

© О. И. Доценко

## ВЛИЯНИЕ НИЗКОЧАСТОТНОЙ ВИБРАЦИИ НА ПРОЦЕССЫ АГРЕГАЦИИ АЛЬБУМИНА В ВОДНОМ РАСТВОРЕ

Донецкий национальный университет; 83050, г. Донецк, ул. Щорса, 46  
e-mail: dots\_don@ukr.net

**Доценко О. И.** Влияние низкочастотной вибрации на процессы агрегации альбумина в водном растворе. – Методом рассеяния света исследовано образование макромолекулярных комплексов в водных растворах альбумина под действием низкочастотной вибрации (интервал частот 8-32 Гц, амплитуды  $0,5 \pm 0,04$  мм и  $0,9 \pm 0,08$  мм). Получены и обсуждены частотно-временные зависимости изменения средней молекулярной массы альбумина и коэффициента межмолекулярного взаимодействия. Показана роль водной среды и растворенного кислорода в процессах агрегации альбумина, инициируемых низкочастотной вибрацией.

*Ключевые слова:* альбумин, низкочастотная вибрация, рассеяние света, межмолекулярное взаимодействие.

### Введение

Изучение белков как основного составного элемента живой природы, а также влияния внешних факторов на белковые системы представляет собой одну из наиболее актуальных проблем биофизики. Межмолекулярные взаимодействия и динамика белковых макромолекул играют чрезвычайно важную роль в функционировании различных биосистем. В условиях современной жизни особенно интересным представляется изучение неизбежного влияния на эти системы различных отрицательных факторов и токсических воздействий.

Ранее было установлено [1], что действие низкочастотной вибрации диапазона 8-32 Гц на растворы альбумина приводит к его окислительной модификации. Было показано, что модификации подвергаются как боковые аминокислотные остатки молекулы альбумина, такие как тирозин, триптофан, фенилаланин, лизин, аргинин, так и остатки, расположенные в более глубоких участках молекулы. Следствием этих процессов может быть образование внутренних и межмолекулярных сшивок и появление белковых агрегатов [2].

Известно, что агрегация белковых молекул приводит к образованию олигомеров «неправильной» формы вследствие «ошибочных» межмолекулярных взаимодействий и может являться причиной многих заболеваний [3].

В водном растворе молекула альбумина, состоящая из трех последовательно расположенных доменов, может динамически разгибаться и сгибаться, принимая определенные формы, в связи с чем можно предполагать наличие не одной определенной, а нескольких конформаций, соотношение между которыми зависит от условий, и которые, возможно, динамически сосуществуют [4]. Молекула белка вместе с водной фазой представляют собой единое целое, которое характеризуется определенной динамикой во времени. Белок как динамическая молекулярная конструкция оказывает существенное воздействие на водное окружение, а водное окружение, в свою очередь, оказывает влияние на динамику белковой молекулы [5]. Молекулы белка в растворе вследствие взаимодействия друг с другом могут обратимо образовывать агрегаты. Таким образом, в растворе белка устанавливается определенная временная иерархия структурных переходов начиная с времен порядка  $10^{-9}$  с до десятки секунд – десятки минут. Характер такой иерархии может изменяться при действии разнообразных факторов [5].

В связи со сказанным выше цель работы состояла в изучении молекулярно-динамических процессов, происходящих в водных растворах альбумина под действием низкочастотной вибрации.

### Материалы и методы исследования

В работе использован сывороточный альбумин человека (HSA). Растворы альбумина (0,6-1,5 г/дл) в 0,015М Na-фосфатный буфере, pH 7,4, содержащем 0,15М NaCl, подвергали влиянию вибрации в течение 5-ти часов в интервале частот 8-32 Гц (шаг изменения частоты

4 Гц). Ионную силу и рН растворов белка поддерживали постоянными. Вибрацию совершали при помощи вибростенда, разработанного на кафедре биофизики ДонНУ, который состоял из генератора низкочастотных сигналов синусоидальной формы, усилителя и электромеханического преобразователя сигналов, совершающего колебания в вертикальной плоскости с заданной частотой и амплитудой. Экспериментальный стаканчик с раствором белка вертикально и прочно закрепляли на подвижной части вибратора (в этом случае механические колебания передаются в экспериментальную емкость с раствором с незначительными потерями мощности). Результирующую амплитуду сигнала контролировали с помощью осциллографа, подключенного к электромеханическому преобразователю сигналов.

Амплитуда подаваемого сигнала в экспериментах составила  $0,5 \pm 0,04$  мм и  $0,9 \pm 0,08$  мм. В динамике эксперимента регистрировали мутность растворов спектрофотометрически на длине волны 340 нм.

Молекулярную массу альбумина определяли, используя метод светорассеяния Релея-Дебая [6, 7]. Уравнение Дебая позволяет связать экспериментально измеряемую величину – коэффициент рассеивания света (или мутность) с концентрацией раствора и коэффициентом межмолекулярного взаимодействия.

$$f(c) = \frac{H \cdot c}{\tau} = \frac{1}{M} + 2Bc, \quad (1)$$

где

$$H = \frac{32\pi^3 (n_0)^2}{3\lambda^4 N_a} \cdot \left( \frac{dn}{dc} \right)^2, \quad (2)$$

где  $c$  – концентрация растворенного вещества, г/см<sup>3</sup>,  $\tau$  – мутность раствора, см<sup>-1</sup>,  $M$  – средняя молекулярная масса растворенного вещества, г,  $B$  – второй вириальный коэффициент, который является мерой межмолекулярного взаимодействия в растворе, см<sup>3</sup>·моль/г<sup>2</sup>,  $n_0$  – показатель преломления растворителя,  $\lambda$  – длина волны падающего света в вакууме, см,  $N_a$  – число Авогадро,  $dn / dc$  – инкремент показателя преломления раствора, см<sup>3</sup>/г. Инкремент показателя преломления измерялся с помощью интерферометра Релея (погрешность 2%) в растворах с различной концентрацией белка.

Рассматриваемый метод дает возможность прямого определения молекулярной массы макромолекул, для чего необходимо измерить  $\tau$  при нескольких концентрациях и экстраполировать полученную зависимость  $f(c)$  к концентрации  $c = 0$ . Наклон прямой  $f(c)$ , равный  $2B$ , позволяет вычислить второй вириальный коэффициент в разложении для свободной энергии, который характеризует степень отклонения раствора от идеального и служит мерой межмолекулярного взаимодействия в растворе. Погрешность определения коэффициента  $B$  и массы рассеивающих частиц составила 10%.

### Результаты и обсуждение

На рис. 1 показаны кинетические кривые увеличения поглощения при 340 нм растворов альбумина, подвергавшиеся вибрации в интервале частот 8-32 Гц при амплитудах  $0,5 \pm 0,04$  мм и  $0,9 \pm 0,08$  мм. На всех кривых виден участок соответствующий лаг-периоду, что указывает на зародышевый характер агрегации, т.е. в растворах альбумина сначала формируются стартовые агрегаты, которые впоследствии объединяются в макромолекулярный комплекс. Продолжительность лаг-периода зависит от частоты и амплитуды вибрационного воздействия – значительно сокращается в интервале частот 28-32 Гц и удлиняется при воздействии с амплитудой  $0,9 \pm 0,08$  мм в интервале частот 8-24 Гц.

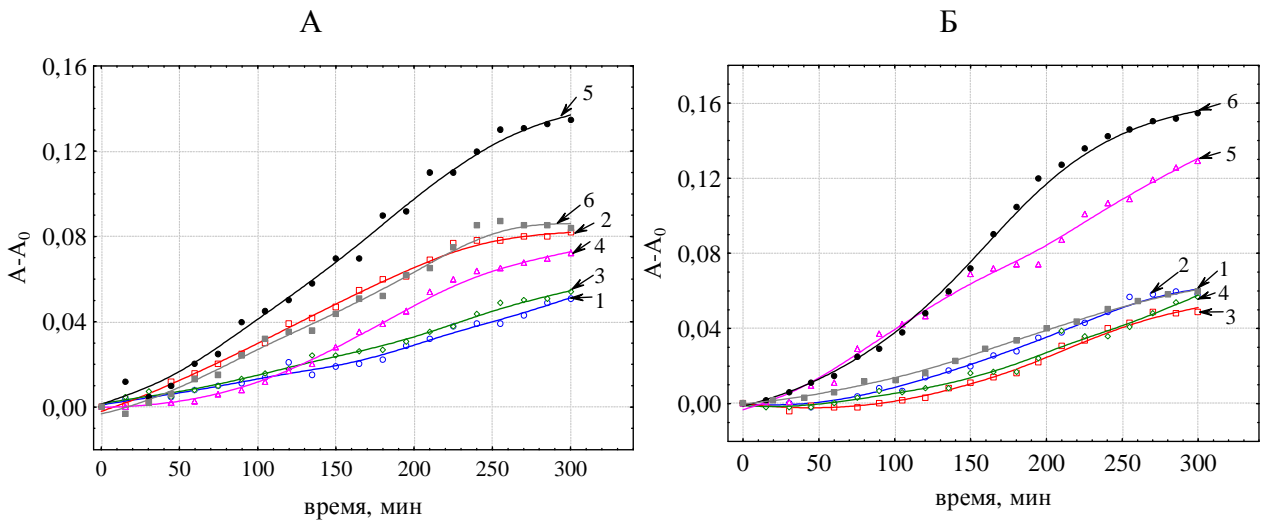


Рис. 1. Прирост поглощения в растворах альбумина, подвергавшихся вибрации с частотой: 1-8, 2-16, 3-20, 4-24, 5-28, 6-32 Гц. Амплитуда вибрации: А –  $0,5 \pm 0,04$  мм, Б –  $0,9 \pm 0,08$  мм. Концентрация альбумина 1 г/дл.

Полученные данные использовались для расчета средней молекулярной массы HSA. На рис. 2 показано изменение молекулярной массы альбумина в процессе воздействия вибрацией в частотном диапазоне 8-32 Гц различной амплитуды.

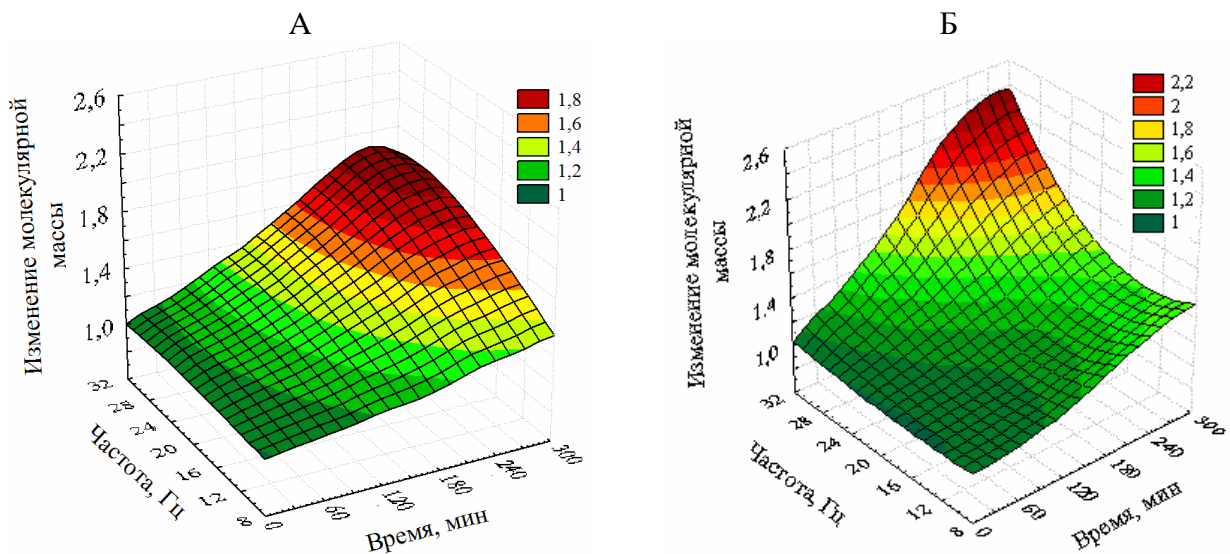


Рис. 2. Изменение средней молекулярной массы альбумина в зависимости от времени и частоты вибрации. Амплитуда вибрации: А –  $0,5 \pm 0,04$  мм, Б –  $0,9 \pm 0,08$  мм.

Известно, что в среде NaCl альбумин не агрегирует самопроизвольно даже при вариации pH и ионной силы раствора [6]. Легкие ионы типа натрия обладают малым ионным радиусом и поэтому прочно удерживают на поверхности гидратную оболочку. Кроме того, участие  $\beta$ - и  $\gamma$ -карбоксильных групп в солевых мостиках лишает белковые молекулы способности реагировать со щелочными металлами [8, 9]. В связи с этим регистрируемые в эксперименте изменения молекулярной массы альбумина могут быть следствием влияния вибрации на изучаемую систему. Установлено, что средняя молекулярная масса HSA увеличивается от 69 кДа до 110-161 кДа и достигает максимальных значений после пяти часов вибрационного воздействия. Видно (см. рис. 2), что изменение молекулярной массы зависит от частоты, амплитуды и длительности вибрации. Так, например, при вибрационном воздействии с частотой 8 Гц, амплитудой  $0,5 \pm 0,04$  мм средняя молекулярная масса

альбуміна після п'яти годин впливу склала 97,33 кДа, а при впливі з частотою 32 Гц і той же амплітудою – 110,87 кДа. При впливі з частотою 8 Гц приріст молекулярної маси в процесі вібрації не залежить від її амплітуди. В інтервалі частот 12-24 Гц приріст молекулярної маси альбуміна більше при впливі з амплітудою  $0,5 \pm 0,04$  мм, а в інтервалі частот 28-32 Гц – при впливі з амплітудою  $0,9 \pm 0,08$  мм.

На рис. 3 показано змінення другого віриального коефіцієнта ( $B$ ) для альбуміна в розчині в процесі вібраційного впливу. Згідно Скэтчарду [6], другим віриальним коефіцієнтом, описуючим парні взаємодії в розчинах, що містять крім низкомолекулярного розчинника ще і третій компонент – сильний електроліт, наприклад NaCl, має вигляд

$$B = \frac{V_1}{M_2^2} \left( \frac{Z^2}{4m_3} + \frac{\beta_{22}}{2} + \frac{\beta_{23}^2 \cdot m_3}{4 + 2\beta_{33} \cdot m_3} \right), \quad (5)$$

де  $V_1$  – удільний об'єм розчинника;  $Z$  – заряд макроіона;  $M_2$  – його маса;  $m_3$  – концентрація іонів солі. Параметри  $\beta_{22}$ ,  $\beta_{23}$  і  $\beta_{33}$  є похідними від коефіцієнтів активності, які служать мірою ефективного концентрації даного компонента. Вони характеризують різні взаємодії між іонами в розчині: ефект виключеного об'єму і взаємодія між зарядами різних макроіонів ( $\beta_{22}$ ), взаємодія між макроіонами і іонами солі ( $\beta_{23}$ ) і взаємодія тільки між іонами солі ( $\beta_{33}$ ). Згідно (5) коефіцієнт міжмолекулярної взаємодії змінюється з ростом сумарного заряду на білку за параболическим законом (ефект Доннана). При великих концентраціях солі в розчині член, що містить коефіцієнт  $\beta_{23}$ , може суттєво перевищувати (за модулем) перші два, і параметр  $B$  може стати негативним. При зростанні іонної сили розчину, т. є. при збільшенні концентрації розчиненої солі, в розчині виникають більш складні утворення з участю іонів  $\text{Na}^+$  і  $\text{Cl}^-$ . Навколо зарядженої молекули білка створюється хмара протівоіонів, екрануюче кулоновське взаємодія. Величина  $B$  зменшується з збільшенням іонної сили, однак маса білкових макромолекул в розчині при цьому залишається практично постійною.

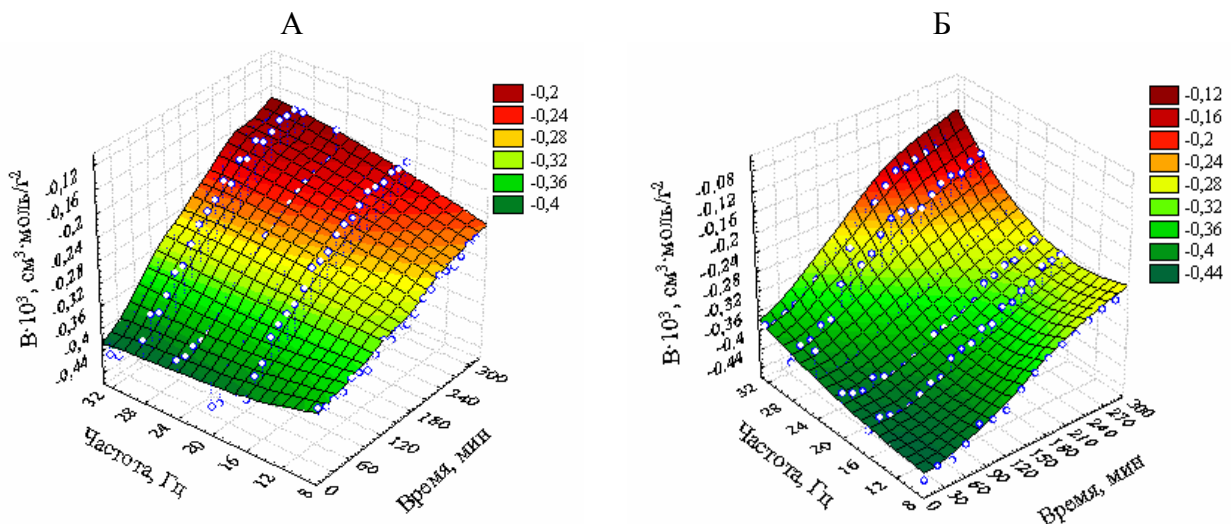


Рис. 3. Змінення коефіцієнта міжмолекулярної взаємодії в залежності від часу і частоти вібрації при постійній іонній силі розчину. Амплітуда вібрації: А –  $0,5 \pm 0,04$  мм, Б –  $0,9 \pm 0,08$  мм.

В розчинах альбуміна з іонною силою  $\mu=0,15$  моль/л, що використовуються в експерименті, коефіцієнт міжмолекулярної взаємодії негативний і склав  $(-4,12 \pm 0,39) \cdot 10^{-4}$  см<sup>3</sup>·моль/г<sup>2</sup>. В процесі вібрації коефіцієнт  $B$  зменшується за абсолютною величиною, однак залишається негативним. На рис. 3, А показано змінення  $B$  розчинів

альбумина, піддаються вібрації з амплітудою  $0,5 \pm 0,04$  мм. При цьому часова залежність  $B$  складається з двох ділянок: початковий лінійний ділянок, тривалістю 100-120 хв, на якому приріст коефіцієнта міжмолекулярного взаємодія незначительний, і другою – ділянок параболічного змінення  $B$ . При впливі вібрації в інтервалі частот 8-20 Гц з амплітудою  $0,9 \pm 0,08$  мм змінення коефіцієнта  $B$  незначительне, хоча і в цьому випадку його значення зменшуються по абсолютній величині. При впливі вібрацією з частотами 28 і 32 Гц і цією ж амплітудою реєструються S-подібні часові залежності змінення  $B$ , причому по абсолютній величині його значення зменшуються в 3 рази, тоді як при діянні вібрації тією ж частотою, але меншою амплітудою тільки в 2 рази. Такий вид залежності  $B$  вказує на зменшення ефективного заряду альбуміна, що і буде сприяти агрегації.

Зупинимося на аналізі процесів, які можуть привести до агрегації альбуміна. Білки в розчині представляють собою частинки, основним видом взаємодія між ними є кулонівське відштовхування. В випадку заряджених молекул енергія кулонівського відштовхування більше  $kT$ . Зближенню макромолекул альбумінів, які мають при нейтральних рН ( $\sim 7$ ) заряд  $q$ , приблизно рівний 10 од. СГСЭ [6], перешкоджає їх взаємне кулонівське відштовхування з енергією

$$E_{qq} = \frac{q^2}{\epsilon \cdot l},$$

де  $l$  – відстань між зарядженими макромолекулами. З збільшенням сумарного (від'ємного або позитивного) заряду на білкової молекулі кулонівські сили відштовхування будуть зростати. Зафіксоване нами раніше збільшення кількості карбонільних груп в молекулі альбуміна [1] в процесі вібраційного впливу вказує на ріст від'ємного заряду молекул, що не буде сприяти агрегації.

Однак ефективне зменшення поверхнового заряду (в випадку компенсації поверхнового заряду іонами) може привести до того, що основним видом взаємодія між макромолекулами стане диполь-дипольне, оскільки білки мають аномально високі дипольні моменти (який ще збільшиться при його окислювальної модифікації). Характер взаємодія макромолекул білків в таких розчинах уже буде визначається не кулонівськими, а диполь-дипольними силами. Енергія диполь-дипольного взаємодія

$$E_{pp} = \frac{p^4}{6\pi \cdot k \cdot T \cdot r^6},$$

де  $p$  – дипольний момент білка. При відстані між диполями  $r \sim 30$  А енергія  $E_{pp}$  може перевищувати теплову енергію  $kT$  майже в 100 раз [6], тому при зближенні на гранично малі відстані білкові молекули можуть утворювати макромолекулярний комплекс – дипольний кластер. Однак взаємодія іонів  $Na^+$  з карбоксильними групами альбуміна стане можливим при розриві солевих зв'язків між фіксованими іонами. Згідно [8] звільнені  $\beta$ - і  $\gamma$ -карбоксильні групи здатні адсорбувати  $Na^+$ , в тому числі робити це вибірково. Крім прямого взаємодія між вільними і фіксованими іонами, існує також сильне автокооперативне взаємодія між адсорбуючими центрами, на що і вказує характерний S-подібний вид залежностей  $B$ . Накоплення карбонільних груп основного характеру при вібраційному впливі в інтервалі частот 24-32 Гц [1], більша частина яких може бути продуктами окислювальної модифікації гідрофобних амінокислотних залишків [10], вказує на те, що обговорювані вище процеси цілком можливі.

Що стосується інтервалу частот 8-20 Гц, при якому вібрація розчинів альбуміна викликає окислювальну модифікацію тільки амінокислотних залишків, розташованих на поверхні, то реєструвані процеси агрегації добре пояснюються індуктивними ефектами [8], а не тільки перестройкою води у поверхні білка [11], що так же не виключається. За рахунок І-індуктивного ефекта, проявляемого утвореними

карбонильними групами при модифікації бокових остатків, внутрішні водородні зв'язи між пептидними карбоксилатами і фенільними групами тирозинових остатків, а також карбоксильними групами і іншими амінокислотними остатками ослаблюються, що може дестабілізувати спіральні частини в білковій молекулі. Через невеликі розміри іон  $\text{Na}^+$  може проникати в гідрофобні області білка і зв'язуватися з карбоксильними групами.

В результаті вказаних механізмів вторинна і третинна структури альбуміну можуть локально змінюватися, що призводить, перш за все, до агрегації.

В роботах [1, 12] нами, з використанням власних і літературних даних, детально обговорювалася роль водної середовища і розчиненого в ній кисню в процесах окислювальної модифікації макромолекул в процесі низькочастотної вібрації. В зв'язі з цим далі досліджувалася роль розчиненого кисню в процесах агрегації. Для цього кисень ретельно видалявся з буферного розчину, за рахунок продувки аргоном, після чого в нього додавали потрібну кількість альбуміну. Герметично закриті розчини піддавали дії низькочастотної вібрації. Результати дослідження представлені на рис. 4. Видно, що при вказаних умовах проведення експерименту зростання оптичної щільності розчинів, а отже, і процеси агрегації, відсутні.

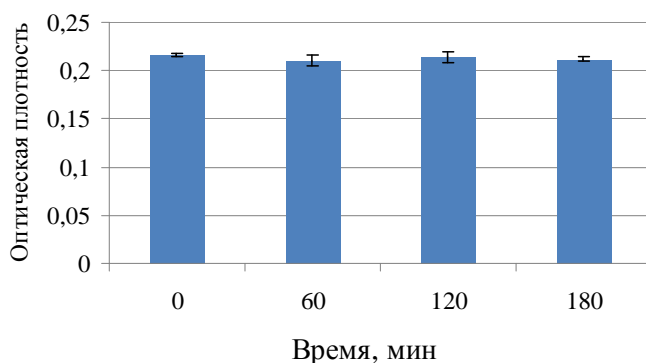


Рис. 4. Оптична щільність розчинів альбуміну до і після вібраційного впливу з частотою 24 Гц, амплітудою  $0,5 \pm 0,04$  мм, приготованих в безкислових буферних розчинах.

Таким чином, розчинений кисень бере безпосередню участь в процесах окислювальної модифікації і агрегації альбуміну під дією низькочастотної вібрації.

### Висновки

1. Показано, що під дією вібрації частотної області 8-32 Гц в розчинах альбуміну відбувається утворення агрегатів, середня молекулярна маса яких на 60-100% перевищує масу білка в початкових розчинах.

2. Аналіз міжмолекулярних взаємодій показав, що утворення агрегатів відбувається за рахунок диполь-дипольної взаємодії макромолекул при участі іонів  $\text{Na}^+$  в екрануванні поверхневого заряду при зв'язуванні з  $\beta$ - і  $\gamma$ -карбоксильними групами альбуміну.

3. Показано, що розчинений в воді кисень бере безпосередню участь в процесах окислювальної модифікації і агрегації альбуміну.

### Список літератури

1. Доценко О. І. Механохімічні процеси у водних розчинах альбуміну / О. І. Доценко, Д. В. Пронько // Проблеми екології та охорони природи техногенного регіону. – Донецьк: ДонНУ, 2008. – Вип. 8. – С. 281–290.

2. Шугалей И. В. Генерация, реакционная способность активных форм кислорода и их деструктивная роль в процессах жизнедеятельности / И. В. Шугалей, И. В. Целинский // Журн. общей химии. – 2000. – Т. 70, № 1. – С. 1057–1070.
3. Taubes G. Protein Chemistry: Misfolding the Way to Disease / G. Taubes // Science. – 1996. – V. 271. – P. 1493–1495.
4. Киселев М. А. Размер молекулы сывороточного альбумина человека в растворе / М. А. Киселев, Ю. А. Грызунов, Г. Е. Добрецов, М. Н. Комарова // Биофизика. – 2001. – Т. 46, вып. 1. – С. 423–427.
5. Мартынюк В. С. Влияние магнитного поля крайне низкой частоты на собственную флуоресценцию сывороточного альбумина в условиях его насыщения хлороформом / В. С. Мартынюк, Ю. В. Цейслер, Н. С. Мирошниченко, А. Ю. Артеменко // Физика живого. – 2008. – Т. 16, № 1. – С. 74–81.
6. Петрова Г. П. Образование дипольных комплексов в растворах белков с малой концентрацией ионов тяжелых металлов: диагностика методом лазерного светорассеяния / Г. П. Петрова, Ю. М. Петрусевич, Д. И. Тен // Квантовая электроника. – 2002. – Т. 32, № 10. – С. 1–5.
7. Петрова Г. П. Образование дипольных кластеров в растворах альбумина, содержащих ионы кадмия и комплексоны хелата европия / Г. П. Петрова, Ю. М. Петрусевич, Б. Д. Рыжиков и др. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 3. Физика. Астрономия. – 2003. – № 5. – С. 32–36.
8. Линг Г. Физическая теория живой клетки: незамеченная революция / Г. Линг. – СПб.: Наука, 2008. – 376 с.
9. Ling G. N. A study of selective adsorption of  $\text{Na}^+$  and other alkali-metal ions on isolated proteins: a test of the salt-linkage hypothesis / G. N. Ling, Z. L. Zhang // Phys. Chem. Physics and Med. NMR. – 1984. – V. 16. – P. 221–235.
10. Казакова В. В. Окислительная модификация и изменения внутримолекулярной гидрофобности гемоглобина А при инкубации эритроцитов человека в среде Фентона / В. В. Казакова, Н. М. Ёлкина // Укр. біохім. журн. – 2007. – Т. 79, № 4. – С. 34–38.
11. Морозова Т. Ф. Изменение спектральных свойств бычьего сывороточного альбумина в концентрированных растворах хлористого натрия / Т. Ф. Морозова, А. М. Грек, В. А. Коптелов и др. // Проблемы криобиологии. – 1982. – № 10. – С. 22–27.
12. Доценко О. И. Изучение влияния низкочастотной вибрации на активность глутатионпероксидазы эритроцитов / О. И. Доценко, В. О. Ткаченко // Вестник Харьковского ун-та им. В. Н. Каразина. Сер. Биол. – 2010. – Вып. 11, № 905. – С. 166–172.

**Доценко О. І. Вплив низькочастотної вібрації на процеси агрегації альбуміну у водному розчині.** – Методом розсіювання світла досліджено утворення макромолекулярних комплексів у розчинах альбуміну під впливом низькочастотної вібрації (інтервал частот 8-32 Гц, амплітуди  $0,5 \pm 0,04$  мм і  $0,9 \pm 0,08$  мм). Отримані та обговорені частотно-часові залежності змінення середньої молекулярної маси альбуміну та коефіцієнту міжмолекулярної взаємодії. Показана роль водного середовища та розчиненого кисню в процесах агрегації альбуміну під дією низькочастотної вібрації.

*Ключові слова:* альбумін, низькочастотна вібрація, розсіювання світла, міжмолекулярна взаємодія.

**Dotsenko O. I. Influence of low-frequency vibration on processes albumin aggregation at the aqueous solutions.** – The formation of macromolecular complexes at the albumin aqueous solutions at the action of low-frequency vibration was investigated by light scattering methods (range of frequencies 8-32 Hz, amplitudes  $0,5 \pm 0,04$  mm and  $0,9 \pm 0,08$  mm). Time-frequency dependence changes of albumins molecular weight mean and coefficient intermolecular interaction was obtained and discussed. The role of aqueous environment and solute oxygen in processes of albumin aggregation at the action of low-frequency vibration demonstrated.

*Key words:* albumin, low-frequency vibration, light scattering, intermolecular interaction.