

Широкополосная диэлектрическая спектроскопия раствора альбумина человека при физиологических температурах

© Ж.А. Сальникова, А.А. Кононов, А.П. Смирнов, Р.А. Кастро

Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, Институт физики,
191186 Санкт-Петербург, Россия
e-mail: jannete90@mail.ru

Поступило в Редакцию 22 ноября 2024 г.

В окончательной редакции 20 февраля 2025 г.

Принято к публикации 24 февраля 2025 г.

Определены и проанализированы параметры релаксационных процессов в растворе альбумина человека методом диэлектрической спектроскопии через анализ поведения комплексного электрического модуля в широком диапазоне частот 1 Hz–2 GHz и в области физиологических температур 33 °C–42 °C. Обнаружено три релаксационных процесса и на основе их аппроксимации уравнением Гаврильяка–Негами для комплексного электрического модуля определены их релаксационные параметры α , β , τ_0 , построены функции распределения времен релаксаторов $G(\tau)$, а также вычислены их энергии активации E_a . Сделаны предположения касательно идентификации возможных кинетических единиц, ответственных за данные процессы.

Ключевые слова: комплексный электрический модуль, релаксационные параметры, уравнение Гаврильяка–Негами, функция распределения времен релаксаторов.

DOI: 10.61011/JTF.2025.06.60474.427-24

Введение

В физике диэлектриков широко используется метод диэлектрической спектроскопии, т.е. исследования частотных зависимостей удельной электропроводности, диэлектрической проницаемости и фактора диэлектрических потерь [1–3] при различных температурах. Этим методом исследуются как синтетические полимеры разного типа [4–6], так и биополимеры [7–9]. Метод диэлектрической спектроскопии позволяет связать диэлектрические свойства исследуемого образца с электрическими свойствами молекул его образующих, в частности, с их дипольными моментами, а также сделать некоторые выводы о потенциалах внутримолекулярных вращений и межмолекулярных взаимодействиях [10–14]. Анализ максимумов на частотной зависимости фактора диэлектрических потерь позволяет определять релаксационные параметры диэлектриков, при этом часто используется эмпирическое уравнение Гаврильяка–Негами. Однако при высокой электропроводности на частотных зависимостях фактора диэлектрических потерь не удается обнаружить релаксационные максимумы. Для их обнаружения целесообразно применять метод комплексного электрического модуля [15].

Альбумин человека — один из основных белковых компонентов крови, содержащийся в ее сыворотке и выполняющий функции транспорта различных веществ, а также поддерживающий осмотическое давление крови. Он составляет около 55 % от всех содержащихся в сыворотке крови белков. За сутки в организме человека вырабатывается 10–15 г альбумина. Молекула альбумина — глобулярный белок с массой порядка 67 kDa, состоящий

из одной полипептидной цепи и 585 аминокислотных остатков, расположение которых представлено, например, в [16]. Альбумин относится к классу альфа-белков. Его вторичная структура состоит из альфа-спиралей (50%–68%) и бета-складок (16%–18%), а также неупорядоченной части макромолекулы [17]. Благодаря 17 дисульфидным мостикам образуется третичная структура, состоящая из трех доменов, каждый из которых состоит из двух поддоменов, содержащих 6 и 4 альфа-спирали соответственно. При этом гидрофобные взаимодействия между доменами формируют глобулярную структуру молекулы альбумина. Гидродинамический радиус молекул альбумина в водном растворе составляет 4.2 nm [18], а конформация может быть представлена в виде несимметричного сплющенного эллипсоида [19]. Молекула альбумина содержит порядка сотни пар положительных и отрицательных аминокислотных остатков (99 положительных и 126 отрицательных [20]). При этом дипольный момент молекулы альбумина составляет порядка 500 D [21], что и определяет ее электрические свойства в растворе. Обобщенная информация об альбумине представлена в [22].

Цель настоящей работы — исследование диэлектрических свойств раствора сывороточного альбумина человека при физиологических температурах в широком диапазоне частот. Путем анализа поведения частотных зависимостей вещественной и мнимой компонент комплексного электрического модуля удалось обнаружить релаксационные максимумы, исследование которых позволило определить релаксационные параметры α , β , τ_0 и на их основе построить функцию распределения времен релаксаторов и рассчитать энергию активации

обнаруженных процессов. Поскольку альбумин человека является одним из основных белков его сыворотки крови, то при анализе значений релаксационных параметров α, β, τ_0 образцов сыворотки крови можно выделить вклад соответствующих релаксационных параметров альбумина. Это может быть актуально при анализе релаксационных параметров сыворотки крови здоровых доноров и больных пациентов и представлять интерес при анализе развития заболеваний, а также при разработке лекарств для лечения больных пациентов.

1. Анализ диэлектрических спектров

1.1. Релаксационные уравнения

Для анализа релаксационных свойств диэлектриков используется понятие комплексной диэлектрической проницаемости $\epsilon^*(f)$, которая определяется выражением: $\epsilon^*(f) = \epsilon'(f) - i\epsilon''(f)$, где f — частота приложенного электрического поля, $\epsilon'(f)$ — вещественная часть комплексной диэлектрической проницаемости, которая называется диэлектрической проницаемостью среды и характеризует степень экранирования внешнего электрического поля, $\epsilon''(f)$ — мнимая часть комплексной диэлектрической проницаемости, которая называется фактором диэлектрических потерь и характеризует поглощение энергии с превращением ее в тепловую форму. Значения $\epsilon'(f)$ и $\epsilon''(f)$ определяются экспериментально с помощью диэлектрических спектрометров.

Процессы диэлектрической релаксации в общем виде описываются уравнением Гаврильяка–Негами (ГН) [23]:

$$\epsilon^*(\omega) = \epsilon_\infty + \frac{\epsilon_s - \epsilon_\infty}{(1 + (i\omega\tau_0)^{1-\alpha})^{1-\beta}}, \quad (1)$$

где $\epsilon_s, \epsilon_\infty$ — статическая и высокочастотная диэлектрическая проницаемость $\epsilon'(f)$ (ϵ_s — при $f \rightarrow 0, \epsilon_\infty$ — при $f \rightarrow \infty$), $\omega = 2\pi f$ — циклическая частота, τ_0 — наиболее вероятное время релаксации кинетических единиц образца (молекул, их отдельных частей, а также молекулярных комплексов), α — ширина релаксационного спектра, β — диссимметрия этого спектра. Данные параметры изменяются в следующих пределах: $0 \leq \alpha < 1, 0 \leq \beta < 1$. Чем больше величина α , тем больше частотная дисперсия численных значений времен релаксации кинетических единиц образца τ относительно τ_0 , т.е. шире релаксационный спектр, поэтому в формуле целесообразно использовать величину $1-\alpha$; чем больше β , тем больше его диссимметрия, т.е. степень отклонения спектра от симметричного вида, поэтому в формуле целесообразно использовать величину $1-\beta$. Для случая дебаевского спектра $\alpha = 0, \beta = 0$.

Параметры α, β, τ_0 являются основными релаксационными параметрами объекта исследования.

Из теоретического описания диэлектрической релаксации кинетических единиц образца, рассматриваемых в виде независимых диполей с несколькими дискретными

состояниями ориентации, следует наличие диполей с различными временами релаксации τ [24]. Кооперативный характер переориентации молекулы, рассматриваемой в виде диполя, заключается в ее одиночных скачкообразных поворотах под действием внешнего поля, при которых вероятность ее переориентации и энергия активации зависят от ориентации соседей, что, в свою очередь, приводит к возникновению спектра времен релаксации [25], характеризуемой функцией $G(\tau)$ распределения времен релаксации кинетических единиц образца τ относительно τ_0 . Аналитическое выражение для функции $G(\tau)$ может быть представлено в виде [26]:

$$G(\tau) = \frac{(\tau/\tau_0)^{(1-\alpha)(1-\beta)} \sin((1-\beta)\theta)}{\pi\tau [(\tau/\tau_0)^{2(1-\alpha)} + 2(\tau/\tau_0)^{(1-\alpha)} \cos(\pi(1-\alpha)) + 1]^{\frac{1-\beta}{2}}}, \quad (2)$$

где

$$\theta = \arctg \left[\frac{\sin(\pi(1-\alpha))}{(\tau/\tau_0)^{(1-\alpha)} + \cos(\pi(1-\alpha))} \right], \quad 0 \leq \theta \leq \pi.$$

Полуширина функции $G(\tau)$ определяется параметром α , а ее диссимметрия параметром β . Чем больше эти параметры, тем более широкой и диссимметричной является функция $G(\tau)$.

При $\alpha = 0$ и $\beta = 0$ уравнение ГН переходит в уравнение Дебая [27]:

$$\epsilon^*(\omega) = \epsilon_\infty + \frac{\epsilon_s - \epsilon_\infty}{1 + i\omega\tau_0}. \quad (3)$$

В этом случае $G(\tau)$ является дельта-функцией $\delta(\tau_0)$ [3], что соответствует состоянию, при котором все кинетические единицы образца обладают одинаковым временем релаксации τ_0 .

При $\alpha \neq 0$ и $\beta = 0$ уравнение ГН переходит в уравнение Коула–Коула [28]:

$$\epsilon^*(\omega) = \epsilon_\infty + \frac{\epsilon_s - \epsilon_\infty}{1 + (i\omega\tau_0)^{1-\alpha}}. \quad (4)$$

В этом случае $G(\tau)$ является симметричной функцией относительно τ_0 [3] и ее олуширина определяется параметром α .

При $\alpha = 0$ и $\beta \neq 0$ уравнение ГН переходит в уравнение Дэвидсона–Коула [29]:

$$\epsilon^*(\omega) = \epsilon_\infty + \frac{\epsilon_s - \epsilon_\infty}{(1 + i\omega\tau_0)^{1-\beta}}. \quad (5)$$

В этом случае $G(\tau)$ является диссимметричной функцией относительно τ_0 [3] и степень ее диссимметрии определяется параметром β .

Параметры α, β, τ_0 и функцию $G(\tau)$ можно определить, если имеются релаксационные максимумы на полученной экспериментально зависимости $\epsilon''(f)$. Если же эти релаксационные максимумы не удастся обнаружить (как в нашем случае), то определение данных параметров этим методом становится невозможным. Ввиду

этого, нами был применен метод анализа вещественной и мнимой компонент комплексного электрического модуля, который ранее использовался для диэлектрических исследований сыворотки крови при различных онкологических заболеваниях [30], хроническом лимфолейкозе [31,32], карциноме Эрлиха [33], онкогематологических заболеваниях [34], а также для синтетического полимера на основе амидных (в биофизике — пептидных) групп — полиамида СПА-3 [35], являющегося хорошей моделью внутримолекулярных движений в пептидных группах биополимеров.

1.2. Метод комплексного электрического модуля

Комплексным электрическим модулем $M^*(\omega)$ называется величина обратной комплексной диэлектрической проницаемости, определяемая выражением

$$M^*(\omega) = M'(\omega) + iM''(\omega).$$

Величины $M'(\omega)$, $M''(\omega)$ называются соответственно вещественной и мнимой компонентами комплексного электрического модуля. Они равны

$$M'(\omega) = \frac{\varepsilon'(\omega)}{\varepsilon'^2(\omega) + \varepsilon''^2(\omega)}, \quad (6)$$

$$M''(\omega) = \frac{\varepsilon''(\omega)}{\varepsilon'^2(\omega) + \varepsilon''^2(\omega)}. \quad (7)$$

Из уравнения ГН (1) математически можно вывести теоретические уравнения для $M'(\omega)$ и $M''(\omega)$ [36]:

$$M'(\omega) = \frac{A^{1-\beta} M_\infty M_s [A^{1-\beta} M_s + (M_\infty - M_s) \cos(1-\beta)\varphi]}{A^{2(1-\beta)} M_s^2 + 2A^{1-\beta} M_s (M_\infty - M_s) \cos(1-\beta)\varphi + (M_\infty - M_s)^2}, \quad (8)$$

$$M''(\omega) = \frac{A^{1-\beta} M_\infty M_s (M_\infty - M_s) \sin(1-\beta)\varphi}{A^{2(1-\beta)} M_s^2 + 2A^{1-\beta} (M_\infty - M_s) M_s \cos(1-\beta)\varphi + (M_\infty - M_s)^2}, \quad (9)$$

где

$$M_\infty = \frac{1}{\varepsilon_\infty}, \quad M_s = \frac{1}{\varepsilon_s},$$

$$A = \left[1 + 2(\omega\tau_0)^{1-\alpha} \sin \frac{\pi\alpha}{2} + (\omega\tau_0)^{2(1-\alpha)} \right]^{1/2},$$

$$\varphi = \arctg \left[\frac{(\omega\tau_0)^{1-\alpha} \cos \frac{\pi\alpha}{2}}{1 + (\omega\tau_0)^{1-\alpha} \sin \frac{\pi\alpha}{2}} \right].$$

Стоит отметить, что параметры ε_s , ε_∞ , ω , а также α , β , τ_0 — имеют такой же физический смысл, что и в уравнении (1).

Экспериментально измеряемыми величинами, как правило, являются $\varepsilon'(f)$ и $\varepsilon''(f)$. Согласно формулам (6), (7), осуществляется построение зависимостей

$M'(\omega)$, $M''(\omega)$ и их последующая аппроксимация по формулам (8) и (9). При построении аппроксимирующих кривых используется метод наименьших квадратов. Релаксационные параметры α , β , τ_0 определяют эмпирически из принципа наилучшей одновременной аппроксимации графиков $M''(\omega)$, $M'(\omega)$, $M''(M')$.

2. Методика эксперимента

2.1. Образцы

Образцы для экспериментов представляли собой реализуемый в сети аптек РФ альбумин человеческого 20% производства Бакстер АГ, Австрия. Состав образцов: альбумин человека — 200 г/л; натрия хлорид — 3 г/л; натрия каприлат — 2.7 г/л; натрия ацетилтриптофан — 4.3 г/л; вода для инъекций — до 1 л. Общее содержание натрия 100–130 ммоль/л.

2.2. Используемое оборудование и методика измерений

Измерения диэлектрических спектров были проведены на спектрометре Novocontrol Concept 81 центра коллективного использования РГПУ им. А.И. Герцена [37] в диапазоне частот $f = 1-2 \cdot 10^9$ Hz, и диапазоне температур 33 °C–42 °C. В области низких частот $f = 1-3 \cdot 10^6$ Hz измерения производились методом „вольтметра–амперметра“, а в области высоких частот $f = 3 \cdot 10^6-2 \cdot 10^9$ Hz микроволновым методом с использованием коаксиальной системы.

В методе „вольтметра–амперметра“ на измеряемый образец с генератора подается переменное напряжение $U_0(\omega)$ и измеряется проходящий через него ток:

$$I^*(\omega) = I_a(\omega) + i I_p(\omega),$$

где $I_a(\omega)$ и $I_p(\omega)$ — активная и реактивная компоненты тока. Комплексный импеданс $Z^*(\omega)$ вычисляется по формуле

$$Z^*(\omega) = Z'(\omega) + i Z''(\omega) = \frac{U_0(\omega)}{I^*(\omega)},$$

Емкость $C(\omega)$ и электропроводность $\sigma'(\omega)$ образца вычисляются по формуле

$$Z'(\omega) + i Z''(\omega) = \frac{1}{\sigma'(\omega)} + \frac{1}{i\omega C(\omega)}.$$

Диэлектрическая проницаемость $\varepsilon'(\omega)$ вычисляется по формуле плоского конденсатора

$$C(\omega) = \frac{\varepsilon'(\omega)\varepsilon_0 S}{d}.$$

Фактор потерь $\varepsilon''(\omega)$ вычисляется по формуле

$$\varepsilon''(\omega) = \varepsilon'(\omega) \operatorname{tg} \delta(\omega),$$

Значения релаксационных параметров α , β , τ_0 (в соответствии с уравнением (1))*

$T, \text{ }^\circ\text{C}$	Первый релаксационный процесс: $f = 10^1 - 10^2 \text{ Hz}$			Второй релаксационный процесс: $f = 10^4 - 10^5 \text{ Hz}$			Третий релаксационный процесс: $f = 10^8 - 10^9 \text{ Hz}$		
	α_1	β_1	$\tau_{0_1} (s)$	α_2	β_2	$\tau_{0_2} (s)$	α_3	β_3	$\tau_{0_3} (s)$
33	0.09	0.62	$3.7 \cdot 10^{-2}$	0.35	0.02	$5.7 \cdot 10^{-6}$	0.00	0.37	$9.80 \cdot 10^{-10}$
34	0.05	0.73	$4.5 \cdot 10^{-2}$	0.32	0.00	$5.7 \cdot 10^{-6}$	0.00	0.35	$9.81 \cdot 10^{-10}$
35	0.03	0.74	$3.4 \cdot 10^{-2}$	0.31	0.01	$5.6 \cdot 10^{-6}$	0.00	0.38	$9.77 \cdot 10^{-10}$
36	0.02	0.74	$2.6 \cdot 10^{-2}$	0.30	0.03	$5.3 \cdot 10^{-6}$	0.00	0.38	$9.73 \cdot 10^{-10}$
37	0.00	0.74	$2.1 \cdot 10^{-2}$	0.30	0.02	$5.1 \cdot 10^{-6}$	0.00	0.30	$9.74 \cdot 10^{-10}$
38	0.04	0.72	$1.6 \cdot 10^{-2}$	0.29	0.05	$5.1 \cdot 10^{-6}$	0.00	0.34	$9.65 \cdot 10^{-10}$
39	0.09	0.70	$1.6 \cdot 10^{-2}$	0.29	0.07	$5.1 \cdot 10^{-6}$	0.00	0.35	$9.65 \cdot 10^{-10}$
40	0.30	0.43	$9.1 \cdot 10^{-3}$	0.32	0.07	$5.2 \cdot 10^{-6}$	0.00	0.35	$9.60 \cdot 10^{-10}$
41	0.28	0.41	$7 \cdot 9 \cdot 10^{-3}$	0.33	0.09	$5.2 \cdot 10^{-6}$	0.00	0.32	$9.59 \cdot 10^{-10}$
42	0.28	0.40	$6.9 \cdot 10^{-3}$	0.34	0.08	$5.2 \cdot 10^{-6}$	0.00	0.31	$9.56 \cdot 10^{-10}$

Примечание. * — погрешность аппроксимации для параметров α, β не превышала 0.02; для параметра τ_0 не превышала 10%. При значениях α, β около 0.0 их погрешность не превышала 0.01.

где

$$\text{tg } \delta(\omega) = \frac{I_a(\omega)}{I_p(\omega)}$$

— тангенс угла диэлектрических потерь.

В микроволновом методе на измеряемый образец подается электромагнитная волна, и измеряется комплексный коэффициент отражения $r^*(l)$. Комплексный импеданс $Z_s^*(\omega)$ вычисляется по формуле

$$Z_s^*(\omega) = Z_0 \frac{1 + r^*(l)}{1 - r^*(l)},$$

где Z_0 — входное сопротивление волновода длиной l . На основе $Z_s^*(\omega)$ вычисляются все необходимые параметры: $C(\omega)$, $\text{tg } \delta(\omega)$, $\epsilon'(\omega)$, $\epsilon''(\omega)$, $\sigma'(\omega)$. Точность определения импеданса составляла 0.1%.

Измерения производились с использованием ячейки BDS 1308 (Novocontrol Technologies GmbH & Co), предназначенной для работы с жидкостями.

Для сбора и отображения результатов измерений использовалось программное обеспечение WinDeta (Novocontrol Technologies GmbH, Германия).

Значения релаксационных параметров α, β, τ_0 , а также функцию распределения времен релаксации $G(\tau)$ кинетических единиц определяли путем аппроксимации экспериментальных кривых $M'(\omega)$ (6), $M''(\omega)$ (7), $M''(M')$ по уравнению ГН для электрического модуля с использованием программного обеспечения WinFit (Novocontrol Technologies GmbH & Co), осуществляющего аппроксимацию $M'(\omega)$ и $M''(\omega)$ по уравнениям (8) и (9) методом наименьших квадратов.

Погрешность аппроксимации для параметров α, β не превышала 0.02; для параметра τ_0 не превышала 10%. При значениях α, β около 0.0 их погрешность не превышала 0.01.

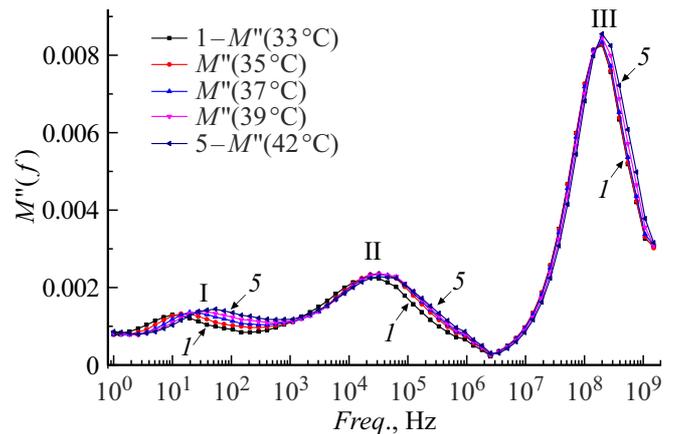


Рис. 1. Частотная зависимость мнимой части электрического модуля $M''(f)$ при температурах 33 °С–42 °С.

3. Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлены частотные зависимости $M''(f)$ при температурах 33 °С–42 °С. На данных зависимостях наблюдаются три максимума: первый при $f = 10^1 - 10^2 \text{ Hz}$, второй при $f = 10^4 - 10^5 \text{ Hz}$, третий при $f = 10^8 - 10^9 \text{ Hz}$. Для всех максимумов параметры α, β, τ_0 определялись с помощью уравнения ГН для электрического модуля с использованием программы WinFit, согласно методике, изложенной в разд. 2.2. Результаты вычислений данных релаксационных параметров представлены в таблице.

Сдвиг максимумов $M''(f)$ в область высоких частот с увеличением температуры указывает на наличие трех релаксационных процессов. При этом первый и второй

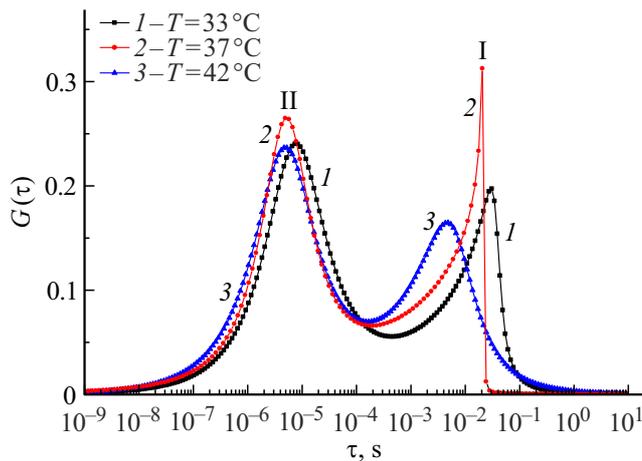


Рис. 2. Функция распределения времен релаксаторов $G(\tau)$ для первого (I) и второго (II) релаксационных процессов при разной температуре: 1 — 33 °С, 2 — 37 °С, 3 — 42 °С.

процессы частично перекрываются. Первый процесс заканчивается при частоте $f \sim 10^3$ Hz (рис. 1), однако при этом $M''(f) \neq 0$, т. е. начинается второй релаксационный процесс. На рис. 2 представлена функция распределения времен релаксаторов $G(\tau)$ для первого и второго релаксационных процессов, построенная по уравнению (2) с использованием программы WinFit.

Видно, что первый и второй релаксационные процессы действительно частично накладываются. Следует отметить, что степень диссимметрии $G(\tau)$ первого релаксационного процесса определяется большим значением параметра β_1 ($\beta_1 \approx 0.7$), а полуширина $G(\tau)$ второго релаксационного процесса определяется большим значением параметра α_2 ($\alpha_2 \approx 0.3$). Рассмотрим подробнее каждый релаксационный процесс.

3.1. Первый релаксационный процесс

Первый релаксационный процесс, соответствующий максимуму $M''(f) \approx 1.5 \cdot 10^{-3}$, наблюдается при температурах $T = 33$ °С–42 °С в частотном диапазоне $f = 10^1$ – 10^2 Hz (рис. 1). В диапазоне температур $T = 33$ °С–9 °С этот процесс хорошо описывается уравнением Дэвидсона–Коула (5), так как $\alpha_1 \approx 0$ и $\beta_1 \approx 0.7$.

На рис. 3 представлены температурные зависимости релаксационных параметров $\alpha_1(T)$, $\beta_1(T)$ для этого процесса.

На графике рис. 3 при температуре 37 °С отчетливо виден минимум α_1 , а также в диапазоне температур 35 °С–37 °С — максимум β_1 . Уменьшение параметра α_1 , возможно, связано с тем, что уменьшаются различия в размерах кинетических единиц. Данный вывод можно сделать исходя из того, что для дебаевского спектра $\alpha = 0$ и в этом случае кинетические единицы в системе имеют практически одинаковый размер. Увеличение параметра β означает, что спектр становится менее симметричным, так как для дебаевского спектра $\beta = 0$

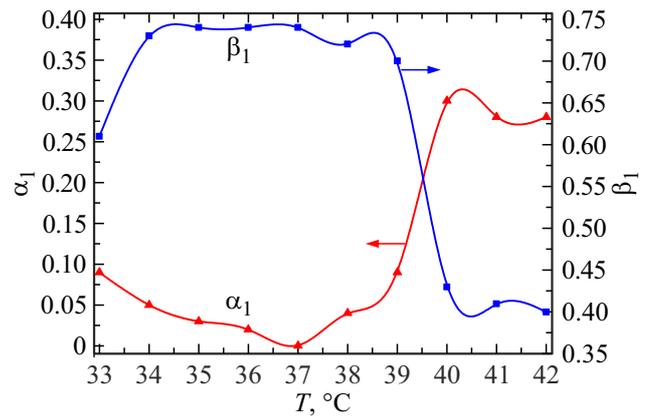


Рис. 3. Температурные зависимости релаксационных параметров $\alpha_1(T)$ и $\beta_1(T)$ первого релаксационного процесса.

и в этом случае кинетические единицы в системе обладают идентичной формой. Очень большое значение, в частности, $\beta \sim 0.7$ означает, что формы кинетических единиц являются существенно разными. Таким образом, одновременное уменьшение параметров α и увеличение β может быть связано с изменением конформации кинетических единиц первого релаксационного процесса.

В диапазоне температур 39 °С–40 °С происходит одновременно сильное изменение параметров α_1 и β_1 : параметр α_1 увеличивается в 3 раза от 0.1 до 0.3, а параметр β_1 уменьшается почти в 2 раза от 0.7 до 0.42. Данные изменения могут также быть объяснены изменением конформации кинетических единиц первого релаксационного процесса. При дальнейшем росте температур 40 °С–42 °С данные параметры остаются практически постоянными.

Для расчета энергии активации процесса дипольной поляризации было использовано уравнение [38]:

$$\tau_0 = A e^{E_a/kT}, \quad (10)$$

где A — постоянная для данной жидкости, E_a — энергия активации, k — постоянная Больцмана, T — температура, [°K].

После логарифмирования уравнения (10) получается следующее уравнение:

$$\ln \tau_0 = \ln A + \frac{E_a}{kT}.$$

В свою очередь, после ввода обозначений: $y = \ln \tau_0$, $x = 1000/T$, $\ln A = C$, получается уравнение прямой:

$$y = C + \frac{E_a}{1000k} x. \quad (11)$$

После построения данной прямой в декартовой системе координат на основе данных $\tau_{0,1}$, T из таблицы, нами была определена энергия активации E_a по следующей

формуле:

$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{E_a}{1000k}, \quad (12)$$

где α — угол наклона прямой (11).

На рис. 4 представлен график зависимости $\ln \tau_{0-1}$ от $(1000/T)$ для первого процесса. Энергия активации первого релаксационного процесса оказалась равной $E_{0-1} = (1.8 \pm 0.1)$ eV, т.е. (173 ± 13) kJ/mol.

Поскольку и время релаксации и энергия активации оказались достаточно большими ($\tau_{0-1} = 6.9 \cdot 10^{-3} - 3.7 \cdot 10^{-2}$ s, $E_a = 173$ kJ/mol) соответственно, то возможные кинетические единицы первого процесса — целые молекулы альбуминов, либо крупные сегменты, например, домены, составляющие их третичную структуру. В обоих случаях первый релаксационный процесс — это дипольно-сегментальное движение, или α -процесс [6], связанный с ориентационными поворотами крупных сегментов макромолекул альбумина, либо с изменением конформации молекулы альбумина, как целого.

Об изменении конформации молекулы альбумина при физиологических температурах как о фазовом переходе первого рода типа „глобула–клубок“ было показано в работе группы Е.Б. Шадрина [39]. В этой работе отмечено, что температура фазового перехода зависит от концентрации водного раствора альбумина и при концентрации 5% составляет 38 °С. Согласно этим данным, при увеличении концентрации температура фазового перехода уменьшается. В нашем случае (концентрация альбумина в воде 20%) при температуре 37 °С мы наблюдаем минимум $\alpha_1 = 0$ и максимум $\beta_1 = 0.74$. Таким образом, минимум параметра α_1 , равный нулю, с одновременным максимумом параметра β_1 , возможно, являются индикатором фазового перехода первого рода. Стоит отметить, что в диапазоне температур 39 °С–40 °С наблюдается одновременное резкое изменение параметров α_1 и β_1 ; α_1 увеличивается в 3 раза, а β_1 уменьшается почти в 2 раза (рис. 3). При более высоких температурах параметры α_1 и β_1 изменяются незначительно.

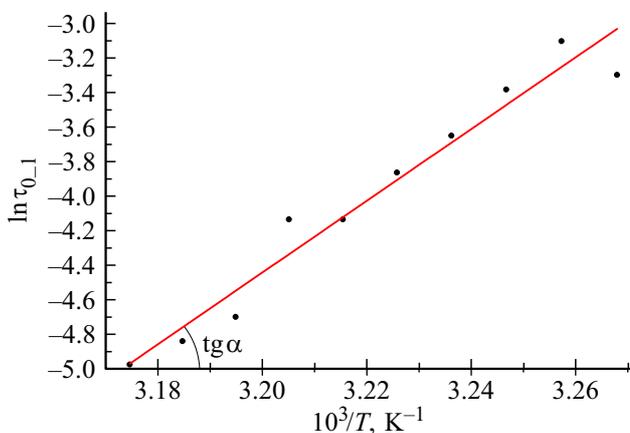


Рис. 4. Температурная зависимость времени релаксации τ_{0-1} для первого релаксационного процесса: $\ln \tau_{0-1} (1000/T)$.

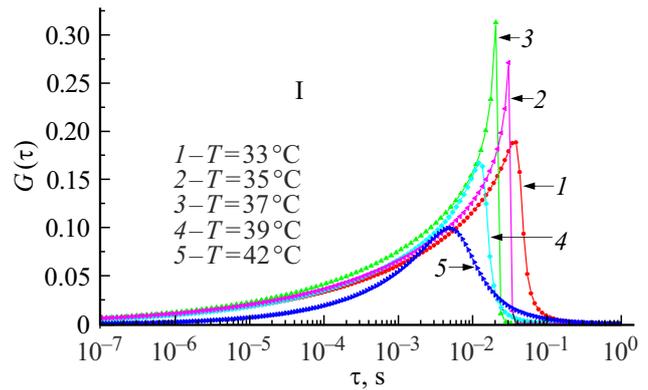


Рис. 5. Функция распределения времен релаксаторов $G(\tau)$ для первого релаксационного процесса при разной температуре: 1 — 33 °С, 2 — 35 °С, 3 — 37 °С, 4 — 39 °С, 5 — 42 °С.

Разделение функции $G(\tau)$ (рис. 2) на первый и второй процессы представлено на рис. 5 и в разд. 3.2 соответственно.

Изображенная на рис. 5 функция $G(\tau)$ для первого релаксационного процесса в диапазоне температур $T = 33^\circ\text{C} - 39^\circ\text{C}$ явно диссимметричная, что подтверждается значением параметра $\beta_1 = 0.61 - 0.74$ и при этом очень широкая (7 частотных порядков $10^{-8} - 10^{-1}$ s). При более высоких температурах $G(\tau)$ становится более симметричной, что подтверждается значением параметра $\beta_1 = 0.4$ и менее широкой (5 частотных порядков $10^{-6} - 10^{-1}$ s). Функция $G(\tau)$ достигает своего максимума при $T = 37^\circ\text{C}$, являясь при этом наиболее диссимметричной. Максимум $G(\tau)$ при $T = 37^\circ\text{C}$ приходится на $\tau_{0-1} = 2.1 \cdot 10^{-2}$ s, при этом присутствуют релаксаторы с τ вплоть до 10^{-8} s (6 частотных порядков относительно τ_{0-1}), но отсутствуют релаксаторы с $\tau > 6 \cdot 10^{-2}$ s (менее 1/2 частотного порядка относительно τ_{0-1}). Такое распределение релаксаторов можно объяснить тем, что наблюдается суперпозиция движений скелета основной цепи молекулы альбумина и внутренних вращений в боковых полярных группах, сильно сцепленных с основной цепью молекулы. При таких движениях может наблюдаться единый процесс [40], а функция $G(\tau)$ становится существенно диссимметричной [40].

3.2. Второй релаксационный процесс

Второй релаксационный процесс, соответствующий максимуму $M''(f) \approx 2 \cdot 10^{-3}$, наблюдается при температурах $T = 33^\circ\text{C} - 42^\circ\text{C}$ в частотном диапазоне $f = (10^4 - 10^5)$ Hz (рис. 1). С увеличением температуры наблюдается сдвиг максимума M'' в область высоких частот, что указывает на релаксационный процесс, связанный с ориентационными поворотами кинетических единиц макромолекул альбуминов. Однако данный сдвиг существенно меньше, чем в первом процессе. В диапазоне температур $T = 33^\circ\text{C} - 42^\circ\text{C}$ этот процесс хорошо

описывается уравнением Коул–Коула (4), так как в данном случае $\alpha_2 \approx 0.3$ и $\beta_2 \approx 0$.

На рис. 6 представлены температурные зависимости релаксационных параметров $\alpha_2(T)$, $\beta_2(T)$ для второго процесса.

В отличие от первого процесса, второй процесс обладает весьма широким ($\alpha_2 \sim 0.3$), но симметричным ($\beta_2 < 0.1$) релаксационным спектром. При температурах 38°C – 39°C параметр α_2 минимален, параметр β_2 монотонно возрастает в диапазоне температур 34°C – 41°C . Среднее время релаксации для второго процесса почти на четыре порядка меньше, чем для первого ($\tau_{0,2} \sim 5 \cdot 10^{-6}$ s и $\tau_{0,1} \sim 2 \cdot 10^{-2}$ s соответственно), что говорит о разных размерах и массах соответствующих кинетических единиц данных процессов.

Для расчета энергии активации второго процесса также были использованы уравнения (10)–(12). На рис. 7 представлен график зависимости $\ln \tau_{0,2}$ от $(1000/T)$.

Энергия активации второго релаксационного процесса оказалась равной $E_{a,2} = (0.10 \pm 0.02)$ eV, т.е. (9 ± 2) kJ/mol.

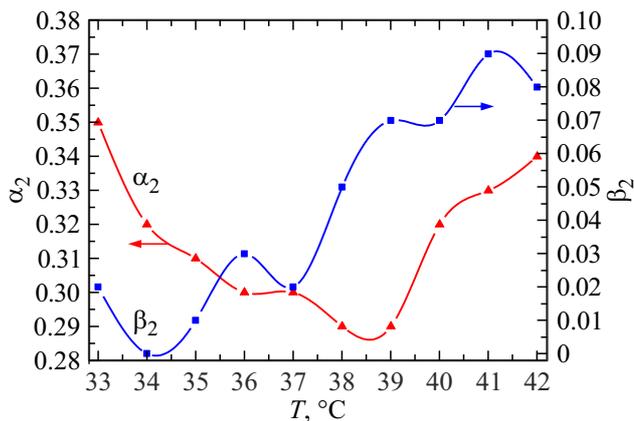


Рис. 6. Температурные зависимости релаксационных параметров $\alpha_2(T)$ и $\beta_2(T)$ второго релаксационного процесса.

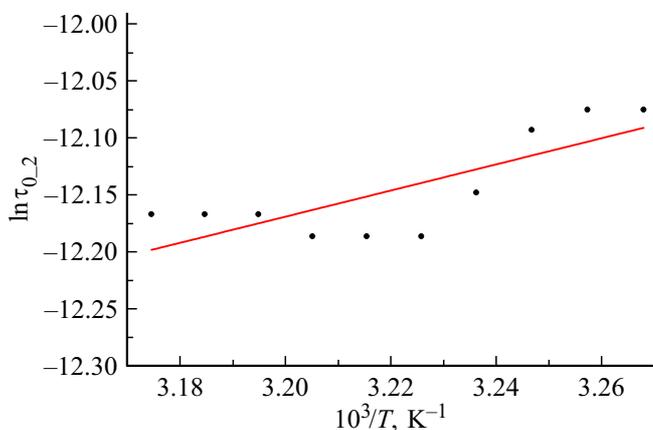


Рис. 7. Температурная зависимость времени релаксации $\tau_{0,2}$ для второго релаксационного процесса: $\ln \tau_{0,2}(1000/T)$.

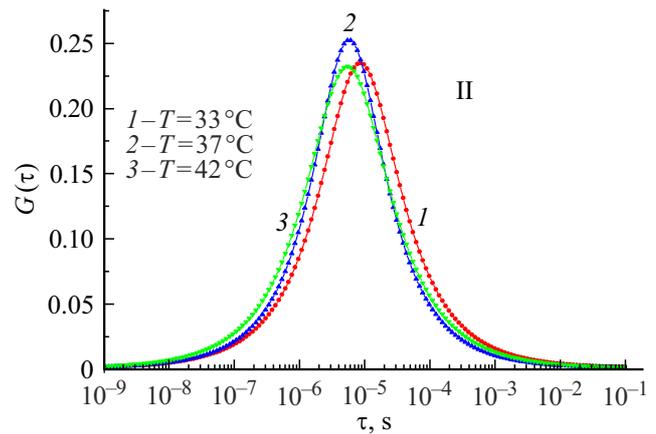


Рис. 8. Функция распределения времен релаксаторов $G(\tau)$ для второго релаксационного процесса при разной температуре: 1 — 33°C , 2 — 37°C , 3 — 42°C .

Поскольку энергия активации второго процесса существенно меньше, чем первого и времена релаксации второго процесса также существенно меньше первого, то возможными кинетическими единицами второго процесса могут быть альфа-спирали молекул альбуминов (дипольно-групповое движение, или β -процесс) [6]. При этом из-за тепловых флуктуаций углы внутреннего вращения в главной (ϕ_i, ψ_i, ω_i) и боковой (χ_i) цепях могут варьироваться [41]. Наличие трех углов вращения расширяет релаксационный спектр, т.е. увеличивает параметр α_2 . Однако при этом релаксационный спектр является симметричным ($\beta_2 < 0.1$). Это говорит о том, что углы внутреннего вращения в равной степени могут как увеличиваться, так и уменьшаться.

Функция $G(\tau)$ для второго процесса представлена на рис. 8.

Для второго процесса функция $G(\tau)$ также является очень широкой 6 частотных порядков (10^{-8} – 10^{-2} s), но при этом симметричной, что подтверждается значением параметра $\beta_2 < 0.1$. По сравнению с первым релаксационным процессом (рис. 5) полуширина $G(\tau)$ для второго процесса существенно больше. Поскольку для второго релаксационного процесса параметр $\alpha_2 \approx 0.3$ и функция $G(\tau)$ широкая, то в молекуле альбумина может осуществляться широкий набор разномасштабных движений с различными активационными барьерами и различными характерными временами, что является общим свойством белков и может быть описано как набор диэлектрических проницаемостей, каждая из которых соответствует своему временному интервалу [42].

3.3. Третий релаксационный процесс

Третий релаксационный процесс, соответствующий максимуму $M''(f) \approx 8 \cdot 10^{-3}$, наблюдается при температурах $T = 33^\circ\text{C}$ – 42°C в частотном диапазоне $f = (10^8$ – $10^9)$ Hz. Этот процесс хорошо описывается

уравнением Дэвидсона–Коула (5), так как в данном случае $\alpha_3 = 0$ и $\beta_3 \neq 0$ во всем температурном диапазоне.

На рис. 9 представлены температурные зависимости релаксационных параметров $\alpha_3(T)$, $\beta_3(T)$ для третьего процесса.

Видно, что с ростом температуры параметр β_3 уменьшается, при этом наблюдается минимум при 37 °С. Это означает, что система проявляет слабую тенденцию к симметрии, хотя и остается достаточно несимметричной ($\beta_3 > 0.3$). В свою очередь, параметр $\alpha_3 = 0$ во всем температурном диапазоне 33 °С–42 °С. Это означает, что система обладает минимально широким релаксационным спектром (для дебаевского спектра $\alpha_3 = 0$).

На рис. 10 представлена функция $G(\tau)$ для третьего релаксационного процесса, построенная с помощью уравнения (2) с использованием программы WinFit при $T = 38$ °С. Для случаев других температур она выглядит аналогично.

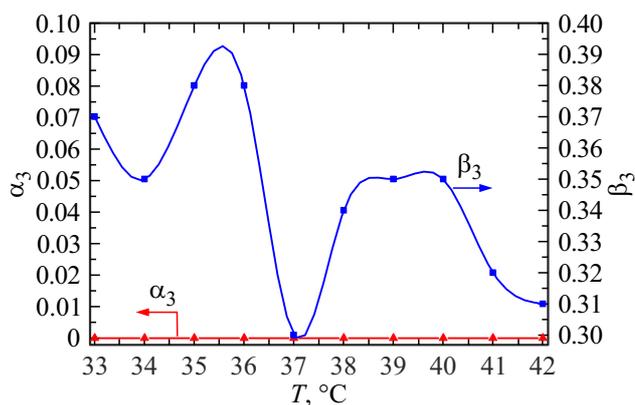


Рис. 9. Температурные зависимости релаксационных параметров $\alpha_3(T)$ и $\beta_3(T)$ третьего релаксационного процесса.

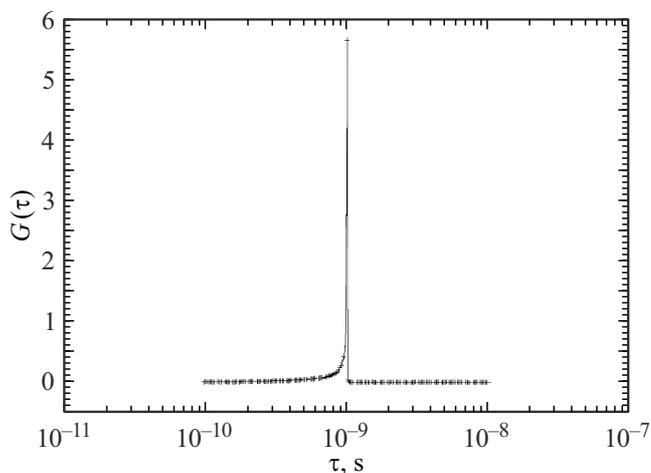


Рис. 10. Функция распределения времен релаксаторов $G(\tau)$ для третьего релаксационного процесса при температуре 38 °С.

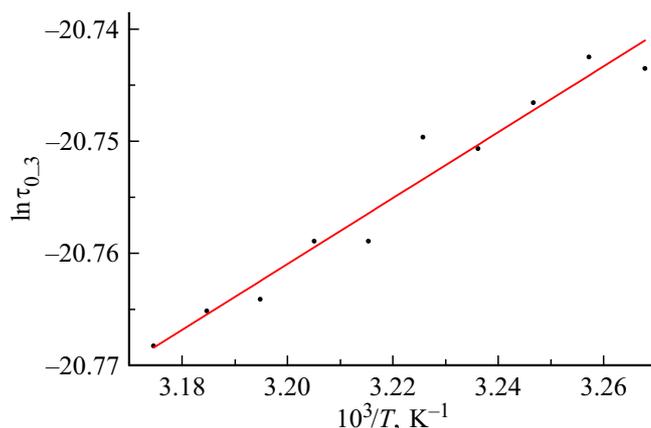


Рис. 11. Температурная зависимость времени релаксации $\tau_{0,3}$ для третьего релаксационного процесса: $\ln \tau_{0,3} (1000/T)$.

У данной функции практически отсутствует полуширина, но наблюдается диссимметрия, что подтверждается параметром β_3 ($\beta_3 \approx 0.3$).

Для расчета энергии активации третьего процесса также были использованы уравнения (10)–(12). На рис. 11 представлен график зависимости $\ln \tau_{0,3}$ от $(1000/T)$. Энергия активации третьего релаксационного процесса оказалась равной $E_{a,3} = (0.025 \pm 0.002)$ eV, т.е. (2.4 ± 0.2) kJ/mol.

Полученное нами среднее время релаксации кинетических единиц третьего процесса составляет $\tau_{0,3} \sim 1 \cdot 10^{-9}$ s. С увеличением температуры наблюдается слабый сдвиг максимума M'' в область высоких частот, существенно меньший, чем в первом и втором процессах. Данный сдвиг связан с ориентационными поворотами различных по форме ($\beta \sim 0.3$) кинетических единиц. Вероятнее всего, такими единицами являются полярные аминокислотные остатки основной цепи молекулы альбумина. Как отмечалось во введении, их около двухсот (99 положительных и 126 отрицательных).

3.4. Сравнение энергии активации трех процессов

Сравним энергии активации трех релаксационных процессов: $E_{a,1} = 173$ kJ/mol; $E_{a,2} = 9$ kJ/mol; $E_{a,3} = 2.4$ kJ/mol.

Максимальная энергия активации $E_{a,1}$ и наибольшее время релаксации ($\tau_{0,1} \sim 10^{-2}$ s) наблюдается у первого релаксационного процесса. Вероятно, это связано с размерами (радиус порядка 4.2 nm) и формой молекул альбуминов (несимметричный сплюснутый эллипсоид), поскольку они определяют величину ее дипольного момента (порядка 500 D) и, как следствие, величину энергии диполь-дипольного взаимодействия как между молекулами альбумина и воды, так и между молекулами альбумина. Отметим, что энергия ван-дер-ваальсового диполь-дипольного взаимодействия между молекулами

пропорциональна произведению квадратов их дипольных моментов [12]. Поскольку размеры и дипольный момент молекулы альбумина большие, то она будет взаимодействовать с большим количеством молекул воды. Соответственно будет большая энергия диполь-дипольного взаимодействия молекул альбумина и воды, а также молекул альбумина между собой. Для преодоления этих энергетических барьеров и требуется большая энергия активации E_{a_1} .

Энергия активации второго процесса E_{a_2} в 20 раз меньше, чем первого, т.е. энергетические барьеры дипольных поворотов альфа-спиралей внутри молекулы альбумина в 20 раз меньше, чем при повороте молекулы альбумина как целого в водном окружении. Как отмечено в работе [43], белки характеризуются низкой диэлектрической проницаемостью, наличием постоянного внутрибелкового электрического поля и широким набором времен диэлектрической релаксации. Именно широкий релаксационный спектр второго процесса ($\alpha_2 \approx 0.32$) мы и наблюдали.

Энергия активации третьего процесса E_{a_3} в 4 раза меньше, чем второго и в 72 раза меньше, чем первого. Это означает, что энергетические барьеры процесса дипольной ориентации полярных аминокислотных остатков существенно ниже, чем барьеры дипольных поворотов альфа-спиралей и гораздо ниже барьеров дипольных поворотов целых молекул альбумина. Для третьего процесса $\alpha = 0$, $\beta \approx 0.35$, что делает его похожим на первый процесс ($\alpha \approx 0$, $\beta \approx 0.7$) и отличным от второго ($\alpha \approx 0.30$, $\beta \approx 0.0$). Вероятно, это связано с различной формой аминокислотных остатков и различными величинами (и направлением относительно оси) их дипольных моментов.

Заключение

В процессе исследования 20% водного раствора человеческого сывороточного альбумина при физиологических температурах были обнаружены три релаксационных процесса и определены их параметры. Вероятнее всего, первый из них (низкочастотный), хорошо описываемый при $T = 33^\circ\text{C} - 39^\circ\text{C}$ уравнением Дэвидсона—Коула (5), связан с поворотами целых молекул альбумина под действием переменного электрического поля, а также, возможно, с изменением конформации молекул альбумина с глобулярной в клубковую при 37°C . Кооперативный характер поворота целых молекул альбумина характеризуется высокими значениями параметра β_1 и энергии активации E_{a_1} , а также формой функции $G(\tau)$ (рис. 5). Второй процесс (среднечастотный), хорошо описываемый уравнением Коул—Коула (4), вероятно, связан с вращением альфа-спиралей молекул альбумина. Третий (высокочастотный) процесс, хорошо описываемый уравнением Дэвидсона—Коула (5), вероятно, связан с поворотами

полярных аминокислотных остатков основной цепи альбумина.

Анализ графиков $\alpha(T)$, $\beta(T)$ может дать новую информацию об изменении конформации кинетических единиц данного релаксационного процесса, в том числе и о фазовых переходах в них. Минимум параметра α , равный нулю, с одновременным максимумом параметра β , возможно, является индикатором фазового перехода.

Метод диэлектрической спектроскопии может стать хорошим дополнением к другим различным методам исследования альбумина сыворотки крови в клинической медицине [16], поскольку данный метод способен эффективно выявлять изменения конформаций релаксаторов (структурных единиц) биополимеров, следовательно, и вариации межмолекулярных взаимодействий в их водных растворах. Диэлектрическая спектроскопия позволяет глубже понять природу релаксационных процессов в широком классе сложносоставных жидкостей, в том числе биологических, что пока еще не достаточно разработано.

В заключение отметим, что метод комплексного электрического модуля является эффективным методом исследования релаксационных процессов в водных растворах полимеров, в том числе водорастворимых глобулярных белков, основных молекул живой природы.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] Г.И. Сканава. *Физика диэлектриков (область слабых полей)* (ГИТТЛ, М.-Л., 1949), 500 с.
- [2] Н.П. Богородицкий, Ю.М. Волокобинский, А.А. Воробьев, Б.М. Тареев. *Теория диэлектриков* (Энергия, М.-Л., 1965), 344 с.
- [3] F. Kremer, A. Schonhals. *Broadband Dielectric Spectroscopy* (Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2003), 730 p.
- [4] Б.И. Сажин. *Электрические свойства полимеров* (Химия, Л., 1986), 3-е изд., 224 с.
- [5] Э.Р. Блайт, Д. Блур. *Электрические свойства полимеров* (Физматлит, М., 2008), 368 с.
- [6] Ю.А. Гороховатский, Е.А. Карулина, Д.Э. Темнов. *Физика полимерных диэлектриков* (Изд-во РГПУ им. А.И. Герцена, СПб., 2013), 124 с.
- [7] O. Schanne, P. Ruiz, E. Ceretti. *Impedance measurements in biological cell* (John Wiley & Sons, 1978), 430 p.
- [8] *Dielectric Relaxation in Biological Systems: Physical Principles, Methods, and Applications*, ed. V. Raicu, Y. Feldman (Scholarship, Published to Oxford, 2015), 430 p.
- [9] А.Н. Романов, Е.Ю. Винокурова, А.О. Ковригин, А.Ф. Лазарев, В.А. Лубенников, Н.А. Романова, С.А. Комаров. *Диэлектрические характеристики биологических жидкостей человека при развитии онкологических заболеваний (микроволновый диапазон)* (Барнаул, 2008), 70 с.
- [10] С. Мидзусима. *Строение молекул и внутреннее вращение* (Изд-во ИЛ, М., 1957), 264 с.

- [11] *Внутреннее вращение молекул*, под ред. В.Дж. Орвилл-Томаса, пер. с англ. под ред. Ю.А. Пентина (Мир, М., 1977), 510 с.
- [12] И.Г. Каплан. *Введение в теорию межмолекулярных взаимодействий* (Наука, М., 1982), 312 с.
- [13] *Межмолекулярные взаимодействия: от двухатомных молекул до биополимеров*, под ред. Б. Пульмана (Мир, М., 1981), 592 с.
- [14] И.Г. Каплан. *Межмолекулярные взаимодействия. Физическая интерпретация, компьютерные расчеты и модельные потенциалы*, пер. с англ. (БИНОМ, Лаборатория знаний, М., 2017), 394 с.
- [15] Ж.А. Сальникова, А.А. Кононов, А.П. Смирнов, Р.А. Кастро Арата. *Phys. Complex Systems*, **3** (1), 11 (2022). DOI: 10.33910/2687-153X-2022-3-1-11-20
- [16] *Альбумин сыворотки крови в клинической медицине*, под ред. Ю.А. Грызунова, Г.Е. Добрецова (Ирнус, М., 1994), 226 с.
- [17] J.T. Peters. *All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications* (Academic Press, 1996), 432 p.
- [18] Н.П. Маломуж, А.В. Хорольский. *Журн. физ. хим.*, **95** (2), 231 (2021).
- [19] М.А. Киселев, Ю.А. Грызунов, Г.Е. Добрецов, М.Н. Комарова. *Биофизика*, **46** (3), 423 (2001).
- [20] А. Ленинджер. *Биохимия* (Мир, М., 1974, 958 с.)
- [21] В.В. Гибизова, И.А. Сергеева, Г.П. Петрова, А.В. Приезжев, Н.Г. Хлебцов. *Вестник Московского ун-та. Серия 3. Физика. Астрономия. № 5 (Биофизика и медицинская физика)*, 39 (2011).
- [22] Albumin. Электронный ресурс. URL: www.albumin.org (дата обращения: 01.11.2024)
- [23] S. Navriliak, S. Negami. *J. Polymer Sci. Part C*, **14** (1), 99 (1966).
- [24] Г. Фрелих. *Теория диэлектриков* (Изд-во ИЛ, М., 1960), 252 с.
- [25] *Релаксационные явления в полимерах*, под ред. Г.М. Бартенева, Ю.В. Зеленева (Химия, Л., 1972), 373 с.
- [26] S. Navriliak, S. Negami. *Polymer*, **8**, 161 (1967).
- [27] П. Дебай. *Полярные молекулы* (ГНТИ, М.-Л., 1931), 248 с.
- [28] K.S. Cole, R.H. Cole. *J. Chem. Phys.*, **9**, 341 (1941).
- [29] D.W. Davidson, R.H. Cole. *J. Chem. Phys.*, **18**, 1417 (1950); DOI: 10.1063/1.1747496
- [30] Ж.А. Сальникова, Р.А. Кастро. *VI Петербургский международный онкологический форум «Белые Ночи 2020»* (Тез. докл., 2020), с. 309.
- [31] Zh.A. Salnikova, L.V. Plotnikova, A.P. Smirnov A.D. Garifullin, A.Yu. Kuvshinov, S.V. Voloshin, A.M. Polyanchko. *AIP Conf. Proceed.* **2308**, 030018 (2020). DOI: 10.1063/5.0035270
- [32] Ж.А. Сальникова, Л.В. Плотникова, А.П. Смирнов Р.А. Кастро, А.Д. Гарифуллин, А.Ю. Кувшинов, С.В. Волошин, А.М. Поляничко. *Материалы 54-й школы ПИЯФ по физике конденсированного состояния* (СПб., 16-20.03.2020, http://fks2020.pnpi.spb.ru/media/Sbornik_tez_FKS_2020_v_3.pdf с. 157 (2020).
- [33] Ж.А. Сальникова, А.П. Смирнов, А.А. Богданов, Н.А. Верлов, Р.А. Кастро. *ЖТФ*, **92** (1), 147 (2022).
- [34] Р.А. Кастро Арата, Л.В. Плотникова, Ж.А. Сальникова, А.П. Смирнов, А.А. Кононов, О.С. Везо, А.Д. Гарифуллин, А.Ю. Кувшинов, С.В. Волошин, А.М. Поляничко. *Опт. спектр.*, **130** (6), 918 (2022).
- [35] V.T. Avanesyan, Zh.A. Salnikova. *AIP Conf. Proceed.*, **2308**, 030013 (2020). DOI: 10.1063/5.0035258
- [36] Zh.A. Salnikova, A.A. Kononov. *AIP Conf. Proceed.*, **2308**, 030017 (2020). DOI: 10.1063/5.0034028
- [37] *Описание прибора «Novocontrol Concept-81»* <https://ckpo.herzen.spb.ru/?page=dielectrici-oborudovani&ID=5566>
- [38] Я.И. Френкель. *Кинетическая теория жидкостей* (Изд-во Наука ЛО, Л., 1975), 592 с.
- [39] А.О. Вонти, А.В. Ильинский, В.М. Капралова, Е.Ю. Шадрин. *ЖТФ*, **88** (6), 934 (2018).
- [40] Ю.Я. Готлиб, А.А. Даринский, Ю.Е. Светлов. *Физическая кинетика макромолекул* (Химия, Л., 1986), 272 с.
- [41] А.В. Финкельштейн. *Физика белковых молекул* (Ин-т компьютерных исследований, М.-Ижевск, 2014), 424 с.
- [42] L.I. Krishtalik. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Bioenerg.*, **1273**, 139 (1996).
- [43] Л.И. Кришталик. *УФН*, **183** (12), 1275 (2012).