

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В.ЛОМОНОСОВА»

ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

КАФЕДРА МОЛЕКУЛЯРНЫХ ПРОЦЕССОВ И ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ СОСТОЯНИЙ  
ВЕЩЕСТВ

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА  
«ВЛИЯНИЕ ХЛОРИДА КАЛИЯ НА ПОВЕДЕНИЕ БЕЛКА ГЕМОГЛОБИНА В  
ВОДНЫХ РАСТВОРАХ»

Выполнил студент 404 группы

Майков Эмиль

\_\_\_\_\_

подпись студента

Научный руководитель:

профессор

Петрова Галина Петровна

\_\_\_\_\_

подпись научного руководителя

Допущен к защите

Зав. кафедрой \_\_\_\_\_  
подпись зав. кафедрой

Москва

2020

## Оглавление

Введение.....	3
Строение и свойства объектов исследования .....	5
Белки.....	5
Гемоглобин .....	6
Хлорид калия .....	8
Теоретические основы методов рассеяния света.....	11
Поведение белковых молекул в растворе.....	11
Метод статического рассеяния света .....	13
Теория Рэля-Дебая. Определение молекулярного веса рассеивающих частиц. ....	14
Экспериментальная аппаратура.....	16
Обзор литературы .....	18
Экспериментальные результаты.....	21
Методика подготовки исследуемых образцов .....	21
Методика обработки результатов.....	22
Обработка экспериментальных данных.....	23
Обсуждение результатов .....	26
Список литературы .....	28

## Введение

Белковая молекула гемоглобина является объектом интенсивного исследования в современной медицинской физике. На ряду с изучением самого гемоглобина, большой интерес представляет его взаимодействие в совокупности с другими веществами в организме, ведь недостаток или избыток вещества может повлиять на состояние здоровья человека.

Белки – высокомолекулярные органические вещества, выполняющие ключевые функции жизнеобеспечения в организме. Белки участвуют в таких процессах как дыхание, катализ различных химических реакций, образование большинства органических клеток, передача сигналов между клетками. Исходя из всего этого, исследование свойств белков при различных нарушениях в работе организма человека может быть использовано для диагностики и прогноза множества заболеваний.

Нарушения в повседневных процессах живого организма, возникающие из-за заболеваний, в первую очередь проявляются в изменение макропараметров белков. К таким параметрам относятся их молекулярная масса, коэффициент межмолекулярного взаимодействия, коэффициент диффузии. Наблюдая за изменениями этих величин при взаимодействии белковой молекулы с другими веществами, определяют, какие параметры подвержены наибольшему изменению, строят характерные зависимости их от количества взаимодействующего вещества. Все эти наблюдения могут быть использованы для диагностики заболеваний, при которых баланс веществ в организме часто нарушается.

Одним из щелочноземельных металлов, входящих в состав живых организмов, является калий. Действие данного микроэлемента оказывает важнейшее значение для функционирования человеческого организма, в частности, поддержания его жизнедеятельности. Калий содержится в теле человека в виде солей, от которых зависит регуляция баланса воды и ритм сердца. Повышение концентрации данного металла в крови ведет к нарушению сердечного ритма, требующего неотложной помощи. Калий также

участвует в процессах насыщения клеток кислородом, поэтому изучение его взаимодействие с белком – крайне интересная задача для биофизических и медицинских приложений.

Гемоглобин – основополагающая составная в дыхательных процессах – изучение влияния на него других элементов важно для будущего современной медицины. Основной функцией данной молекулы является транспортировка кислорода в организме, что делает ее ключевым элементом в процессах дыхания.

Существуют различные методы исследования белковых молекул в растворе. Оптические методы, основанные на явлениях статического и динамического рассеяния света на частицах раствора, являются наиболее эффективными. С их помощью определяются такие молекулярно-динамические параметры белков, как коэффициенты трансляционной диффузии и гидродинамические радиусы частиц в растворе, а также их массы и коэффициенты межмолекулярного взаимодействия.

Целью данного исследования было изучение особенностей взаимодействия белка гемоглобина с ионами калия в водных растворах. Исходя из цели работы были поставлены следующие задачи:

- 1) приготовление образцов с расчетом соответствующих концентраций и ионных сил;
- 2) измерение молекулярных параметров частиц в чистых растворах и растворах, содержащих ионы калия, с определенной ионной силой;
- 3) обнаружение различий или сходств в полученных значениях масс рассеивающих частиц и коэффициента межмолекулярного взаимодействия при различных ионных силах раствора.

## Строение и свойства объектов исследования

### Белки

Белковые молекулы – полимеры, состоящие из базовых структурных элементов – аминокислот. Молекулярная масса белков варьируется в большом диапазоне (от 5000 до нескольких миллионов г/моль).

Любое соединение, содержащее одновременно одну карбоксильную и одну аминогруппу, называется аминокислотой. В состав белка могут входить до 20 типов аминокислот, различающихся по своему строению. В структуре аминокислот часть цепи, не относящаяся к амино- и карбоксильной группе, обозначается буквой R. Атом углерода, находящийся рядом с карбоксильной группой, называется альфа-углеродом, а аминокислоты, боковая цепь которых связана с этим атомом, называются альфа-аминокислотами. По свойствам боковых цепей аминокислоты подразделяются на четыре группы. Боковая цепь может сделать аминокислоту слабой кислотой, слабым основанием или гидрофобным, плохо впитывающим воду, веществом (если боковая цепь неполярна) [1].

Как уже было сказано, основной составляющей в белке является полипептидная цепь, образованная соединением аминокислот. В процессе биосинтеза белка в полипептидную цепь включаются до 20  $\alpha$ -аминокислот, кодируемых генетическим кодом. Помимо этих стандартных аминокислот в некоторых белках присутствуют специфические нестандартные аминокислоты, возникающие из стандартных в процессе различных модификаций. Характерной особенностью пептидной связи является то, что 6 атомов в ней находятся в одной плоскости. Это связано с тем, что связь C=O не является полностью кратной, а связь C-N не является полностью простой. Белки, в зависимости от состава, бывают простые (содержащие только незамещенные остатки аминокислот в полипептидной цепи) и сложные, когда посредством боковых радикалов аминокислотных остатков к полипептидной цепи присоединяются молекулы жирных кислот, сахаров, ацилглицеринов,

других органических групп (в том числе порфириновых), остатки фосфорной кислоты и т.д.

Макромолекулы белков имеют форму компактных шаров (глобул) или вытянутых структур – фибрилл. Укладка пептидной цепи для каждого белка находится в определенной конфигурации. В структуре белковой молекулы рассматривают несколько уровней организации. Первичной структурой белка называется полная последовательность аминокислотных остатков в полипептидной цепи. Вторичная структура белка представлена спиралью, в которую закручивается полипептидная цепь. Группы N–H и C=O, входящие в пептидную связь, заметно поляризованы: азот обладает большей электроотрицательностью, чем водород, а кислород – большей, чем углерод. Разновидностями вторичной структуры является  $\alpha$  – спираль (каждый атом кислорода находится в связи с атомом водорода четвертой группы NH) и  $\beta$  – слой (водородная связь между звеньями соседних полипептидных цепей). Третичная структура белка представляет собой сложную трехмерную пространственную упаковку вторичных структур, где происходит складывание полипептидной цепи с частичным нарушением спиральной структуры. Белок, состоящий из нескольких полипептидных цепей, связанных между собой нековалентными (не пептидными и не дисульфидными) связями, обладает четвертичной структурой.

### **Гемоглобин**

Одним из примеров белка с четвертичной структурой является сложная молекула гемоглобина. Гемоглобин — железосодержащий белок, отвечающий за доставку кислорода к тканям организма и углекислого газа обратно к лёгким. Характерным свойством данного белка является его способность присоединять к себе молекулы кислорода и углекислого газа.

Сложная молекула гемоглобина состоит из двух альфа субъединиц (спиралей) и двух бета слоев. Каждая из структурных единиц связана с молекулой железосодержащего гема (рис. 1), объединяющего молекулу.

Только данная упаковка позволяет гемоглобину полноценно выполнять свою функцию – переносить кислород.

Содержание гемоглобина в массе эритроцитов составляет 35 %, что делает его самым распространенным элементом в их составе. Эритроциты варьируются в размерах от 7 до 12 мкм, а также обладают различными формами, среди которых основную массу (80-90%) составляют эритроциты двояковогнутой формы – дискоциты. Средняя концентрация гемоглобина в эритроцитарной массе 320—360 г/л.

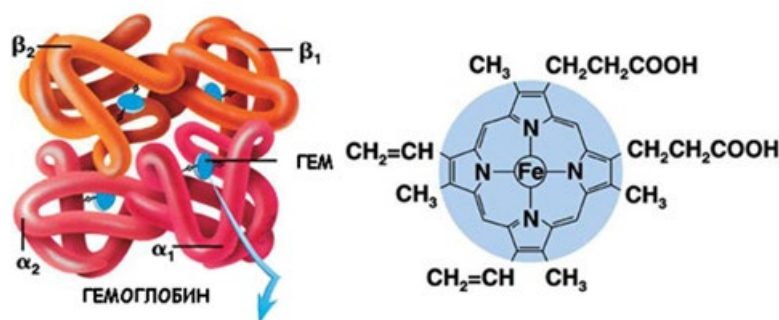


Рис. 1. Структура гемоглобина (слева) и структурная формула гема (справа)

Количественное содержание гемоглобина в крови отражает цветовой показатель крови, который в норме равен 1,0. В одном эритроците содержится около 340 млн. молекул гемоглобина, каждая из которых примерно состоит из  $10^3$  атомов С, Н, О, N, S и 4-х атомов железа.

Поддержание концентрации гемоглобина в крови является жизненно необходимым фактором у животных. Ее снижение в крови часто происходит при одновременном уменьшении количества эритроцитов и изменения их качественного состава, что может привести к возникновению анемии. Анемия приводит к снижению дыхательных функций крови и развитию кислородного голодания.

Буферные свойства гемоглобина обусловлены возможностью взаимодействия его соединений с калиевой солью с образованием эквивалентного количества соответствующей калийной соли и свободного гемоглобина (Hb), обладающего характером очень слабой органической кислоты [2].

Основные характеристики молекулы гемоглобина представлены в таблице 1.

Общая концентрация гемоглобина в крови	130~185 г/л
Молекулярная масса	64.5–68 кДа
Изоэлектрическая точка	pI 6,8±0,1
Растворимость сухого гемоглобина в крови	20 г/л (вода)

Таблица 1. Параметры гемоглобина

Экспериментальные результаты исследований гемоглобина в водных растворах при изменении рН методом статического рассеяния [3], показали, что при накоплении на поверхности белка большого положительного или отрицательного заряда, молекула гемоглобина начинает распадаться на более мелкие составляющие, содержащие две и даже одну отдельную глобулу (рис. 2).

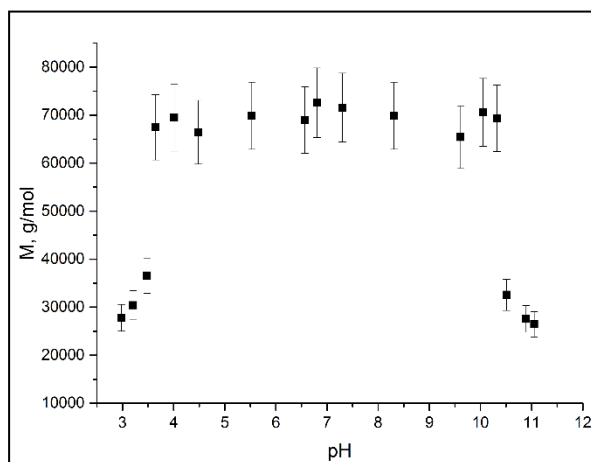


Рис. 2. График зависимости массы гемоглобина от рН раствора

### Хлорид калия

Хлорид калия – соль соляной кислоты и калия, неорганическое соединение белого цвета. На вид представляет собой белые, бесцветные кубические кристаллы, не имеющие запаха. Температура кипения составляет 1407°С, температура плавления - 776°С. Данное вещество можно получить в результате взаимодействия гидроксида калия с соляной кислотой



(лабораторный метод). В промышленном масштабе эту соль получают из минерала сильвинита методом галургии и флотации.

Калий поступает в организм человека, в основном, в виде солей с продуктами питания и напитков. Слишком высокий или слишком низкий уровень калия в крови может привести к различным осложнениям, включающим нарушение ритма сердца с возможной его остановкой.

Основная часть калия в организме запасается внутри клеток-эритроцитов. Большое количество накопленного в клетках калия может быть использовано для поддержания его должного уровня в крови. Воздействие определенных медицинских препаратов может повлиять на способность калия накапливаться и перемещаться внутрь клеток или переходить в межклеточное пространство, что, в свою очередь, сказывается на изменении уровня его содержания в крови. Калий, находящийся в межклеточном пространстве, может вести себя как токсичный тяжелый металл, т.к. обладает большим ионным радиусом равным 1,33 Å.

Присутствие ионов калия в растворах белков – альбумина, гамма-глобулина и коллагена способствует увеличению массы рассеивающих частиц за счет образования т.н. нанокластеров [4]. Уменьшение значения коэффициента трансляционной диффузии рассеивающих частиц в растворах, содержащих ионы  $K^+$ , может быть объяснено изменением характера взаимодействия белковых молекул. Вместо кулоновского отталкивания одинаково заряженных частиц возникают силы диполь-дипольного притяжения. При прочном связывании тяжелого иона ( $K^+$ ) с отрицательно заряженными группами на поверхности белка, поверхностный заряд на белке компенсируется, и определяющую роль во взаимодействии молекул начинают играть диполи. Силы диполь-дипольного взаимодействия при сближении молекул, приводят к образованию более крупных частиц (кластеров) и уменьшению подвижности частиц и, соответственно, к уменьшению коэффициента диффузии  $D_t$ .

Ионы калия участвуют в электрических импульсах мышечных и нервных клеток, чем характеризуется их важная роль в поддержании нормальной работы сердечно-сосудистой системы. Также калий выполняет следующие функции в организме человека:

- роль катализатора в белковом и углеродном обмене;
- поддержание кислотно-щелочного баланса;
- регуляция давления крови;
- при взаимодействии с натрием поддерживает нормальное функционирование клеточных мембран;
- способствует нормальной работе почек.

# Теоретические основы методов рассеяния света

## Поведение белковых молекул в растворе

Белковые глобулы в растворе относятся к макромолекулам - полиэлектролитам, полимерные цепочки у которых содержат ионизированные боковые группы.

В теории Дебая – Хюккеля рассматривается идеализированная модель раствора электролита с ионами в виде твердых шариков, погруженных в сплошную среду с диэлектрической проницаемостью и взаимодействующие друг с другом по закону Кулона [5].

Изолированный ион с зарядом  $Ze$  ( $Z$  – валентность иона,  $e$  – заряд электрона) создает на расстоянии  $r$  в чистой воде электрический потенциал:

$$\varphi(r) = \frac{Ze}{\varepsilon \cdot r}. \quad (1)$$

Поскольку раствор в целом является электрически нейтральным, то около каждой заряженной группы на поверхности белковой молекулы должен находиться противоположно заряженный ион. Согласно теории Дебая-Хюккеля, каждая молекула оказывается окруженной атмосферой противоионов, что приводит к частичной экранировке кулоновских взаимодействий [6].

Таким образом, в среде, содержащей ионы противоположного знака, потенциал  $\varphi(r)$  имеет вид:

$$\varphi(r) = \frac{1}{\varepsilon r} \exp(-\varkappa r). \quad (2)$$

Плотность этой атмосферы, характеризуемая параметром  $\varkappa$  - в данной теории, определяется общей концентрацией ионов в растворе (ионной силой)  $\mu$ :

$$\varkappa^2 = \frac{4\pi q^2 \mu}{\varepsilon kT}, \quad \mu = \sum c_i \cdot z_i. \quad (3)$$

Здесь  $e$  – заряд электрона,  $z_i$  – валентность иона,  $c_i$  – молярная концентрация ионов,  $\varepsilon$  – диэлектрическая проницаемость раствора. Параметр  $\varkappa$  - имеет смысл обратной величины эффективного радиуса ионной атмосферы, т.е. определяет расстояние до иона, на котором осуществляется

полная экранировка кулоновских взаимодействий. Ионная сила характеризует общее число ионных зарядов в единице объема независимо от их знаков.

Суммарный заряд на молекуле белка определяется концентрацией свободных протонов в растворе, т.е. величиной рН:

$$pH = -\lg[H^+]. \quad (4)$$

Значение рН меняется при добавлении в раствор кислоты или щелочи, при этом в среде появляется либо избыток, либо недостаток протонов по сравнению с чистой водой. Концентрация ионов водорода в чистой воде составляет  $\sim 10^{-7}$  моль/л, т.е. для нейтральной среды рН  $\sim 7$ , для кислой рН  $< 7$ , для основной рН  $> 7$ .

Для каждого белка существует определенное значение рН, при котором молекула в целом электронейтральна – так называемая, изоэлектрическая точка (рI). При значениях рН  $> pI$  белок будет обладать отрицательным суммарным зарядом, при рН  $< pI$  – положительным (для гемоглобина рI  $\approx 6,8$ ).

Группы на поверхности белковой молекулы взаимодействуют сложным образом, и их ионизация происходит не независимо. Для анализа связи рН раствора с суммарным зарядом на белке можно прийти к приближенному уравнению, выражающему нелинейную зависимость величины  $Z$  от рН.

Взаимодействие макроионов в растворе, содержащем еще и сильный электролит, было рассмотрено Скэтчардом [7]. Выражение для второго вириального коэффициента, который характеризует взаимодействие частиц в растворе, согласно его теории, можно записать следующим образом:

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

Здесь  $V_1$  – удельный объем растворителя,  $Z$  – заряд макроиона,  $M_2$  – масса макроиона,  $m_3$  – концентрация ионов соли. Параметры  $\beta_{22}$ ,  $\beta_{23}$ ,  $\beta_{33}$  характеризуют взаимодействия между ионами в растворе: взаимодействие между зарядами макроионов –  $\beta_{22}$ , взаимодействие между макроионами и ионами соли  $\beta_{23}$ , взаимодействие только между ионами соли –  $\beta_{33}$ .

Согласно этой формуле, коэффициент межмолекулярного взаимодействия изменяется с ростом суммарного заряда на белке по параболическому закону  $\sim Z^2$  с минимумом в изоэлектрической точке ( $Z = 0$ ).

### Метод статического рассеяния света

Рассмотрим основные положения теории рассеяния для случая изотропных молекул  $l \leq \frac{\lambda}{20}$ . В этом случае рассеяние происходит с сохранением частоты падающего света, то есть рассеяние всеми элементарными центрами (осцилляторами) частицы можно считать происходящими в одной и той же фазе. Их можно рассматривать как точечные дипольные излучатели с дипольным моментом  $p = \alpha E$ , а интенсивность рассеяния определяется электронной поляризуемостью  $\alpha$ , которая характеризует способность элементов объёма смещаться под действием падающей волны (рис. 3).

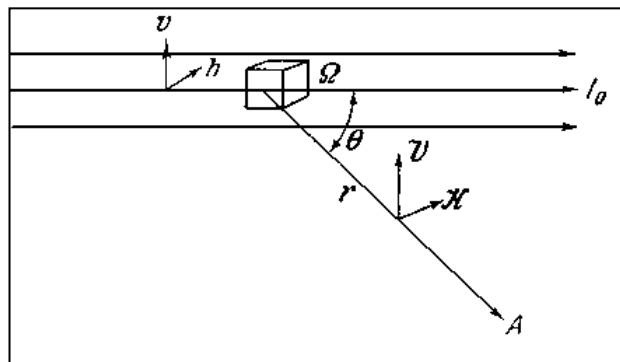


Рис. 3. Компоненты электрического вектора световой волны в первичном ( $v, h$ ) и рассеянном ( $V, H$ ) пучках

Соотношения между интенсивностями рассеянного света (в т. А)  $J$  и первичного пучка  $J_0$  имеет вид:

$$J = \frac{16\pi^4}{\lambda_0^4 r^2} \alpha^2 N_0 \Omega J_0 P(\theta), \quad P(\theta) = \frac{1}{2} (1 + \cos \theta) \quad (6)$$

Здесь  $\lambda_0$  и  $J_0$  — длина и интенсивность падающей волны,  $r$  и  $\theta$  — расстояние и угол до точки наблюдения,  $\alpha$  — поляризуемость рассеивающих частиц,  $N_0$  — число молекул в элементе объёма  $\Omega$ . Функция  $P(\theta)$  в общем

случае определяется поляризацией света, размерами, формой и анизотропией рассеивающих молекул.

Обычно удобнее пользоваться приведённой интенсивностью рассеяния  $R_\theta$ , не зависящей от произвола в выборе  $J_0$ ,  $r$  и  $\theta$ :

$$R_\theta = \frac{Jr^2}{J_0\Omega} = \frac{16\pi^2}{\lambda_0^4} \alpha^2 N_0 P(\theta), \quad (7)$$

т.н. рэлеевский коэффициент рассеяния.

Дальнейший расчёт устанавливает связь между  $R_\theta$  и концентрацией раствора  $c$  (для разбавленных растворов):

$$R_\theta = cKMP(\theta), \quad K = \frac{2\pi^2 n_0^2}{\lambda_0^4 N_A} \left(\frac{dn}{dc}\right)^2, \quad (8)$$

где  $M$  — молекулярная масса растворённого вещества,  $H$  — оптическая постоянная раствора,  $\frac{dn}{dc} = \frac{n - n_0}{c}$  — инкремент показателя преломления раствора,  $n$  и  $n_0$  — показатели преломления раствора и растворителя.

Функция  $P(\theta)$  (форм-фактор) в общем случае определяется поляризацией света, размерами, формой и анизотропией рассеивающих молекул. В данном случае  $P(0^\circ) = 1$ ,  $P(90^\circ) = 0.5$  для неполяризованного и  $P(\theta) = 1$  для поляризованного падающего света [7].

### **Теория Рэлея-Дебая. Определение молекулярного веса рассеивающих частиц.**

Уравнение рассеяния позволяет определить молекулярную массу малых взаимодействующих частиц:

$$M = \left(\frac{cK}{R_{90}}\right)^{-1}, \quad (9)$$

где  $K$  — оптическая константа. Однако в большинстве полимерных растворов сказывается влияние межмолекулярных взаимодействий.  $R_{90}$  — коэффициент рассеяния, не зависящий от выбора условий эксперимента. Как было показано Дебаем, для рассеяния на флуктуациях диэлектрической проницаемости, обусловленных флуктуациями  $\Delta N$  числа рассеивающих частиц в

элементарных объемах, малых по сравнению с  $\lambda^3$ , но содержащих еще достаточное число молекул, выполняется следующая зависимость:

$$R_{90} = \frac{2\pi^2 c n_0^2 \left(\frac{dn}{dc}\right)^2}{\lambda_0^4 N_A \frac{1}{RT} \frac{\partial \Pi}{\partial c}}, \quad (10)$$

где  $\Pi$  — осмотическое давление раствора.

Осмоз — это диффузия вещества через полупроницаемую перегородку, разделяющую раствор и чистый растворитель, или два раствора различной концентрации, возникающая в результате понижения химического потенциала растворителя в присутствии молекул растворенного вещества. Направленный поток растворителя в раствор приводит к возникновению осмотического давления.

Осмотическое давление — это избыточное гидростатическое давление со стороны раствора, препятствующее диффузии растворителя через полупроницаемую перегородку (мембрану), разделяющую чистый растворитель и раствор, и проницаемую только для растворителя.

Зависимость коэффициента рассеяния от  $\frac{\partial \Pi}{\partial c}$  имеет физический смысл -- разность осмотических давлений в соседних областях препятствует развитию флуктуаций концентрации в растворе, таким образом, чем больше  $\frac{\partial \Pi}{\partial c}$ , тем меньше развиты флуктуации, тем меньше коэффициент рассеяния.

Для идеальных растворов, в которых скомпенсированы межмолекулярные взаимодействия, выполняется закон Вант-Гоффа:

$$\Pi = \frac{cRT}{M}, \quad (11)$$

где  $T$  — температура раствора.

Осмотическое давление раствора как функцию концентрации можно представить в виде степенного ряда:

$$\Pi = RT(Ac + Bc^2 + \dots), \quad (12)$$

где  $A$ ,  $B$  и т.д. — вириальные коэффициенты ряда, где  $A = \frac{1}{M}$ , который позволяет определить молекулярную массу рассеивающих частиц. В этом случае для разбавленных растворов макромолекул имеет место окончательное

выражение:

$$\left(\frac{cHK}{R_{90}}\right) = \frac{1}{M} + 2Bc + \dots \quad (13)$$

Полученная зависимость  $R_{90}$  от  $c$  делает невозможным определение  $M$  путём измерения  $R_{90}$  при одной концентрации. Необходимо провести измерения для нескольких  $c$  и экстраполировать результаты к  $c = 0$ :

$$M = \left(\frac{cH}{R_{90}}\right)_{c \rightarrow 0}^{-1} \quad (14)$$

Оптическая постоянная раствора находится путём рефрактометрических измерений  $\frac{dn}{dc}$ . Экстраполяцию выполняют графически, откладывая  $\frac{cHK}{R_{90}}$  как функцию  $c$ . Наклон прямой позволяет вычислить коэффициент  $B$  [8].

Второй вириальный коэффициент характеризует степень неидеальности раствора и учитывает парные межмолекулярные взаимодействия в растворе. Термодинамическая теория растворов макромолекул даёт следующее выражение для  $B$ :

$$B = \frac{\nu_0 N_A}{2M^2} \quad (15)$$

где  $\nu_0$  – исключённый объём, т.е. объём, из которого молекула вытесняет все остальные.

Отметим также, что мультиплетные взаимодействия, описываемые третьим вириальным коэффициентом, проявляются в искривлении прямых, выражающих зависимость  $\frac{cK}{R_{90}}$  от  $c$ .

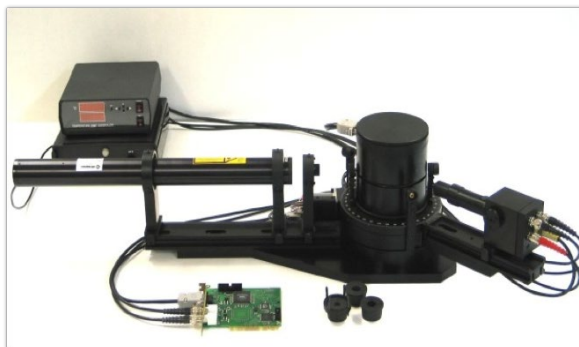
### Экспериментальная аппаратура

В данной работе эксперименты проводились с помощью универсального прибора, основанного на оптическом методе рассеяния света, «Photocor Complex» (рис. 4) [9], работающего в режиме интегрального светорассеяния с использованием чувствительного фотоприемника ФЭУ.



Характерный линейный размер рассеивающего объема обычно составляет 50...100 мкм. В результате для эффективного приема столь малых интенсивностей рассеянного света необходимо использовать фотоприемники, работающие в режиме счета фотонов.

Кювета с исследуемым раствором помещается в кюветное отделение анализатора. Свет от лазера, проходя через раствор, рассеивается на полимерных молекулах или дисперсных частицах, имеющих в растворе.



*Рис. 4. Спектрометр Photocor Complex*

Для изучения рассеивающих свойств водных растворов белков была использована оптическая установка «Photocor Complex», в которой в качестве источника света использовался диодный лазер с длиной волны 647 нм и мощностью 25 мВт. Пучок света попадает на фокусирующий узел и проходит через кювету с исследуемым раствором. Луч, рассеянный под углом  $90^\circ$ , регистрируется фотодиодом. Температура образца ( $20^\circ\text{C}$ ) поддерживается при помощи встроенного в прибор термостата. Выходной сигнал регистрируется на компьютере. Обработка сигнала производится на компьютере в автоматическом режиме с помощью программы Static Light Scattering. Для контроля полученных данных была проведена повторная обработка вручную методом Дебая.

## Обзор литературы

В литературе имеется большое число работ по исследованию взаимодействия белковых макромолекул с различными ионами, в основном, ионами тяжелых металлов, обладающими большими ионными радиусами [10]. Методом статического светорассеяния были исследованы изменения молекулярных параметров яичного альбумина в чистых растворах и растворах, содержащих ионы натрия и цезия. Как показывают результаты этих исследований массы рассеивающих частиц в растворах с большими ионами, резко возрастают в области изоэлектрических точек белка, а знак зависимости второго вириального коэффициента раствора от рН меняется на обратный (рис. 5). Данные зависимости показывают, что при смене характера межмолекулярного взаимодействия (переходу к диполь-дипольному взаимодействию) в растворах с более тяжелыми металлами ( $R_{Cs^+} = 1,67 \text{ \AA}$ ), появляются надмолекулярные структуры – дипольные белковые кластеры [11].

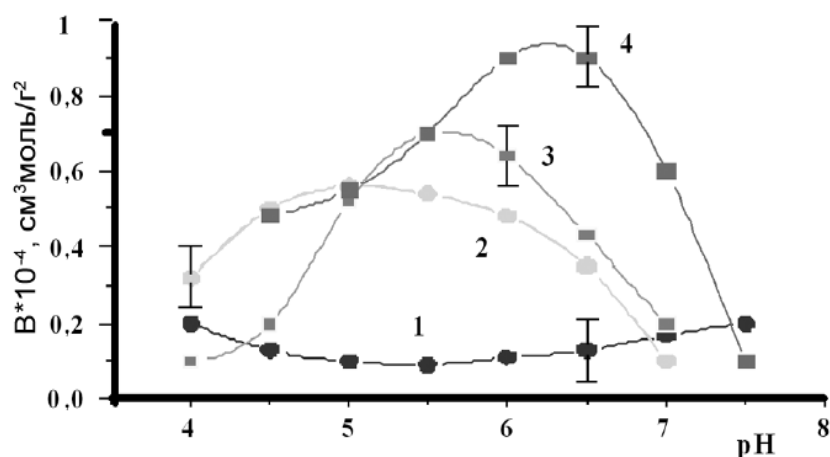


Рис. 5. График коэффициента межмолекулярного взаимодействия от рН в растворах яичного альбумина, содержащих ионы натрия (1) и ионы цезия (2, 3, 4) при различных ионных силах

В работе [12] методом динамического рассеяния и зондовой микроскопии были исследованы водные растворы основных белков сыворотки крови при наличии в них малых концентраций ионов калия или европия.

Эксперименты проводились с помощью фотонно-корреляционного спектрометр «Photocor Complex», и атомно силового микроскопа АСМ Solver Р47. В качестве исследуемых белков были взяты человеческий альбумин и гамма-глобулин фирмы “Sigma”.

В результате работы было обнаружено, что с увеличением количества ионов калия в растворах альбумина и гамма-глобулина происходило уменьшение коэффициента трансляционной диффузии рассеивающих частиц, что свидетельствует о возникновении дипольных нанокластеров.

Радиус образованных нанокластеров растет с увеличением ионной силы раствора. После воздействия на раствор ультразвука происходит разрушение нанокластеров – радиус частиц стал порядка 5 нм (рис. 6).

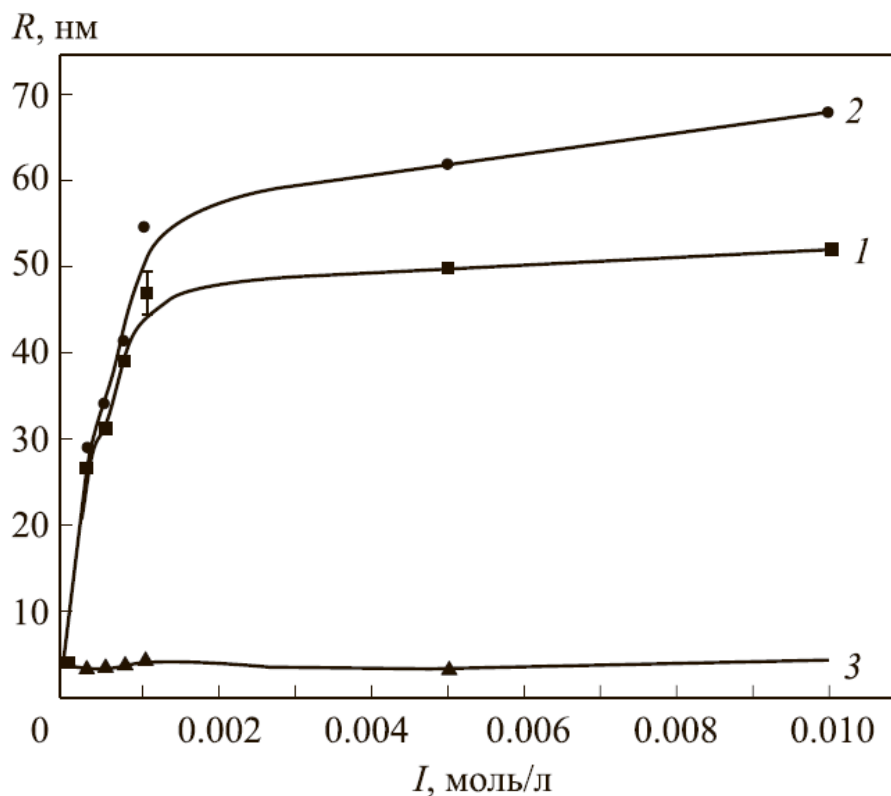


Рис. 6. График зависимости радиуса нанокластеров альбумина от ионной силы раствора. 1 – водный раствора альбумина с KCl, 2 – раствор альбумина с  $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$ , 3 – раствор альбумина с KCl после воздействия на него ультразвуком

В работе [13] исследовалась сорбция некоторых ионов -  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  и  $\text{Cs}^+$  на сывороточном альбумине и гемоглобине.

Для приготовления растворов в качестве исследуемых образцов были взяты белки бычьего сывороточного альбумина и гемоглобина (Sigma, USA, стерильные). Для получения ионов использовались соли хлоридов (NaCl, KCl, RbCl, CsCl) с содержанием основного компонента более 99% (химически чистые).

Регистрацию концентраций исследуемых катионов  $K^+$  и  $Na^+$  в растворах проводили на ионометрическом преобразователе И-500 с электродной системой, включающей измерительный и вспомогательный электроды, предназначенные для измерения в водных растворах концентрации одно- и двухвалентных анионов и катионов.

Были проведены две серии экспериментов с попарно одинаковыми и различными концентрациями солей (рис. 7). Результаты показали, что с гемоглобином и альбумином предпочтительнее связываются ионы, обладающие большим ионным радиусом, при этом наличие  $Na^+$  в водном белковом растворе увеличивает количество сорбированного  $K^+$ .

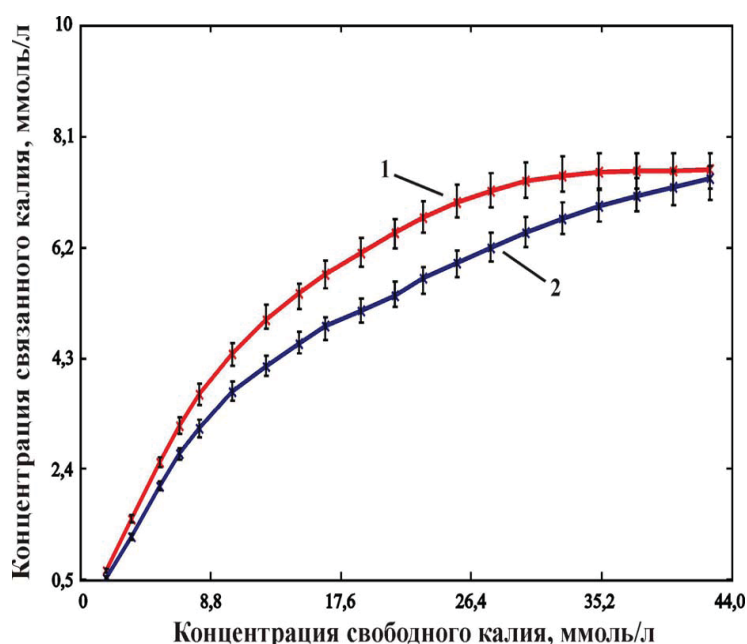


Рис. 7. Зависимость количества связанного  $K^+$  с гемоглобином от концентрации свободного  $K^+$  в растворе при максимальной (0.5 моль/л) (1) и минимальной концентрации  $Na^+$  (0.05 моль/л) (2)

## Экспериментальные результаты

### Методика подготовки исследуемых образцов

Эксперименты были проведены с белками фирмы “Sigma” – гемоглобин человека H7379 [14].

Для приготовления образцов в роли растворителя была использована вода для инъекций АО «Новосибхимфак», рН  $\approx 7$ . Экспериментальные измерения проводились при температуре 20 °С.

С целью исследования свойств чистого раствора гемоглобина (без добавления хлорида калия) в 5 мл чистой дистиллированной воды добавляется 25 мкл раствора гемоглобина с концентрацией гемоглобина 10 мг/мл. В результате получался раствор с  $C_0=0,05$ . Измерения проводились для набора концентраций от 0,05 мг/мл до 0,25 мг/мл с шагом 0,05 мг/мл.

Для исследования взаимодействия хлорида калия с гемоглобином раствор с хлоридом калия приготавливался отдельно. Для этого был произведен следующий расчет ионной силы:

$$\mu = \frac{1}{2} \sum_i c_i z_i^2 \quad (16)$$

В эксперименте использовался раствор KCl с ионными силами: 0,0015 М, 0,015 М, 0,15 М.

Измерения проводились для концентраций гемоглобина от 0,05 мг/мл до 0,25 мг/мл с шагом 0,05 мг/мл. В конце измерений для значения ионной силы при концентрации гемоглобина 0,25 мг/мл были измерены значения рН.

Все эксперименты были проведены для значений рН вблизи изоэлектрической точки. Опыты проводились с двумя образцами белка, полученных в разное время.

## Методика обработки результатов

Для определения молекулярного веса (уравнение – 14) и второго вириального коэффициента (уравнение – 15) измерялись относительные интенсивности рассеянного света при  $\theta = 90^\circ$  ( $I_{90^\circ}$ ) при различных значениях ионной силы и концентрации раствора, при этом учитывались значения интенсивности  $I_{90^\circ}$ .

Рефракционный инкремент, взятый для обработки  $dn/dc \sim 2 \cdot 10^{-4}$  л/г [15].

Использование воды и бензола в качестве калибровочных веществ позволило от относительных интенсивностей перейти к коэффициенту рассеяния:

$$R_{90} = \frac{I - I_{\text{в}}}{I_{\text{б}} - I_{\text{ф}}} \cdot 10^{-3} [\text{М}^{-1}], \quad (17)$$

где  $I_{\text{в}}$  – интенсивность рассеянного света для воды,  $I_{\text{ф}}$  – интенсивность фона,  $I_{\text{б}}$  – интенсивность рассеяния для бензола.

Графики концентрационных зависимостей параметра рассеяния были обработаны методом наименьших квадратов в программе Origin 8.5.

## Обработка экспериментальных данных

В ходе исследования были получены значения интенсивности рассеянного света при различных значениях концентрации белка гемоглобина. Для каждой ионной силы были построены графики зависимости интенсивности от концентрации для чистых водных растворов гемоглобина – образец I (рис. 8(а)) и при добавлении хлорида калия (рис. 8(б, в)).

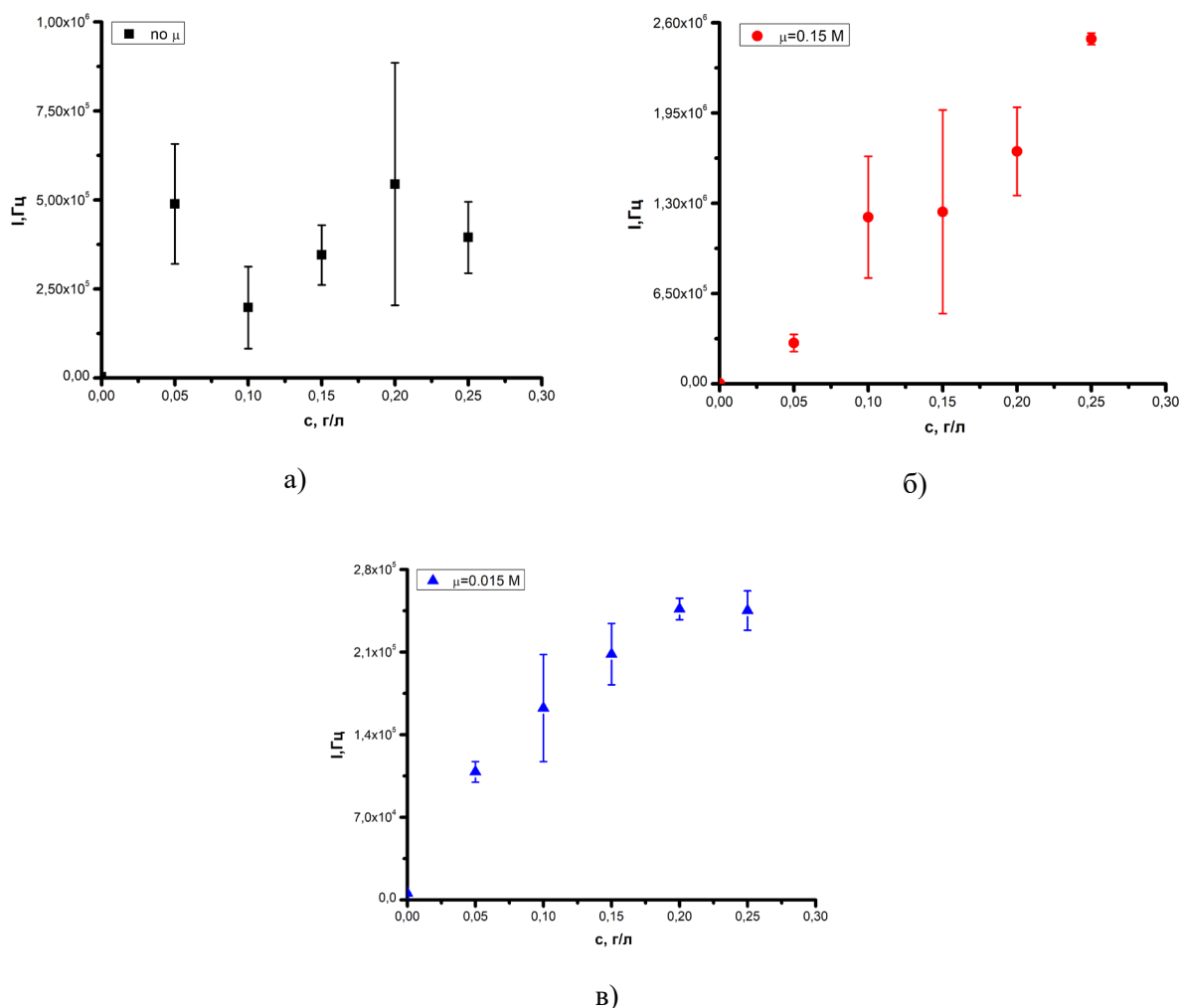


Рис. 8. График зависимости интенсивности от концентрации гемоглобина: а) для чистого раствора и при добавлении в раствор гемоглобина KCL б) с  $\mu=0,15$  M, в) с  $\mu=0,015$  M

Для удобства представления результатов был построен сводный график зависимости интенсивности рассеянного света от концентрации гемоглобина при всех выше рассмотренных ионных силах раствора (рис. 9).

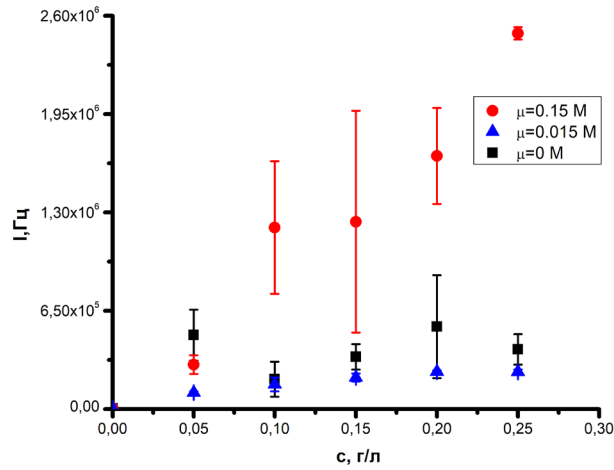


Рис. 9. График зависимости интенсивности от концентрации гемоглобина для чистого раствора и при добавлении в раствор гемоглобина KCL

На основе измеренных значений интенсивности для двух разных образцов, полученных в разное время, были построены две серии графиков концентрационных зависимостей параметра рассеяния  $sK/R_{90}$  (рис. 10).

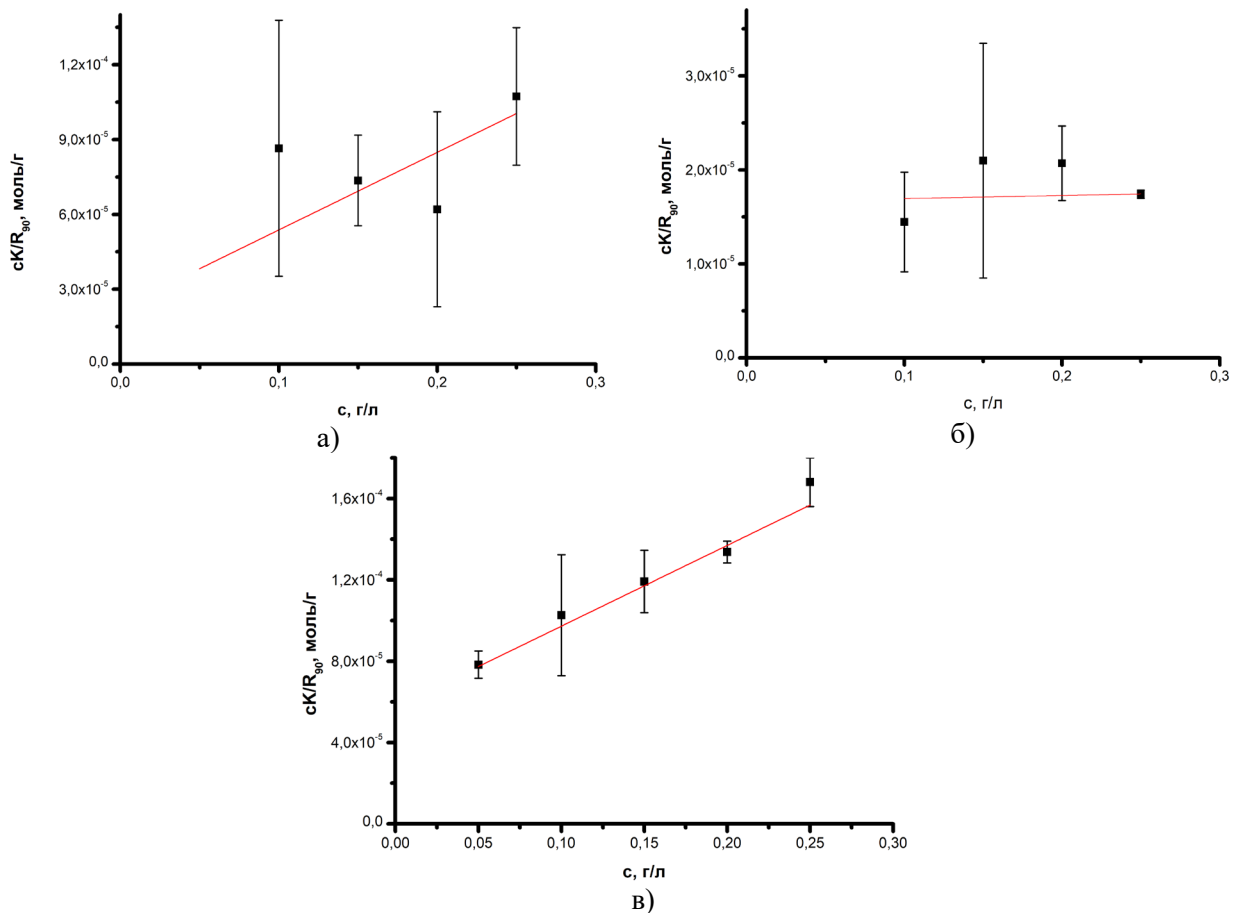


Рис. 10. Первая серия графиков зависимостей  $sK/R_{90}$  от концентрации гемоглобина для чистого раствора а) и при добавлении в раствор гемоглобина KCL б) с  $\mu=0,15 \text{ M}$ , в) с  $\mu=0,015 \text{ M}$



По итогам эксперимента значения массы и второго вириального коэффициента для первого образца гемоглобина при разных значениях ионной силы составили (таблица 2):

$\mu, M$	Масса рассеивающих частиц, кДа	Коэффициент взаимодействия частиц, моль*дм <sup>3</sup> /г <sup>2</sup>
0	44.1±54	(11.4±8.7)*10 <sup>-5</sup>
0,015	17.3±2	(19.8±1.7)*10 <sup>-5</sup>
0,15	60.1±20.7	(1.63±1.2)*10 <sup>-5</sup>

Табл. 2. Таблица молекулярных параметров рассеивающих частиц при разных значениях ионной силы (образец I)

Для второго образца гемоглобина, графики зависимости  $sK/R_{90}$  выглядели следующим образом (рис. 11):

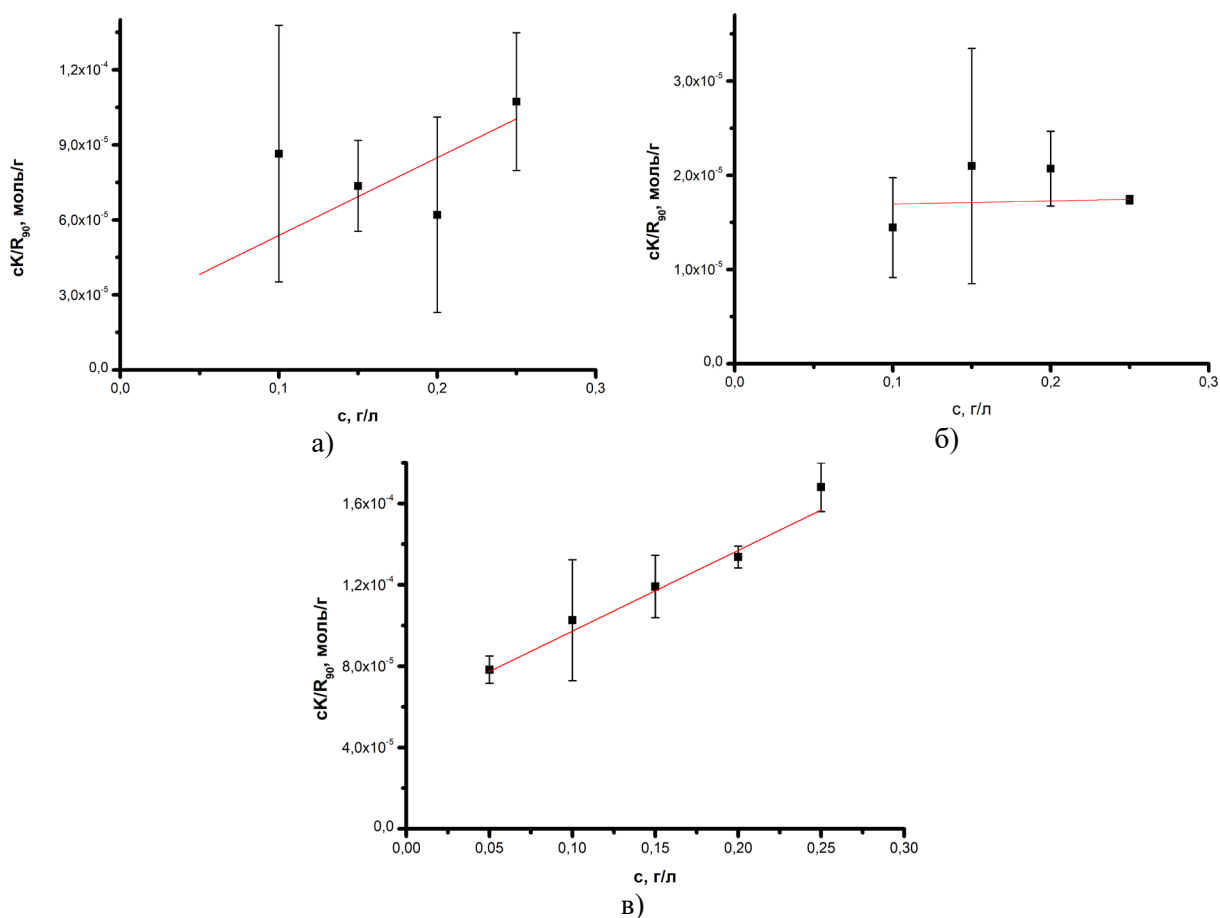


Рис. 11. Вторая серия графиков зависимостей  $sK/R_{90}$  от концентрации гемоглобина для чистого раствора а) и при добавлении в раствор гемоглобина KCL б) с  $\mu=0,001 M$ , в) с  $\mu=0,01 M$

Значения массы и второго вириального коэффициента для второго образца гемоглобина при разных значениях ионной силы составили (таблица 3):

$\mu, \text{M}$	Масса рассеивающих частиц, кДа	Коэффициент взаимодействия частиц, моль*дм <sup>3</sup> /г <sup>2</sup>
0	58.1±16,3	(1.23±2.5)*10 <sup>-5</sup>
0,001	22.1±6.1	(19.8±7.7)*10 <sup>-5</sup>
0,01	33.9±49.7	(4.33±3.1)*10 <sup>-4</sup>

Табл. 3. Таблица молекулярных параметров рассеивающих частиц при разных значениях ионной силы (образец II)

### Обсуждение результатов

По итогам эксперимента значения массы и второго вириального коэффициента для всех рассмотренных случаев показаны: для 1-го образца: в таблице 2, для второго образца – в таблице 3.

Была определена масса свободного белка гемоглобина в водном растворе при различной концентрации белка в изоэлектрической точке. Полученные результаты для массы чистого белка гемоглобина (образец II) согласуются с данными других работ [16, 2]. Добавление в раствор ионов калия (раствор хлорида калия) показало, что масса рассеивающих частиц в растворе при малой ионной силе становится меньше, чем молекулярная масса белка, примерно, в три раза. Это может объясняться изменением зарядов на поверхности белка, а это, в свою очередь, может вызвать разрушение четвертичной структуры гемоглобина с уменьшением средней массы рассеивающих частиц. При увеличении концентрации ионов, масса частиц растет и достигает в, среднем, величины равной половине молекулярной массы молекулы гемоглобина.

Значительный разброс величин, указанных на графиках, может объясняться тем, что система белок в изоэлектрической точке (экстремальная

точка), окруженная атмосферой анионов и катионов -  $K^+$  и  $Cl^-$ , является очень неустойчивой, а это неизбежно должно сказаться на точности измерений.

Данные, приведенные в таблицах, свидетельствуют также, что величины второго вириального коэффициента увеличиваются с ростом ионной силы раствора. Из этого можно сделать вывод о том, что ионы электролита оказывают заметное воздействие на белок гемоглобин.

## Список литературы

1. *Физика белка: Курс лекций с цветными и стереоскопическими иллюстрациями и задачами* Финкельштейн А.В., Птицын О.Б. 2012 г.
2. *Биологическая химия.* Збраский Б.И., Иванов И.И., Мардашев С.Р. Ленинград : Медицина, 1965 г.
3. *Влияние металлических ионов на поведение белковых макромолекул в водных растворах.* Рябчикова М.С. Москва : б.н., 2017 г.
4. *Special role of potassium ions in living organisms functioning measured by laser light scattering.* Petrova G.P, Petrusevich Yu.M., Boiko A.V., Perfilieva I.A., Ten D.I., I. Moscow : Moscow State University.
5. *Анизотропные жидкости. Биологические структуры.* Петрова Г.П. Москва : Физический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова, 2007 г.
6. *Физическая химия полимеров* Тенфорд. Ч. Изд-во Химия. Москва. 1965 г
7. *Оптические спектральные методы исследования жидкостей и растворов. Часть 1.* Петрова Г.П. Москва : Физический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова.
8. *Лабораторная диагностика анемий: Пособие для врачей.* Долгов В.В., Луговская С.А., Морозова В.Т., Почтарь М.Е. Тверь: Губернская медицина, 2001 г.
9. *Официальный сайт приборов «Photocor» - photocor.ru.* [В Интернете]
10. *Влияние ионов тяжелых металлов на молекулярно-динамические характеристики молекул коллагена в водных растворах.* Масленникова А.Д., Сергеева И.А., Петрова Г.П. Москва : Изд-во Моск. ун-та, 2013 г.
11. *Физический механизм токсического воздействия тяжелых металлов на белки и ферменты.* Петрова Г.П., Петрусевич Ю.М., Гурова М.А., Сергеева И.А., Тихонова Т.Н., Федорова К.В., Чжан Сяолей. Москва : б.н., 2010 г.
12. *Образование дипольных нанокластеров в растворах основных белков сыворотки крови, содержащих ионы европия и калия.* Тихонова Т.Н.,

Петрова Г.П., Петрусевич Ю.М., Федорова К.В., Кашин В.В. Москва :  
Изд-во Моск. ун-та, 2011 г.

13. *Конкурентная сорбция  $K^+$  в присутствии  $Na^+$  бычьим сывороточным альбумином и гемоглобином*. Ребров В. Г, Верхов Д. Г., Сидоренко С. В., Усанов А. Д., Скрипаль А. В., Усанов Д. А. 2016 г.
14. [https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product\\_Information\\_Sheet/2/h7379pis.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/2/h7379pis.pdf).  
[www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com). [В Интернете]
15. *Использование голографической интерферометрии в реальном времени для анализа проб и визуализации процессов, происходящих при жидкостном аналитическом электрофорезе в плоском капилляре..*  
Бабенко В.А, Константинов В.Б., Малый А.Ф. 10, Санкт-Петербург :  
Письма в ЖТФ, Т. 33, 2007 г.
16. *Гемоглобины человека*. Кривенцев Ю. А., Бисалиева Р. А., Носков. А. И.  
41, б.м. : Вестник Агту, Т. 6, 2007 г.

В заключении автор выражает признательность всему коллективу кафедры молекулярных процессов и экстремальных состояний вещества и, конечно, лично своему научному руководителю профессору Галине Петровне Петровой за предоставление интересной темы для исследований, помощь при обсуждении полученных результатов и написании работы, а также младшему научному сотруднику кафедры Виктории Валерьевне Гибизовой за помощь в проведении эксперимента, ценные советы и постоянное внимание к работе.