

УДК 53.082.55; 535.36; 539.22

**Фудулей Н.О.<sup>1</sup>, Хорольський О.В.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>*Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, вул. Дворянська 2, Одеса, 65082; e-mail: [nata.fudulei@gmail.com](mailto:nata.fudulei@gmail.com)*

<sup>2</sup>*Полтавський національний педагогічний університет імені В.Г. Короленка, вул. Остроградського, 2, Полтава 36003; e-mail: [khorolskiy.alexey@gmail.com](mailto:khorolskiy.alexey@gmail.com)*

### **Особливості статичного розсіяння світла водними розчинами сироваткового альбуміну людини**

*У роботі наведено результати дослідження молекулярного розсіяння світла водними розчинами сироваткового альбуміну людини. Методами статичного розсіяння світла отримано, що концентраційна залежність інтенсивності молекулярного розсіяння відрізняється від подібних залежностей для розчинів полімерів типу поліетиленгліколю або полівінілового спирту. На відміну від них концентраційні залежності інтенсивності МРС мають пік розсіяння за концентрації 6%, який може розглядатися як аномальне розсіяння подібне до розсіяння світла у водних розчинах деяких речовин, частіше – спиртів. Отримане у роботі положення піку розсіяння світла співпадає з характерною точкою водних розчинів альбумінів різного походження, яка визначається концентрацією білкового компонента у плазмі крові ссавців. Детальний аналіз отриманих результатів потребує нових досліджень по температурним залежностям піків інтенсивності МРС та результатів лазерної кореляційної спектроскопії інтенсивності розсіяного світла.*

**Ключові слова:** молекулярне розсіяння світла, коефіцієнт розсіяння, водні розчини, альбумін, астрономічні камери.

**Вступ.** Молекулярне розсіяння світла (МРС) є одним із надпотужних оптичних методів дослідження конденсованого стану речовини [1-5]. У одній з перших монографій присвячених МРС [5] сказано – «кожне фізичне явище, що веде до розсіяння світла, залишає на ньому “відбиток”, змінюючи інтенсивність, поляризацію, спектральний склад». Наприклад, всього за допомогою визначення залежностей коефіцієнту розсіяння світла можна визначити термодинамічні властивості та структуру розчинів та дисперсних систем.

Коефіцієнт розсіяння світла (коефіцієнт Релея) визначається як відношення інтенсивності випромінювання, що проходить через досліджувану речовину  $I_0$  до інтенсивності розсіяного випромінювання  $I$ , а з врахуванням геометрії дослі-

ду його представляють як: 
$$R = \frac{Ir^2}{I_0V}$$
. Тут  $V$  – об’єм розсіяння, а  $r$  – відстань між

об’ємом розсіяння та детектором випромінювання.

При дослідженні коефіцієнта розсіяння розбавлених водно-спиртових розчинів [2] було показане існування особливих точок, в околі яких спостерігалось збільшення інтенсивності МРС, яке за своїми характеристиками є аномальним. Подібна поведінка МРС є характерною і для водних розчинів КСІ [3], хоча його величина значно менша. Таке розсіяння стали вважати аномальним, тому що звичайне МРС у розчинах відбувається лише на флуктуаціях концентрації та

густини [1, 5], йому не властиво положення в вузькій області малих концентрацій та зростання з зменшенням температури. У роботах останнього десятиріччя було показано, що таке розсіяння пов'язане з утворенням мікронеоднорідної структури у розчинах і може розглядатися як структурний фазовий перехід.

Окрема проблема останнього часу – дослідження розчинів біологічного походження. Завдяки доступності вихідного матеріалу найбільшого використання для потреб медицини, фармакології, молекулярної біології та біохімії набули протеїнові макромолекули альбумінів – сироваткового альбуміну людини, бичачого сироваткового альбуміну, овальбуміну тощо [6, 7]. Просторова структура і конформація біомакромолекул у фізіологічних рідинах значним чином визначає їх функціональні властивості у живому організмі.

Сироваткові альбуміни становлять близько 2/3 загальних білків плазми крові, їхня концентрація у сироватці крові – 35-50 г/л [7, 8]. Сироватковий альбумін має найменшу молекулярну масу серед білків плазми крові – близько 67 кДа, проте вносить найбільший вклад у 75-80% в осмотичний тиск крові [9, 10]. Альбумін є головним протеїном, який відповідає за транспортну, регуляторну та накопичувальну функції крові. Сироваткові альбуміни забезпечують транспорт гормонів, жирних кислот, метаболітів, токсинів, лікарських речовин, катіонів металів ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^+$ ) тощо [6, 7].

Сироватковий альбумін людини (САЛ) – це глобулярний протеїн, який складається з 585 амінокислотних залишків, об'єднаних у один макромолекулярний ланцюг довжиною 350 Å з достатньо складною просторовою структурою [7]. Вторинна структура макромолекул альбуміну складається з альфа-спіралей і бета-складок, стабілізованих водневими зв'язками, а також невпорядкованої частини макромолекулярного ланцюга. Завдяки 17 дисульфідним зв'язкам між цистеїновими залишками альфа-спіралей утворюється доменна будова макромолекул альбуміну, яка визначає третинну структуру макромолекул, а гідрофобні взаємодії між доменами визначають глобулярну структуру білка [6, 7].

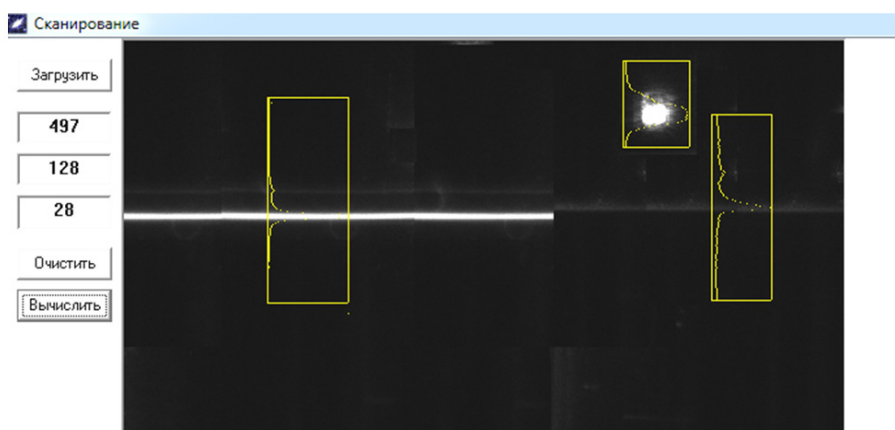
У кристалічному стані макромолекула сироваткового альбуміну людини згорнута у компактну конформацію правильної трикутної призми серцеподібною форми зі сторонами 80 Å і висотою 30 Å [11]. Сироватковий альбумін добре розчиняється у водних розчинах і має визначні властивості стосовно води: 1 г альбуміну здатний зв'язати 18 мл води [10]. Структура макромолекули альбуміну у водному розчині зазнає значних змін внаслідок теплового руху молекул води та конформаційних змін частин ланцюга макромолекули.

Відомо, що структура і динаміка макромолекули сироваткового альбуміну людини залежить від концентрації, температури, рН його водних розчинів, присутності солей і денатурантів. Проте, єдина картина зв'язку структури макромолекули альбуміну з фізичними властивостями рідинного середовища наразі відсутня. Зазначена проблематика потребує подальших системних досліджень, частиною яких є дана робота.

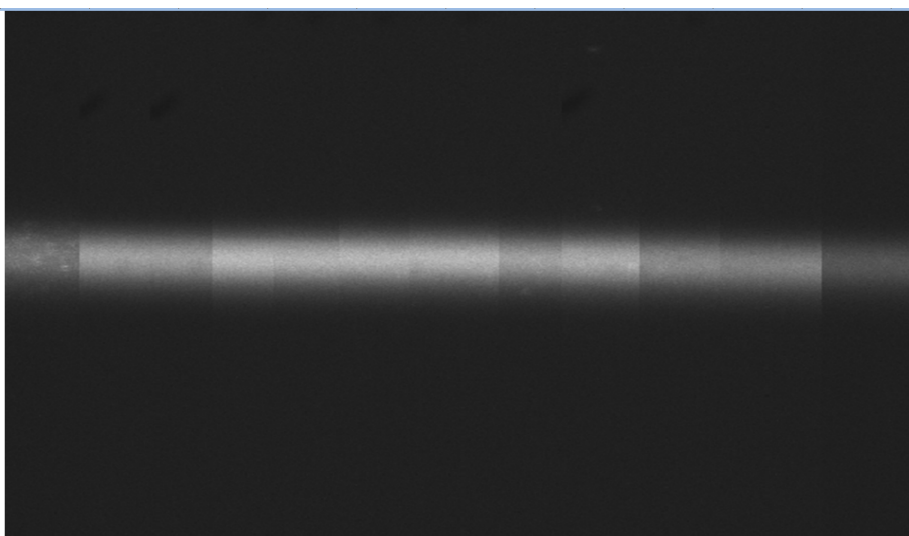
Метою даної роботи є отримання залежності інтенсивності статичного інтегрального розсіяння світла від концентрації розчинів. Об'єктом дослідження

є сироватковий альбумін людини. Відомо, що розсіяння білковими розчинами є більш інтенсивним, ніж для чистих рідин і більшості молекулярних розчинів. Для порівняння, величина коефіцієнта розсіяння води складає  $2 \cdot 10^{-6} \text{ см}^{-1}$ , водних розчинів KCl порядку  $10^{-7} \text{ см}^{-1}$  [2], а для білку в водному розчині  $R = 2 \cdot 10^{-4} \text{ см}^{-1}$  (за концентрації  $c = 10^{-3} \text{ г/мл}$  та  $M = 5 \cdot 10^5 \text{ Да}$ ) [5].

**1. Матеріали та метод дослідження.** Для приготування розчинів використовувалися: фармакологічний розчин сироваткового альбуміну людини 20% та вода для ін'єкцій. Вихідні данні для базового розчину альбуміну: розчин двокомпонентний та розчинник – вода, концентрація діючого компонента задава-



**Рис. 1.** Загальний вигляд програмної оболонки Light для визначення інтенсивності розсіяння світла. Ліворуч – розсіяння лазерного випромінювання 532нм у бензолі, праворуч – розсіяння у воді. Нагорі – зображення опорного випромінювання, яке подається у поле зору камери.



**Рис.2.** Залежність інтенсивності розсіяного світла водними розчинами сироваткового альбуміну людини від концентрації білкового компоненту у розчині. Представлена комбінована «перетяжка променя» побудована відрізками зображень отриманих камерою ZWOASI 120MM (Рис.1) при проходженні лазерного випромінювання 532нм через розчини різних концентрацій, зліва – направо 20%, 15%, далі - від 10% до 1% з кроком в один відсоток.

лась з відотною точністю 0.01. Концентрація розчинів визначалась за об'ємом компонент. При приготуванні експериментальних зразків використовувалась автоматична піпетка-дозатор змінного об'єму 1÷500 мкл. Точність роботи дозатора контролювалась аналітичними терезами з абсолютною похибкою 0.2 мг й при максимальній дозі 500 мкл становила 0,2% відносної похибки.

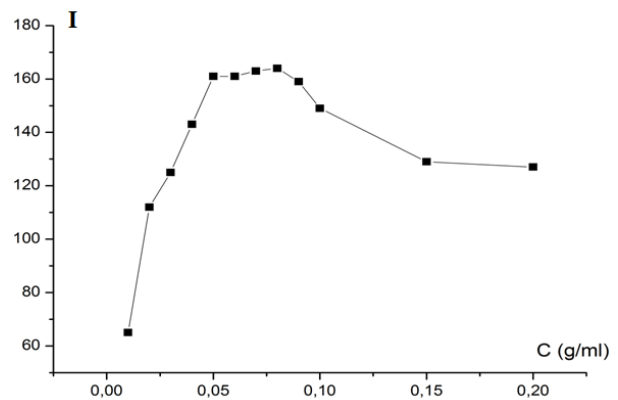
Для дослідження МРС використовували: напівпровідниковий лазер з довжиною хвилі 532нм, систему коліматорів та фотоприймач, астрономічну камеру ZWOASI120MM спряжену USB-кабелем з робочим комп'ютером дослідника. Методику застосування астрономічних камер у експериментах з молекулярної оптики описано у [12]. Лазерний промінь проходячи через систему коліматорів, потрапляв на кювету з досліджуваним розчином, надалі, проходячи через зразок він фіксувався фотоприймачем. Астрономічна камера ZWOASI 120MM здатна фіксувати дуже слабкі світлові потоки, що використовується при фіксації метеорів, тому експериментальні задачі молекулярного розсіяння світла розв'язуються аналогічно та з легкістю. Отримані зображення оброблялися спеціально розробленою програмою Light [12], результатами обробки якої є умовні значення інтенсивності досліджуваних зразків як властивість зафіксованого фото (рис.1).

**2. Результати експериментів.** Під час проходження лазерного променя через водний розчин сироваткового альбуміну людини (рис.2), було добре видно, навіть неозброєним оком, що інтенсивність розсіяного світла для різних концентрацій відрізняється.

Надалі отримані зображення розчинів оброблювалися за допомогою програми Light. Результати розрахованої інтенсивності в залежності від концентрації розчинів представлені на рис.3.

Зразки отримувались розведенням базового розчину 20%. З графіку добре видно, що при концентрації розчину від 0.2 до 0.15 г/мл інтенсивність розсіяння світла збільшувалась, й найбільше її значення (плато максимумів) спостерігалось при концентрації 0.05 - 0.1 г/мл, потім інтенсивність променя зменшується при менших концентраціях від 0.05 до 0.01 г/мл.

**3. Обговорення результатів.** Варто зауважити, що така поведінка розчину (збільшення інтенсивності) при деяких концентраціях, схожа зі зростанням коефіцієнта розсіяння водних розчинів КСІ за концентрацій порядку  $10^{-3} \div 10^{-4}$  мольної частки солі [3]. Для розчинів солі коефіцієнт МРС зростає в максимумі при мольній частці  $x \approx 0.0024$ . Подібний ріст коефіцієнта не є характерним для розсіяння на флуктуаціях концентра-



**Рис.2.** Залежність інтенсивності розсіяного світла від концентрації водного розчину сироваткового альбуміну людини. Інтенсивність наведено в умовних одиницях при обробці цифрового зображення.

ції та густини. Як результат, авторами було зазначено, що подібний аномальний пік розсіяння міг бути обумовлений: наявністю гідратних оболонок іонів, виникненням нестабільності системи (за певних температур та концентрацій) та утворенням макроскопічних структур (кластерів).

Білкові молекули складаються з гідрофобних (знаходяться в середині молекули) та гідрофільних (на поверхні) зв'язків. Відомо, що альбуміни добре розчиняються в воді, їх негативно заряджені полярні групи знаходяться на поверхні білкової молекули, вони притягують до себе позитивно заряджені диполі молекул води, внаслідок чого навколо протеїну утворюється гідратна оболонка.

Всього існує 3 види молекул води в білковому розчині:

1. Сильно пов'язана вода, молекули є частиною білкової структури;
2. Пов'язана вода, складає гідратну оболонку;
3. Об'ємна (вільна) вода.

В складі пов'язаної води, окремо виділяють перший гідратний шар, властивості якого визначаються властивостями поверхні білку, дипольним моментом та поляризацією; інші шари оболонки, є більш рухомими.

В експериментах по вимірюванню крайового кута з рядом рідин, на шарах гідратованого САЛ [13], було виявлено, що при гідратації сироваткового альбуміну, молекули води жорстко орієнтуються, таким чином, що утворюють перший молекулярний шар, з орієнтацією 98%, а другий – 30%. При цьому молекули води в гідратній оболонці мають ближче направлені атоми  $H$  до білку, й далі від його поверхні атоми  $O$ . Така оболонка перешкоджає утворенню осаду та агрегації білку.

Знаючи молекулярну масу молекули сироваткового альбуміну людини 66.5 кДа [7], та те, що 1 г білку може пов'язати 0.3 г води [14] Можемо розрахувати кількість молекул води, пов'язаних в розчині з однією молекулою альбуміну, за допомогою виразу

$$\frac{N_{\text{мол}}(H_2O)}{N_{\text{мол}}(\text{alb})} = \frac{n_{H_2O}}{n_{\text{alb}}}$$
. Отримаємо, що на 1 молекулу

сироваткового альбуміну людини припадає близько 1108 молекул пов'язаної води (для порівняння на один іон солі  $КСl$  припадає 250-300 молекул води) [3]. Таке значення є доволі великим, але цілком можливим, зважаючи на те, що макромолекула цього білку має велику активну поверхню й може транспортувати різні речовини в організмі (амінокислоти, гормони, іони важких металів і т.д.).

Згідно з даними [15], при дослідженні залежності густини гідратних оболонок від відстані до поверхні білка, для глобулярних білків було виявлено, що їх структурне впорядкування знаходиться на відстані до  $7\text{\AA}$  та може включати 4 гідратних оболонки. Також варто зауважити, що густина першого молекулярного шару має густина майже на 10% більше ніж вільна вода розчину [16].

Наступний фактор, що може впливати на інтенсивність розсіяння – утворення макроскопічних структур або ж кластерів.

В ряді робіт [17, 18] досліджувались розчини САЛ з домішками солей різних металів (мідь, кадмій, свинець, калій та Європій). При наявності в білкових розчинах таких молекул, відбувається їх пов'язування з макромолекулами протеїну. В результаті, поверхневий заряд білків зменшується, що призводить до

диполь-дипольної міжмолекулярної взаємодії [17]. Для неї характерна орієнтаційна впорядкованість макромолекул, енергія визначається наступним виразом:

$E = \frac{p^4}{6\pi \cdot \epsilon kT}$ , де  $p$  – дипольний момент. З формули видно, що при підвищенні температури тепловий рух молекул буде збільшуватись, тим самим дезорієнтуючи їх та понижуючи енергію взаємодії, але при збільшенні дипольного моменту, енергія орієнтаційної взаємодії буде зростати. Величина дипольного моменту для альбуміну сироватки людини складає  $p = 500$  Д при ізоелектричній точці  $pH = 4.8$  [18]. Таке значення моменту є великим, тому вважається, що для комплексу альбуміну та йонів металів буде домінуючою диполь-дипольна взаємодія. Відповідно, при знаходженні на невеликих відстанях подібні комплекси будуть утворювати дипольні кластери.

Описаний вище вид взаємодії, на жаль, не відповідає нашим розчинам (САЛ та вода), тому для них буде діяти кулонівське відштовхування. Енергія зарядженого іона та дипольної молекули води складає:  $E_q = \frac{q^2 p_w^2}{12\pi \epsilon_0^4 kT}$ , де  $q$  – заряд іона,  $p_w$  – дипольний момент молекули води.

Подібне збільшення значень інтенсивності може бути зумовлене наявністю структурних змін в макромолекулах альбуміну. В роботах присвячених дослідженню цієї речовини [19-20] зауважується, що на структурні зміни макромолекул впливають: температура, концентрація та  $pH$  речовини.

Дослідження залежності ефективних радіусів макромолекул від температури, концентрації та водневого показника  $pH$  має визначальне значення для встановлення характеру перебудови внутрішньої структури макромолекул та відтворення процесів олігомеризації в системі.

Із експериментальних даних зсувної в'язкості водних розчинів альбуміну за допомогою коміркового підходу побудовані поверхні ефективних радіусів макромолекул сироваткового альбуміну людини [19] у діапазоні концентрацій (0.82÷23.8) мас.% при  $pH$  7.0 та бичачого сироваткового альбуміну [21] в концентраційному інтервалі (2.0-27.2) мас.% при  $pH$  5.0 в інтервалі температур (278-318) К. У роботі [19] показано, що у всьому температурному інтервалі при  $pH$  7.0 ефективні радіуси сироваткового альбуміну людини до концентрації ~5 мас.% залишаються незмінними, а при концентраціях >5 мас.% ефективні радіуси альбуміну у водному розчині нелінійно зменшуються. У роботі [21] показано, що у всьому температурному інтервалі при  $pH$  5.0 до концентрацій ~5 мас.% відбувається стрімке нелінійне зростання, а для концентрацій >5 мас.% – нелінійне зменшення ефективних радіусів макромолекул бичачого сироваткового альбуміну. При концентрації ~5 мас.% спостерігаються максимуми ефективних радіусів макромолекул бичачого сироваткового альбуміну, положення яких виявляється незалежним від температури, а ефективні радіуси з ростом температури зменшуються несуттєво. Зроблено висновок, що з огляду на схожу просторову структуру макромолекул досліджених альбумінів подібними рисами вказаних залежностей є незалежність від температури ефективних радіусів макромолекул при концентраціях  $\geq 10$  мас.% та практично рівність ма-

ксимальних ефективних радіусів сироваткового альбуміну людини (44 Å) і бичачого сироваткового альбуміну (43.5 Å) у межах похибок моделювання[21].

### **Висновки.**

1. Отриманий пік інтенсивності молекулярного розсіяння світла при досліді по статичному інтегральному розсіянню світла водними розчинами сироваткового альбуміну людини є аналогічним до піків аномального розсіяння світла у деяких водних розчинах типу вода-спирти.

2. Пік молекулярного розсіяння світла отриманий у цій роботі збігається за концентраційним положенням з концентрацією білкового компоненту у нативній плазмі крові ссавців та овоальбуміну.

3. Отримані результати необхідно доповнювати даними динамічного розсіяння світла та концентраційними залежностями таких базових термодинамічних величин як густина, в'язкість та поверхневий натяг.

### **Література:**

1. Вукс М.Ф. Рассеяние света в газах, жидкостях и растворах. – Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1979. – 320 с.
4. Вукс М.Ф., Шурупова Л.В. Рассеяние света и фазовые переходы в водных растворах простых спиртов // Оптика и спектроскопия. – 1976. – Т.40, №1. – С. 154.
5. Чечко В.Є., Гоцувський В.Я. Аномальне (додаткове) розсіяння світла у водних розчинах КСl // Укр. фіз. журн. – 2018. – Т.63, №7. – С. 652-657.
6. V.Y.Chechko, V.Y.Gotsulskiy, N.P.Malomuzh. Peculiar points of aqueous solutions of mono-hydrogen alcohols // J.Mol.Liq. - 2022, 367, 120537
7. Фабелинский И.Л. Молекулярное рассеяние света. – М.: Высшая школа, 1965. – 512 с.
8. Rodwell V.W., Bender D.A., Botham K.M., Kennelly P.J., Weil P.A. Harper's Illustrated Biochemistry. – McGraw Hill, 2018. – 800 p.
9. Peters T. All about Albumin Biochemistry, Genetics and Medical Applications. – Academic Press: San Diego, CA, 1996. – 432 p.
10. Хмельевский Ю.В., Усатенко О.К. Основные биохимические константы человека в норме и при патологии. – К.: Здоров'я, 1987. – 160 с.
11. Тарасенко Л.М., Непорада К.С., Григоренко В.К. Функціональна біохімія: підручник. – Полтава, 2000. – 216 с.
12. Ковалкіна Л.О., Мороз Г.І. Альбумін – препарат поліфункціональної дії // Український журнал екстремальної медицини імені Г.О. Можаєва. – 2010. – Т. 11, № 3. – С. 18-22.
13. He X.M., Carter D.C. Atomic Structure and Chemistry of Human Serum Albumin // Nature. – 1992. – V. 358(6383). – P. 209-215.
14. Фудулей Н.О., Горбаньов Ю.М. Використання астрономічної камери ZWO ASI120MM для дослідження молекулярного розсіяння світла // Фізика аеродисперсних систем. – 2022. – №60. – С.53-62.

15. *Van Oss C. J., & Good R. J.* Orientation of the water molecules of hydration of human serum albumin // Journal of Protein Chemistry. – 1988. – V. 7(2). – P. 179–183.
16. *Jackson M. B.* Molecular and Cellular Biophysics. – New York, 2006. – 524 p.
17. *Рубцова Е.В., Соловей А.Б., Лобышев В.И.* Статистические характеристики гидратных оболочек белков. Компьютерное моделирование // ВМУ. Серия 3. ФИЗИКА. АСТРОНОМИЯ. – 2015. – №5. – С. 33-38.
18. *Svergun D.I., Richard S., Koch M.H.J. et al.* Protein hydration in solution: Experiment observation by x-ray and neutron scattering // Proc.Natl. Acad. Sci. – 1998. – V. 95(5). – P. 2267.
19. *Тихонова Т.Н., Петрова Г.П., Петрусевич Ю. М., Федорова К.В., Кашин В.В.* Образование дипольных нанокластеров в растворах основных белков сыворотки крови, содержащих ионы европия и калия //Биофизика и медицинская физика. – 2011. – №2. – С.82-87.
20. *Петрова Г.П., Петрусевич Ю.М., Тен Д.И.* Образование дипольных комплексов в растворах белков с мало концентрацией ионов тяжелых металлов: диагностика методом лазерного светорассеяния // Квантовая электроника. – 2002. – Т. 32, № 10. – С. 897–901.
21. *Хорольський О.В.* Ефективні радіуси макромолекул альбуміну людини із даних по зсувній в'язкості його водних розчинів // Український фізичний журнал. – 2019. – Т. 64, № 4. – С. 285-290.
22. *Khorolskyi O.V., Malomuzh N.P.* Macromolecular sizes of serum albumins in its aqueous solutions //AIMS Biophysics. – 2020. – Т. 7, №4. – С. 219-235.
23. *Хорольський О.В., Москаленко Ю.Д.* Обчислення розмірів макромолекул бичачого сироваткового альбуміну згідно даних із в'язкості його водних розчинів // Український фізичний журнал. – 2020. – Т. 65, № 1. – С. 40-48.

***N.O. Fuduley, O.V. Khorolskyi.***

**Peculiarities of static light scattering by aqueous solutions of human serum albumin**

**SUMMARY**

*The paper presents the results of the study of molecular light scattering (MLS) by aqueous solutions of human serum albumin. Using static light scattering methods, it was found that the concentration dependence of molecular scattering intensity differs from similar dependences for solutions of polymers such as polyethylene glycol or polyvinyl alcohol. In contrast, the concentration dependences of MLS intensity have a scattering peak at concentrations of 6%, which can be considered as anomalous scattering similar to the scattering of light in aqueous solutions of some substances, more often - alcohols. The position of the light scattering peak obtained in the work coincides with the characteristic point of aqueous solutions of albumins of various origins, which is determined by the concentration of the protein component in the blood plasma of mammals. A detailed analysis of the obtained results requires new studies on the temperature dependence of the MLS intensity peaks and the results of laser correlation spectroscopy of the intensity of scattered light.*

**Key words:** *molecular light scattering, scattering coefficient, aqueous solutions, albumin, astronomical cameras.*