

Ю. В. ЛЕВЧЕНКО, А. В. ХОРОЛЬСКИЙ

**ЭФФЕКТИВНЫЕ РАДИУСЫ МАКРОМОЛЕКУЛ БЫЧЬЕГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА, РАССЧИТАННЫЕ ПО ДАННЫМ О СДВИГОВОЙ ВЯЗКОСТИ ЕГО ВОДНЫХ РАСТВОРОВ**

С помощью ячеечного подхода Маломужа – Орлова из экспериментальных данных по сдвиговой вязкости растворов бычьего сывороточного альбумина рассчитаны эффективные радиусы биомакромолекул в интервале концентраций 2,0–27,2 масс. % и температур 278–318 К при постоянном значении рН = 5,2.

Важной характеристикой макромолекул глобулярных белков у разбавленных растворах является их гидродинамический радиус. Изменение гидродинамического радиуса позволяет отслеживать изменения внутренней структуры макромолекул в растворе в зависимости от температуры, концентрации и показателя кислотно-щелочного баланса среды (рН). Для определения гидродинамического радиуса используются разные физико-химические методы: фотонная корреляционная спектроскопия, дифракция рентгеновских лучей, малоугловое рассеивание нейтронов, ЯМР-спектроскопия с импульсным градиентом магнитного поля, капиллярная вискозиметрия. Вследствие многофакторности влияния на структуру макромолекул белка (концентрация, температура, кислотно-щелочной баланс, присутствие солей, денатурантов, и т. п.) и отличий в физических подходах экспериментальных методов исследования, возникают различия в определении величины гидродинамического радиуса макромолекул в растворе.

Настоящая работа посвящена обсуждению результатов моделирования эффективного радиуса макромолекул бычьего сывороточного альбумина (БСА) в зависимости от температуры и концентрации. Определение эффективного радиуса производится путем обработки экспериментальных данных сдвиговой вязкости с помощью формулы Бетчелора [1] для достаточно разбавленных растворов и формулы Маломужа – Орлова [2; 3] для концентрированных растворов. Внимательное исследование зависимости эффективных радиусов макромолекул в зависимости от температуры, концентрации и кислотно-щелочного баланса водной среды имеет первоочередное значение для определения характера перестроек внутренней структуры макромолекул и особенностей процессов олигомеризации в жидкой системе.

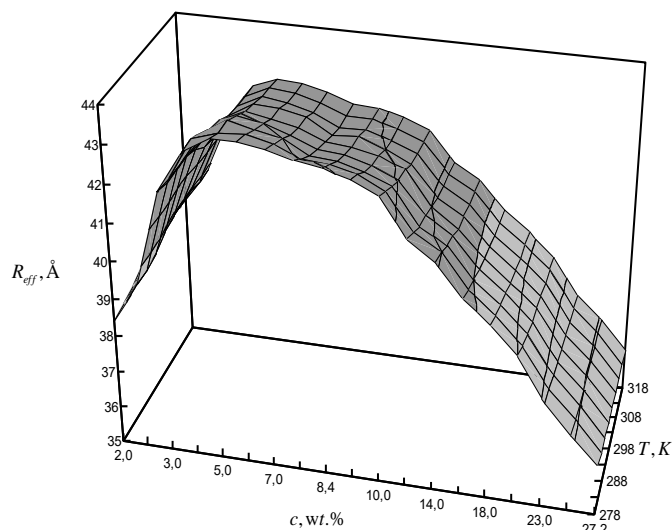
Методом капиллярной вискозиметрии в работе [4] экспериментально исследована сдвиговая вязкость растворов БСА в интервале концентраций 1,76–36,34 масс. % и температур 278–318 К при постоянном значении рН = 5,2, которое находится в окрестностях изоэлектрической точки БСА. Для расчетов эффективных радиусов макромолекул из данных о сдвиговой вязкости в диапазоне объемных концентраций  $0,2 \leq \varphi \leq 0,5$  использована формула Маломужа – Орлова, теоретическое обоснование которой проведено в работах [2; 3]. Формула Маломужа – Орлова получена с использованием ячеечного подхода, который учитывает вращательные степени свободы частицы. Методика использования алгоритма Маломужа – Орлова описана в работе [5]. Этот подход позволяет описать поведение растворов макромолекул в интервале объемных концентраций  $\varphi \leq 0,5$ , верхняя граница которого совпадает с плотностью раствора при контакте всех макромолекул [2; 3; 5].

При уровне кислотно-щелочного баланса 5,2 макромолекула БСА свернута в компактную конформацию сердцевидной формы (N-изоформа), поэтому правомерно использовать подход Маломужа – Орлова для расчета эффективных радиусов биомакромолекул. Для этого перейдем от массовой концентрации раствора к объемной концентрации. Вследствие этого указанный алгоритм был использован для интервала массовых концентраций 2,0–27,2 масс. %, что соответствует интервалу объемных концентраций макромолекул 0,04–0,49. Путем обработки экспериментальных данных с помощью алгоритма Маломужа – Орлова получены концентрационные зависимости эффективных радиусов макромолекул БСА вдоль изотерм для его водных растворов (рис. 1).

Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что во всем температурном интервале вплоть до концентраций ~5 масс. % наблюдается быстрое нелинейное увеличение эффективных радиусов макромолекул БСА. Отметим наличие максимумов эффективных радиусов макромолекул БСА при концентрации 5 масс. %, положение которых практически не зависит от температуры: при 278 К эффективный радиус БСА равен 43,50 Å, а при 318 К – 42,55 Å. В интервале концентраций 5,0–27,2 масс. % наблюдается уменьшение размеров макромолекулы БСА, причем при концентрациях  $\geq 10$  масс. % зависимость носит линейный характер [6].

Ранее в работе [7] нами исследованы эффективные радиусы макромолекул сывороточного альбумина человека (САЧ) из данных о сдвиговой вязкости его водных растворов при постоянном значении рН = 7,0 (близко к естественному рН крови человека) в интервале концентраций 0,82–36,9 масс. % и температурном интервале 278–318 К. Установлено, что во всем температурном интервале до концентраций 3,7 масс. % эффективные радиусы САЧ остаются неизменными в пределах погрешностей моделирования: наблюдается «плато» эффективных радиусов макромолекул САЧ в области относительно низких концентраций белка. Для

БСА же в окрестностях изоэлектрической точки наблюдается другая закономерность: в разбавленных растворах БСА с ростом концентрации видим рост эффективных радиусов белка. Схожими чертами температурно-концентрационных зависимостей эффективных радиусов БСА и САЧ являются следующие результаты: 1) эффективные радиусы этих макромолекул при концентрациях  $\geq 10$  масс. % остаются почти независимыми от температуры; 2) максимальные эффективные радиусы САЧ (44 Å) и БСА (43,5 Å) практически равны. Напомним, что макромолекулы САЧ и БСА имеют похожую на 75,52 % последовательность нуклеотидов в макромолекулярной цепи, что обуславливает подобные пространственные структуры этих белков.



**Рисунок 1 – Температурно-концентрационная зависимость эффективных радиусов макромолекул бычьего сывороточного альбумина при pH = 5,2**

Сравнение указанных результатов с величинами гидродинамических радиусов БСА, полученных из экспериментальных данных о коэффициенте самодиффузии макромолекул в растворе, свидетельствует в пользу хорошей корреляции полученных величин [6]. При этом следует отметить, что обоснование некоторых несоответствий и расхождений в результатах, полученных разными экспериментальными методами, требует дальнейших системных исследований.

Таким образом, определение радиусов макромолекул из данных о сдвиговой вязкости их растворов с помощью формулы Маломужа – Орлова представляется достаточно простым и эффективным методом. Экспериментальная доступность метода капиллярной вискозиметрии и возможность оперативного изменения состава раствора в процессе исследования позволяют получить картину изменения размеров макромолекул в зависимости от температуры, концентрации, кислотно-щелочного баланса, ионного состава раствора, что предельно важно для понимания особенностей сложной динамики биомacroмолекул в водных растворах.

#### Список литературы

1. Batchelor, G. K. An Introduction to Fluid Dynamics / G. K. Batchelor. – Cambridge University Press : Cambridge Mathematical Library series, 2000 [1967]. – XXX p.
2. Malomuzh, N. P. Static shear viscosity of a bimodal suspension / N. P. Malomuzh, E. V. Orlov // Ukrainian Journal of Physics. – 2005. – Vol. 50, iss. 6. – P. 618–622.
3. Orlov, E. V. Shear viscosity of dispersions of particles with liquid shells / E. V. Orlov // Colloid Journal. – 2010. – Vol. 72. – P. 820–824.
4. Monkos, K. Viscosity of bovine serum albumin aqueous solutions as a function of temperature and concentration / K. Monkos // International Journal of Biological Macromolecules. – 1996. – Vol. 18. – P. 61–68.
5. Khorolskiy, O. V. Effective radii of macromolecules in dilute polyvinyl alcohol solutions / O. V. Khorolskiy // Ukrainian Journal of Physics. – 2018. – Vol. 63, iss. 2. – P. 144–149.
6. Khorolskiy, O. V. Calculation of the macromolecular size of bovine serum albumin from the viscosity of its aqueous solutions / O. V. Khorolskiy, Yu.D. Moskalenko // Ukrainian Journal of Physics. – 2020. – Vol. 65, iss. 1. – P. 41–49.
7. Khorolskiy, O. V. Calculation of the effective macromolecular radii of human serum albumin from the shear viscosity data for its aqueous solutions / O. V. Khorolskiy // Ukrainian Journal of Physics. – 2019. – Vol. 64, iss. 4. – P. 285–290.

On the basis of experimental data for the shear viscosity of aqueous bovine serum albumin solutions and in the framework of the Malomuzh – Orlov cellular approach, effective radii of bovine serum albumin has been calculated for the constant pH = 5,2 in the concentration interval of 2,0–27,2 wt. % and the temperature interval of 278–318 K.

Левченко Юлия Викторовна, студентка физико-математического факультета Полтавского национального педагогического университета имени В. Г. Короленко, Полтава, Украина, rpru20@gmail.com.

Научный руководитель – Хорольский Алексей Викторович, кандидат физико-математических наук, старший преподаватель Полтавского национального педагогического университета имени В. Г. Короленко, Полтава, Украина, khorolskiy.alexey@gmail.com.

УДК 577.346:577.352.333

Ю. А. ЛЫЧАГИНА

## СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА НОВОГО ДИКАРБОЦИАНИНОВОГО КРАСИТЕЛЯ, МОДИФИЦИРОВАННОГО ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЕМ

Исследованы спектры поглощения и флуоресценции нового производного тиофлавина Т, дикарбоцианинового красителя, модифицированного полиэтиленгликолем, в растворителях различной полярности и вязкости и в присутствии белка бычьего сывороточного альбумина и амилоидных фибрилл из инсулина. Установлена высокая специфичность нового красителя к амилоидным фибриллам.

Красители, у которых после поглощения света происходит поворот одного фрагмента молекулы относительно другого, сопровождаемый внутримолекулярным переносом заряда, получили название молекулярных роторов (МР). МР рассматриваются, как перспективные зонды для определения вязкости жидкостей, в особенности в локально малых объемах (мембраны, клетки, капилляры кровеносных сосудов). Возможность управления внутримолекулярным движением может быть использована для построения устройств, имеющих нанометровые размеры, – молекулярных моторов или молекулярных машин. Молекулярные роторы являются наиболее чувствительными флуоресцентными зондами для детекции и исследования амилоидных фибрилл (АФ) и других упорядоченных белковых агрегатов, которые считаются ключевым фактором в этиологии целого ряда конформационных болезней, включая болезни Альцгеймера, Паркинсона и др. Классическим флуоресцентным маркером амилоидов является бензотиазольный краситель Паркинсона и др. Классическим флуоресцентным маркером амилоидов является бензотиазольный краситель тиофлавин Т, который образует с фибриллами интенсивно флуоресцирующий комплекс. Тиофлавин Т практически не флуоресцирует в воде и других маловязких растворителях, однако его квантовый выход увеличивается на три порядка при наличии в растворе АФ. Кроме того, присутствие в растворе белков в нативной или даже денатурированной форме практически не влияет на интенсивность его флуоресценции. Однако, этот маркер имеет ряд недостатков, из которых наиболее существенным является поглощение и флуоресценция в сине-зеленой области спектра, что затрудняет его использование для детекции амилоидных фибрилл в тканях. В связи с этим, актуальным является синтез и исследование новых красителей, молекулярных роторов, чувствительных к АФ, но имеющих поглощение и флуоресценцию в длинноволновой области, где поглощение биологических тканей является незначительным.

Данная работа направлена на исследование спектральных свойств нового флуоресцентного дикарбоцианинового красителя, ковалентно связанного с полиэтиленгликолем (Th-C8), в растворителях различной полярности и вязкости (H<sub>2</sub>O, глицерин, диоксан) и определение возможности его использования для детекции и исследования амилоидных фибрилл, а также белков и их комплексов.



Рисунок 1 – Структурная схема тиофлавина Т (а) и дикарбоцианинового красителя, модифицированного полиэтиленгликолем (Th-C8, б).

Результаты исследований спектров поглощения и флуоресценции представлены на рисунке 2а, б. Видно, что положение спектра поглощения является чувствительным к полярности микроокружения: в полярном растворителе (вода) спектр поглощения имеет наиболее коротковолновое положение. В малополярном диоксане и при встраивании в амилоидные фибриллы имеет место значительный bathochromный сдвиг спектра поглощения, составляющий соответственно 15 и 50 нм. Положение спектра флуоресценции практически не