

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

ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

КАФЕДРА МОЛЕКУЛЯРНЫХ ПРОЦЕССОВ И ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ СОСТОЯНИЙ  
ВЕЩЕСТВ

Универсиада «Ломоносов»

**«Особенности поведения белка гемоглобина при добавлении хлорида  
калия»**

Выполнил студент 404 группы

Майков Эмиль

Научный руководитель:

Профессор, д.ф.-м.н. Петрова  
Галина Петровна

Москва

2020

## **Введение**

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.

В данной работе исследовался белок гемоглобин как в чистом растворе, так и в растворе, содержащем ионы калия. Как известно белок гемоглобин в основном содержится в крови человека в клетках, называемых эритроцитами. 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.

Цель данной работы – исследовать воздействия иона калия на гемоглобин, изучить поведение молекул растворенного вещества оптическим методом – методом рассеяния света.

## **Литературный обзор**

За последнее десятилетие появилось множество научных работ, в которых гемоглобин фигурировал как главный объект исследования при возникновении распространенных заболеваний и разработках методов их диагностики.

В работе [1] был разработан метод для определения насыщенности гемоглобина в ткани организма с последующей ее визуализацией в реальном времени. На основе достаточно простого уравнения была разработана упрощенная процедура для получения изображения насыщенности гемоглобина. Удалось получить частоту обновления изображения до 7.5

кадров в секунду, однако присутствие артефактов и деформаций на изображениях требует дальнейшего улучшения частоты.

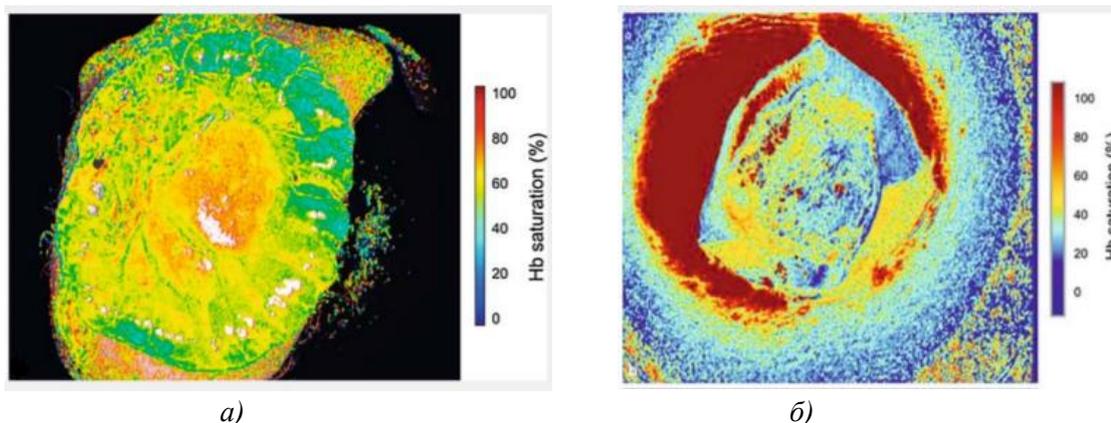


Рис. 1. Картины насыщенности гемоглобина в перевязке сосудов а), опухоли б), генерируемой системой эндоскопа системой эндоскопов, низкие уровни насыщенности Hb отмечены зеленым цветом.

В [2] исследовался процесс сорбции ионов  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Rb^+$  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 предпочтительнее связываются ионы, обладающие большим ионным радиусом, при этом наличие  $Na^+$  в водном белковом растворе увеличивает количество сорбированного  $K^+$ .

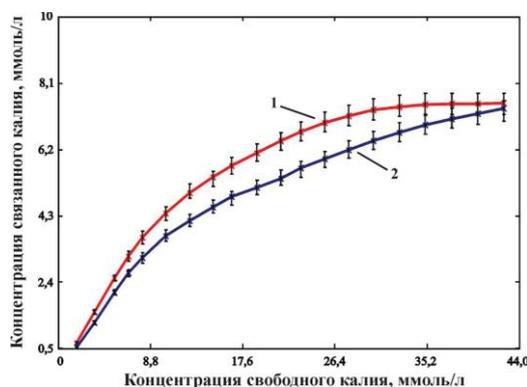


Рис. 2. Зависимость количества связанного  $K^+$  с гемоглобином от концентрации свободного  $K^+$  в растворе при максимальной (0.5 моль/л) (1) и минимальной концентрации  $Na^+$  (0.05 моль/л) (2).

В работе [3] был проведено исследование макро-динамических свойств молекул растворимых белков – бычьего сывороточного альбумина и гамма-

глобулина фирмы “Sigma” в водных растворах. В ходе эксперимента методом динамического рассеяния были получены зависимости динамических параметров белковых молекул от величины поверхностного заряда на них. Определенное значение рН в растворе достигалось добавлением соляной кислоты или щелочи калия. По экспериментальным данным, были построены зависимости коэффициента межмолекулярного взаимодействия, совпадающие со характером кривых, полученных из метода статического рассеяния света.

### **Объекты исследования**

Белковые молекулы – полимеры, состоящие из базовых структурных элементов – аминокислот. К аминокислотам относятся любые соединения, содержащие карбоксильные и аминогруппы. Молекулярная масса белков варьируется в большом диапазоне (от 5000 до нескольких миллионов г/моль). В зависимости от конформации различаются фибриллярные и глобулярные белки. Гемоглобин, обладающий четвертичной структурой, относится к глобулярным белкам.

Гемоглобин — железосодержащий белок, функциями которого является доставка кислорода к тканям организма и углекислого газа обратно к лёгким. Характерным свойство данного белка выражается в его способности присоединять к себе молекулы кислорода и углекислый газ. 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 [4].

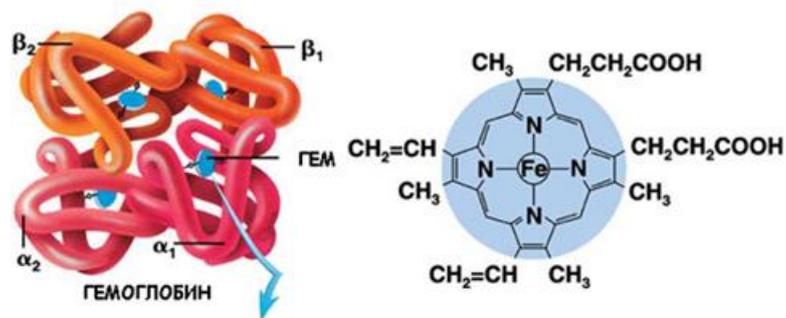


Рис. 3. Структура гемоглобина и структурная формула гема

Снижение концентрации гемоглобина в крови происходит при одновременном уменьшении количества эритроцитов и изменении их качественного состава, что приводит к снижению дыхательных функций крови и развитию кислородного голодания – возникновению анемии.

Хлорид калия – соль соляной кислоты и калия, неорганическое соединение белого цвета, представляющее собой белые, бесцветные кубические кристаллы, не имеющие запаха. Калий участвует в построении клеток и тканей организма, электрических импульсах в мышечных и нервных клетках, регуляции давления крови, поддержании кислотно-щелочного баланса.

### Метод статического рассеяния света

Вследствие броуновского движения частиц в жидкости возникают флуктуации локальной концентрации. В результате наблюдаются локальные неоднородности показателя преломления, а также флуктуации интенсивности рассеянного света при прохождении лазерного луча через среду.

Разность осмотических давлений в соседних областях препятствует развитию флуктуаций концентрации в растворе. В рамках данного эксперимента осмотическое давление можно представить в виде степенного ряда:

$$P = RT(As + Bc^2 + \dots), \quad (1)$$

где  $A$ ,  $B$  и т.д. — вириальные коэффициенты раствора,  $A = \frac{1}{M}$ . В этом случае для разбавленных растворов макромолекул имеет место окончательное выражение:

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

Уравнение рассеяния позволяет определить молекулярную массу малых не взаимодействующих частиц [5]:

$$M = \left(\frac{cHK}{R_{90}}\right)^{-1}, \quad (3)$$

где  $K$  - фактор Кабанна,  $R_{90}$  – рэлеевский коэффициент рассеяния, не зависящий от выбора условий эксперимента. 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  $B$ , характеризующий степень неидеальности раствора и учитывающий парные межмолекулярные взаимодействия в растворе.

### Экспериментальные результаты

Исследования проводятся на оптической установке «Photocor Complex», в которой используется 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 коррелятором Photocor-FC. В кювете с исследуемым образцом поддерживается температура ( $20^\circ\text{C}$ ) при помощи встроенного в прибор термостата. Выходной сигнал регистрируется на компьютере [6]. Обработка сигнала производится на компьютере в автоматическом режиме с помощью программы Static Light Scattering, которая позволяет получить результаты в

виде значений массы  $M$  и второго вириального коэффициента рассеивающих частиц.

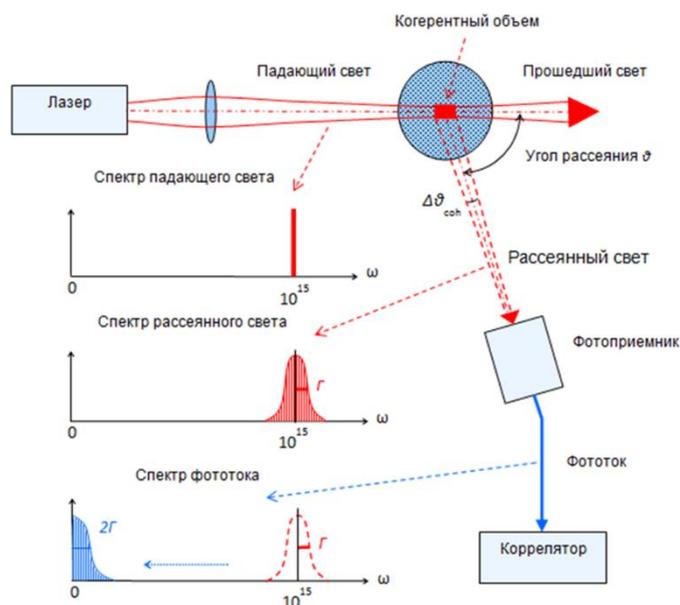


Рис. 4. Схема экспериментальной установки Photocor Complex

Для приготовления растворов была использована вода для инъекций АО «Новосибхимфак»,  $pH \approx 7$ . Экспериментальные измерения были проведены для концентраций от 0,05 мг/мл до 0,25 мг/мл с шагом 0,05 мг/мл при температуре 20 °С. Раствор с хлоридом калия приготавливался отдельно. В эксперименте использовался раствор KCl с заранее рассчитанными значениями ионной силы: 0,0015 М, 0,015 М, 0,15 М. В раствор с заданной ионной силой добавляется по 25 мкл раствора гемоглобина с концентрацией 10 мг/мл. Для каждого значения ионной силы при концентрации гемоглобина 0,25 мг/мл были измерены значения pH. Рефракционный инкремент, взятый для обработки  $dn/dc \sim 2 \cdot 10^{-4}$  л/г [7].

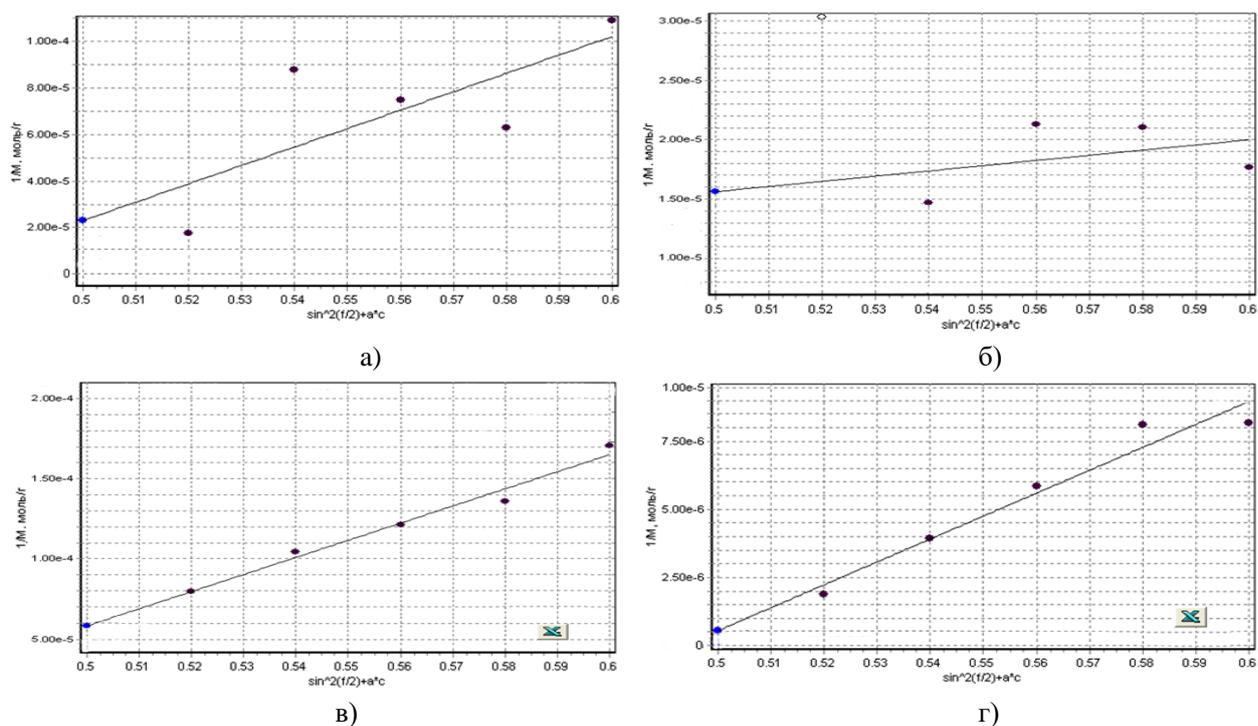


Рис. 5. График зависимости  $sNK/R_{90}$  от концентрации гемоглобина для чистого раствора а) и при добавлении в раствор гемоглобина KCL б) с  $\mu=0,15$  М, в) с  $\mu=0,015$  М, г) с  $\mu=0,0015$  М.

По итогам эксперимента значения массы и второго вириального коэффициента для всех рассмотренных случаев составили:

$\mu$ , М	Масса рассеивающих частиц, кДа	Коэффициент взаимодействия частиц, моль*дм <sup>3</sup> /г <sup>2</sup>
0	43444	$1,58 \cdot 10^{-4}$
0,0015	181960	$1,68 \cdot 10^{-5}$
0,015	17215	$2,14 \cdot 10^{-4}$
0,15	64033	$8,76 \cdot 10^{-6}$

Табл. 1. Таблица молекулярных параметров молекулы при разных значениях ионной силы

Методом светорассеяния была определена масса свободного белка гемоглобина в водном растворе при различной концентрации белка в изоэлектрической точке. Полученные результаты для массы белка гемоглобина согласуются с данными других работ. Добавление в раствор ионов калия (хлорид калия) показало, что масса рассеивающих частиц в растворе увеличивается при увеличении концентрации ионов калия. Из этого можно сделать вывод о том, что ионы калия оказывают заметное воздействие на белок гемоглобина.

## Список литературы

1. **Toru Chiba, Yoshimi Obara, Masaharu Murata, Tomohiko Akahoshi.** *Advanced multispectral image-processing endoscopy system for.* New York : Georg Thieme Verlag KG Stuttgart, 2019. eISSN 2196-9736.
2. *Конкурентная сорбция  $K^+$  в присутствии  $Na^+$  бычьим сывороточным альбумином и гемоглобином.* **В. Г. Ребров, Д. Г. Верхов, С. В. Сидоренко, А. Д. Усанов, А. В. Скрипаль, Д. А. Усанов.** 2016 г.
3. *Исследование модельных растворов сыворотки крови методом динамического рассеяния света.* **М.П. Папок, Г.П. Петрова, К.А. Аненкова, Е.А. Папиш.** Москва : б.н., 2012 г.
4. **Збраский Б.И., Иванов И.И., Мардашев С.Р.** *Биологическая химия.* Ленинград : Медицина, 1965.
5. **Г.П., Петрова.** *Оптические спектральные методы исследования жидкостей и растворов. Часть 1.* Москва : Физический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова.
6. *Официальный сайт приборов «Photocor» - photocor.ru.*
7. *Использование голографической интерферометрии в реальном времени для анализа проб и визуализации процессов, происходящих при жидкостном аналитическом электрофорезе в плоском капилляре .* **В.А. Бабенко, В.Б. Константинов, А.Ф. Малый.** 10, Санкт-Петербург : Письма в ЖТФ, 2007 г., Т. 33.