dažiklių elektrocheminės oksidacijos signalai yra naujas ir paprastas įrankis tiriant amiloido susidarymą [25].

2. EKSPERIMENTINIO TYRIMO METODIKA

2.1. Tyrimams naudota aparatūra ir tirpalai

2.1.1. Tyrimams naudotos medžiagos

Itin grynas dejonizuotas vanduo ($R \geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$), tiekiamas iš Milli Q-plus-Millipore sistemos (JAV).

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (CAS Nr. 13472-35-0, grynumas $\geq 99\%$), NaCl (CAS Nr. 7647-14-5, grynumas $\geq 99,5\%$), KOH (CAS Nr. 1310-58-3, grynumas $\geq 85\%$) druskos, HCl (koncentruota 36,5%), iš ROTH (Karlsruhė, Vokietija).

Tioflavinas T (CAS Nr. 2390-54-7) ir vištos kiaušinio baltymo lizocimo milteliai (CAS Nr. L6876) iš Sigma-Aldrich (Sent Luisas, JAV).

2.1.2. Tyrimams naudota aparatūra

Ciklinės voltamperometrijos ir elektrocheminio impedanso spektroskopijos matavimai buvo atlikti naudojant $\mu\text{AUTOLAB}$ potenciostatą / galvanostatą iš ECO-Chemie (Utrechtas, Olandija). Medžiagų svėrimams buvo naudojamos Kern abt 220-5dm analitinės svarstyklės iš Sigma-Aldrich (Miunchenas, Vokietija). pH nustatymui naudotas pH metras HI83141 su HI1230B elektrodu iš Hanna Instruments (Bedfortvėjus, Pietų Afrikos Respublika).

Tyrimams naudoti elektrodai: pagalbinis ir darbinis (geometrinis plotas $1,3 \text{ cm}^2$) elektrodai – platinos plokštelės, palyginamasis elektrodas – sidabro viela padengta sidabro chlorido sluoksniu pamerkta į sotų KCl tirpalą (Ag/AgCl , , $\text{KCl}_{\text{sot.}}$).

2.1.3. Tyrimams reikalingų tirpalų gaminimas

Tyrimams naudotas fosfatinis buferis (PBS angl. k. phosphate buffer solution) ($10 \text{ mmol/L NaH}_2\text{PO}_4$ ir $0,1 \text{ M NaCl}$ pH7,4): su analitinėmis svarstyklėmis buvo pasveriami $0,78 \text{ g NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ir $2,925 \text{ g NaCl}$ ir dedama į 500 mL cheminę stiklinę. Į stiklinę pilama maždaug 480 mL dejonizuoto vandens. Sukalibruotas pH metras įmerkiamas į stiklinėlę su tirpalu ir laukiama, kol pH vertė taps pastovi. Tada į tirpalą buvo lašinama KOH tirpalo, kol pH vertė tirpale buvo 7,4. Paruoštas tirpalas supilamas į 500 mL matavimo kolbą ir skiedžiamas dejonizuotu vandeniu iki 500 mL žymos.

Lizocimo agregato tirpalo gaminimas: lizocimo milteliai buvo ištirpinami 50 mM natrio fosfato (Na_2HPO_4) buferyje (pH 6,0), kuriame yra 2 M guanidino hidrochlorido (GuHCl) iki galutinės $950 \mu\text{M}$ baltymo koncentracijos. Gautas tirpalas buvo paskirstytas į 2 ml mėgintuvėlius (po 1.75 ml), kurių kiekviename buvo po du 3 mm stiklo rutuliukus, ir 72 val. inkubuotas $60 \text{ }^\circ\text{C}$ temperatūroje maišant 600 aps./min. Gautas agregatų tirpalas buvo centrifuguojamas centrifugoje 5 min. Tada likęs tirpalas buvo išpilamas ir užpilama $0,7 \text{ mL}$ buferio, mėgintuvėlis supurtomas ir vėl dedamas 5 min į centrifugą. Šita procedūra buvo kartojama 4 kartus, kad būtų pašalintos agregato tirpale esančios priemaišos ir neagregavęs lizocimo baltymas. Tada į mikro centrifuginį mėgintuvėlį buvo pilama buferio iki 1 mL žymos. Taip buvo gaunamas $1,663 \text{ mM}$ lizocimo agregatų tirpalas.

2.2. Ciklinės voltamperometrijos ir impedimetrinio tyrimo metodika ir rezultatų apdorojimas TFT koncentracijos nustatymui

2.2.1. Ciklinės voltamperometrijos tyrimo metodika TFT koncentracijos nustatymui

Ciklinės voltamperometrijos (CV) tyrimai buvo atliekami trijų elektrodų sistemoje, susidedančioje iš darbinio ir pagalbinio platinos elektrodų ir sidabro/sidabro chlorido palyginamojo elektrodo sočiame KCl tirpale (Ag/AgCl , $\text{KCl}_{(\text{sat.})}$). Ciklinės voltamperometrijos matavimai buvo atliekami skleidžiant potencialą intervale nuo 0,2V iki 0,9V Ag/AgCl , $\text{KCl}_{\text{sat.}}$ pagalbinio elektrodo atžvilgiu, naudojant 0,04V potencialo skleidimo greitį ir 0,00412V žingsnio potencialą. Tyrimai buvo atliekami 10 mmol/L NaH_2PO_4 ir 0,1M NaCl pH7,4 PBS. Sujungus 3 elektrodų sistemą ir į kiuvetę įdėjus 8 mL buferinio tirpalo, būdavo matuojamas ciklinės voltamperometrijos srovė buferyje. Tada buvo dedamas reikiamas tioflavino T tirpalo tūris, tirpalas išmaišomas su magnetine maišykle, po kiekvieno TFT dėjimo vėl matuojant 3 ciklus intervale nuo 0,2V iki 0,9V. Taip buvo kartojama, kol užfiksuojamas norimas TFT koncentracijos intervalas.

Ciklinės voltamperometrijos rezultatams apdoroti, buvo skaičiuojamos susidariusios tioflavino T koncentracijos kiuvetėje. Tada atitinkamos TFT koncentracijos srovės stipris ties 0,9V būdavo padalijamas iš buferyje gauto srovės stiprio ties 0,9V.

2.2.2. Impedimetrinio tyrimo metodika

Atliekant elektrocheminio impedanso spektroskopijos (EIS) tyrimus buvo naudojama tokia pati trijų elektrodų sistema: darbinis ir pagalbinis elektrodai – platinos plokštelės, palyginamasis elektrodas – Ag/AgCl , $\text{KCl}_{(\text{sat.})}$. Impedimetriniams tyrimams atlikti į kiuvetę buvo dedama 8 mL buferio ir matuojamas EIS atsakas esant norimam potencialui. Tada į tirpalą buvo dedamas reikiamas tūris TFT tirpalo, kiuvetės tirpalas išmaišomas naudojant magnetinę maišyklę ir vėl matuojamas impedanso atsakas esant 0,9V potencialo skirtumui palyginus su Ag/AgCl , $\text{KCl}_{\text{sat.}}$ palyginamuoju elektrodu. Taip buvo kartojama tol, kol pridėjus tioflavino T į tirpalą, spektrų forma nebesikeičia. Visi EIS matavimai buvo atlikti kintamosios srovės dažnių intervale nuo 0,5 Hz iki 100000 Hz.

Norint apdoroti EIS rezultatus buvo apskaičiuojamos susidariusios TFT koncentracijos tirpale ir rezultatai modeliuojami pasinaudojus reikiama ekvivalentine schema.

2.3. Ciklinės voltamperometrijos ir impedimetrinio tyrimo metodika ir rezultatų apdorojimas agregato koncentracijos nustatymui

2.3.1. Ciklinės voltamperometrijos tyrimo metodika

Norint nustatyti lizocimo agregatus buvo naudojama ta pati 3 elektrodų sistema, kaip ir TFT nustatymo atveju. Buvo dedamas toks buferio kiekis, kad po buferio pridėjus agregato tirpalo, bendras buferio ir agregato tirpalo tūris būtų lygus 8 mL. Pavyzdžiui, jeigu buferio buvo dedama 7 mL, tada agregato tirpalo buvo dedama 1 mL, o jeigu buferio buvo dedama 7,8 mL, tada buvo dedama 0,2 mL agregato tirpalo ir pan. Tada matuojama buferio ir agregato CV kreivė. Dedamas reikiamas tūris TFT tirpalo, tirpalas išmaišomas su magnetine maišykle ir vėl atliekamas CV matavimas. Taip matavimai buvo kartojami, kol apimamas norimas tioflavino T koncentracijų intervalas. Po matavimo kiuvetė ir

elektrodai yra išplaunami krano vandeniui ir tada dejonizuotu vandeniui ir matavimas kartojamas. Taip buvo atliekami matavimai galutiniame tirpale esant nuo 0.208 μM iki 207,8 μM lizocimo agregatų.

Norint interpretuoti rezultatus, apskaičiuojamos TFT ir lizocimo agregato koncentracijos tirpale. Iš tirpale esant tioflavino T srovės stiprio vertės prie 0,9V yra atimama srovės stiprio vertė prie 0,9V, esant atitinkamai agregato koncentracijai. Iš šių duomenų gaunamos agregato kalibravimo kreivės, pasitelkiant srovės stiprio skirtumą esant vienai TFT koncentracijai.

Norint gauti rezultatus pasinaudojus gautų taškų aibe, buvo braižomos tiesinės priklausomybės tarp srovės stiprio ir tioflavino T koncentracijos, esant skirtingoms agregato koncentracijoms norimame tioflavino T koncentracijos ruože. Iš šių duomenų konstruojama kalibravimo kreivė, skirta agregato koncentracijai nustatyti.

2.3.2. Elektrocheminio impedanso spektroskopijos tyrimo metodika

Lizocimo agregatų nustatymui buvo taikoma ta pati 3 elektrodų sistema, kaip ir TFT nustatymo atveju. Kaip ir ciklinės voltamperometrijos atveju, dedamas toks buferio tūris, kad buferio ir agregato tūrių sumos būtų lygios 8mL. Pamatuojamas buferyje gaunamas impedimetrinis atsakas esant 0,9V potencialų skirtumui palyginus su Ag/AgCl , $\text{KCl}_{(\text{sat.})}$ palyginamuoju elektrodu. Tada matuojamas gaunamas atsakas pridėjus reikiamą tūrį lizocimo agregatų į tirpalą. Dedamas norimas tūris tioflavino T tirpalo, tirpalas išmaišomas ir vėl matuojamas elektrocheminio impedanso atsakas esant pasirinktam potencialui.

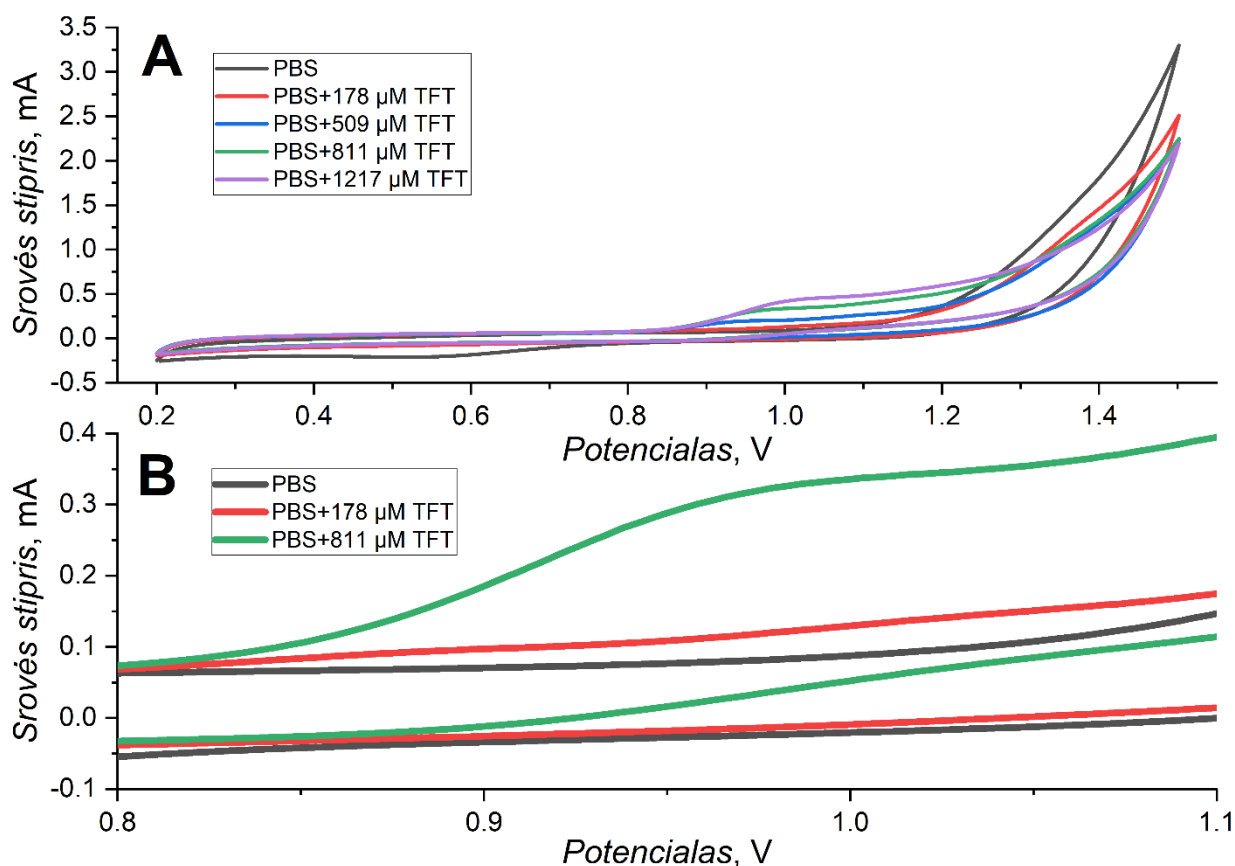
Kaip ir prieš tai minėtose metodikose, paskaičiuojamos lizocimo ir agregato koncentracijos tirpaluose. Gautos kreivės esant skirtingoms agregato ir tioflavino T koncentracijos yra pritaikomos, pasinaudojus tą pačią ekvivalentinę schemą, kaip ir TFT nustatymo atveju.

3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. TFT koncentracijos nustatymas

3.1.1. TFT koncentracijos nustatymas ciklinės voltamperometrijos metodu

Norint nustatyti optimalų potencialų intervalą, kuriame galima matyti srovės stiprio pokyčius, tarp skirtingų tioflavino T koncentracijų, buvo tiriamos 4 skirtingos TFT koncentracijos (nuo 178 μM iki 1217 μM) potencialų intervale nuo 0,2 V iki 1,5 V palyginus su Ag/AgCl, KCl_{sat.} palyginamuoju elektrodu (6 pav.).



6 pav. Ciklinės voltamperinės kreivės PBS pH4,5 be tioflavino T ir esant skirtingoms tioflavino T koncentracijoms (nuo 178 μM iki 1217 μM). A – potencialų intervale nuo 0,2 V iki 1,5 V; B – potencialų intervale nuo 0,8 V iki 1,1 V. Potencialo skleidimo greitis 0,040 V//s.

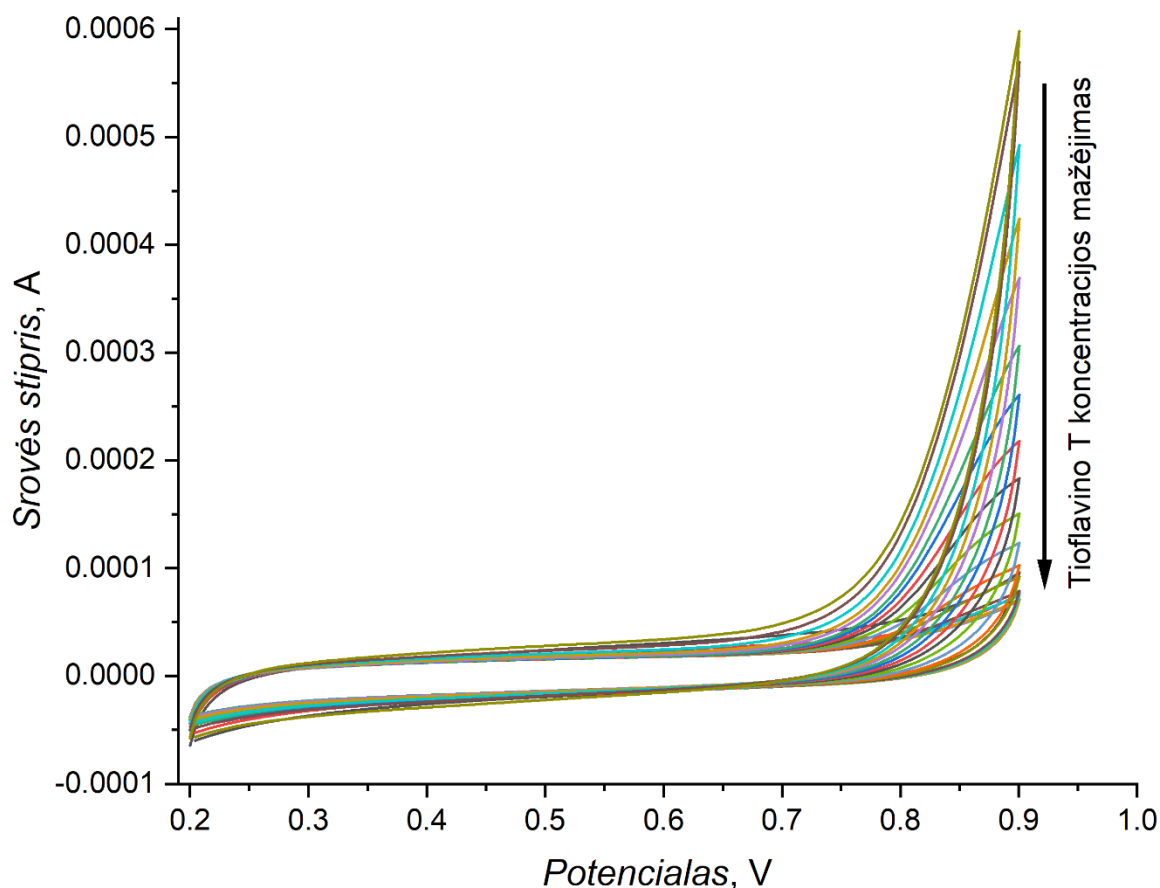
Iš 6 pav. pateiktų kreivių galima matyti, kad didėjant TFT koncentracijai tirpale, pradeda didėti anodinės srovės stipris ties 0,9 V. Pavyzdžiui, srovės stipris padidėja 1,4 karto pridėjus 178 μM TFT, palyginus su srovės stipriu užregistruotu buferyje. Tuo tarpu pridėjus 811 μM TFT, srovės stipris padidėja beveik 2,6 karto.

Šis kitimas smarkiai sulėtėja pasiekus 1V, o esant tioflavino T koncentracijai nuo 509 μM , ties maždaug 1V jau galima matyti anodinės srovės stiprio piką. Tikėtina, kad šis pikas priklauso tioflavino T oksidacijai, kadangi didėjant TFT koncentracijai, atitinkamai didėja ir srovės tankis, esant 1V potencialui. Literatūroje rasti duomenys patvirtina galimą TFT oksidaciją tokių potencialų srityje, pvz.: ant stiklo anglies elektrodo naudojant diferencinę ciklinę voltamperometriją TFT srovės

pikas matomas ties 0,9 V palyginus su Ag/AgCl, KCl_{sot.} [23], taip pat ant šilkografiniu būdu atspausdintos anglies juostelės elektrodo tiriant CV metodu TFT pikai matomi ties 0,95 V palyginus su Ag/AgCl, KCl_{sot.} elektrodu [25]. Literatūroje nebuvo rasta TFT oksidacijos produkto struktūra, taip yra todėl, nes TFT oksidacijos produktas yra nestabilus vandeninėje terpėje atliekant branduolių magnetinio rezonanso (BMR) matavimus ir gaunamas BMR spektras yra per sudėtingas jį išspręsti [20]. Toliau keliant darbinio elektrodo potencialą, nuo 1,2V matomas dar vienas srovės stiprio kilimas, kuris yra galimai susijęs su vandens oksidacija, kuri prasideda esant pakankamai dideliems potencialams. Pavyzdžiui, literatūroje rasta vandens oksidacija ant platinos paviršiaus atliekant CV matavimus prasideda ties 0,9 V ar 1,2 V priklausant nuo tirpalo sudėties [53,54].

Nors didesnis srovės stiprių skirtumas tarp skirtingų tioflavino T koncentracijų yra matomas esant apie 1V potencialų skirtumui (6 pav.), tačiau tolesniems CV tyrimams potencialo intervalas buvo pasirinktas nuo 0,2V iki 0,9V. Taip buvo nuspręsta todėl, kad pasirinkus mažesnę potencialą, kuriame dar galima matyti vykstančią TFT oksidaciją yra užtikrinama mažesnė vandens elektrolizės įtaka matuojamam elektrocheminiam signalui.

Norint CV metodą pritaikyti tioflavino T koncentracijos nustatymui, buvo atliekami 3 CV ciklai vis pridodant papildomai TFT tirpalo ir iš naujo matuojant 3 CV ciklus (7 pav.).



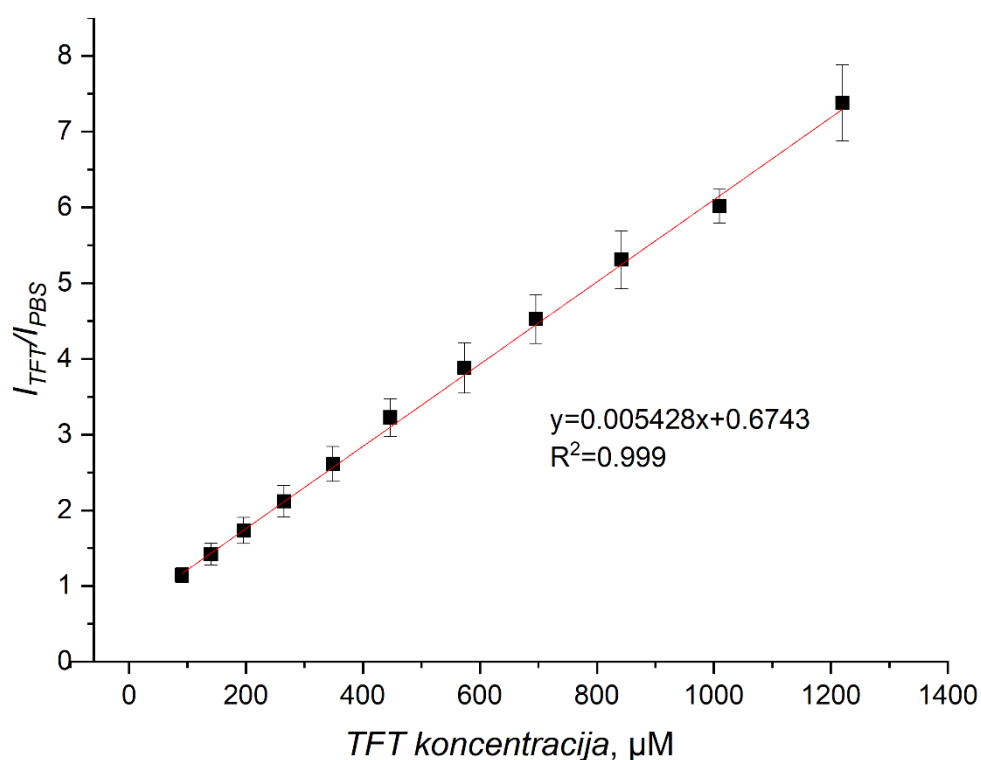
7 pav. Ciklinės voltamperometrijos kreivės PBS pH7,4 be TFT ir esant skirtingoms TFT koncentracijoms (nuo 2,19 μ M iki 1219,76 μ M). Potencialo skleidimo greitis 0,040 V/s.

Iš 7 pav. pateiktų duomenų matoma, kad TFT koncentracijos padidėjimas tirpale sukelia ženklų srovės stiprio, išmatuoto ties 0,7 V - 0,9 V, augimą. Kadangi didžiausi srovės stiprio skirtumai matosi esant didžiausiam potencialui (0,9V), šiame potenciale esanti srovės stiprio vertė ir buvo pasirinkta kalibravimo kreivės, skirtos nustatyti TFT koncentraciją, sudarymui.

7 pav. pavaizduoti matavimai buvo atliekami 6 kartus, kiekvieną kartą iš naujo registruojant ciklinę voltamperinę kreivę buferiniame tirpale be tioflavino T ir esant skirtingoms tioflavino T koncentracijoms. Iš šių duomenų buvo gaunama kalibravimo kreivė ir paklaidų vertės, kurios pavaizduotos 8 pav. Ant x ašies buvo atidedama tioflavino T koncentracija, o ant y ašies atidedamas dalmuo, tarp srovės stiprio vertės nustatytos buferiniame tirpale su skirtinga TFT koncentracija ir srovės stiprio vertės nustatytos buferiniame tirpale be TFT, esant 0,9V elektrodo potencialui (2 lygtis).

$$dalmuo = \frac{I_{TFT}}{I_{PBS}} \quad (2)$$

čia I_{TFT} – srovės stipris ties 0,9V buferiniame tirpale su tioflavinu T; I_{PBS} – srovės stipris ties 0,9V buferiniame tirpale be tioflavino T.

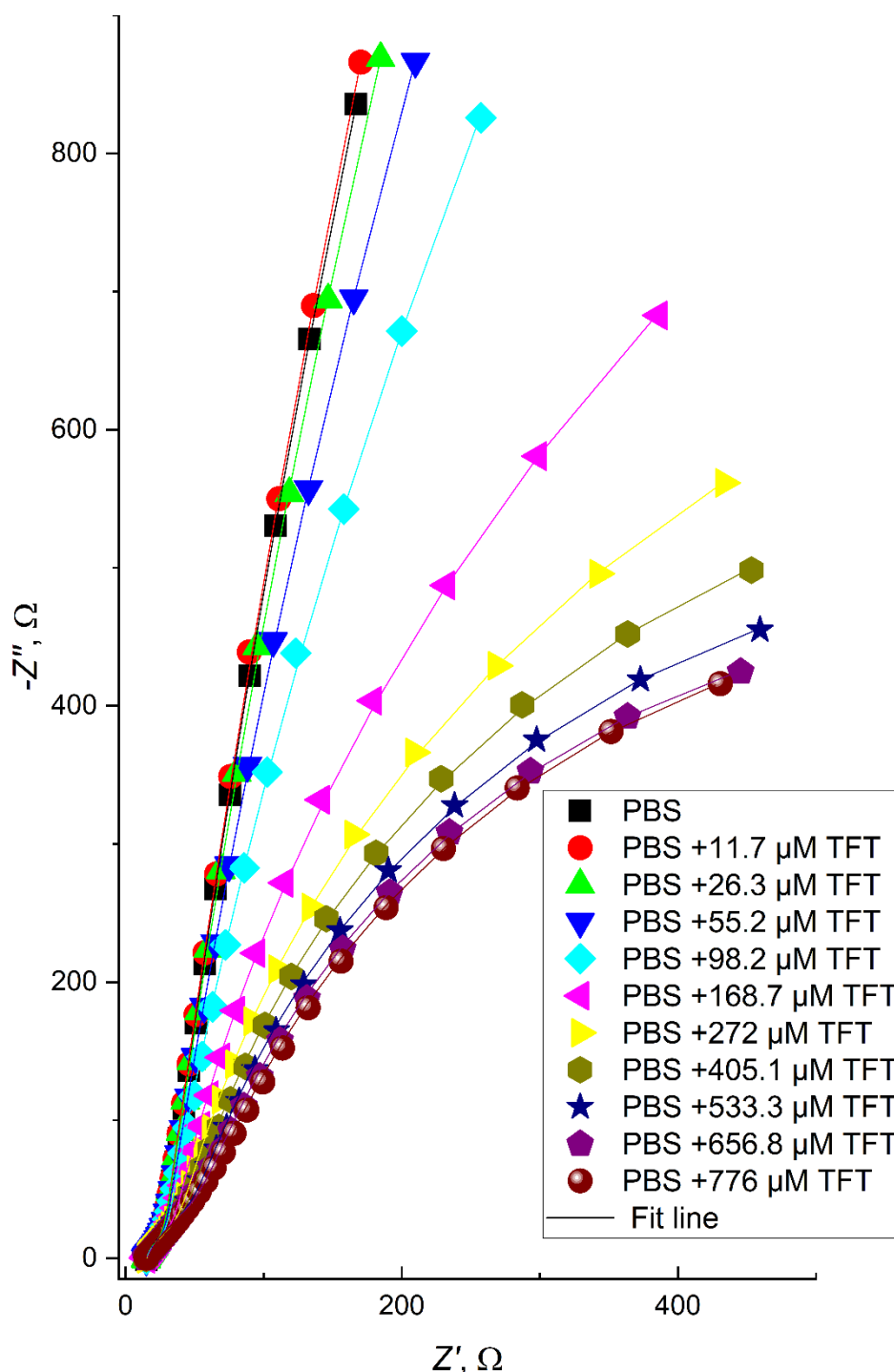


8 pav. Kalibravimo kreivė TFT koncentracijos nustatymui fosfatiniame buferiniame tirpale pH4,5.

Nors ciklinės voltamperinės kreivės buvo registruojamos tirpaluose, kuriuose mažiausia tioflavino T koncentracija buvo lygi 2,19 μM , tačiau tiesinės koncentracijos intervalas (8 pav.) buvo pasiektas tik TFT koncentracijoms esant nuo 90,35 μM iki 1219,76 μM . Taip galėjo būti todėl, kad esant pakankamai mažoms TFT koncentracijoms, srovės stiprio vertės ties 0,9V pokyčiai yra labai neįžymūs ir šiuo metodu negali būti pastebėti. Tačiau padidinus tioflavino T koncentraciją iki 90,35 μM , TFT oksidacija ties 0,9V sustiprėja ir pokyčiai jau gali būti fiksuojami. Taip pat 8 pav. matosi, kad gautos kalibravimo tiesės koreliacijos koeficiento kvadratas yra beveik lygus 1 (0,999). Tai rodo labai gerą sistemos išvestinio signalo I_{TFT}/I_{PBS} (2 lygtis) ir tioflavino T koncentracijos tiesiškumą visame tirtų koncentracijų intervale. Pasitelkus šį metodą, jo jautrumas (tiesės lygties narys prie x) yra 0,005428 μM^{-1} .

3.1.2. TFT koncentracijos nustatymas elektrocheminio impedanso spektroskopijos metodu

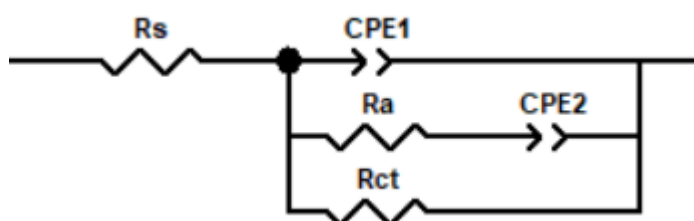
Potenciostatiniais elektrocheminio impedanso spektrų matavimams elektrodui suteikiamas potencialas buvo pasirinktas iš TFT ciklinės voltamperometrijos duomenų (7 pav.). Kaip jau buvo minėta, esant 0,9V potencialo skirtumui, yra matoma TFT oksidacija, tačiau vykstantys pašaliniai procesai, tokie kaip vandens oksidacija, dar reikšmingai neįtakoja registruojamo signalo. Todėl buvo nuspręsta EIS matavimus atlikti esant 0,9 V potencialui Ag/AgCl, KCl_(sot.) palyginamojo elektrodo atžvilgiu. Gautos elektrocheminio impedanso kreivės yra pateikiamos 9 pav.



9 pav. Elektrocheminio impedanso spektrai ir pagal 10 pav. ekvivalentinę schemą apskaičiuotos teorinės kreivės PBS pH7,4 be tioflavino T ir esant skirtingoms tioflavino T koncentracijoms, esant 0,9 V elektrodo potencialo vertei Ag/AgCl, KCl_(sot.) palyginamojo elektrodo atžvilgiu.

Kaip matosi 9 pav., EIS kreivių forma skiriasi priklausomai nuo TFT koncentracijos PBS. Esant nedidelei TFT koncentracijai (iki 26,25 μM) impedanso spektrai praktiškai nesiskiria nuo kreivės, užregistruotos PBS be TFT, tačiau didėjant tioflavino T koncentracijai, kompleksinės varžos vertės ima pastebimai mažėti, atitinkamai, krūvio pernašos proceso greitis didėja, didėjant TFT koncentracijai tirpale.

Gauti EIS rezultatai (9 pav.) buvo modeliuojami naudojant 10 pav. pateiktą ekvivalentinę schemą. Ši schema, susidedanti iš tirpalo varžos, dviejų pastovios fazės elementų (CPE1 reprezentuoja dvigubo elektrinio sluoksnio talpą, o CPE2 – adsorbcijos talpą) ir krūvio pernašos bei adsorbcijos varžų, buvo pasirinkta, kadangi tioflavinas T linkęs adsorbuotis ant elektrodo paviršiaus, pvz.: stipriai adsorbuojasi ant stiklo anglies elektrodo [23]. Ekvivalentinės schemos (10 pav.) tinkamumą eksperimentinių EIS duomenų apdorojimui patvirtina geras eksperimentiškai nustatytų EIS kreivių (9 pav., simboliai) ir pagal ekvivalentinę schemą sumodeliuotų teorinių kreivių (9 pav., linija) sutapimas. 1 lentelėje pateikiamos Pt elektrodo skirtingos sudėties fosfatiniame buferiniame tirpale elektrocheminių parametrų vertės, gautos modeliuojant 9 pav. pateiktus EIS pagal 10 pav. pateiktą ekvivalentinę schemą.



10 pav. Naudota ekvivalentinė schema EIS rezultatų modeliavimui susidedanti iš tirpalo varžos (R_s), – 1 ir 2 procesų pastovios fazės elementų (CPE1 ir CPE2, kurie atitinkamai reprezentuoja dvigubo elektrinio sluoksnio talpą ir adsorbcijos talpą), krūvio pernašos varžos (R_{ct}) ir adsorbcijos varžos (R_a).

1 lentelė. Pagal 10 pav. pateiktą ekvivalentinę schemą apskaičiuotų EIS (9 pav.) elektrocheminių parametrų vertės.

Tirpalo sudėtis	R_s, Ω	CPE1-T, μF	CPE1-P	R_a, Ω	CPE2-T, μF	CPE2-P	$R_{ct}, \text{k}\Omega$
PBS	15.73	157	0.93	31.65	254	0.91	22.41
PBS +11.69 μM TFT	15.63	152	0.93	29.16	244	0.91	25.11
PBS +26.25 μM TFT	15.48	149	0.92	29.07	246	0.91	19.81
PBS +55.2 μM TFT	15.57	158	0.90	29.93	239	0.91	15.40
PBS +98.2 μM TFT	15.49	211	0.85	36.6	201	0.92	9.09
PBS +168.7 μM TFT	15.53	292	0.79	61.14	152	0.94	3.07
PBS +272 μM TFT	15.75	272	0.79	66.1	182	0.91	1.84
PBS +405.1 μM TFT	15.85	257	0.79	76.54	195	0.90	1.48
PBS +533.3 μM TFT	16.06	241	0.79	87.72	213	0.88	1.30
PBS +656.8 μM TFT	16.13	256	0.78	100.1	221	0.88	1.22
PBS +776 μM TFT	16.33	269	0.77	106	236	0.87	1.24

Kaip buvo minėta, 10 pav. gauta ekvivalentinė schema atitinka du vykstančius procesus ant platinos paviršiaus, kur vienas iš jų, tikėtina, TFT adsorbcija ant darbinio elektrodo, o kitas TFT oksidacija ant platinos paviršiaus. 1 lentelėje matomas krūvio pernašos varžos mažėjimas, didėjant TFT koncentracijai, indikuoja intensyvesnę krūvio pernašą fazių sąlyčio riboje tirpalas-elektrodas

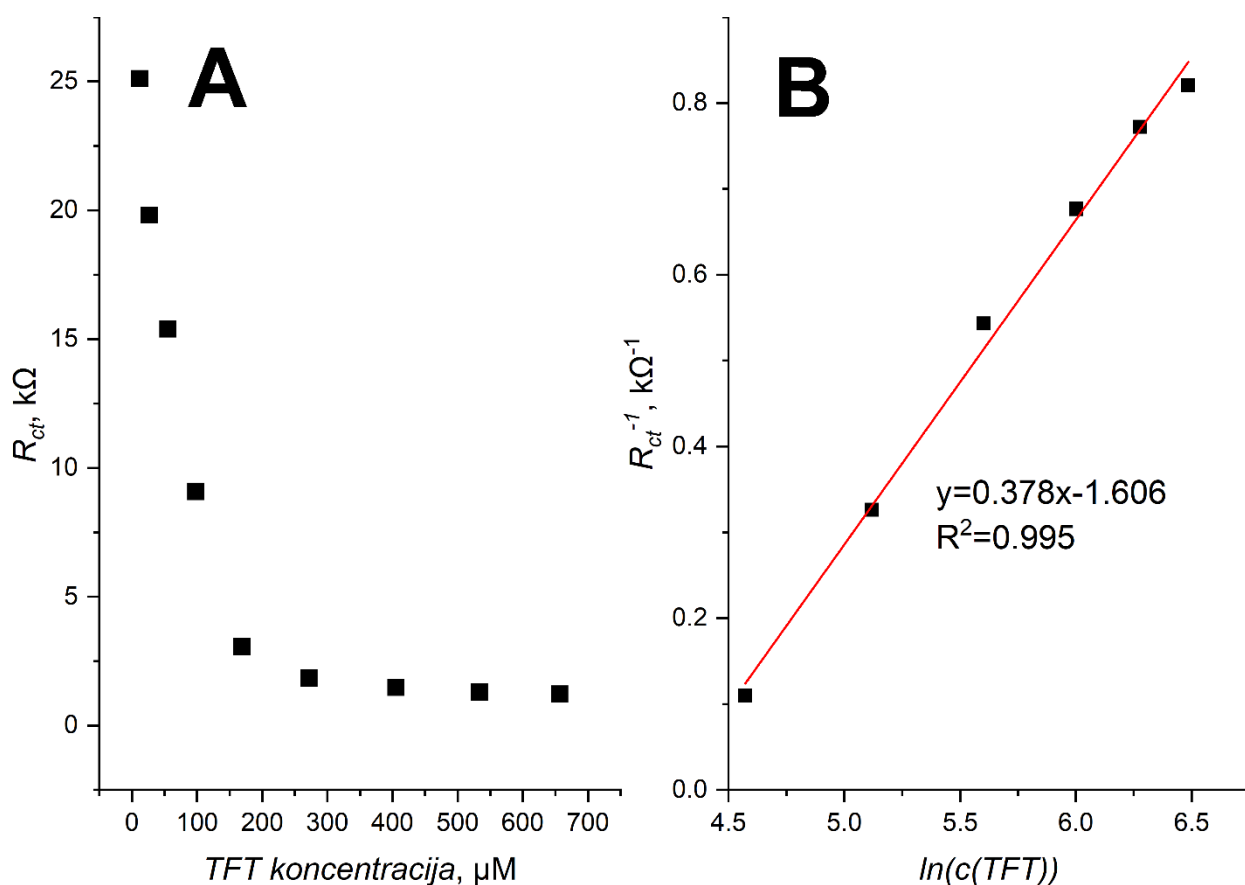
esant didesnėms TFT koncentracijoms. Skirtinga tendencija yra matoma iš 1 lentelėje pateiktų adsorbcijos varžos reikšmių. Šiuo atveju didėjant TFT koncentracijai adsorbcijos varža didėja. Taip yra todėl, kad didėjant tioflavino T koncentracijai tirpale didesnis kiekis molekulių būna adsorbuotos ant platinos paviršiaus, kas lemia didesnę varžą.

Ekvivalentinės schemos tinkamumas eksperimentinių duomenų apdorojimui bei apskaičiuotų elektrocheminių parametrų verčių patikimumas buvo tiriamas naudojant chi kvadrato (χ^2) testą (3 lygtis), kuris įvertina gautų dydžių pagal ekvivalentinę schemą ir realių matavimo duomenų atitikimą. Geriausias realių ir pagal ekvivalentinę schemą gautų verčių atitikimas gaunamas chi kvadrato vertei artėjant prie 0 [55,56]. 1 lentelėje pateiktų dydžių χ^2 vertės svyruoja nuo $1,00 \times 10^{-3}$ iki $4,33 \times 10^{-3}$.

$$\chi^2 = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}}{n} \quad (3)$$

, čia O_i – išmatuota varžos vertė; E_i – pagal ekvivalentinę schemą gauta varžos vertė; n – matavimų skaičius (priklausantis nuo to kiek skirtingų dažnių buvo matuota);

Krūvio pernašos varža mažėja didėjant tioflavino T koncentracijai tirpale (1 lentelė). Todėl pasitelkiant R_{ct} buvo sudaroma krūvio pernašos varžos priklausomybė nuo tioflavino T koncentracijos. Ryšys tarp krūvio pernašos varžos ir TFT koncentracijos atsispindi 11 pav. (A), o gauta kalibravimo kreivė panaudojant R_{ct} yra pateikiama 11 pav. (B).



11 pav. A – krūvio pernašos varžos priklausomybė nuo TFT koncentracijos; B – kalibravimo kreivė TFT koncentracijos nustatymui pagal R_{ct} krūvio pernašos varžą

Analizuojant eksperimentinius EIS duomenis (11 pav.) nustatyta, kad tiesinis koncentracijos intervalas koordinatėse $1/R_{ct} - \ln c(\text{TFT})$ yra nuo 98,2 μM iki 656,8 μM tioflavino T, kurio jautrumas yra 0,378 $\text{k}\Omega^{-1}$.

Palyginimui, TFT koncentracijos nustatymui panaudojant CV metodą, gautas tiesinės koncentracijos intervalas yra nuo 90,35 μM iki 1219,76 μM . Šis intervalas yra beveik 2 kartus platesnis, negu gautas naudojant R_{ct} varžos pokytį (nuo 98,2 μM iki 658,8 μM). Be to, ciklinės voltamperometrijos metodas pasižymėjo geresniu taškų tiesiškumu ($R^2=0,999$), negu buvo gaunama EIS metodu nustatant TFT koncentraciją pagal R_{ct} , kurio tiesinės koreliacijos kvadratas yra lygus 0,995.

Siekiant rezultatus palyginti su kitais literatūroje pateiktais tioflavino T nustatymo metodais, literatūroje buvo rastos trys TFT nustatymo metodikos, kurios yra pateikiamos 2 lentelėje.

2 lentelė. TFT koncentracijos nustatymo būdai ir jų tiesiniai intervalai.

TFT aptikimo metodas	Tiesinis intervalas	Šaltinis
Diferencinė impulsinė voltamperometrija	40 nM - 400 nM	[23]
Vandeninio tirpalo laidumas	10 μM - 200 μM	[18]
Spektroskopinė analizė	1,7 μM - 12 μM	[24]
Ciklinė voltamperometrija	90,35 μM - 1219,76 μM	Šis darbas
Elektrocheminio impedanso spektroskopija	98,2 μM - 658,8 μM	Šis darbas

Kaip matosi 2 lentelėje, pasitelkus kitus literatūroje pateiktus metodus tioflavino T koncentracijos galima nustatyti nuo 40 nM iki 200 μM . Iš pateiktų duomenų, diferencinės impulsinės voltamperometrijos (DPV) metodas yra galintis nustatyti mažiausias TFT koncentracijas. Jis gali nustatyti TFT koncentracijas nuo 40 nM iki 400 nM [23]. Tuo tarpu, pasitelkus vandeninio tirpalo laidumą, straipsnio kūrėjams pavyko nustatyti TFT koncentracijas intervale nuo 10 μM iki 200 μM [18]. TFT koncentracijos nustatymui naudojant spektroskopinę analizę ir tirpale esant nedidelėms kraujo albumino koncentracijoms, buvo gautos tiesinės tioflavino T koncentracijos ir santykinio fluorescencijos intensyvumo priklausomybės TFT koncentracijos intervale nuo maždaug 1,7 μM iki 12 μM [24].

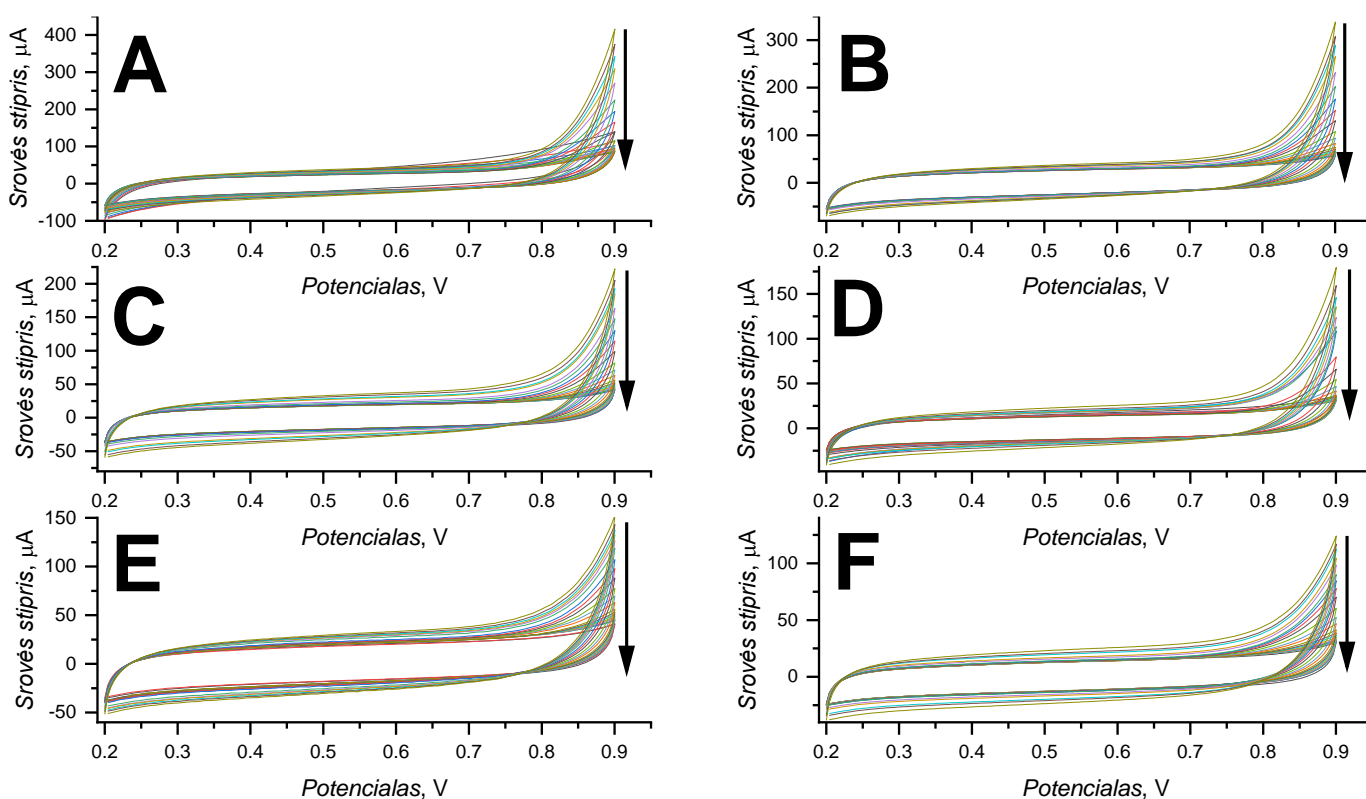
Palyginus su šiame darbe aprašytais TFT nustatymo metodais, literatūroje aprašyti metodai turi panašų tiesinio intervalo plotį. Straipsniuose tiesiniai intervalai apima nuo 1 iki 2 eilių, o šiame darbe nustatinėjant TFT koncentracijas atitinkamai CV ir EIS metodais, tiesinio intervalo pločiai yra atitinkamai lygūs 1,3 ir 0,7 eilės. Tuo tarpu vertinant mažiausią nustatomą TFT koncentraciją, literatūroje rastos metodikos pasižymėjo galimybe nustatyti mažesnes TFT koncentracijas, negu buvo gauta tiriant TFT koncentracijas CV ir EIS metodais šiame darbe. Nepaisant to, ir šiame darbe aprašytos EIS ir CV metodikos ir literatūroje rasti vandeninio tirpalo laidumo ir spektroskopinė analizės metodai, galėjo aptikti μM tioflavino T koncentracijas. Nepaisant mažiausios koncentracijos nustatymo ribos, šiame darbe minimo metodo pranašumas yra tas, kad naudojamas paprastas darbinis elektrodas (platinos plokštelė), kuriam nereikia jokių apdorojimo procedūrų, taip pat pati analizė, tiriant šiam darbe aprašytu metodu, nereikalauja jokių papildomų reagentų.

Kadangi abu metodai, ir ciklinė voltamperometrija ir elektrocheminio impedanso spektroskopija, gali būti sėkmingai naudojami nustatant TFT koncentracijas tirpale, toliau abu šie metodai buvo pritaikomi lizocimo agregato koncentracijai nustatyti.

3.2. Lizocimo agregato koncentracijos nustatymas

3.2.1. Lizocimo agregato koncentracijos nustatymas ciklinės voltamperometrijos metodu

Pirmiausia lizocimo agregatams nustatyti CV metodu buvo matuojamos skirtingos agregato koncentracijos (nuo 0,208 μM iki 83,13 μM) dedant į tirpalą vis didesnius tioflavino kiekius (nuo 2,743 μM iki 1463,7 μM). Šie matavimai kiekvienai skirtingai agregato koncentracijai buvo kartojami tris kartus, toliau imant šių rezultatų vidurkį. Matavimai skirti išsiaiškinti optimalią tioflavino T koncentraciją, kurioje bus galima matyti srovių skirtumus tarp skirtingo agregato koncentracijų. Taip gaunamos ciklinės kreivės esant skirtingoms lizocimo agregato koncentracijoms pateikiamos 12 pav.



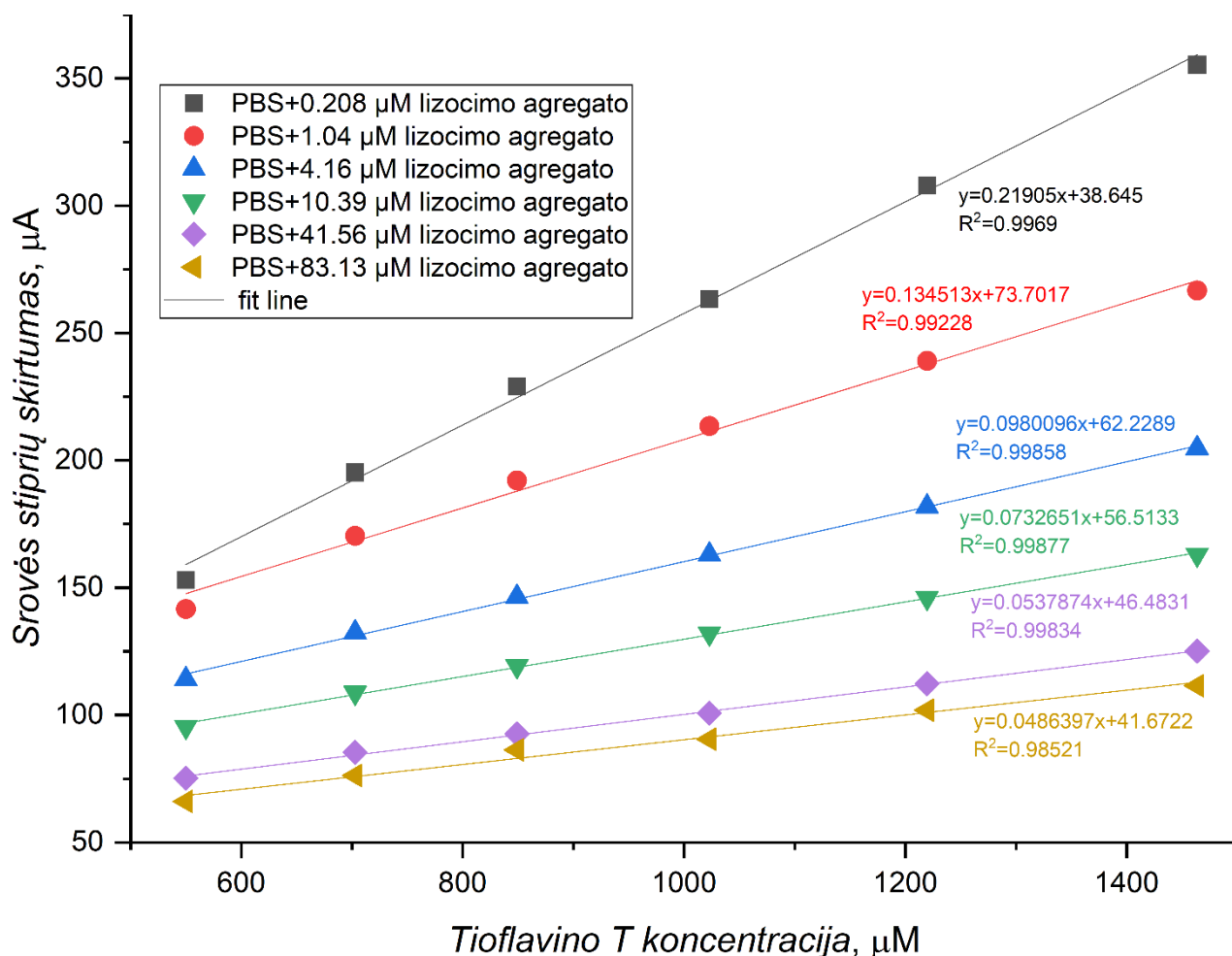
12 pav. Ciklinės voltamperometrijos kreivės PBS buferyje, kuriame lizocimo agregato koncentracija yra: A – 0,208 μM ; B – 1,39 μM ; C – 4,16 μM ; D – 10,9 μM ; E – 41,56 μM ; F – 83,13 μM ; ir esant skirtingoms TFT koncentracijoms (nuo 2,743 μM iki 1463,7 μM). Rodyklės rodo tioflavino T koncentracijos mažėjimo kryptį. Potencialo skleidimo greitis 0,040 V/s.

Kaip matosi iš 12 pav. duomenų, esant 0,9V potencialo vertei, srovės stiprio vertės mažėja didėjant lizocimo agregato koncentracijai. Pvz.: pakėlus agregato koncentraciją nuo 0,208 μM iki 4,16 μM ir esant maksimaliai (1463,7 μM) tioflavino T koncentracijai, srovės stipris nukrenta beveik 2 kartus. Tuo tarpu, TFT koncentracijai esant 1463,7 μM , pakeitus lizocimo agregato koncentraciją nuo 83,13 μM iki 10,9 μM , srovės stipris prie 0,9V padidėja beveik 1,5 karto. Taip pat, lyginant su tyrimais be lizocimo agregato (7 pav.), pridėjus bet kokią lizocimo agregato koncentraciją į tirpalą, sumažėja gautas srovės stipris, negu buvo gautas matuojant CV kreives PBS nesant lizocimo agregato. Tikėtina, kad taip yra todėl, nes tioflavinas T linkęs jungtis prie agregatų [18,24,25] ir tai apsunkina TFT oksidaciją ant elektrodo paviršiaus.

Norint gauti kreivę, skirtą agregato koncentracijos nustatymui iš gautų ciklinės voltamperometrijos duomenų buvo konstruojamos tiesinės priklausomybės tarp srovės stiprio skirtumo pridėjus atitinkamą TFT koncentraciją ir srovės stiprio gauto pridėjus atitinkamą agregato koncentraciją (žr. 4 lygtį) ir tioflavino T koncentracijos. Gautos tiesės, jų koreliacijos kvadratų vertės ir tiesės lygtys pateikiamos 13 pav.

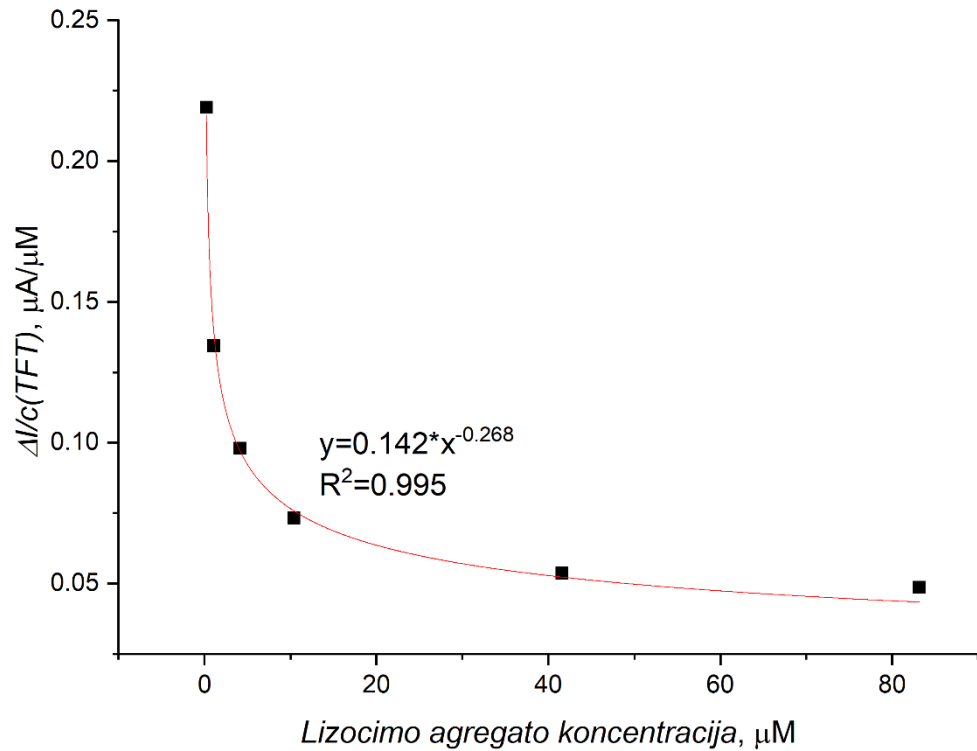
$$\Delta I = I_{TFT} - I_{agr}. \quad (4)$$

, čia ΔI yra srovės stiprių skirtumas; I_{TFT} yra srovės stipris pridėjus atitinkamą tioflavino T koncentraciją; I_{agr} yra srovės stipris pridėjus į PBS lizocimo agregato tirpalo.



13 pav. Srovės stiprių skirtumo tarp srovės stiprio tirpale esant atitinkamai agregato koncentracijai ir esant atitinkamai tioflavino T koncentracijai esant 0,9V potencialo skirtumo vertei, esant skirtingoms lizocimo agregato koncentracijoms (nuo 0,208 μM iki 83,13 μM).

Kaip matosi 13 pav., srovės stiprių skirtumas didėjant agregato koncentracijai mažėja. Taip yra todėl, nes lizocimo agregatas suriša tioflaviną T ir jam trukdo oksiduotis ant elektrodo paviršiaus ir oksidacinė srovė ties 0,9V mažėja. Taip pat iš 13 pav. galima matyti, kad kuo didesnė agregato koncentracija, tuo tiesės nuolinkis yra mažesnis. Kas reiškia, kad didinant agregato koncentraciją, taip pat mažėja srovės stiprių didėjimo greitis, didinant TFT koncentraciją. Taip gali būti todėl, nes, kaip jau buvo minėta, lizocimo agregatas apsunkina TFT oksidaciją, o didėjant tioflavino T koncentracijai šis pokytis gali būti lengviau užfiksuotas. Buvo sudaryta priklausomybė tarp tiesės nuolinkio ir lizocimo agregato koncentracijos (14 pav.).



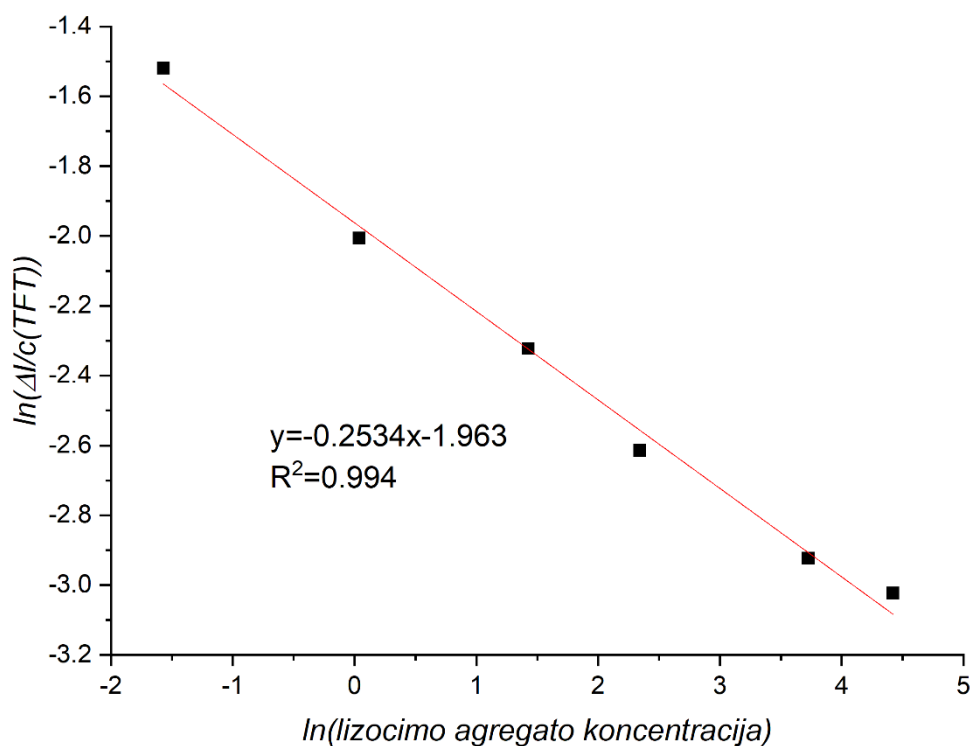
14 pav. Tiesės nuolinkio priklausomybė nuo lizocimo agregato koncentracijos.

Kaip matosi iš 14 pav. kreivės formos (eksponentės forma) ir pateiktos koreliacijos koeficiento kvadrato vertės, gautus taškus geriausiai atitinka lygtis, kurios forma yra $y=a*x^b$. Šią funkciją logaritmuojant gaunama 5 lygtis. Pasinaudojant logaritmų savybėmis, galima atskirti a ir x^b narius logaritme per jų sumą ir iškėlus b koeficientą prieš logaritmą gauti 6 lygtį.

$$\ln y = \ln (a * x^b) \quad (5)$$

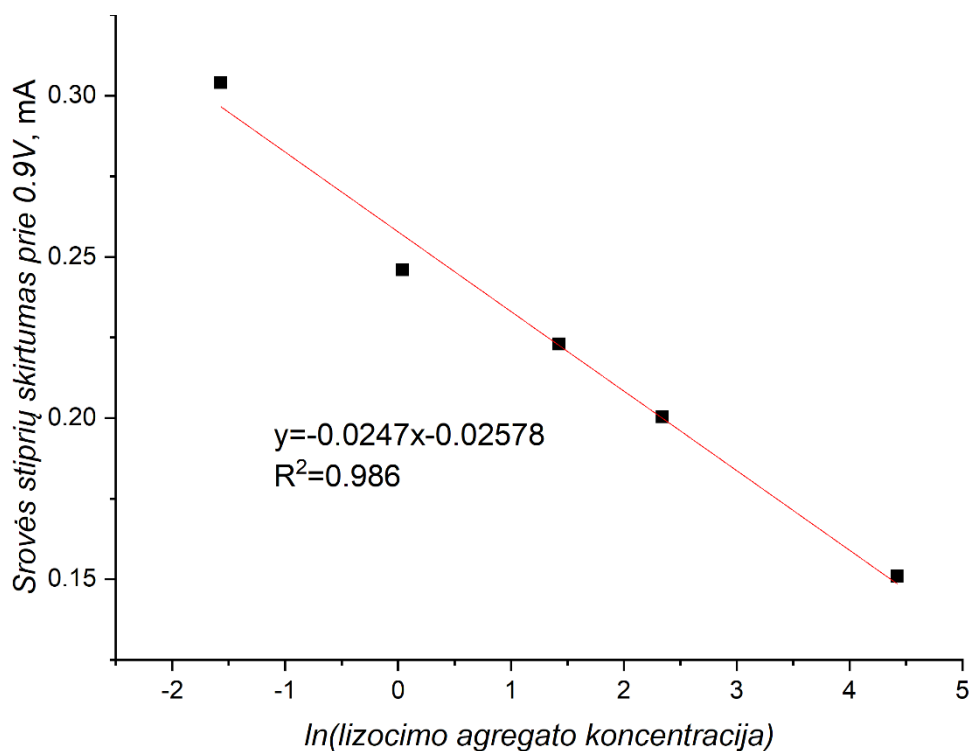
$$\ln y = \ln a + b * \ln x \quad (6)$$

Kaip matosi 6 lygtyje, tiesinę priklausomybę galima gauti atidėjus ant x ir y ašių atitinkamai lizocimo agregato koncentracijos logaritmą ir tiesės nuolinkio logaritmą. Iš šių duomenų buvo gaunama kalibravimo kreivė lizocimo agregato nustatymui pagal tiesės nuolinkio kampo logaritmą ir lizocimo agregato koncentracijos logaritmą (15 pav.).



15 pav. Tiesė skirta lizocimo agregato nustatymui pagal tiesės nuolinkio logaritmą.

15 pav. gautas tiesinis intervalas lizocimo agregato nustatymui yra nuo 0,208 μM iki 83,125 μM , o šio metodo jautrumas yra 0,2534. Nepaisant to, kad šiuo metodu tiriant agregato koncentraciją reikia labai daug matavimų vienam lizocimo agregato koncentracijos nustatymui, tačiau šiuo metodu nustatant agregato koncentraciją kalibravimo kreivėje įtraukiama daug matavimų taškų. Tai padidina lizocimo agregato nustatymo tikslumą ir sumažina matavimo paklaidų įtaką rezultatams. Tačiau siekiant sumažinti reikalingą matavimams laiką, taip pat buvo naudojama ne aibė skirtingų TFT koncentracijų, o tik 849 μM tioflavino T koncentracija. Tyrimo metu į buferinį tirpalą buvo lašinamos skirtingos lizocimo agregato koncentracijos (nuo 0,208 μM iki 83,125 μM) ir tada dedama 849 μM tioflavino T, po kiekvieno iš tirpalų įdėjimo matuojant CV kreives. Buvo gauta tiesinė srovės stiprio prie 0,9 V skirtumo, tarp TFT ir lizocimo agregato sukeltų srovių stiprių, ir lizocimo agregato koncentracijos logaritmo priklausomybė pagal šio matavimo rezultatus. Ši kalibravimo kreivė pateikiama 16 pav.

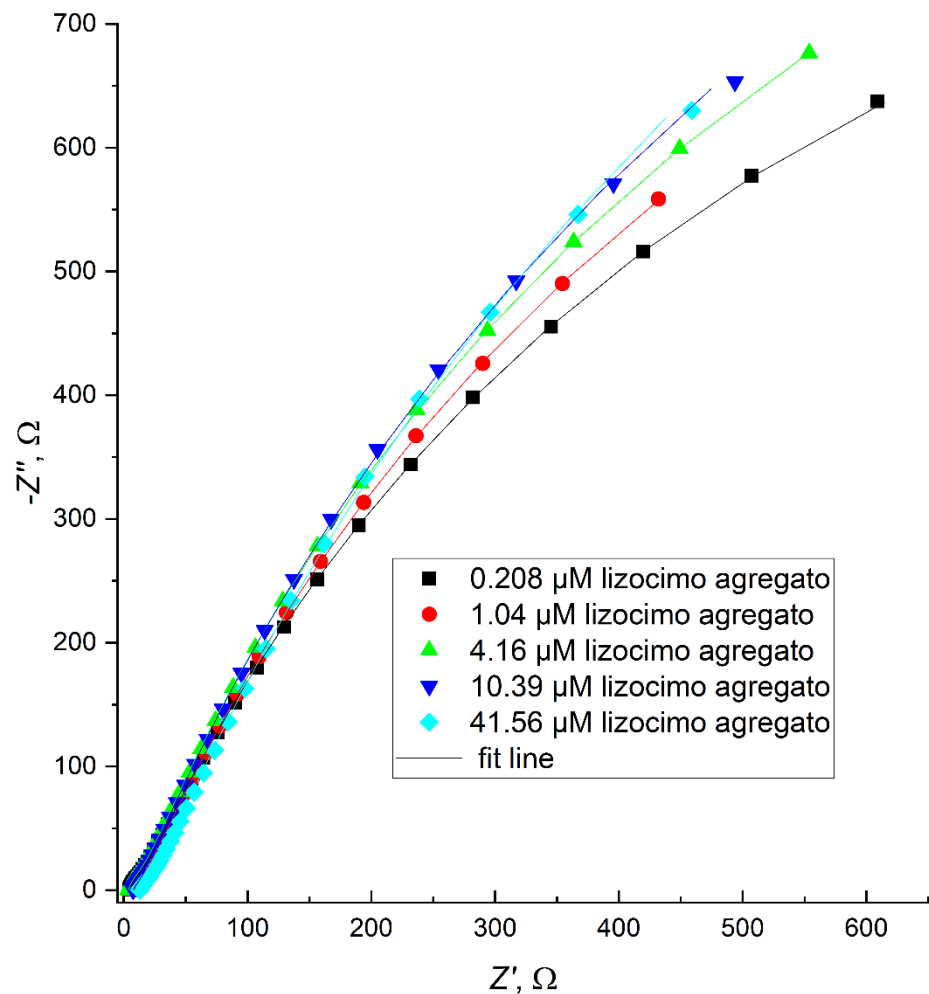


16 pav. Kalibravimo kreivė skirta lizocimo agregato nustatymui pagal srovės stiprio pokytį ties 0,9V, esant 849 μM TFT koncentracijai.

Kaip matosi 16 pav., norint gauti kalibravimo kreivę iš vienos koncentracijos matavimo duomenų, taip pat kaip ir iš tiesės nuolinkio matavimų, reikia naudoti lizocimo agregato koncentracijos logaritmą. Šiuo atveju gautas agregato tiesinės koncentracijos intervalas yra toks pat, kaip pasinaudojant tiesės lygtimis (15 pav.) ir yra nuo 0,208 μM iki 83,125 μM . Nors 16 pav. gautas koreliacijos koeficiento kvadratas yra 0,986 ir yra mažesnis negu gautas pasinaudojant tiesės lygtimis (0,994), tačiau šiuo metodu nustatant lizocimo agregato koncentraciją, matavimai ir skaičiavimai yra greitesni ir paprastesni.

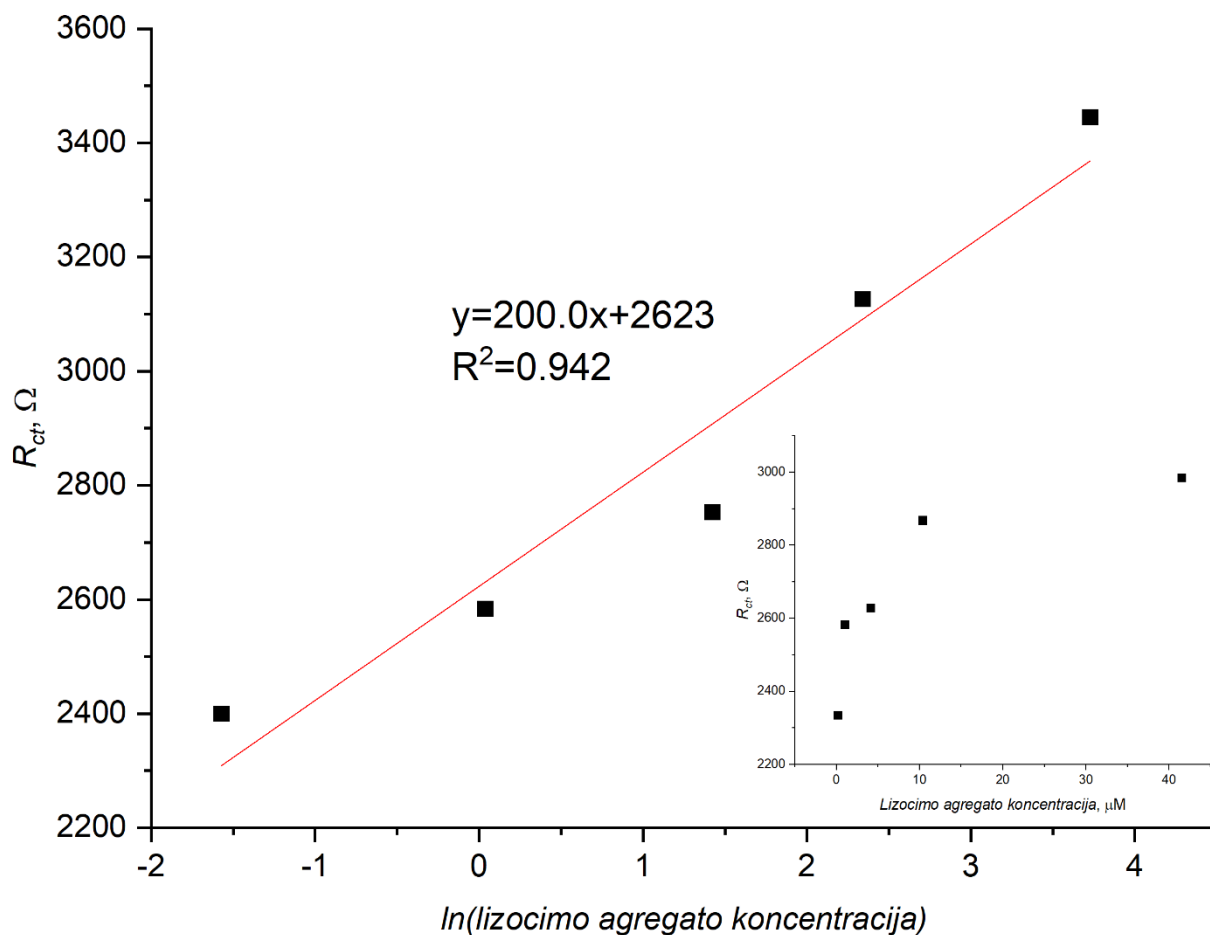
3.2.2. Lizocimo agregato koncentracijos nustatymas pasitelkiant EIS metodą

Norint nustatyti lizocimo agregato koncentraciją EIS metodu buvo tiriamos agregato koncentracijos nuo 0,208 μM iki 41,56 μM . Buvo pasirinkta tokia TFT koncentracija, kuriai mažėjant matosi didžiausi impedanso spektrų pokyčiai (9 pav.), esant vidutiniškomis TFT koncentracijoms (nuo 272 μM iki 656,8 μM). Taip buvo atsižvelgta į srovės stiprių mažėjimo tiriant lizocimo agregato koncentracijas tyrimus (13 pav.), kur didesni srovės stiprių pokyčiai buvo fiksuojami esant didesnėms tioflavino T koncentracijoms. Todėl iš 9 pav. duomenų buvo pasiimta vidutinė tioflavino T koncentracijos vertė 430 μM , bandant atsižvelgti ir į vizualių pokyčių mažėjimą tarp EIS kreivių (9 pav.) ir į didesnių TFT koncentracijų jautrumo didėjimą (13 pav.). Gautos impedanso kreivės ir jų gautos vertės pagal tą pačią ekvivalentinę schemą, kuri buvo naudota tioflavino T nustatymo metu 10 pav., pateikiamos 17 pav.



17 pav. Impedanso spektrai matuoti PBS, kuriame yra 430 μM TFT, esant skirtingai lizocimo agregato koncentracijai.

17 pav. pateikiamose kreivėse matomas kreivių formos kitimas esant skirtingoms lizocimo agregato koncentracijoms. Šiuo atveju, didėjant lizocimo agregato koncentracijai, impedanso kreivės nepilnas pusapskritimis (žemuose dažniuose) didėjo, todėl galima teigti, kad agregato koncentracijos didėjimas tirpale sumažino TFT oksidacijos intensyvumą. Tai gali būti paaiškinta tuo, kad didesnė agregato koncentracija mažina efektyvią, kuri gali oksiduotis ant elektrodo paviršiaus, TFT koncentraciją tirpale. Pagal gautus kalibravimo pagal ekvivalentinę schemą duomenis, buvo gaunama lizocimo agregato kalibravimo kreivė pagal R_{ct} varžos pokytį. Ši kalibravimo kreivė pateikta 18 pav.



18 pav. Kalibravimo kreivė lizocimo agregato nustatymui pagal R_{ct} varžos pokytį. Intarpe pateikta priklausomybė tarp krūvio pernašos varžos ir lizocimo agregato koncentracijos.

Impedimetriniu metodu nustatant lizocimo agregato koncentraciją (18 pav.), gautas tiesinės koncentracijos intervalas yra nuo $0,208 \mu\text{M}$ iki $41,56 \mu\text{M}$, o šiuo metodu nustatinėjant agregato koncentraciją vėl reikia naudoti agregato koncentracijos logaritmą.

Lyginant su agregato nustatymu pasitelkiant CV metodą, matuojant EIS metodu gaunamas šiek siauresnis tiesinės koncentracijos intervalas (CV atveju buvo $0,208 \mu\text{M}$ iki $83,125 \mu\text{M}$). Tačiau tiesinės koreliacijos koeficientas yra toks pat, kaip ir nustatinėjant agregato koncentraciją CV metodu iš vienos TFT koncentracijos duomenų (16 pav.). Geriausi agregato nustatymo parametrai, ir plačiausias tiesinis intervalas, ir geriausias tiesinės koreliacijos koeficiento kvadratas, yra gaunami agregato koncentraciją nustatant iš tiesės nuolinkio kampo, matuojant įvairias TFT koncentracijas (15 pav.), tačiau šiuo atveju matavimai užtrunka daug ilgiau negu kitų dviejų metodų atveju, o rezultatų apdorojimas yra sudėtingesnis. Literatūroje pateikiamų jutiklių veikimas ir parametrai pateikiami 3 lentelėje.

3 lentelė. Literatūroje rastų jutiklių, skirtų nustatyti lizocimo koncentracijas, pagaminimo junginiai, elektrodas, metodas ir tiesinis intervalas.

Jutiklio medžiagos	Elektrodas	metodas	tiesinis intervalas	šaltinis
Aptameras ir grafenas	Šilkografijos būdu atspausdintas elektrodas	EIS	5 nM - 80 nM	[57]
Aptameras ir anglies nanopluoštas	Šilkografijos būdu atspausdinti elektrodai	EIS	18 nM - 105 nM	[58]
Aptameras ir aukso nanodalelės	Šilkografijos būdu atspausdintas aukso elektrodas	CV	70 nM - 700 nM	[59]
Aptameras	Anglies-pastos elektrodas	KBV	110 nM - 1385 nM	[60]
Tioflavinas T	Platinos plokštelė	CV	0,208 μ M - 83,13 μ M	Šis darbas
Tioflavinas T	Platinos plokštelė	EIS	0,208 μ M - 41,56 μ M	Šis darbas

Kaip matosi 3 lentelėje, naudojant skirtingus metodus, gaunamos skirtingos tiesinio intervalo ribos lizocimo koncentracijos nustatymui, prasidedančios ties skirtingomis koncentracijų vertėmis. Mažiausią lizocimo koncentraciją pagal 3 lentelės duomenis galima nustatyti EIS metodu (5 nM lizocimo) [57,58]. Pasinaudojant CV metodu, nustatomas lizocimo koncentracijos intervalas yra nuo 70 nM iki 700 nM [59]. Tuo tarpu lizocimo koncentracijos nustatymas pasinaudojant kvadratinio bangų voltamperometrijos (KBV) metodu, nors yra turintis panašų į kitų metodų koncentracijos intervalo plotį, tačiau gali nustatyti tik sąlyginai dideles lizocimo koncentracijas nuo 110 nM [60].

Lyginant su literatūroje rastais lizocimo nustatymo metodais, šiame darbe aptartas lizocimo agregatų nustatymo metodas naudoja paprastesnius ir pigesnius elektrodus ir jutiklio medžiagas. Literatūroje pateiktiems lizocimo nustatymo būdams reikia aptamero ir specialių elektrodų, tokių kaip šilkografijos būdu atspausdinto elektrodo ar anglies pastos elektrodo [57–60]. Šiame darbe aptartu metodu, reikia tik tioflavino T ir platinos elektrodų, kurie yra paprastesnės konstrukcijos ir pigesni. Taip pat, tiriant CV metodu ir naudojant agregato nustatymą pagal tiesės nuolinkio koeficientą, skirtingai negu literatūroje rastuose metoduose, į kiekvieną lizocimo agregato koncentracijos tašką yra įtraukiama daug matavimo duomenų, kas sumažina atsitiktines matavimo paklaidas.

IŠVADOS

1. Nustatyta, kad ciklinės voltamperometrijos metodas gali būti naudojamas tioflavino T (TFT) koncentracijos nustatymui fosfatiniame buferyje (pH 7,4), skleidžiant Pt elektrodo potencialą nuo 0,2 V iki 0,9 V palyginamojo Ag/AgCl, KCl_{sot.} elektrodo atžvilgiu. Gautas tiesinės koncentracijos intervalas tioflavino T nustatymui yra nuo 90,35 μM iki 1219,76 μM.

2. Elektrocheminio impedanso spektroskopijos metodas gali būti naudojamas tioflavino T (TFT) koncentracijos nustatymui fosfatiniame buferyje (pH 7,4), esant 0,9 V elektrodo potencialo vertei Ag/AgCl, KCl_{sot.} palyginamojo elektrodo atžvilgiu. Gautas tiesinės koncentracijos intervalas tioflavino T nustatymui yra nuo 98,2 μM iki 658,8 μM.

3. Nustatyta, kad CV metodu lizocimo agregato koncentracijos nustatymui galima naudoti srovės stiprio augimo, didinant tioflavino T koncentracijas mėginyje, lėtėjimą, didinant agregato koncentraciją tirpale. Norint nustatyti lizocimo agregato koncentracijas, buvo sudaromos tiesės, kur ant x ašies atidėta TFT koncentracija, o ant y ašies srovės stiprio pokytis po TFT pridėjimo į PBS. Nubraižyta kalibravimo kreivė, skirta lizocimo agregato koncentracijos nustatymui intervale nuo 0,208 μM iki 83,125 μM.

4. Nustatyta, kad lizocimo agregato koncentracijos nustatymui tinka ciklinės voltamperometrijos metodas, kuriuo gali būti nustatomas oksidacinės srovės stiprio mažėjimas, didėjant agregato koncentracijai mėginyje, esant 0,9 V elektrodo potencialui. Šia metodika, norint gauti tiesinę priklausomybę, ant x ašies atidedamas lizocimo agregato koncentracijos logaritmas, o ant y ašies atidedamas srovės stiprio pokytis, gautas po 849 μM tioflavino T pridėjimo. Šiuo metodu gautas tiesinės koncentracijos intervalas yra nuo 0,208 μM iki 83,125 μM lizocimo agregato.

5. Nustatyta, kad lizocimo agregato koncentracijas galima nustatyti naudojant EIS metodą, esant 0,9V potencialų skirtumui palyginus su Ag/AgCl, KCl_{sot.} palyginamuoju elektrodu. Lizocimo agregato koncentracijos nustatymui naudojant EIS metodą, gauta krūvio pernašos varžos priklausomybė nuo lizocimo agregato koncentracijos logaritmo tiesinės koncentracijos intervale nuo 0,208 μM iki 41,56 μM.

SANTRAUKA

VILNIAUS UNIVERSITETAS CHEMIJOS IR GEOMOKSLŲ FAKULTETAS

NARVYDAS DĖNAS

Elektrocheminių metodų taikymas baltymų agregatų nustatymui

Baltymų agregacija žmogaus kūne laikoma pagrindiniu veiksniumi, lemiančiu neurodegeneracinių ligų, tokių, kaip Parkinsono ir Alzheimerio ligos, patogenezę. Siekiant sukurti veiksmingus neurodegeneracinių ligų gydymo ir prevencijos metodus, daug dėmesio skiriama baltymų, pavyzdžiui, amiloidinių baltymų, agregacijos tyrimams ir baltymų agregaciją slopinančių medžiagų paieškoms. Šiame darbe sukurtas naujas metodas lizocimo agregatų koncentracijai mėginyje nustatyti.

Norint sukurti lizocimo koncentracijos nustatymo metodiką, buvo panaudota tioflavino T (TFT) oksidacija ant platinos elektrodo. Pirma, buvo sukurti metodai tioflavino T koncentracijai mėginiuose nustatyti naudojant ciklinę voltamperometriją (CV) ir elektrocheminės varžos spektroskopiją (EIS). Šie metodai buvo pritaikyti, kad būtų galima nustatyti lizocimo agregato koncentracijas mėginiuose. Naudojant ciklinę voltamperometriją lizocimo agregato koncentracijai nustatyti, reikėjo atlikti daugybę skirtingų TFT koncentracijų matavimų. Kalibravimo kreivė taip pat apėmė daug matavimų esant skirtingoms TFT koncentracijoms. Šiuo metodu buvo galima nustatyti lizocimo agregato koncentracijas nuo 0,208 μM iki 83 125 μM . Norint sutrumpinti matavimų laiką, buvo sukurtas kitas metodas lizocimo koncentracijai nustatyti. Šis metodas buvo pagrįstas srovės intensyvumo pokyčiu, esant 0,9 V potencialo vertei ir 849 μM TFT koncentracijai. Šis metodas turėjo tokį patį tiesinės koncentracijos intervalą kaip ir ankstesnis metodas – nuo 0,208 μM iki 83,125 μM . Nustatant lizocimo koncentraciją EIS metodu, gauti rezultatai buvo modeliuoti naudojant ekvivalentinę schemą. Atidedant krūvio pernašos varžą nuo lizocimo agregato koncentracijos logaritmo, gautas tiesinis koncentracijos intervalas yra nuo 0,208 μM iki 41,56 μM .

SUMMARY

VILNIUS UNIVERSITY
FACULTY OF CHEMISTRY AND GEOSCIENCES

NARVYDAS DĖNAS

Application of Electrochemical Methods for Determination of Protein Aggregates

Protein aggregation in the human body is considered to be a key factor in the pathogenesis of neurodegenerative diseases such as Parkinson's and Alzheimer's. In order to develop effective therapies for the treatment and prevention of neurodegenerative diseases, there is a strong focus on aggregation studies of proteins, such as amyloid proteins, and on the search for substances that inhibit protein aggregation. In this work, new technique to determine lysozyme aggregate concentration in sample is developed.

To create technique to determine lysozyme concentration, thioflavin T (ThT) oxidation on platinum electrode was used. Firstly, techniques to determine thioflavin T concentration in samples using cyclic voltammetry (CV) or electrochemical impedance spectroscopy (EIS) were developed. These methods than were investigated to being able to determine the concentrations of lysozyme aggregate in the samples. Using cyclic voltammetry to determine lysozyme aggregate concentration many measurements of different ThT concentrations were required. The calibration curve also included many measurements at different ThT concentrations. This method was able to identify lysozyme concentrations from 0.208 μM to 83.125 μM . To reduce the time taken for measurements, another method, to determine lysozyme concentration was developed. This method was based on the change in current intensity at 0.9 V at 849 μM ThT concentration. This method had the same linear concentration as past approach ranging from 0.208 μM to 83.125 μM . Determining lysozyme concentration using EIS method the results obtained were fitted using an equivalent circuit. Plotting charge transfer resistance against lysozyme aggregate concentration logarithm, the obtained linear concentration range is from 0.208 μM to 41.56 μM .

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- [1] G.B. Irvine, O.M. El-Agnaf, G.M. Shankar, D.M. Walsh, Protein aggregation in the brain: the molecular basis for Alzheimer's and Parkinson's diseases, *Mol Med* 14 (2008) 451–464. <https://doi.org/10.2119/2007-00100.IRVINE>.
- [2] M. Ziaunys, A. Sakalauskas, T. Sneideris, V. Smirnovas, Lysozyme Fibrils Alter the Mechanism of Insulin Amyloid Aggregation, *Int J Mol Sci* 22 (2021) 1–12. <https://doi.org/10.3390/IJMS22041775>.
- [3] T. Šneideris, L. Baranauskiene, J.G. Cannon, R. Rutkiene, R. Meškys, V. Smirnovas, Looking for a generic inhibitor of amyloid-like fibril formation among flavone derivatives, *PeerJ* 3 (2015). <https://doi.org/10.7717/PEERJ.1271>.
- [4] V. Foderà, M. Groenning, V. Vetri, F. Librizzi, S. Spagnolo, C. Cornett, L. Olsen, M. Van De Weert, M. Leone, Thioflavin T hydroxylation at basic pH and its effect on amyloid fibril detection, *Journal of Physical Chemistry B* 112 (2008) 15174–15181. https://doi.org/10.1021/JP805560C/SUPPL_FILE/JP805560C_SI_001.PDF.
- [5] L.F. Pease, J.T. Elliott, D.H. Tsai, M.R. Zachariah, M.J. Tarlov, Determination of protein aggregation with differential mobility analysis: Application to IgG antibody, *Biotechnol Bioeng* 101 (2008) 1214–1222. <https://doi.org/10.1002/BIT.22017>.
- [6] M. Barba, H. Czosnek, A. Hadidi, Optimizing Protein Aggregate Analysis by SEC, *Biopharm Int* 30 (2017) 46–47, 50–51. <https://doi.org/10.3390/V6010106>.
- [7] J. den Engelsman, P. Garidel, R. Smulders, H. Koll, B. Smith, S. Bassarab, A. Seidl, O. Hainzl, W. Jiskoot, Strategies for the Assessment of Protein Aggregates in Pharmaceutical Biotech Product Development, (n.d.). <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0297-1>.
- [8] M. Cuartero, G.A. Crespo, M. Ghahraman Afshar, E. Bakker, Exhaustive thin-layer cyclic voltammetry for absolute multianalyte halide detection, *Anal Chem* 86 (2014) 11387–11395. https://doi.org/10.1021/AC503344F/SUPPL_FILE/AC503344F_SI_001.PDF.
- [9] H.S. Magar, R.Y.A. Hassan, A. Mulchandani, Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS): Principles, Construction, and Biosensing Applications, *Sensors (Basel)* 21 (2021). <https://doi.org/10.3390/S21196578>.
- [10] N. Bonanos, B.C.H. Steele, E.P. Butler, J.R. Macdonald, W.B. Johnson, W.L. Worrell, G.A. Niklasson, S. Malmgren, M. Strømme, S.K. Sundaram, M.C.H. McKubre, D.D. Macdonald, G.R. Engelhardt, E. Barsoukov, Brian.E. Conway, Wendy.G. Pell, N. Wagner, C.M. Roland, R.S. Eisenberg, Applications of Impedance Spectroscopy, *Impedance Spectroscopy* (2018) 175–478. <https://doi.org/10.1002/9781119381860.CH4>.
- [11] P. Vadhva, J. Hu, M.J. Johnson, R. Stocker, M. Braglia, D.J.L. Brett, A.J.E. Rettie, Electrochemical Impedance Spectroscopy for All-Solid-State Batteries: Theory, Methods and Future Outlook, *ChemElectroChem* 8 (2021) 1930–1947. <https://doi.org/10.1002/CELC.202100108>.
- [12] Y. Barsoukov, J.R. Macdonald, ELECTROCHEMICAL IMPEDANCE SPECTROSCOPY, (n.d.).
- [13] Elektrocheminės varžos spektroskopijos pagrindai – Biodrvier M-online, (n.d.). <https://m.biodrvier.com/h-nd-279.html> (accessed January 12, 2024).
- [14] F. Lisdat, D. Schäfer, The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing, *Anal Bioanal Chem* 391 (2008) 1555–1567. <https://doi.org/10.1007/S00216-008-1970-7/FIGURES/5>.

- [15] S. Al Sana, C. Gabrielli, H. Perrot, Influence of Antibody Insertion on the Electrochemical Behavior of Polypyrrole Films by Using Fast QCM Measurements, *J Electrochem Soc* 150 (2003) E444. <https://doi.org/10.1149/1.1596166/XML>.
- [16] H. Peng, C. Soeller, M.B. Cannell, G.A. Bowmaker, R.P. Cooney, J. Travas-Sejdic, Electrochemical detection of DNA hybridization amplified by nanoparticles, *Biosens Bioelectron* 21 (2006) 1727–1736. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2005.08.011>.
- [17] Y. Xu, H. Cai, P.G. He, Y.Z. Fang, Probing DNA Hybridization by Impedance Measurement Based on CdS-Oligonucleotide Nanoconjugates, *Electroanalysis* 16 (2004) 150–155. <https://doi.org/10.1002/ELAN.200302923>.
- [18] R. Khurana, C. Coleman, C. Ionescu-Zanetti, S.A. Carter, V. Krishna, R.K. Grover, R. Roy, S. Singh, Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils, (2005). <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2005.06.006>.
- [19] C. Xue, T.Y. Lin, D. Chang, Z. Guo, Thioflavin T as an amyloid dye: fibril quantification, optimal concentration and effect on aggregation, *R Soc Open Sci* 4 (2017). <https://doi.org/10.1098/RSOS.160696>.
- [20] J.C.C. Hsu, E.H.L. Chen, R.C. Snoeberger, F.Y. Luh, T.S. Lim, C.P. Hsu, R.P.Y. Chen, Thioflavin T and its photoirradiative derivatives: Exploring their spectroscopic properties in the absence and presence of amyloid fibrils, *Journal of Physical Chemistry B* 117 (2013) 3459–3468. https://doi.org/10.1021/JP309331U/SUPPL_FILE/JP309331U_SI_001.PDF.
- [21] F. Yeasmin Khusbu, X. Zhou, H. Chen, C. Ma, K. Wang, Thioflavin T as a fluorescence probe for biosensing applications, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 109 (2018) 1–18. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2018.09.013>.
- [22] X.-Y. Li, Y.-C. Du, Y.-P. Zhang, & De-, M. Kong, Dual functional Phi29 DNA polymerase-triggered exponential rolling circle amplification for sequence-specific detection of target DNA embedded in long-stranded genomic DNA OPEN, (n.d.). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06594-1>.
- [23] V. Dounin, A. Constantinof, H. Schulze, T.T. Bachmann, K. Kerman, Electrochemical detection of interaction between Thioflavin T and acetylcholinesterase, *Analyst* 136 (2011) 1234–1238. <https://doi.org/10.1039/C0AN00743A>.
- [24] P. Sen, S. Fatima, B. Ahmad, R.H. Khan, Interactions of thioflavin T with serum albumins: Spectroscopic analyses, *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 74 (2009) 94–99. <https://doi.org/10.1016/J.SAA.2009.05.010>.
- [25] A.J. Veloso, V.W.S. Hung, G. Sindhu, A. Constantinof, K. Kerman, Electrochemical oxidation of benzothiazole dyes for monitoring amyloid formation related to the Alzheimer's disease, *Anal Chem* 81 (2009) 9410–9415. https://doi.org/10.1021/AC901940A/SUPPL_FILE/AC901940A_SI_001.PDF.
- [26] R.R. da Silva, S. V. de Lima, H.P. de Oliveira, C.P. de Melo, I.A.M. Frías, M.D.L. Oliveira, C.A.S. Andrade, Real-time monitoring of amyloid fibrillation by electrical impedance spectroscopy, *Colloids Surf B Biointerfaces* 160 (2017) 724–731. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2017.10.010>.
- [27] W. de Vries, P.F. Römken, G. Schütze, Critical Soil Concentrations of Cadmium, Lead, and Mercury in View of Health Effects on Humans and Animals, *Rev Environ Contam Toxicol* 191 (2007) 91–130. https://doi.org/10.1007/978-0-387-69163-3_4.
- [28] H. Na Kim, W. Xiu Ren, J. Seung Kim, J. Yoon, Fluorescent and colorimetric sensors for detection of lead, cadmium, and mercury ions, *Chem Soc Rev* 41 (2012) 3210–3244. <https://doi.org/10.1039/C1CS15245A>.

- [29] Y. Wen, L. Wang, L. Li, L. Xu, G. Liu, A Sensitive and Label-Free Pb(II) Fluorescence Sensor Based on a DNAzyme Controlled G-Quadruplex/Thioflavin T Conformation, *Sensors* 2016, Vol. 16, Page 2155 16 (2016) 2155. <https://doi.org/10.3390/S16122155>.
- [30] J. Ge, X.-P. Li, J.-H. Jiang, R.-Q. Yu, A highly sensitive label-free sensor for Mercury ion (Hg²⁺) by inhibiting thioflavin T as DNA G-quadruplexes fluorescent inducer, (2014). <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.01.033>.
- [31] A.J. Weids, S. Ibstedt, M.J. Tamás, C.M. Grant, Distinct stress conditions result in aggregation of proteins with similar properties, *Scientific Reports* 2016 6:1 6 (2016) 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep24554>.
- [32] J.M. Barral, S.A. Broadley, G. Schaffar, F.U. Hartl, Roles of molecular chaperones in protein misfolding diseases, *Semin Cell Dev Biol* 15 (2004) 17–29. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2003.12.010>.
- [33] C.M. Dobson, Principles of protein folding, misfolding and aggregation, *Semin Cell Dev Biol* 15 (2004) 3–16. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2003.12.008>.
- [34] C.M. Dobson, Protein folding and misfolding, *Nature* 426 (2003) 884–890. <https://doi.org/10.1038/nature02261>.
- [35] V. Daggett, A. Fersht, The present view of the mechanism of protein folding, *Nat Rev Mol Cell Biol* 4 (2003) 497–502. <https://doi.org/10.1038/nrm1126>.
- [36] T. Fleming Outeiro, P.J. McLean, B.T. Hyman, Protein Aggregation Disorders, *Neurobiol Dis* (2007) 111–123. <https://doi.org/10.1016/B978-012088592-3/50012-8>.
- [37] W.T. Godbey, Proteins, *Biotechnology and Its Applications* (2022) 47–72. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817726-6.00003-4>.
- [38] C.E. Ha, N.V. Bhagavan, Three-dimensional structure of proteins and disorders of protein misfolding, *Essentials of Medical Biochemistry* (2023) 55–81. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-88541-6.00033-8>.
- [39] J. Den Engelsman, P. Garidel, R. Smulders, H. Koll, B. Smith, S. Bassarab, A. Seidl, O. Hainzl, W. Jiskoot, Strategies for the Assessment of Protein Aggregates in Pharmaceutical Biotech Product Development, *Pharm Res* 28 (2011) 920. <https://doi.org/10.1007/S11095-010-0297-1>.
- [40] E. Künnemann, Protein Aggregates, *Materials and Methods* 2020 (2020) 2924. <https://doi.org/10.13070/mm.en.10.2924>.
- [41] H.C. Mahler, W. Friess, U. Grauschopf, S. Kiese, Protein aggregation: pathways, induction factors and analysis, *J Pharm Sci* 98 (2009) 2909–2934. <https://doi.org/10.1002/JPS.21566>.
- [42] E.Y. Chi, S. Krishnan, T.W. Randolph, J.F. Carpenter, Physical stability of proteins in aqueous solution: mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation, *Pharm Res* 20 (2003) 1325–1336. <https://doi.org/10.1023/A:1025771421906>.
- [43] E.Y. Chi, J. Weickmann, J.F. Carpenter, M.C. Manning, T.W. Randolph, Heterogeneous nucleation-controlled particulate formation of recombinant human platelet-activating factor acetylhydrolase in pharmaceutical formulation, *J Pharm Sci* 94 (2005) 256–274. <https://doi.org/10.1002/JPS.20237>.
- [44] R.I. Litvinov, O. V. Gorkun, S.F. Owen, H. Shuman, J.W. Weisel, Polymerization of fibrin: specificity, strength, and stability of knob-hole interactions studied at the single-molecule level, *Blood* 106 (2005) 2944–2951. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2005-05-2039>.
- [45] G. Merlini, V. Bellotti, A. Andreola, G. Palladini, L. Obici, S. Casarini, V. Perfetti, Protein aggregation, *Clin Chem Lab Med* 39 (2001) 1065–1075. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2001.172/MACHINEREADABLECITATION/RIS>.

- [46] P.J. Thomas, B.H. Qu, P.L. Pedersen, Defective protein folding as a basis of human disease, *Trends Biochem Sci* 20 (1995) 456–459. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)89100-8](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)89100-8).
- [47] C.A. Ross, M.A. Poirier, Protein aggregation and neurodegenerative disease, *Nat Med* 10 (2004) S10. <https://doi.org/10.1038/NM1066>.
- [48] B. Caughey, P.T. Lansbury, Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: Separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders, *Annu Rev Neurosci* 26 (2003) 267–298. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.NEURO.26.010302.081142>.
- [49] J. Den Engelsman, P. Garidel, R. Smulders, H. Koll, B. Smith, S. Bassarab, A. Seidl, O. Hainzl, W. Jiskoot, Strategies for the Assessment of Protein Aggregates in Pharmaceutical Biotech Product Development, *Pharm Res* 28 (2011) 920. <https://doi.org/10.1007/S11095-010-0297-1>.
- [50] J. Philo, A critical review of methods for size characterization of non-particulate protein aggregates, *Curr Pharm Biotechnol* 10 (2009) 359–372. <https://doi.org/10.2174/138920109788488815>.
- [51] K.K. Arthur, J.P. Gabrielson, B.S. Kendrick, M.R. Stoner, Detection of protein aggregates by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation (SV-AUC): sources of variability and their relative importance, *J Pharm Sci* 98 (2009) 3522–3539. <https://doi.org/10.1002/JPS.21654>.
- [52] I.M. Kuznetsova, A.I. Sulatskaya, V.N. Uversky, K.K. Turoverov, A New Trend in the Experimental Methodology for the Analysis of the Thioflavin T Binding to Amyloid Fibrils, (n.d.). <https://doi.org/10.1007/s12035-012-8272-y>.
- [53] E. Hudak, Electrochemical Evaluation of Platinum and Diamond Electrodes for Neural Stimulation, (2011).
- [54] P. Daubinger, J. Kieninger, T. Unmüssig, G.A. Urban, Electrochemical characteristics of nanostructured platinum electrodes – a cyclic voltammetry study, *Physical Chemistry Chemical Physics* 16 (2014) 8392–8399. <https://doi.org/10.1039/C4CP00342J>.
- [55] P. Virbickas, A. Valiūnienė, D. Baryševa, G. Popkirov, A. Ramanavičius, Determination of cyanide concentration by chronoamperometry, cyclic voltammetry and fast Fourier transform electrochemical impedance spectroscopy, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 895 (2021) 115449. <https://doi.org/10.1016/J.JELECHEM.2021.115449>.
- [56] Website of the Department of Statistics and Data Science of Yale University., Chi-Square Goodness of Fit Test, (n.d.). <http://www.stat.yale.edu/Courses/1997-98/101/chigf.htm> (accessed April 27, 2023).
- [57] I. Alam, B. Lertanantawong, W. Prongmanee, T. Lertvanithphol, M. Horprathum, T. Sutthibutpong, P. Asanithi, Investigating lysozyme amyloid fibrillization by electrochemical impedance spectroscopy for application in lysozyme sensor, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 901 (2021) 115799. <https://doi.org/10.1016/J.JELECHEM.2021.115799>.
- [58] H. Senturk, E. Eksin, Ö. Işık, Z. İlaslan, F. Mısırlı, A. Erdem, Impedimetric aptasensor for lysozyme detection based on carbon nanofibres enriched screen-printed electrodes, *Electrochim Acta* 377 (2021) 138078. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2021.138078>.
- [59] A.M. Titoiu, R. Porumb, P. Fanjul-Bolado, P. Epure, M. Zamfir, A. Vasilescu, Detection of Allergenic Lysozyme during Winemaking with an Electrochemical Aptasensor, *Electroanalysis* 31 (2019) 2262–2273. <https://doi.org/10.1002/elan.201900333>.
- [60] M.C. Rodríguez, G.A. Rivas, Label-free electrochemical aptasensor for the detection of lysozyme, *Talanta* 78 (2009) 212–216. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2008.11.002>.