

значительных уровней и может оказывать вредное физиологическое воздействие на человека, длительное время управляющего автомобилем. На рис. 4 отмечается значительное повышение уровня инфразвука в салоне автомобиля при проезде под аркой здания по сравнению с соответствующим уровнем, измеренным, когда автомобиль двигался на площади.

Вместе с тем спектральные уровни, приведенные к эквивалентному уровню звукового давления (например, по формулам (1) и (2)), которые были измерены микрофоном и векторным приемником, оказались различными, причем разность уровней зависела от точки размещения приемной системы внутри салона, что свидетельствовало о возникновении почти

стоячих волн. Различие значений достигало 15 дБ.

Следует отметить, что в процессе измерений шумовой помехи внутри салона автомобиля были получены данные, которые позволили определить направление на источник шумовой помехи и с учетом этого выдать рекомендации по уменьшению уровня помех в инфразвуковом диапазоне частот внутри салона некоторых автомобилей повышенного класса.

#### Литература

1. Борьба с шумом на производстве / Под ред. Е. Я. Юдина. М., 1985.
2. Колесников А.Е. Шум и вибрация. Л., 1988.
3. Шум на транспорте / Под ред. Р. Хеберга. М., 1995.

УДК 532.782; 532.541.64; 532.577.11

## РОЛЬ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ В ОБРАЗОВАНИИ БЕЛКОВЫХ КЛАСТЕРОВ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

Г. П. Петрова, Ю. М. Петрусевич, А. Н. Евсеевичева

**Впервые обнаружено образование макромолекулярных белковых кластеров в присутствии ионов тяжелых металлов с помощью метода рэлеевского рассеяния света. Исследованы условия образования и разрушения таких кластеров. Показано, что масса кластеров имеет максимальное значение в изоэлектрической точке белка и возрастает с увеличением ионной силы раствора. Образование кластеров в присутствии токсичных тяжелых металлов в живых клетках имеет существенное физиологическое и экологическое значение. Обсуждается молекулярный механизм образования таких кластеров.**

Экологам хорошо известна высокая токсичность ряда тяжелых металлов, к которым относятся ртуть, свинец, олово, таллий, теллур, хром и многие другие. Для человека токсичной является концентрация этих металлов в воздухе порядка  $10^{-2}$  мг/м<sup>3</sup>. В виде водных растворов ртуть токсична для человека при концентрации  $5 \cdot 10^{-3}$  мг/л, никель, свинец, титан, висмут и хром — при концентрации около 0,1 мг/л. Мало известна токсичность таких тяжелых металлов, как цезий и рубидий, которые являются предметом исследования в данной работе.

Известны некоторые химические и биофизические механизмы действия тяжелых металлов на функционирование живых клеток и организмов, например отравление ферментов, нарушение проницаемости мембран и электронного транспорта, блокирование нервной проводимости, а также развитие цепных свободнорадикальных процессов. Однако при этом существуют и чисто физические механизмы взаимодействия заряженных ионов тяжелых металлов с биологическими макромолекулами и прежде всего белками. Результаты взаимодействия — это образование белковых кластеров, аномалия молекулярного дви-

жения заряженных биополимеров, а также аномальная сорбция ионов тяжелых металлов на поверхности липопротеинов и биологических мембран.

В данной статье рассматриваются физические процессы в растворах, связанные с образованием белковых кластеров в присутствии ионов тяжелых металлов.

Взаимодействие белковых макромолекул в растворе определяется электростатическими силами, возникающими между зарядами макроионов и находящимися в их окрестности зарядами низкомолекулярных ионов, при этом общая концентрация ионов в растворе носит название ионной силы. Раствор, содержащий ионы, в целом остается электронейтральным. Взаимодействие макроионов в растворе, содержащем кроме низкомолекулярного растворителя еще и третью компоненту — сильный электролит, было рассмотрено в теории Скэтчарда [1]. Выражение для второго вириального коэффициента  $B$  (в разложении для свободной энергии) согласно этой теории может быть записано в виде

$$B = \frac{V_1}{M_2^2} \left( \frac{Z^2}{4m_3} + \frac{\beta_{22}}{2} - \frac{\beta_{23}^2 m_3}{4 + 2\beta_{33} m_3} \right). \quad (1)$$

Здесь  $V_1$  — удельный объем растворителя,  $Z$  — заряд макроиона,  $M_2$  — его масса,  $m_3$  — концентрация ионов соли. Параметры  $\beta_{22}$ ,  $\beta_{23}$  и  $\beta_{33}$ , являющиеся производными от коэффициентов активности, 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 (1) коэффициент межмолекулярного взаимодействия изменяется с ростом суммарного заряда на белке по параболическому закону, пропорционально  $Z^2$  (эффект Доннана), и имеет минимум в точке  $Z \approx 0$  (изоэлектрическая точка) [2]. Коэффициент  $\beta_{22}$  обычно мал по сравнению с остальными слагаемыми в формуле (1). При больших концентрациях соли в растворе член, содержащий коэффициент  $\beta_{23}$ , может существенно превышать первые два (по модулю) и параметр  $B$  может стать отрицательным.

Весьма эффективным методом для определения коэффициента взаимодействия  $B$  и массы макромолекул является метод рэлеевского рассеяния света [3, 4]. Как было показано Дебаем [4], в случае молекулярных растворов можно связать экспериментально измеряемый коэффициент рассеяния раствора  $R_\theta$  ( $\theta$  — угол рассеяния) с вириальным разложением для осмотического давления  $\Pi$ :

$$\frac{cHK}{R_\theta} = \frac{1}{RT} \frac{d\Pi}{dc} = \frac{1}{M} + 2Bc + \dots \quad (2)$$

где  $c$  — концентрация,  $H = \frac{2\pi^2 n_0^2 (dn/dc)^2}{\lambda^4 N_A}$  — так называемая постоянная раствора (постоянная Дебая),  $R$  — газовая постоянная,  $\lambda$  — длина волны возбуждающего света,  $n_0$ ,  $n$  — коэффициенты преломления чистого растворителя и раствора,  $M$  — масса макромолекулы,  $K$  — фактор Кабанна [5].

Исследования водных растворов различных белков с помощью этого метода [6–9] показали, что масса белковых макромолекул  $M$  в растворе при изменении поверхностного заряда на белке (определяемого параметром рН) остается практически постоянной. Зависимость коэффициента взаимодействия (параметра  $B$ ) от рН раствора изменяется нелинейно и имеет минимум в изоэлектрической точке, что согласуется с формулой (1).

При возрастании ионной силы раствора, т. е. при увеличении концентрации растворенной соли, например NaCl, в растворе возникают более сложные образования с участием ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$ . Вокруг заряженной молекулы белка при этом создается облако противоионов, экранирующее кулоновское взаимодействие. Величина  $B$  уменьшается с увеличением ионной силы  $\mu$ , однако параболический вид зависимости  $B$  от рН сохраняется. Эти эффекты наблюдались экспериментально [6–9]. Для белка лизоцима при большой

ионной силе наблюдалось изменение знака  $B$ , определяемое ростом (по модулю) третьего члена формулы Скэтчарда (1) [9].

При увеличении концентрации соли NaCl в растворе наблюдается смещение минимума кривых  $B = f(\text{pH})$  от изоэлектрической точки в сторону меньших рН (положительный заряд на белке), как, например, для сывороточного альбумина [6] и  $\gamma$ -глобулина [7]. Смещение минимума  $B$  в сторону положительных  $Z$  (меньших рН) было объяснено в работе Эдсолла и др. [6] связыванием ионов хлора ( $\text{Cl}^-$ ) на поверхности альбумина.

Ионный радиус  $\text{Cl}^-$  составляет 1,75 Å, а  $\text{Na}^+$  — 0,8 Å. Поэтому ион хлора прочнее связывается с поверхностными группами белка, чем  $\text{Na}^+$ . Ионы тяжелых щелочных металлов, обладая большой массой и большими ионными радиусами (например, ионный радиус цезия составляет 1,65 Å, а рубидия — 1,47 Å), сравнительно слабо удерживают гидратную оболочку, поэтому на поверхности белка они могут образовывать так называемый кулоновский комплекс, соединившись с отрицательным противоионом на макромолекуле. В связи с этим можно ожидать, что процессы адсорбции тяжелых ионов  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  и легкого  $\text{Na}^+$  на поверхности белка будут существенно отличаться. Это подтверждается расчетом относительной энергии взаимодействия заряженного иона с дипольной молекулой воды (рис. 1).

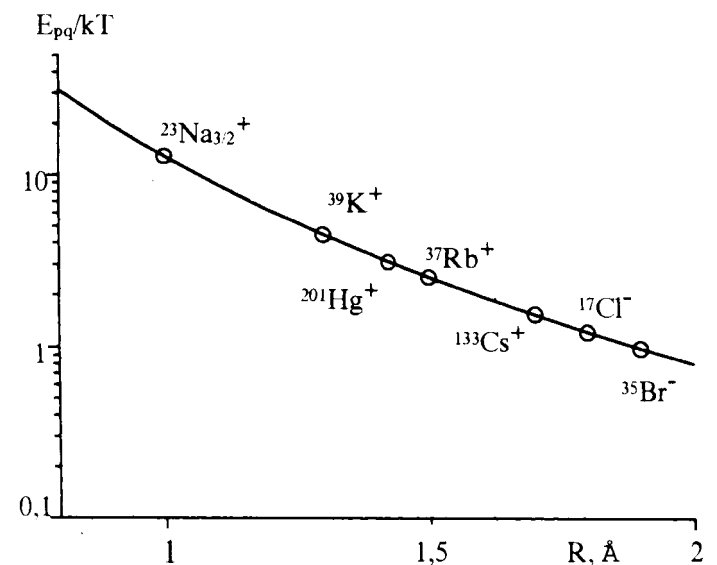


Рис. 1. Зависимость относительной энергии взаимодействия заряженного иона и диполя воды от ионного радиуса

В нашей работе методом светорассеяния были исследованы водные растворы сывороточного и яичного альбуминов (фирмы Serva) в присутствии солей CsCl и RbCl при различных значениях поверхностного заряда на белке и ионной силы. Эксперименты проводились на установке с He-Ne лазером и фото-

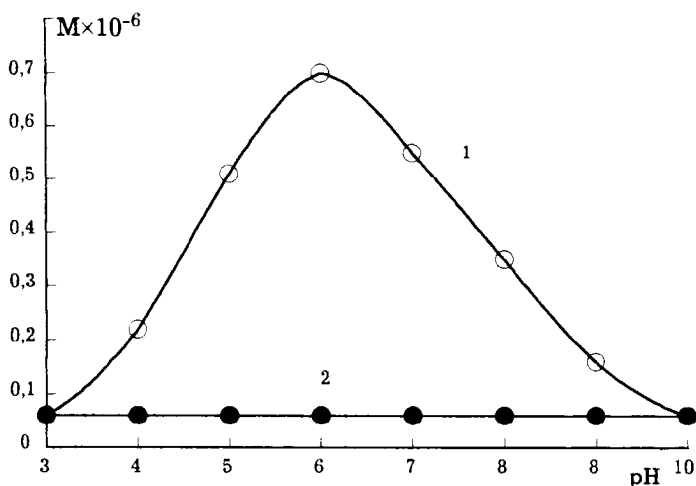


Рис. 2. Зависимость массы рассеивающих частиц в растворе сывороточного альбумина от pH в присутствии соли CsCl при ионной силе  $\mu = 0,1$  моль/л (1) и в отсутствие соли (2)

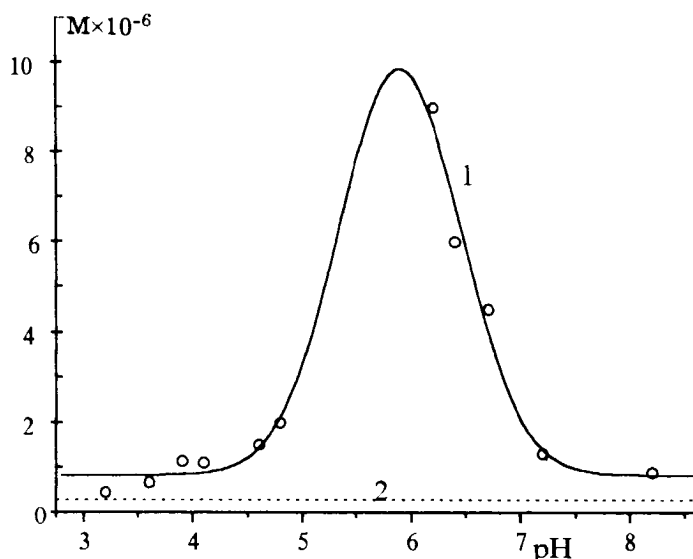


Рис. 4. Зависимость массы рассеивающих частиц в растворе сывороточного альбумина от pH в присутствии соли RbCl при ионной силе  $\mu = 0,1$  (1) и соли NaCl при ионной силе  $\mu = 0,1$  (2)

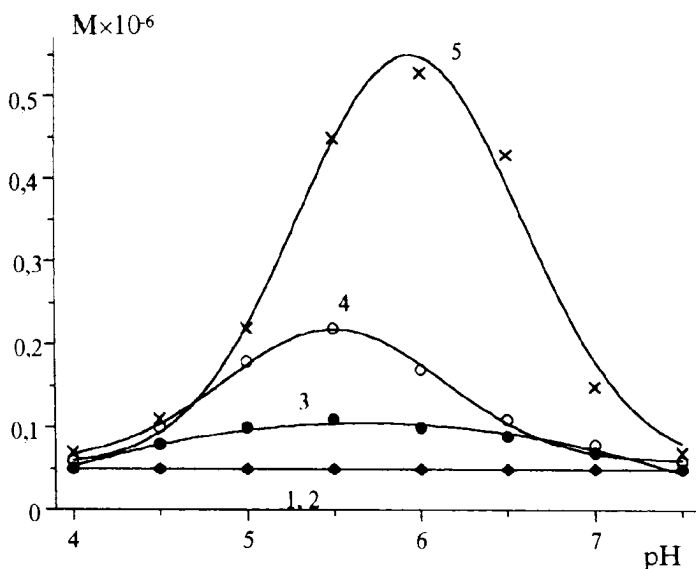


Рис. 3. Зависимость массы рассеивающих частиц в растворе яичного альбумина при различной ионной силе: яичный альбумин + вода,  $\mu = 0,001$  и яичный альбумин + вода + NaCl,  $\mu = 0,1$  (1, 2), яичный альбумин + вода + CsCl,  $\mu = 0,01$  (3), 0,1 (4) и 0,2 (5)

электрическим регистратором рассеянного излучения по методике, описанной в работе [7].

Из экспериментальных данных для коэффициента рассеяния при различных концентрациях белка и различных значениях ионной силы были рассчитаны коэффициенты межмолекулярного взаимодействия  $B$  [10], а также массы рассеивающих частиц (рис. 2–4).

Как следует из литературных данных, во всех ранее изученных растворах белков в присутствии соли NaCl [6–9] масса рассеивающих частиц не зависит от концентрации соли. Обнаруженное нами новое явление заключается в том, что в присутствии в растворе солей тяжелых металлов масса рассеивающих частиц резко возрастает, достигая максимума

в области изоэлектрической точки, соответствующей нулевому суммарному заряду на поверхности белка, причем величина этого максимума возрастает с ростом концентрации соли тяжелого металла.

Данный эффект можно, по-видимому, объяснить возникновением молекулярных комплексов (кластеров) в этих растворах. Сближению макромолекул альбуминов в нейтральных растворах препятствует заряд  $q$  величиной около 10 элементарных зарядов, вызывающий их взаимное кулоновское отталкивание. Из расчетного графика (рис. 5) видно, что когда заряд на поверхности белка составляет 10 элементарных зарядов, то энергия кулоновского взаимодействия оказывается на порядок больше тепловой при расстоянии между макромолекулами около  $70\text{\AA}$ . Эффективное уменьшение поверхностного заряда белка в результате прочного связывания ионов тяжелых металлов с поверхностными заряженными группами приводит к тому, что основным видом взаимодействия между макромолекулами становится диполь-дипольное, поскольку белки имеют аномально высокое значение дипольных моментов (для сывороточного альбумина  $P = 380$  Д, для яичного —  $250$  Д [2]).

Слабая связь молекул воды с ионами тяжелых щелочных металлов определяется соотношением собственной электростатической энергии, которая зависит от ионного радиуса, и тепловой энергии  $kT$ :

$$E_{pq} = \frac{q^2 p_w^2}{12\pi\epsilon r_0^4} \frac{1}{kT}$$

Здесь  $E_{pq}$  — электростатическая энергия взаимодействия ион-молекула воды,  $q$  — поляризационный заряд иона тяжелого металла,  $p_w$  — дипольный момент молекулы воды,  $r_0$  — расстояние между центрами

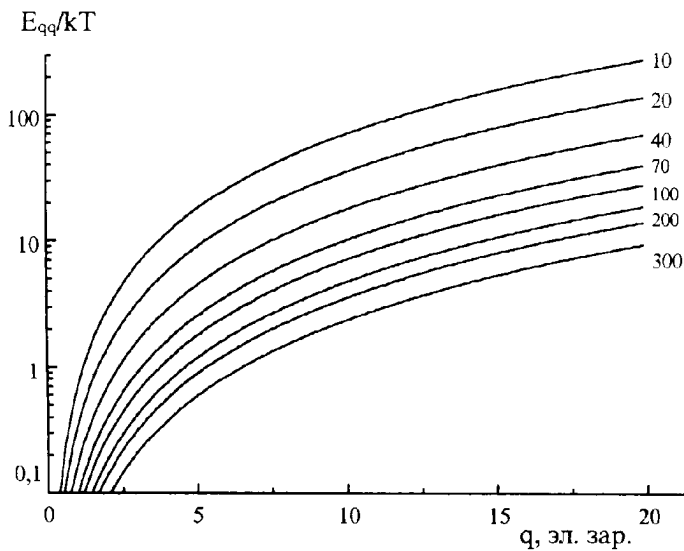


Рис. 5. Зависимость относительной энергии заряд-зарядовых взаимодействий биополимеров в водных растворах от величины элементарного заряда макромолекулы при различном расстоянии между макромолекулами (расстояние в ангстремах указано рядом с кривыми)

иона и молекулы воды,  $\epsilon$  — диэлектрическая проницаемость воды ( $\sim 80$ ).

Если энергия взаимодействия  $E_{pq} < kT$ , то на поверхности иона вода не будет удерживаться, и ионы могут образовывать электростатические пары на белке, полностью компенсируя его поверхностный заряд. Характер взаимодействия макромолекул альбуминов в этом случае будет определяться в основном силами диполь-дипольного и диполь-зарядового взаимодействий (рис. 6, а, б). Энергия диполь-дипольного взаимодействия молекул белка определяется соотношением

$$E_{pp} = \frac{p^4}{6\pi\epsilon kT l^6}.$$

Здесь  $p$  — дипольный момент макромолекулы,  $l$  — расстояние наибольшего сближения диполей. При сближении диполей на расстояние около  $25\text{Å}$  энергия  $E_{pp}$  может превышать тепловую энергию  $kT$  почти в 100 раз (рис. 6, б).

При стремлении к нулю фактического заряда на поверхности макромолекулы создаются условия, когда молекулам белка выгоднее объединиться в комплексы (достигается минимум свободной энергии). Белковые макромолекулы могут сблизиться на предельно малые расстояния, образуя макромолекулярный комплекс — кластер.

Для более тяжелого сывороточного альбумина максимальная масса кластера достигает примерно 60 молекулярных масс белка, для яичного альбумина — примерно 10 молекулярных масс.

С увеличением суммарного (отрицательного или положительного) заряда на белке кулоновские

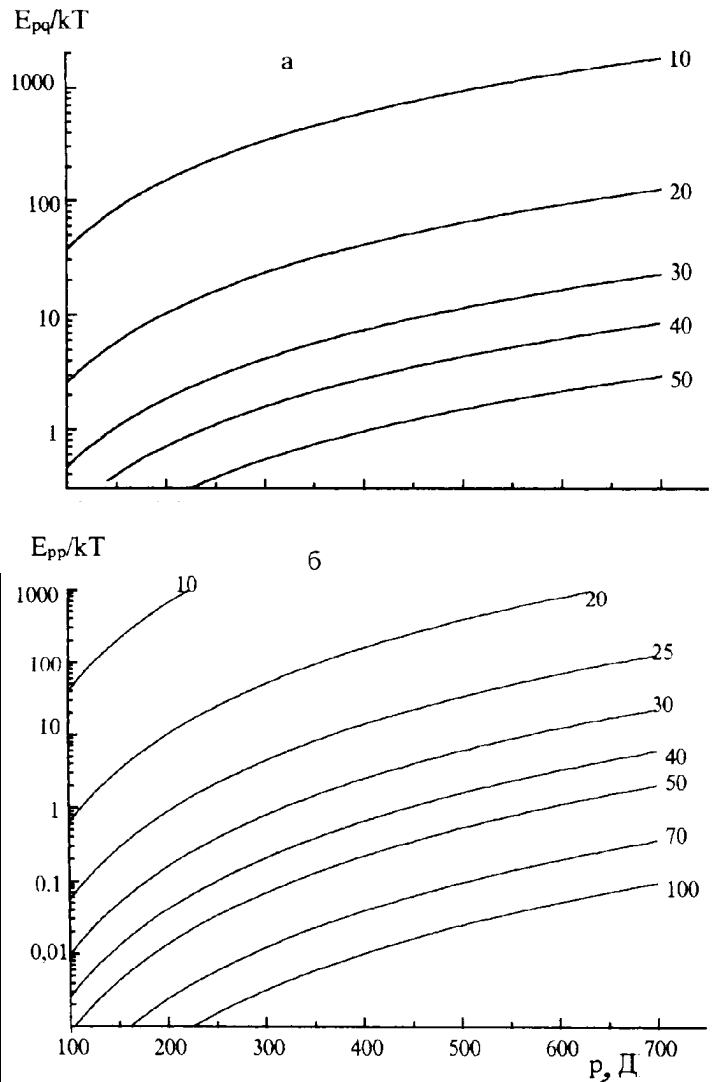


Рис. 6. Зависимость относительной энергии диполь-зарядовых (а) и диполь-дипольных (б) взаимодействий биополимеров в водных растворах от величины дипольного момента макромолекулы при различном расстоянии между макромолекулами (расстояние в ангстремах указано рядом с кривыми). График (а) рассчитан для заряда макромолекулы  $q = 10$  эл. зар.

силы отталкивания возрастают и кластеры разрушаются, причем эффективная масса рассеивающих частиц приближается к величине молекулярной массы белка (см. рис. 2–4).

Полученный результат представляет несомненный интерес для понимания молекулярных процессов, происходящих в живых организмах при воздействии ионов тяжелых металлов.

#### Литература

1. *Scatchard G.J.* // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1949. 51. P. 2315.
2. *Тейфорд Ч.* Физическая химия полимеров. М., 1965.
3. *Цветков В.Н., Эскин В.Е., Френкель С.Я.* Структура макромолекул в растворах. М., 1956.
4. *Дебай П.* Избранные труды. Л., 1987. С. 363–376.

5. Cabannes J. La Diffusion Moleculaire de la Lumiere. Paris, 1929.
6. Edsall J.T., Edelhoeh H., Lontie R., Morrison P.R. // J. Am. Chem. Soc. 1950. 72. P. 4641.
7. Петрова Г.П., Петрусевич Ю.М., Ширкова И.И., Ревакотов О.П. // Вестн. Моск. ун-та. Физ. Астрон. 1987. № 2. С. 59. (Moscow University Phys. Bull. 1987. No. 2. P. 71).
8. Petrova G.P., Petrusevich Yu. M., Borisov B.A. // SPIE: Laser Application in Life Sciences. 1990. 1403. P. 387.
9. Петрова Г.П., Петрусевич Ю.М. // Вестн. Моск. ун-та. Физ. Астрон. 1994. № 3. С. 45 (Moscow University Phys. Bull. 1994. No. 3. P. 41).
10. Петрова Г.П., Петрусевич Ю.М., Евсевичева А.Н. и др. Препринг физ. ф-та МГУ. 1997, № 4.