Фізика аеродисперсних систем. – 2024. – № 62. – С.57-61

УДК 53.082.55; 539.22

Фудулей Н.О.[1], Хорольський О.В.[2]
[1]Одеський національний університет імені І.І. Мечникова
E-mail: nata.fudulei@gmail.com
[2]Полтавський національний педагогічний університет імені В.Г. Короленка
E-mail: khorolskiy.alexey@gmail.com

Волюметрия водних розчинів альбумінів в околі особливої точки

У роботі наведено результати дослідження густини та контракції водних розчинів сироваткового альбуміну людини в залежності від концентрації розчину. Показано, що розведення фармакологічних форм максимальних концентрацій 20% дозволяють відокремити окіл особливої точки, концентрація якої співпадає з нативними значеннями протеїнів у плазмі крові. Особливості поведінки густини розчинів добре узгоджуються з даними по показникам pH та заломлення світла.

Ключові слова*: вода, протеїни, альбумін, розчини, густина, контракція.*

Вступ. Структура і властивості білків продовжують залишатися в центрі уваги медиків, хіміків, фізиків та інших дослідників. Особливості зміни структури білків при розчиненні у воді та водних розчинах є одними з провідних питань біофізики та фізики рідин і рідинних систем [1]. У цій статті ми зосередимося на перетвореннях, які відбуваються з макромолекулами сироваткового альбуміну людини у водних розчинах.

Сироватковий альбумін людини (ЛСА, далі – альбумін) складається з 585 амінокислотних залишків, об’єднаних в єдиний макромолекулярний ланцюг з молекулярною масою 66.5 кДа [2]. У кристалічному стані макромолекула альбуміну згорнута в компактну конформацію правильної трикутної призми у формі серця з розмірами ~80 Å та ~30 Å [3]. Доменна структура альбуміну загальноприйнятою. При фізіологічних значеннях pH вторинна структура ЛСА складається з альфа-спіралей (50-68%) і бета-складок (16-18%), стабілізованих водневими зв'язками, а також невпорядкованої частини макромолекулярного ланцюга [2, 3, 4]. За рахунок 17 дисульфідних зв'язків між залишками цистеїну альфа-спіралей формується третинна структура альбуміну: утворюються три домени, кожен з яких утворений субдоменами з трьох альфа-спіралей, а гідрофобні взаємодії між доменами визначають глобулярну структуру білку [2, 3].

При розчиненні у воді, водних і біологічних розчинах повинна порушуватися жорстка конформація макромолекул альбуміну внаслідок взаємодії з водою. Найбільшою мірою це стосується тих особливостей будови альбуміну, які зумовлені кулонівськими силами. При розчиненні відбувається незначний перерозподіл локально заряджених ділянок макромолекули альбуміну, що змінює її гідрофільні та гідрофобні властивості. Це може бути причиною компактизації макромолекул альбуміну, тобто зменшення розміру макромолекули, а переважання гідрофільних взаємодій може сприяти перетворенню компактної доменної структури на квазілінійну [2, 5]. Тому як гідрофобні, так і гідрофільні взає-

DOI: 10.18524/0367-1631.2024.62.320206

модії можуть сприяти руйнуванню доменної структури альбуміну в розчині, яка притаманна кристалічному стану білка.

Розчинення макромолекул альбуміну у воді можна розглядати як внутрішній структурний фазовий перехід. Структурні перетворення макромолекули альбуміну також змінюватимуть структуру водного середовища. Особливості такого фазового переходу може бути досліджена різними фізико-хімічними методами: малокутовим розсіюванням нейтронів [6, 7], малокутовим рентгенівським розсіюванням [8], ЯМР спектроскопією з імпульсним градієнтом магнітного поля [9, 10], атомно-силовою мікроскопією [11], гельпроникною хроматографією [12], динамічним розсіюванням світла [13, 14], капілярною віскозиметрією [15, 16], денсиметрією (волюмометрією) [17,18].

Денсиметрія (волюмометрія) дозволяє досліджувати об’ємні властивості білків та їх низькомолекулярних аналогів для вивчення конформаційних переходів білків, а також взаємодій типу білок-розчинник, білок-ліганд і білок-білок. У роботі [19] виділяють дві основні причини для аномально швидкого зростання густини плазми крові, розбавленої ізотонічним розчином: по-перше, це зміна характеру просторового впорядкування протеїнів (олігомеризація альбуміну), а по-друге, це зміна внутрішньої структури протеїнів внаслідок їх взаємодії між собою за посередництвом водного оточення.

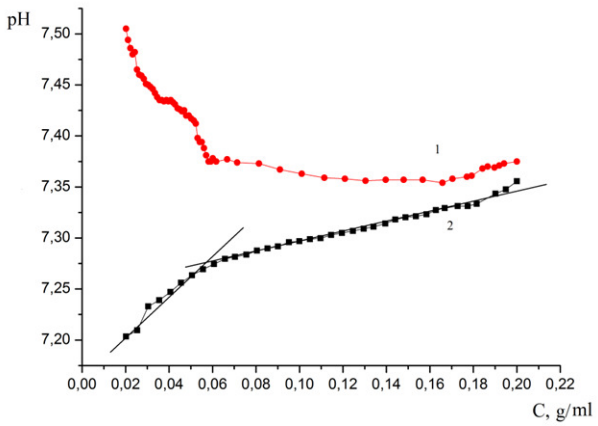

Рис.1. Залежність pH від концентрації для розчину сироваткового альбуміну людини при розбавлені водою (1) та фізіологічним розчином (2)

Вплив значення pH і солей на парціальний молярний об'єм альбуміну при низьких концентраціях білка у водних розчинах при 298,15 K досліджували експериментально за допомогою вимірювань густини у роботі [Jirasek2018]. У діапазоні значень pH від 3,0 до 9,0 вплив pH на парціальний молярний об’єм альбуміну виявився незначним, незважаючи на структурний перехід, який зазнає білок в ізоелектричній точці.

Таким чином, у даній роботі ми зосередилися на використанні волюмометрії для водних розчинів альбуміну для концентрацій від фармакологічної форми 20% до околу особливої точки, якою є концентрація протеїну наближена до нативних значень у плазмі крові.

1. **Особлива точка водних розчинів САЛ.** Нами визначався показник pH для розчинів САЛ отриманих розведенням фармакологічної форми 20% (20 г/мл). Він вимірювався іономером И-160М з комбінованим електродом порівняння, похибка якого становить $\pm 0{,}02$ одиниці pH, темостатуванням з точністю 0,2К при температурі 300К. Розведення проводилось фізіологічним розчином 0,09% NaCl або водою для ін’єкцій. Останній вид розчинів (вода - альбумін) використовувався при проведенні всіх інших видів експериментів.

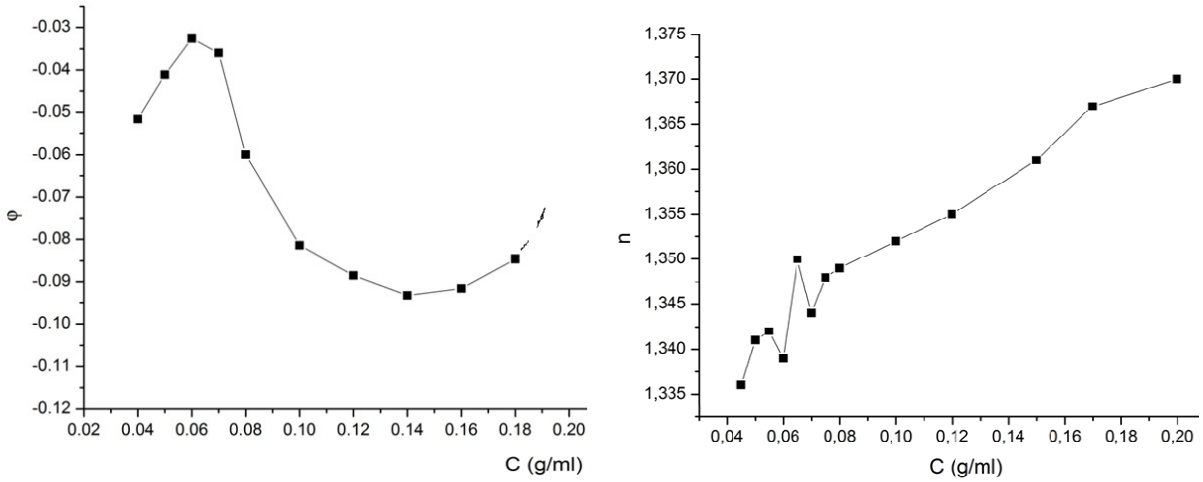

Рис. 2. Контракція φ та показник заломлення n водного розчину сироваткового альбуміну людини в залежності від масової долі альбуміну

З залежностей очевидно, що як і при розведенні нативної плазми крові, так і для розчинів альбуміну є особлива точка у розчині, яка відповідає концентрації білкового компоненту у плазмі нормальної крові – 0.06 г/мл. У попередніх роботах [18] було показано, що зменшення концентрації протеїнів у плазмі до 0.9 від нормального значення призводять до змін, що можуть розглядатися як структурні переходи. Отримані нами залежності (Рис.1) показують, що і для найпростішої підсистеми крові (розчин вода альбумін) можна твердити, що вона може бути чинником гомеостазу, але за концентрацій не менших за 0.9 від нативної.

2. **Густина та контракція водних розчинів альбуміну.** У роботах по особливим точкам водних розчинів спиртів [20] було показано що такий параметр, як контракція, яка є відносним надмірним об’ємом при утворенні розчину з вихідних компонентів, несе інформації про асоціацію молекул значно більше, ніж густина, або питомий об’єм на молекулу. Контракцією називають зміну об’єму суміші компонент, відносно суми вихідних об’ємів компонент, й визначають співвідношенням: $\varphi = \frac{V_{12}}{V_1 + V_2} - 1$, де V_{12} – об’єм суміші, V_1, V_2 – об’єми компонент. Експерименти по дослідженню контракції для розчину сироваткового альбуміну майже відсутні.

Головна проблема при такому дослідженні - це густина альбуміну, який складно взяти за вихідний параметр, оскільки молекули значно змінюються за різних чинників. Але ми можемо розрахувати об’єм протеїнів, вважаючи, що при наших експериментах форма і об’єм молекул альбуміна стала, а його молекулярна маса відома. Тож, якщо ми розводимо вихідний розчин 20 г/мл, то вихідний об’єм білку у всіх розчинах при розведенні будемо вважати сталим – сумою об’ємів всіх молекул, розміри яких відомі: 80х40х30 ангстрем.

Результати експериментів по визначенню контракції водних розчинів САЛ при Т=6^{o}С та показнику заломлення тих самих розчинів представлені на Рис.2. Очевидно, що, в околі особливої точки розчинів, що збігається з нативною кон-

центрацією протеїнів у крові, спостерігається екстремум контракції. При цьому, залежність показника заломлення стає складною саме у околі цієї точки на відміну від монотонної залежності на всьому іншому концентраційному інтервалі. Такі процеси характерні і для таких простих систем як водні розчини спиртів, де в околі особливої точки спостерігається не тільки наявність відхилення від монотонних залежностей різних параметрів, а і довготривале встановлення рівноважного стану після утворення розчину. Дослідження встановлення рівноваги для біологічних розчинів майже неможливе внаслідок агресивності до них оточуючого середовища, особливо мікробіологічна активність. Проведені нами досліди з овоальбуміном показали, що альбуміни абсолютно різного походження мають спільні характеристики, а їх дія, як одного з чинників процесів молекулярного транспорту у крові, універсальна.

Висновки

1.Залежність показника *pH* від концентрації при розбавленні фармакологічних форм альбуміну максимальних концентрацій дозволяють підтвердити наявність особливої точки простої підсистеми крові вода-альбумін з концентрацією 0.06 г/мл, вище якої можна говорити про неї як одного з чинників гомеостазу крові.

2. Особливості контракції та показника заломлення водних розчинів альбуміну в околі концентрації 0.06 г/мл підтверджують, що там проходять структурні перетворення, а спільні характеристики альбуміна людини та овоальбуміна говорять про універсальність його як одного з чинників обмінних процесів у багатьох біосистемах.

Література:

1. *Fenimore PW, Frauenfelder H, Magazù S, et al.* Concepts and problems in protein dynamics. // Chem Phys. – 2013. – Vol. 424. – P. 2-6.
2. *Peters Jr T* All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications. Academic Press, 1996. – 432p.
3. *He X.M., Carter D.C.* Atomic structure and chemistry of human serum albumin. // Nature. – 1992. – Vol. 358. – P. 209-215
4. *Majorek KA, Porebski PJ, Dayal A, et al.* Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins // Mol Immun. 2012.– Vol. 52. – P. 174-182.
5. *Carter D.C., Ho J.X.* Structure of serum albumin. // Adv Protein Chem. – 1994. – Vol. 45. – P. 153-203.
6. *Akdogan Y., Reichenwallner J., Hinderberger D.* Evidence for Water-Tuned Structural Differences in Proteins: An Approach Emphasizing Variations in Local Hydrophilicity // PLoS ONE 2012. – Vol. 7. – P. e45681.
7. *Sjöberg B., Mortensen K.* Interparticle interactions and structure in nonideal solutions of human serum albumin studied by small-angle neutron scattering and Monte Carlo simulation. // Biophys Chemist. – 1994. – Vol. 52. – P. 131-138.
8. *Varga B, Migliardo F, Takacs E, et al.* Neutron scattering studies on dUTPase complex in the presence of bioprotectant systems // Chem Phys. – 2008. – Vol. 345. – P. 250-258.
9. *Olivieril J.R., Craievich A.F.* The subdomain structure of human serum albumin in solution under different pH conditions studied by small angle X-ray scattering // Eur Biophys J. – 1995. Vol. 24. – P. 77-84.

10. *Wilkins DK, Grimshaw SB, Receveur V, et al.* (1999) Hydrodynamic radii of native and denatured proteins measured by pulse field gradient NMR techniques // Biochem 38: 16424-16431.
11. *Magazù S.* NMR, static and dynamic light and neutron scattering investigations on polymeric aqueous solutions. // J Mol Struct. – 2000. – Vol. 523. – P. 47-59.
12. *Chicea D, Chicea R, Chicea L.M.* HSA particle size characterization by AFM. // Rom Reports Phys. – 2013. – Vol. 65. – P. 178-185.
13. *Qian J., Tang Q., Cronin B., et al.* Development of a high performance size exclusion chromatography method to determine the stability of human serum albumin in a lyophilized formulation of Interferon alfa-2b // J Chromatogr A .– 2008. – Vol. 1194. – P. 48-56.
14. *Maslova M.N., Zaritskiy A.R., Chaykov L.L.* The blood plasma particles sizes oscillations observed by dynamic light scattering // Biophys J . – 2014. – Vol. 106. – P. 457a-458a.
15. *Jachimska B., Wasilewska M., Adamczyk Z.* Characterization of globular protein solutions by dynamic light scattering, electrophoretic mobility, and viscosity measurements. // Langmuir. – 2008. – Vol. 24. – P. 6866. https://doi.org/10.1021/la800548p
16. *Chalikian T.V.* Volumetric Properties of Proteins // Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure. – 2003. – Vol. 32(1). – P. 207–235. doi: 10.1146/annurev.biophys.32.110601.141709
17. *Rani, R., Rajput, S., Sharma, K., & Baboria, V.* Volumetric and viscometric properties of amino acids in aqueous solutions of various drugs at different temperatures: A review. // Molecular Physics. 2021. – Vol. 120(4). https://doi.org/10.1080/00268976.2021.1992029
18. *Malomuzh, N. P., Bulavin, L. A., Gotsulskyi, V. Y., & Guslisty, A. A.* Characteristic Changes in the Density and Shear Viscosity of Human Blood Plasma with Varying Protein Concentration // Ukrainian Journal of Physics. – 2020. – Vol. 65(2). – P. 151. https://doi.org/10.15407/ujpe65.2.151
19. *Iqbal, M., & Verrall, R. E.* Volumetric properties of aqueous solutions of bovine serum albumin, human serum albumin, and human hemoglobin // The Journal of Physical Chemistry. – 1987. – Vol. 91(7). – P. 1935–1941. doi:10.1021/j100291a050
20. *Гоцульский В.Я., Маломуж Н.П., Чечко В.Е.* Особые точки водно-спиртовых растворов // Журнал физической химии. – 2015. – Т. 89 (2). – С. 225-232. DOI:10.7868/S0044453715020119

N.O. Fuduley, O.V. Khorolskyi

Volumetry of aqueous albumin solutions in the vicinity of a specific point

SUMMARY

The paper presents the results of a study on the density and contraction of aqueous solutions of human serum albumin as a function of solution concentration. The obtained dependence of the pH of the solutions on concentration, when diluting pharmacological forms of albumin at maximum concentrations, confirms the presence of a specific point in the simple subsystem of blood – the water-albumin solutions with a concentration of 0.06 g/ml, above which it can be considered as one of the factors of blood homeostasis. It is shown that dilution of pharmacological forms at maximum concentrations of 20% allows isolating the region around the specific point, whose concentration coincides with native protein values in blood plasma. The behavior of solution density aligns well with data on pH and refractive index. The characteristics of contraction and refractive index of aqueous albumin solutions near the specific point confirm that structural transformations occur there, and the common features of human albumin and ovalbumin indicate its universality as one of the factors in metabolic processes across many biosystems.

Keywords: *water, proteins, albumin, solutions, density, contraction.*