

ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.І.МЕЧНИКОВА

Факультет математики, фізики та інформаційних технологій

Кафедра фізики та астрономії

**Кваліфікаційна робота**

На здобуття ступеня вищої освіти «бакалавр»

**«Воллюметрія водних розчинів альбумінів поблизу їх характерних  
точок»**

«Volumetry of aqueous albumin solutions near their characteristic points»

Виконав: здобувач денної форми навчання

Спеціальності 104-Фізика та астрономія

Освітня програма Фізика та астрономія

Шмаленюк-Наградський Ігор Тарасович

Керівник д. ф.-м.н., проф. Гоцунський В.Я \_\_\_\_\_

Рецензент к.ф.-м.н., с.н.с. Чечко В.Є.

Одеса 2025

## ЗМІСТ

|   |    |
|---|----|
| ВСТУП   | 4  |
| РОЗДІЛ 1 СИРОВАТКОВИЙ АЛЬБУМІН ЛЮДИНИ (САЛ) ТА ЙОГО ДОСЛІДЖЕННЯ | 5  |
| 1.1. Фізичні та хімічні властивості САЛ                         | 5  |
| 1.2. Біологічні функції САЛ                                     | 7  |
| 1.3. Взаємодія з водним середовищем та гідратація               | 9  |
| 1.4. Методи дослідження альбуміну та його розчинів              | 11 |
| 1.5. Особливі точки водних альбуміну                            | 13 |
| ПОСТАНОВКА ЗАДАЧІ   | 17 |
| РОЗДІЛ 2. ВОЛЮМЕТРИЧНИЙ АНАЛІЗ ВОДНИХ РОЗЧИНІВ АЛЬБУМІНУ        | 18 |
| 2.1. Причини неадитивної зміни густини розчинів альбуміну       | 18 |
| 2.2. Методи вимірювання величин пов'язаних з об'ємом            | 20 |
| 2.3. Результати роботи та обговорення                           | 25 |
| ВИСНОВКИ  | 32 |
| ЛІТЕРАТУРА  | 33 |

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Дослідження структури та фізико-хімічних властивостей білків є актуальним напрямом сучасної науки, який перебуває в центрі уваги фізиків, хіміків, біологів і медиків. Особливу роль відіграє вивчення змін у структурі білкових молекул під час їх розчинення у водних та біологічних середовищах, оскільки це дозволяє краще зрозуміти механізми їхньої біологічної активності, міжмолекулярної взаємодії та фазових перетворень у складних рідинних системах. Сироватковий альбумін (СА) теплокровних та птахів є одним із ключових модельних об'єктів для вивчення таких процесів завдяки добре дослідженій структурі, біологічній значущості та поширеному застосуванню в наукових і медичних дослідженнях.

Сучасні методи аналізу, такі як малокутове розсіювання нейтронів і рентгенівського випромінювання, ЯМР-спектроскопія, атомно-силова мікроскопія, динамічне розсіювання світла, гельпроникна хроматографія та капілярна віскозиметрія, відкривають нові можливості у вивченні конформаційних переходів макромолекул. Однак особливу цінність становлять волюмометричні методи (денсиметрія), які дозволяють аналізувати зміни в об'ємних характеристиках білкових розчинів, пов'язані як із внутрішніми структурними перетвореннями молекул, так і з їхньою взаємодією із середовищем.

Враховуючи суперечливість і фрагментарність наявних експериментальних даних щодо густини та об'ємних властивостей альбуміну у водних системах, подальше дослідження за допомогою денсиметричних методів має важливе значення для глибшого розуміння як конформаційної динаміки білкових макромолекул, так і структурування водного середовища навколо них.

**Мета роботи.** Метою роботи є дослідження особливостей конформаційних перетворень людського сироваткового альбуміну у

водних розчинах з використанням денсиметрії як методу аналізу. Особливий акцент зроблено на вивченні залежності парціального молярного об'єму альбуміну та особливості поведінки густини та контракції розчину у особливих точках – концентрації білкового компоненту наближеної до нативної у плазмі крові та близької до максимальних у фармакологічних формах.

**Об'єкт дослідження.** Об'єктом дослідження є водні розчини сироваткового альбуміну різного походження з різною концентрацією білка.

**Предмет дослідження.** Предметом дослідження є зміни парціального молярного об'єму альбуміну, які відображають його конформаційні переходи, олігомеризацію та специфіку взаємодії з молекулами розчинника за різних умов. Також предметом виступає вплив цих змін на об'ємні властивості системи «білок – вода».

## РОЗДІЛІ. СИРОВАТКОВИЙ АЛЬБУМІН ЛЮДИНИ (САЛ) ТА ЙОГО ДОСЛІДЖЕННЯ

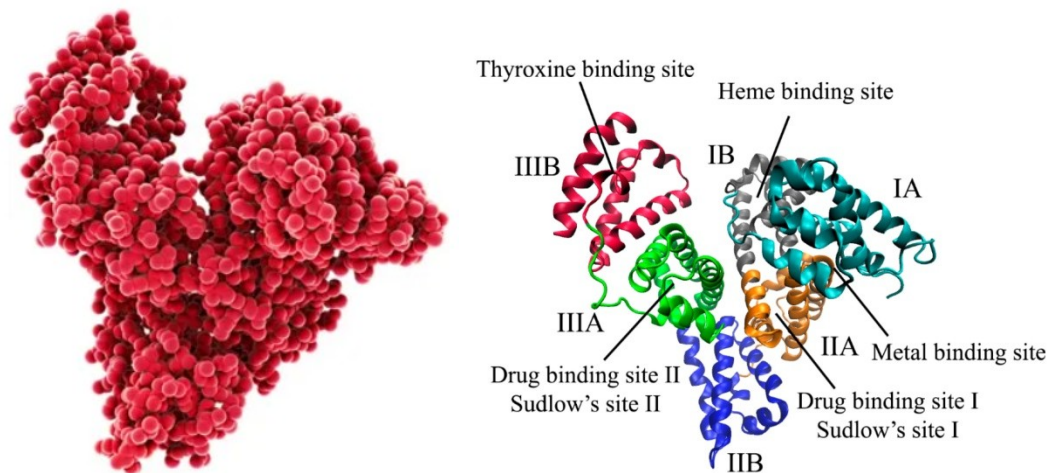
У цьому розділі будуть описані загальні відомості про сироватковий альбумін людини.

### 1.1. Фізичні та хімічні властивості САЛ

Сироватковий альбумін людини (САЛ) або людський сироватковий альбумін (ЛСА) є найбільш поширеним білком у плазмі крові, в нормі його концентрація у здорової людини становить приблизно 35-50 г/л, що складає більше 50% від загального вмісту білків плазми [1]. Це високорозчинний у воді, мономерний глобулярний білок, що виробляється в печінці, після чого він вивільняється в кровотік, де він виконує свої ключові функції, зокрема регуляцію розподілу рідин між кровоносними судинами та тканинами, головним чином шляхом підтримки онкотичного тиску плазми [2,3].

Цей білок (див Рис.1) має наступні характеристики:

- САЛ складається з 585 амінокислот [1,2,3].
- Має молекулярну масу 66.5 кДа [3].
- Має лінійні розміри близько 80x80x30 Å [1].
- Його структура характеризується 17 дисульфідними містками та однією вільною сульфгідрильною групою (Cys-34). Ці дисульфідні зв'язки є вирішальними для стабільності білка [1,2].
- Вільний цистеїновий залишок (Cys-34) розташований у домені I в глибокій щілині та відіграє критичну роль у окисно-відновних властивостях альбуміну, включаючи поглинання активних форм кисню (АФК) та утворення комплексів з іонами металів [4].



*Рис.1 Найчастіші зображення молекули альбуміну у науковій літературі*

- Цей білок має серцеподібну форму [1].
- Має три основних домени (I, II та III), кожен з яких поділяється на два субдомени (A та B) [1].
  - У своєму нативному стані він на 67% складається з  $\alpha$ -спіральний, з 10% витків, 23% випадкових спіралей та не має  $\beta$ -листів [4].
  - Питомий об'єм САЛ становить 0,754 мл/г [4].
  - Ізоелектрична точка (pI) САЛ становить приблизно 4,7. Його чистий негативний заряд при фізіологічному рН (близько 7,0-7,4) обумовлений надлишком кислих амінокислотних залишків над основними, що призводить до приблизно 15 чистих негативних зарядів на молекулу [6].
  - САЛ також містить 16 гістидинових імідазольних залишків, які сприяють його буферній функції завдяки їх значенню рКа приблизно 6,75, що дозволяє їм приймати або віддавати іони  $H^+$  залежно від навколишнього рН [7].

Наявність 17 дисульфідних містків у ЛСА забезпечує його вражаючу стабільність та загальну структурну міцність [4]. Однак, незважаючи на цю

глобальну стабільність, САЛ демонструє значну внутрішню гнучкість та рухливість доменів, особливо при підвищених температурах або в присутності лігандів [1,4]. Ця властива динамічна природа, описана як "болеадора-подібне розташування доменів", дозволяє здійснювати конформаційні перебудови, які є вирішальними для його різноманітних функцій, включаючи зв'язування лігандів та їх транспорт [7]. Ця гнучкість, замість того, щоб бути ознакою нестабільності, є функціональною характеристикою, яка дозволяє ЛСА адаптуватися до різних партнерів зв'язування та умов навколишнього середовища. Взаємодія між глобальною стабільністю та локальною динамікою є ключем до його біологічної ролі.

## 1.2. Біологічні функції САЛ

САЛ є досить важливим з клінічної точки зору білком, оскільки він виконує багато функцій з широким спектром фізіологічних ролей у нашому організмі:

- Підтримання онкотичного тиску: САЛ відповідає за приблизно 70-80% ефективного колоїдно-осмотичного тиску плазми, що є вирішальним для розподілу рідини між внутрішньосудинним та внутрішньоклітинним просторами [3]. Швидкість його синтезу в печінці регулюється онкотичним тиском крові [7].

- Транспортна функція: ЛСА має численні сайти зв'язування лігандів, серед яких найбільш вивченими є Сайти Садлоу: Сайт I у субдоміні ІА (сайт зв'язування варфарину) та Сайт II у субдоміні ІІА (сайт зв'язування діазепаму/ібупрофену) [2,4]. В результаті він діє як критична транспортна молекула для величезної кількості ендогенних та екзогенних речовин, включаючи жирні кислоти, гормони (особливо

жиророзчинні, такі як гормони щитовидної залози), некон'югований білірубін, іони металів, малі молекули та багато лікарських засобів [2,3,7]. Його зв'язувальні властивості можуть впливати на період напіввиведення лікарських засобів та призводити до лікарських взаємодій [2].

- Антиоксидантна та протизапальна дія: САЛ поглинає активні форми кисню (АФК) та оксид азоту, захищаючи від окисного пошкодження. Він вважається негативним білком гострої фази, рівень якого знижується під час запальних станів, що робить його маркером запалення [2,3].

- Буферизація рН: Завдяки 16 гістидиновим залишкам, ЛСА сприяє підтримці кислотно-лужного балансу в крові [1,4,7].

Клінічна значущість:

- Нормальні концентрації сироваткового альбуміну у дорослих коливаються у межах 35-50 г/л [1].

- Гіпоальбумінемія (низький альбумін, <35 г/л) є поширеною у критично хворих пацієнтів (захворюваність 24-87%) і є незалежним фактором ризику підвищеної смертності, супутніх захворювань та тривалості перебування в лікарні. Вона може бути спричинена захворюваннями печінки, нефротичним синдромом, опіками, недоїданням та запальними процесами [7,9].

- Гіперальбумінемія (високий альбумін) майже завжди спричинена зневодненням [10].

- Розчини ЛСА використовуються в медицині для лікування шоку, опіків та гіпопротеїнемії, але їх клінічна користь є суперечливою, і невідповідне використання є поширеним [6,9,11].

Різноманітні функції ЛСА (транспорт, онкотичний тиск, антиоксидантна дія, буфер) є важливими індивідуально, але їх синергічна дія підкреслює ширшу роль білка. Той факт, що його синтез регулюється онкотичним тиском, а його рівні змінюються під час запалення, вказує на

існування складного зворотного зв'язку. Здатність САЛ зв'язувати велику кількість біоактивних речовин означає, що він постійно адаптує свою конформацію. Таким чином, ЛСА є не просто пасивним носієм або структурним компонентом; він діє як динамічний, чутливий регулятор фізіологічного гомеостазу. Його структурна адаптивність дозволяє йому модулювати свої спорідненості до зв'язування та взаємодії у відповідь на мінливі фізіологічні потреби. Ця динамічна регуляція, що часто включає тонкі конформаційні зміни, є вирішальною для підтримки тонкого балансу внутрішнього середовища, і зміни в його об'ємних властивостях можуть відображати порушення цієї гомеостатичної здатності.

### **1.3. Взаємодія з водним середовищем та гідратація**

Гнучкість структури та наявність різноманітних сайтів зв'язування роблять САЛ чудовою модельною системою для вивчення білок-лігандних взаємодій та конформаційної динаміки білків у розчині.

Біофізичні властивості, такі як об'єм та стисливість безпосередньо пов'язані зі структурою білка, його динамікою, гідратацією та взаємодіями з компонентами розчину. Багатогранність функцій САЛ зумовлена його структурною організацією (мультидоменність, гнучкість, наявність специфічних сайтів зв'язування) та здатністю реагувати на зміни у навколишньому середовищі (рН, температура, тиск, зв'язування лігандів). Ця взаємопов'язаність робить водні розчини САЛ ідеальною, хоча й складною, системою для дослідження за допомогою волюметричних методів, які дозволяють зондувати ці зв'язки між структурою, функцією та відгуком на зовнішні умови.

Отже розуміння поведінки САЛ саме в розчині є надзвичайно важливим, оскільки це його природне середовище функціонування. Взаємодія ЛСА з водою відома як гідратація. Ось основні її принципи:

- Білки, при контакті з водою, швидко зв'язують молекули води до 10-20% своєї ваги [12].
- Молекули води зв'язуються з зарядженими (наприклад, аміно-, карбоксильними) та полярними (наприклад, гідроксильними, амідними) групами на поверхні білка завдяки дипольній природі води [12].
- Деякі молекули води міцно зв'язані, тоді як інші слабо зв'язані або утворюють "острівці" всередині згорнутих пептидних ланцюгів [12].
- Гідратація є важливою для розчинності білка; зменшення гідратації (наприклад, додаванням солей, таких як сульфат амонію) може призвести до осадження (висолювання). І навпаки, "всолювання" відбувається, коли невеликі кількості солі збільшують розчинність, взаємодіючи із зарядженими бічними ланцюгами [12].
- Кількість води, зв'язаної з одним грамом глобулярного білка в розчині, зазвичай варіюється від 0,2 до 0,5 грама [12].
- Гідратаційна оболонка навколо білків може мати середню щільність приблизно на 10% більшу, ніж у об'ємного розчинника, при цьому зв'язані молекули води займають приблизно на 20% менший об'єм, ніж вільна вода. Ця вища щільність приписується електрострикції навколо заряджених груп [13].
- Однак, гетерогенна природа поверхні білка (полярні та неполярні області) може призводити до локальних змін щільності в гідратаційній оболонці, при цьому пакування навколо гідрофобних груп потенційно призводить до меншої щільності [13].

Динаміка гідратації та поведінка білка:

- Високороздільні ЯМР-дослідження показують два типи гідратаційних ділянок: невелика кількість чітко визначених внутрішніх

молекул води з довшим часом перебування (від  $10^{-8}$  до  $10^{-2}$  с) та поверхневі молекули води з часом перебування менше наносекунди [14].

- Вода є "істотним учасником" стабільності, структури, динаміки та функції білків, впливаючи на згортання білка через гідрофобний колапс та опосередковуючи зв'язування за допомогою водневих зв'язків [15].
- Зміни у водному середовищі (наприклад, температура, тиск, іони, корозчинники) впливають на стабільність біомолекул [15].
- Рухливість білка модулюється динамікою води, а рухи білка впливають на стабільність водневих зв'язків води [16].
- Утворення конденсату (наприклад, рідинно-рідинне фазове розділення, РРФР) може призвести до вивільнення "гідрофобної води" (молекул води, що гідратують гідрофобні частини) при збереженні "гідрофільної води" всередині конденсату [16].

#### 1.4. Методи дослідження альбуміну та його розчинів

##### Калориметрія з пертурбацією тиску:

- Принцип: Метод вимірює теплоту, що поглинається або виділяється розчином при невеликій, швидкій зміні тиску за постійної температури. Тепловий ефект прямо пропорційний коефіцієнту термічного розширення (розширюваності) розчину [20].
- Вимірюваний Параметр: Тепловий ефект (Q) при зміні тиску ( $\Delta P$ ) [20].
- Похідний Параметр: Парціальна молярна розширюваність ( $E^\circ$ ) та зміни розширюваності ( $\Delta E^\circ$ ) під час переходів [20].

##### Спектроскопічні Методи (Залежні від Тиску/Температури):

Такі методи, як УФ/видима абсорбція, флуоресценція, круговий дихроїзм (КД), ЯМР, ЕПР, дозволяють моніторити конформаційні зміни, індуковані

тиском або температурою. Якщо перехід можна наближено описати як двостановий, то залежність константи рівноваги (отриманої зі спектроскопічних даних) від тиску або температури дозволяє визначити  $\Delta V^\circ$  або  $\Delta H^\circ$  відповідно [20,22,32].

**Рентгеноструктурний Аналіз (Залежний від Тиску/Температури):** Може надати інформацію на атомному рівні про те, як кристалічна упаковка та структура білка реагують на тиск або температуру, що дозволяє оцінити власну стисливість або термічне розширення білка [20].

**Молекулярно-динамічне (МД) Моделювання:** Комп'ютерний підхід для моделювання поведінки білків, їх гідратації та волюметричних властивостей на атомістичному рівні. Дозволяє розділяти внески різних факторів (наприклад, власний об'єм проти гідратації) та розраховувати властивості, які важко виміряти експериментально [19].

Важливо відзначити, що жоден окремий метод не надає повної волюметричної картини. Денситометрія дає інформацію про об'єм (упаковка та гідратація), велосиметрія - про адіабатичну стисливість (флуктуації та гідратація), а PPC - про розширюваність (термічний відгук). Спектроскопічні методи в поєднанні зі зміною тиску або температури дозволяють визначити термодинаміку переходів ( $\Delta V$ ,  $\Delta H$ ), але часто спираються на спрощені моделі (наприклад, двостановий перехід). Таким чином, комплексний підхід, що поєднує кілька методів, є найбільш інформативним для всебічної характеристики волюметричної поведінки білків, таких як САЛ, особливо при дослідженні складних конформаційних переходів.

Крім того, як вимірювання об'єму, так і стисливості є надзвичайно чутливими до гідратації білка [22]. Зміни цих параметрів під час конформаційних переходів часто відображають зміни в кількості або властивостях молекул води, що взаємодіють з поверхнею білка. Наприклад, це може бути вивільнення електрострикційної води при

нейтралізації зарядів, експозиція гідрофобних груп у розчинник або зміни у стисливості самої гідратної оболонки. Розуміння внеску гідrataції є ключовим для правильної інтерпретації волюметричних даних.

### 1.5. Особливі точки водних альбуміну

Поведінка білкових розчинів не є лінійною і може демонструвати різкі зміни об'єму та інших властивостей при певних "особливих точках", таких як критичні концентрації, фазові переходи та пороги агрегації. Ці точки відображають фундаментальні зміни у взаємодіях білок-білок та білок-розчинник.

Білки є динамічними молекулами, що існують у вигляді ансамблів різних конформацій [35]. Переходи між різними конформаційними станами (макростанами або субстанами) є критично важливими для їх функціонування [36]. Ці переходи, які часто називають розгортанням, денатурацією або конформаційними змінами, можуть бути індуковані змінами факторів навколишнього середовища, таких як температура, рН, тиск, концентрація денатурантів або зв'язування лігандів [37].

Для САЛ у розчині ключовими особливими точками, що представляють інтерес для волюметричних досліджень, є:

- Термічна Денатурація: Розгортання, спричинене підвищенням температури. Цей процес часто включає проміжні стани і може бути оборотним або необоротним залежно від умов (кінцевої температури, рН, іонної сили). При високих температурах часто призводить до агрегації [21,38,39].

- рН-індуковані Переходи: САЛ зазнає кількох оборотних конформаційних змін при зміні рН. Найбільш відомим є перехід N до B (Basic, рН ~8-9). [40].

- Денатурація Тиском: Розгортання, індуковане високим гідростатичним тиском [34].
- Ліганд-індуковані Конформаційні Зміни: Зв'язування лігандів, особливо жирних кислот, може викликати значні конформаційні перебудови в молекулі САЛ [40].
- Агрегація/Фібриляція: Утворення димерів, олігомерів або амілоїдоподібних фібрил, часто спричинене частковим розгортанням за стресових умов (нагрівання, зміна рН, зсув, окиснення) [41,42,43].

Вивчення цих особливих точок надає термодинамічну та структурну інформацію про механізми цих переходів.

Особливі точки у контексті контракції ЛСА, ймовірно, відповідають умовам, за яких тонкий баланс між електрострикцією та пакуванням навколо гідрофобних груп порушується, що призводить до значних зрушень у стані гідратації, таких як вивільнення слабозв'язаної води під час агрегації або реорганізація молекул води при конформаційних змінах.

Білок залишатиметься в розчині лише до певної критичної концентрації; перевищення цього ліміту призводить до появи нового стану або фази [44]. Ці переходи, відомі як фазові переходи білків (PPTs), включають перехід від розчинного стану до щільної рідкої фази (краплі через рідинно-рідинне фазове розділення, LLPS) або до твердих агрегатів (таких як амілоїди) [45,46]. LLPS характеризується спонтанним розділенням компонентів розчину на дві фази, що стабільно співіснують: щільну фазу та розведену фазу [46].

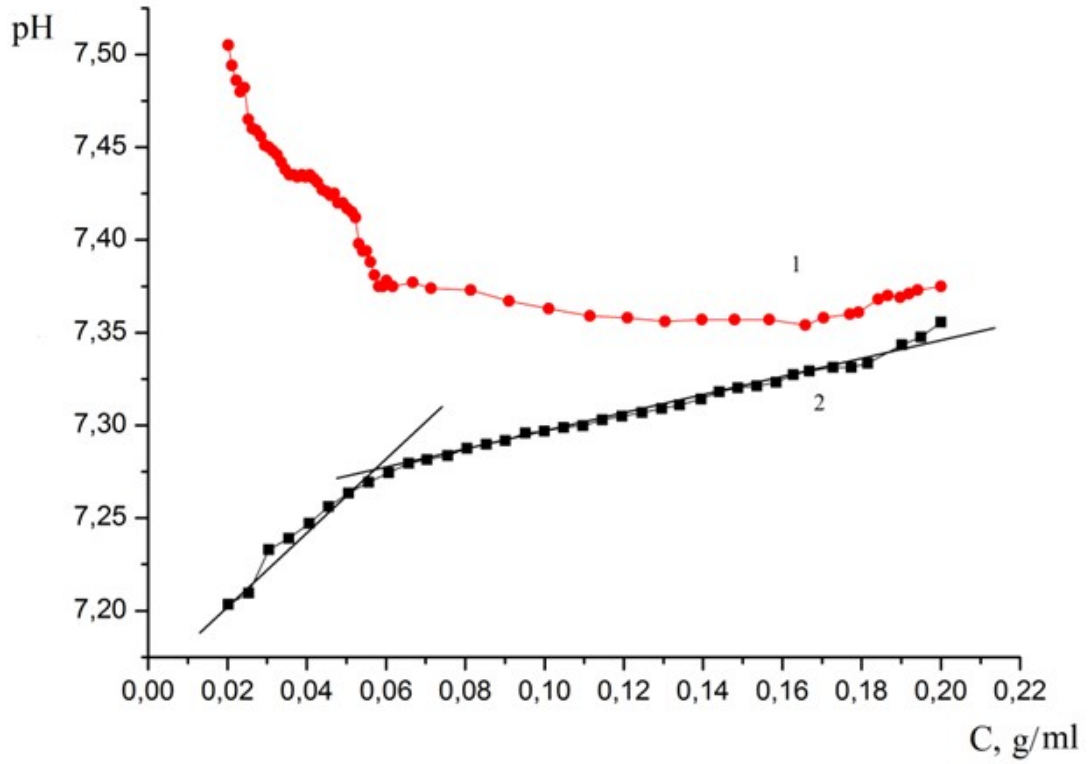
Критична концентрація визначається як концентрація, при якій відбувається фазове розділення [47]. Цікаво, що деякі білки можуть утворювати щільні краплі значних розмірів навіть нижче критичної концентрації [47]. Це свідчить про доперехідний режим, де тонкі зміни об'єму можуть вже відбуватися через ранні стадії молекулярних асоціацій. На відміну від крапель, які часто можуть повертатися до розчинного стану,

перехід рідина-тверде (наприклад, утворення амілоїдів) часто є незворотним [46].

Агрегація білка є критичним показником якості при розробці лікарських засобів, оскільки вона може призвести до потенційних ризиків для безпеки пацієнтів, зниження виходу очищення та зменшення терміну придатності продукту [48]. Висококонцентровані білкові композиції, які все частіше використовуються в терапевтичних цілях, створюють значні проблеми через потенціал для посиленої агрегації та підвищеної в'язкості. Конформаційні зміни білка також можуть сприяти агрегації [48]. Агрегація може бути класифікована як внутрішня (виникає в межах білкової композиції під час синтезу та очищення) або зовнішня [49].

Розрізнення між оборотними (рідиноподібні краплі) та часто незворотними (тверді агрегати, такі як амілоїди) фазовими переходами є критичним [46]. Якщо перехід є оборотним, пов'язані з ним зміни об'єму також можуть бути оборотними при зміні умов [46]. Однак незворотні переходи, ймовірно, призведуть до постійних змін у макроскопічному об'ємі або щільності розчину [46]. Це означає, що моніторинг змін об'єму з часом або при циклічному зміні параметрів навколишнього середовища може розрізняти ці типи переходів та надавати уявлення про стабільність та долю білкових композицій [46].

Але головна увага у нашій роботі приділяється особливим точкам водних розчинів альбуміну при зміні концентрації білкового компоненту. У роботах Н.Фудулей та О.Хорольського (ФАС 61, ФАС 62 видання збірки ОНУ імені І.І.Мечникова [ ]) було показано, що за концентрацій 0,06 г/мл та 0,18 г/мл залежності рН та показника заломлення змінюють свій хід таким чином, що ці точки можна вважати особливими (див.Рис.2)



**Рис.2.** Залежність рН від концентрації для розчину сироваткового альбуміну людини при розбавленні водою (1) та фізіологічним розчином (2).

## ПОСТАНОВКА ЗАДАЧІ

Явище контракції у водних розчинах білків, зокрема сироваткового альбуміну людини (САЛ), є важливим аспектом біофізичної хімії, що відображає складні молекулярні взаємодії та структурні перебудови. Контракція, як зменшення об'єму розчину порівняно з адитивною сумою об'ємів його компонентів, зумовлена змінами в гідратаційній оболонці білка, електрострикцією та конформаційними переходами. Вивчення об'ємних змін у водних розчинах САЛ має фундаментальне значення для розуміння біофізичних процесів, що визначають стабільність, функцію та взаємодію білків у біологічних системах. Вивчення цих процесів сприяє глибшому розумінню термодинамічних і структурних особливостей САЛ у розчині, що має як теоретичне, так і практичне значення, зокрема для розробки фармацевтичних препаратів та діагностики патологічних станів, пов'язаних із змінами концентрації САЛ у біологічних рідинах.

Метою даної роботи є дослідження волюметричних властивостей водних розчинів САЛ в околі цієї особливої точки за концентрації, що відповідає нативним зразкам плазми крові людини з використанням методу денситометрії, зокрема за допомогою пікнометрії.

## РОЗДІЛ 2. ВОЛЮМЕТРИЧНИЙ АНАЛІЗ ВОДНИХ РОЗЧИНІВ АЛЬБУМІНУ

Волюметричний аналіз, у широкому сенсі, стосується вимірювання об'єму речовини [17]. У біофізиці білків такі термодинамічні властивості, як парціальний молярний об'єм та його похідні за тиском (стисливість) і температурою (розширюваність) надають унікальну інформацію про фундаментальні аспекти білкових систем у розчині [18]:

### 2.1. Причини неадитивної зміни густини розчинів альбуміну

- Гідратація білка: Взаємодії між поверхнею білка та молекулами води, що його оточують. Це включає електрострикцію (стиснення води навколо заряджених груп) та зміни структури води біля гідрофобних ділянок. Вода гідратної оболонки має відмінні від об'ємної води волюметричні характеристики (об'єм, стисливість, розширюваність) [18].
- Внутрішньоглобулярна упаковка: Ефективність розміщення атомів всередині білкової глобули, включаючи наявність та розмір внутрішніх порожнин або дефектів упаковки [19,20].
- Конформаційна динаміка: Флуктуації об'єму ( $\Delta V$ ), пов'язані з гнучкістю білка та його внутрішніми рухами, які можна кількісно оцінити через стисливість та розширюваність [18,20].

Зміни цих волюметричних параметрів ( $\Delta V$ ,  $\Delta K$ ,  $\Delta E$ ) при дії зовнішніх чинників (температура, рН, тиск, зв'язування лігандів) відображають зміни у структурі, гідратації та упаковці, що супроводжують функціонально важливі процеси, такі як згортання/розгортання,

зв'язування та конформаційні переходи [20]. Незважаючи на те, що волюметричні дослідження білків проводяться з 1950-х років, вони залишаються потужним, хоча, можливо, недостатньо використовуваним інструментом, особливо з появою сучасних високочутливих приладів [20]. Ці технологічні досягнення дозволяють детальніше характеризувати тонкі зміни об'єму та стисливості, що супроводжують білкові переходи, стимулюючи новий інтерес до цієї галузі досліджень і роблячи огляд сучасного стану знань особливо актуальним.

#### Визначення ключових волюметричних параметрів

Для кількісного опису волюметричної поведінки білкових розчинів використовують низку термодинамічних параметрів:

- Парціальний Молярний Об'єм ( $V_m$ ): Визначається як зміна загального об'єму розчину при додаванні одного моля розчиненої речовини (білка) при нескінченному розведенні (або при постійних  $T$ ,  $P$  та кількості розчинника  $N_v$ ). Одиниці вимірювання:  $\text{см}^3/\text{моль}$  або  $\text{мл}/\text{моль}$ . Цей параметр відображає власний об'єм білкової молекули плюс внесок від її гідратації. Розраховується на основі вимірювань густини [20,21].

- Парціальний Питомий Об'єм ( $v$ ): Парціальний молярний об'єм, поділений на молекулярну масу білка. Одиниці вимірювання:  $\text{см}^3/\text{г}$  або  $\text{мл}/\text{г}$ . Часто використовується для макромолекул [2].

- Уявний Молярний/Питомий Об'єм ( $V_\phi$ ,  $\phi_v$ ): Розраховується при скінченній концентрації білка за даними густини. Екстраполяція до нульової концентрації дає парціальний молярний/питомий об'єм. Концентраційна залежність пов'язана з міжмолекулярними взаємодіями білок-білок [19].

- Адіабатична Стисливість ( $K_S$  або  $\beta_S$ ): Відносна зміна об'єму на одиницю зміни тиску за адіабатичних умов (без теплообміну з навколишнім середовищем).  $K_S = -(1/V)(\partial V/\partial P)_S$ . Визначається зі швидкості звуку ( $u$ ) та густини ( $\rho$ ) за допомогою рівняння Ньютона-

Лапласа:  $\beta_s = 1/(\rho u^2)$ . Пов'язана зі швидкими флуктуаціями об'єму. Парціальна молярна/питома адіабатична стисливість ( $K_s^\circ$ ,  $\kappa_s^\circ$ ,  $\phi_k$ ) відображає стисливість білка та його гідратної оболонки [20,22].

- Ізотермічна Стисливість ( $K_T$  або  $\beta_T$ ): Відносна зміна об'єму на одиницю зміни тиску при постійній температурі.  $K_T = -(1/V)(\partial V/\partial P)_T$ . Пов'язана із середньою амплітудою флуктуацій об'єму. Може бути розрахована з  $K_s$  за допомогою термодинамічних співвідношень, що включають розширюваність та теплоємність, або оцінена з залежності об'єму від тиску [19,20].

- Парціальна Молярна Розширюваність ( $E^\circ$  або  $\alpha_M$ ): Відносна зміна об'єму на одиницю зміни температури при постійному тиску.  $E^\circ = (1/V)(\partial V/\partial T)_P$ . Вимірюється безпосередньо методом калориметрії з пертурбацією тиску (PPC) або визначається з температурної залежності парціального молярного об'єму. Відображає чутливість об'єму білка/гідратації до змін температури [20,21].

## 2.2. Методи вимірювання величин пов'язаних з об'ємом

Вимірювання волюметричних властивостей білкових розчинів вимагає високоточних методів. Нижче описані основні експериментальні підходи, що використовуються для визначення об'єму, стисливості та розширюваності розчинів САЛ та інших білків.

**Денситометрія (вимірювання густини).** Принцип: Метод базується на точному вимірюванні густини розчину білка ( $\rho$ ) та чистого розчинника ( $\rho_0$ ). Різниця між цими значеннями використовується для розрахунку уявного питомого або молярного об'єму ( $\phi_v$ ,  $V_\phi$ ) за допомогою відповідних рівнянь [20]. Екстраполяція уявного об'єму до нескінченного розведення

(нульової концентрації білка) дозволяє отримати парціальний питомий або молярний об'єм ( $v^\circ$ ,  $V_m^\circ$ ) [20,21].

- Техніки:

- Денситометрія з віброуючою трубкою: Найбільш поширений та високоточний метод [13]. Вимірюється період коливань зазвичай U- або V-подібної скляної або металеві трубки постійного об'єму, заповненої зразком [14]. Період коливань прямо пов'язаний з густиною рідини [13,14]. Цей метод широко використовується для білкових розчинів завдяки високій точності (до  $10^{-6}$  г/см<sup>3</sup>) та малим об'ємам зразків (порядку мл) [13].

Переваги [24,25]:

- Висока точність для газів та рідин.
- Проста експлуатація та низькі вимоги до об'єму зразка.
- Можливість проведення вимірювань у поточному режимі.
- Підходить для вимірювання щільності білкових розчинів, що підтверджено дослідженнями з використанням вібраційно-трубкових денсиметрів для розчинів ЛСА.

Обмеження та міркування щодо встановлення/калібрування [14,16]:

- Однофазні рідини: Більшість денсиметрів призначені для однофазних рідин; непередбачувані вимірювання виникають при змінних сумішах рідини та газу.

- Встановлення: Вимагає ретельного розгляду швидкості потоку (часто в обхідному контурі для високих потоків у трубопроводі), мінімізації відстані від пов'язаних пристроїв вимірювання потоку та належної ізоляції для рівномірної температури.

- Калібрування ("Проба"): Періодично калібрується за допомогою пікнометра, точної сфери відомої маси та об'єму. Вимагає сертифікованих вагових пристроїв та компенсації плавучості та місцевої гравітації.

**Класичні методи:** Пікнометрія, дилатометрія, метод падаючої краплі, метод магнітного поплавка є історично важливими, але зараз менш поширені для високоточних досліджень білків через більші вимоги до об'єму зразка та меншу точність порівняно з вібраційною денситометрією [20].

- Вимірюваний Параметр: Густина ( $\rho$ ) [20].
- Похідний Параметр: Парціальний питомий/молярний об'єм ( $v^\circ$ ,  $V_m^\circ$ ). Температурна залежність густини (або  $v^\circ$ ) дозволяє визначити розширюваність ( $E^\circ$ ) [20].

**Ультразвукова велосиметрія (вимірювання швидкості звуку).** Ультразвукові методи є універсальними неруйнівними методами, що використовуються для вимірювання таких властивостей, як щільність, швидкість та стисливість у рідинах, включаючи білкові розчини [17].

- Принцип: Базується на вимірюванні амплітуди ультразвукової хвилі, відбитої від границі поверхні тверде тіло/рідина (метод імпульсного відлуння). Коефіцієнт відбиття пов'язаний з акустичним імпедансом рідини, який залежить від її щільності та швидкості ультразвукової хвилі. Чвертьхвильовий акустичний узгоджувальний шар може підвищити чутливість. Швидкість ультразвукової хвилі часто вимірюється одночасно в режимі передачі для усунення впливу температури [20,21].

- Техніка: Часто використовуються резонаторні методи, які забезпечують високу точність вимірювання швидкості звуку (до  $10^{-4}$  %) при малих об'ємах зразка. Також застосовуються методи, що базуються на вимірюванні часу проходження імпульсу, зокрема широкосмугові методи [20,27].

- Вимірювання стисливості: Коефіцієнт адіабатичної стисливості ( $\beta_s$ ) може бути розрахований за рівнянням Лапласа, використовуючи виміряну щільність ( $\rho$ ) та швидкість ультразвуку ( $u$ ):  $\beta_s = 1/(\rho u^2)$ . Цей

підхід, як правило, є більш точним та зручним, ніж прямі вимірювання стисливості [17,18].

Переваги:

- **Неруйнівний:** Дозволяє проводити повторні вимірювання без пошкодження зразка.
- **Аналіз у реальному часі:** Може контролювати динамічні структурні зміни, такі як агрегація білка, у реальному часі.
- **Чутливість до конформаційних змін:** Зменшення швидкості ультразвуку вказує на підвищену стисливість білка, пов'язану зі змінами компактності. Зміни в загасанні можуть вказувати на конформаційні зміни.
- **Кількісна міра гідратації:** Для білкових розчинів стисливість забезпечує кількісну міру молекулярної гідратації.
- **Малі об'єми зразків:** Сучасні методи можуть досягти підвищеної точності з малими об'ємами зразків (наприклад, 500 мкл або навіть 100-300 мкл), що є вирішальним для біологічних зразків.
- **Екстремальні умови:** Підходить для вимірювань при високих температурах та тисках, захищаючи звичайні перетворювачі за допомогою металевих хвилеводів.
- **Одночасне вимірювання:** Дозволяє одночасно визначати масову щільність та швидкість ультразвуку з одного акустичного вимірювання, підвищуючи точність для адіабатичної стисливості.

Обмеження [18,19,20]:

- **Складність інтерпретації:** Роль води на поверхні білка ускладнює інтерпретацію даних.
- **Непряме вимірювання:** Стисливість розраховується непрямо з вимірювань щільності та швидкості.
- **Залежність від температури:** Як щільність, так і швидкість ультразвуку сильно залежать від температури; точний контроль температури є критичним для точних розрахунків стисливості.

- **Обмежена чутливість до розміру частинок:** Розмір частинок може не сильно впливати на швидкість ультразвуку, що означає, що його може бути недостатньо для характеристики агрегації, якщо змінюється лише розмір частинок.
- **Вплив охолодження:** Вимірювання після нагрівання та охолодження можуть не повністю відображати зміни під час термічної обробки через процеси згортання під час охолодження.
- **Звичайні обмеження:** Старіші методи можуть вимагати великих об'ємів зразків та мати обмежену точність, або мати труднощі з неоднорідними/агрегатуючими зразками.

**Капілярна дилатометрія.** Капілярна дилатометрія є прямим методом вимірювання змін об'єму, що є екстенсивною термодинамічною властивістю. Вона дає уявлення про зміни гідратації під час згортання білка, зв'язування лігандів та взаємодії з іншими клітинними компонентами [21].

Принцип роботи [21]:

- Техніка передбачає розміщення буферного розчину білка та ліганда (якщо застосовно) в окремих відгалуженнях інвертованого Y-подібного дилатометра (дилатометра Карлсберга).
- Нерозчинний органічний розчинник діє як манометрична рідина в капілярі, прикріпленому до дилатометра.
- Зміни об'єму спостерігаються як зсуви висоти меніска в капілярі.
- Дилатометр занурюється в точно контрольовану термостатовану ванну (коливання менше 1 міліградуса Цельсія) через високий коефіцієнт теплового розширення манометричної рідини.
- Змішування вмісту (білка та ліганда) ініціює реакцію, і зміна висоти меніска реєструється після стабілізації.

- Сучасні дилатометри використовують різьбові з'єднання та тефлонові пробки для запобігання витокам та дозволяють взаємозамінні частини. Діаметр отвору капіляра є критичним для чутливості, при цьому вузьчі отвори забезпечують більшу чутливість.

Переваги [31]:

- Забезпечує пряме вимірювання об'ємних змін.
- Надає уявлення про зміни гідратації при згортанні білка, зв'язуванні лігандів та макромолекулярних взаємодіях.
- Техніка є неруйнівною, що дозволяє відновлювати та повторно використовувати білкові розчини.
- Може виявляти складні, багатостадійні процеси, які можуть виглядати як одна подія в інших спектроскопічних методах (наприклад, дані КД показують єдиний процес, тоді як волюметричні дані показують дві розрізнявані повільні події).

Обмеження [21]:

- Історично не так широко використовувався, як інші методи (наприклад, калориметрія) через технічні труднощі.
- Вимагає надзвичайно стабільного контролю температури через великий коефіцієнт теплового розширення манометричної рідини.
- Потрібне обережне поводження та змішування, щоб уникнути проблем з розсіюванням тепла.
- Потребує контролю розведення та контролю розчинника без білка для врахування помилкових об'ємних змін.

### **2.3. Результати роботи та обговорення**

Базовим експериментальним методом у роботі взято класичний пікнометричний метод.

У роботах, присвячених вивченню особливих точок у водних розчинах спиртів [20], було встановлено, що такий параметр, як **контракція** — тобто відносна зміна об'єму при змішуванні компонентів — містить значно більше інформації про молекулярну асоціацію, ніж такі традиційні характеристики, як густина або питомий об'єм на одну молекулу. Під контракцією розуміють різницю між фактичним об'ємом суміші та сумою об'ємів її індивідуальних компонентів до змішування. Цей параметр визначається за формулою:

$$\phi = \frac{V_{12}}{V_1 + V_2} - 1$$

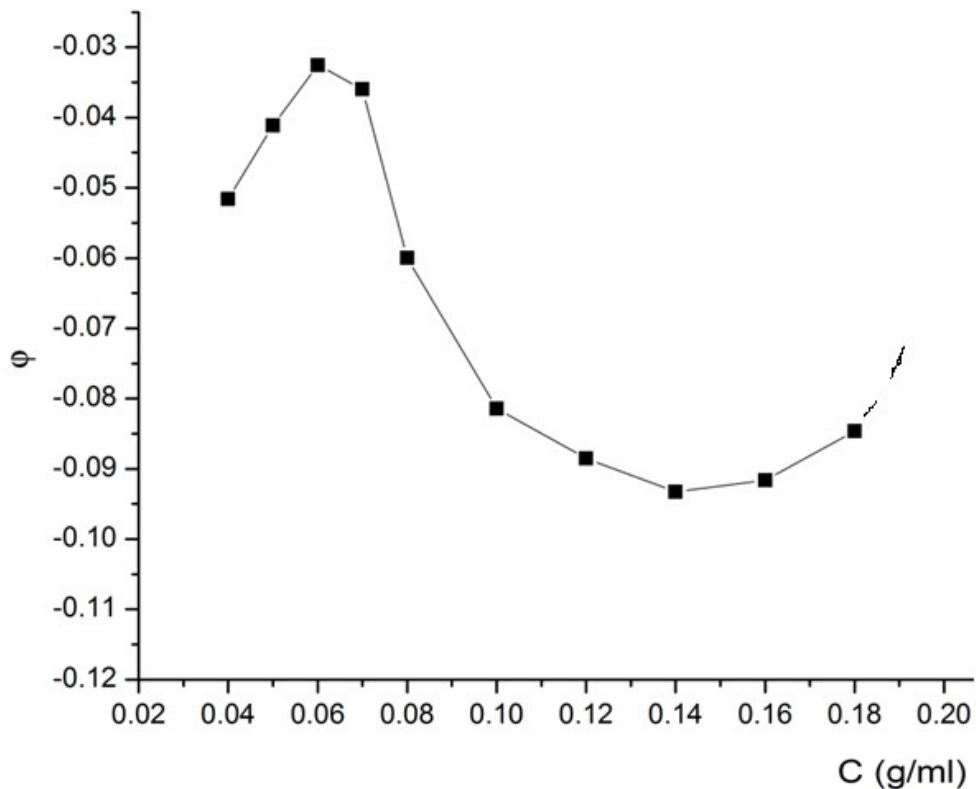
де  $V_{12}$  — об'єм суміші,  $V_1$ ,  $V_2$  — об'єми компонент. Основна складність у таких вимірюваннях полягає у визначенні густини самого альбуміну. Це пов'язано з тим, що структура молекул білка є варіабельною і суттєво змінюється під впливом зовнішніх чинників. Незважаючи на це, об'єм білкових молекул можна розрахувати, виходячи з припущення, що за умов проведення експерименту їх форма та розміри залишаються незмінними, а молекулярна маса альбуміну є відомою. Таким чином, ми можемо розглядати вихідний розчин з концентрацією 20 г/мл як базову систему для подальших розрахунків.

У літературі говориться, що явище "контракції" у розчинах ЛСА є складним та принципово обумовлене змінами в гідратаційній оболонці, яка є нерівномірною, а динамічною, гетерогенною сутністю. Баланс між електрострикцією (зменшення об'єму навколо заряджених груп) та потенційно менш щільним пакуванням навколо гідрофобних груп (збільшення об'єму) визначає чистий об'єм гідратації. В результаті цих

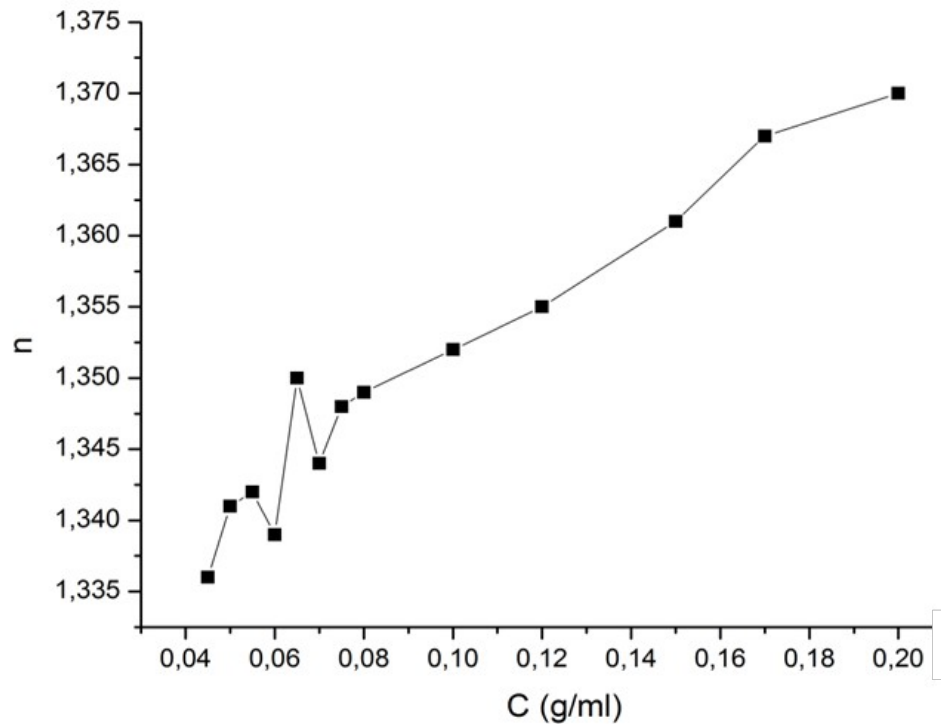
складних взаємодій між білком та розчинником об'єм втрачає свою адитивність.

Об'ємні зміни в білкових розчинах переважно обумовлені змінами стану гідратації білка та навколишнього розчинника, при цьому електрострикція відіграє значну роль [31,33]. Об'ємні зміни, спричинені гідратацією: біохімічні процеси, такі як згортання/розгортання білка, об'єм порожнин та розгортання білка.

Нами було отримано наступні залежності волю метричних характеристик водних розчинів білків, приготовлених з фармакологічної форми концентрації 20%.



*Рис.3 Контракція  $\phi$  водного розчину сироваткового альбуміну людини в залежності від масової долі альбуміну за температури 20С.*



*Рис.4 Показник заломлення  $n$  в водного розчину сироваткового альбуміну людини в залежності від масової долі альбуміну за температури 20 °C.*

На Рис.3,4 наведено результати експериментальних вимірювань контракції водних розчинів сироваткового альбуміну людини (САЛ) при температурі 20 °C, а також значення показника заломлення для тих самих зразків. Як видно з графіків, у ділянці концентрацій, що відповідає природній (нативній) концентрації альбуміну в крові, спостерігається екстремальне значення контракції. У цій же області поведінка показника заломлення стає нелінійною та складною, тоді як за межами цієї зони його залежність від концентрації залишається монотонною.

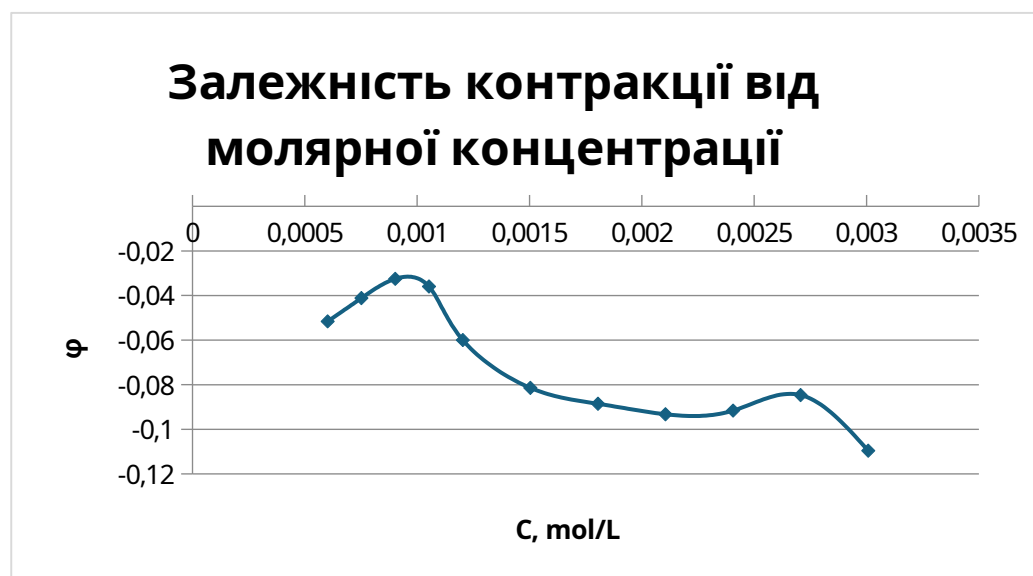
Подібні ефекти відомі також для простих систем, таких як водні розчини спиртів, де поблизу так званих **особливих точок** фіксується не лише порушення монотонності у поведінці фізико-хімічних параметрів, але й повільне встановлення термодинамічної рівноваги після змішування компонентів.

Що стосується біологічних систем, зокрема білкових розчинів, то дослідження рівноважного стану у часі є практично неможливим. Це обумовлено високою чутливістю таких розчинів до зовнішніх факторів, зокрема мікробіологічною активністю, що ускладнює підтримання стабільних умов досліду.

Наші додаткові вимірювання з використанням овоальбуміну підтвердили, що білки альбумінового типу незалежно від походження демонструють спільні фізико-хімічні характеристики. Це свідчить про універсальність їх ролі у біологічних процесах, зокрема в молекулярному транспорті в кровоносній системі.

Нами у подальшому були виміряні залежності густини водно-альбумінового розчину при низьких температурах (6°C). Результати представлено на Рис.5 в залежності від молярної концентрації та мольної частки білкового компоненту.

6 °C





*Рис.5. Контракція водно-альбумінового розчину при температурі 6°C. Результати представлено в залежності від молярної концентрації та мольної частки білкового компоненту.*

Проведені експериментальні вимірювання густини водних розчинів сироваткового альбуміну дозволили побудувати залежність контракції від концентрації білка в розчині. Ця залежність виявила наявність вираженого максимуму в області концентрацій, характерних для середньої плазми крові людини. Такий екстремум не є випадковим, а свідчить про особливий стан системи, що формується саме при цих значеннях концентрації. Спостереження подібної поведінки у водно-білковій системі дозволяє припустити існування специфічного механізму молекулярної взаємодії, який є релевантним для фізіологічних умов.

Зокрема, зростання контракції розчину при збільшенні концентрації альбуміну можна інтерпретувати як індикатор початку **олігомеризації білкових макромолекул** у розчині. Така асоціація молекул може відображати перехід від стану незалежного існування білкових одиниць до більш організованої надмолекулярної структури. Олігомеризація, у свою чергу, впливає на фізико-хімічні властивості розчину, включаючи густину,

в'язкість, оптичні параметри, і, що найважливіше, його **буферну і транспортну функції**.

Таким чином, можна розглядати підвищення контракції як **маркер саморегулювальних процесів у водно-білковому середовищі**, які відіграють важливу роль у підтриманні **гомеостазу крові**. Оскільки альбумін є основним білком плазми і виконує функції підтримки осмотичного тиску, транспорту низькомолекулярних сполук і детоксикації, його здатність до регульованої асоціації у розчині може бути фундаментальним механізмом забезпечення стабільності фізико-хімічних параметрів крові в умовах зовнішніх і внутрішніх змін.

Ці результати відкривають перспективу подальших досліджень щодо встановлення взаємозв'язку між макроскопічними термодинамічними властивостями білкових розчинів і механізмами молекулярного рівня, відповідальними за **регуляцію життєво важливих фізіологічних процесів**.

## ВИСНОВКИ

1. Наявність особливих точок водних розчинів альбуміну, які були раніше отримані по залежностям показника  $pH$  від концентрації при розбавленні фармакологічних форм альбуміну максимальних концентрацій, підтверджено отриманими залежностями густини розчинів від концентрації.
2. Побудована за даними густини залежність контракції водних розчинів альбуміну демонструє пік за концентрацій характерних до зразків середньої плазми крові людини.
3. Збільшення контракції водного розчину альбуміну можна вважати початком олігомеризації молекул білкового компоненту у розчині, що може бути головним чинником гомеостазу крові людини.
4. Другий пік залежності контракції за концентрації білкового компоненту близької до максимальних фармакологічних форм говорить про встановлення перколяції у розчині та втрати принципової можливості саморегулювання параметрів ( $pH$  та ін.) у таких розчинах.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Claudio Catalano, Kyle W. Lucier, Dennis To, Skerdi Senko, Nhi L. Tran, Ashlyn C. Farwell, Sabrina M. Silva, Phat V. Dip, Nicole Poweleit, Giovanna Scapin. The CryoEM structure of human serum albumin in complex with ligands. // *Journal of Structural Biology*. – 2024. – Vol. 216. – P. 108105. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2024.108105>
2. De Simone, G., di Masi, A., Ascenzi, P. Serum Albumin: A Multifaced Enzyme. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22. <https://doi.org/10.3390/ijms221810086>
3. Wu, N., Liu, T., Tian, M., Liu, C., Ma, S., Cao, H., Qi, J. Albumin, an interesting and functionally diverse protein, varies from ‘native’ to ‘effective’ (Review). // *Molecular Medicine Reports*. – 2024. – Vol. 29. – P. 24. <https://doi.org/10.3892/mmr.2023.13147>
4. Mishra, V., & Heath, R. J. Structural and Biochemical Features of Human Serum Albumin Essential for Eukaryotic Cell Culture. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22. – P. 8411. <https://doi.org/10.3390/ijms22168411>
5. Senft M. D., Zocher G., Retzbach S., Maier R., Hiremath A., Zhang F., Stehle T., Schreiber F. Role of Specific and Nonspecific Interactions in the Crystallization Behavior of BSA and HSA Protein Solutions. // *Crystal Growth & Design*. – 2025. – Vol. 25. – P. 1528-7483. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.4c01535>
6. Akbarzadehlaleh, P., Mirzaei, M., Mashahdi-Keshtiban, M., Shamsasenjan, K., & Heydari, H. PEGylated Human Serum Albumin: Review of PEGylation, Purification and Characterization Methods. // *Advanced pharmaceutical bulletin*. – 2016. – Vol. 6(3). – P. 309-317. <https://doi.org/10.15171/apb.2016.043>
7. Fenimore PW, Frauenfelder H, Magazù S, et al. (2013) Concepts and problems in protein dynamics. *Chem Phys* 424: 2-6.
8. Peters Jr T (1996) All about albumin: biochemistry, genetics, and medical

applications. Academic Press, 1-432.

9. He XM, Carter DC (1992) Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature* 358: 209-215

10. Majorek KA, Porebski PJ, Dayal A, et al. (2012) Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Mol Immun* 52: 174-182.

11. Carter DC, Ho JX (1994) Structure of serum albumin. *Adv Protein Chem* 45: 153-203.

12. Akdogan Y, Reichenwallner J, Hinderberger D (2012) Evidence for Water-Tuned Structural Differences in Proteins: An Approach Emphasizing Variations in Local Hydrophilicity. *PLoS ONE* 7: e45681.

13. Sjöberg B, Mortensen K (1994) Interparticle interactions and structure in nonideal solutions of human serum albumin studied by small-angle neutron scattering and Monte Carlo simulation. *Biophys Chemist* 52: 131-138.

14. Varga B, Migliardo F, Takacs E, et al. (2008) Neutron scattering studies on dUTPase complex in the presence of bioprotectant systems. *Chem Phys* 345: 250-258.

15. Olivieril JR, Craievich AF (1995) The subdomain structure of human serum albumin in solution under different pH conditions studied by small angle X-ray scattering. *Eur Biophys J* 24: 77-84.

16. Wilkins DK, Grimshaw SB, Receveur V, et al. (1999) Hydrodynamic radii of native and denatured proteins measured by pulse field gradient NMR techniques. *Biochem* 38: 16424-16431.

17. Magazù S (2000) NMR, static and dynamic light and neutron scattering investigations on polymeric aqueous solutions. *J Mol Struct* 523: 47-59.

18. Chicea D, Chicea R, Chicea LM (2013) HSA particle size characterization by AFM. *Rom Reports Phys* 65: 178-185.

19. Qian J, Tang Q, Cronin B, et al. (2008) Development of a high performance size exclusion chromatography method to determine the stability of human

serum albumin in a lyophilized formulation of Interferon alfa-2b. *J Chromatogr A* 1194: 48-56.

20. Maslova MN, Zaritskiy AR, Chaykov LL (2014) The blood plasma particles sizes oscillations observed by dynamic light scattering. *Biophys J* 106: 457a-458a.

21. B. Jachimska, M. Wasilewska, Z. Adamczyk. Characterization of globular protein solutions by dynamic light scattering, electrophoretic mobility, and viscosity measurements. *Langmuir* 24, 6866 (2008). <https://doi.org/10.1021/la800548p>

22. Chalikian, T. V. (2003). Volumetric Properties of Proteins. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 32(1), 207–235. doi: 10.1146/annurev.biophys.32.110601.141709

23. Rani, R., Rajput, S., Sharma, K., & Baboria, V. (2021). Volumetric and viscometric properties of amino acids in aqueous solutions of various drugs at different temperatures: A review. *Molecular Physics*, 120(4). <https://doi.org/10.1080/00268976.2021.1992029>

24. Malomuzh, N. P., Bulavin, L. A., Gotsulskyi, V. Y., & Guslisty, A. A. (2020). Characteristic Changes in the Density and Shear Viscosity of Human Blood Plasma with Varying Protein Concentration. *Ukrainian Journal of Physics*, 65(2), 151. <https://doi.org/10.15407/ujpe65.2.151>

25. Iqbal, M., & Verrall, R. E. (1987). Volumetric properties of aqueous solutions of bovine serum albumin, human serum albumin, and human hemoglobin. *The Journal of Physical Chemistry*, 91(7), 1935–1941. doi:10.1021/j100291a050