

М.П. МАЛОМУЖ,<sup>1</sup> Л.А. БУЛАВІН,<sup>2</sup> В.Я. ГОЦУЛЬСЬКИЙ,<sup>1</sup> А.А. ГУСЛІСТИЙ<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Одеський національний університет імені І.І. Мечникова

(Вул. Дворянська, 2, Одеса 65082; e-mail: mnp@onu.edu.ua, vygot@onu.edu.ua)

<sup>2</sup> Київський національний університет імені Тараса Шевченка

(Вул. Володимирська, 64/13, Київ 01601; e-mail: bulavin221@gmail.com)

<sup>3</sup> Одеський обласний медичний центр психічного здоров'я

(Вул. Воробійова, 9, Одеса 65006; e-mail: aguslisty@gmail.com)

## ХАРАКТЕРНІ ЗМІНИ ГУСТИНИ ТА В'ЯЗКОСТІ ПЛАЗМИ ЛЮДСЬКОЇ КРОВІ В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД КОНЦЕНТРАЦІЇ БІЛКІВ

УДК 538.93, 612.1

*Досліджується залежність густини та в'язкості плазми людської крові від концентрації альбуміну, гама-глобуліну, фібриногену тощо, які утворюють природний склад плазми крові. Концентрація біоматеріалу змінюється шляхом розбавлення плазми крові ізотонічним водним розчином. Показано, що зменшення концентрації біоматеріалу до 0,91 від його середньої кількості приводить до різкої зміни густини плазми та зміни характеру концентраційної залежності зсувної в'язкості плазми крові. Висловлюється припущення, що спостережувані зміни густини та зсувної в'язкості плазми крові є пов'язаними зі структурними перетвореннями, викликаними процесами олігомеризації, в першу чергу, димеризації молекул альбуміну. Робиться висновок про те, що дозоване введення кровозамінників, яке не повинно перевищувати 0,1 від кількості крові, є тісно пов'язаним зі структурними перетвореннями біоматеріалу в плазмі крові.*

*Ключові слова:* густина плазми крові, зсувна в'язкість плазми крові, концентрація протеїнів, олігомеризація біомолекул.

### 1. Вступ

Плазма крові відіграє важливу роль у формуванні властивостей крові, в першу чергу, її зсувної в'язкості, значення якої сприяють або перешкоджають переносу кисню від легенів до тканин та вуглекислого газу у зворотному напрямку. Дослідженню фізичних властивостей плазми крові присвячено немало робіт [1, 2], серед яких основну роль відіграють динамічне розсіювання світла, дослідження температурної, концентраційної та рН-залежності зсувної в'язкості плазми крові [3, 4], малокутове розсіювання теплових нейтронів та рентгенівського випромінювання [5], і таке інше.

В представленій роботі ми хочемо звернути увагу на одночасне дослідження найпростішої характеристики плазми крові – її густини, та зсувної в'язкості плазми за тих самих умов. Дослідження густини плазми як функції температури, концентрації біопротейнів, що входять до її складу, показника кислотно-лужного балансу рН дозволяє встановити границі існування тих чи інших структурних особливостей біорозчину плазми. Паралельне дослідження зсувної в'язкості допомагає отримати додаткову інформацію про особливості структурних перетворень, зокрема, про характерні розміри тих біокомплексів, що можуть утворюватись у плазмі крові.

У зв'язку з цим, приймаємо до уваги, що плазму крові можна розглядати, перш за все, як во-

© М.П. МАЛОМУЖ, Л.А. БУЛАВІН,  
В.Я. ГОЦУЛЬСЬКИЙ, А.А. ГУСЛІСТИЙ, 2020

дний розчин альбуміну, гама-глобуліну та фібриногену [6]. Перший з них відіграє, мабуть, домінуючу роль і тому важливо прослідкувати, як перетворення структури молекул альбуміну впливатимуть на зміну властивостей їх водних розчинів. Добре відомо, що у “сухому” стані молекула альбуміну являє собою “серцеподібний” комплекс, розмір якого становить близько 80 Å. Цей комплекс складається з трьох доменів, а кожний з них з двох субдоменів. В свою чергу, субдомени утворюються з  $\alpha$ -спіралей, а останні утворюються послідовностями амінокислот. При розчиненні у воді жорстка просторова конфігурація доменів за певних температур і значень рН руйнується, а молекули альбуміну переходять до квазілінійних комплексів трьох послідовно пов’язаних доменів (так званої *F*-конформації). Внаслідок взаємодії між доменами різних макромолекул можуть утворюватись квазілінійні комплекси, тобто димери, або в більш загальному випадку, олігомери альбуміну більш високого порядку. Оскільки ефективний об’єм димеру перевищує суму ефективних об’ємів мономерів, то в області параметрів розчину, що сприяють виникненню розвинутої олігомеризації макромолекул альбуміну у плазмі крові, слід чекати зміни густини розчину. Певним чином, зміна характеру олігомеризації буде впливати і на зміну зсувної в’язкості плазми крові.

Але взаємодія з молекулами води сприяє також і перебудові доменів, особливо при зміні показника кислотно-лужного балансу. Тут гідрогени можуть частково компенсувати негативні заряди карбо-груп і на “поверхню” альбуміну виходять позитивно заряджені аміно-групи, що супроводжується зміною знака дзета-потенціалу [7, 8]. Певним чином це впливатиме і на комплексно-утворення у водному розчині альбуміну.

В представленій роботі наша основна увага фокусуватиметься на експериментальному дослідженні залежності густини плазми від концентрації біопротейнів, а також на поведінці її зсувної в’язкості.

## 2. Експериментальна частина

Зміни густини та зсувної в’язкості плазми крові людини здійснюються шляхом додаванням ізотонічного 0,9%-розчину вода-NaCl, або фізіологічного розчину. Ця ситуація цілком збігається з інфузійним лікуванням, або заміною частини крові у руслі кровообігу кровозамінниками. Сучасні

медичні протоколи допускають використання фізіологічного розчину як кровозамінника у екстрених випадках, оскільки нині розроблено колоїдні та такі, що забезпечують транспорт кисню та інших газів. Але фізіологічний розчин залишається базовим при введенні більшості ліків у русло кровообігу. Відомо емпіричне правило, за яким об’єм фізіологічного розчину, що додається до крові, не повинен перевищувати 10% від загальної кількості крові у людини. Вона розраховується за формулою 7% від маси людини, стандартне значення якої дорівнює зросту людини у сантиметрах мінус 100.

Оскільки кров дуже складна рідинна система, нами було проведено перші дослідження по впливу води на властивості її базового компонента – плазми, а остання розглядається як водний розчин високомолекулярних сполук. Використано було нативну плазму.

Густина плазми визначалась пікнометричним методом, а в’язкість – диференціальним віскозиметром Геса. Оскільки концентрація білків у плазмі та їх спектр є абсолютно індивідуальним параметром і коливається в досить широких межах, ми використовуємо відносні концентрації та в’язкості зразків, нормуючи їх на початкові значення, що належать отриманій нативній плазмі. Подальші зміни концентрації проводились заміною частини об’єму зразка фізіологічним розчином. Кожного разу об’єм зразка зменшувався на один відсоток, а потім доводився до початкового. Оскільки при вимірах густини та в’язкості можливі невеликі втрати частини зразка в пікнометрі та віскозиметрі, необхідно це враховувати при формуванні кожної нової концентрації, що робилось аналітичним зважуванням порцій компонентів розчину.

При об’ємі пікнометра 10 см<sup>3</sup> відносним методом (порівнянням ваги води та досліджуваної рідини однакових об’ємів) можна досягти точності визначення густини з похибкою 10<sup>-5</sup>. Маса зразків  $M_w$  та еталона  $M_l$  визначались на аналітичних терезах з точністю 0,2 мг. Густина досліджуваної рідини визначалась за виразом:

$$\rho = \frac{M_l}{M_w}.$$

На рис. 1 наведено результати вимірювання густини плазми крові людини при додаванні ізотонічного розчину. Плазму нам було надано з клінічної

лабораторії терапевтичного відділення 411 Одеського військового клінічного госпіталю.

З рис. 1 випливає, що за концентрації протеїнів у плазмі крові, що дорівнює приблизно 0,9 від її початкового значення, густина різко змінюється. Це можна пояснити тим, що за значення концентрації  $C/C_0$  в плазмі крові відбувається перехід від однорідного желеподібного стану до неоднорідного стану, породжуваного утворенням зародків з меншою густиною протеїнового матеріалу (див. оцінки в обговоренні результатів). Неочікуваним є те, що значення цієї характеристичної концентрації цілком збігається з тією, що надаються емпіричними рекомендаціями та лікарськими протоколами, за яких кровозамінники не повинні заміщувати більше 10% від об'єму крові.

Віскозиметром Геса було отримано концентраційну залежність в'язкості плазми для тих саме зразків. В'язкість подається у відносних величинах, тобто нормованих на її значення для води. На рис. 2. наведено результати вимірювання в'язкості плазми крові людини від концентрації в ній протеїнів відносно початкової при додаванні ізотонічного розчину NaCl зразу після виділення плазми з крові.

Тут треба зазначити, що кінетичні властивості плазми крові більш точно характеризуються кінематичною в'язкістю:

$$\nu(T, \tilde{C}) = \frac{\eta(T, \tilde{C})}{\rho(T, \tilde{C})},$$

яка подібно до густини змінюється стрибко-подібним чином.

### 3. Поведінка густини і в'язкості плазми крові через добу після приготування

Властивості плазми крові з часом змінюються, оскільки її протеїнова складова поступово втрачає свою властивість до самовідновлення [10]. Макромолекули протеїнів втрачають свої подвійні електричні шари, які перешкоджають їх злипанню у життєздатному стані, і починають коагулювати та випадати в осад. Цей ефект безпосередньо спостерігається у кюветі, в якій плазма зберігається у холодильнику впродовж доби за температури 4 °С. Внаслідок часткового випадіння протеїнів в осад, їх концентрація в плазмі зменшується. Процеси ко-

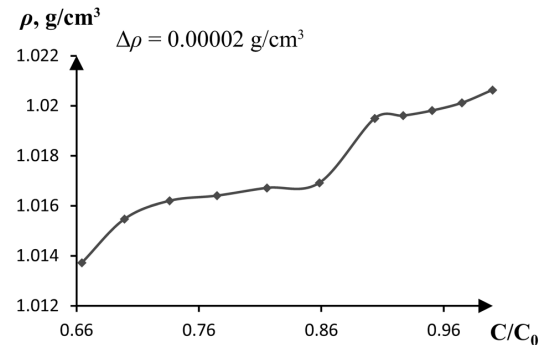


Рис. 1. Залежність густини плазми крові людини від відносної концентрації в ній протеїнів при додаванні ізотонічного розчину NaCl зразу після виділення плазми з крові,  $C_0$  – середня концентрація протеїнів у крові людини [9]

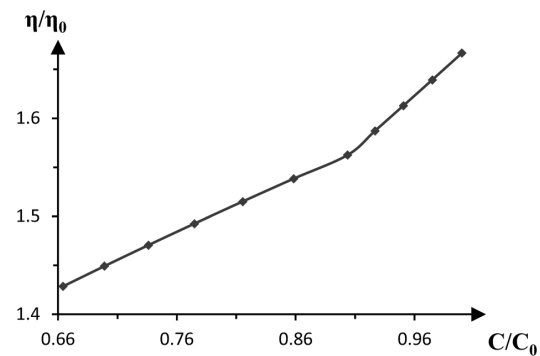
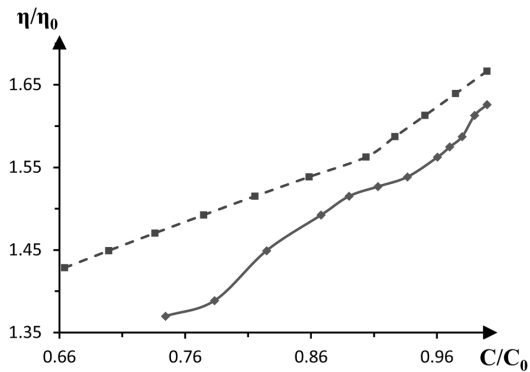


Рис. 2. Залежність відносної в'язкості плазми крові людини від концентрації в ній протеїнів при додаванні ізотонічного розчину NaCl зразу після виділення плазми з крові ( $\eta_0$  – зсувна в'язкість води)

агуляції додатково призводять до зменшення об'ємної долі протеїнів. Тому, як наслідок, слід чекати зменшення зсувної в'язкості плазми з часом.

Залежність в'язкості плазми через добу після її виділення наведено на рис. 3.

Як бачимо, у згоді з нашими очікуваннями зсувна в'язкість плазми крові зменшується, але її залежність від концентрації в обох інтервалах відносної концентрації:  $0,6 < C/C_0 < 0,91$  і  $0,91 < C/C_0 < 1,0$  виявляється нелінійною, на відміну від того, що спостерігалось у свіжоприготовленій плазмі. Це вказує на те, об'ємна доля протеїнів у старіючій плазмі нелінійно зменшується із додаванням ізотонічного розчину. Ця обставина є надзвичайно важливою і вимагає скрупульозного вивчення. Чіткість позиціонування характерної концентрації  $C/C_0 = 0,91$  втрачається, хоча в околі цієї



**Рис. 3.** Залежності в'язкості плазми крові людини від відносної концентрації протеїнів за додавання до неї ізотонічного розчину NaCl зразу після виділення з крові (верхня крива) та через 24 години після її отримання (нижня крива). Обидва експерименти виконувались за температури 16 °C

точки характер нелинійної залежності від  $C/C_0$  помітно змінюється.

Треба додати, що виконання експериментів у старіючій плазмі ускладнюється ефектами піноутворення, внаслідок чого експериментальні помилки у вимірюванні густини плазми можуть наближуватись до стрибка густини, що спостерігається у свіжоприготовленій плазмі. Піноутворення є відображенням ефектів кластеризації, що відбуваються з денатурованими молекулами протеїнів. Зазначимо, що для адекватної інтерпретації результатів вимірювань їх необхідно доповнити результатами за різних температур, особливо в температурному діапазоні життєдіяльності людини: 34 °C та 42 °C, та різних значень показника кислотно-лужного балансу рН.

#### 4. Обговорення результатів

Характер залежності густини плазми крові від відносної концентрації  $x = C/C_0$  основних протеїнів в ній наводить на думку, що при  $C/C_0 \approx 0,91$  в плазмі відбувається розмазаний фазовий перехід. Саме він і є фізично обґрунтованою передумовою вимоги емпіричного медичного протоколу по кровозаміщенню, що полягає у дотриманні граничної кількості кровозамінника.

Є дві основні причини для аномально швидкого зростання густини плазми крові, розбавленої ізотонічним розчином. Перш за все, це зміна характеру просторового впорядкування протеїнів і друге, це зміна внутрішньої структури протеїнів внаслідок їх взаємодії між собою за посередництвом водного оточення. Коротко розглянемо деякі особливості обох цих факторів.

Почнемо з поведінки протеїнів плазми у гранично розбавленому розчині (експерименти виконувались в протилежному напрямку). Основні протеїнові складові плазми: альбумін, гама-глобулін та фібриноген утворюють суміш мономерів. При зростанні концентрації, внаслідок взаємодії між макромолекулами, починають утворюватись протеїнові олігомери, перш за все димери альбуміну [11, 12].

Зробимо оцінки об'ємної долі протеїнів в плазмі крові. Згідно з роботою Хорольського [13–15] ефективний радіус ізольованої макромолекули альбуміну становить наближено:

$$r_{\text{eff}}^{(\text{alb})} \approx 40 \text{ \AA}.$$

Масова густина молекул альбуміну в плазмі крові людини згідно з [6] дорівнює

$$\rho_{\text{alb}} = 0,07 \text{ г/см}^3.$$

Враховуючи те, що атомарна маса макромолекули альбуміну має величину

$$M_a \approx 0,65 \cdot 10^5,$$

для об'ємної долі протеїнів в плазмі крові знаходимо:

$$\varphi_{\text{alb}} = \frac{4\pi}{3} r_{\text{eff}}^3 \frac{\rho_{\text{alb}}}{m_{\text{alb}}},$$

де  $m_{\text{alb}} = M_a \cdot 1,66 \cdot 10^{-24}$  г – маса молекули альбуміну. Підставляючи наведені вище значення густини і розміру макромолекул альбуміну, отримуємо таку оцінку:

$$\varphi_{\text{alb}} \approx 0,2,$$

що є близькою до величини перколяційного порога (див. далі). Сумарний відносний об'єм протеїнів в плазмі крові, імовірно, є більшим в півтора-два рази:

$$\varphi_{\text{prot}}^{(u)} \approx (0,30-0,40),$$

що повинно суттєво впливати як на поведінку густини плазми крові, так і на поведінку її зсувної в'язкості.

При найбільшому розбавленні плазми крові ізотонічним розчином, відносний об'єм протеїнів становить:

$$\varphi_{\text{prot}}^{(l)} \approx (0,17-0,25).$$

Розглядаючи біомолекули плазми як частинки суспензії, для розрахунку зсувної в'язкості плазми крові можна скористатись формулою, отриманою в роботі [19] (див. також [18]) на основі чарункового підходу. Характер залежності  $\eta/\eta_0$  від  $\varphi_{\text{prot}}$ , що розрахований за отриманою в [19] формулою, наведено на рис. 4. Зокрема, значенню  $\varphi_{\text{prot}}^{(l)}$  відповідає  $\eta/\eta_0 \approx 1,5$ , що майже точно збігається з результатами експериментального вимірювання на рис. 2. З цього випливає, що в дослідженому нами інтервалі,  $0,65 < C/C_0 < 1,0$ , відносних концентрацій протеїнів, біомолекули утворюють ансамбль, що складається з мономерів та олігомерів різного порядку. Це є безпосереднім наслідком представлення залежності  $\eta/\eta_0$  від  $\varphi_{\text{prot}}$  нескінченим рядом з усіма степенями  $\varphi_{\text{prot}}$ . При цьому, кожний степінь  $\varphi_{\text{prot}}$  цього ряду відповідає внесок від олігомера відповідного порядку.

Вже за об'ємної долі  $\varphi$  протеїнів, що становить наближено  $\varphi_P \approx 0,23$  [21], протеїни плазми будуть утворювати нескінченні перколяційні кластери, які з часом перетворюються один в другий. Тому за цієї об'ємної концентрації протеїнів слід чекати певної зміни густини системи, або її похідних за концентрацією та температурою. Паралельно, утворення перколяційних кластерів та їх взаємні переходи повинні відбиватись також на певдинці зсувної в'язкості плазми крові. Можна висловити припущення, що в наших дослідках значення перколяційного порога, фактично, відповідає відносній концентрації  $C/C_0 \approx 0,91$ .

За  $C/C_0 > 0,91$  система, імовірно, перетворюється на рідку желеподібну фазу – “рідкий кисіль”, зсувна в'язкість якого буде суттєво залежати від температури.

Другою причиною аномального зростання густини розбавленої плазми крові за  $C/C_0 \approx 0,91$  може бути перебудова внутрішньої структури макромолекул протеїнів. Проілюструємо це на прикладі макромолекули альбуміну. У сухому стані вона має серцеподібну структуру [22, 23], утворюється з трьох доменів, а кожний з них – з двох субдоменів. В свою чергу, субдомени складаються з

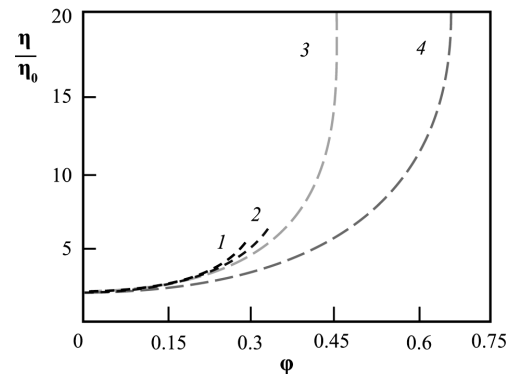


Рис. 4. Залежність відносної величини в'язкості крові (по відношенню до в'язкості її плазми) від питомого об'єму  $\varphi$ : крива 1 відповідає формулі Айнштайна [16] для розрідженої суспензії, крива 2 – формулі Бетчелора [17], крива 3 побудована згідно з [18, 19], крива 4 відповідає модельній формулі для щільної суспензії з [20]

4-х і 6-ти  $\alpha$ -спіралей, зафіксованих в певних конфігураціях. Попадаючи у водне середовище, макромолекули альбуміну починають «плавитись»: домени можуть складатись або розтягуватись в залежності від температури та значень рН. Відбуваються зміни і у структурі субдоменів. Певною мірою, процес “плавлення” макромолекул у воді нагадує структурні перетворення у воді після плавлення льоду. Зразу після плавлення, локальна структура води залишається льодоподібною, а в об'ємі води виникають кластери, структура яких і характер теплового руху молекул в них залишаються близькими до тих, що є характерними для льоду. Час життя таких кластерів є скінченим, що і є їх найбільш характерною відмінністю від льодоподібного стану. Зрозуміло, що із зростанням температури ефект декомпактизації біомолекул повинен зростати.

Найбільш суттєво внутрішня перебудова макромолекул протеїнів буде впливати на поведінку теплоємності та діелектричної проникності системи. Тобто їх подальше дослідження може вирішально вплинути на розуміння структурних перетворень у розбавленій плазмі крові.

Автори роботи щиро дякують д-ру Анатолію Фісенку (Канада) за надзвичайно уважне ставлення до роботи, обговорення отриманих результатів та корисні поради. Ми висловлюємо нашу особливу подяку за співпрацю Кутовець Сніжани Леонідівні.

1. G.D.O. Lowe, J.C. Barbenel. Plasma and blood viscosity, in *Clinical blood rheology* edited by G.D.O. Lowe, (CRC Press, Boca Raton, 1988), V. 1, p. 11.
2. M. Brust, C. Schaefer, R. Doerr, L. Pan, M. Garcia, P.E. Arratia, C. Wagner. Rheology of human blood plasma: Viscoelastic versus Newtonian behavior. *Phys. Rev. Lett.* **110**, 078305 (2013).
3. E. Davila, D. Pares, G. Cuvelier, P. Relkin. Heat-induced gelation of porcine blood plasma proteins as affected by pH. *Meat Science* **76**, 216 (2007).
4. P.D. Watson. Modeling the effects of proteins on pH in plasma. *J. Appl. Physiol.* **86**, 1421 (1999).
5. F. Roosen-Runge, M. Hennig, F. Zhang, R.M.J. Jacobs, M. Sztucki et al. Protein self-diffusion in crowded solutions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 11815 (2011).
6. С.А. Волкова, Н.Н. Боровков. *Основы клинической гематологии* (НижГМА, 2013).
7. B. Jachimska, M. Wasilewska, Z. Adamczyk. Characterization of globular protein solutions by dynamic light scattering, electrophoretic mobility, and viscosity measurements. *Langmuir* **24**, 6866 (2008).
8. K. Baler, O.A. Martin, M.A. Carignano, G.A. Ameer, J.A. Vila et al. Electrostatic Unfolding and Interactions of Albumin Driven by pH Changes: A Molecular Dynamics Study. *J. Phys. Chem. B* **118**, 921 (2014).
9. А.Л. Гребенев. *Пропедевтика внутренних болезней* (Медицина, 2001).
10. A. Michnik, K. Michalik, Z. Drzazga. DSC study of human serum albumin ageing processes in aqueous and low concentration ethanol solutions. *Polish J. Env. Stud.* **15**, 81 (2006).
11. A. Bhattacharya, R. Prajapati, S. Chatterjee, T.K. Mukherjee. Concentration-dependent reversible self-oligomerization of serum albumins through intermolecular  $\beta$ -sheet formation. *Langmuir* **30**, 14894 (2014).
12. R.F. Atmeh, I.M. Arafa, M. Al-Khateeb. Albumin aggregates: hydrodynamic shape and physico-chemical properties. *Jordan J. Chem.* **2**, 169 (2007).
13. О.В. Хорольський. Ефективні радіуси макромолекул альбуміну людини із даних по зсувній в'язкості його водних розчинів. *УФЖ* **64** (4), 285 (2019).
14. О.В. Хорольський. Ефективні радіуси макромолекул у розбавлених розчинах полівінілового спирту. *УФЖ* **63** (2), 144 (2018).
15. О.В. Хорольський. Природа в'язкості розчинів полівінілового спирту у диметилсульфоксиді та воді *УФЖ* **62** (10), 858 (2017).
16. A. Einstein. Eine neue Bestimmung der Molekuldimensionen. *Ann. Phys.* **19**, 289 (1906).
17. *Гидродинамическое взаимодействие частиц в суспензиях*. Под ред. А.Ю. Ишлинского, Г.Г. Черного (Мир, 1980).
18. А.А. Гуслістий, М.П. Маломуж, А.І. Фісенко. Оптимальна температура життєвої активності людини. *УФЖ* **63** (9), 809 (2018).
19. Н.П. Маломуж, Е.В. Орлов. Новая версия ячеечного метода определения вязкости взвесей. *Коллоидный журнал* **64**, 802 (2002).
20. T.S. Chow. Viscosities of concentrated dispersions. *Phys. Rev. E* **48**, 1977 (1993).
21. R. Consiglio, D.R. Baker, G. Paul, H.E. Stanley. Continuum percolation thresholds for mixtures of spheres of different sizes. *Physica A* **319**, 49 (2003).
22. D.C. Carter, J.X. Ho. Structure of Serum Albumin. *Advances in Protein Chemistry* **45**, 153 (1994).
23. S. Curry, H. Mandelkow, P. Brick, N. Franks. Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **5**, 827 (1998).

Одержано 26.01.18

N.P. Malomuzh, L.A. Bulavin,  
V.Ya. Gotsulskyi, A.A. Guslisty

#### CHARACTERISTIC CHANGES IN THE DENSITY AND SHEAR VISCOSITY OF HUMAN BLOOD PLASMA WITH VARYING PROTEIN CONCENTRATION

#### S u m m a r y

The density and shear viscosity of human blood plasma and their dependence on the concentration of proteins (albumin,  $\gamma$ -globulin, fibrinogen, etc.) entering the natural blood composition have been studied. The biomaterial concentration is varied by diluting the blood plasma with the isotonic aqueous solution. It is shown that a decrease in the biomaterial concentration down to 0.91 of its initial value leads to a drastic change in the plasma density and to a change in the character of the concentration dependence of the shear viscosity of blood plasma. A hypothesis is put forward that the observed changes in the density and shear viscosity result from the structural transformations induced by oligomerization processes; first of all, by the albumin dimerization. A conclusion is drawn that the introduced blood substitutes should not exceed 10% of the blood mass; otherwise, structural transformations of a biomaterial in blood plasma can be provoked.