

**Бурмістров Олександр Миколайович**

канд. фіз.-мат. наук, доцент,
Донецький національний медичний університет МОЗ
України

Гуца Тетяна Олегівна

канд. фіз.-мат. наук, старш. н. с.,
Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії ім. В.П. Кухаря НАН
України,
м. Київ

Лунгол Ольга Миколаївна

канд. пед. наук,
Донецький національний медичний університет МОЗ
України, м. Кропивницький

Габорець Ольга Андріївна

канд. пед. наук,
Донецький національний медичний університет МОЗ
України,
м. Кропивницький

ТЕОРЕТИЧНІ ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ОСНОВИ АКУСТИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ РОЗЧИНІВ БІЛКІВ В АВТОМАТИЧНОМУ РЕЖИМІ

Відомо, що основним білковим компонентом крові, який відіграє центральну роль в транспортуванні лікарських речовин системою кровообігу до хворого органу, являється сироватковий альбумін людини (САЛ). А тому, важливе значення має дослідження взаємодії низькомолекулярних лігандів з альбуміном, яке ще вивчене недостатньо. Особливо до цього часу ще відсутнє однозначне твердження, яким чином відбувається ця взаємодія: шляхом молекулярних динамічних рухів, чи шляхом конформаційних перетворень. Найпростіший рух, який може виконувати білок у розчині – це обертання та поступальне зміщення макромолекули як цілого. Ці процеси залежать від форми та моментів інерції молекули. Обертання та зміщення всієї молекули часто визначають, припускаючи, що внутрішня геометрія полімеру залишається постійною протягом періоду спостереження. Проте в переважній більшості білків за час обертання та зміщення всієї молекули може

відбуватися внутрішній рух елементів ланцюга – повороти окремих груп та сегментів, що супроводжуються розривом слабких внутрішньо-молекулярних і порушенням міжмолекулярних зв'язків у гідратній оболонці. Конформаційна лабільність глобули в нативному стані (при фізіологічних значеннях рН, температури, іонної сили) має дуже велике біологічне значення. Досліджено, що залежності «структура – функція» в біомолекулярних (білкових) комплексах визначається різноманітністю їх конформаційних властивостей. З'ясовано, що саме конформаційна рухливість є причиною унікальних каталітичних та регуляторних властивостей білків, їх специфічної взаємодії з лігандами. Незважаючи на достатньо обширні літературні дані про конформаційну перебудову альбуміну в присутності низькомолекулярних лігандів, природа взаємодії та її механізми ще вивчені досить слабо. Розкриття цих механізмів могло б значно поглибити існуючі уявлення про тонку будову і принципи роботи транспортних білків крові.

Дослідження взаємодії низькомолекулярних лігандів з альбуміном є актуальним питанням сьогодення. Низка робіт вітчизняних та зарубіжних вчених присвячена цьому питанню. Так, вчені з Відділу біології раку Науково-дослідного інституту Лернера (клініка Клівленда, Огайо) Стів С. Хуанг та Уоррен Д. В. Хестон¹, досліджують можливість підвищення ефективності цільової терапії PSMA (Простат-специфічного мембранного антигену), додаючи альбумін-зв'язуючу речовину до низькомолекулярних агентів. На надзвичайні властивості зв'язування лігандів сироваткового альбуміну людини акцентують увагу вчені з кафедри структурної та функціональної біології Університету Інсубрії (Центр Нейронаук, Арсіціо, Італія) Мауро Фазано, Стівен Каррі, Енцо Террено, Моніка Гальяно, Габріелла Фаналі, Паскуале Нарсісо, Стефанія Нотарі та Паоло Ашензі². Вчені Ю.В. Корноушенко, В.А. Ігнатенко, П.А. Авдєєв та Л.А. Євтухова³ досліджуючи дію на бичачий сироватковий альбумін таких низькомолекулярних сполук, як нітрит натрію, пероксид водню, сульфат міді (II), гідроксильний радикал встановили, що із збільшенням концентрації Cu (II) передбачається збільшення ступеня олігомеризації бичачого сироваткового альбуміну, при цьому ліганд утворююча здатність альбуміну знижується.

1 Huang, S. S., & Heston, W. (2017). Should Low Molecular Weight PSMA Targeted Ligands Get Bigger and Use Albumin Ligands for PSMA Targeting?. *Theranostics*, 7(7), 1940–1941. <https://doi.org/10.7150/thno.20284>

2 Fasano, M., Curry, S., Terreno, E., Galliano, M., Fanali, G., Narciso, P., Notari, S., & Ascenzi, P. (2005). The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. *IUBMB life*, 57(12), 787–796. <https://doi.org/10.1080/15216540500404093>

3 Kornoushenko Yu. V., Ignatenko V. A., P. A. Avdeev, Evtukhova L. A. Interaction between some low-molecular agents with different chemical structure and bovine serum albumin. *Експериментальна медицина та біологія. Проблеми здоров'я та екології*. 2016. С. 114 – 121.

Незважаючи на достатньо обширні дослідження даного питання, конформаційну перебудову альбуміну в присутності низькомолекулярних лігандів, природа взаємодії та її механізми потребують більш детального дослідження.

Для проведення різноманітних досліджень активно використовуються і постійно вдосконалюються ультразвукові спектрометри. Вчені кафедри електротехніки, Інституту точних і прикладних наук Федерального університет Ору-Прету (Жуан Монлевад, Бразилія) та факультету електротехніки Університету Естадуал Пауліста (Ілья Солтейра, Бразилія)⁴ Марсело Мореїра Тьяго, Рікардо Токіо Ігуті, Луїс Ельвіра Сегура, Клаудіо Кітано та ін. розробили новий ультразвуковий спектрометр для рідин на основі використання комерційних кювет для обробки зразків. Спектрометр працює в діапазоні частот від 20 до 80 МГц і має ряд важливих характеристик, серед яких високу термічну стабільність (0,01°C) та практичне використання зразків з невеликим об'ємом (≤ 3 мл). Вчені Букін В., Карас Альтас М. (Університетський коледж Дубліна, Ірландія)⁵ вказують на можливість використання ультразвукових спектрометрів у дослідженнях, що включають аналіз конформаційних переходів полімерів, зв'язування ліганду, самозбірку та агрегацію, кристалізацію, гелеутворення, аналіз фаз переходів та фазові діаграми, моніторинг хімічних та біохімічних реакцій, вимірювання в невеликих об'ємах зразків (аж до розміру крапель) та в широкому температурному діапазоні, при навколишньому та підвищеному тиску, у різних режимах вимірювання, таких як автоматичний підвищення температури, титрування та вимірювання потоку.

Для проведення експериментальних акустичних досліджень розчинів білків в автоматичному режимі ми використали ультразвуковий спектрометр, блок схема якого детально описана в роботі.

Об'єктом досліджень було обрано сироватковий альбумін людини (САЛ), який відносять до простих глобулярних білків. Молекули цих білків складаються з 585 амінокислот. Молекулярна маса мономерної фракції альбуміну за даними різних розрахунків становить від 65000 до 68000 Да. Результати недавніх кристалографічних досліджень дозволили уточнити попередні моделі та повністю описати атомну структуру САЛ і хімічні аспекти

4 Tiago M. M., Higuti R. T., Segura L. E., Kitano C., Assunção E. and Oliveira S. L. Versatile Ultrasonic Spectrometer for Liquids With Practical Sample Handling by Using Standard Cuvettes. IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control, vol. 66, no. 1, pp. 109-118, Jan. 2019, doi: 10.1109/TUFFC.2018.2875872.

5 Buckin V., Caras Altas M. High-resolution ultrasonic spectroscopy. Acoustic Methods. P. 298 – 303. doi: 10.5162/sensor2017/C1.1; Buckin, V. High-resolution ultrasonic spectroscopy, J. Sens. Sens. Syst., 7, 207–217, <https://doi.org/10.5194/jsss-7-207-2018>, 2018.

зв'язування ним лігандів⁶. Згідно цих даних, вторинна структура САЛ складається з 28 спіралей, що містять від 5 до 31 амінокислот. Таким чином, приблизно 67% ланцюга САЛ припадає на α -спіралі, а решта – на повороти і витягнутий поліпептид. Тривимірна структура альбуміну утворена періодичною серією із шести спіральних субдоменів. Ці субдомени з'єднані в молекулу, форма якої може бути апроксимована суцільним рівнобічним трикутником з довжиною сторін $\sim 80 \text{ \AA}$ і товщиною $\sim 30 \text{ \AA}$. У відповідності з внутрішньою гомологією амінокислотної послідовності в молекулі повторюються три структурно гомологічних домени I, II і III, кожен з яких містить по 10 спіральних утворень і складається з двох субдоменів, A і B⁷.

Зміни форми і розмірів САЛ у водних розчинах останнім часом були підтверджені структурними дослідженнями. В роботі⁸ методом мало-кутового рентгенівського розсіювання було отримано радіус інерції молекули САЛ, який коливається в межах (26,7 – 34,5) $\text{\AA}$ при змінах pH в межах (2,5 – 7,0). Подібний ефект від зміни pH був встановлений також для гідродинамічного розміру САЛ методом динамічного розсіювання світла⁹. Мінімальний стоксівський радіус 30-31 $\text{\AA}$ спостерігався в цих експериментах при умовах близьких до фізіологічних (pH=7.4). Помірне відхилення pH від фізіологічних значень в той чи інший бік в межах (5.4 – 8,0) приводило до зростання стоксівського радіуса до (34 – 40) $\text{\AA}$. Відмінності у поведінці радіуса інерції та гідродинамічного радіуса відображають залежність гідратної оболонки від конформації САЛ.

Таким чином, крім геометричної чіткості розташування поліпептидних ланцюгів в просторі, макромолекула САЛ характеризується ще й такою важливою рисою, як висока стерична лабільність, легкість конформаційних переходів. Ця властивість є головним фактором, що забезпечує унікальну широту комплексоутворюючих властивостей білка, який здатен фіксувати низькомолекулярні сполуки різноманітної хімічної будови та стеричної структури.

Коротко поговоримо про суть проблеми. Конформаційні перебудови САЛ при зв'язуванні лігандів були зафіксовані різними методами¹⁰. При проведенні

6 X.M. He, D.C. Carter. Atomic structure and chemistry of human serum albumin // Nature.–1992.– 358. – p. 209-215.

7 Там само.

8 J.R. Olivieri, A.F. Craievich. The subdomain structure of human serum albumin in solution under different pH conditions studied by small angle X-ray scattering // Eur. Biophys. J.– 1995.–24.– p.77-84.

9 Луйк А.И., Набока Ю.Н., Могилевич С.Е., Гуца Т.О, Мищенко Н.И. Изучение структуры сывороточного альбумина человека методом динамического рассеяния света. Два типа реакций при изменениях pH и взаимодействии с физиологически активными веществами // Доповіді Національної академії наук України.– 1999.– №1.– с.179-184.

10 Луйк А.И., Лукьянчук В.Д.. Сывороточный альбумин и биотранспорт ядов.– М.: Медицина, 1984.– 224 с.

флуоресцентних досліджень було помічено, що при зв'язуванні дінитрофенольних сполук, конформаційна перебудова білка значно випереджає процес заповнення зв'язуючих центрів макромолекули¹¹. Конформаційний перехід САЛ в цьому випадку не є наслідком заповнення цих центрів молекулами ліганда, а передує йому. Комплексоутворення відбувається на фоні вже зміненої структури білка, немов би "адаптованої" для фіксації молекул ліганда. Структурні дослідження, проведені методом динамічного розсіювання світла¹², показали, що взаємодія САЛ з великим набором фармакологічних лігандів викликає перебудови, аналогічні до тих, що відбуваються при відхиленні від фізіологічних значень рН.

Теоретичне обґрунтування акустичного методу. В методі акустичної релаксації для відхилення системи від умов термодинамічної рівноваги застосовують звукові хвилі малої амплітуди. Плоска поздовжня звукова хвиля являє собою періодичні коливання локального (статичного) тиску, що поширюються в рідині адіабатично в напрямі (X) руху хвилі:

$$P = P_0 e^{-\alpha X} e^{i\omega \left(t - \frac{X}{u} \right)}, \quad (1)$$

де $P_0 = P(X=0)$; $\omega = 2\pi f$ – кругова частота; α – амплітудний коефіцієнт поглинання звуку в рідині. Ці коливання супроводжуються локальними періодичними змінами температури і густини (об'єму), що порушує молекулярну рівновагу і приводить до характерної частотної залежності ряду термодинамічних коефіцієнтів рідини, таких як стисливість, теплопровідність та ін. В найпростішому випадку, коли звукова хвиля порушує рівновагу лише одного молекулярного процесу, частотна залежність комплексної адіабатичної стисливості описується співвідношенням¹³:

$$\beta(\omega) = \beta_\infty + \frac{\beta_0 - \beta_\infty}{1 + i\omega \tau}, \quad (2)$$

- 11 Луйк А.И., Лукьянчук В.Д.. Сывороточный альбумин и биотранспорт ядов.– М.: Медицина, 1984.– 224 с.
- 12 Луйк А.И., Набока Ю.Н., Могилевич С.Е., Гуца Т.О, Мищенко Н.И. Изучение структуры сывороточного альбумина человека методом динамического рассеяния света. Два типа реакций при изменениях рН и взаимодействии с физиологически активными веществами // Доповіді Національної академії наук України.– 1999.– №1.– с.179-184.
- 13 J.R. Olivier, A.F. Craievich. The subdomain structure of human serum albumin in solution under different pH conditions studied by small angle X-ray scattering // Eur. Biophys. J.– 1995.–24.– p.77-84; Луйк А.И., Набока Ю.Н., Могилевич С.Е., Гуца Т.О, Мищенко Н.И. Изучение структуры сывороточного альбумина человека методом динамического рассеяния света. Два типа реакций при изменениях рН и взаимодействии с физиологически активными веществами // Доповіді Національної академії наук України.– 1999.– №1.– с.179-18; Луйк А.И., Лукьянчук В.Д.. Сывороточный альбумин и биотранспорт ядов.– М.: Медицина, 1984.– 224 с. F. Wajji, A. Rosen, R.C. Hider. The existence of conformationally labile (performed) drug binding sites in human serum albumin as evidenced by optical rotation measurements // J. Pharm. and Pharmacol. – 1993. –V. 45. – p. 551 – 558; Bree F., Urein S., Nguyen P. et al. Human serum albumin conformational changes as induced by tenoxicam and modified by simultaneous diazepam binding // J. Pharm. and Pharmacol. – 1993. – V.45. – p. 1050 – 1053; Стюер Дж., Егер Э. Распространение ультразвуковых волн в растворах электролитов. – В кн.: Физическая акустика / Под ред. У.М. Мэзона, М.: Мир, 1968, т. 2А.– с. 371 – 485.

де β_0 – рівноважна адіабатична стисливість при $\omega \rightarrow 0$, β_∞ – високочастотна границя адіабатичної стисливості при $\omega \rightarrow \infty$; τ – час релаксації, тобто характеристичний час урівноваження цього молекулярного процесу.

Із співвідношення (2) можна отримати частотні залежності для величин u і α , які безпосередньо вимірюються в акустичному експерименті¹⁴:

$$\frac{u_0^2}{u^2} = 1 - b \frac{\omega^2 \tau^2}{1 + \omega^2 \tau^2} \quad (3)$$

$$\alpha \lambda = \pi b \frac{\omega \tau}{1 + \omega^2 \tau^2} + \frac{Bu}{2\pi} \omega \quad (4)$$

де $u_0 = (\beta_0 \rho)^{-1/2}$ – низькочастотна границя швидкості звуку, $b = (\beta_0 - \beta_\infty) / \beta_0$ – релаксаційна сила, $\lambda = u/f$ – довжина звукової хвилі (1), доданок $Bu\omega/2\pi$ відображає асимптотичну поведінку величини $\alpha\lambda$ при $\omega \rightarrow \infty$.

$$(\alpha \lambda)' \equiv \alpha \lambda - \frac{Bu}{2\pi} \omega = \sum_{j=1}^N \pi b_j \frac{\omega \tau_j}{1 + \omega^2 \tau_j^2} \quad (5)$$

Параметри b_j і τ_j акустичної релаксації залежать від кінетичних і термодинамічних характеристик відповідних молекулярних процесів. Так для процесу конформаційних переходів білка у розчині, що описується мономолекулярною реакцією, цей зв'язок має такий вигляд¹⁵:

$$b = \frac{1}{RT\beta_0} \left(\frac{\theta V_M}{c_p} \Delta H - \Delta V \right)^2 \frac{K}{(1+K)^2} C \quad , \quad (6)$$

$$\tau^{-1} = k_{-1} + k_1 = k_1 (1+K) \quad , \quad (7)$$

де $\theta = \frac{1}{V} \left(\frac{\partial V}{\partial T} \right)_p$ – термодинамічно рівноважний коефіцієнт об'ємного розширення розчину; c_p – термодинамічно рівноважна молярна теплоємність при сталому тиску; V_M – молярний об'єм розчину; C – молярна концентрація білка у розчині; $K \equiv k_{12}/k_{21} = \exp[-(\Delta H - T\Delta S)/RT]$ – константа рівноваги; ΔV , ΔH і ΔS – об'ємний, тепловий і ентропійний ефекти реакції відповідно; R – універсальна газова стала; T – абсолютна температура.

Як видно із співвідношення (6), акустична релаксаційна сила відрізняється від нуля, коли процес, який протікає в рідині, супроводжується виділенням

14 Шахпаронов М.И.. Механизмы быстрых процессов в жидкостях. – М.: Высшая школа, 1980. – 352 с; Дж. Лемб. Термическая релаксация в жидкостях. – В кн.: Физическая акустика / Под ред. У.М. Мэзона, М.: Мир, 1968. т. 2А. – с. 222 – 296; Михайлов І.Г., Соловйов В.А., Сирніков Ю.П.. Основи молекулярної акустики. – М.: Наука, 1964. – 516 с; Литовиць Т., Девіс К.. Структурна та сдвігова релаксація в рідинах. – В кн.: Физическая акустика / Под ред. У.М. Мэзона, М.: Мир, 1968, т. 2А. – с. 298 – 369.

15 Михайлов І.Г., Соловйов В.А., Сирніков Ю.П.. Основи молекулярної акустики. – М.: Наука, 1964. – 516 с.

чи поглинанням теплоти, або зміною об'єму системи. Саме такі процеси і вивчаються методом акустичної релаксації.

Блок-схема ультразвукового спектрометра, який використовувався в даній роботі, зображена на рис. 1. Головною конструкцією спектрометра є резонаторна камера. Якість резонаторної камери залежить в першу чергу від паралельності перетворювачів. Вона юстується стисненням м'яких гумових прокладок між каркасними пластинами і оболонкою камери за допомогою 3-х гвинтів. При такому юстуванні досягався коефіцієнт добротності резонатора $\sim 10^4$, що цілком забезпечило необхідну точність вимірювання швидкості ультразвуку $\pm 0,02\%$. Така точність вимагала температурної стабільності резонатора не гірше $0,02^\circ\text{C}$, що досягалося шляхом циркуляції води від термостата у каналах каркасних пластин камери і всередині ізоляційного кожуха, яким накривався резонатор. Об'єм резонаторної камери може змінюватись в межах від 2 до 15 мл при заміні оболонки. Частотний діапазон вимірювань: від 0,1 до 15 МГц, що передбачає використання кварцевих перетворювачів з різною фундаментальною частотою (1; 2; 4; 7 та 10 МГц).

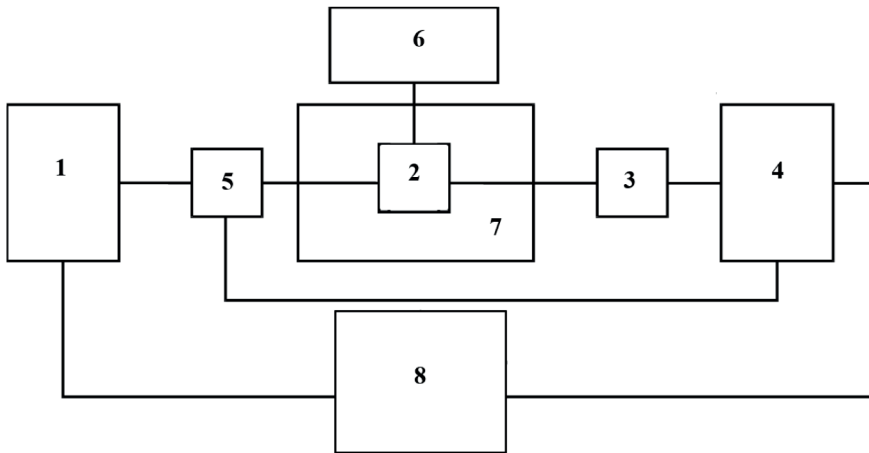


Рис. 1. Блок-схема ультразвукового спектрометра.

- 1 – генератор синусоїдальних хвиль; 2 – резонаторна камера;
 3 – підсилювач вихідного сигналу, що узгоджує імпеданс вихідного перетворювача резонаторної камери з 4 – приладом для вимірювання відношення рівнів напруг резонатора та опорного сигналу;
 5 – дільник сигналу; 6 – платиновий термометр опору; 7 – рідинний термостат;
 8 – комп'ютер для управління вимірюванням резонансних спектрів.

Для вимірювання ультразвукових резонансних спектрів в автоматичному режимі генератор (1) та вимірювач рівнів напруг (2) були з'єднані з персональним комп'ютером (7) через стандартний інтерфейс (IEEE 488).

Для чутливого контролю температури в резонаторній камері платиновий термометр (6) був також з'єднаний з персональним комп'ютером (7) з допомогою вимірювального модуля (ICP CON i-7013D) та аналого-цифрового перетворювача (ICP CON i-7520).

Для автоматизації процесу вимірювань була створена програма Resotest, яка включає алгоритми автоматичного запису амплітуди та фази вихідного сигналу резонатора, а також графічного зображення отриманої інформації. Необхідні діапазон та дискретність по частоті в програмі задаються оператором. Для контролю за температурою зразка створена програма Temperature, яка графічно зображає на дисплеї персонального комп'ютера зміни температури з часом. Алгоритми програм Resotest та Temperature реалізовані мовою C++ в середовищі Windows.

Типовий спектр рідкого зразка, отриманий на описаному ультразвуковому спектрометрі з допомогою розробленого програмного забезпечення, зображено на рис. 2. Піки відповідають утворенню стоячої хвилі, тобто умові, коли довжина резонатора x_L дорівнює цілому числу n пів довжин звукової хвилі $x_L = n \lambda / 2$. Враховуючи, що $\lambda = u / f_n$, отримаємо частоти максимумів для резонансних піків:

$$f_n = n u / 2 x_L \quad (8)$$

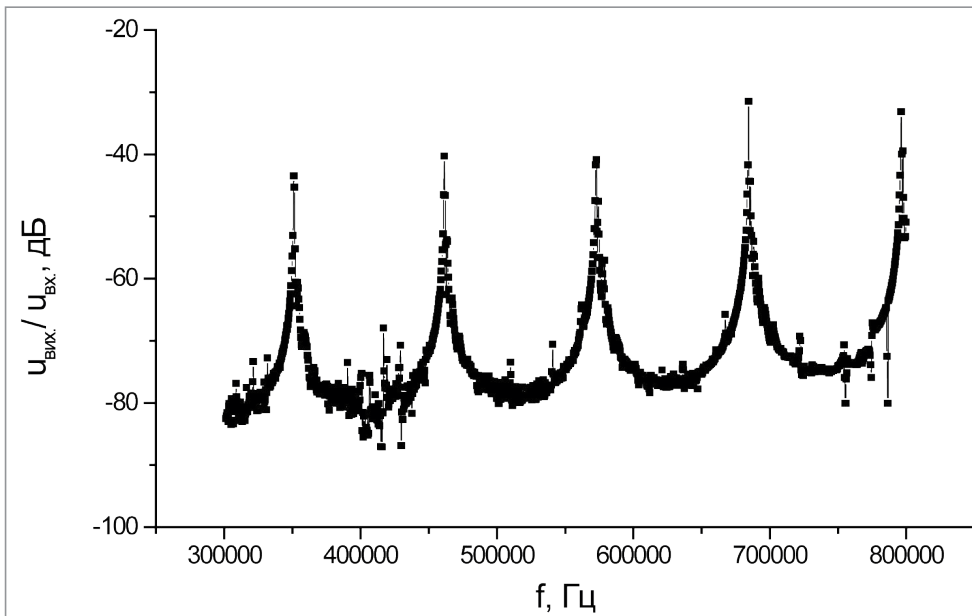


Рис. 2. Частина амплітудно-частотної характеристики ультразвукового резонатора, заповненого водою (20 °C).

У кожному із досліджених розчинів вимірювали відношення $U_{\text{вих.}}/U_{\text{вх.}}$ амплітуди вихідного і вхідного сигналів резонатора від частоти з кроком 1 – 3 Гц для 20 – 30 обертонів ($n = 3 – 30$). На рис. 3 і 4 для прикладу зображені спектри різних резонансних піків, отриманих для води і для 4 %-ого водного розчину САЛ.

Положення максимумів резонансних піків f_n визначали при апроксимації експериментальних спектрів в області двох півширин піку теоретичним співвідношенням:

$$\dot{O}_{\text{LOR}}(f) = \left(\frac{U_{\text{вх.}}}{U_{\text{вх.}}} \right)^2 = \frac{E_0^2}{(\alpha x_L)^2 + [\pi(f - f_n)/f_L]^2}, \quad (9)$$

з використанням нелінійного методу найменших квадратів. В співвідношенні (2) амплітудний множник E_0 – функція передачі п'єзоперетворювачів, що є постійною поблизу резонансного піку; α – амплітудний коефіцієнт поглинання звуку, що визначається із півширини Δf (повна ширина функції $T_{\text{LOR}}(f)$ на половині висоти) резонансного піку:

$$\Delta f = \alpha u / \pi \quad (10)$$

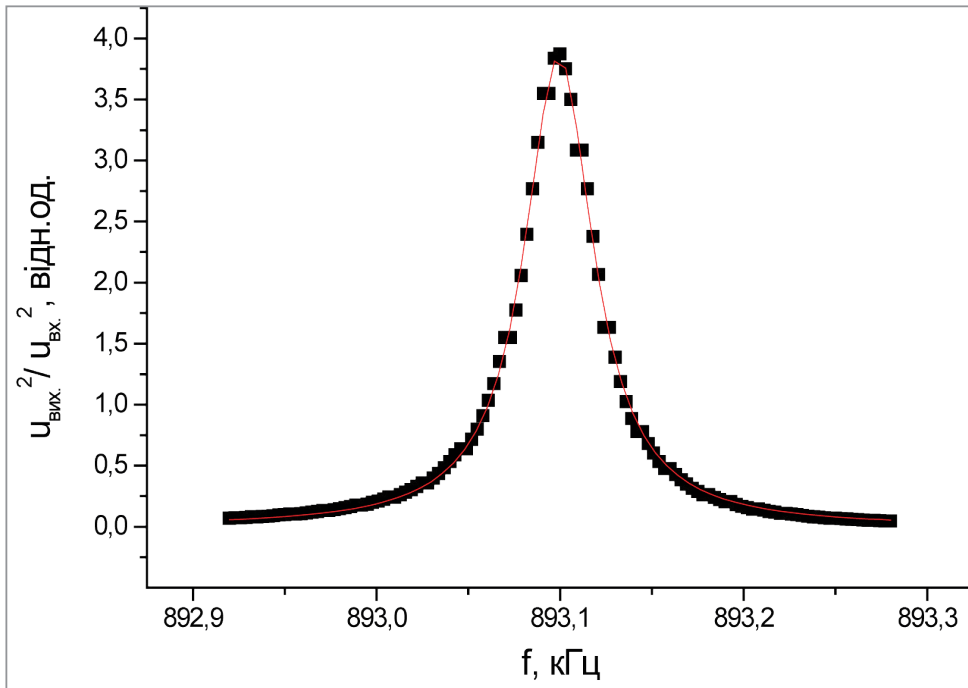


Рис. 3. Спектр 8-го обертону резонатора, заповненого водою, 25 °С.
Точками позначені експериментальні дані, а суцільною лінією –
результат їх апроксимації формулою (2.3.4):
 $f_L = 111,610$ кГц; $f_n = 893,099$ кГц; $\Delta f = 45,6$ Гц.

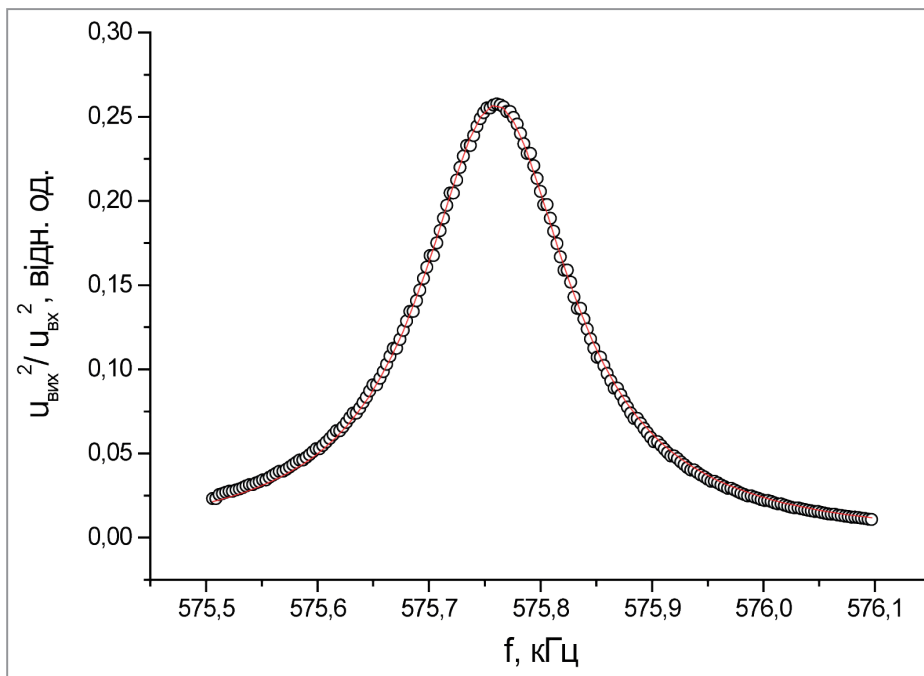


Рис. 4. Спектр 5-го обертону резонатора, заповненого розчином 4% САЛ у воді, 20 °С. Точками позначені експериментальні дані, а суцільною лінією – результат їх апроксимації формулою (2.3.4): $f_L = 114,242$ кГц; $f_n = 575,759$ кГц; $\Delta f = 159,9$ Гц).

Проведений аналіз показав, що застосування розроблених програм забезпечує сумарні похибки вимірювання швидкості звуку $\left(\frac{\delta u}{u}\right) = \pm 1,4 \cdot 10^{-2} \%$ та коефіцієнта поглинання звуку $\frac{\delta \alpha}{\alpha} \approx \pm 7 \%$ на рівні, достатньому для досліджень релаксаційних параметрів у розчинах білків.

Аналіз літературних даних вказує на перспективність поєднання методів акустичної релаксації та молекулярного моделювання при дослідженні впливу зовнішніх шкідливих факторів на динаміку білків у розчині. Програмне забезпечення для вимірювання низькочастотних акустичних спектрів забезпечило необхідну точність дослідження параметрів акустичної релаксації у розчинах білків. Оригінальний алгоритм конформаційного пошуку для довгих пептидних ланцюгів дозволив отримати різні стабільні конформації виділеної ділянки пептидного ланцюга білка і їх орієнтацію відносно решти молекули.