

О.В. ХОРОЛЬСЬКИЙ, Ю.Д. МОСКАЛЕНКО

Полтавський національний педагогічний університет імені В.Г. Короленка  
(Вул. Остроградського, 2, Полтава 36000; e-mail: khorolskiy.alexey@gmail.com)

## ОБЧИСЛЕННЯ РОЗМІРІВ МАКРОМОЛЕКУЛ БИЧАЧОГО СИРОВАТКОВОГО АЛЬБУМІНУ ЗГІДНО ДАНИХ ІЗ В'ЯЗКОСТІ ЙОГО ВОДНИХ РОЗЧИНІВ

УДК 532.13, 577.322.3,  
577.356

За допомогою коміркового підходу Маломужа–Орлова з експериментальних даних зсувної в'язкості розчинів бичачого сироваткового альбуміну побудована поверхня ефективних радіусів макромолекул бичачого сироваткового альбуміну у концентраційному інтервалі 2,0–27,2 мас.% та інтервалі температур 278–318 К при сталому значенні  $pH = 5,2$ . Показано, що у всьому температурному інтервалі до концентрацій  $\sim 5$  мас.% відбувається стрімке нелінійне зростання ефективних радіусів макромолекул бичачого сироваткового альбуміну. При концентрації 5 мас.% спостерігаються максимуми ефективних радіусів макромолекули бичачого сироваткового альбуміну, положення яких виявляється незалежним від температури. У інтервалі концентрацій 5,0–27,2 мас.% простежується зменшення ефективних радіусів макромолекул бичачого сироваткового альбуміну, причому при концентраціях більших 10 мас.% спадає залежність носить лінійний характер. Проводиться порівняння результатів роботи з даними літературних джерел по коефіцієнту самодифузії макромолекул у розчині, яке вказує на ефективність формули Маломужа–Орлова для розрахунку радіусів макромолекул глобулярних білків із даних зсувної в'язкості їх водних розчинів.

**Ключові слова:** бичачий сироватковий альбумін, водний розчин, ефективний радіус макромолекули, теорія Маломужа–Орлова.

### 1. Вступ

Конформація і просторова структура біомакромолекул у розчині значним чином визначає їх функціональні властивості у живому організмі. Найкраще вивченим і найпоширенішим білком плазми крові є бичачий сироватковий альбумін (БСА), на який припадає близько 70% загального білкового складу плазми крові з концентрацією 35–55 г/л [1]. Завдяки стандартизованим методикам виділення та доступності вихідного матеріалу БСА широко застосовується у лабораторній біохімічній практиці, зокрема як стандарт молекулярної маси протеїнів та при кількісному визначенні білків, для стабілізації деяких ферментів та в імуногістохімії [1, 2].

БСА складається з 583 амінокислотних залишків, об'єднаних у однією ланцюгову макромолекулу з молекулярною масою 66,5 кДа та достатньо складною просторовою структурою, подібною до

структури сироваткового альбуміну людини [1, 2]. Однією з відмінностей будови БСА є присутність у макромолекулярному ланцюзі двох залишків триптофану (Trp135 і Trp214), на відміну від одного залишку в макромолекулі сироваткового альбуміну людини (Trp214) [1]. За фізіологічних значень pH вторинна структура БСА складається з альфа-спіралей (50–68%) і бета-складок (16–18%), стабілізованих водневими зв'язками, а також неупорядкованої частини макромолекулярного ланцюга [1–3]. Завдяки 17 дисульфідним зв'язкам між цистеїновими залишками альфа-спіралей утворюється третинна структура БСА: формуються три домени, кожен з яких утворений субдоменами з трьох альфа-спіралей, а гідрофобні взаємодії між доменами визначають глобулярну структуру білка [1, 2].

Просторова структура БСА є чутливою до зміни кислотно-основного балансу – третинна структура суттєво, проте зворотно змінюється зі зміною pH розчину. Конформаційні переходи відбуваються при значеннях pH 2,7, 4,3, 8 і 10: за фізіоло-

гічного значення рН = 7,4 білок згорнутий у компактну конформацію практично правильної трикутної призми серцеподібної форми (так звана N-ізоформа), за рН = 3,5 конфігурація біомакромолекули нагадує витягнутий еліпсоїд обертання сигароподібної форми (F-ізоформа), а зі зниженням рН до 2,7 білок денатурує до практично витягнутої конфігурації макромолекули (E-ізоформа) [3–5]. Внаслідок конформаційного N–F переходу загальний заряд білка змінюється з –16 при рН = 7,4 до +100 при рН = 3,5, проходячи ізoeлектричну точку при рН = 4,7, коли сумарний заряд біомакромолекули дорівнює нулю [1, 5].

Однією з найважливіших характеристик макромолекул БСА у розведених розчинах є їх гідродинамічний радіус. Він дозволяє стежити за зміною внутрішньої структури макромолекул у розчині у залежності від температури, концентрації та показника кислотно-основного балансу (рН). Для визначення гідродинамічного радіуса використовуються різні фізико-хімічні методи: флуоресценція, фотонна кореляційна спектроскопія, дифракція рентгенівських променів, малокутове розсіювання нейтронів, ЯМР-спектроскопія з імпульсним градієнтом магнітного поля, капілярна віскозиметрія. Внаслідок багатofакторності впливу на структуру макромолекул білка (концентрація, температура та рН його водних розчинів, присутність солей та денатурантів тощо) і відмінностей фізичних підходів у експериментальних методиках дослідження, виникають розбіжності у визначенні величини гідродинамічного радіуса.

Метою даної роботи є ретельне визначення ефективного радіуса макромолекул БСА у водних розчинах у залежності від температури та концентрації. Визначення ефективного радіуса відбувається шляхом обробки експериментальних значень зі зсувної в'язкості за допомогою формул Бетчелора у достатньо розведеному розчині та Маломужа Орлова у концентрованому розчині. Отримані результати порівнюються з тими значеннями, що визначаються з аналізу коефіцієнта самодифузії макромолекул БСА за допомогою формули Стокса–Айнштайна. Прискіпливе дослідження залежності ефективних радіусів макромолекул від температури, концентрації та показника кислотно-основного балансу має визначальне значення для встановлення характеру перебудови внутрішньої структури

макромолекул та відтворення процесів олігомеризації в системі.

## 2. Експериментальна частина

Експериментальні дані взято з роботи [6], де методом капілярної віскозиметрії досліджена зсувна в'язкість розчинів БСА в інтервалі концентрацій (1,76–36,34) мас.% та температур (278–318) К при сталому значенні рН = 5,2, що відповідає околу ізoeлектричної точки БСА.

## 3. Теоретична частина

### 3.1. Застосування формули

#### *Бетчелора до даних із зсувної в'язкості розчинів до об'ємних концентрацій $\varphi \leq 0,2$*

Проілюструємо наш метод визначення ефективного радіуса макромолекул у найпростішому випадку, коли відношення зсувної в'язкості розчину  $\eta$  до в'язкості розчинника  $\eta_0$  задовольняє нерівності  $\eta/\eta_0 < 1,5$ , що відповідає об'ємним концентраціям  $\varphi \leq 0,2$ . Саме в цьому випадку можна скористатись результатами точних розрахунків Бетчелора [7], згідно яких:

$$\eta = \eta_0(1 + a_1\varphi + a_2\varphi^2 + \dots), \quad (1)$$

де

$$a_1 = 2,5, \quad a_2 = 5,2. \quad (2)$$

Перепишучи рівняння (1) у вигляді:

$$a_1\varphi + a_2\varphi^2 + \dots = \lambda, \quad \lambda = \frac{\eta}{\eta_0} - 1, \quad (3)$$

будемо шукати значення  $\varphi$  у вигляді нескінченного ряду за степенями  $\lambda < (\ll) 1$ :

$$\varphi(\lambda) = b_1\lambda + b_2\lambda^2 + \dots \quad (4)$$

Прирівнюючи коефіцієнти при однакових степенях  $\lambda$ , знаходимо:

$$b_1 = \frac{1}{a_1}, \quad b_2 = \frac{a_2}{a_1^3}. \quad (5)$$

У згоді з (2)

$$b_1 = 0,4, \quad b_2 = -0,3328. \quad (6)$$

Об'ємна концентрація макромолекулярних клубків є пов'язаною з ефективним радіусом макромолекули  $R_{\text{eff}}$  співвідношенням:

$$\varphi = \frac{4\pi\rho c_m N_A R_{\text{eff}}^3}{3M_w}, \quad (7)$$

де  $c_m$  – масова концентрація,  $\rho$  – густина розчину,  $N_A$  – стала Авогадро,  $M_w$  – середньомасова молекулярна маса,  $R_{\text{eff}} = R_\eta$  або  $R_D$ . Звідси:

$$R_\eta = \gamma\varphi^{1,3}, \quad \gamma = d(\rho c_m)^{-1/3}, \quad d = \sqrt[3]{\frac{3M_w}{4\pi N_A}}. \quad (8)$$

Для макромолекул альбуміну  $d_{\text{alb}} = 2,98 \cdot 10^{-8} \text{ кг}^{-1/3}$ . Додатково будемо враховувати, що:

$$\rho = \rho_w(1 - c_m) + \rho_{\text{alb}}c_m, \quad (9)$$

де  $\rho_w$  – масова густина води, а  $\rho_{\text{alb}} = 0,07 \text{ г/см}^3$  – масова густина сухого альбуміну [8]. Комбінуючи (8) і (4), знаходимо:

$$R_\eta = \gamma(b_1\lambda)^{1/3}(1 + (b_1/b_2)\lambda + \dots)^{1/3} \Rightarrow \quad (10)$$

$$\Rightarrow \gamma(b_1\lambda)^{1/3} \left( 1 + \frac{b_2}{3b_1}\lambda - \frac{1}{9} \left( \frac{b_2}{b_1} \right)^2 \lambda^2 + \dots \right), \quad (11)$$

де

$$\frac{b_2}{3b_1} = -0,2773, \quad \frac{1}{9} \left( \frac{b_2}{b_1} \right)^2 = 0,0769.$$

Формула Бетчелора дозволяє отримувати радіуси твердих компактних близьких до сферичних макромолекул, які добре корелюють з результатами інших фізичних методів до об'ємних концентрацій  $\varphi \leq 0,2$ . Проте вона не враховує зміну рН середовища та присутність солей, до яких є надзвичайно чутливою внутрішня структура макромолекули альбуміну в розчині.

### 3.2. Застосування формули Маломужа–Орлова до даних із зсувної в'язкості розчинів до об'ємних концентрацій $0,2 \leq \varphi \leq 0,5$

Подальший прогрес у знаходженні зсувної в'язкості більш концентрованих розчинів макромолекул пов'язаний із використанням коміркових моделей. У них враховується, що збурення гідродинамічних потоків частинками суспензії локалізуються, головним чином, усередині сферичної комірки, яка оточує частинку. Також вважається, що на

межі комірки нормальна складова швидкості збурення і тангенціальна напруга дорівнюють нулю, що означає відсутність тертя на зовнішній поверхні комірки.

Для обчислення ефективних радіусів макромолекул із даних зсувної в'язкості розчинів у діапазоні об'ємних концентрацій  $0,2 \leq \varphi \leq 0,5$  застосуємо формулу Маломужа–Орлова, теоретичне обґрунтування якої викладене у роботах [9–10]. Формула Маломужа–Орлова отримана з використанням коміркового підходу, що враховує обертальні ступені свободи частинки. Методика застосування алгоритму Маломужа–Орлова докладно описана в роботах [11–12]. Вона дозволяє описати в'язкість розбавлених розчинів макромолекул в інтервалі значень об'ємної концентрації частинок  $\varphi \leq 0,5$ , що фактично співпадає з густиною розчину, яка відповідає контакту всіх макромолекул [9–12].

### 3.3. Застосування методу Бетчелора до визначення коефіцієнта самодифузії макромолекул у розчині

Зазначимо, що, як і у випадку зсувної в'язкості, метод Бетчелора є застосовним до об'ємних концентрацій  $\varphi \leq 0,2$ . У роботах [13, 14] було показано, що коефіцієнт самодифузії твердих сфер у розбавленому розчині визначається виразом:

$$D_S = D_0(1 + \alpha\varphi + O(\varphi^2)), \quad (12)$$

а  $\alpha = -2, 1$ ,  $D_0$  – коефіцієнт самодифузії Стокса–Айнштайна [13]:

$$D_0 = \frac{k_B T}{6\pi\eta_0 R_D}, \quad (13)$$

де  $k_B$  – стала Больцмана,  $T$  – абсолютна температура,  $\eta_0$  – в'язкість розчинника,  $R_D$  – гідродинамічний радіус макромолекули.

Обмежуючись першим порядком об'ємної концентрації  $\varphi$ , отримаємо вираз для коефіцієнта самодифузії [15]:

$$D_S = D_0(1 + \lambda_C\varphi + \dots), \quad \lambda_C = \lambda_V + \lambda_O + \lambda_D + \lambda_S + \lambda_A. \quad (14)$$

Тут позначено  $x = R_S/R_D$ , де  $R_S$  – радіус модельної твердої сфери,  $R_D$  – гідродинамічний радіус частинки, доданки у формулі (14) визначаються так:  $\lambda_V = 8x^3$  – коефіцієнт віріальної корекції,

$\lambda_O = -6x^2$  – внесок Озеєна,  $\lambda_D = 1$  – дипольний внесок,  $\lambda_S = 75/(256x^4) + O(x^{-5})$  і  $\lambda_A$  – внески, які визначаються гідродинамічними взаємодіями.

У роботі [15] показана нелінійність залежності  $\lambda_C = f(x)$ , причому коефіцієнт у формулі (14) змінюється від  $\lambda_C^{\min} = 1,454$  при  $x = 1,00$  до  $\lambda_C^{\max} = 7,251$  при  $x = 8,00$ .

Залежність коефіцієнта самодифузії макромолекул від їх об'ємної концентрації  $\varphi$  у лінійному наближенні має вигляд (14), де  $\lambda_C$  – відомий коефіцієнт пропорційності. Об'ємна концентрація пов'язана з ефективним радіусом макромолекули  $R_{\text{eff}}$  співвідношенням:

$$\varphi = \frac{4\pi\rho_m c_m N_A}{3M_w} R_{\text{eff}}^3 \equiv P\rho_m c_m R_{\text{eff}}^3, \quad (15)$$

де  $c_m$  – масова концентрація макромолекул у розчині,  $\rho_m$  – густина речовини, утвореної макромолекулами,  $R_{\text{eff}} = R_\eta$  або  $R_D$ . Приймається, що коефіцієнт самодифузії макромолекул  $D_0$  для гранично розбавленого розчину визначається співвідношенням Стокса–Айнштайна:

$$D_0 = \frac{k_B T}{6\pi\eta_0 R_0}, \quad \varphi \rightarrow 0. \quad (16)$$

Якщо концентрація макромолекул є відносно невеликою, їх ефективний радіус можна представити у вигляді:

$$R_D = R_0 + \delta R, \quad (17)$$

де  $R_0$  – радіус макромолекули у розбавленому розчині.

Для слабо концентрованих розчинів макромолекул формулу Стокса–Айнштайна (16) можна узагальнити наступним чином:

$$D_S = \frac{k_B T}{6\pi\eta_0 R_D} = D_0 \left( 1 - \frac{\delta R}{R_0} + \frac{\delta R^2}{R_0^2} + \dots \right). \quad (18)$$

Порівнюючи її з (14), знаходимо рівняння:

$$-\frac{\delta R}{R_0} + \frac{\delta R^2}{R_0^2} + \dots = \lambda\varphi. \quad (19)$$

Очевидно, що:

$$\varphi = P c_m (R_0 + \delta R)^3 \Rightarrow \quad (20)$$

$$\Rightarrow \varphi_0 \left( 1 + 3 \frac{\delta R}{R_0} + 3 \frac{\delta R^2}{R_0^2} + \dots \right), \quad \varphi_0 = P c_m R_0^3. \quad (21)$$

Вирази (21) приводять до наступного рівняння:

$$\frac{\delta R}{R_0} (1 + 3\lambda\varphi_0) - \frac{\delta R^2}{R_0^2} (1 - 3\lambda\varphi_0) + \dots = -\lambda\varphi_0. \quad (22)$$

У лінійному наближенні за  $\lambda\varphi_0$  знаходимо:

$$\delta R = -\lambda\varphi_0 R_0 + 4\lambda^2 \varphi_0^2 R_0. \quad (23)$$

Нагадаємо, що для сферичних макромолекул  $\lambda$  є від'ємним, тому радіус макромолекул зі збільшенням  $\varphi_0$  зростає.

#### 3.4. Коефіцієнти самодифузії макромолекул у достатньо концентрованих розчинах

У літературі використовуються також більш складні вирази для коефіцієнта самодифузії. Зокрема, у роботі [13] для концентрованих розчинів пропонується формула:

$$D_S = D_0 (1 + \beta_1 \varphi + \beta_2 \varphi^2), \quad (24)$$

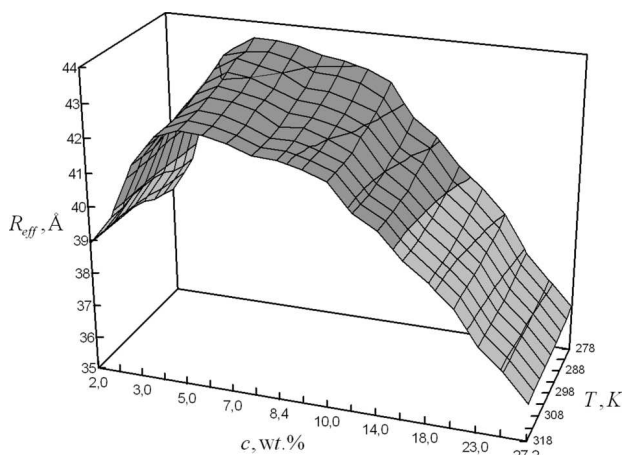
де

$$\beta_1 = -1,83, \quad \beta_2 = 0,91. \quad (25)$$

У роботі [13] вказується, що формула (24) добре корелює з даними коефіцієнта самодифузії для об'ємних концентрацій  $\varphi \leq 0,1$ , а при вищих концентраціях краще апроксимується лінійним представленням залежності коефіцієнта самодифузії від об'ємної концентрації, що входить у суперечність із теоретичною моделлю Бетчелора. Неврахування зміни кислотно-основного балансу та присутності іонів солей вносить значні похибки у визначення радіусів макромолекул альбуміну, структура яких є чутливою до зміни вказаних характеристик розчину.

Поєднання моделі твердих сфер, теорії Медіні–Нойоли [16] та наближення середнього поля Мазура і Гейгенмйєлера [17] приводить до виразу, який добре корелює з експериментальними результатами та теоретичними передбаченнями і придатний для опису коефіцієнта самодифузії сферичних макромолекул у розчині в діапазоні об'ємних концентрацій  $0,2 \leq \varphi \leq 0,5$  [18]:

$$D_S = D_0 \frac{(1 - \varphi)^3}{1 + 1,5\varphi + 2\varphi^2 + 3\varphi^3}. \quad (26)$$



**Рис. 1.** Температурно-концентраційна залежність ефективних радіусів макромолекул бичачого сироваткового альбуміну при рН = 5,2

Для визначення коефіцієнта самодифузії макромолекул та їх розмірів у розчинах значного поширення набув метод динамічного розсіювання світла, який ґрунтується на аналізі часової автокореляційної функції флуктуації інтенсивності розсіяного випромінювання, яка задається рівняннями:

$$G^{(2)}(\tau) = \left[ G^{(1)}(\tau) \right]^2 + 1 + \zeta(x), \quad (27)$$

$$G^{(1)}(\tau) = \int_0^{\infty} P(\Gamma) \exp(-\Gamma\tau) d\Gamma, \quad (28)$$

де  $G^{(1)}(\tau)$  – кореляційна функція першого порядку,  $\zeta(x)$  – експериментальний шум,  $P(\Gamma)$  – функція розподілу за швидкостями релаксацій,  $\Gamma = 1/t_c = D_S q^2$ , причому  $t_c$  – час кореляції,  $q$  – хвильовий вектор флуктуації концентрації [19].

Обчислення розмірів макромолекул із часової автокореляційної функції має ряд переваг, проте не позбавлене і недоліків. Рівняння (27) називають співвідношенням Зіггера, рівняння (28) є інтегральним рівнянням Фредгольма першого роду. Розв’язок останнього відноситься до класу некоректно поставлених завдань, що означає, що якщо функція задана навіть з невеликою помилкою, розв’язок може відрізнятись від істинного і може бути не єдиним. У межах експериментальної похибки буде існувати нескінченне число різних розв’язків, які однаково добре відповідають

експериментальними даними. Чим точніше експериментальні дані, тим менше буде розв’язків, які відповідають цим даним [19].

Методика визначення радіуса частинки у розчині з результатів динамічного розсіювання світла потребує виконання кількох етапів: 1) знаходження значень автокореляційної функції; 2) апроксимація автокореляційної функції за допомогою співвідношення Зіггера; 3) визначення значення коефіцієнта самодифузії; 4) обчислення радіуса частинки за співвідношенням Стокса–Айнштайна. Таким чином, визначення розмірів макромолекул методом динамічного розсіювання світла виявляється багатостадійним процесом, кожен етап якого потребує використання певних фізичних моделей із своїми наближеннями та похибками.

Отже, визначення розмірів макромолекул із даних зсувної в’язкості за допомогою співвідношення Маломужа–Орлова видається експериментально простішим та більш зручним методом для обчислення радіусів макромолекул у розчині.

#### 4. Обговорення результатів

Насамперед зазначимо, що при вказаному рН = 5,2 макромолекула БСА згорнута у компактну конформацію серцеподібної форми (N-ізоформа), тому застосування формули Маломужа–Орлова видається правомірним, – це дає можливість розрахувати ефективні радіуси частинки, яка бере участь у в’язкій течії. Для використання формули Маломужа–Орлова необхідно перейти від масової концентрації розчину  $c$  до об’ємної концентрації макромолекул: алгоритм був застосований для інтервалу концентрацій  $c = 2,0\text{--}27,2$  мас.%, що відповідає інтервалу об’ємних концентрацій макромолекул  $\varphi = 0,049\text{--}0,4$ . Обробкою експериментальних даних за алгоритмом Маломужа–Орлова отримано концентраційні залежності ефективних радіусів макромолекул бичачого сироваткового альбуміну вздовж ізотерм для водних розчинів (див. рис. 1).

Аналіз поверхні ефективних радіусів на рис. 1 показує, що у всьому температурному інтервалі до концентрацій  $\sim 5$  мас.% відбувається стрімке нелінійне зростання ефективних радіусів макромолекул БСА. Спостерігаються максимуми ефективних радіусів макромолекул БСА при концентраціях 5 мас.%, положення яких виявляється незалежним від температури, причому ефективні радіу-

си з ростом температури зменшуються несуттєво: від 43,50 Å при 278 К до 42,55 Å при 318 К. В інтервалі концентрацій 5,0–27,2 мас.% спостерігається зменшення ефективних радіусів макромолекул БСА, а при концентраціях більших 10 мас.% спадну залежність можна апроксимувати прямою (рис. 2).

Раніше нами у роботі [12] досліджені ефективні радіуси макромолекул сироваткового альбуміну людини з даних по зсувній в'язкості його водних розчинів при  $\text{pH} = 7,0$  у температурному інтервалі 278–318 К та інтервалі концентрацій 0,82–36,9 мас.%. Встановлено, що до концентрації 3,7 мас.% у всьому температурному інтервалі ефективні радіуси альбуміну залишаються незмінними, тобто спостерігається “плато” ефективних радіусів макромолекул в області відносно низьких концентрацій. Для БСА ж поблизу ізоелектричної точки спостерігається інша закономірність – для розбавлених розчинів з ростом концентрації ефективні радіуси зростають. Подібними рисами концентраційно-температурних залежностей ефективних радіусів БСА і сироваткового альбуміну людини є те, що ефективні радіуси біомакромолекул при концентраціях 10 мас.% залишаються майже незалежним від температури. З огляду на подібну просторову структуру біомакромолекулу добре корелюють між собою і максимальні ефективні радіуси сироваткового альбуміну людини (44 Å) і бичачого сироваткового альбуміну (43,50 Å).

Порівняємо отримані нами результати з даними з літературних джерел. Попри велику кількість робіт про структуру макромолекул альбуміну в розчині, відповідні результати залежать від фізичних підходів у експериментальних методиках дослідження та вносять фрагментарні, мозаїчні уявлення про динаміку структури макромолекул альбуміну в розчині залежно від температури, концентрації,  $\text{pH}$ , наявності солей і природи буферних розчинів. З огляду на вищесказане, спробуємо порівнювати розміри макромолекул, отримані з експериментальних методів, які ґрунтуються на явищах переносу, передовсім – із коефіцієнту дифузії макромолекули у розчині.

У роботі [20] методом динамічного розсіяння світла для розбавлених водних розчинів БСА ( $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} = 5,0$ , іонна сила 0,15 М) отриманий коефіцієнт самодифузії  $D_S = (6,14 \pm 0,03) \times 10^{-11}\text{ м}^2/\text{с}$ , з якого розрахуємо  $R_D = (39,92 \pm$

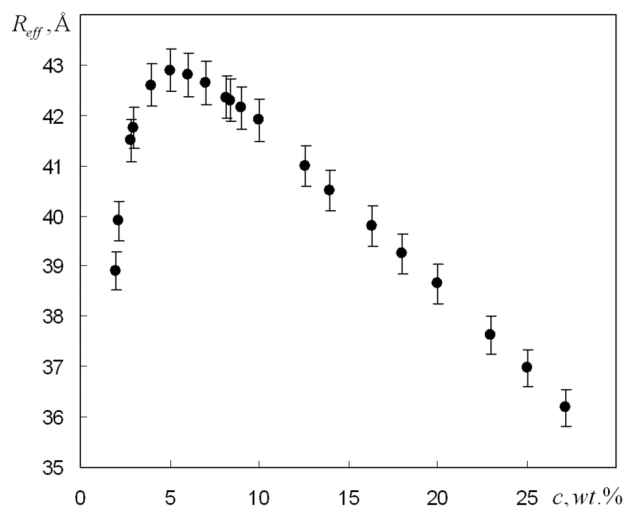


Рис. 2. Концентраційна залежність ефективних радіусів БСА у водному розчині при  $T = 298\text{ К}$  і  $\text{pH} = 5,2$

$\pm 0,03$ ) Å. Ці результати співпадають зі значенням  $R_\eta = (39,90 \pm 0,05)\text{ Å}$ , яке отримане нами за формулою Маломужа–Орлова ( $c = 2,14\text{ мас.}\%$ ,  $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} = 5,2$ ). При цьому, відмітимо, що  $\text{pH}$  розчинів, радіуси макромолекул БСА яких порівнюються, знаходяться поблизу ізоелектричної точки розчинів БСА.

У роботі [21] методом динамічного розсіяння світла проведені вимірювання коефіцієнта дифузії макромолекул БСА у водному розчині ( $c = 1\text{ мас.}\%$ ,  $T = 23\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} = 3\text{--}7$ , фосфатний буфер 0,023 М), які дають змогу розрахувати гідродинамічний радіус при  $\text{pH} = 5,0$  –  $R_D = 37,9\text{ Å}$ . Отримане значення гідродинамічного радіуса макромолекули БСА добре корелює із значеннями, представленими на рис. 2, якщо криву екстраполювати до концентрації  $\sim 1\text{ мас.}\%$ .

Згідно дослідження зсувної в'язкості водних розчинів БСА, у яких біомакромолекула перебуває у компактній N-формі при  $\text{pH} = 4\text{--}9$  [22], ефективна довжина макромолекули БСА оцінена у 83 Å, тобто ефективний радіус дорівнює 41,5 Å. У цій же роботі методом динамічного розсіяння світла визначений коефіцієнт дифузії, який дає для інтервалу  $\text{pH} = 4\text{--}9$  усереднене значення гідродинамічного радіуса 38,8 Å. Указані результати в цілому добре корелюють зі значеннями, отриманими із формули Маломужа–Орлова (таблиця).

У роботі [23] методом дифузії через пористі діафрагми для розбавлених водних розчинів БСА

( $c = 2,79$  мас.%,  $T = 25$  °С, рН = 4,7, іонна сила 0,1 М) отриманий коефіцієнт взаємодифузії, з якого розраховуємо з врахуванням поправок  $R_D = 40,3$  Å. Отримане нами за формулою Маломужа–Орлова з в'язкості водного розчину БСА ( $c = 2,79$  мас.%,  $T = 25$  °С, рН = 5,2) значення виявляється дещо більшим  $R_\eta = 41,50 \pm 0,05$  Å, що можна пов'язати з певною невідповідністю рН розчинів та наявністю NaCl.

Таким чином, отримані нами результати добре корелюють з величинами, розрахованими за даними літературних джерел. Складність порівняння радіусів макромолекули визначається невідповідністю рН розчину та присутністю іонів солей, до яких чутлива структура альбуміну. Проте наявні результати, які свідчать про дещо менші значення радіусів макромолекули БСА. Так, для розведених водних розчинів БСА при  $T = 25$  °С і рН = 5,0 аналіз даних зі зсувної в'язкості приводить авторів роботи [24] до значення радіуса БСА рівного 33,7 Å, а аналіз даних дифузії – 34,8 Å. У роботі [25] повідомляється про радіус макромолекули БСА у розчині, рівний 33,9 Å. Застосувавши модель твердої сфери до макромолекул БСА у фізіологічному розчині, у роботі [26] отримали гідродинамічний радіус згорнутої макромолекули БСА у розбавлених розчинах рівним  $34,2 \pm 1,4$  Å, проте ні про температуру, ні про рН розчину в роботі не повідомляється. Цікаво, що ці результати подібні до значень, отриманих методом молекулярної динаміки [5] для N-ізоформи при рН = 7,4, де відстань між центрами мас доменів 1 та 3 оцінена як  $34,7 \pm 1,2$  Å.

У чому ж причини вказаних невідповідностей ефективних радіусів, отриманих різними фізичними методами дослідження? По-перше, структура макромолекули БСА, яка відповідає компактній конформації серцеподібної форми, відхиляється від сферичної форми і краще апроксимується де-

що витягнутим сфероїдом, сплюснутим у полюсах, що може впливати на результати моделювання ефективних радіусів за формулою Маломужа–Орлова. По-друге, макромолекула білка нерівномірно оточена шаром (або шарами) розчинника, молекули якого пов'язані з макромолекулою білка водневими зв'язками та беруть участь у процесі в'язкої течії разом з макромолекулою. Тому зрозуміло, що гідродинамічний розмір макромолекул повинен бути дещо більшим ніж розмір макромолекул у квазікристалічному стані. Це приводить до запитання: яка ж кількість молекул води біля поверхні макромолекули бере участь у процесі її в'язкої течії?

Таким чином, визначення радіусів макромолекул із даних зсувної в'язкості їх розчинів за допомогою формули Маломужа–Орлова виявляється достатньо простим і ефективним. Експериментальна доступність методу капілярної віскозиметрії та можливість оперативної зміни складу розчину у процесі дослідження дозволяють отримати картину зміни розмірів макромолекули від температури, концентрації, рН та йонного складу розчину, що важливо для розуміння особливостей складної динаміки біомакромолекул у водному розчині.

Важливим результатом є те, що за допомогою запропонованого методу показана немонотонна зміна ефективного радіуса макромолекул альбуміну, – це особливо важливо для встановлення характеру структурних перетворень макромолекули альбуміну.

## 5. Висновки

Із експериментальних даних зсувної в'язкості розчинів БСА та за допомогою коміркового підходу Маломужа–Орлова побудована поверхня ефективних радіусів його макромолекул у концентраційному інтервалі 2,0–27,2 мас.% та інтервалі температур 278–318 К при сталому значенні рН = 5,2, що відповідає околу відповідної ізоелектричної точки.

Показано, що у всьому температурному інтервалі до концентрацій ~5 мас.% відбувається стрімке нелінійне зростання ефективних радіусів макромолекул БСА. При концентрації 5 мас.% спостерігаються максимуми ефективних радіусів макромолекул бичачого сироваткового альбуміну, положення яких виявляється незалежним від темпе-

**Порівняння отриманих значень ефективних радіусів макромолекул БСА**

$c$ , мас.%	$R_\eta$ , Å	$R_D$ , Å	Примітка до $R_D$
1,00	35,6	37,9	23 °С, рН = 5,0, і.с. 0,023 М [21]
2,14	39,90	39,92	25 °С, рН = 5,0, і.с. 0,15 М [20]
2,79	41,5	40,3	25 °С, рН = 4,7, і.с. 0,1 М [22]

ратури, а ефективні радіуси з ростом температури зменшуються несуттєво. У інтервалі концентрацій 5,0–27,2 мас.% спостерігається зменшення ефективних радіусів його макромолекул, причому при концентраціях більших 10 мас.% спадає залежність носить лінійний характер. Встановлено, що ефективний радіус макромолекул альбуміну змінюється *немонотонно*, – це особливо важливо для встановлення характеру структурних перетворень макромолекули альбуміну.

Проаналізовано концентраційно-температурні залежності ефективних радіусів БСА і сироваткового альбуміну людини, які досліджені нами раніше. З огляду на схожу просторову структуру біомакромолекул альбумінів подібними рисами вказаних залежностей є незалежність від температури ефективних радіусів біомакромолекул при концентраціях  $\geq 10$  мас.% та практично рівність максимальних ефективних радіусів сироваткового альбуміну людини (44 Å) і БСА (43,5 Å) у межах похибок моделювання.

Проведене порівняння результатів роботи із даними літературних джерел, які ґрунтуються на коефіцієнті самодифузії макромолекул у розчині, вказує на ефективність формули Маломужа–Орлова для розрахунку радіусів макромолекул глобулярних білків із даних зсувної в'язкості їх водних розчинів. Висунуті припущення щодо причин невідповідностей значень радіусів макромолекул, які отримані різними фізичними методами дослідження.

*Автори роботи висловлюють щире подяку академіку Леоніду Анатолійовичу Булавину за постійну увагу та всебічну підтримку досліджень властивостей макромолекул у розчинах. Автори глибоко вдячні професору М.П. Маломужу та професору А.І. Фісенку за ґрунтовне обговорення отриманих результатів і критично важливі зауваження при написанні роботи.*

1. T. Peters, Jr. *All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications* (Academic Press, 1996).
2. K.A. Majorek, P.J. Porebski, A. Dayal *et al.* Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Mol. Immunol.* **52**, 174 (2012).
3. D.C. Carter, J.X. Ho. Structure of serum-albumin. *Adv. Protein Chem.* **45**, 153 (1994).
4. C. Leggio, L. Galantini, N.V. Pavel. About the albumin structure in solution: Cigar expanded form versus heart normal shape. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **10**, 6741 (2008).

5. K. Baler, O.A. Martin, M.A. Carignano *et al.* Electrostatic unfolding and interactions of albumin driven by pH changes: A molecular dynamics study. *J. Phys. Chem. B* **118**, 921 (2014).
6. K. Monkos. Viscosity of bovine serum albumin aqueous solutions as a function of temperature and concentration. *Int. J. Biol. Macromol.* **18**, 61 (1996).
7. G.K. Batchelor. *An Introduction to Fluid Dynamics* (Cambridge University Press, 2000).
8. В.Я. Гоцульський, А.А. Гуслістий, М.П. Маломуж. Характерні зміни густини та в'язкості плазми людської крові в залежності від концентрації білків. *Український фізичний журнал (у друці)*.
9. N.P. Malomuzh, E.V. Orlov. Static shear viscosity of a bimodal suspension. *Ukr. J. Phys.* **50**, 618 (2005).
10. N.P. Malomuzh, E.V. Orlov. New version of the cellular method for determining the viscosity of suspensions. *Kolloid. Zh.* **64**, 802 (2002) (in Russian).
11. O.V. Khorolskyi. Effective radii of macromolecules in dilute polyvinyl alcohol solutions. *Ukr. J. Phys.* **63**, 144 (2018).
12. O.V. Khorolskyi. Calculation of the effective macromolecular radii of human serum albumin from the shear viscosity data for its aqueous solutions. *Ukr. J. Phys.* **64**, 285 (2019).
13. J.K.G. Dhont. *An Introduction to Dynamics of Colloids* (Elsevier, 1996).
14. M. Ripoll, K. Mussawisade, R.G. Winkler, G. Gompper. Dynamic regimes of fluids simulated by multiparticle-collision dynamics. *Phys. Rev. E* **72**, 016701 (2005).
15. B. Cichocki, B.U. Felderhof. Diffusion of Brownian particles with hydrodynamic interaction and hard core repulsion. *J. Chem. Phys.* **94**, 556 (1991).
16. M. Medina-Noyola. Long-time self-diffusion in concentrated colloidal dispersions. *Phys. Rev. Lett.* **60**, 2705 (1988).
17. P. Mazur, U. Geigenmüller. A simple formula for the short-time self-diffusion coefficient in concentrated suspensions. *Physica A* **146**, 657 (1987).
18. A. van Blaaderen, J. Peetermans, G. Maret, J.K.G. Dhont. Long-time self-diffusion of spherical colloidal particles measured with fluorescence recovery after photobleaching. *J. Chem. Phys.* **96**, 4591 (1992).
19. И. Сердюк, Н. Заккаи, Дж. Заккаи. *Методы в молекулярной биофизике: структура, функция, динамика: учебное пособие. Т. 1* (КДУ, 2009).
20. S. Yadav, S.J. Shire, D.S. Kalonia. Viscosity analysis of high concentration bovine serum albumin aqueous solutions. *Pharmaceut. Res.* **28**, 1973 (2011).
21. A.K. Gaigalas, J.B. Hubbard, M. McCurley, Sam Woo. Diffusion of bovine serum albumin in aqueous solutions. *J. Phys. Chem.* **96**, 2355 (1992).
22. B. Jachimska, A. Pajor. Physico-chemical characterization of bovine serum albumin in solution and as deposited on surfaces. *Bioelectrochemistry* **87**, 138 (2012).
23. K.H. Keller, E.R. Canales, S.I. Yum. Tracer and mutual diffusion coefficients of proteins. *J. Phys. Chem.* **75**, 379 (1971).



24. C. Tanford, J.G. Buzzell. The viscosity of aqueous solutions of bovine serum albumin between pH 4.3 and 10.5. *J. Phys. Chem.* **60**, 225 (1956).
25. V.N. Uversky, N.V. Narizhneva, T.V. Ivanova, A.Y. Tomashevski. Rigidity of human  $\alpha$ -fetoprotein tertiary structure is under ligand control. *Biochemistry* **44**, 13638 (1997).
26. R.S. Tu, V. Breedveld. Microrheological detection of protein unfolding. *Phys. Rev. E* **72**, 041914 (2005).

Одержано 11.08.19

*O. V. Khorolskyi, Yu. D. Moskalenko*

CALCULATION OF THE MACROMOLECULAR SIZE  
OF BOVINE SERUM ALBUMIN FROM THE VISCOSITY  
OF ITS AQUEOUS SOLUTIONS

S u m m a r y

On the basis of experimental data for the shear viscosity of aqueous bovine serum albumin (BSA) solutions and in the

framework of the Malomuzh–Orlov cellular approach, the surface of effective radii of BSA macromolecules has been plotted for the constant pH = 5.2 in the concentration interval of 2.0–27.2 wt% and the temperature interval 278–318 K. A rapid nonlinear increase in the effective radii of BSA macromolecules is shown to take place up to BSA concentrations of about 5 wt% in the whole examined temperature interval. The maxima of the effective radii of BSA macromolecules are observed at a BSA concentration of 5 wt%, and their position is temperature-independent. In the concentration interval 5.0–27.2 wt%, the effective radii of BSA macromolecules decrease, and this reduction is linear at BSA concentrations higher than 10 wt%. A comparison of the calculation results with literature data on the self-diffusion coefficient of macromolecules in solutions testifies to the efficiency of the Malomuzh–Orlov formula for calculating the macromolecular radii of globular proteins on the basis of shear viscosity data for their aqueous solutions.