

# Образование дипольных комплексов в растворах белков с малой концентрацией ионов тяжелых металлов: диагностика методом лазерного светорассеяния

Г.П.Петрова, Ю.М.Петрусевич, Д.И.Тен

*С помощью спектроскопии лазерного рассеяния света Рэлея–Дебая было исследовано образование макромолекулярных белковых кластеров в растворах при наличии малых концентраций солей токсичных тяжелых металлов, таких как свинец, медь, кадмий. Обнаружено, что масса кластеров максимальна в области изоэлектрической точки белка и возрастает с увеличением ионной силы раствора. Показано, что при нагревании растворов до температуры порядка 40 °С кластеры разрушаются.*

**Ключевые слова:** тяжелые металлы, белки, рассеяние света, межмолекулярное взаимодействие.

## 1. Введение

Металлы играют важную роль в человеческом организме. Более 5 % веса тела составляют натрий, калий, кальций и магний. Такие металлы как железо, кобальт, медь, молибден, цинк и др., присутствуют в организме в связанном состоянии (железо, например, содержится в гемоглобине, а большинство элементов связано с ферментами) и составляют менее 1 % веса [1]. Превышение допустимой концентрации металлов в окружающей среде создает серьезную угрозу здоровью человека. Особенно опасны тяжелые металлы. При попадании даже в небольших концентрациях в питьевую воду, кровь и другие биологические жидкости они способны нарушить нормальное течение физиологических процессов в организме.

Токсичность металлов, относящихся к группе цинка (кадмий, ртуть), резко повышается при возрастании их порядкового номера. Кадмий растворяется в органических кислотах, находящихся в пище, и образует соли, которые преобразуются в хлорид кадмия под действием желудочного сока. Даже малые количества кадмия могут приводить к серьезным отравлениям с летальным исходом. Особенно опасны респираторные отравления парами кадмия.

Токсичными для человека являются также марганец, никель, свинец. Последний относится к группе так называемых тяжелых цветных металлов и является, вероятно, наиболее распространенным металлическим ядом. Свинец используется для многих промышленных целей: производства красок, в качестве добавок к автомобильному топливу. Подобно ртути, свинец очень токсичен для нервной системы и почек, при этом токсичность зависит от возраста человека и времени воздействия. Для детей

при малом времени воздействия свинца могут наблюдаться снижение интеллекта и изменения в поведении, а длительное воздействие может приводить к различным повреждениям клеток мозга и даже к летальному исходу.

Основными физическими механизмами токсического действия ионов тяжелых металлов являются их аномальная сорбция на поверхности липопротеинов, аномалия молекулярной подвижности заряженных биополимеров, образование дипольных белковых кластеров.

Настоящая работа посвящена изучению влияния тяжелых металлов, таких как медь, свинец, кадмий, на молекулярные параметры белков в водных растворах, которые можно рассматривать в качестве моделей биологических жидкостей (например, сыворотки крови или лимфы). Исследования проводились с помощью метода Рэлея–Дебая [2], а именно метода лазерного светорассеяния, при изменении параметров среды: водородного показателя, ионной силы раствора, определяемой концентрацией растворенной соли, и температуры раствора.

## 2. Теория метода

Выражение для интенсивности рассеяния линейно поляризованного света, проходящего через рассеивающий объем, который содержит раствор макромолекул, может быть записано следующим образом:

$$I_s = \frac{2\pi^2 n_0^2 (dn/dc)^2 c M I_0 K v}{\lambda_0^4 N_A r^2} \sin^2 \theta, \quad (1)$$

где  $n_0$  – показатель преломления растворителя;  $dn/dc$  – инкремент показателя преломления раствора;  $c$  – концентрация растворенного вещества;  $I_0$  – интенсивность падающего света;  $v$  – рассеивающий объем;  $\lambda_0$  – длина волны падающего света в вакууме;  $N_A$  – число Авогадро;  $M$  – молекулярная масса растворенного вещества;  $r$  – расстояние от рассеивающего объема до детектора рассеянного излучения;  $\theta$  – угол рассеяния;  $K$  – коэффициент, определяемый оптической анизотропией рассеивающих частиц (фактор Кабанна).

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, физический факультет, Россия, 119992 Москва, Воробьевы горы; e-mail: petrova@phys.msu.ru

Обычно используется коэффициент рассеяния  $R_\theta$ , не зависящий от значений  $I_0$ ,  $v$  и  $r$ . Для  $\theta = 90^\circ$  имеем

$$R_{90} = \frac{I_{90} r^2}{I_0 v} = c H M K, \quad (2)$$

где

$$H = \frac{2\pi^2 n_0^2 (dn/dc)^2}{\lambda^4 N_A}$$

– оптическая постоянная раствора. Из (2) видно, что коэффициент рассеяния пропорционален концентрации рассеивающих частиц и их массе. В связи с этим в последнее время метод Рэлея–Дебая используется, например, для определения критической концентрации полимеризации [3] или количественного анализа наличия различных макромолекул в растворах [4].

Выражение (2) справедливо, только если положения рассеивающих частиц некоррелированы или если частицы находятся на достаточно больших расстояниях друг от друга и их взаимодействием можно пренебречь. При конечных концентрациях всегда будет существовать межмолекулярное взаимодействие, поэтому, согласно теории Дебая, интенсивность рассеянного света можно выразить через флуктуации концентрации, которые зависят от химического потенциала. В этом случае для разбавленных растворов макромолекул имеет место соотношение

$$f(c) = \frac{c H K}{R_{90}} = \frac{1}{M} + 2Bc + \dots, \quad (3)$$

которое позволяет измеряемую в эксперименте величину  $R_{90}$  представить в виде вириального разложения по малым концентрациям.

Рассматриваемый метод дает возможность прямого определения молекулярной массы  $M$ , для чего необходимо измерить  $R_{90}$  при нескольких концентрациях и экстраполировать полученную зависимость  $f(c)$  к концентрации  $c = 0$ . Наклон прямой  $f(c)$ , равный  $2B$ , позволяет вычислить второй вириальный коэффициент  $B$  в разложении для свободной энергии, который характеризует степень отклонения раствора от идеального и служит мерой межмолекулярного взаимодействия в растворе.

Следует отметить, что в исследованиях светорассеяния в растворах белков до появления лазеров [5] коэффициент  $K$  полагался равным единице. Однако измерения поляризационных характеристик рассеяния, проводимые с помощью лазерного излучения [6] показали, что коэффициент  $K$  отличен от единицы и зависит от свойств белка.

Согласно Скэтчарду [7], второй вириальный коэффициент, который описывает парные взаимодействия в растворах, содержащих кроме низкомолекулярного растворителя еще и третий компонент – сильный электролит, например NaCl, имеет вид

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

где  $V_1$  – удельный объем растворителя;  $Z$  – заряд макроиона;  $M_2$  – его масса;  $m_3$  – концентрация ионов соли.

Табл.1.

Белок	$M$	$p$ (Д)	Изоэлектрическая точка (pH)
Человеческий сывороточный альбумин	66000	500	4.8
Бычий сывороточный альбумин	68000	480	4.9
Яичный альбумин	50000	400	4.8

Параметры  $\beta_{22}$ ,  $\beta_{23}$  и  $\beta_{33}$  являются производными от коэффициентов активности, которые служат мерой эффективной концентрации данного компонента. Они характеризуют различные взаимодействия между ионами в растворе: эффект исключенного объема и взаимодействие между зарядами различных макроионов ( $\beta_{22}$ ), взаимодействие между макроионами и ионами соли ( $\beta_{23}$ ) и взаимодействие только между ионами соли ( $\beta_{33}$ ).

Согласно формуле (4) коэффициент межмолекулярного взаимодействия изменяется с ростом суммарного заряда на белке по параболическому закону (эффект Доннана) с минимумом в изоэлектрической точке. (Изоэлектрической точкой белка называется значение pH, при котором средний заряд на макромолекуле белка  $Z \sim 0$ ). Изоэлектрические точки некоторых белков приведены в табл.1. Значения pH белкового раствора, а следовательно, и заряд на молекуле белка, можно изменять путем добавления в раствор кислоты или основания, при этом в среде появляется либо избыток, либо недостаток протонов по сравнению с чистой водой. Зависимость заряда  $Z$  на белке от pH обычно определяют с помощью титрования или электрофореза. Коэффициент  $\beta_{22}$  обычно мал по сравнению с остальными слагаемыми в формуле (4). При больших концентрациях соли в растворе член, содержащий коэффициент  $\beta_{23}$ , может существенно превышать (по модулю) первые два и параметр  $B$  может стать отрицательным.

При возрастании ионной силы раствора, т. е. при увеличении концентрации растворенной соли, в растворе возникают более сложные образования с участием ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$ . Вокруг заряженной молекулы белка создается облако противоионов, экранирующее кулоновское взаимодействие. Величина  $B$  уменьшается с увеличением ионной силы  $\mu$ , однако параболический вид зависимости  $B$  от pH сохраняется. Масса белковых макромолекул  $M$  в растворе при этом остается практически постоянной [5, 6, 8].

В проведенных ранее исследованиях методом светорассеяния [8–10] впервые было обнаружено, что, если в растворе с белком содержатся ионы тяжелых щелочных металлов, таких как цезий и рубидий, масса рассеивающих частиц не остается постоянной. Она растет для pH, соответствующих изоэлектрической точке белка, при этом изменяется характер межмолекулярного взаимодействия. Вместо параболической зависимости параметра  $B$  от заряда на белке с минимумом в изоэлектрической точке наблюдается нелинейный рост  $B$  с максимумом при  $Z \sim 0$ .

В данной работе методом светорассеяния были исследованы водные растворы сывороточного и яичного альбуминов в присутствии солей тяжелых металлов (свинца, меди и кадмия) при различных значениях поверхностного заряда белка и ионной силы.

### 3. Экспериментальная установка и материалы

Макромолекулы белков представляют собой сложные полимерные структуры с молекулярной массой до нескольких сотен тысяч. На поверхности молекул белков могут находиться до нескольких сотен заряженных групп, что обуславливает большие значения дипольных моментов белковых молекул – до 1000 Д (табл.1). В растворе белки представляют собой полиэлектролиты, при этом суммарный заряд на поверхности белка может изменяться в широких пределах в зависимости от концентрации свободных протонов. В табл.1 указаны параметры белков, исследованных в нашей работе (применялись препараты фирм Sigma и Serva). В табл.2 указаны соли, которые использовались в эксперименте.

Табл.2.

Тяжелые металлы	Соли
Медь	Хлорид меди $\text{CuCl}_2$
Свинец	Ацетат свинца $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
Кадмий	Сульфат кадмия $\text{CdSO}_4$

Рассеивающие свойства водных растворов белков изучались на оптической установке с He–Ne-лазером ( $\lambda = 632 \text{ нм}$ ) и фотоэлектронным детектором рассеянного излучения (рис.1). Вертикально поляризованный пучок света через призму 4 подавался на цилиндрическую стеклянную кювету 8 с исследуемым раствором. Падающий пучок модулировался электромеханическим прерывателем 3 с частотой  $\sim 70 \text{ Гц}$ , что позволяло отделить сигнал от фоновой засветки. Рассеянный под углом  $90^\circ$  свет регистрировался ФЭУ 11, сигнал с которого поступал на резонансный усилитель 13, затем подавался на компьютер 15 и оцифровывался с помощью АЦП (его роль выполняла звуковая карта). Сигнал можно было также наблюдать визуально на экране осциллографа 14. Система, состоящая из призмы Воластона (9) и Глана–Томсона (10) позволяла разделить поляризованную и деполаризованную компоненты рассеянного

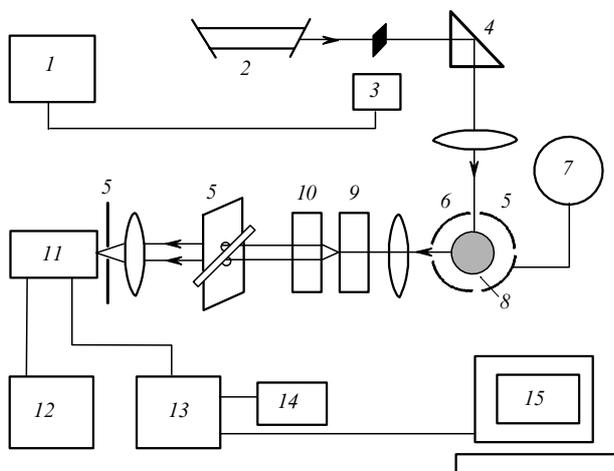


Рис.1. Схема оптической установки:

1 – звуковой генератор; 2 – лазер; 3 – электромеханический модулятор; 4 – поворотная призма; 5 – экраны; 6 – нагревательный элемент; 7 – ЛАТР; 8 – кювета с раствором; 9 и 10 – призмы Воластона и Глана–Томсона; 11 – ФЭУ; 12 – блок питания ФЭУ; 13 – резонансный усилитель; 14 – осциллограф; 15 – компьютер.

излучения и измерить их интенсивности. С помощью разработанной программы проводилась экстраполяция рабочих зависимостей  $f(c)$  (3) методом наименьших квадратов и рассчитывались ошибки эксперимента.

Молекулярная масса и второй вириальный коэффициент вычислялись по измерениям относительных интенсивностей излучения, рассеянного под углом  $90^\circ$ , для двух взаимно ортогональных направлений поляризации, что позволяло учитывать вклад оптической анизотропии макромолекул. Результаты корректировались с учетом интенсивностей света, рассеянного чистой водой.

Для калибровки интенсивности рассеянного света в качестве эталонной жидкости использовался бензол ( $R_{90} = 12.64 \times 10^{-6} \text{ см}^{-1}$  для  $\lambda = 632 \text{ нм}$ ). При этом делалась поправка, учитывающая разницу показателей преломления бензола и воды. Погрешность измерений  $R_{90}$  составляла 6%.

Инкремент показателя преломления измерялся с помощью интерферометра Рэлея (погрешность измерений 2%) в растворах с различными водородными показателями pH (погрешность измерений 3%) и концентрациями белка. Концентрация свободных протонов (pH) и ионная сила  $\mu$  варьировались путем добавления в раствор малых количеств кислоты, основания и соли. Погрешность определения коэффициента  $B$  и массы рассеивающих частиц составляла 10%.

### 4. Экспериментальные результаты

На рис.2 показаны зависимости второго вириального коэффициента  $B$  от pH (или  $Z$ ) для бычьего сывороточного альбумина при различных концентрациях ацетата свинца (различных ионных силах). Видно, что в присутствии в растворе соли свинца характер зависимости  $B$  от pH резко изменяется: при малых ионных силах  $\mu$  коэффициент  $B$  становится отрицательным, хотя параболический вид зависимости сохраняется, а при дальнейшем увеличении  $\mu$  наблюдается рост  $B$  в области изоэлектрической точки, причем с увеличением  $\mu$  происходит рост максимума  $B$ . В области больших положительных и отрицательных зарядов на белке коэффициент  $B$  имеет близкие численные значения для всех  $\mu$ .

Исходя из экспериментально полученных коэффициентов рассеяния  $R_{90}$  для растворов яичного и сывороточного альбуминов в присутствии солей свинца (при раз-

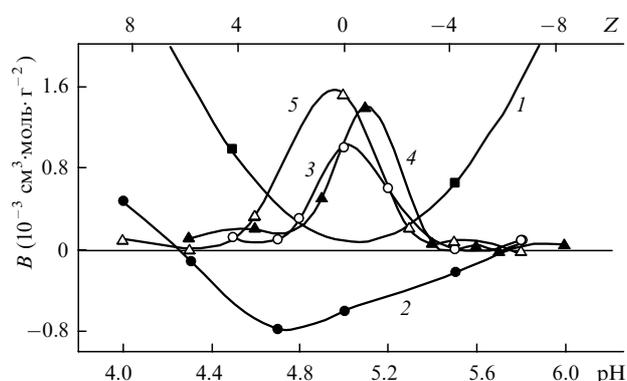


Рис.2. Коэффициент межмолекулярного взаимодействия  $B$  как функция pH (или поверхностного заряда  $Z$ ) для бычьего сывороточного альбумина при ионных силах  $\mu = 0.00075$  (2), 0.00105 (3), 0.0012 (4) и 0.0015 моль/л (5). Кривая 1 получена для раствора альбумина в чистой воде и соответствует кривой 1 на рис.5.б.

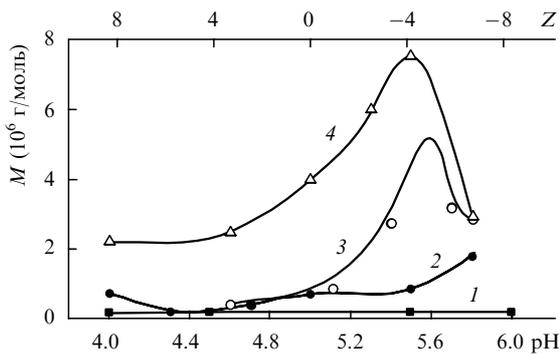


Рис.3. Эффективная масса рассеивающих частиц  $M$  как функция рН (или  $Z$ ) для растворов бычьего сывороточного альбумина, содержащих ацетат свинца, при  $\mu = 0.00075$  (2), 0.00105 (3) и 0.0015 моль/л (4). Кривая 1 получена для раствора альбумина в чистой воде.

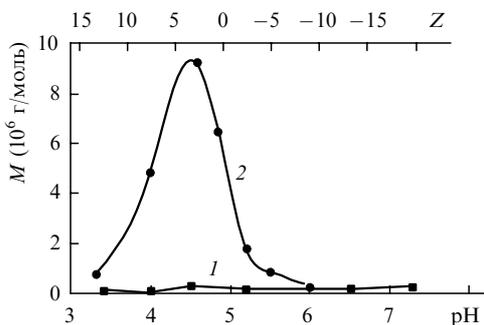
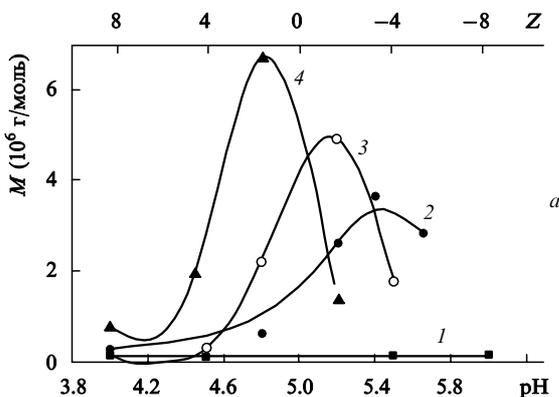


Рис.4. Зависимости эффективной массы рассеивающих частиц  $M$  от рН (или  $Z$ ) для раствора яичного альбумина в чистой воде (1) и раствора, содержащего ацетат свинца, при  $\mu = 0.00105$  моль/л (2).

личных  $\mu$ ) по формуле (3) были рассчитаны эффективные массы рассеивающих частиц (рис.3, 4).

Зависимости эффективной массы рассеивающих частиц от рН также качественно меняются в области изоэлектрической точки. Масса рассеивающих частиц в растворах с солями тяжелых металлов не остается постоянной, как это наблюдается в растворах с NaCl, а резко возрастает вблизи нулевого суммарного заряда на белке, причем максимум  $M$  увеличивается с ростом ионной силы  $\mu$ .

Аналогичные эксперименты были проведены также для растворов человеческого сывороточного альбумина в присутствии хлорида меди (рис.5) и растворов бычьего сывороточного альбумина с солью кадмия (рис.6).



### 5. Обсуждение эксперимента

Белки в растворе представляют собой частицы, основным видом взаимодействия между которыми является кулоновское отталкивание. Однако если сравнить энергию электростатического взаимодействия заряженного иона и дипольной молекулы воды

$$E_{pq} = \frac{q^2 p_w^2}{12\pi\epsilon r_0^4 kT} \tag{5}$$

(где  $q$  – заряд иона;  $p_w$  – дипольный момент молекулы воды;  $\epsilon \sim 80$  – диэлектрическая проницаемость воды;  $r_0$  – радиус иона) с тепловой энергией [10], то можно сделать вывод о том, что ионы металлов, обладающие большей массой и большими ионными радиусами (например, ионные радиусы кадмия, меди и свинца  $Pb^{++}$  составляют соответственно  $\sim 1.0, \sim 1.2$  и  $\sim 1.3 \text{ \AA}$ ) слабее удерживают гидратную оболочку, чем ион натрия с  $r_0 \sim 0.8 \text{ \AA}$ . Ион с большим  $r_0$  более прочно связывается с отрицательно заряженной группой на белке и может образовывать так называемый кулоновский комплекс с общей гидратной оболочкой на макромолекуле белка. В этом случае ионы полностью компенсируют поверхностный заряд белка.

Эффективное уменьшение поверхностного заряда может привести к тому, что основным видом взаимодействия между макромолекулами станет диполь-дипольное, поскольку белки имеют аномально высокие дипольные моменты (табл.1).

Таким образом, характер взаимодействия макромолекул белков в таких растворах определяется не кулоновскими, а диполь-дипольными силами. Энергия диполь-дипольного взаимодействия

$$E_{pp} = \frac{p^4}{6\pi\epsilon kTr^6}, \tag{6}$$

где  $p$  – дипольный момент белка. При расстоянии между диполями  $r \sim 30 \text{ \AA}$  энергия  $E_{pp}$  может превышать тепловую энергию  $kT$  почти в 100 раз (рис.7) [10], поэтому при сближении на предельно малые расстояния белковые молекулы могут образовывать макромолекулярный комплекс – дипольный кластер.

В случае заряженных молекул энергия кулоновского отталкивания больше  $kT$ . Сближению макромолекул альбуминов, имеющих при нейтральных рН ( $\sim 7$ ) заряд

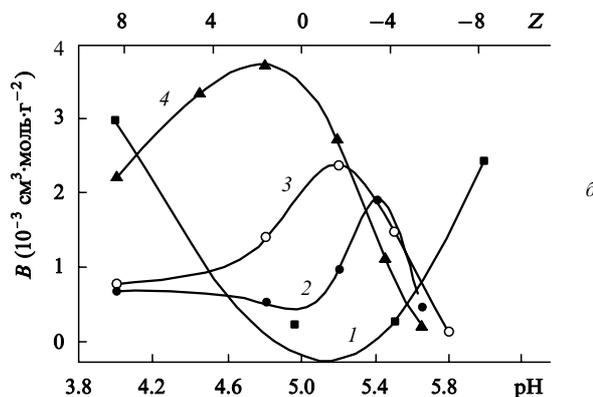


Рис.5. Зависимости эффективной массы рассеивающих частиц  $M$  (а) и коэффициента межмолекулярного взаимодействия  $B$  (б) от рН (или  $Z$ ) для водных растворов человеческого сывороточного альбумина в присутствии  $CuCl_2$  при  $\mu = 0.008$  (2), 0.012 (3) и 0.02 моль/л (4). Кривые 1 получены для раствора альбумина в чистой воде.

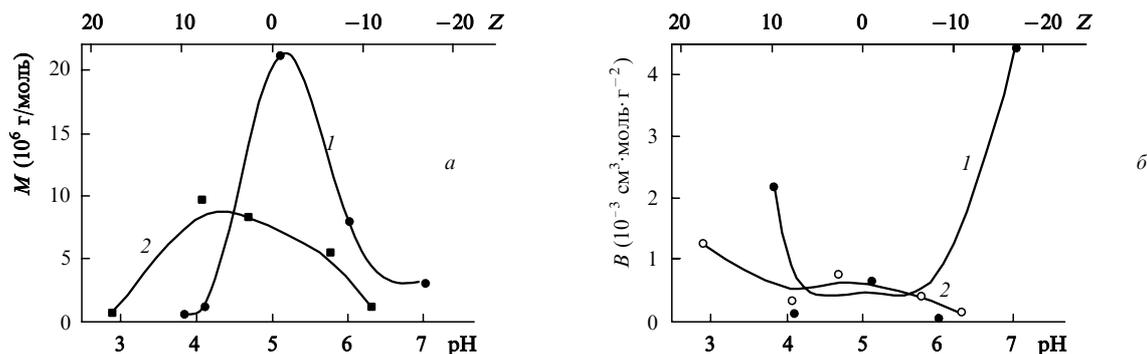


Рис.6. Зависимости эффективной массы рассеивающих частиц  $M$  (а) и коэффициента межмолекулярного взаимодействия  $B$  (б) от рН для водных растворов бычьего сывороточного альбумина в присутствии  $CdSO_4$  при  $\mu = 0.0005$  (1) и  $0.001$  моль/л (2).

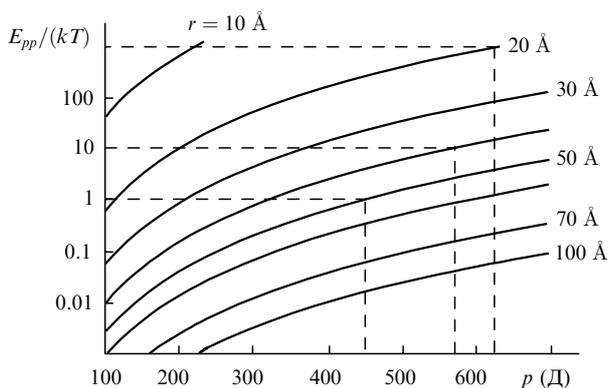


Рис.7. Зависимости отношения энергии диполь-дипольного взаимодействия  $E_{pp}$  к тепловой энергии  $kT$  от дипольного момента молекулы  $p$  при различных расстояниях между частицами  $r$ .

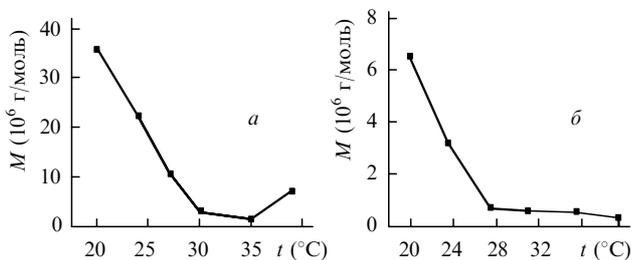


Рис.8. Изменение эффективной массы рассеивающих частиц  $M$  при нагревании растворов бычьего сывороточного альбумина (рН  $\sim 5$ ) (а) и яичного альбумина (рН  $\sim 4.9$ ) (б), содержащих ацетат свинца при  $\mu = 0.00105$  моль/л.

$q$ , примерно равный 10 ед. СГСЭ, препятствует их взаимное кулоновское отталкивание с энергией

$$E_{qq} = \frac{q^2}{\epsilon l}, \tag{7}$$

где  $l$  – расстояние между заряженными макромолекулами. С увеличением суммарного (отрицательного или положительного) заряда на белковой молекуле кулоновские силы отталкивания возрастают и кластеры разрушаются, причем эффективная масса рассеивающих частиц приближается к молекулярной массе белка.

Поскольку отношение энергии диполь-дипольного взаимодействия к тепловой энергии для исследуемых растворов близко к единице, можно ожидать, что даже небольшие изменения температуры среды приведут к изменению параметров раствора. В нашей работе были исследованы водные растворы яичного и бычьего сыво-

роточного альбуминов, содержащие малые концентрации ( $\mu = 0.00105$  моль/л) ионов свинца, в диапазоне температур 20–45 °С в области их изоэлектрических точек (рис.8). Полученные результаты показывают, что эффективная масса рассеивающих частиц уменьшается примерно на порядок с ростом температуры. Этот эффект может быть связан с разрушением надмолекулярных комплексов – кластеров. Расчеты показывают, что с увеличением тепловой энергии всего на 5% минимальное расстояние между дипольными макромолекулами в кластерах увеличивается более чем в два раза.

## 6. Заключение

Таким образом, в настоящей работе обнаружено и детально исследовано методом рассеяния лазерного излучения возникновение макромолекулярных агрегатов – кластеров в растворах белков, содержащих ионы тяжелых металлов. Изучено влияние концентрации ионов в растворе и поверхностного заряда белковых молекул на массу возникающих макромолекулярных комплексов. Предложена физическая модель, объясняющая это явление на основе сильных диполь-дипольных взаимодействий. Исследовано воздействие температуры на дипольные белковые комплексы.

Проведенные исследования взаимодействия белковых макромолекул с ионами тяжелых металлов важны для установления молекулярных механизмов патологических изменений в биологических объектах, например в сыворотке крови, при воздействии токсичных ионов. В связи с этим данные исследования имеют практическое значение для решения задач экологии и медицины.

- Williams A.P. *The metals of life* (NewYork: Willey, 1971).
- Дебай П. *Определение молекулярного веса методом рассеяния света* (Л.: Наука, 1987)
- Liu Y., Ma C.Q., Li K.A., Xie F.C., Tong S.Y. *Anal. Biochem.*, **268**, № 2, 187 (1999).
- Mukherjee A., Lutkenhaus J. *J. Bacteriol.*, **181**, № 3, 823 (1999).
- Edsall J.T., Edelhoch H., Lontie R., Morrison P.R. *Am. Chem. Soc.*, **72**, 4641 (1950).
- Петрова Г.П., Петрусевич Ю.М. *Вестник Моск. ун-та. Сер. Физика, астрономия*, **35**, № 3, 45 (1994).
- Scatchard G.J. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **51**, 2315 (1949).
- Petrova G.P., Petrusevich Yu.M., Evseevicheva A.N., Ten D.I. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **4263**, 150 (2001).
- Petrova G.P., Petrusevich Yu.M., Evseevicheva A.N. *Gen. Physiol. Biophys.*, **17**, № 2, 97 (1998).
- Петрова Г.П., Петрусевич Ю.М., Евсеевичева А.Н. *Вестник Моск. ун-та. Сер. Физика, астрономия*, № 4, 71 (1998).