



МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

Кафедра молекулярных процессов и
экстремальных состояний вещества

Влияние хлорида калия на поведение белка гемоглобина в водных растворах

Научный руководитель:
д.ф.-м.н. профессор, Петрова Г.П.

Выполнил:
студент 4 курса бакалавриата,
Майков Э.В.

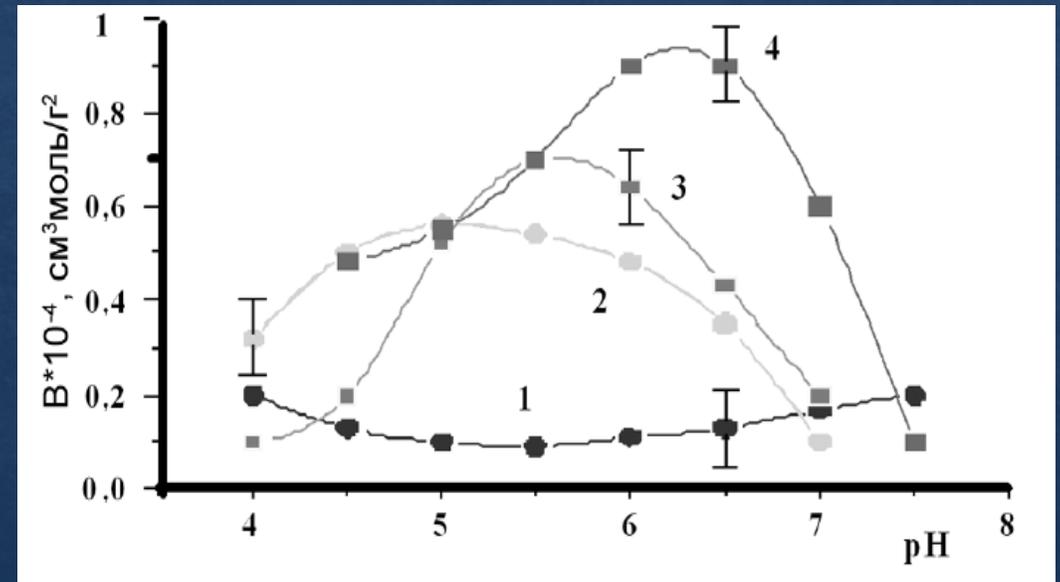
Москва, 2020

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Методом светорассеяния исследовать взаимодействие белка гемоглобина с ионами калия в водных растворах

ОБЗОР ИССЛЕДОВАНИЙ В НАУЧНЫХ ПУБЛИКАЦИЯХ

В работе [1] методом статического светорассеяния были исследованы изменения молекулярных параметров яичного альбумина в чистых растворах и растворах, содержащих ионы натрия и цезия. Данные зависимости показывают (рис. 1), что при смене характера межмолекулярного взаимодействия в растворах с более тяжелыми металлами ($R_{Cs^+} = 1,67 \text{ \AA}$), происходит переход к диполь-дипольному взаимодействию, появляются надмолекулярные структуры – дипольные белковые кластеры.



[1] 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.

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

ОБЗОР ИССЛЕДОВАНИЙ В НАУЧНЫХ ПУБЛИКАЦИЯХ

В работе [2] исследовался процесс сорбции ионов K^+ и Na^+ , а также тяжелых ионов Rb^+ и Cs^+ на сывороточном альбумине и гемоглобине. Были проведены две серии экспериментов с попарно одинаковыми и различными концентрациями солей. Результат показал, что с гемоглобином и альбумином предпочитают связываться ионы, обладающие большим ионным радиусом, при этом наличие Na^+ в водном белковом растворе увеличивает количество сорбированного K^+ (рис. 2).

[2] Конкурентная сорбция K^+ в присутствии Na^+ бычьим сывороточным альбумином и гемоглобином В. Г. Ребров, Д. Г. Верхов и др.

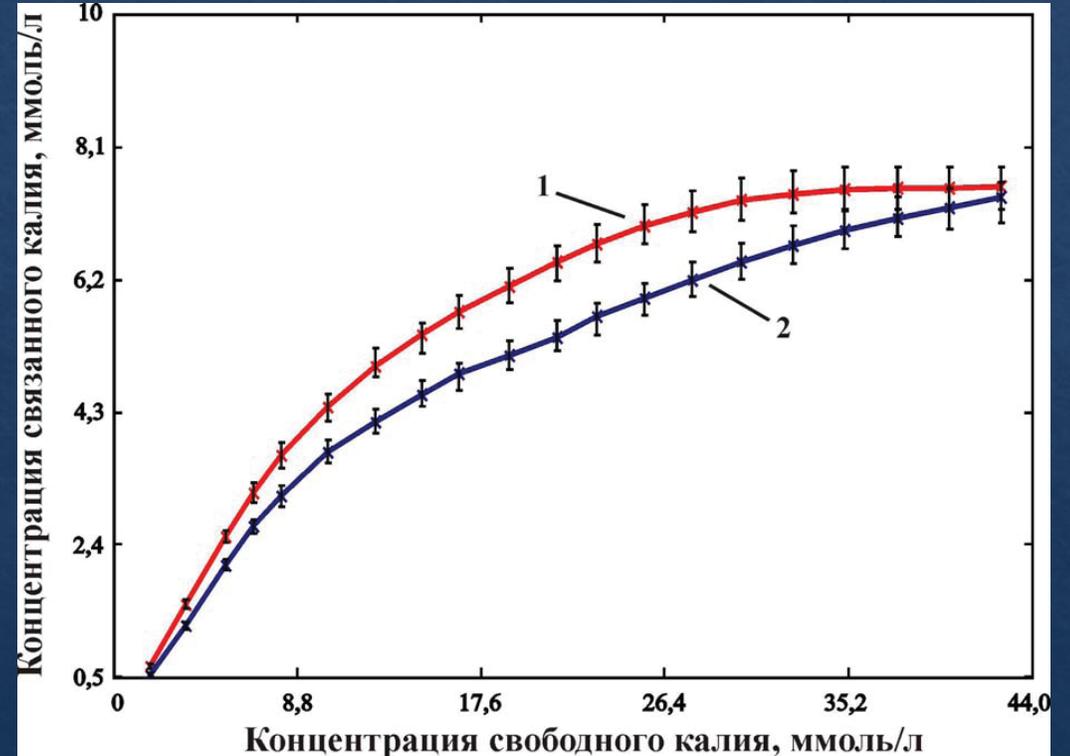
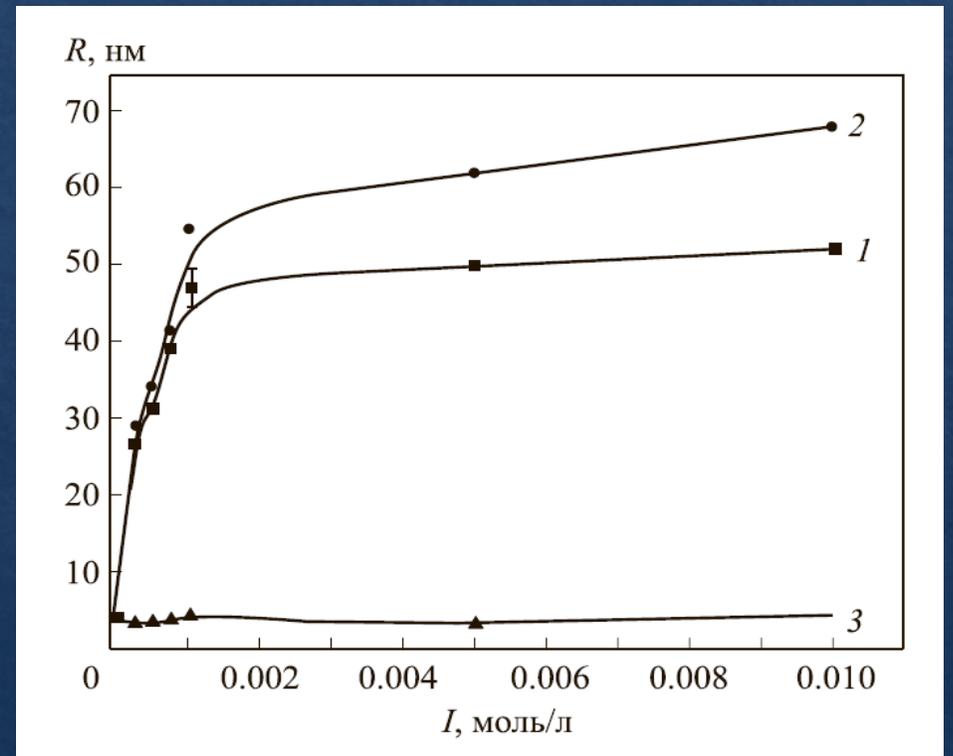


Рис. 2. Зависимость количества связанного K^+ с гемоглобином от концентрации свободного K^+ в растворе при максимальной (0.5 моль/л) (1) и минимальной концентрации Na^+ (0.05 моль/л) (2)

ОБЗОР ИССЛЕДОВАНИЙ В НАУЧНЫХ ПУБЛИКАЦИЯХ

В работе [3] методом динамического рассеяния и зондовой микроскопии были исследованы водные растворы основных белков сыворотки крови при наличии в них малых концентраций ионов калия или европия. На рисунке 3 видно, что радиус образованных нанокластеров растет с увеличением ионной силы раствора. После воздействия на раствор ультразвука (5 кГц) произошло разрушение нанокластеров – радиус частиц стал порядка 5 нм (зависимость 3).



[3] 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.

Рис. 3. 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.

ОБЗОР ИССЛЕДОВАНИЙ В НАУЧНЫХ ПУБЛИКАЦИЯХ

В работе [4] было обнаружено, что добавление цезия в водный раствор коллагена приводит к уменьшению коэффициента трансляционной диффузии. На рисунке 4 видно, что в области изоэлектрической точки белка (6.0 рН) максимум зависимости D_t переходит в минимум при добавлении соли свинца в различных концентрациях. Показанный минимум возрастает с ростом ионной силы при увеличении концентрации свинца.

[4] Влияние ионов тяжелых металлов на молекулярно-динамические характеристики молекул коллагена в водных растворах. Масленникова А.Д., Сергеева И.А., Петрова Г.П.

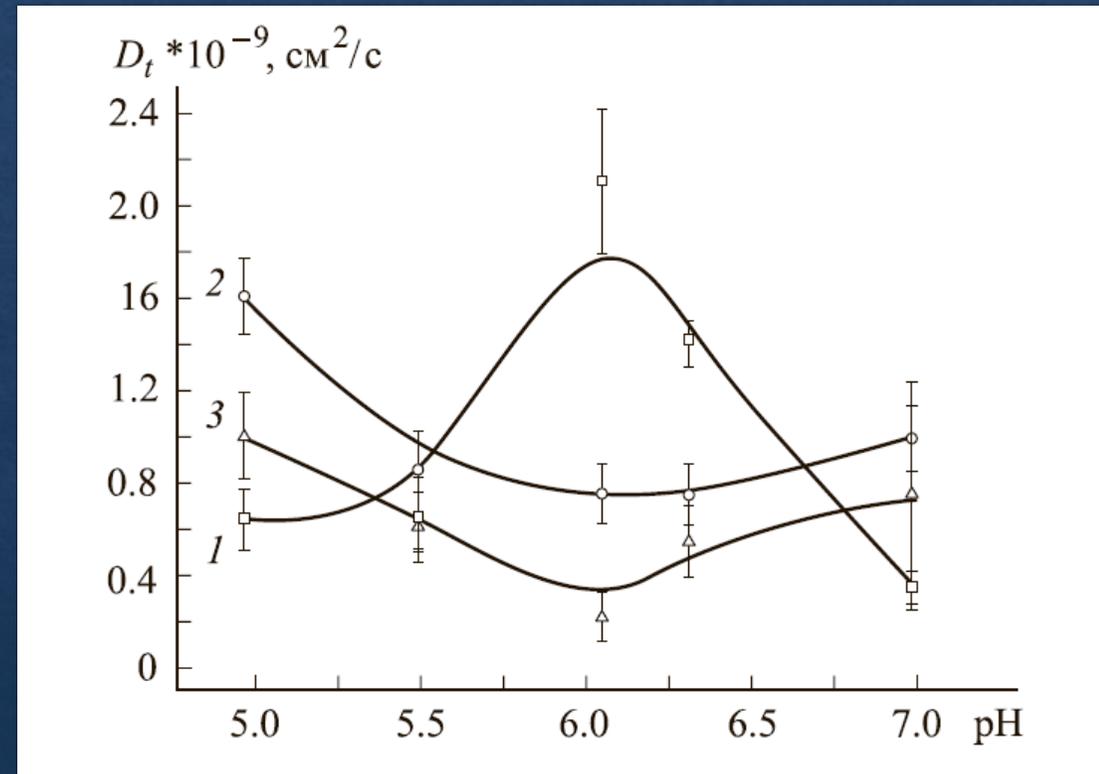


Рис. 4. pH-зависимость коэффициента трансляционной диффузии D_t коллагена (1 – чистый раствор, 2 – с добавлением соли свинца $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \mu_{\text{Pb}} = 10^{-3}$ моль/л, 3 – с добавлением соли свинца $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \mu_{\text{Pb}} = 10^{-3}$ моль/л и NaCl , $\mu_{\text{Na}} = 10^{-3}$ моль/л)

ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ: ЧЕЛОВЕЧЕСКИЙ ГЕМОГЛОБИН



- ❖ Гидродинамический радиус молекулы 3.4 нм
- ❖ 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)

Рис. 5. Человеческий гемоглобин
фирмы “Sigma” H7379

ХЛОРИД КАЛИЯ

- ❖ Содержание калия в организме - около 150 г
- ❖ Содержание калия в эритроцитах в норме составляет 78.5—112 ммоль/л.
- ❖ Молярная масса калия ~ 39.09 г/моль
- ❖ Растворимость 343 г/л (вода 20°C)
- ❖ Гидродинамический ионный радиус калия 1.33 Å



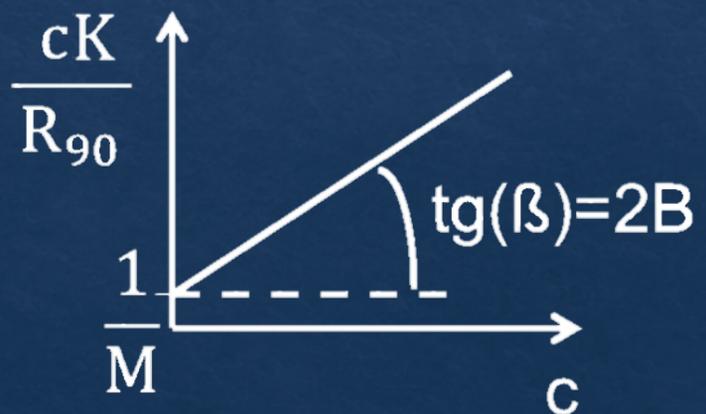
Рис. 6. Соль хлорида калия с
содержанием от 99.9%

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ МЕТОДА СТАТИЧЕСКОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА

$$R_{90} = \frac{2\pi^2 c n_0^2 \left(\frac{dn}{dc}\right)^2}{\lambda_0^4 N_A \frac{1}{RT} \frac{\partial \Pi}{\partial c}}, \text{ где } \Pi = \frac{cRT}{M} \text{ закон Вант-Гоффа}$$

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

$$\left. \begin{array}{l} \\ \\ \end{array} \right\} \left(\frac{cK}{R_{90}}\right) = \frac{1}{M} + 2Bc + \dots$$



Экстраполируя прямую на ось ординат, получается значение первого вириального коэффициента $A=1/M$.

Из наклона графика находится значение коэффициента межмолекулярного взаимодействия B .

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ АППАРАТУРА



Рис. 7. Спектрометр Photocor Complex

Измерения проводились на установке Photocor Complex со следующими параметрами

Технические характеристики	
Диапазон измерения	Размер частиц: от 0.5 нм до 10 мкм Коэффициент диффузии: 10^{-5} - 10^{-10} см ² /с Молекулярный вес: 10^3 - 10^{12} г/моль
Типичная погрешность измерения	±1%
Объем образца	От 50 мкл до 10 мл
Углы рассеяния	90°
Лазер	Диодный лазер, длина волны – 647 нм, мощность 25 мВт

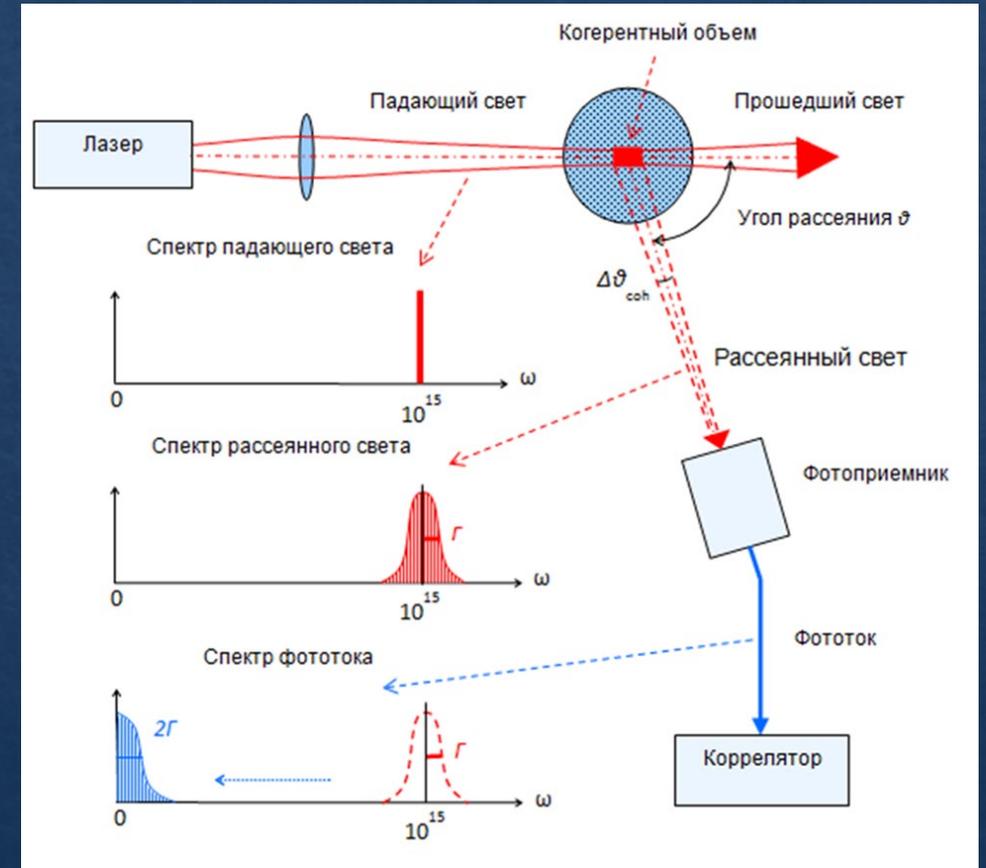


Рис. 8. Принципиальная схема работы спектрометра для измерения массы частицы и коэффициента межмолекулярного взаимодействия

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

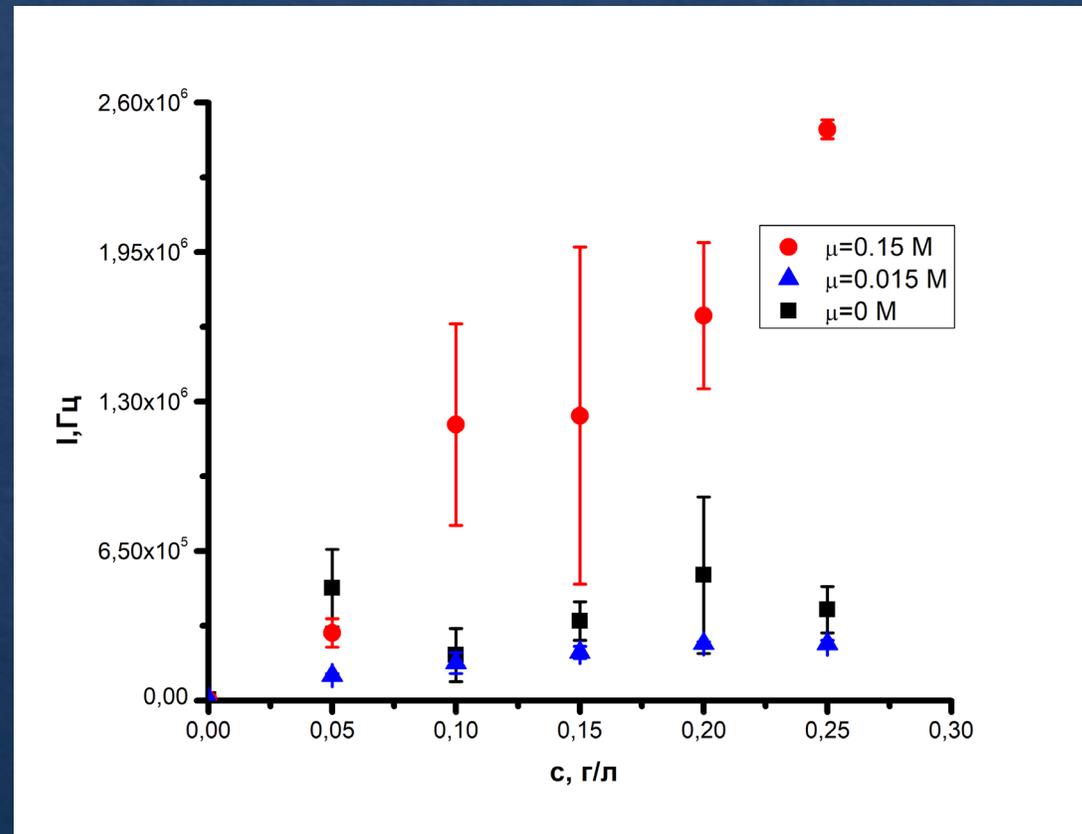
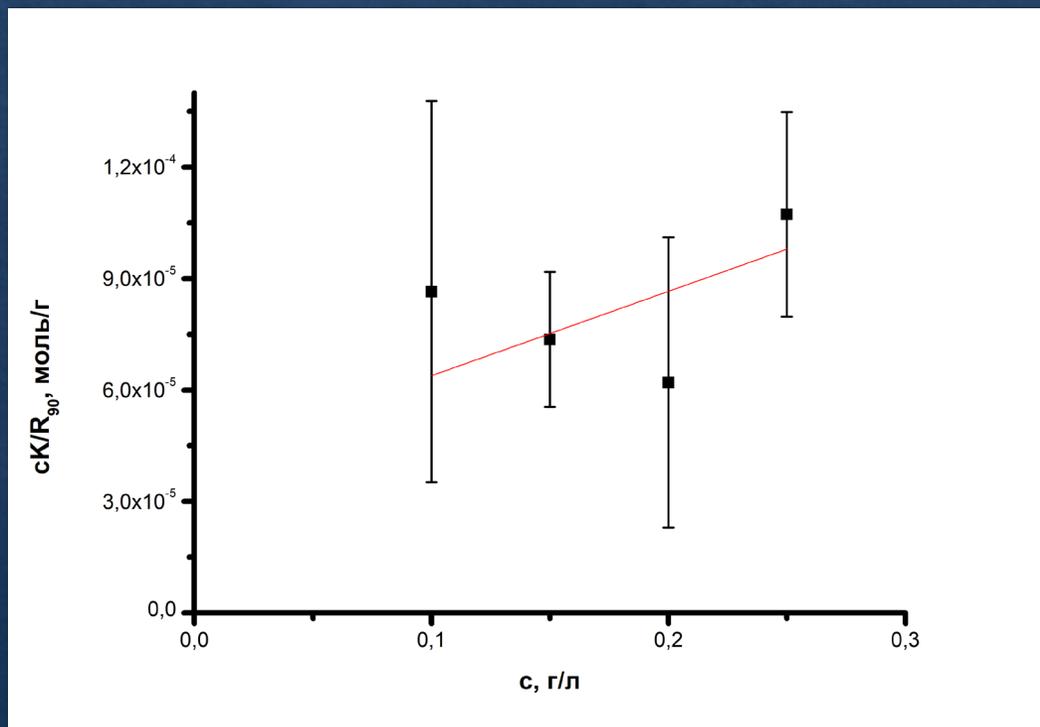


Рис. 9. График зависимости интенсивности рассеянного света от концентрации гемоглобина (образец I) для чистого раствора и при добавлении KCl в раствор гемоглобина.

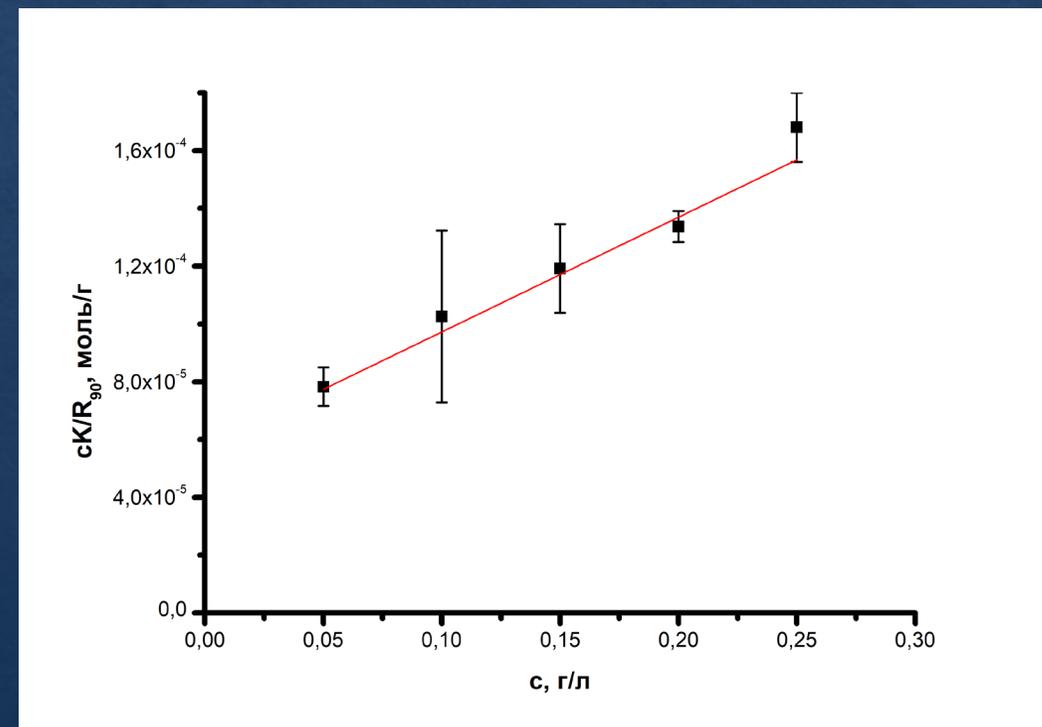
РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

$$\frac{1}{M} = (4.12 \pm 3.18) * 10^{-5}$$

$$\frac{1}{M} = (5.8 \pm 0.6) * 10^{-5}$$



а)



б)

Рис. 10. Графики зависимости sK/R_{90} от концентрации гемоглобина (образец I) а) для чистого водного раствора, б) для раствора содержащего KCl с $\mu=0.015$ M.

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

$$\frac{1}{M} = (1.7 \pm 0.6) * 10^{-5}$$

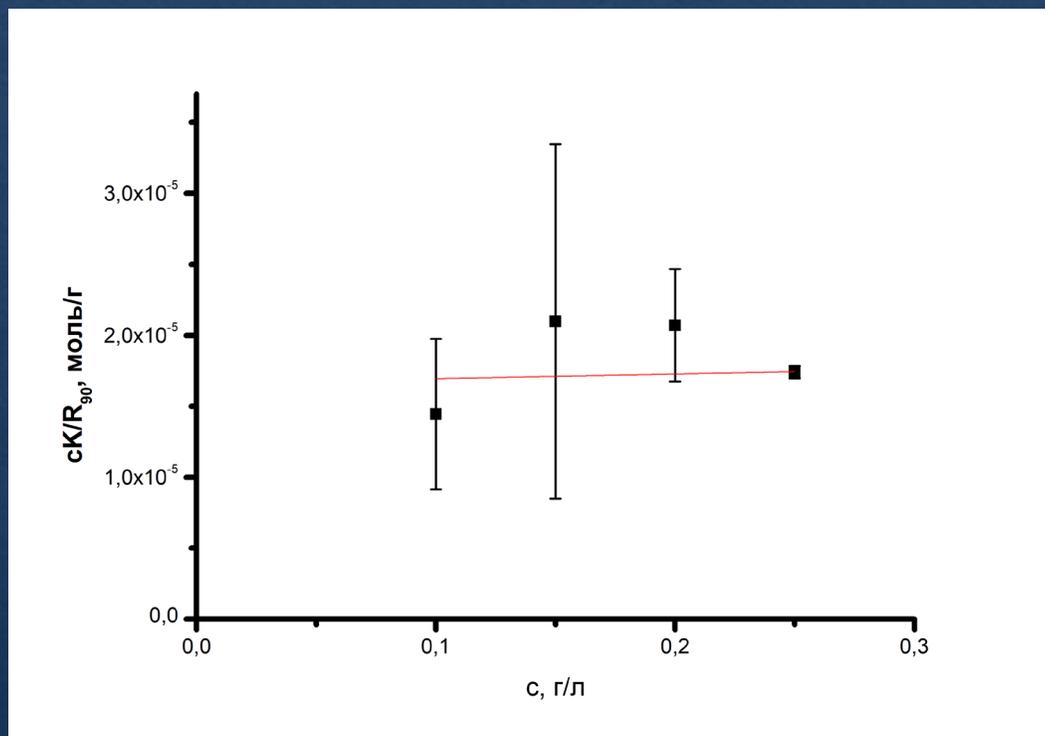
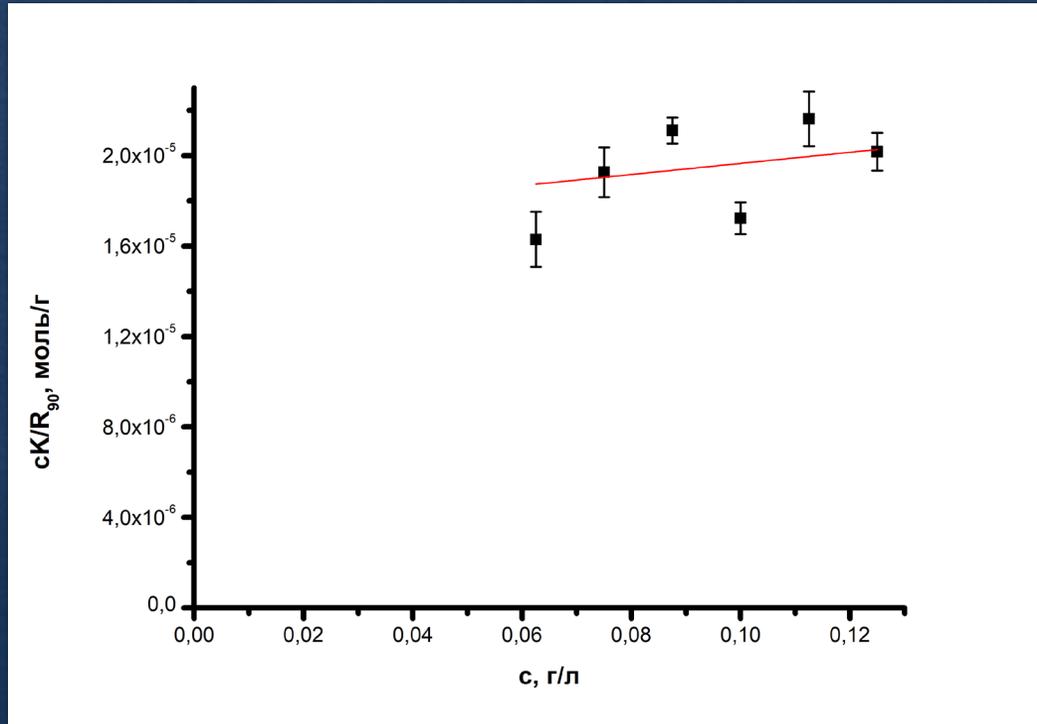


Рис. 11. Графики зависимости sK/R_{90} от концентрации гемоглобина (образец 1) в растворе содержащем KCl с $\mu=0,15$ М

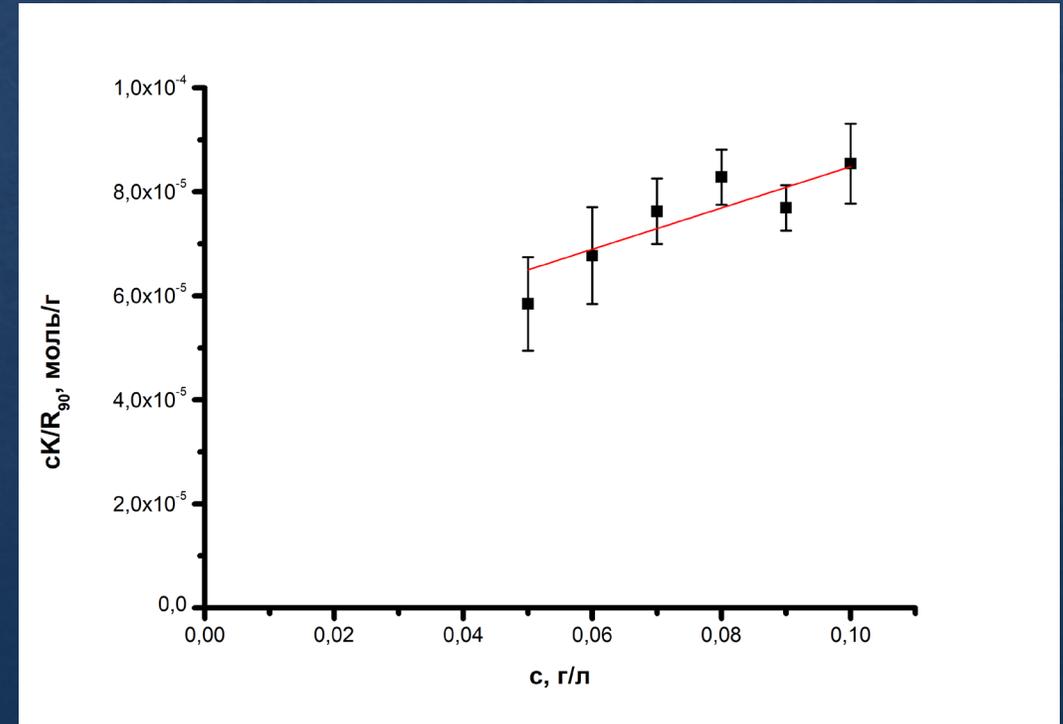
РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

$$\frac{1}{M} = (1.7 \pm 0.5) \cdot 10^{-5}$$



а)

$$\frac{1}{M} = (4.5 \pm 1.3) \cdot 10^{-5}$$



б)

Рис. 12. Графики зависимости cK/R_{90} от концентрации гемоглобина (образец II) а) для чистого водного раствора, б) для раствора, содержащего KCl с $\mu=0,001$ М.

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

$$\frac{1}{M} = (3 \pm 4.3) * 10^{-5}$$

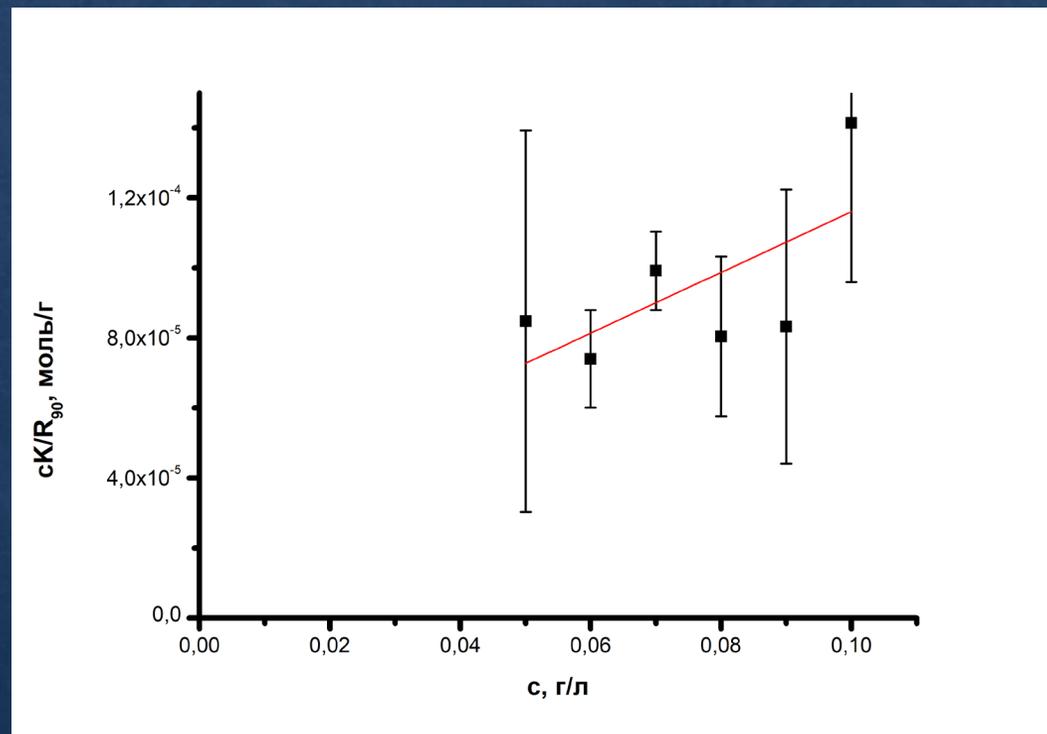


Рис. 13. Графики зависимости sK/R_{90} от концентрации гемоглобина в растворе содержащем KCl (для образца II) с $\mu=0,01$ М

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

μ, M	Масса рассеивающих частиц, кДа	Коэффициент взаимодействия частиц, моль*дм ³ /г ²
0	44.1 ± 54	$(11.4 \pm 8.7) * 10^{-5}$
0,015	17.3 ± 1.7	$(19.8 \pm 1.7) * 10^{-5}$
0,15	60.1 ± 20.7	$(1.6 \pm 1.15) * 10^{-5}$

Табл. 1. Таблица молекулярных параметров рассеивающих частиц при разных значениях ионной силы (образец I)

μ, M	Масса рассеивающих частиц, кДа	Коэффициент взаимодействия частиц, моль*дм ³ /г ²
0	58.1 ± 16.3	$(1.2 \pm 2.5) * 10^{-5}$
0,001	22.1 ± 6.1	$(19.8 \pm 7.7) * 10^{-5}$
0,01	33.9 ± 49.7	$(43.3 \pm 30.8) * 10^{-5}$

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

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ И ВЫВОДЫ

- ◇ Значение массы для второго образца гемоглобина в чистом водном растворе согласуется с данными, полученными ранее в других работах [5,6].
- ◇ Масса рассеивающих частиц в растворе при малой ионной силе становится меньше молекулярной массы белка II образца гемоглобина, примерно, в три раза. Это может объясняться изменением заряда на поверхности белка, что, в свою очередь, может вызвать разрушение его четвертичной структуры с уменьшением средней массы рассеивающих частиц.
- ◇ Значительный разброс величин, указанных на графиках, может объясняться тем, что система белок в изоэлектрической точке (экстремальная точка), окруженный атмосферой анионов и катионов - K^+ и Cl^- , является очень неустойчивой, а это неизбежно должно сказаться на точности измерений.
- ◇ Величины второго вириального коэффициента увеличиваются с ростом ионной силы раствора, что свидетельствует о том, что ионы электролита оказывают заметное воздействие на белок гемоглобина.
- ◇ Ионы калия в организме находятся преимущественно внутри клеток-эритроцитов, поэтому важно изучить воздействие этого иона на гемоглобин, поскольку это представляет большой интерес.

[5] 14. Гемоглобины человека. Ю. А. Кривенцев, Р. А. Бисалиева, А. И. Носков. 41, б.м. : Вестник Агту, 2007 г., Т. 6.

[6] Биологическая химия. Збраский Б.И., Иванов И.И., Мардашев С.Р. Ленинград : Медицина, 1965 г.

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!