Л.А. БУЛАВІН,[1] О.В. ХОРОЛЬСЬКИЙ[2]

[1] Київський національний університет імені Тараса Шевченка
(Вул. Володимирська, 64/13, Київ 01601)
[2] Полтавський національний педагогічний університет імені В.Г. Короленка
(Вул. Остроградського, 2, Полтава 36000; e-mail: khorolskiy.alexey@gmail.com)

УДК 532.13,
577.322.3, 577.356

КОНЦЕНТРАЦІЙНА ЗАЛЕЖНІСТЬ РОЗМІРІВ МАКРОМОЛЕКУЛ АЛЬБУМІНІВ У ВОДНИХ РОЗЧИНАХ[1]

За допомогою сучасної коміркової моделі в'язкості водних розчинів із експериментальних даних зсувної в'язкості отримані концентраційні залежності ефективного радіуса макромолекул овечого сироваткового альбуміну у водних розчинах у концентраційному інтервалі (3,65–25,8) мас.% та інтервалі температур (278–318) K при сталому значенні pH = 7,05. Проведено порівняння концентраційних і температурних залежностей ефективних радіусів макромолекул овечого сироваткового альбуміну, бичачого сироваткового альбуміну та сироваткового альбуміну людини. Показано, що спостерігається часткова подібність концентраційних і температурних залежностей ефективних радіусів макромолекул овечого сироваткового альбуміну і макромолекул сироваткового альбуміну людини в інтервалах об'ємних концентрацій, відповідно, (0,12–0,49) і (0,18–0,48), причому кислотно-лужні баланси (pH) водних розчинів вказаних альбумінів однакові. Зроблено висновки про те, що: 1) концентраційні залежності ефективних радіусів структурно схожих альбумінів є подібними, але за умови однакових pH; 2) залежність об'ємної концентрації водних розчинів альбуміну від температури при сталому радіусі макромолекули підтверджує гіпотезу про існування у водних розчинах при температурі 42 °C динамічного фазового переходу, при якому має місце суттєва зміна характеру теплового руху молекул води.

Ключові слова: овечий сироватковий альбумін, водний розчин, ефективний радіус макромолекули, коміркова модель.

1. Вступ

Сироваткові альбуміни – це глобулярні протеїни, які складаються з послідовності амінокислотних залишків, об'єднаних у одноланцюгову макромолекулу з достатньо складною просторовою структурою [1]. Функціональні властивості макромолекул альбумінів залежать від їх просторової будови на рівні вторинної та третинної структур макромолекул, які визначаються амінокислотною послідовністю ланцюга [1, 2]. Вторинна структура макромолекул альбумінів складається з альфа-спіралей і бета-складок, стабілізованих водневими зв'язками, а також невпорядкованої частини макромолекулярного ланцюга. Третинна структура макромолекул альбумінів представлена доменною будовою макромолекули, а гідрофобні взаємодії між доменами визначають глобулярну структуру білка [1–3]. Сироваткові альбуміни відпо-

© Л.А. БУЛАВІН, О.В. ХОРОЛЬСЬКИЙ, 2020

[1] Стаття присвячена 75-річному ювілею академіка Л.А. Булавіна

відають за осмотичний тиск крові та забезпечують транспорт гормонів, жирних кислот, метаболітів, токсинів, лікарських речовин, катіонів металів (Na^+, K^+, Ca^+) тощо [1, 2]. Завдяки доступності вихідного матеріалу найбільшого використання для потреб медицини, фармакології, молекулярної біології та біохімії набули сироватковий альбумін людини (далі – альбумін-I) та бичачий сироватковий альбумін (альбумін-II) [2–5].

На структуру макромолекул альбумінів у розчині суттєво впливають температура, концентрація, кислотно-лужний баланс, присутність іонів солей і денатурантів. Одним із чутливих індикаторів внутрішніх структурних перетворень макромолекули у розчині є її гідродинамічний радіус. Застосування сучасної коміркової моделі [6–8] дозволяє отримати концентраційні залежності гідродинамічного радіуса макромолекул у залежності від температури, кислотно-лужного балансу водного розчину та його йонного складу.

Метою роботи є дослідження концентраційної залежності ефективного радіуса макромолекул овечого сироваткового альбуміну (далі – альбумін-III) у водних розчинах за різних температур, що покликане встановити особливості перебудови внутрішньої структури макромолекул у водних розчинах у процесі кластероутворення.

2. Експериментальні дані

Експериментальні дані взято з роботи [9], де методом капілярної віскозиметрії досліджена зсувна в'язкість водних розчинів овечого сироваткового альбуміну в інтервалі концентрацій (3,65–39,3) мас.% та температур (278–318) K при сталому значенні pH = 7,05. У роботі [9] використано не знежирений кристалічний овечий сироватковий альбумін (Sigma Chemical Company), який розчиняли у дистильованій воді, тобто розчини не містили йонів солей.

3. Теоретична частина

Сучасний етап моделювання зсувної в'язкості розчинів макромолекул пов'язаний із використанням коміркового підходу [6–8]. При цьому враховується, що збурення гідродинамічних потоків макромолекулами локалізуються переважно всередині сферичної комірки, яка оточує макромолекулу. Вважається, що на межі комірки нормальна складова швидкості збурення і тангенціальна напруга дорівнюють нулю, що означає відсутність тертя на зовнішній поверхні комірки [6–8]. Для використання коміркового підходу слід перейти від масової концентрації розчину C до об'ємної концентрації φ макромолекул, які пов'язані між собою співвідношенням:

$$\varphi = \frac{4\pi\rho C N_{\rm A} R^3}{3M}, \tag{1}$$

де R – радіус макромолекули, ρ – густина розчину, $N_{\rm A}$ – стала Авогадро, M – молекулярна маса макромолекули.

Ефективні радіуси макромолекул альбуміну із даних зсувної в'язкості розчинів у діапазоні об'ємних концентрацій $\varphi \leqslant 0,2$ розраховано із використанням формули Бетчелора [10]:

$$\bar{\eta} = \eta_0(1 + 2{,}5\varphi + 5{,}2\varphi^2 + ...), \tag{2}$$

де η_0 – в'язкість розчинника, $\bar{\eta}$ – середня в'язкість розчину. Формула Бетчелора дозволяє отримувати радіуси близьких до сферичних макромолекул, які добре корелюють з результатами інших фізичних методів дослідження радіусів макромолекул до об'ємних концентрацій $\varphi \leqslant 0{,}2$. Детальний аналіз і методику використання алгоритму за формулою Бетчелора для визначення розмірів макромолекул у розбавлених розчинах можна знайти у роботах [11, 12].

У роботах [6–8] для розрахунку ефективних радіусів макромолекул із даних зсувної в'язкості розчинів у діапазоні об'ємних концентрацій $0{,}2 \leqslant \varphi \leqslant 0{,}5$ теоретично обґрунтоване співвідношення:

$$\bar{\eta} = \eta_0 \frac{\psi(1-\psi)}{\psi(1-\psi) + 1 - \sqrt{1 + 2\psi^2(1-\psi)}}, \tag{3}$$

де η_0 – в'язкість розчинника, $\bar{\eta}$ – середня в'язкість розчину, $\psi = (R/R_0)^3$, R – радіус макромолекули, R_0 – радіус комірки. Таким чином, задача визначення середньої в'язкості розчину макромолекул зводиться до встановлення взаємозв'язку параметра коміркової моделі $\psi = (R/R_0)^3$ з величиною питомого об'єму $\varphi = V/V_0$, яка вимірюється експериментально і має сенс об'ємної концентрації макромолекул у розчині. V – сумарний об'єм, який займають макромолекули, V_0 – об'єм системи.

Формула (3) отримана із використанням коміркового підходу, що враховує обертальні ступені

свободи частинки і дозволяє описати поведінку в'язкості розбавлених розчинів макромолекул в інтервалі значень об'ємної концентрації частинок $\varphi \leqslant 0{,}5$, що фактично співпадає з густиною розчину, яка відповідає контакту всіх макромолекул [6–8, 11, 12]. Методика застосування алгоритму розрахунку за формулою (3) докладно описана в роботах [11, 12].

4. Обговорення результатів

Просторова структура альбумінів чутлива до зміни кислотно-лужного балансу, а третинна структура його макромолекули суттєво змінюється зі зміною pH розчину. Відзначимо, що фізіологічне значення кислотно-лужного балансу крові овець має середнє значення pH = 7,40 [13, 14]. При вказаному pH макромолекула альбуміну-III згорнута у компактну конформацію "серцеподібного медальйону" [15, 16]. В експерименті [9] кислотно-лужний баланс розчинів pH = 7,05 знаходиться у околі фізіологічних значень pH, тому з певними застереженнями можна моделювати макромолекулу альбуміну-III сферою. Ця обставина дає нам підстави застосувати формулу (3) для розрахунку ефективних радіусів частинок, які беруть участь у в'язкій течії. Таким чином, при обробці експериментальних даних [9] формула (3) була нами застосована у інтервалі концентрацій (3,65–25,8) мас.%, що відповідає інтервалу об'ємних концентрацій макромолекул альбуміну-III $\varphi = (0{,}12–0{,}48)$.

Аналіз отриманих концентраційних залежностей ефективного радіуса макромолекул альбуміну-III в усьому температурному інтервалі дозволяє виділити дві області концентрацій, яким властива подібна поведінка ефективного радіуса. В інтервалі концентрацій (3,65–11,2) мас.% ($\varphi = (0{,}12–0{,}30)$) ефективні радіуси альбуміну-III немонотонно зменшуються зі збільшенням концентрації та температури, причому максимальне значення ефективного радіуса 45,50 Å досягається тоді, коли $\varphi = 0{,}13$ і $T = 283$ K. У концентраційному інтервалі (15,8–25,8) мас.% ($\varphi = (0{,}39–0{,}49)$) спостерігаються майже лінійні залежності ефективного радіуса альбуміну-III, при цьому вплив температури на величину ефективного радіуса альбуміну-III менший, ніж у попередньому інтервалі концентрацій (див. рис. 1).

На жаль, відсутність експериментальних даних для концентрацій, менших від 3,65 мас.%, не дозволяє простежити поведінку ефективних радіусів при концентраціях альбуміну-III, нижчих за $\varphi \leqslant 0{,}12$.

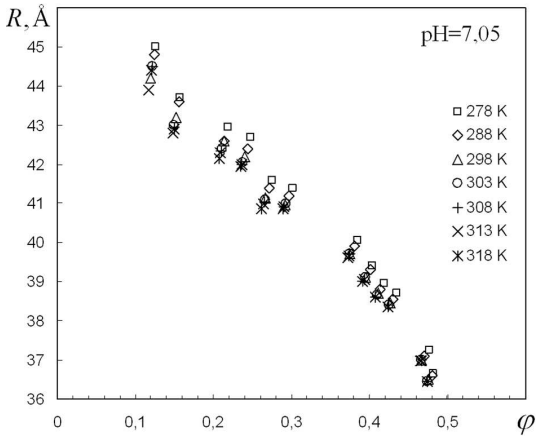

Рис. 1. Концентраційна залежність ефективного радіуса макромолекул альбуміну-III у водному розчині при pH = = 7,05 за різних температур

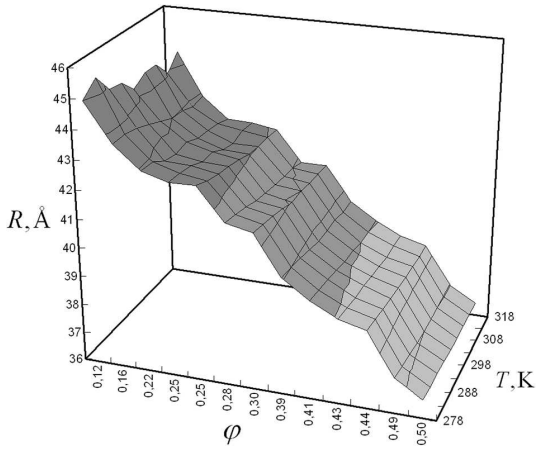

Рис. 2. Поверхня залежності ефективного радіуса макромолекул альбуміну-III у водних розчинах від об'ємної концентрації та температури при pH = 7,05

Внаслідок обробки експериментальних даних за формулою (3), отримано концентраційні та температурні залежності ефективних радіусів макромолекул альбуміну-III у водних розчинах в інтервалі температур (278–318) K при pH = 7,05 (рис. 2).

Проаналізуємо залежності концентрацій альбуміну-III у водних розчинах від температури, за яких радіус макромолекули альбуміну залишатиметься незмінним. Ці лінії є характеристичними кривими, які дають змогу прослідкувати зміни

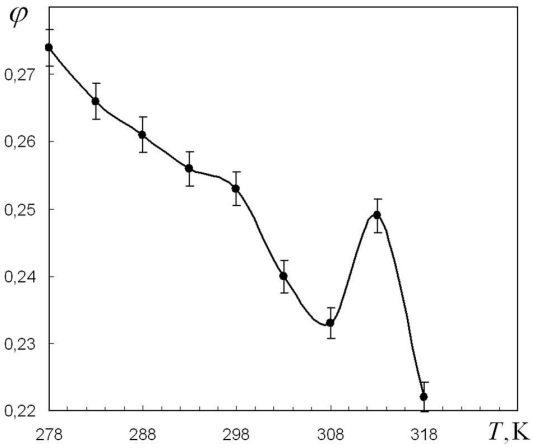

Рис. 3. Залежність об'ємної концентрації водних розчинів альбуміну-III від температури при сталому радіусі його макромолекули

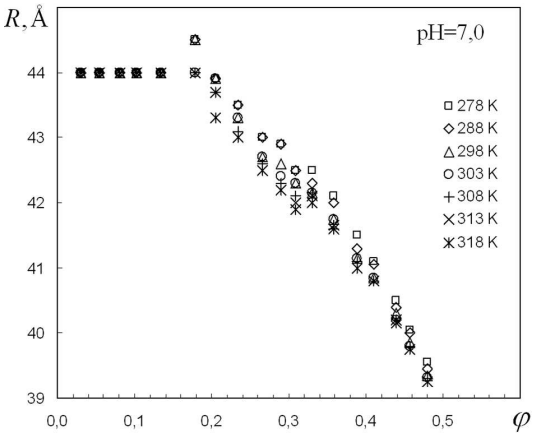

Рис. 4. Концентраційна залежність ефективного радіуса макромолекул альбуміну-I вздовж ізотерм при pH = 7,0 [21]

розміру макромолекули альбуміну, що зумовлені властивостями води. На рис. 3 подано характеристичну криву $\varphi = f(T)\ |_{R=\text{const}}$, яка відповідає $R = (42,15 \pm 0,05)$ Å у концентраційному діапазоні (7,3–9,3) мас.% (φ = (0,22–0,27)). Звернемо увагу, що вказані концентрації дещо вищі за концентрацію перколяційного порога $\varphi \approx 0,23$ (≈7 мас.% для альбуміну-III), при якій макромолекули протеїнів у розчині утворюватимуть нескінченні перколяційні кластери [16]. Ця крива має локальний мінімум при температурі $T_{\min} = (308 \pm 1)$ K ((35 ± 1) °C) та локальний максимум при температурі $T_{\max} = (314 \pm 1)$ K ((41 ± 1) °C). Наявність максимуму кривої $\varphi = f(T)\ |_{R=\text{const}}$ свідчить про те, що температура 42 °C є особливою температурою для водних розчинів альбуміну-III. Це підтверджує гіпотезу, висловлену в роботах [17–19], про існування у водних системах при $T = 42$ °C динамічного фазового переходу, при якому має місце суттєва зміна характеру теплового руху молекул води та перерозподіл водневих зв'язків.

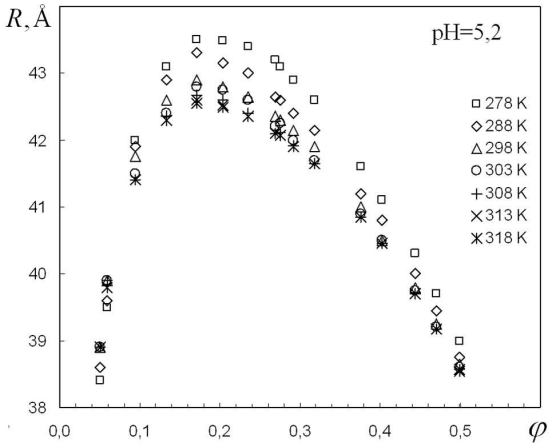

Рис. 5. Концентраційна залежність ефективного радіуса макромолекул альбуміну-II вздовж ізотерм при pH = = 5,2 [22]

У періодичній літературі можна знайти поодинокі публікації, присвячені властивостям макромолекул альбуміну-III у водних розчинах. Так, у роботі [15] методом динамічного розсіяння світла у водних розчинах альбуміну-III з концентрацією 0,9 мас.% (φ = 0,03) за температури T = 298 K і pH = 7,4 отримано значення гідродинамічного радіуса R_H = 36,0 Å. За допомогою цього ж методу за тих самих умов (T = 298 K і pH = 7,4) у роботі [20] для водних розчинів альбуміну-III з концентрацією 0,1 мас.% ($\varphi = 3,5 \cdot 10^{-3}$) отримано значення гідродинамічного радіуса R_H = 38,0 Å. Звернемо увагу, що вказані гідродинамічні радіуси отримано із коефіцієнтів самодифузії макромолекул альбуміну-III у розбавлених водних розчинах із використанням рівняння Стокса–Ейнштейна.

Порівняємо отримані результати для альбуміну-III з раніше дослідженими нами концентраційно-температурними залежностями ефективних радіусів макромолекул альбуміну-I [21] та альбуміну-II [22].

Побудована поверхня ефективних радіусів макромолекул альбуміну-I як функція температури в інтервалі (278–318) K та концентрації в інтервалі (0,82–18,2) мас.% (φ = (0,03–0,48)) для зна-

чення pH = 7,0. Виділено три області концентрацій, де поведінка ефективного радіуса альбуміну-I відрізняється: 1) (0,82–3,65) мас.% (φ = (0,03–0,14)) ефективні радіуси альбуміну-I залишаються незмінними; 2) (4,67–9,45) мас.% (φ = (0,18–0,31)) ефективні радіуси альбуміну у водному розчині немонотонно зменшуються; 3) при концентраціях ≥10,2 мас.% ($\varphi \geq 0{,}33$) ефективні радіуси макромолекул альбуміну-I з ростом концентрації зменшуються майже лінійно, причому кут нахилу спадних залежностей слабко залежить від температури [21] (рис. 4).

Із експериментальних даних зсувної в'язкості розчинів альбуміну-II побудована поверхня ефективних радіусів макромолекул альбуміну-II у концентраційному інтервалі (2,0–20,0) мас.% (φ = =(0,05–0,49)) та інтервалі температур (278–318) K при сталому значенні pH = 5,2, що відповідає околу ізоелектричної точки альбуміну-II. Показано, що до концентрацій ∼5 мас.% ($\varphi \approx 0{,}17$) відбувається стрімке зростання ефективних радіусів макромолекул альбуміну-II. При концентрації 5 мас.% ($\varphi = 0{,}17$) спостерігаються максимуми ефективних радіусів макромолекул альбуміну-II, положення яких виявляється майже незалежним від температури. Концентраційний максимум залежності ефективного радіуса макромолекул альбуміну-II відповідає ізольованим макромолекулам, оскільки концентрація, при якій макромолекули протеїнів у розчині будуть утворювати нескінченні перколяційні кластери, дорівнює ≈7 мас.% ($\varphi \approx 0{,}23$) [16]. Відбувається зменшення ефективного радіуса макромолекул альбуміну-II у інтервалі концентрацій (5,0–20,0) мас.% (φ = (0,17–0,49)), причому при концентраціях, більших за 10 мас.% ($\varphi > 0{,}32$) спадна залежність носить майже лінійний характер [22] (рис. 5).

Спостерігається часткова подібність концентраційних залежностей ефективних радіусів макромолекул альбуміну-III і макромолекул альбуміну-I при φ(III) ≥ 0,12 і φ(I) ≥ 0,18. Схожою є поведінка ефективних радіусів макромолекул альбуміну-III і альбуміну-I у областях концентрацій: 1) для φ(III) = (0,12–0,30) і φ(I) = (0,18–0,31) ефективні радіуси макромолекул демонструють немонотонне зменшення з ростом концентрації та температури; 2) для φ(III) =(0,39–0,49) і φ(I) = (0,33–0,48) спостерігаються майже лінійні залежності, які слабо залежать від температури.

На нашу думку, подібність концентраційних залежностей ефективних радіусів макромолекул альбуміну-I і альбуміну-III спостерігаються внаслідок подібності просторових будов макромолекул альбуміну-I, альбуміну-III та за умови однакових pH їх водних розчинів.

5. Висновки

У роботі із залученням сучасної коміркової моделі в'язкості водних розчинів проведена обробка експериментальних даних зсувної в'язкості водних розчинів овечого сироваткового альбуміну, побудована поверхня ефективного радіуса макромолекул овечого сироваткового альбуміну у концентраційному інтервалі (3,65–25,8) мас.% (φ = (0,12–0,48)) та інтервалі температур (278–318) K при сталому значенні pH = 7,05.

Проведене порівняння концентраційних і температурних залежностей ефективного радіуса макромолекул овечого сироваткового альбуміну з раніше отриманими результатами для сироваткового альбуміну людини та бичачого сироваткового альбуміну. Показано, що спостерігається часткова подібність концентраційних і температурних залежностей ефективних радіусів макромолекул овечого сироваткового альбуміну і макромолекул сироваткового альбуміну людини в інтервалах об'ємних концентрацій відповідно (0,12–0,49) і (0,18–0,48), причому кислотно-лужні баланси (pH) водних розчинів вказаних альбумінів однакові в межах інструментальної похибки.

За результатами аналізу концентраційних залежностей ефективних радіусів макромолекул альбумінів зроблені висновки: 1) концентраційні залежності ефективних радіусів структурно схожих альбумінів є подібними, але за умови однакових pH; 2) залежність об'ємної концентрації водних розчинів альбуміну від температури при сталому радіусі макромолекули підтверджує гіпотезу [17–19] про існування у водних розчинах при температурі $T = 42\ ^\circ C$ динамічного фазового переходу, при якому має місце суттєва зміна характеру теплового руху молекул води.

1. T. Peters, Jr. *All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications* (Academic Press, 1996).
2. A. Bujacz, J.A. Talaj, K. Zielinski, A.J. Pietrzyk-Brzezinska, P. Neumann. Crystal structures of serum albumins from domesticated ruminants and their complexes

with 3,5-diiodosalicylic acid. *Acta Crystallogr. D* **73**, 896 (2017).
3. Y. Akdogan, J. Reichenwallner, D. Hinderberger. Evidence for water-tuned structural differences in proteins: an approach emphasizing variations in local hydrophilicity. *PLoS ONE* **7**, e45681 (2012).
4. I. Miller, M. Gemeiner. An electrophoretic study on interactions of albumins of different species with immobilized cibacron blue F3G A. *Electrophoresis* **19**, 2506 (1998).
5. Y. Moriyama, D. Ohta, K. Hachiya, Y. Mitsui, K. Takeda. Fluorescence behavior of tryptophan residues of bovine and human serum albumins in ionic surfactant solutions: a comparative study of the two and one tryptophan(s) of bovine and human albumins. *J. Protein Chem.* **15**, 265 (1996).
6. C. Branca, A. Faraone, T. Lokotosh, S. Magazu, G. Maisano, N.P. Malomuzh, P. Migliardo, V. Villari. Diffusive dynamics: self vs. collective behaviour. *J. Mol. Liq.* **93**, 139 (2001).
7. N.P. Malomuzh, E.V. Orlov. Static shear viscosity of a bimodal suspension. *Ukr. J. Phys.* **50**, 618 (2005).
8. E.V. Orlov. Shear viscosity of dispersions of particles with liquid shells. *Colloid Journal* **72**, 820 (2010).
9. K. Monkos. Determination of some hydrodynamic parameters of ovine serum albumin solutions using viscometric measurements. *J. Biol. Phys.* **31**, 219 (2005).
10. G.K. Batchelor. *An Introduction to Fluid Dynamics* (Cambridge University Press, 2000).
11. O.V. Khorolskyi. The nature of viscosity of polyvinyl alcohol solutions in dimethyl sulfoxide and water. *Ukr. J. Phys.* **62**, 858 (2017).
12. O.V. Khorolskyi. Effective radii of macromolecules in dilute polyvinyl alcohol solutions. *Ukr. J. Phys.* **63**, 144 (2018).
13. H.A. Hussein, A.A. Aamer. Influence of different storage times and temperatures on blood gas and acid-base balance in ovine venous blood. *Open veterinary journal* **3**, 1 (2013).
14. V.I. Petrenko, M.V. Avdeev, L. Almásy, L.A. Bulavin, V.L. Aksenov, L. Rosta, V.M. Garamus. Interaction of mono-carboxylic acids in benzene studied by small-angle neutron scattering. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **337**, 91 (2009).
15. M.A. Dar, Wahiduzzaman, M.A. Haque, A. Islam, M.I. Hassan, F. Ahmad. Characterisation of molten globule-like state of sheep serum albumin at physiological pH. *International Journal of Biological Macromolecules* **89**, 605 (2016).
16. 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. *Ukr. J. Phys.* **65**, 151 (2020).
17. L.A. Bulavin, N.P. Malomuzh. Upper temperature limit for the existence of living matter. *Journal of Molecular Liquids* **124**, 136 (2006).
18. Л.А. Булавин, Н.П. Маломуж. Динамический фазовый переход в воде как важнейший фактор провоцирования денатурации белков в теплокровных организмах. *Физика живого* **18**, 16 (2010).
19. A.I. Fisenko, N.P. Malomuzh. To what extent is water responsible for the maintenance of the life for warm-blooded organisms? *Int. J. Mol. Sci.* **10**, 2383 (2009).
20. J.M. Khan, S.A. Abdulrehman, F.K. Zaidi, S. Gourinath, R.H. Khan. Hydrophobicity alone can not trigger aggregation in protonated mammalian serum albumins. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **16**, 5150 (2014).
21. 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**, 287 (2019).
22. O.V. Khorolskyi, Yu.D. Moskalenko. Calculation of the macromolecular size of bovine serum albumin from the viscosity of its aqueous solutions. *Ukr. J. Phys.* **65**, 41 (2020).

Одержано 16.03.20

L.A. Bulavin, O.V. Khorolskyi

CONCENTRATION DEPENDENCES OF MACROMOLECULAR SIZES IN AQUEOUS SOLUTIONS OF ALBUMINS

S u m m a r y

On the basis of experimental data for the shear viscosity in the aqueous solutions of ovine serum albumin and using the cellular model describing the viscosity in aqueous solutions, the concentration dependences of the effective radius of ovine serum albumin macromolecules in the aqueous solutions within a concentration interval of 3.65–25.8 wt% and a temperature interval of 278–318 K at the constant pH = 7.05 are calculated. The concentration and temperature dependences of the effective radii of ovine, bovine, and human serum albumin macromolecules are compared. It is shown that they are partially similar for the solutions of ovine and human serum albumins within concentration intervals of 0.12–0.49 vol% and 0.18–0.48 vol%, respectively, provided an identical acid-base balance (pH) in those solutions. The following conclusions are drawn: (i) the concentration dependences of the effective radii of structurally similar macromolecules of various albumins are similar, but provided an identical pH, and (ii) the dependence of the volume concentration of aqueous albumin solutions on the temperature at the constant radius of a macromolecule confirms the hypothesis about the existence of a dynamic phase transition in aqueous solutions at a temperature of 42 °C, at which the thermal motion of water molecules significantly changes.