

АКУСТИКА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФИЗИКА

УДК 532.782; 532.541.64; 532.577.11

ФИЗИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ВОЗДЕЙСТВИЯ ИОНОВ СВИНЦА НА БЕЛКИ В РАСТВОРАХ**Г. П. Петрова, Ю. М. Петрусевиц, А. Н. Евсеевичева, Д. И. Тен, В. Ю. Петрусевиц***(кафедра молекулярной физики)*

E-mail: petrova@phys.msu.su

С помощью двух независимых физических методов (рэлеевского рассеяния света и электронного парамагнитного резонанса) исследовано воздействие ионов токсичного тяжелого металла — свинца — на белки в водных растворах (в том числе белки сыворотки крови). Обсуждается физический механизм взаимодействия ионов тяжелых металлов с заряженными биополимерами, в основе которого — образование прочных связей металлических ионов с поверхностью макромолекул. На основе полученных результатов может быть предложен метод мониторинга загрязненности природных жидких сред тяжелыми металлами.

Введение

Металлы играют важную роль в человеческом организме. Содержание в теле человека таких металлов, как натрий, калий, кальций, магний, составляет до нескольких процентов общего веса (примерно 2 кг на 70 кг веса). Другие металлы, такие как железо, кобальт, молибден, цинк, присутствуют в организме в очень малых концентрациях, находясь в связанном с ферментами состоянии, их содержание составляет менее 1% веса.

Превышение предельно допустимых концентраций металлов в организме, в особенности токсичных тяжелых металлов, опасно для человека.

В настоящее время проблема исследования молекулярных механизмов воздействия ионов тяжелых металлов на биологические жидкости, например кровь, а также разработка достаточно простых и надежных физических методов для экологического мониторинга наличия тяжелых металлов в природных средах, прежде всего в воде, является весьма актуальной.

В табл. 1 приводятся известные химические, биофизические и физические механизмы воздействия металлов на функционирование клеток и живого организма как целого.

Сравнительно недавно в водных растворах белков нами был обнаружен один из физических механизмов токсического действия металлов, указанный в таблице. Водные растворы белков могут рассматриваться как модельные растворы сыворотки крови. В работах [1, 2, 3] было показано, что при наличии в них ионов тяжелых щелочных металлов цезия и рубидия в результате взаимодействия этих ионов с макромолекулами белка в растворах возникают надмолекулярные структуры — кластеры, масса которых на порядок и более превышает массу белковой молекулы.

Т а б л и ц а 1

Основные механизмы токсического воздействия тяжелых металлов

Химические и биофизические механизмы	Физические механизмы
1. Отравление ферментов	1. Аномальная сорбция на поверхности липопротеинов (онкология, старение)
2. Нарушение проницаемости мембран	2. Аномалия молекулярной подвижности заряженных биополимеров (онкология, токсикоз)
3. Нарушение электронного транспорта	3. Образование дипольных белковых кластеров
4. Блокирование нервной проводимости	
5. Развитие цепных свободно-радикальных процессов (онкология, старение, радиационные повреждения)	

Свинец относится к группе так называемых тяжелых цветных металлов и является, вероятно, наиболее распространенным «металлическим» ядом. Свинец используется для многих промышленных целей — в производстве красок, в качестве добавок к автомобильному топливу и др. Подобно ртути, свинец очень токсичен для нервной системы и почек, при этом степень тяжести поражения организма зависит от возраста человека и времени воздействия. У детей уже при низких уровнях концентрации свинца наблюдаются снижение интеллекта, изменения в поведении, а длительное воздействие может приводить к различным повреждениям мозга и даже к летальным исходам.

В настоящей работе исследовалось воздействие ионов свинца на белки (альбумины) в водных растворах.

Эффективным методом исследования растворов макромолекул является метод рэлеевского рассеяния света [4, 5]. Известное уравнение Дебая позволяет связать экспериментально измеряемую величину —

коэффициент рассеяния света (или мутность) раствора с концентрацией раствора и коэффициентом межмолекулярного взаимодействия (вторым вириальным коэффициентом в разложении осмотического давления по малым концентрациям):

$$\frac{cHK}{R_{90}} = \frac{1}{RT} \frac{d\Pi}{dc} = \frac{1}{M} + 2Bc + \dots, \quad (1)$$

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

где c — концентрация белка, R_{90} — рэлеевский коэффициент рассеяния под углом 90° к падающему лучу, H — так называемая постоянная раствора, K — коэффициент, определяющий оптическую анизотропию рассеивающих частиц, R — универсальная газовая постоянная, T — температура, Π — осмотическое давление. Уравнение позволяет определять массу рассеивающих частиц M и параметр межмолекулярного взаимодействия B .

Рассеивающие свойства водных растворов белков в нашей работе изучались на оптической установке (рис. 1) с использованием гелий-неонового лазера ($\lambda = 632$ нм) и фотоэлектронного детектора рассеянного излучения. Поляризация состояла из двух элементов: призмы Волластона и призмы Глана–Томсона. Два рассеянных луча с взаимно перпендикулярными направлениями поляризации модулировались с одинаковой частотой (80 Гц) при помощи оптического обтюлятора. Сигнал с фотумножителя поступал на усилитель, настроенный на частоту модуляции, усиленный сигнал измерялся цифровым вольтметром. Интенсивность лазерного луча контролировалась с помощью фотодиода.

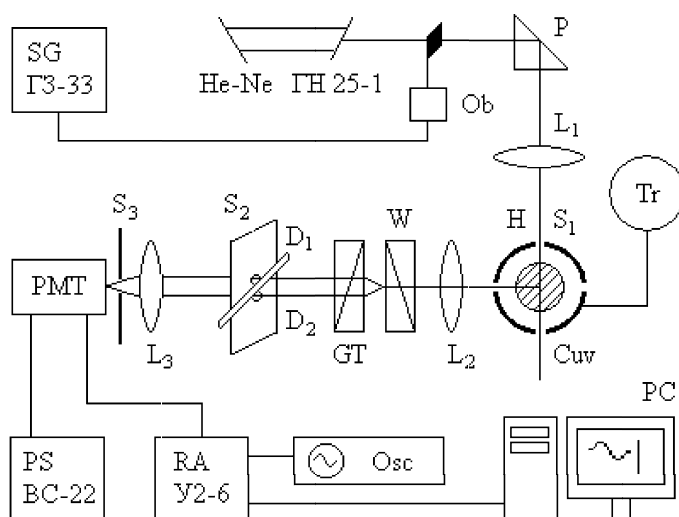


Рис. 1. Блок-схема оптической установки: He-Ne ГН 25-1 — лазер, SG — звуковой генератор, Ob — модулятор, P — поворотная призма, L_{1-3} — линзы, S_{1-3} — экраны, H — нагревательный элемент, Tr — ЛАТР, Cuв — кювета с раствором, W и GT — призмы Волластона и Глана–Томсона (поляриод), D_{1-2} — диафрагмы, PMT — ФЭУ, PS — блок питания ФЭУ, RA — резонансный усилитель, Osc — осциллограф

Молекулярный вес и второй вириальный коэффициент рассчитывались по измерениям относительных интенсивностей излучения, рассеянного под углом 90° , для двух перпендикулярных направлений поляризации. Измерения проводились в растворах с различными значениями водородного показателя и концентрации белка. Результаты корректировались с учетом значений интенсивности света, рассеянного растворителем (водой).

Для калибровки значений интенсивности рассеянного света в качестве стандартной жидкости использовался бензол ($R_{90} = 12.64 \cdot 10^{-6}$ см $^{-1}$ для $\lambda = 632$ нм), с поправкой на разницу величин показателей преломления бензола и воды. Погрешность измерений R_{90} составила 6 %.

Инкремент показателя преломления измерялся с помощью интерферометра Рэля (погрешность измерений составляла 2%). Концентрация свободных протонов в растворе (рН) и ионная сила μ варьировались путем добавления в раствор малых количеств кислоты, основания и соли.

Эффективность данного метода может быть проиллюстрирована с помощью экспериментального графика (рис. 2), показывающего зависимость параметра рассеяния cH/R_{90} для водного раствора гемоглобина от концентрации при изменении поверхностного заряда на белке (изменение рН). Как можно видеть, при увеличении положительного заряда на белке до рН 3.5 молекула гемоглобина распадается на две субъединицы, что сразу же приводит к соответствующему уменьшению коэффициента рассеяния раствора.

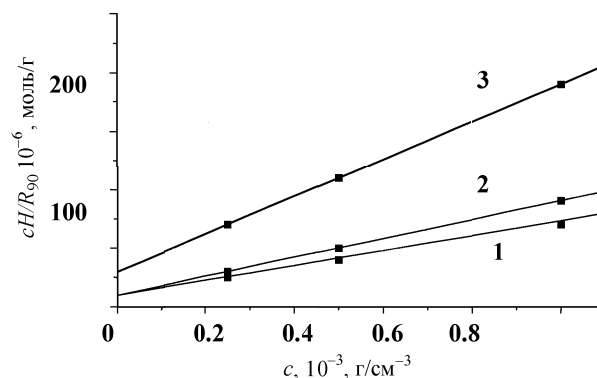


Рис. 2. Зависимость параметра рассеяния от концентрации для водного раствора гемоглобина: (1) рН 5.2; (2) рН 6.5 ($M = 68500$); (3) рН 3.5 ($M = 39000$)

Масса макромолекул в растворе может быть определена с помощью другого физического метода — электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Для этих целей обычно используется парамагнитный зонд.

Для медленных движений макромолекул ЭПР-спектр белка с адсорбированным нитроксильным радикалом имеет два четко разделенных пика (рис. 3, а, б). Согласно теории, изложенной в работе [6], такой спектр можно интерпретировать,

используя параметр $S = A'_Z/A_Z$, где A_Z — полуширина расстояния между высоким и низким пиками спектра альбумина в водном растворе; A'_Z — аналогичный параметр, но для более вязкого раствора.

В работе [6] предложено уравнение для вычисления времени корреляции τ в интервале времен $10^{-9} \div 10^{-8}$ с:

$$\tau = a(1 - S)^b, \quad (2)$$

где $b = -1.16$, $a = 8.5 \cdot 10^{-10}$, ширина центральной линии спектра нитроксильного радикала $\Delta H_0 = 5$ Гс.

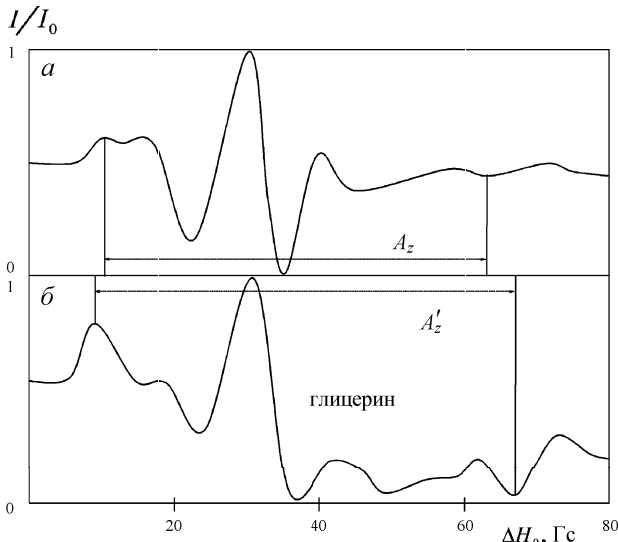


Рис. 3. ЭПР-спектр белка: (а) в водном растворе; (б) в глицерине. ΔH_0 — изменение постоянного поля спектрометра

Массу макромолекул можно вычислить с использованием формулы

$$\tau = \frac{V\eta}{kT} = \frac{M\eta}{\rho kT}, \quad (3)$$

где ρ — плотность и η — вязкость раствора.

В нашем случае спин-меченый раствор приготовлялся следующим образом: взвешенная порция каждой спиновой метки растворялась в этаноле и добавлялась в раствор белка, при этом концентрация этанола составляла менее 1 %. ЭПР-спектры записывались PS-100X ЭПР-спектрометром (марки ADANI). В экспериментах были использованы белки фирмы Serva (табл. 2). В качестве третьей компоненты раствора взяты ацетат свинца $Pb(CH_3COO)_2 \times 3H_2O$ и нитрат свинца $Pb(NO_3)_2$.

Т а б л и ц а 2

Параметры белков, использованных в экспериментах

Белок	Молекулярная масса, а.е.м.	Дипольный момент, D	Изоэлектрическая точка (pH)
Бычий сывороточный альбумин	68 000	480	4.9
Яичный альбумин	50 000	400	4.8
Молочный альбумин	14 500	700	5
Гемоглобин	68 000	380	5.2

Экспериментальные результаты и обсуждение

Исследования водных растворов ряда белков с помощью метода рэлеевского светорассеяния показали, что масса белковой макромолекулы остается практически постоянной при изменении pH раствора и ионной силы, определяемой концентрацией соли NaCl [5]. В качестве примера на рис. 4 показана зависимость параметра рассеяния водного раствора гемоглобина от концентрации при различных ионных силах и постоянном pH.

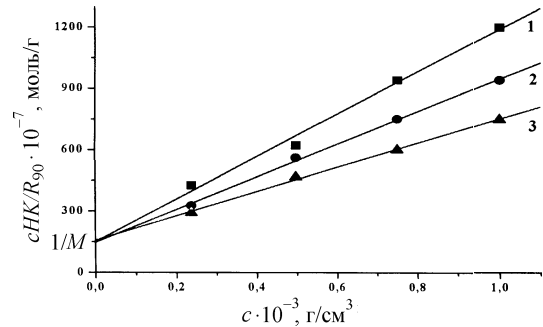


Рис. 4. Зависимость параметра рассеяния от концентрации для водного раствора гемоглобина при различных концентрациях NaCl (μ) при pH 5.5, $M = 65000$ г/моль: (1) $\mu = 0.001$ моль/л; (2) $\mu = 0.01$ моль/л; (3) $\mu = 0.05$ моль/л

Легкие ионы типа натрия обладают сравнительно малыми ионными радиусами и поэтому прочно удерживают на поверхности гидратную оболочку. Для тяжелых ионов, обладающих большими ионными радиусами, процессы их адсорбции на макромолекуле белка могут протекать по-другому [1].

Если энергия электростатического взаимодействия между ионом и молекулой воды $E_{pq} < kT$, то на поверхности иона гидратная оболочка не будет удерживаться, и ионы могут образовывать устойчивые электростатические пары на белке, полностью компенсирующие его поверхностный заряд.

На рис. 5 представлены зависимости коэффициента межмолекулярного взаимодействия от pH (Z), где Z — суммарный заряд на поверхности белка, для водных растворов бычьего сывороточного альбумина в присутствии соли свинца.

Как можно видеть из этих зависимостей, характер межмолекулярного взаимодействия в растворе, содержащем соль свинца, резко изменяется по сравнению с чистым раствором белка (кривая 1). При малых концентрациях соли свинца коэффициент межмолекулярного взаимодействия принимает отрицательные значения (кривая 2), а при дальнейшем увеличении ионной силы вместо минимума в области изоэлектрической точки наблюдается максимум коэффициента взаимодействия, величина которого возрастает с ростом ионной силы (кривые 3, 4, 5). На рис. 6 представлены зависимости эффективной массы рассеивающих частиц от pH в этих же растворах. Масса образующихся в растворе белковых

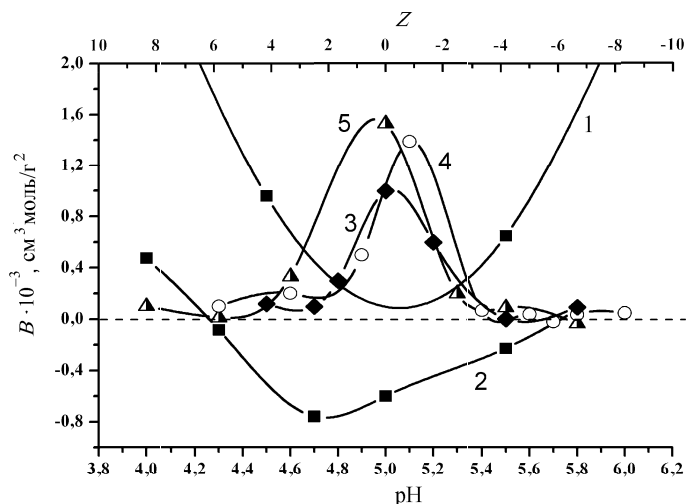


Рис. 5. Коэффициент межмолекулярного взаимодействия как функция $pH(Z)$ для сывороточного альбумина при добавлении ацетата свинца $Pb(CH_3COO)_2$: (1) $\mu = 0$; (2) $\mu = 0.00075$ моль/л; (3) $\mu = 0.00105$ моль/л; (4) $\mu = 0.0012$ моль/л; (5) $\mu = 0.0015$ моль/л

кластеров увеличивается более чем на порядок по сравнению с массой одной макромолекулы, причем максимального значения масса кластеров достигает в области изоэлектрической точки белка.

Характер взаимодействия макромолекул белков (альбуминов) в случае, когда в растворе имеются ионы с большим ионным радиусом, будет определяться в основном диполь-дипольными силами. Энергия диполь-дипольного взаимодействия при сближении диполей на расстояние порядка 30–50 Å может превышать тепловую энергию kT почти в 100 раз [3]. Белковые молекулы могут сблизиться на предельно малые расстояния друг от друга, образуя макромолекулярный комплекс — дипольный кластер.

Как было показано в работе [3], в водных растворах белков в присутствии солей тяжелых щелочных

металлов (цезия и рубидия) процесс образования и распада дипольных комплексов является обратимым. Аналогичные эффекты наблюдаются и в водных растворах бычьего сывороточного альбумина в присутствии ацетата свинца (рис. 6). В этом случае также при увеличении заряда (положительного или отрицательного) на поверхности макромолекулы масса рассеивающих частиц приближается к молекулярной массе белка.

Образование крупных частиц — надмолекулярных структур в водных растворах может быть также независимо подтверждено с помощью другого физического метода — электронного парамагнитного резонанса.

На рис. 7 показаны спектры ЭПР в водном растворе чистого белка (кривая 1) и в случае, когда в водный раствор альбумина добавлен ацетат свинца I/I_0

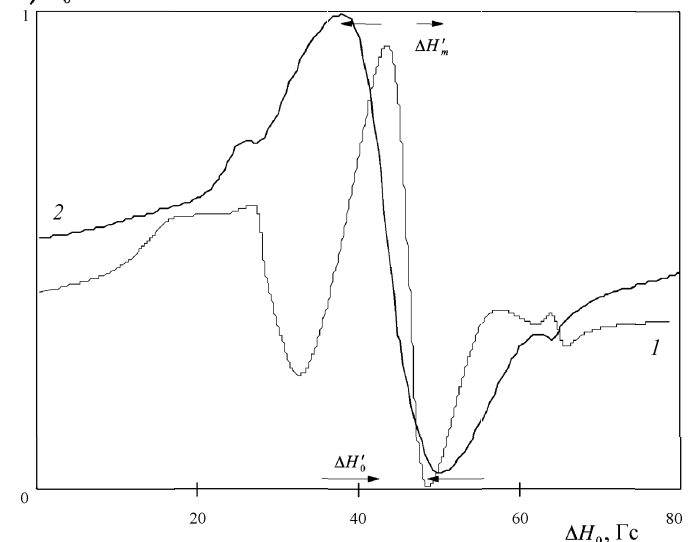


Рис. 7. ЭПР-спектр нитроксильного радикала, адсорбированного на белке: (а) в чистом водном растворе, (б) в водном растворе с добавлением ацетата свинца

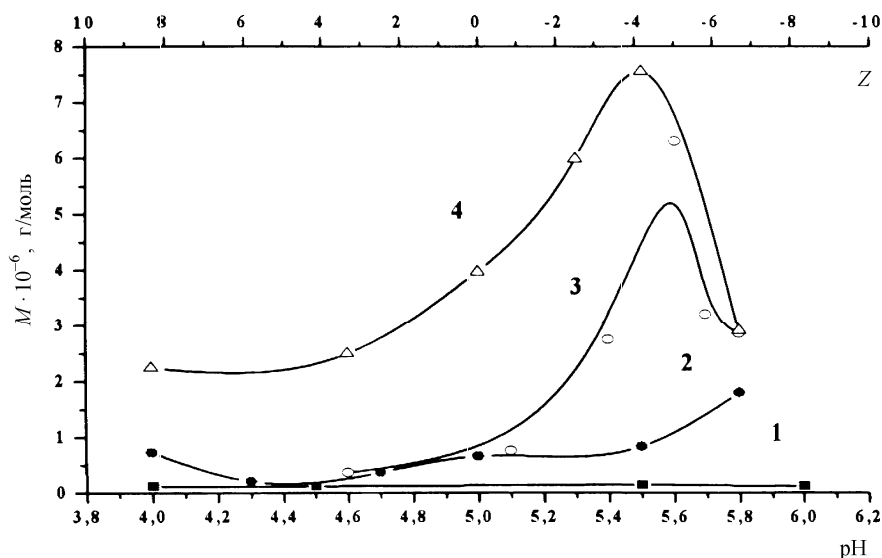


Рис. 6. Зависимость массы рассеивающих частиц от поверхностного заряда белка при различных концентрациях ионов свинца: (1) $\mu = 0.00075$ моль/л; (2) $\mu = 0.00105$ моль/л; (3) $\mu = 0.0015$ моль/л

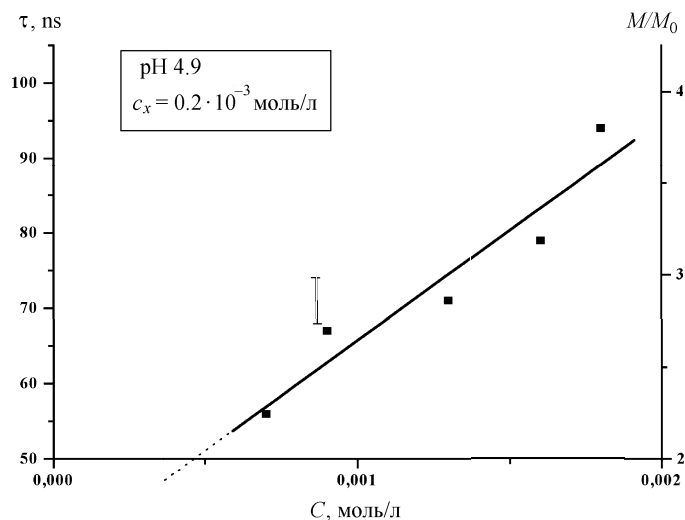


Рис. 8. Зависимость времени вращательной корреляции τ и относительной массы частиц M/M_0 в растворе от концентрации ацетата свинца

(кривая 2). В качестве парамагнитной метки использовался имминоксильный радикал. Почти двукратное увеличение ширины резонансной линии ΔH соответствует десятикратному увеличению массы частиц в растворе, как следует из расчета времени вращательной корреляции по формуле (2).

На рис. 8 приведена рассчитанная по формуле (2) зависимость времени вращательной корреляции и относительной массы частиц в растворе от концентрации соли свинца. Как можно видеть, наблюдается

линейное увеличение времени вращательной корреляции и массы кластера с ростом ионной силы раствора в области изоэлектрической точки белка. Таким образом, независимым физическим методом — ЭПР — подтверждается образование дипольных белковых кластеров в растворах, содержащих тяжелые металлы.

Методы рэлеевского рассеяния и ЭПР могут быть использованы для мониторинга загрязнения природных сред тяжелыми металлами, включая источники питьевой воды, при этом метод светорассеяния является наиболее простым и эффективным.

Литература

1. Петрова Г.П., Петрусевич Ю.М., Евсеевичева А.Н. и др. // Препринт МГУ. 1997. № 4.
2. Petrova G.P., Petrusevich Yu.M., Evseevicheva A.N. // Gen. Physiol. and Biophys. 1998. **17**. P. 97.
3. Петрова Г.П., Петрусевич Ю.М., Евсеевичева А.Н. // Вестн. Моск. ун-та. Физ., Астрон. 1998. № 4. С. 71. (Moscow University Phys. Bull. 1998. No. 4. P. 91).
4. Debye P. J. // Appl. Phys. 1946. **15**. P. 338.
5. Edsall J.T., Edelhoch H., Lontie R., Morrison P.R. // J. Am. Chem. Soc. 1950. **72**. P. 4641.
6. Hubbell W.L., McConnell H.M. // J. Am. Chem. Soc. 1971. **93**. P. 314.

Поступила в редакцию
30.09.02

ФИЗИКА ТВЕРДОГО ТЕЛА

УДК 537.312.8

ФОРМАЛИЗМ КУБО В ТЕОРИИ ЭЛЕКТРОННОГО ТРАНСПОРТА В НАНОГЕТЕРОСТРУКТУРАХ

И. В. Жуков, А. В. Ведяев

(кафедра магнетизма)

E-mail: ilya@magn.ru

В рамках формализма Кубо рассчитано гигантское магнетосопротивление (ГМС) для двух тонких слоев ферромагнитных металлов. Доказана эквивалентность учета «вершинной поправки» и метода эффективного электрического поля. Показано, что сопротивление структуры состоит из трех слагаемых: сопротивления за счет рассеяния в объеме и контактного сопротивления на границах металл–металл и металл–резервуар. Оказывается, что контактное сопротивление существенно зависит от спина носителей тока и оно дает заметный вклад в ГМС.

Введение

Важной особенностью вычисления эффекта гигантского магнетосопротивления (ГМС) в перпендикулярной геометрии является неоднородность электрического поля в направлении перпендикулярном плоскости слоев. Нахождение внутреннего электрического поля представляет собой сложную задачу. Этого можно избежать, если, используя формализм

Кубо, найти полную проводимость системы с учетом вершинной поправки, но такая задача пока не решена. Вместо этого в рассмотрение обычно вводится эффективное поле такое, что под его воздействием на проводимость, вычисленную без учета вершинной поправки, возникает тот же ток, что и при воздействии внешнего электрического поля на полную проводимость. Данная методика используется во многих работах [1, 2]. При этом или просто предполагается,