

О.В. ХОРОЛЬСЬКИЙ

Полтавський національний педагогічний університет імені В.Г. Короленка
(Вул. Остроградського, 2, Полтава 36000; e-mail: khorolskiy.alexey@gmail.com)**ЕФЕКТИВНІ РАДІУСИ МАКРОМОЛЕКУЛ
АЛЬБУМІНУ ЛЮДИНИ ІЗ ДАНИХ ПО ЗСУВНІЙ
В'ЯЗКОСТІ ЙОГО ВОДНИХ РОЗЧИНІВ**УДК 532.13, 577.322.3,
577.356

Для обробки експериментальних даних зсувної в'язкості водних розчинів сироваткового альбуміну людини у широкому температурному та концентраційному інтервалах при сталому значенні $pH = 7,0$ використано формулу Маломужа–Орлова, яка дозволяє розрахувати ефективні радіуси макромолекул сироваткового альбуміну людини. Показано, що у температурному інтервалі 278–318 К можна виділити три області концентрації з різною поведінкою ефективного радіуса сироваткового альбуміну людини: 1) до концентрації кросовера ефективні радіуси альбуміну залишаються незмінними; 2) від концентрації кросовера аж до концентрації ~ 10 мас.% ефективні радіуси альбуміну у водному розчині нелінійно зменшуються; 3) при концентраціях 10,2–23,8 мас.% ефективні радіуси макромолекул альбуміну з ростом концентрації лінійно зменшуються. Висунуто припущення, що при вітальних концентраціях сироваткового альбуміну людини провідну роль у динаміці макромолекул відіграють властивості молекул води, які знаходяться у об'ємі. Обговорюється роль води біля поверхонь макромолекул альбуміну, фізичні властивості якої зазнають певних змін.

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

1. Вступ

Альбуміни становлять близько 2/3 загальних білків плазми крові людини. Вони мають найменшу молекулярну масу серед білків плазми крові (69000 Да) і вносять найбільший внесок у колоїдно-осмотичний тиск крові (75–80%) [1, 2]. Концентрація альбумінів у сироватці крові людини становить 35–50 г/л [3]. Альбумін володіє визначними властивостями стосовно води: 1 г альбуміну здатний зв'язати 18 мл води [2]. Альбуміни транспортують жирні кислоти, гормони, білірубін і лікарські речовини [1].

Сироватковий альбумін людини (human serum albumin, HSA) складається з 585 амінокислотних залишків, які об'єднані у один макромолекулярний ланцюг з трьома α -спіральною доменами [4]. У кристалічному стані макромолекула сироваткового альбуміну людини згорнута у компактну конформацію правильної трикутної призми серцеподібної форми зі сторонами ~ 80 Å і висотою ~ 30 Å [5]. Структура макромолекули альбуміну у водно-

му розчині зазнає значних змін внаслідок теплового руху молекул води та конформаційних змін ланок макромолекули.

Слід очікувати, що структура і динаміка макромолекули сироваткового альбуміну людини залежить від концентрації, температури та pH його водних розчинів. Варто зазначити, що pH крові є жорсткою константою організму і коливається у межах 7,36–7,44. Зсуви pH змінюють електрохімічні властивості білків і викликають загальні порушення метаболізму. Перевищення нормального pH на 0,4–0,5 викликають незворотні зміни гомеостазу, які несумісні з життям [1].

Питанню структури сироваткового альбуміну людини у водних розчинах присвячена значна кількість як теоретичних (наприклад, [6, 7]), так і експериментальних робіт (наприклад, [7–11]), проте єдина картина зв'язку структури макромолекули альбуміну із pH, концентрацією, температурою, наявністю домішок у водних розчинах наразі відсутня. Не зрозумілими залишаються і особливості динаміки молекул води біля поверхні макромолекули, зокрема, яка кількість молекул води біля поверхні макромолекули беруть участь у проце-

© О.В. ХОРОЛЬСЬКИЙ, 2019

сі її в'язкої течії. Ці питання потребують подальших системних досліджень, частиною яких є дана робота.

2. Експериментальна частина

Експериментальні дані зсувної в'язкості водних розчинів сироваткового альбуміну людини у температурному інтервалі 278–318 К та інтервалі концентрацій 0,82–36,9 мас.% для сталого значення рН = 7,0 взято з роботи [12]. Вимірювання у роботі [12] проведені за допомогою методу капілярної віскозиметрії, відносна похибка не перевищувала 2%.

3. Теоретична частина

Сучасний етап моделювання зсувної в'язкості розчинів макромолекул пов'язаний з використанням коміркових моделей [13]. У них враховується, що збурення гідродинамічних потоків частинками у розчині локалізуються, головним чином, усередині сферичної комірки, яка оточує частинку. Також вважається, що на межі комірки нормальна складова швидкості збурення і тангенціальна напруження дорівнюють нулю, що означає відсутність тертя на зовнішній поверхні комірки [13]. Зокрема у роботах [13, 14] показано, що в'язкість розведених розчинів макромолекул визначається формулою Маломужа–Орлова:

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

де η_0 – в'язкість розчинника, $\bar{\eta}$ – середня в'язкість розчину, $\psi = (R_0/R)^3$, R_0 – радіус макромолекули, R – радіус комірки. Таким чином, задача визначення середньої в'язкості розчину полімеру зводиться до встановлення взаємозв'язку параметра моделі $\psi = (R_0/R)^3$ з величиною питомого об'єму $\varphi = V_0/V$, яка вимірюється експериментально і має смисл об'ємної концентрації макромолекул у розчині, де V_0 – сумарний об'єм, який займають макромолекули, V – об'єм системи. Формула Маломужа–Орлова дозволяє описати поведінку в'язкості розбавлених розчинів макромолекул в інтервалі значень об'ємної концентрації частинок: $\varphi \leq 0,5$, що фактично збігається з густиною розчину, яка відповідає контакту всіх макромолекул [13, 14].

Для використання формули Маломужа–Орлова необхідно перейти від масової концентрації розчину C до об'ємної концентрації φ макромолекул, які пов'язані між собою співвідношенням:

$$\varphi = \frac{4\pi R^3 \rho C N_A}{3M_w}, \quad (2)$$

де R – радіус макромолекулярного клубка; ρ – густина розчину; N_A – стала Авогадро; M_w – середньомасова молекулярна маса високомолекулярної сполуки.

Для знаходження ефективного радіуса макромолекули ми використовуємо такий алгоритм [15]:

1) ефективний радіус макромолекули визначається за формулою:

$$R_{\text{eff}} = \left(\frac{3M_w}{4\pi\rho C N_A} \varphi_{\text{eff}} \right)^{1/3}, \quad (3)$$

де M_w – середньомасова молекулярна маса високомолекулярної сполуки, ρ і C – густина і масова концентрація розчину; N_A – стала Авогадро.

2) φ_{eff} – ефективна об'ємна концентрація макромолекул у розчині, яка визначається зі співпадіння зсувної в'язкості розчину η_{sol} зі значенням $\eta_{\text{MO}}[\varphi_{\text{eff}}]$, яке надається формулою Маломужа–Орлова:

$$\eta_{\text{sol}} = \eta_{\text{MO}}[\varphi_{\text{eff}}]. \quad (4)$$

Зазначимо, що φ_{eff} відрізняється від величини об'ємної концентрації макромолекул φ , розрахованою за формулою (2).

Використовуючи експериментальні дані та формулу для зсувної в'язкості Маломужа–Орлова, шляхом обробки експериментальних даних за вказаним алгоритмом отримано концентраційні залежності ефективних радіусів макромолекул сироваткового альбуміну людини вздовж ізотерм для водних розчинів.

У теорії розбавлених розчинів високомолекулярних сполук характеристична в'язкість використовується як критерій для оцінки концентраційного режиму розчину:

$$[\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} \left(\frac{\eta - \eta_0}{\eta_0 C} \right), \quad (5)$$

де η – в'язкість розчину високомолекулярної сполуки, η_0 – в'язкість розчинника, C – концентрація розчину у масових частках. Розчин називають

розбавленим, якщо його об'єм, зайнятий макромолекулами, значно менше загального об'єму розчину. Зі зростанням концентрації високомолекулярної сполуки структура розчину змінюється, переходячи від ізольованих макромолекул до агрегатів і міжмолекулярної сітки зачеплень при досягненні критичної концентрації перекриття макромолекул C^* – початку так званої області кросовера. Критичну концентрацію кросовера C^* можна визначити експериментально віскозиметричним методом [16]:

$$[\eta]C^* = 1. \quad (6)$$

Розрахунок концентрації кросовера для водних розчинів сироваткового альбуміну людини у всьому температурному діапазоні дає середнє значення $C^* = 3,7$ мас. %.

4. Обговорення результатів

Аналіз результатів, отриманих із використанням алгоритму Маломужа–Орлова, свідчить про складну температурно-концентраційну залежність ефективних радіусів макромолекул альбуміну, в якій можна умовно виділити три області (рис. 1). До концентрації кросовера включно ($C^* = 3,7$ мас. %), яка розрахована з характеристичної в'язкості за формулами (5) і (6) та визначає перехід від розбавлених розчинів до напіврозбавлених, у всьому температурному інтервалі ефективні радіуси альбуміну залишаються незмінними і дорівнюють 44 Å. Подібна ситуація описана нами раніше в [15] для ефективних радіусів макромолекул полівінілового спирту (ПВС) у розбавлених водних розчинах: спостерігається “плато” ефективних радіусів макромолекул в області відносно низьких температур і концентрацій, за яких ефективні радіуси залишаються незмінними.

При концентраціях 4,65–9,45 мас. % ефективні радіуси альбуміну у водному розчині нелінійно зменшуються до значень ~ 42 Å. У діапазоні концентрацій 10,2–23,8 мас. %, верхня межа якого ($\varphi \approx 0,47$) відповідає межі застосовності формули Маломужа–Орлова, ефективні радіуси макромолекул альбуміну з ростом концентрації лінійно зменшуються, причому кути нахилу спадних залежностей слабко залежать від температури (рис. 2).

Аналіз даних на рис. 2 показує, що ефективний радіус макромолекули альбуміну при концентраціях 0,82–3,65 мас. % і 10,2–23,8 мас. % залишається

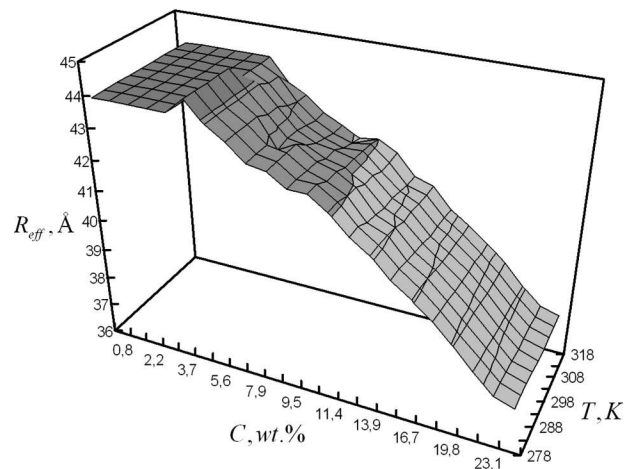


Рис. 1. Температурно-концентраційна залежність ефективних радіусів макромолекул сироваткового альбуміну людини

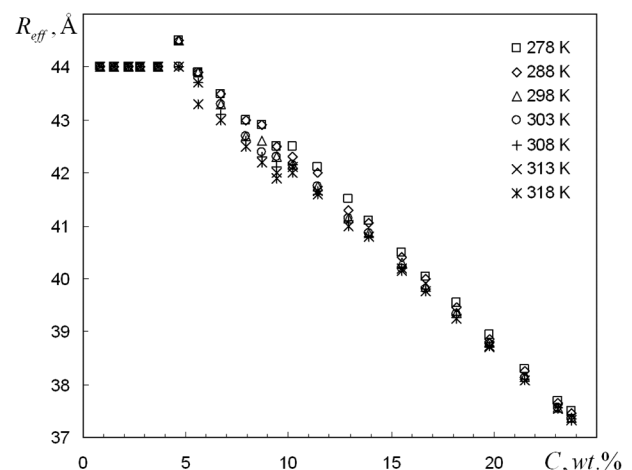


Рис. 2. Концентраційна залежність ефективних радіусів макромолекул сироваткового альбуміну людини вздовж ізотерм

майже незалежним від температури. Найчутливішою до змін температури макромолекула альбуміну стає в діапазоні концентрацій 4,65–9,45 мас. %.

Таким чином, ефективний радіус макромолекули сироваткового альбуміну людини у водному розчині виявляється значно чутливішим до змін концентрації білка, ніж до змін температури розчину. З точки зору біохімії організму людини, відхилення саме концентрації білків плазми крові від норми (гомеостазу) пов'язане із виникненням патологічних станів і захворювань [1–3].

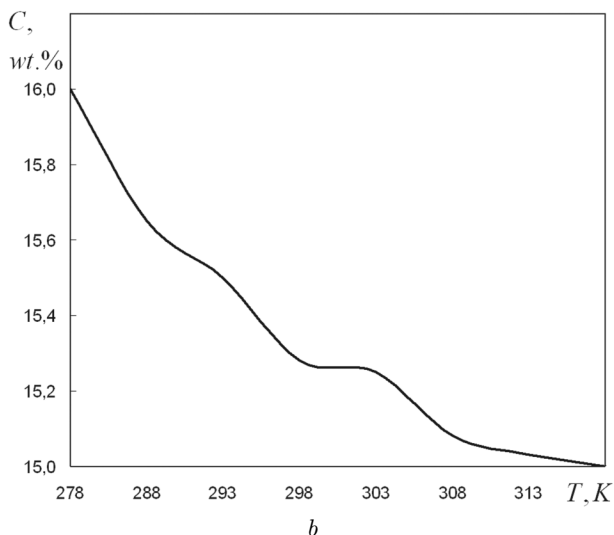
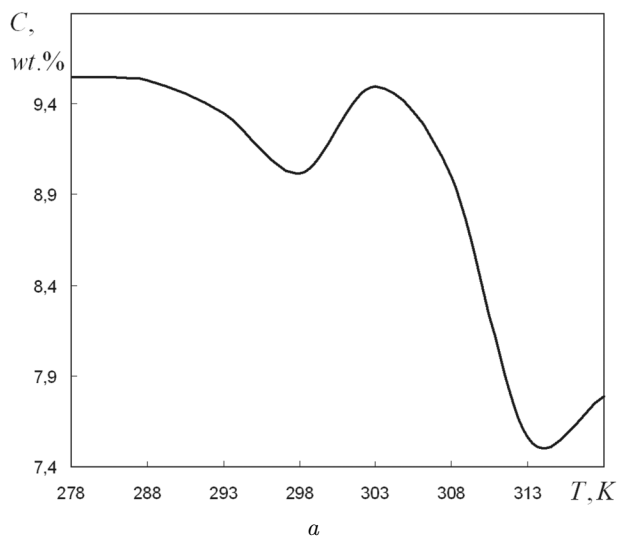


Рис. 3. Залежності концентрації від температури водних розчинів альбуміну при сталому радіусі макромолекулярного клубка ($42,53 \pm 0,05$ Å (a) та $(40,35 \pm 0,05)$ Å (b))

Побудуємо залежності концентрації від температури $C = f(T)|_{R=\text{const}}$, при яких радіус макромолекули альбуміну залишатиметься незмінним (рис. 3). Ці лінії є характеристичними кривими, які дають змогу розрізнити зміни розміру макромолекули альбуміну, зумовлені властивостями води у об’ємі та води біля поверхні макромолекули. Раніше нами показано в [15], що характеристичні криві для водних розчинів ПВС можна апроксимувати двома прямими з різними кутами нахилу, які перетинаються при температурі (315 ± 2) К.

Зроблений висновок про те, що при цій температурі відбувається зміна мікроставностей рідинної системи ПВС–вода, які зумовлені зміною властивостей розчинника – води. Як показано авторами роботи [17], при температурі 317 К (42 °С) у воді відбувається динамічний фазовий перехід, при якому має місце суттєва зміна характеру теплового руху молекул води та перерозподіл водневих зв’язків.

На рис. 3, a подано характеристичну криву $C = f(T)|_{R=\text{const}}$, яка відповідає $R_{\text{eff}} = (42,53 \pm 0,05)$ Å у концентраційному діапазоні 7,0–10,0 мас.%. Ця крива має два локальні мінімуми при температурах $T_{\text{min}1} = (25 \pm 1)$ °С і $T_{\text{min}2} = (41 \pm 1)$ °С та один локальний максимум при температурі $T_{\text{max}} = (30 \pm 1)$ °С. Зазначимо, що температурний інтервал між локальними мінімумами відповідає межах існування живої матерії (більш точно – межах існування теплокровних організмів) [18].

На рис. 3, b подано характеристичну криву $C = f(T)|_{R=\text{const}}$, яка відповідає $R_{\text{eff}} = (40,35 \pm 0,05)$ Å у концентраційному діапазоні 14,5–16,0 мас.%. Як видно, указані екстремуми у цьому концентраційному діапазоні зникають. Спробуємо дати такий поведінці тлумачення.

У концентраційному діапазоні 14,5–16,0 мас.% зростає роль молекул води, які знаходяться біля поверхні макромолекул альбуміну [19]. При цьому спостерігається зникнення екстремумів на характеристичній кривій. Можна припустити, що це свідчить про зміну фізичних властивостей води біля поверхні макромолекули альбуміну. Певним свідченням на користь такого припущення є експериментальні дослідження водних розчинів біополімерів за допомогою методу ЯМР, у яких показано, що у заморожених до температури -35 °С водних розчинах біополімерних макромолекул реєструється сигнал від “незамерзлої” води, кількість якої пропорційна концентрації макромолекул [20, 21]. Зроблено висновок про те, що 1) “незамерзла” вода знаходиться у безпосередньому контакті з макромолекулою біополімеру, і 2) вона є менш рухливою, ніж в об’ємній фракції води [21]. Енергія взаємодії молекули води з поверхнею макромолекули білка оцінюється як енергія розриву приблизно одного водневого зв’язку [21]. Але кожна молекула води здатна формувати 4 водневі зв’язки з сусідніми молекулами, і в об’ємі вона пов’язана

з сусідніми молекулами приблизно трьома водневими зв'язками [22, 23]. Тому говорити про радикальні зміни властивостей води біля поверхні макромолекули альбуміну, на нашу думку, є некоректним. Просто, мова повинна йти про певну модифікацію властивостей води. Цьому питанню ми сподіваємось присвятити окрему статтю.

5. Висновки

Для обробки експериментальних даних із температурних і концентраційних залежностей в'язкості водних розчинів сироваткового альбуміну людини використано формулу Маломужа–Орлова, яка дозволяє моделювати зсувну в'язкість розчинів макромолекулярних клубків аж до об'ємних концентрацій $\varphi = 0,45$ та розрахувати ефективні радіуси макромолекул.

Побудована поверхня ефективних радіусів макромолекул сироваткового альбуміну людини як функція температури в інтервалі 278–318 К та концентрації в діапазоні 0,82–23,8 мас.% для сталого значення рН = 7,0.

Показано, що у всьому температурному інтервалі можна виділити три області концентрацій, де поведінка ефективного радіуса сироваткового альбуміну людини змінюється: 1) при концентраціях 0,82–3,65 мас.% ефективні радіуси сироваткового альбуміну людини залишаються незмінними; 2) при концентраціях 4,67–9,45 мас.% ефективні радіуси альбуміну у водному розчині нелінійно зменшуються; 3) при концентраціях 10,2–23,8 мас.% ефективні радіуси макромолекул альбуміну з ростом концентрації лінійно зменшуються, причому кут нахилу спадних залежностей слабо залежить від температури.

Висунуто припущення, що при вітальних концентраціях сироваткового альбуміну людини провідну роль у динаміці макромолекул відіграють властивості молекул води, які знаходяться у об'ємі. При зростанні концентрації сироваткового альбуміну людини зростає роль води біля поверхонь макромолекул альбуміну, фізичні властивості якої зазнають певних змін.

Автор роботи щирою вдячністю академіку Леоніду Анатолійовичу Булавину за постійну увагу та всебічну підтримку наших досліджень властивостей макромолекул у розчинах. Автор висловлює також глибоку подяку професору

М.П. Маломужу та професору О.П. Руденку за ґрунтовне обговорення отриманих результатів і критичні зауваження при написанні роботи.

1. Л.М. Тарасенко, К.С. Непорада, В.К. Григоренко. *Функціональна біохімія: підручник для студ. стомат. фак. вищих мед. навч. закладів* (Полтава, 2000).
2. Л.О. Ковалкіна, Г.І. Мороз. Альбумін – препарат поліфункціональної дії. *Український журнал екстремальної медицини імені Г.О. Можсаєва* **11**, 18 (2010).
3. Ю.В. Хмелевский, О.К. Усаєнко. *Основные биохимические константы человека в норме и при патологии* (Здоров'я, 1987).
4. T. Peters, Jr. *All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications* (Academic Press, 1996).
5. X.M. He, D.C. Carter. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature* **3582**, No. 6383, 209 (1992).
6. B. Sjöberg, K. Mortensen. Interparticle interactions and structure in nonideal solutions of human serum albumin studied by small-angle neutron scattering and Monte Carlo simulation. *Biophys. Chemist.* **52**, 131 (1994).
7. M.L. Ferrer, R. Duchowicz, B. Carrasco, J.G. de la Torre, A.U. Acuña. The conformation of serum albumin in solution: A combined phosphorescence depolarization-hydrodynamic modeling study. *Biophys. J.* **80**, 2422 (2001).
8. P.C. Sontum, C. Christiansen. Photon correlation spectroscopy applied to characterization of denaturation and thermal stability of human albumin. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **16**, 295 (1997).
9. A. Amoresano, A. Andolfo, R.A. Siciliano, R. Cozzolino, L. Minchiotti, M. Galliano, P. Pucci. Analysis of human serum albumin variants by mass spectrometric procedures. *Biochim. Biophys. Acta* **1384**, 79 (1998).
10. D. Pouliquen, Y. Gallois. Physicochemical properties of structured water in human albumin and gammaglobulin solutions. *Biochimie* **83**, 891 (2001).
11. J.K.A. Kamal, D.V. Behere. Spectroscopic studies on human serum albumin and methemalbumin: Optical, steady-state, and picosecond time-resolved fluorescence studies, and kinetics of substrate oxidation by methemalbumin. *J. Biol. Inorg. Chem.* **7**, 273 (2002).
12. K. Monkos. On the hydrodynamics and temperature dependence of the solution conformation of human serum albumin from viscometry approach. *Biochim. Biophys. Acta* **1700**, 27 (2004).
13. N.P. Malomuzh, E.V. Orlov. Static shear viscosity of a bimodal suspension. *Ukr. J. Phys.* **50**, 618 (2005).
14. E.V. Orlov. Shear viscosity of dispersions of particles with liquid shells. *Colloid J.* **72**, 820 (2010).
15. O.V. Khorolskyi. Effective radii of macromolecules in dilute polyvinyl alcohol solutions. *Ukr. J. Phys.* **63**, 144 (2018).
16. O.V. Хорольський. Дослідження концентраційних режимів розчинів полівінілового спирту вискозиметричним методом. *УФЖ* **60**, 882 (2015).

17. Л.А. Булавин, Н.П. Маломуж. Динамический фазовый переход в воде как важнейший фактор провоцирования денатурации белков в теплокровных организмах. *Физи́ка живого* **18**, 16 (2010).
18. 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).
19. Ю.И. Хургин. Гидратация глобулярных белков. *Журнал Всесоюзного химического общества им. Д.И. Менделеева* **21**, 684 (1976).
20. А.Б. Курзаев, В.И. Квливидзе, В.Ф. Киселев. Специфика фазового перехода воды на поверхности биологических и неорганических дисперсных тел при низких температурах. *Связанная вода в дисперсных системах* **4**, 156 (1977).
21. В.Я. Волков, Б.В. Сахаров, Л.А. Волкова. Радиоспектроскопические методы в криобиологии. *Криобиология* **4**, 3 (1985).
22. Т.В. Локотош, Н.П. Маломуж, В.Л. Захарченко. Связь структуры воды с аномалиями ее плотности и диэлектрической проницаемости. *Журнал структурной химии* **44**, 1085 (2003).
23. L.A. Bulavin, N.P. Malomuzh, K.N. Pankratov. Self-diffusion in water. *J. Struct. Chem.* **47**, Suppl. 1, S50 (2006).

Одержано 19.02.19

O. V. Khorolskyi

CALCULATION OF THE EFFECTIVE
MACROMOLECULAR RADII OF HUMAN SERUM
ALBUMIN FROM THE SHEAR VISCOSITY
DATA FOR ITS AQUEOUS SOLUTIONS

S u m m a r y

The Malomuzh–Orlov theory is used to analyze the experimental shear viscosity data obtained for aqueous solutions of human serum albumin (HSA) at pH = 7.0 in wide temperature and concentration intervals, which allowed the effective radii of HSA macromolecules to be calculated. It is shown that three intervals of the effective molecular radius of HSA with different behaviors can be distinguished in a temperature interval of 278–318 K: 1) below the crossover concentration, the effective molecular radius of HSA remains constant; 2) in the interval from the crossover concentration to about 10 wt%, the effective molecular radius of HSA in the aqueous solution nonlinearly decreases; and 3) at concentrations of 10.2–23.8 wt%, the effective radius of HSA macromolecules linearly decreases, as the concentration grows. The assumption is made that the properties of water molecules in the solution bulk play a crucial role in the dynamics of HSA macromolecules at the vital concentrations of HSA in the solutions. The role of water near the surface of HSA macromolecules and the corresponding changes of its physical properties have been discussed.