

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
«ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

*На правах рукописи*

Лавриненко Игорь Андреевич

РАЗРЕШЕНИЕ, ИДЕНТИФИКАЦИЯ И АНАЛИЗ ПЕРЕКРЫВАЮЩИХСЯ  
ПОЛОС ПОГЛОЩЕНИЯ ХРОМОФОРОВ НЕКОТОРЫХ ПРОСТЫХ И  
СЛОЖНЫХ БЕЛКОВ В ДИАПАЗОНЕ ДЛИН ВОЛН 240–320 НМ

Специальность: 03.01.02 — Биофизика

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор биологических наук,  
профессор Артюхов В.Г.

Воронеж — 2015

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	5
СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ.....	6
ВВЕДЕНИЕ.....	8
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
Глава 1. СТРУКТУРА И НЕКОТОРЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВЫХ МАКРОМОЛЕКУЛ.....	15
1.1 Структура, некоторые физико-химические и спектральные свойства простых белков и апобелковой составляющей сложных белков.....	16
1.2 Структура, электронные, магнитные и спектральные свойства простетической группы гемопротеидов.....	31
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	37
Глава 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	37
2.1 Объекты исследования.....	37
2.2 Методы исследования.....	38
2.2.1 Забор, транспортировка и хранение образцов крови.....	38
2.2.2 Получение фракции отмытых эритроцитов.....	39
2.2.3 Получение растворов гемоглобина.....	40
2.2.4 Получение производных гемоглобина.....	40
2.2.4.1 Получение растворов оксигемоглобина.....	41
2.2.4.2 Получение растворов дезоксигемоглобина.....	41
2.2.4.3 Получение растворов карбоксигемоглобина.....	42
2.2.4.4 Получение растворов метгемоглобина.....	42
2.2.5 Получение растворов цианметгемоглобина.....	43
2.2.6 Получение растворов фетального гемоглобина.....	44
2.2.7 Реактивы: класс чистоты.....	44
2.2.8 Регистрация спектров поглощения: спектрофотометры и протокол измерения.....	45

2.2.9 Подходы, направленные на снижение фотометрических ошибок и увеличение разрешения в спектрах поглощения .....	46
2.2.10 Расчет концентрации гемоглобина .....	55
2.2.11 Коррекция молярных спектров поглощения производных гемоглобина на присутствие неосновных компонент .....	56
2.2.11.1 Коррекция молярных спектров поглощения метгемоглобина А .....	58
2.2.11.2 Коррекция молярных спектров поглощения дезоксигемоглобина А .....	61
2.2.11.3 Коррекция молярных спектров поглощения карбоксигемоглобина А .....	64
2.2.11.4 Коррекция молярных спектров поглощения оксигемоглобина А .....	66
2.2.11.5 Коррекция молярных спектров поглощения оксигемоглобина F .....	67
2.2.12 Усреднение молярных показателей поглощения в спектрах производных гемоглобина .....	70
<b>Глава 3. РАЗРЕШЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПЕРЕКРЫВАЮЩИХСЯ ПОЛОС ПОГЛОЩЕНИЯ ХРОМОФОРОВ БЕЛКОВ В ДИАПАЗОНЕ ДЛИН ВОЛН 240–320 НМ .....</b>	<b>71</b>
3.1 Разрешение полос поглощения в спектрах белков с помощью второй производной .....	71
3.2 Соотнесение полос поглощения в спектрах белков к полосам поглощения в спектрах аддитивных моделей .....	91
3.3 Идентификация полос поглощения в спектрах белков путем их сопоставления в системе «аддитивная модель апобелка–свободные аминокислоты» .....	101
<b>Глава 4. РАЗЛОЖЕНИЕ УФ-СПЕКТРОВ ПОГЛОЩЕНИЯ ХРОМОПРОТЕИДОВ НА СПЕКТРЫ СВЕТОПОГЛОЩЕНИЯ ПРОСТЕТИЧЕСКИХ ГРУПП И АПОБЕЛКА С ПОМОЩЬЮ</b>	

АДДИТИВНОЙ МОДЕЛИ.....	116
4.1 Разработка способа разложения УФ-спектров поглощения хромопротеидов на составляющие светопоглощения апобелковой и небелковой компонент.....	116
4.2 Разложение УФ-спектров светопоглощения производных гемоглобина на составляющие поглощения апобелка и простетических групп.....	136
Глава 5. АНАЛИЗ УФ-СПЕКТРОВ ПОГЛОЩЕНИЯ АПОБЕЛКОВОЙ И ГЕМОВОЙ КОМПОНЕНТ НЕКОТОРЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ГЕМОГЛОБИНА В СОСТАВЕ МАКРОМОЛЕКУЛЫ.....	161
5.1 Сравнительный анализ УФ-спектров поглощения апобелковой составляющей окси-, карбокси-, дезокси- и метгемоглобина.....	161
5.2 Исследование УФ-спектров поглощения простетических групп окси-, карбокси-, дезокси- и метгемоглобина.....	176
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	192
ВЫВОДЫ.....	200
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	202



## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

A — поглощение

Alk — алкил, алифатический радикал

C — цистеин

C2 — цистин

EBI — Европейский Институт Биоинформатики (*European Bioinformatics Institute*)

F — фенилаланин

FUV — дальний ультрафиолет (*Far Ultraviolet, 122–200 nm*)

H — гистидин

Hal — галоген-радикал

Hb — дезоксигемоглобин

Hb<sub>A</sub> — гемоглобин взрослого человека (*adult*)

HbCO — карбоксигемоглобин

Hb<sub>F</sub> — фетальный гемоглобин человека (*fetal*)

HbO<sub>2</sub> — оксигемоглобин

M — метионин

MtHb — метгемоглобин

MUV — средневолновой ультрафиолет (*Middle Ultraviolet, 200–300 nm*)

PIR — Информационный Ресурс Белка (*Protein Information Resource*)

S/N — отношение «сигнал/шум» (*Signal/Noise*)

SIB — Швейцарский Институт Биоинформатики (*Swiss Institute of Bioinformatics*)

W — триптофан

Y — тирозин

$\lambda$  — длина волны

$\bar{\nu}$  — волновое число

## СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ

Ауксохром (*Auxochrom*): атомы или группы атомов, которые сами по себе не поглощают, но влияют на поведение сопряженного с ними хромофора [50, 54].

Безызлучательный переход (*Radiationless transition*): переход, не сопровождающийся испусканием, поглощением или рассеянием фотонов (т.е., переход с выделением или поглощением только порций неэлектромагнитной энергии [30].

Запрещенный переход (*Forbidden transition*): переход, невозможный при данной симметрии системы и рассматриваемом взаимодействии [30].

Максимум (*Maxima*): наибольшее значение функции на заданном множестве [45].

Мультиплетный терм (*Multiplet term*): совокупность термов с заданными главными, орбитальными и спиновыми квантовыми числами, но с различными квантовыми числами полного момента количества движения атома [63].

Связывающая орбиталь (*Binding orbital*): молекулярная орбиталь, для которой энергия соответствующего одноэлектронного состояния при переходе к системе разъединенных атомов (или фрагментов молекулы) повышается [29].

Пик (*Peak*): локальный или глобальный выраженный максимум, вершина на кривой [62].

Поле лигандов (*Ligand field*): поле атомов или молекул, которые находятся в ближайшем окружении рассматриваемого центра, как правило, атома или иона металла в кристалле или комплексном соединении [29].

Полоса поглощения (*Absorption band*): область спектра, поглощение в которой превосходит поглощение в соседних областях [30].

Разрешенный переход (*Allowed transition*): переход, возможный при данной симметрии системы и рассматриваемом взаимодействии [30].

Разрыхляющая орбиталь (*Antibinding orbital*): молекулярная орбиталь, для которой энергия соответствующего одноэлектронного состояния при переходе к

системе разъединенных атомов (или фрагментов молекулы) понижается [29].

Терм (*Term*): значение энергии квантового состояния системы, взятое по абсолютной величине (для атома значение терма отсчитывается от границы ионизации) [63].

Терм электронный (*Electronic term*): разность энергий равновесных конфигураций молекулы в возбужденном и основном состояниях [29].

Хромофор (*Chromophor*): функциональная группа атомов в молекуле, обуславливающая поглощение [54].

Экстремум (*Extrema*): значение функции на заданном множестве, являющееся ее максимумом или минимумом (локальным или глобальным, т.е. абсолютным) [45, 62].

Электронный спектр (*Electronic spectrum*): спектр, возникающий в результате квантовых переходов, при которых изменяется энергия электронной оболочки молекул [63].

## ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Среди методов исследования структурно-функциональных свойств белков спектроскопия электронных переходов (электронная спектроскопия) занимает особое место. Данный метод может выступать, и как конечный этап измерений, например, как фотометрическое окончание при определении концентрации белка, и как основа для последующего анализа структуры белка более сложными, дорогостоящими методами, например, как спектроскопия ядерного магнитного резонанса.

С помощью этого метода в условиях, близких к естественным средам живого организма, может быть изучено множество структурных состояний макромолекулы и ее конформационных перестроек при действии целого ряда физико-химических факторов (в т.ч., и в реальном масштабе времени [119]). При этом, регистрируемое изменение спектральных свойств этой макромолекулы несет в себе важную информацию не только о ее состоянии, но и характере микроокружения ее хромофоров и молекулы белка в целом.

Доступность спектрофотометрического метода широкому кругу исследователей является важным преимуществом, что позволило аккумулировать достаточно большой объем информации по данному направлению. Тем не менее, в этой области знаний существуют определенные проблемы, которые, на наш взгляд, разрешены не в полной мере.

Часть таких исследований ориентирована на соотнесение полос поглощения к переходам, которые их формируют. Для ряда модельных систем, начиная от отдельных хромофорных групп в составе простых химических соединений, до хромофоров боковых групп аминокислот в составе полипептидных цепей, а также изолированных простетических групп белка и их производных, изменяя параметры среды, удалось выявить особенности происхождения тех или иных полос поглощения, и в ряде случаев, сопоставить к соответствующим электронным термам молекулы.

Однако различия в условиях проведения эксперимента и способов оценки полос поглощения при изучении нативных белков не позволяют корректно оценить диапазон варьирования их максимумов по местоположению и интенсивности. Это затрудняет сравнительную оценку полос светопоглощения для белков, сходных по своему аминокислотному составу и структуре, но полученных по различному протоколу эксперимента.

Таким образом, небольшие девиации в спектре светопоглощения белка при воздействии на него различных физико-химических агентов могут быть маскированы различием протоколов эксперимента, представленных в опубликованных работах. При этом, в спектрах поглощения макромолекул хромофоры аминокислотных остатков, и в принципе простетических групп, могут формировать суперпозицию полос поглощения, пики которой из-за интерферирующего эффекта могут менять свое положение. Причем, эти изменения могут быть обусловлены только различием в соотношении количества однотипных радикалов боковых групп аминокислот тех или иных белков при одинаковых или сходных условиях микроокружения макромолекул.

Принимая это во внимание, для корректной оценки данных изменений необходимо, с одной стороны, выработать приемлемые способы или «стандарты» в оценке этих полос поглощения, доступных для большинства исследователей, с другой — изучить степень варьирования положения пиков поглощения для нативных белков в среде, близкой к естественной среде функционирующего белка, а также их определенным способом классифицировать.

Другая проблема, связанная с предыдущей, состоит в том, что разделение физико-химическими методами белка на составляющие зачастую приводит к ненадлежащим результатам исследований, вследствие нарушения системы внутримолекулярных взаимодействий. При этом изменения в локальном окружении хромофоров могут повлечь за собой соответствующие изменения их спектральных свойств.

Возможным путем решения обсуждаемой проблемы является разложение интегрального спектра поглощения вещества математическими методами,

которые лишены рассмотренных недостатков, но имеющих, безусловно, из-за формализации свои ограничения.

Решение данной задачи потребует разработки способа разложения интегрального спектра на составляющие, который мог бы быть универсальным, и в принципе, применимым по своему подходу к решению аналогичных задач, выходящих за рамки спектрального анализа белков. Это может быть достигнуто созданием алгоритма и его математической реализации, опираясь, в том числе, и на существующие методы обработки сложных сигналов, известных своим применением в различных областях физики [157].

В связи с вышеизложенным, в настоящей работе нами проанализированы спектральные свойства простых белков — трипсина и альбумина, сложных белков — каталазы, гемоглобина и его производных по апобелковой и гемовой части макромолекулы: оксигемоглобина А и F, карбокси-, дезокси- и метгемоглобина А.

Цель исследования. Целью настоящей работы явилось разрешение, идентификация и анализ перекрывающихся полос поглощения хромофоров некоторых простых и сложных белков в диапазоне длин волн 240–320 нм.

Задачи работы предусматривали:

1. Подбор оптимальных режимов работы спектрофотометра при регистрации данных и рациональных способов комбинированной цифровой фильтрации интегральных, разностных и дифференцированных спектров поглощения белков;

2. Разрешение полос поглощения в спектрах белков с помощью второй производной;

3. Соотнесение полос поглощения в спектрах белков к полосам поглощения в спектрах аддитивных моделей;

4. Идентификацию полос поглощения в спектрах белков путем их сопоставления в системе «аддитивная модель апобелка–свободные аминокислоты»;

5. Разработку способа разложения УФ-спектров поглощения

хромопротеидов на составляющие светопоглощения апобелковой и небелковой компонент;

6. Разложение УФ-спектров светопоглощения производных гемоглобина на составляющие поглощения апобелка и простетических групп;

7. Сравнительный анализ УФ-спектров поглощения апобелковой составляющей окси-, карбокси-, дезокси- и метгемоглобина;

8. Исследование УФ-спектров поглощения простетических групп окси-, карбокси-, дезокси- и метгемоглобина.

Научная новизна. Работа представляет собой систематическое исследование спектров поглощения некоторых простых и сложных белков в диапазоне длин волн 240–320 нм с привлечением математических методов обработки сложных сигналов.

Показано, что вторые производные спектров светопоглощения некоторых простых и сложных белков (трипсина, альбумина, каталазы, гемоглобина и его производных: оксигемоглобина А и F, карбокси-, дезокси- и метгемоглобина А) содержат до 20 пиков различной степени разрешения и интенсивности, ассоциируемых с полосами поглощения, и которые, в свою очередь, были классифицированы по принадлежности к тем или иным типам аминокислотных остатков и суперпозиции светопоглощения последних.

Установлено, что моделирование спектров поглощения гемоглобина путем рекомбинации белковой и небелковой составляющих оксиформ А и F показало их высокую аддитивность по отношению к результирующему спектру макромолекулы гембелка.

Выявлено, что изменения в моделях спектров поглощения апобелка производных гемоглобина коррелируют с изменениями положения атома железа относительно порфиринового кольца простетических групп.

Спектрофотометрическим методом показано, что лигандирование гемового железа приводит к изменению спектров поглощения тирозиновых аминокислотных остатков в молекуле гембелка.

В модельных спектрах светопоглощения гемовой компоненты белка

обнаружены полосы поглощения, перекрывающиеся и маскирующиеся полосами поглощения апобелковой части макромолекулы.

Рассчитана относительная интегральная доля поглощения небелковой компоненты гемоглобина и его производных в диапазоне длин волн 240–320 нм.

На примере гемоглобина предложен и обоснован способ разложения спектров светопоглощения хромопротеидов на составляющие поглощения белковой и небелковой компонент.

Предложена схема расположения пиков полос поглощения электронных переходов, отвечающих за спектральные свойства белковых макромолекул.

Практическая значимость. Полученные результаты систематизируют, расширяют и углубляют современные представления о спектральных свойствах простых и сложных белков на примере трипсина, альбумина, гемопротеидов.

Результаты работы представляют интерес как для биофизиков, биохимиков, для которых спектральный анализ является одним из основных аналитических методов изучения белков, так и для фотобиологов, исследующих влияние УФ-света на эти биополимеры.

Используемые подходы и способы анализа спектров поглощения белков, также могут быть полезны и для специалистов, сталкивающихся с практическими вопросами разрешения сложных сигналов, регистрируемых от многокомпонентных систем в случае плохого разделения их составляющих хроматографическими, электрофоретическими или другими физико-химическими методами исследования.

Результаты исследований и приемы анализа спектров поглощения белков, представленные в диссертации, нашли свое отражение в учебных программах дисциплин спецкурсов, предлагаемых студентам кафедры биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы представлены, доложены и обсуждены на 9-м съезде Белорусского объединения фотобиологов и биофизиков «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем» (Минск, 2010); на IV и V съездах биофизиков



России (Нижний Новгород, 2012; Ростов-на-Дону, 2015); научно-практической конференции и зонального рабочего совещания учреждений службы крови 5-й зоны РФ (Воронеж, 2012); международной научно-методической конференции «Современные проблемы биофизики сложных систем. Информационно-образовательные процессы» (Воронеж, 2013); а также на научных отчетных сессиях преподавателей и сотрудников Воронежского госуниверситета (Воронеж, 2008, 2014, 2015).

Публикации. По теме диссертационной работы опубликовано 6 статей, в том числе 3 статьи в журналах из «Перечня ВАК РФ».

На защиту выносятся следующие положения:

1. Разработан и обоснован способ разложения спектров поглощения сложных белков (оксигемоглобина А и F, карбокси-, дезокси- и метгемоглобина А) до уровня: «апобелок–простетические группы»;

2. Вторые производные спектров поглощения некоторых простых и сложных белков (трипсина, альбумина, каталазы, гемоглобина и его производных) содержат до 20 пиков полос поглощения, классифицируемых по принадлежности к тем или иным типам аминокислотных остатков и суперпозиции светопоглощения последних;

3. В недифференцированных модельных спектрах поглощения простетических групп окси- и карбоксигемоглобина регистрируется полоса, обозначенная нами как « $-\alpha$ »;

4. На второй производной модельных спектров поглощения производных гемоглобина выявляются две полосы, обозначенных как « $-\alpha$ » и « $-\beta$ »;

5. Изменения в моделях спектров поглощения апобелка окси-, карбокси-, дезокси- и метгемоглобина коррелируют с изменениями положения атома железа относительно порфиринового кольца простетических групп;

6. Предложена схема расположения пиков полос поглощения электронных переходов, отвечающих за спектральные свойства белковых макромолекул.

Структура и объем работы. Диссертационная работа включает 217 страниц машинописного текста, 12 таблиц, 62 рисунка, состоит из «Введения», 5 глав,

«Заключения» и «Выводов». Список литературы содержит 172 источника, из них 69 отечественных и 103 зарубежных.

## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Глава 1. СТРУКТУРА И НЕКОТОРЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ  
СВОЙСТВА БЕЛКОВЫХ МАКРОМОЛЕКУЛ

Исследование строения химических соединений (в т.ч., биополимеров) претерпело длительную эволюцию. Начиная от классических методов нахождения брутто-формул и заканчивая, к настоящему времени, использованием новейших методик секвенирования биополимеров (*next-generation sequencing, NGS technology*), определением их пространственной структуры с помощью дифракции рентгеновских лучей и тепловых нейтронов (*X-ray and neutron scattering techniques*) или посредством спектроскопии ядерного магнитного резонанса (*NMR spectroscopy of polymers*) [72, 82, 95, 102, 125, 161].

Применение методов молекулярной динамики (*MD*), квантово-химических методов (*QM*), а также их гибридных решений, в совокупности с физико-химическими методами анализа, создает эффективный комплекс инструментов по исследованию пространственной структуры белков и их супрамолекулярных ансамблей [156].

Среди множества физико-химических методов исследования структуры веществ, спектральный анализ представляется наиболее востребованным в силу ряда обстоятельств, таких как универсальность применения, чувствительность, достаточная для решения большинства задач, способность проводить измерения в многокомпонентных системах и мн. др. [85, 132, 143].

Однако главным достоинством данного метода является быстрота проведения анализа в совокупности с неразрушающим воздействием на исследуемый образец [130]. Это позволяет реализовать ряд методик, связанных с исследованием структурно-функциональных свойств биомолекул, таких как, например, технологии лазерной, фурье- и корреляционной спектроскопии (*ultrafast laser, fourier transform and photon correlation spectroscopy*) в широком

временном интервале, начиная от изучения квазистатических состояний системы и заканчивая сверхбыстрыми процессами фемто- и аттосекундного диапазонов [119, 150].

Таким образом, сочетая данные спектроскопии белков с результатами экспериментов, полученных методами структурного анализа, аналитического и численного моделирования, можно достичь наилучшего эффекта в исследовании биомакромолекул при действии на них различных физико-химических факторов.

Как известно, существование определенной трехмерной структуры белков представляется множеством конформационных состояний макромолекулы, часть из которых являются нативными, функционально значимыми, а сами состояния могут быть охарактеризованы рядом потенциалов (например, термодинамическим) [123].

Рассматривая биомакромолекулу как систему, обладающую по определению таким свойством как эмерджентность, необходимо реализовывать интегративный подход к ее изучению. Однако это вступает в противоречие с возможностями инструментальных методов анализа и формализацией представлений об объекте, его текущем состоянии или проходящем процессе. Тем не менее, исследование составляющих частей такой системы остается важнейшим путем изучения целого [6].

Принимая во внимание вышесказанное, в этой главе нами рассмотрены вопросы, касающиеся известных литературных данных о структуре и некоторых физико-химических свойствах белков, так или иначе связанными со спектральными методами анализа биомакромолекул. При этом использование в обзоре литературы различных физических моделей в качестве аналогий или гомологий, а также определенной формализации, является общепринятым подходом.

## 1.1 Структура, некоторые физико-химические и спектральные свойства простых белков и апобелковой составляющей сложных белков

К настоящему времени собран обширный материал по структуре белковых макромолекул [71, 75, 84, 134]. Различают четыре уровня организации белка: первичная структура, в основе которой лежит последовательность аминокислотных остатков, связанных между собой пептидной (амидной) связью [168]; вторичная структура, стабилизированная с помощью водородных связей функциональных групп пептидного остова [94, 96, 142, 155]; третичная структура, сконфигурированная посредством ковалентных, ионных, а также гидрофильно/гидрофобных взаимодействий [97, 121, 147]; и четвертичная структура, формируемая, главным образом, за счет гидрофобных взаимодействий, а также водородных и ионных связей [104, 108, 118].

Кроме этого, для белков различают также структурные домены (*structural domain*), структурные мотивы (паттерны) или последовательности (*patterns, structural and sequence motif*), супервторичные структуры (*supersecondary structure*), белковые свертки (*protein fold*) и супердомены (*superdomain*) [73, 103, 105, 109, 116, 117, 145, 162].

Накопление информации о структуре белков привело к появлению таких интерактивных баз данных как: Structural Classification of Proteins database (*SCOP* и *SCOP2*), посвященной структурной классификации белков [151, 158]; Uniprot (консорциум *EBI*, *SIB* и *PIR*), содержащий, главным образом, базу аминокислотных последовательностей [165]; Protein Data Bank (*PDB*), являющийся банком данных 3-D структур белков и нуклеиновых кислот [144].

Исследованию различных физико-химических и функциональных свойств белков и их комплексов как в нативном состоянии, так и при воздействии на них различных физико-химических факторов, посвящено достаточно большое количество работ [4, 28, 64, 78, 83]. В настоящее время, существенная часть исследований направлена на решение таких важнейших проблем, как предсказание структуры (в т.ч., путем гомологического моделирования), фолдинг и молекулярный дизайн белка [74, 80, 110, 120]. Однако сколько-нибудь полное описание результатов этих работ потребует другого формата представления.

Как известно, регистрация спектров поглощения молекул позволяет экспериментально находить энергию переходов [44, 69], происхождение которых может быть установлено путем соответствующего анализа электронной структуры молекулярной квантовой системы [16, 40].

Фундаментальной основой этого анализа является теория групп (точечных групп симметрии) [79]. Ее применение в квантовой механике основано на свойстве инвариантности уравнения Шредингера относительно группы симметрии [124].

Такой анализ может быть выполнен как на основе свойств симметрии этих молекул, так и на основе симметрии волновых функций электронов. Это позволяет, не решая стационарное уравнение Шредингера, сделать определенные выводы о свойствах волновых функций и энергетических уровнях системы (число, вырождение, тип симметрии, узловые характеристики заполненных молекулярных орбиталей и др.) [39].

Другой подход к анализу электронной структуры заключается в приближенном решении уравнения Шредингера численными методами. Основой этих методов является теория самосогласованного поля (*MFT*), теория функционала плотности (*DFT*), а также их дальнейшее развитие [33, 47, 101].

Распределение электронной плотности в молекуле, поглощение и излучение ею квантов света может быть формализовано в рамках теории молекулярных орбиталей (*MO*) [66, 141]. Теория базируется на общепринятом приближении, представляющем молекулярную орбиталь как линейную комбинацию атомных орбиталей (*MO LCAO*) [128]. Заполнение и конфигурация этих орбиталей (равно как и атомных) подчиняется принципу минимальной энергии (принцип *Aufbau*) по правилу Маделунга-Клечковского, принципу Паули и правилу Хунда [37, 42].

В соответствии с этим, поглощение квантов света в УФ- и видимой областях спектра будет определяться типом перехода, классифицированному по характеру изменений в электронной конфигурации молекул:  $\sigma \rightarrow \sigma^*$ ,  $\pi \rightarrow \pi^*$ ,  $n \rightarrow \sigma^*$  и  $n \rightarrow \pi^*$  [7, 66], а сами энергетические уровни молекулы могут быть представлены

в виде термов [44]. Существуют и другие разновидности переходов, обязанные своим происхождением, например, возникновением различных внутри- и межмолекулярных комплексов с переносом заряда [46].

Таким образом, данные построения являются теоретической основой абсорбционной молекулярной спектроскопии электронных переходов.

Вместе с тем, представляется удобным использовать классификацию поглощения света белком, построенную на принадлежности его хромофоров к соответствующему типу: пептидные группы (тип I), боковые группы аминокислотных остатков (тип II) и простетические группы (тип III) [28].

Для соотнесения результатов квантово-химического моделирования поглощения пептидной (карбамидной) группы с данными, полученными по физической модели, часто используются простые соединения типа формальдегида, ацетона или другие производные, содержащие карбонильную группу [89].

Однако такое соотнесение, в этом и ряде других случаев, не всегда обеспечивает надежную верификацию квантово-химических расчетов, что обусловлено трудностями при подборе соответствующих физических моделей (ограничения по растворимости, образование ассоциатов, комплексов, протекание химических реакций и т.д.), или напротив, имеющаяся физическая система требует усложнения квантово-химических вычислений [28]. Это, в свою очередь, приводит к использованию более грубых приближений для теоретической модели [140], что, однако, качественно не затрудняет интерпретацию положения и интенсивности регистрируемых полос поглощения.

При исследовании спектров поглощения пептидной группы используют и более сложные соединения типа формамида или N-метилацетамида, содержащие не только карбонильную, но и соответственно, аминогруппу [28, 89, 93, 131].

Применение физических моделей молекулы белка, таких как, например, полипептидные цепочки L-лизина с меняющейся степенью полимеризации, дает возможность последовательно проследить изменения спектральных свойств пептидной группы при формировании различных типов укладки вторичной

структуры полимера [146].

В результате исследований пептидной группы было установлено ее светопоглощение, по разным данным, в диапазоне длин волн от 150 до 230 нм.

Соотнесение наблюдаемых полос поглощения к теоретической модели показало, что интенсивный пик поглощения с длиной волны 190–195 нм принадлежит  $\pi \rightarrow \pi^*$  переходу, точное положение и интенсивность которого зависит от характера укладки полипептидной цепи. Точка перегиба (*inflection point*) или плечо в спектре молекулы при 200–210 нм соответствует слабоинтенсивному переходу  $n \rightarrow \pi^*$ , а полоса в районе 175 нм предположительно относится к переходу типа:  $n \rightarrow \sigma^*$  [28].

По другим данным [23, 122], для пептидной группы наблюдаются следующие полосы поглощения и соответствующие им переходы: интенсивный пик при 190 нм ( $\pi_1 \rightarrow \pi^*$ ), менее интенсивный — при 165 нм ( $\pi_2 \rightarrow \pi^*$ ), слабовыраженный — при 220 нм ( $n \rightarrow \pi^*$ ), смещающийся при увеличении полярности растворителя в коротковолновую область, а также пик при 150 нм ( $n \rightarrow \sigma^*$ ).

Также было установлено, что изменение величины рН на спектральные свойства пептидной группы практически не влияет [28].

Таким образом, используя простые в структурном отношении соединения, имитирующие в той или иной части и степени пептидные группы, с помощью методов квантовой химии, в целом, удалось интерпретировать полосы поглощения хромофоров I типа в составе макромолекулы белка путем соотнесения их физических и математических моделей к нативной структуре биополимера [87, 159].

В отличие от пептидной группы, радикалы боковых групп аминокислот поглощают свет в более широком интервале длин волн, вплоть до 320 нм (триптофан, а также тирозин в форме фенолята). Различия в химической структуре хромофоров (сопряженных с ауксохромами) расширяют диапазон варьирования энергии их переходов (по крайней мере, увеличивают эту вероятность).



Для большинства белков светопоглощение хромофоров боковых групп аминокислот в интервале длин волн от 190 до 200 нм вносит существенный вклад в суммарное поглощение биополимера [23].

Однако полосы поглощения хромофоров некоторых аминокислот уступают по интенсивности наиболее выраженным полосам поглощения пептидных связей, причем число таких хромофоров меньше, чем этих связей [28].

Вследствие перекрытия областей поглощения хромофоров I и II типа в диапазоне длин волн от 150 до 230 нм изучение спектральных свойств каждого из них в составе макромолекулы белка сильно затруднено. Кроме этого, исследования при длинах волн от 190 нм и менее (вакуумный ультрафиолет) сопряжены с рядом методических трудностей [25].

Ввиду того, что остатки, в частности, аспарагиновой и глутаминовой аминокислот, а также их амидов, содержат аналогичные пептидным группам хромофоры, с сопоставимой энергией переходов, то их исследование, во многом, может быть проведено с использованием физических моделей и подходов, предложенных ранее для пептидных групп.

Но, если эта аналогия уместна для свободных аминокислот, то, как уже отмечалось, для сформированной полипептидной цепи следует принимать во внимание тот факт, что создаваемая посредством водородных связей вторичная структура обладает кооперативностью. Это определяет спектральные свойства макромолекулы в зависимости от типа укладки цепи, протяженности и доли этой укладки, а также физико-химических параметров среды [146].

Структурированность полипептидной цепи приводит к возникновению спектральных эффектов, характерных для молекулярных кристаллов. Вследствие резонансного взаимодействия возникает расщепление возбужденного электронного уровня (давыдовское расщепление) и гипохромизм полос поглощения пептидных групп (в частности, гипохромизм и гиперхромизм длинноволновой полосы) [18].

Наличие кооперативной структуры также приводит к «упорядоченности» в поляризации проходящего света боковыми группами аминокислот, имеющих

хиральные центры (т.е. всех, за исключением глицина). Это позволяет методами дисперсии оптического вращения (*ORD*) и кругового дихроизма (*CD*) количественно оценить степень и характер упорядоченности такой структуры, а также по возникающим аномалиям отслеживать конформационные изменения в макромолекуле белка [76, 100].

Другими словами, хиральность радикалов боковых групп аминокислот формирует сигнал, который модулируется степенью и характером регулярности их пространственного расположения, и который несет в себе параметры вторичной структуры белка (зависящей, в свою очередь, в т.ч., от преобладающего типа аминокислотных остатков).

Таким образом, рассмотренные спектральные эффекты, обусловленные регулярностью вторичной структуры белков, существенно усложняют анализ перекрывающихся полос поглощения хромофоров I и II типа.

Вместе с тем, в интервале длин волн от 230 до 320 нм, где практически не поглощают пептидные связи и некоторые хромофоры боковых групп аминокислот, возможно исследовать взаимозависимость структурных и спектральных свойств белка посредством анализа спектров поглощения радикалов фенилаланина, тирозина, триптофана, гистидина, цистеина, метионина и димера цистеина — цистина.

В УФ-диапазоне длин волн в той или иной степени изучены спектральные свойства ароматических, гетероциклических и серосодержащих аминокислот, а также их некоторых производных [23]. В качестве исходной физической модели к фенилаланину, тирозину и триптофану представляется удобным использовать такие соединения как бензол и индол.

Молекула бензола относится к точечной группе симметрии  $D_{6h}$  (в системе обозначений Шёнфлиса, широко используемой в спектроскопии [92]). Ее основной переход (т.е. переход между наиболее низкими колебательными уровнями основного и возбужденного состояний) является запрещенным по симметрии. Другими словами, переход становится возможным только в том случае, когда в молекуле существует хотя бы один колебательный квант,

нарушающий эту симметрию [23].

Для метил- и этилбензола сопряжение групп  $\text{CH}_3$  ( $\text{C}_2\text{H}_5$ ) с  $\pi$ -электронной системой бензольного кольца приводит к частичному нарушению этой симметрии с изменением ее типа с  $D_{6h}$  на  $C_{2v}$ , при этом снимается запрет на электронный переход, вследствие чего становится возможным его спектральное проявление [23].

Наличие алкильного радикала (Alk) в монозамещенном бензольном кольце вызывает сдвиг полос поглощения  $\pi$ -электронной системы в длинноволновую область спектра (до +6 нм) и приводит к возрастанию их интенсивности. Такое смещение электронной плотности вдоль оси  $\sigma$ -связи между  $\text{C}_6\text{H}_5$  и  $\text{CH}_3$  ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ) группами осуществляется за счет индуктивного и мезомерного (резонансного) механизмов [23].

Так, для бензола один из пиков поглощения соответствует длине волны около 255 нм (запрещенный по симметрии переход  ${}^1A_{1g} \rightarrow {}^1B_{2u}$ ). В то же время для метилбензола этот переход приходится на длину волны приблизительно 261 нм. Для галогенов (Hal), проявляющих, как в основном, индуктивный, так и мезомерный эффект, волновой сдвиг по отношению к спектру бензола увеличивается до +9 нм [32].

В экспериментах, высокая летучесть паров бензола (320 мг/л при 20 °С) позволяет избежать влияния конденсированного состояния (а также растворителя) на его спектральные свойства. Это дает возможность получать спектры высокого разрешения с минимальным межмолекулярным взаимодействием.

Сопоставляя спектры поглощения водного раствора фенилаланина и парообразного бензола, можно соотнести положение их пиков путем смещения спектра светопоглощения последнего в длинноволновую область.

Поглощение фенилаланина на средневолновом участке УФ-спектра (*MUV*) представляет собой серию пиков в виде зубцов, где основной экстремум приходится на длину волны около 258 нм [41], остальные — с разной степенью разрешения, в областях: 241, 247, 251 и 264 нм [41]. Также обнаруживается плохо разрешенный пик полосы в области 267 нм, отсутствующий в спектре молекулы

бензола, т.к. соответствует запрещенному по симметрии переходу [32]. В дальней области спектра поглощения (*FUV*) для этой аминокислоты характерна высокоинтенсивная полоса при 190 нм [99].

Наблюдаемое длинноволновое смещение спектра поглощения водного раствора фенилаланина относительно бензола будет определяться, в том числе, и взаимодействием молекул данной аминокислоты с молекулами полярного растворителя. Подобного рода «красное» смещение в таком растворителе характерно для запрещенных по симметрии  $\pi \rightarrow \pi^*$  переходов ароматического радикала. Замена неполярных растворителей на полярные приводит к уменьшению разности энергий переходов  $\pi \rightarrow \pi^*$ , что и вызывает батохромный сдвиг (положительный сольватохромный эффект) [28].

Фенилаланин обладает очень низкой флуоресценцией с пиком при 282 нм ( $\approx 0,04$ ), которая в белках практически не проявляется, по всей вероятности, из-за миграции энергии возбужденного состояния на тирозин [34].

Введение в молекулу бензола заместителей, несущих кратные связи, сопрягаемые с  $\pi$ -электронной системой кольца, или заместителей, имеющих неподеленные электронные пары (*n*-электроны), перекрывающиеся своими орбиталями с данной  $\pi$ -электронной системой, вызывает, соответственно, снижение локальной симметрии кольца (до  $C_{2v}$ ), что приводит к существенному сдвигу интенсивных полос поглощения в «красную» область спектра (по аналогии с Alk).

Тогда присутствие в бензольном кольце гидроксильного заместителя (ОН), имеющего *n*-электроны, вызывает сдвиг пиков в спектре поглощения приблизительно на +15 нм и увеличивает их интенсивность. Как уже отмечалось, для бензола один из максимумов поглощения соответствует длине волны около 255 нм. Замена алкильного радикала на гидроксильный в этом случае приводит к смещению данного пика примерно с 261 нм до 270 нм [32].

Таким образом, смещение частот в спектрах поглощения фенола, 4-метилфенола, N-ацетилтирозиламида и тирозина относительно бензола связано со значительным возмущением в  $\pi$ -электронной системе бензольного кольца,

вызванного ОН заместителем в результате возникновения индуктивного и резонансного эффектов, причем выраженных в большей степени, чем для Alk [23].

Наблюдаемое снижение степени разрешения пиков в спектре поглощения тирозина хорошо согласуется с правилом: чем больше батохромный сдвиг полос поглощения бензольного кольца, тем менее выражена в спектре его тонкая структура.

Близость места протонирования гидроксильной группы к  $\pi$ -электронной системе бензольного кольца тирозина приводит к весьма значительным девиациям волнового сдвига и изменениям в интенсивности поглощения, что может быть использовано для титрования и оценки степени гидрофобного окружения этих аминокислотных остатков [28].

При нейтральных и кислых значениях рН спектр поглощения тирозина характеризуется интенсивной полосой при 192 нм (*FUV*), выраженными пиками в области 222 и 275 нм, плечом с длиной волны примерно 282 нм и плохо разрешенным пиком при 267 нм (*MUV*). Его фенолят-анион имеет максимумы поглощения в области 240 и 293 нм [99].

В водных растворах тирозин флуоресцирует при длине волны 303 нм ( $\approx 0,2$ ). Однако в белках интенсивность его флуоресценции минимальна вследствие тушения водородной связью между фенильным гидроксильным и ближайшей ионизированной карбоксильной группой [34].

Индол, 3-метилиндол, триптофан представляют собой гетероциклические ароматические соединения, спектры поглощения которых обусловлены переходами в системе делокализованных  $\pi$ -электронов.

Присутствие гетероатома (азота) снимает квантово-механический запрет по симметрии, разрешая все электронно-колебательные переходы в молекуле индола и его производных [35].

Для этих соединений характерно наличие двух переходов  $A \rightarrow {}^1L_a$  и  $A \rightarrow {}^1L_b$  (верхний индекс — мультиплетность, нижний — направление ориентации). Осцилляторы этих переходов лежат в плоскости индольного кольца и

ориентированы друг к другу под углом в  $66^\circ$  [34].

У триптофана и его производных наблюдается длинноволновое смещение спектра светопоглощения относительно индола. Результатом такого смещения является полное перекрытие полос поглощения, которые соответствуют переходам  ${}^1L_a$  и  ${}^1L_b$  [23].

При этом, сами переходы ( ${}^1L_a$  и  ${}^1L_b$ ) дают разные спектральные сдвиги при изменении полярных свойств и зарядов в окружении хромофорной группы. В большей степени претерпевает смещение полоса перехода  ${}^1L_a$ , т.к. он сильнее подвержен влиянию внутри- и межмолекулярных взаимодействий, чем  ${}^1L_b$  [23].

Спектр поглощения триптофана очень слабо зависит от величины концентрации ионов водорода. Ионизация иминогруппы в щелочной среде с высоким рН (до 14) приводит к появлению полосы при 310–315 нм [23].

В нейтральной и кислой среде триптофан поглощает при следующих длинах волн: полоса высокой интенсивности при 195 нм (*FUV*), пик при 218 нм (*MUV*). Характерные полосы поглощения для  ${}^1L_a$  и  ${}^1L_b$  переходов: 279–280 нм — наиболее интенсивная светопоглощающая компонента, 288 нм — наиболее выраженный пик поглощения и 271–273 нм — плечо в спектре [41].

В водных растворах триптофан обладает выраженной флуоресценцией с максимумом при 350 нм ( $\approx 0,17$ ). В белковой матрице боковые группы этой аминокислоты флуоресцируют с пиком в области 328–350 нм, что зависит от характера микроокружения ее хромофоров. Квантовый выход флуоресценции при этом варьирует в очень широких пределах: от 0,02 до 0,4 [34].

При низких температурах триптофан и его боковые группы в составе белка фосфоресцируют при длинах волн в окрестностях 410, 440 и 480 нм с квантовым выходом  $\approx 0,1$  [34].

Для гистидина, имеющего в своем составе хромофорную группу имидазола, в *MUV* диапазоне длин волн обнаруживается интенсивная полоса поглощения в районе 212 нм и слабовыраженная, размытая — в окрестностях 280 нм. Применение фемтосекундного лазера позволяет получить транзитный спектр данной аминокислоты, где полоса в области 280 нм выявляется более

уверенно [129].

Изменение ионного состояния хромофора гистидина мало сказывается на ее спектральных свойствах [23].

По некоторым данным, эта аминокислота обладает слабой сенсбилизированной флуоресценцией в области 360 нм [49].

Поглощение серосодержащих аминокислот цистеина, метионина и цистина обусловлено  $n \rightarrow \sigma^*$  переходом [23] (по другим данным [34],  $\sigma \rightarrow \sigma^*$  переходом).

С уменьшением длины волны падающего УФ-света для данных аминокислот наблюдается монотонный рост их светопоглощения. Для цистина в окрестностях 250 нм отмечается наличие размытого пика или точки перегиба полосы поглощения [23], однако, это наблюдается не во всех случаях [34]. Аналогичная ситуация отмечается и для цистеина [23].

В кислой среде цистеин поглощает только в *FUV* области, с максимумом при 190 нм, но по мере увеличения рН полоса светопоглощения сдвигается в длинноволновую часть спектра и интенсивность ее нарастает [23].

Из серосодержащих аминокислот наибольшим поглощением обладает цистин. Однако он к флуоресценции и фосфоресценции не способен [34].

Отношение интенсивностей поглощения одних боковых групп аминокислот к другим сильно зависит от длины волны и варьирует в широких пределах. Поэтому такое сопоставление предпочтительнее проводить через соотношение интегралов спектров светопоглощения в соответствующем диапазоне длин волн.

Так, например, в области 190–200 нм полоса поглощения тирозина (192 нм) превосходит наиболее интенсивную (на этом участке спектра) полосу триптофана (195 нм). Отношение площадей спектров поглощения для данных аминокислот — также в пользу тирозина. Но в интервале длин волн от 200 до 230 нм и более, преимущество в поглощении как по интенсивностям пиков, так и по площади светопоглощения — на стороне триптофана. При этом интенсивность пика поглощения в определенном диапазоне длин волн не связана напрямую с площадью светопоглощения.

Исследование полос поглощения аминокислот требует применения различных экспериментальных подходов. Увеличение температуры образца приводит к уширению этих полос (что, в принципе, также несет в себе информацию). Однако это позволяет перевести исследуемое соединение из конденсированного состояния в парообразное (если это возможно), что дает выигрыш в спектральном разрешении, т.к. межмолекулярные взаимодействия при этом ослабевают.

Другой подход ориентирован на «вымораживание» колебательных мод низкой температурой и уменьшения этих взаимодействий, что также повышает разрешение в спектрах поглощения. Это достигается применением различных методик и технологий, начиная от стеклющихся растворителей и матриц Шпольского и заканчивая матричной изоляцией молекул в твердых инертных газах и низкотемпературной селективной лазерной спектроскопией [58].

Кроме этого, используются и традиционные подходы, основанные на применении растворителей с различными физико-химическими свойствами: полярностью, ионной силой, концентрацией ионов водорода, температурой и др. (спектроскопия температурно- и сольвентно-пертурбационными возмущениями) [23, 58].

Повышение информативности спектров поглощения также может быть достигнуто такими конформационно-чувствительными методами, как дифференциальная и производная спектрофотометрия [23, 34].

Таким образом, исследование аминокислот, их хромофорных групп, является одним из наиболее интересных и значимых направлений, фундаментом при изучении белков на субмолекулярном уровне.

Однако и здесь остается невыясненным ряд вопросов, в частности, связанных с поиском и соотношением полос поглощения хромофоров к электронным переходам молекулы, межмолекулярным взаимодействием в изотропных и анизотропных средах, формализацией этих процессов и переходных состояний. Поэтому исследования в данной области еще далеки от завершения.

Спектры поглощения простых белков (а также апобелковой компоненты



макромолекулы) характеризуются в УФ-диапазоне длин волн двумя полосами светопоглощения. Первая полоса находится в *FUV* диапазоне, с максимумом при 190–195 нм. Ее происхождение определяется суперпозицией поглощения хромофоров I и II типа. Вторая полоса имеет максимум в районе 280 нм. Эта полоса формируется хромофорами II типа [28].

В отличие от флуоресценции, светопоглощение белка, в первом приближении, может быть представлено аддитивной моделью, слагаемые которой являются хромофорами пептидных групп и аминокислот [41]. В области, где поглощают только лишь хромофоры II типа, эта аддитивность реализуется лучше всего.

Из аминокислот, которые поглощают в диапазоне длин волн 240–320 нм, триптофан имеет самое интенсивное светопоглощение, далее следует тирозин, фенилаланин и цистин [23]. Поглощение гистидина, цистеина и метионина минимально и становится доступным к определению, начиная приблизительно от 250 нм и менее [41].

Исходя из парциального вклада этих аминокислот в светопоглощение белка, следует отметить, что несмотря на обычно низкое содержание триптофана в белках, и достаточно высокое — тирозина, доля гетероциклической аминокислоты в спектрах поглощения, тем не менее, превалирует [28]. У таких глобулярных белков, как альбумин, гемоглобин или каталаза, парциальная доля поглощения фенилаланина достаточно велика, но не превышает таковую для отмеченных выше ароматических аминокислот. Высокое содержание цистина может вносить вполне определенный вклад в спектр поглощения макромолекулы, но только в области поглощения от 250 нм и менее. Для гистидина, цистеина и метионина, даже их достаточно высокое содержание в биополимере сколь угодно значительно форму или интенсивность спектра поглощения не меняют [41].

Следует отметить, что в диапазоне длин волн 240–320 нм практически все спектры поглощения аминокислотных остатков перекрываются между собой. Однако для спектров светопоглощения тирозина и триптофана характерна интерференция полос поглощения, которая приводит к тому, что изменение

соотношения аминокислот в макромолекуле или их волновой сдвиг друг относительно друга меняют результирующую картину положения пиков в спектре белка.

Ранее было показано, что в УФ-спектрах светопоглощения некоторых белков крови положение полос поглощения смещено в длинноволновую область относительно таковых для свободных аминокислот: фенилаланина, тирозина и триптофана [41]. Установлено, что, в частности, нативный спектр поглощения молекулы альбумина отстоит от его аддитивной модели примерно на 3 нм в сторону бóльших длин волн [28].

Влияние микроокружения хромофоров аминокислот в составе белковой матрицы и моделирующих такое окружение системах изучено достаточно подробно [14]. Выявлено, что изменение показателя преломления среды приводит к батохромному сдвигу полос поглощения в спектрах светопоглощения аминокислот [28]. Исследована способность боковых групп аминокислотных остатков тирозина и триптофана формировать водородные связи и влияние этих связей на спектральные свойства хромофоров [23]. Изучено влияние заряженных групп хромофоров аминокислот, ионизированных карбоксильной и аминогрупп при образовании пептидной связи [23, 28].

Таким образом, на данный момент в литературе представлены обширные сведения по спектральным свойствам белков, аминокислот, несущих хромофорные группы, химических производных этих аминокислот в различных модельных средах и матрицах, а также их квантово-химических моделях. Исследование спектральных свойств молекул представлено широким набором методик и техник измерения образцов [132].

Однако, в заключении к этой части главы, следует отметить некоторую универсальность проблемы, характерную для больших массивов разнородных данных. Отсутствие, по определению, унификации протоколов эксперимента и обработки результатов исследований (например, для гомологичных форм одного и того же белка) при сопоставлении данных из различных литературных источников не всегда позволяет корректно проводить такие сравнения. То есть,

для одного и того же объекта исследования возникает такое варьирование показателя, которое превышает разность сигналов, наблюдаемых при изменении параметров этого объекта, зарегистрированных в одинаковых условиях.

По содержательной части необходимо отметить, что определенная консервативность структуры белков в нативном состоянии дает возможность оценить норму вариабельности положения и интенсивности перекрывающихся полос поглощения хромофоров макромолекулы, а также их идентифицировать и классифицировать. Это мы и попытались реализовать.

## 1.2 Структура, электронные, магнитные и спектральные свойства простетической группы гемопротеидов

Гемопротеиды относят к сложным белкам, простетическая группа которых представляет собой гем — комплекс протопорфирина IX с железом [139]. Известно несколько химических модификаций гема, различающихся между собой заместителями порфиринового кольца: А, В, С, О, D/D<sub>1</sub>, I, m, s, гем-P460 и сирогем [70, 91, 106, 133, 160, 164, 169]. Самым распространенным из них является гем В, входящий в состав гемоглобина, миоглобина, каталазы и других белков [91].

Соединение гема с апобелком в молекуле гемоглобина осуществляется при помощи 60 ван-дер-ваальсовых связей в гидрофобной полости субъединицы. Это предотвращает комплексообразователь от окисления [137]. Кроме этого, с белковой компонентой через полярные связи контактируют два остатка пропионовой кислоты протопорфирина IX, которые играют важную роль в поддержании нативной структуры гембелка [135].

Атом железа, находящийся в двух- ( $Fe^{2+}$ ) или трехвалентном ( $Fe^{3+}$ ) состоянии, координирован с четырьмя атомами азота пиррольных групп порфиринового кольца [55]. Пятая координационная связь, перпендикулярная к плоскости этого кольца, соединена с имидазолом гистидина, а шестая — занята с

лигандом или свободна [166].

Связь железа с проксимальным гистидином не влияет на стабильность в поддержании структуры нативной молекулы биополимера, но является важной с точки зрения связывания гемового лиганда и последующей реконфигурации апобелковой части макромолекулы [136].

Интерпретация электронных, магнитных и спектральных свойств гема базируется на квантово-механических представлениях, в основе которых лежит теория поля лигандов (*LFT*), являющаяся развитием теории кристаллического поля (*CFT*) с дополнениями *MO LCAO* [149].

На пяти *3d* орбиталях  $\text{Fe}^{2+}$  находятся шесть из десяти возможных валентных электронов, два из которых спарены. У  $\text{Fe}^{3+}$  пять таких электронов, расположенных в соответствии с принципом максимальной мультиплетности, каждый на своей орбитали [18]. При отсутствии внешнего возмущения орбитали вырождены (т.е. имеют одинаковую энергию).

Шесть лигандов вокруг иона железа создают электростатическое поле с октаэдрической симметрией. Это поле, в отличие от идеализированного сферического, снимает вырождение *d*-орбиталей, следствием которого является их расщепление на две группы с разностью энергии  $\Delta_{\text{oct}}$ .

Первая группа ( $t_{2g}$ ) имеет орбитали с более низкой энергией:  $3d_{xy}$ ,  $3d_{xz}$  и  $3d_{yz}$ , а вторая ( $e_g$ ) — с более высокой:  $3d_{z^2}$  и  $3d_{x^2-y^2}$  [149]. Орбитали подуровня  $t_{2g}$  из-за их характерной пространственной ориентации способны принимать участие только в  $\pi$ -электронном взаимодействии. Орбитали  $e_g$  — в образовании  $\sigma$ -связей.

Порядок заполнения *3d*-орбиталей определяется разностью величин  $\Delta_{\text{oct}}$  и  $P$  (энергией межэлектронного отталкивания при спаривании электронов). Если  $\Delta_{\text{oct}}$  меньше, чем  $P$ , то энергетически выгодно заселение всех *3d*-орбиталей, что соответствует максимальной спиновой мультиплетности. Тогда высокоспиновое состояние  $\text{Fe}^{3+}$  характеризуется пятью неспаренными электронами, а  $\text{Fe}^{2+}$  — четырьмя.

Если  $\Delta_{\text{oct}}$  больше, чем  $P$ , то электроны распределяются по орбиталям подуровня  $t_{2g}$ , давая при этом низкоспиновое железо. Для  $\text{Fe}^{3+}$  в этом состоянии

есть только один неспаренный электрон, тогда как  $\text{Fe}^{2+}$  все орбитали подуровня  $t_{2g}$  заселены полностью.

Незаселенность орбиталей  $3d_{z^2}$  и  $3d_{x^2-y^2}$  для низкоспиновых состояний  $\text{Fe}^{3+}$  и  $\text{Fe}^{2+}$  приводит к уменьшению диаметра атома железа примерно с 2,06 Å (высокоспиновое состояние) до 1,91 Å (низкоспиновое состояние, т.е., приблизительно на -7 %). Однако этого достаточно, чтобы возникли стерические ограничения из-за несоответствия диаметров полости порфиринового макроцикла (2,02 Å) и атома комплексообразователя. Тогда атом высокоспинового  $\text{Fe}^{3+}$  будет находиться над плоскостью порфиринового кольца примерно на 0,3 Å, а  $\text{Fe}^{2+}$  — на 0,7 Å [48].

Величина  $\Delta_{\text{oct}}$  является важным показателем, характеризующим распределение  $d$ -электронов и зависит от ряда условий. Комплексообразователь, у которого более высокая степень окисления за счет разности зарядов, сильнее притягивает лиганд. Чем ближе лиганд к центральному атому, тем больше  $\Delta_{\text{oct}}$ .

Лиганды, вызывающие большее расщепление  $d$ -орбиталей, обозначаются лигандами сильного поля, против лигандов слабого поля. Соответственно, лиганды высокого поля приводят к возникновению низкоспиновых комплексов [20].

Энергия электронной конфигурации комплексообразователя относительно средней энергии орбиталей может быть охарактеризована через энергию стабилизации в поле лигандов ( $CFSE$ ) [11].

Магнитные свойства гема определяются результирующим спином вследствие взаимодействия комплексообразователя и лиганда [17]. Для окси- и карбоксигемоглобина суммарный спин нулевой (магнитный момент равен 0), т.е. эти производные — диамагнетики. У дезоксигемоглобина спин равен 2, т.к. четыре  $d$ -электрона неспарены, и молекула обладает парамагнитными свойствами. Для производных  $\text{Fe}^{3+}$  (различные метгемоглобины) спин отличен от нуля и принимает значения от 1/2 до 5/2 (парамагнетики). Регистрируемый магнитный момент для отмеченных парамагнетиков лежит в диапазоне от 2,2 до 5,9 Боровских магнетонов [18].

Порфирин, являясь структурным предшественником протопорфирина IX, обладает плоской  $\pi$ -электронной сопряженной системой, с разрешенными переходами в вырожденные состояния  $E_u$  (для симметрии  $D_{4h}$ ) и в состояния  $B_{2u}$  и  $B_{3u}$  (для симметрии  $D_{2h}$ ) [98].

Протяженная  $\pi$ -электронная система порфирина приводит к смещению полос поглощения из УФ- области спектра в видимую. Спектральные свойства порфиринов в видимом диапазоне длин волн характеризуются четырьмя слабыми, сравнительно узкими полосами поглощения, которые нумеруют по Штерну римскими цифрами, начиная с длинноволновой области [21]. На границе видимого и УФ-диапазонов порфирины имеют интенсивную полосу поглощения, именуемую полосой Soret.

Спектры поглощения дезоксигемоглобина и его лигандированных производных обусловлены системой близкорасположенных переходов различной природы:  $\pi$ -электронных переходов протопорфирина, переходов  $d$ -орбиталей гемового железа, имеющих сопоставимую с предыдущими переходами энергию. К ним добавляется, например, в случае оксиформы и  $\pi_g$  орбиталь кислорода. В итоге возникает существенное перекрытие близкорасположенных и сильно различающихся по своей интенсивности полос поглощения  $\pi \rightarrow \pi^*$  переходов. Интерпретация таких спектров светопоглощения представляет собой весьма трудную задачу [48].

При этом, богатый набор близкорасположенных возбужденных состояний обеспечивает исключительно эффективную внутримолекулярную безызлучательную релаксацию энергии возбуждения [48].

Полосы светопоглощения гемоглобина обычно обозначают греческими буквами, по алфавиту, начиная от длинноволнового участка спектра.

Оксигемоглобин имеет следующие полосы поглощения: 577, 542, 412 и 342–345 нм ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - и  $\delta$ -полосы).

Карбоксигемоглобин характеризуется аналогичным набором полос: 569, 539, 419 и 342–343 нм.

Для дезоксиформы белка отмечается полоса при 555 нм, в области 585–590

нм имеется перегиб. Традиционно полосу с максимумом при длине волны 555 нм обозначают  $\alpha$ -полосой, или вообще не применяют это обозначение, т.к., видимо,  $\alpha$ -полосой следовало бы называть точку перегиба при 585–590 нм [18]. Полоса  $\gamma$  (Соре) имеет выраженный максимум при 430 нм.

Окисленная форма белка (метгемоглобин) может быть лигандирована водой или гидроксильным ионом. Поэтому их спектры поглощения разнятся. Для кислого метгемоглобина наблюдаются полосы при 630, 500 и 405 нм ( $\gamma$ -полоса). У щелочного гембелка дополнительно отмечаются полосы при 577 и 540 нм. Полоса Соре имеет интенсивный пик поглощения при 414 нм [4].

В изолированном состоянии гем имеет полосу поглощения в области 565 и 390 нм [18].

Для спектров поглощения гемов в видимой и ближней УФ-областях светопоглощение обусловлено двумя  $\pi \rightarrow \pi^*$  переходами. Эти переходы подвержены сильному влиянию конфигурационного взаимодействия (*configuration interaction*). Для переходов с высокой энергией дипольные моменты складываются, а для переходов с низкой энергией — вычитаются [48].

Интенсивный переход соответствует  $\gamma$ -полосе, а длинноволновой переход —  $\alpha$ -полосе. Однако за счет электронно-колебательных взаимодействий низкоэнергетический переход может акцептировать часть энергии у высокоэнергетического перехода, что приводит к появлению  $\beta$ -полосы [48].

Природа  $\delta$ -полосы дискутируется. Предполагается, что она связана с переходами гема [5].

Вместе с тем для металлсодержащих белков характерны комплексы с переносом заряда (*charge transfer complex*), которые могут как формировать дополнительные полосы поглощения, так и вызывать уширение существующих [48].

Таким образом, в настоящее время достаточно хорошо проработан квантово-механический базис, используемый как теоретическая основа при интерпретации электронных, магнитных и спектральных свойств порфиринов, металлсодержащих органических комплексов и хромопротеидов [44].

Высокая теоретическая и практическая значимость исследований порфиринасодержащих соединений, начиная от синтеза красителей, сенсоров, лекарственных средств и заканчивая моделированием процессов фотосинтеза, изучением структурно-функциональных свойств белков привела к накоплению большого объема информации по данной тематике [111, 112, 113, 114, 115].

Исследованию структурно-функциональных свойств гемопротеидов при действии различных физико-химических факторов, в т.ч., УФ-излучения, уделено особое внимание [4, 19]. Важным приложением таких исследований является биомедицина [19]. При этом, спектральный метод анализа хромопротеидов, и гемоглобина в частности, является одним из основных, как научно-исследовательской лаборатории, так и при решении прикладных задач в клинической лабораторной диагностике [31].

Для хромопротеидов характерно поглощение УФ-света как апобелковой компонентой, так и простетическими группами. Вследствие перекрывающихся областей светопоглощения изучение спектральных свойств данных частей макромолекулы сильно затруднено. Разделение физико-химическими методами сложного белка на его составляющие приводит к ненадежным результатам исследований из-за нарушения системы внутримолекулярных взаимодействий.

В связи с этим, мы предприняли попытку выполнить разложение спектра гембелка и его производных математическими методами, исследовать спектральные свойства апобелковой и гемовой компонент обособленно.



## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Глава 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 2.1 Объекты исследования

Объектами исследования являлись спектры поглощения фенилаланина, тирозина, триптофана, гистидина, цистеина, метионина и цистина; спектры поглощения некоторых простых и сложных белков.

Растворы ароматических, гетероциклических и серосодержащих L-аминокислот получены из кристаллических коммерческих препаратов (Ajinomoto, Япония и PanEco, Россия/Китай) с содержанием основного вещества более 98,5 %. Концентрация (моль/л) фенилаланина —  $(3,0 \div 3,3) \cdot 10^{-3}$ , тирозина —  $(3,3 \div 4,0) \cdot 10^{-4}$ , триптофана —  $(1,2 \div 1,5) \cdot 10^{-4}$ , гистидина —  $(8,1 \div 9,2) \cdot 10^{-2}$ , цистеина —  $(5,8 \div 6,9) \cdot 10^{-2}$ , метионина —  $(0,1 \div 1,0) \cdot 10^{-1}$  и цистина —  $(2,0 \div 2,9) \cdot 10^{-4}$  в 0,01 (аминокислоты PanEco) и 0,1 (аминокислоты Ajinomoto) моль/л Na-фосфатном буфере с pH 7,4 (PanEco и Sigma-Aldrich, США соответственно).

Максимальная концентрация используемых аминокислот лимитировалась, в первую очередь, их растворимостью, во вторую — молярным показателем поглощения в исследуемом диапазоне длин волн. Во избежание возможного окисления SH-групп цистеина применяли деаэрированный буфер в атмосфере гелия или азота.

Растворы белков были приготовлены как из кристаллических коммерческих препаратов: гемоглобин, каталаза, альбумин, трипсин (Sigma-Aldrich и PAA Laboratories, Австрия), так и выделены из цельной крови доноров (гемоглобин А, прибл. 99 %), кордовой крови рожениц (гемоглобин F, прибл. 80 %) в 0,01/0,1 моль/л Na-фосфатном буфере с pH 7,4 (PanEco/Sigma-Aldrich).

Концентрация белков в растворах варьировала в пределах от  $3,0 \cdot 10^{-6}$  до  $4,0 \cdot 10^{-5}$  моль/л. Для гемсодержащих белков (гемоглобин, каталаза) концентрация

рассчитана в пересчете на тетрамер.

С целью минимизации ошибки взвешивания, наименьшая навеска аминокислот и белков соответствовала значению не ниже 20 мг (Ohaus EP64, США). Их рабочие концентрации были приготовлены последовательным разбавлением исходного раствора (если это было необходимо).

Значения pH буферных растворов контролировали с помощью pH-метров Hanna 211 (Hanna, Германия) со стеклянным электродом HI 1332B и S20-K Seven Easy (Mettler Toledo, Швейцария) со стеклянным электродом InLabExpert Pro.

Коммерческие препараты аминокислот и белков в сухом виде хранили при температурных режимах, рекомендованных производителем. Их водные растворы хранили в холодильнике не более 24 ч при температуре +4 °С.

## 2.2 Методы исследования

### 2.2.1 Забор, транспортировка и хранение образцов крови

Забор крови доноров осуществлялся на станции переливания крови в стерильные пластиковые пробирки объемом 15 мл (Axygen, США), в которые предварительно добавлялся гепарин натрия (5000 МЕ/мл, Славянская аптека, Россия) в объеме 30 мкл на 10 мл крови (т.е. 15 МЕ на 1 мл образца).

Забор крови из пуповины рожениц выполнялся в роддоме с помощью вакуумной системы BD Vacutainer (Becton Dickinson, США) в стерильные пробирки для гематологических исследований цельной крови с вакуумно-дозированным объемом в 4 мл, содержащие трехзамещенную калиевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты ( $K_3$ ЭДТА) в концентрации 1,8 мг/мл (цветовая кодировка пробирки — лавандовая).

Тип и количество применяемых антикоагулянтов соответствуют принятой в клинической лабораторной диагностике (КЛД) спецификации, т.е. определение свободного гемоглобина: антикоагулянт ЭДТА или гепарин [31].

Транспортировка образцов крови к лаборатории осуществлялась при температуре воздуха ( $10\div 25$  °С) не более одного часа.

Образцы крови перед экспериментом хранили не более 4-х часов в холодильнике при температуре  $+4$  °С.

Заданные временные интервалы транспортировки и хранения образцов крови соответствуют нормативам КЛД для анализа общего гемоглобина [31].

### 2.2.2 Получение фракции отмытых эритроцитов

Для получения эритроцитов, отмытых от плазмы и очищенных от других форменных элементов, использовали кровь в объеме 2 мл на одну центрифужную пробирку объемом 10 мл (Sarstedt, США) и доводили объем до 8 мл путем смешивания с охлажденным ( $+4$  °С) изотоническим раствором NaCl (INEOS Enterprises, США и PanEco) с концентрацией 0,154 моль/л. Данную смесь центрифугировали в течение 10 мин при 6000 об/мин на центрифуге с охлаждением SIGMA 2-16PK и угловым ротором 12141 (Sigma Laborzentrifugen, Германия) при температуре  $+12$  °С. Надосадочную жидкость, содержащую плазму и тонкий слой лейкоцитов, удаляли с помощью автоматических пипеток Digital (Thermo Fisher Scientific, США). К осажденным эритроцитам повторно добавляли раствор хлорида натрия, доводили до исходного объема, осторожно перемешивали и снова центрифугировали в том же режиме. Операцию отмывки эритроцитов повторяли трижды.

По завершении отмывки эритроцитов, из пробирок осторожно удаляли по 4 мл супернатанта, который использовался в дальнейшем в качестве теста на отсутствие гемолиза этих клеток и наличия компонентов плазмы в среде. Тест выполнялся путем визуальной оценки прозрачности и отсутствия окраски супернатанта и окончательно — спектрофотометрически в диапазоне 400–600 нм.

Далее, осторожно и медленно, не создавая турбулентностей, вводили наконечник пипетки через верхний слой клеток, содержащий небольшое

количество примесных форменных элементов крови, в эритромассу, ко дну пробирки. Не касаясь дна и стенок, осуществляли забор эритроцитов в объеме 0,5 мл и переносили их в новую центрифужную пробирку.

### 2.2.3 Получение растворов гемоглобина

Гемоглобин получали путем гемолиза эритроцитов дистиллированной водой.

В центрифужные пробирки, содержащие дистиллированную воду (тип II) в объеме 1,5 мл, помещали полученную на предварительном этапе фракцию отмытых эритроцитов (0,5 мл), выдерживали 20 мин, периодически перемешивая содержимое.

Строму эритроцитов осаждали центрифугированием в течение 12 мин при 12000 об/мин (ротор 12141, температура камеры центрифуги +12 °С).

После центрифугирования супернатант, содержащий гемоглобин (1,0 мл, взятый от верхней части объема жидкости), аккуратно переносили в пробирки объемом 50 мл (Axugen) и разбавляли 0,01/0,1 моль/л натрий-фосфатным буфером, рН 7,4 (PanEco/Sigma-Aldrich) или дистиллированной водой (при выделении фетального гемоглобина по методу К. Зингера, [153]) до рабочих концентраций.

Перед экспериментом растворы гемоглобина хранили в холодильнике не более 6-ти часов при температуре +4 °С.

### 2.2.4 Получение производных гемоглобина

Получение производных гемоглобина А и F, а также регистрация их спектров поглощения осуществлялись при температурах (18–25 °С).

#### 2.2.4.1 Получение растворов оксигемоглобина

Оксигемоглобин получали барботацией кислородом (99,999 %, НИИ КМ, Россия) раствора гемоглобина, полученного на предыдущем этапе, в специальных герметизируемых силиконовыми септами кварцевых кюветах QS Hellma (Hellma, Германия) с длиной оптического пути 1 см. Регулировку давления осуществляли кислородным редуктором DINOX Plus O3 (GCE, Чехия). Подключение кюветы к редуктору выполнялось с помощью силиконовой трубки FORSIL диаметром 5 мм (Silicone Engineering, Англия), со стандартным портом для шприцев и капельниц — LUER. Подача газа непосредственно в кювету, закрепленную на штативе, осуществлялась при помощи венозного катетера TRO-VENOCATH plus (Troge Medical, Германия) с диаметром иглы G14 (цветовая кодировка катетера — оранжевый). Для выравнивания давления с атмосферой воздуха через одноразовую септу в кювету также вводился отводящий катетер с иглой G14. Время барботации составляло 30 минут.

По окончании барботации газом кюветы, первой удалялась отводящая газ игла, тем самым создавая незначительное избыточное давление внутри кюветы, исключая контакт раствора белка с атмосферой при извлечении подающей газ иглы.

Спектр поглощения раствора оксигемоглобина регистрировался сразу после его получения.

#### 2.2.4.2 Получение растворов дезоксигемоглобина

Дезоксигемоглобин получали барботацией азотом (99,999 %, НИИ КМ) исходного раствора гемоглобина по приведенной ранее процедуре и с применением аналогичного оборудования. Регулировку давления осуществляли редуктором DIN-Control NITROGEN (GCE). Время барботации составляло 40

минут.

Кроме этого, дезоксигемоглобин получали также путем добавления к раствору гембелка в герметизируемой кварцевой кювете кристаллов дитионита натрия (Merck, Германия). Полученный таким способом дезоксигемоглобин использовался как контрольный и был пригоден только для регистрации спектров поглощения в видимом диапазоне (из-за сильного поглощения дитионита натрия и продуктов его окисления).

Спектр поглощения раствора дезоксигемоглобина регистрировался сразу после его получения.

#### 2.2.4.3 Получение растворов карбоксигемоглобина

Карбоксигемоглобин получали из исходного раствора гемоглобина и дезоксигемоглобина барботацией угарным газом (98,5 %, НИИ КМ) по заданному ранее алгоритму и с использованием аналогичного оборудования. Регулировку давления осуществляли редуктором DIN-Control HYDROGEN (GCE). Подключение кюветы к редуктору выполнялось с помощью силиконовой трубки FORSIL диаметром 6 мм (что связано с бóльшим диаметром выпускного отверстия штуцера данного типа редуктора относительно устройств, указанных ранее).

Время барботации составляло 20 минут. Так как угарный газ токсичен, то насыщение им проводилось в непрерывно проветриваемом во время работы помещении, а штатив с кюветой и отводящей газ иглой находился под тягой.

Спектр поглощения раствора карбоксигемоглобина регистрировался сразу после его получения.

#### 2.2.4.4 Получение растворов метгемоглобина

Метгемоглобин получали окислением гемового железа белка гексацианоферратом калия (III) (Вектон, Россия) в стандартных кварцевых кюветах QS Hellma (Hellma) с длиной оптического пути 1 см.

Для окисления гембелка использовалось отношение: 3 мл раствора гемоглобина к 0,1 мл раствора окислителя ( $7,7 \cdot 10^{-3}$  моль/л) в натрий-фосфатном буфере (0,01/0,1 моль/л, pH 7,4).

Время инкубации раствора гембелка с окислителем составляло 15 мин.

Спектр поглощения раствора метгемоглобина регистрировался сразу после его получения.

### 2.2.5 Получение растворов цианметгемоглобина

Цианметгемоглобин получали окислением гемового железа белка раствором гексацианоферрата калия (III) (Вектон) и ацетонциангидрина (Синтакон, Россия) в натрий-фосфатном буфере (0,01 моль/л, pH 7,4) в стандартных кварцевых кюветах QS Hellma (Hellma) с длиной оптического пути 1 см.

Для образования цианметгемоглобина использовалось отношение: 3 мл раствора гемоглобина к 0,1 мл раствора окислителя ( $7,7 \cdot 10^{-3}$  моль/л) и ацетонциангидрина ( $1,1 \cdot 10^{-2}$  моль/л).

Для получения цианметгемоглобина из растворов гембелка, содержащих метгемоглобин, использовали раствор ацетонциангидрина ( $1,1 \cdot 10^{-2}$  моль/л) в натрий-фосфатном буфере. Для этого использовалось отношение: 3 мл раствора гемоглобина к 0,1 мл раствора ацетонциангидрина.

При наведении растворов, содержащих ацетонциангидрин, ввиду его токсичности, соблюдали осторожность: работы проводили под тягой.

Время инкубации раствора гемоглобина с реагентом составляло 15 мин.

Растворы цианметгемоглобина использовались для определения концентрации производных гемоглобина унифицированным метгемоглобин-

цианидным методом (метод Д. Драбкина, 1932 [88]).

Спектр поглощения раствора цианметгемоглобина, а также содержащего его раствора гемоглобина регистрировался сразу после получения.

### 2.2.6 Получение растворов фетального гемоглобина

Фетальный гемоглобин получали по методу К. Зингера (Singer et al., 1951 [153]).

Для выделения фетального гемоглобина в пробирку с 3,2 мл  $8,33 \cdot 10^{-2}$  моль-экв. раствора едкого натра (Химтитры, Россия), предварительно помещенную в водяную баню на 10 мин при 20 °С, быстро вливали 0,2 мл разбавленного дистиллированной водой гемолизата, сильно взбалтывая в водяной бане в течение 10 с, затем включали секундомер. Через 1 мин добавляли 6,8 мл раствора на основе сульфата аммония. Смесь хорошо перемешивали, переворачивая пробирку 6 раз, а затем фильтровали через двойной слой обеззоленных фильтров марки «Ф» (черная лента, 150 мм, Реакон, Россия). На фильтре остается гемоглобин А, а фильтрат содержит гемоглобин F.

Раствор на основе сульфата аммония получали следующим образом: к 350 г сульфата аммония (BASF, Германия) добавляли 500 мл дистиллированной воды (тип II), давали постоять и смешивали 400 мл этого раствора с равным объемом дистиллированной воды; затем к 800 мл полунасыщенного раствора добавляли 2 мл 10 моль-экв. соляной кислоты (Уфимский завод химических реактивов, Россия).

### 2.2.7 Реактивы: класс чистоты

Все используемые в работе реактивы имеют класс чистоты не ниже: «х.ч.» — химические чистые; или соответствуют стандартам: «USP» — фармакопеи



США, «Ph. Eur.» — Европейской фармакопеи, «JP» — фармакопеи Японии, а также Государственной фармакопеи РФ.

Коммерческие препараты реактивов в сухом виде хранили при температурных режимах, рекомендованных производителем. Водные растворы этих препаратов хранили в холодильнике не более 1 месяца при температуре +4 °С. Растворы, срок годности которых ограничен (включая водные растворы аминокислот и белков), готовили *ex tempore* (см. также п. 2.1).

#### 2.2.8 Регистрация спектров поглощения: спектрофотометры и протокол измерения

Регистрацию спектров поглощения образцов, оптически пустых растворов, осуществляли на спектрофотометрах исследовательского класса: Shimadzu-2401(PC) с одинарным монохроматором и Shimadzu-2550(PC) с двойным монохроматором (Shimadzu, Япония), построенных по классической двулучевой оптической схеме (*Conventional Model*). Величина рассеянного света для Shimadzu-2401(PC) составляет менее 0,015 % при длинах волн 220 и 340 нм, Shimadzu-2550(PC) — менее чем 0,0003 %. По другим спектрофотометрическим характеристикам приборы идентичны.

Измерения поглощения образцов проводили в кварцевой кювете QS Hellma (Hellma) с длиной оптического пути 1 см в диапазонах длин волн 230–650 нм, со спектральной шириной щели 0,5 нм, шагом сканирования 0,5 (Shimadzu-2401(PC)) и 0,2 нм (Shimadzu-2550(PC)). Скорость сканирования соответствовала режиму Slow.

Управление спектрофотометрами и предварительную обработку данных выполняли с помощью ПО UVProbe (Shimadzu).

Самотестирование и калибровка спектрофотометров Shimadzu по точности установки длины волны осуществлялись автоматически всякий раз во время инициализации устройства.

В качестве эталонных значений длин волн спектрофотометрами использованы характерные пики интенсивности излучения (486,0 и 656,1 нм) штатно установленной дейтериевой лампы, которая является также источником УФ-света при регистрации спектров.

Спектрофотометры проходили тест, если после рекалибровки значения первого пика находились в диапазоне 485,7–486,3 нм, второго — 655,8–656,4 нм. Однако фактические значения для этих длин волн по отношению к эталонным (при контрольных измерениях), отличались менее, чем на 0,2 нм.

### 2.2.9 Подходы, направленные на снижение фотометрических ошибок и увеличение разрешения в спектрах поглощения

На рис. 1 показана рабочая функция ( $E$ , отн. ед.) спектрофотометра, которая определяется спектральной плотностью источника излучения при постоянной спектральной ширине щели, спектральной чувствительностью фотоприемника при этой ширине и заданном коэффициенте усиления сигнала, а также светосилой монохроматора (-ов) устройства. Данная функция позволяет оценить — насколько оптически плотным может быть образец, при измерении которого для каждой  $\lambda_i$  отношение «сигнал/шум» будет удовлетворительным (т.е. характеризует некоторый «запас прочности» по показателю  $S/N$ ).

Снижение систематической фотометрической ошибки базовой линии спектрофотометров, а также ошибки, обусловленной асимметрией кювет, обеспечивалось путем регистрации спектров в режиме *Split-beam* (рис. 2, 3).

Увеличение разрешения в спектрах поглощения образцов достигалось вычислением второй производной.

С целью снижения случайных ошибок фотометрических измерений, обусловленных тепловым шумом фотодетектора, спектры поглощения сглаживались и аппроксимировались кубическими сплайнами (*Cubic Spline Smoothing, CSS*) с точностью аппроксимации до 0,2 нм (рис. 4).

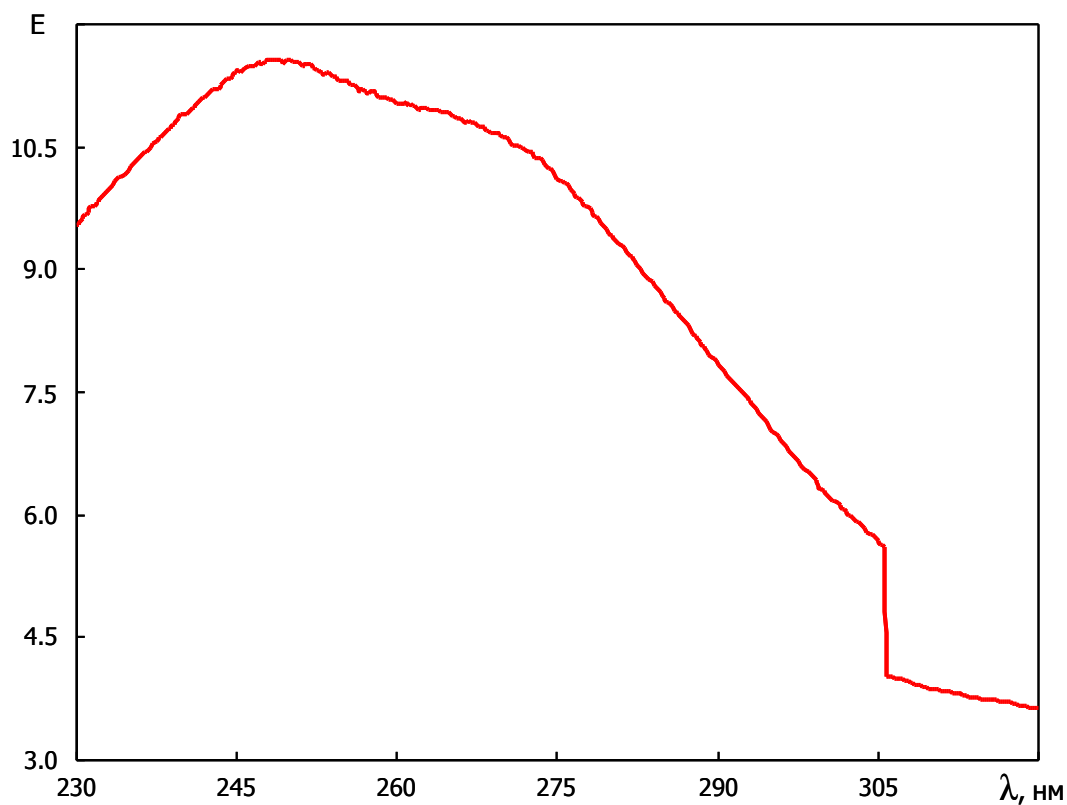


Рис. 1. Рабочая функция, полученная на спектрофотометре Shimadzu-2550

*Примечание: источник излучения — дейтериевая ультрафиолетовая лампа WL24443 А OEM; приемник излучения — InGaAs фотоэлектронный умножитель R928 (Hamamatsu); шаг измерения — 0,2 нм; спектральная ширина щели — 0,5 нм; усиление  $k=1$ ; скорость сканирования — Slow; по оси ординат — сигнал на выходе фотодетектора (E, отн. ед.)*

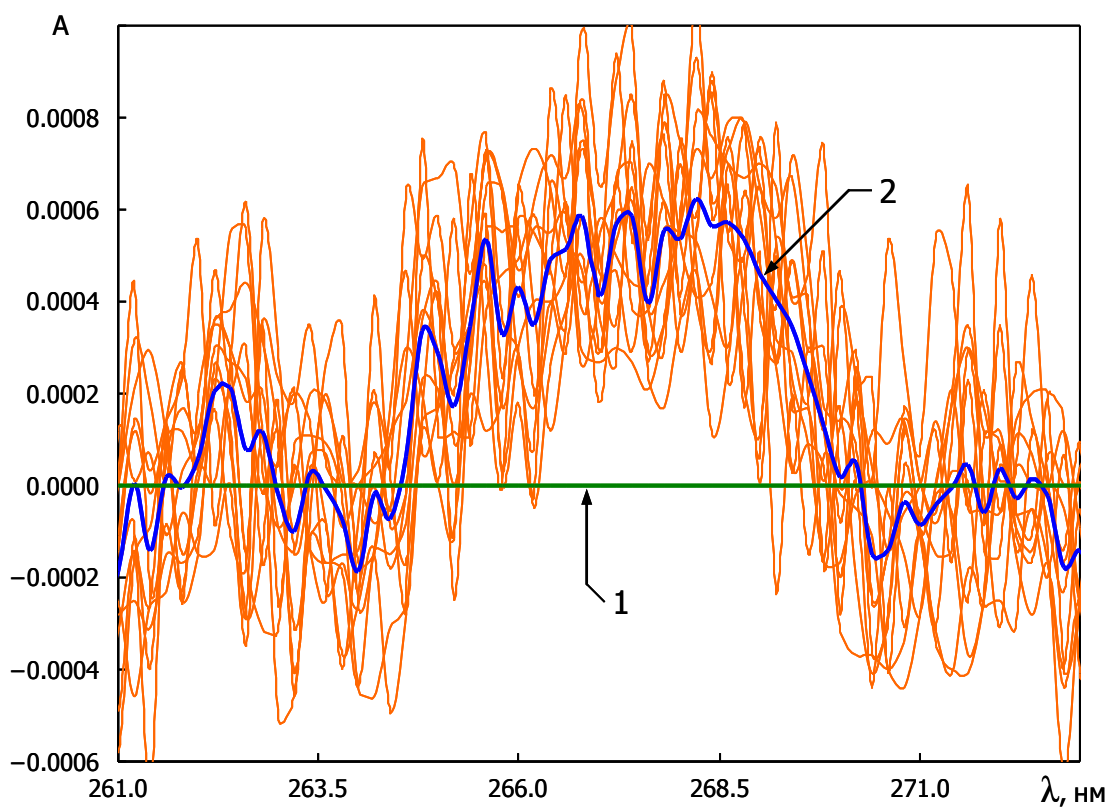


Рис. 2. Базовые линии, полученные на спектрофотометре Shimadzu-2550

Обозначения: 1 — идеальная базовая линия; 2 — среднее арифметическое базовой линии по 12 измерениям (тонкие линии), выполненным с интервалом в 3 мин (стандартный режим измерения),  $A$  — здесь и на других рисунках: поглощение (отн. ед.)

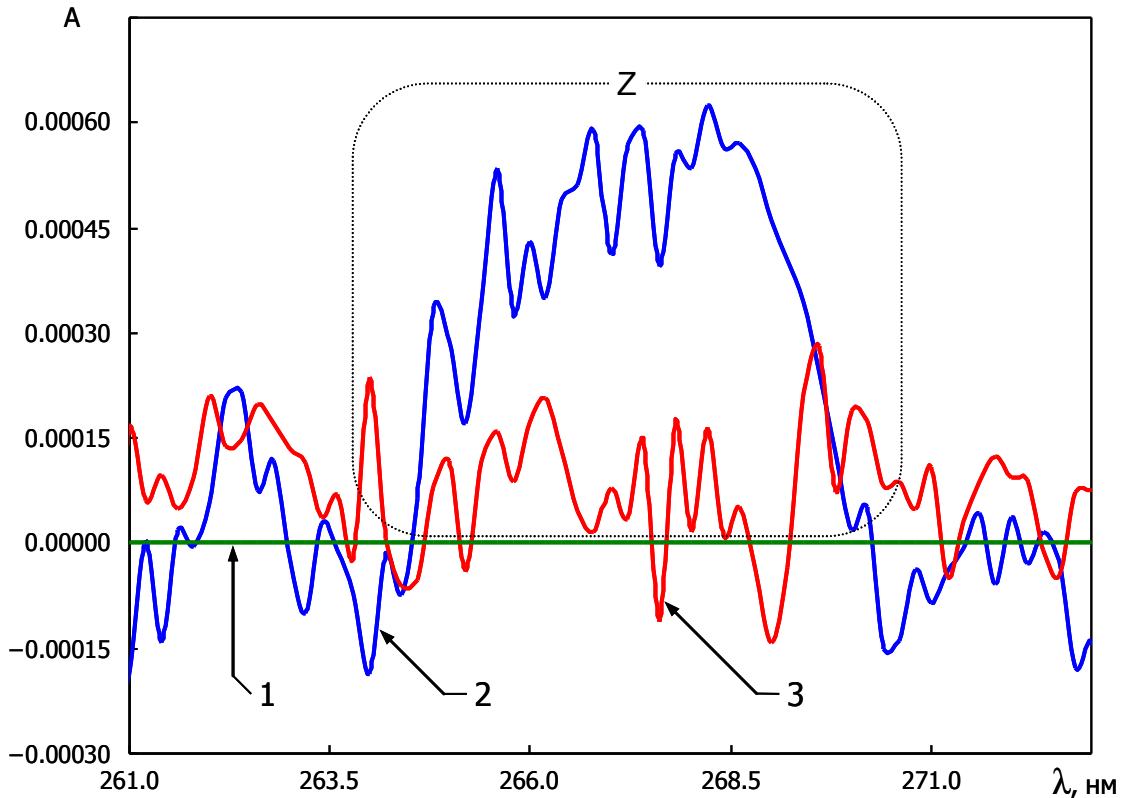


Рис. 3. Базовая линия, полученная на спектрофотометре Shimadzu-2550 при различных режимах измерения

Обозначения: 1 — идеальная базовая линия; 2 — стандартный режим измерения; 3 — режим *Split-Beam*

Примечание: с целью уменьшения систематических ошибок базовой линии все измерения проводили на одном оптическом канале, второй канал (канал сравнения) использовали в качестве опорного (режим *Split-beam*); в качестве примера, пунктирной линией показана случайно возникшая область Z, которая при измерении в стандартном режиме в спектрах светопоглощения может быть ошибочно интерпретирована как плохо разрешенная полоса поглощения; аналогичный артефакт также может снижать и разрешение истинных полос поглощения, соседствующих с ней по обе стороны

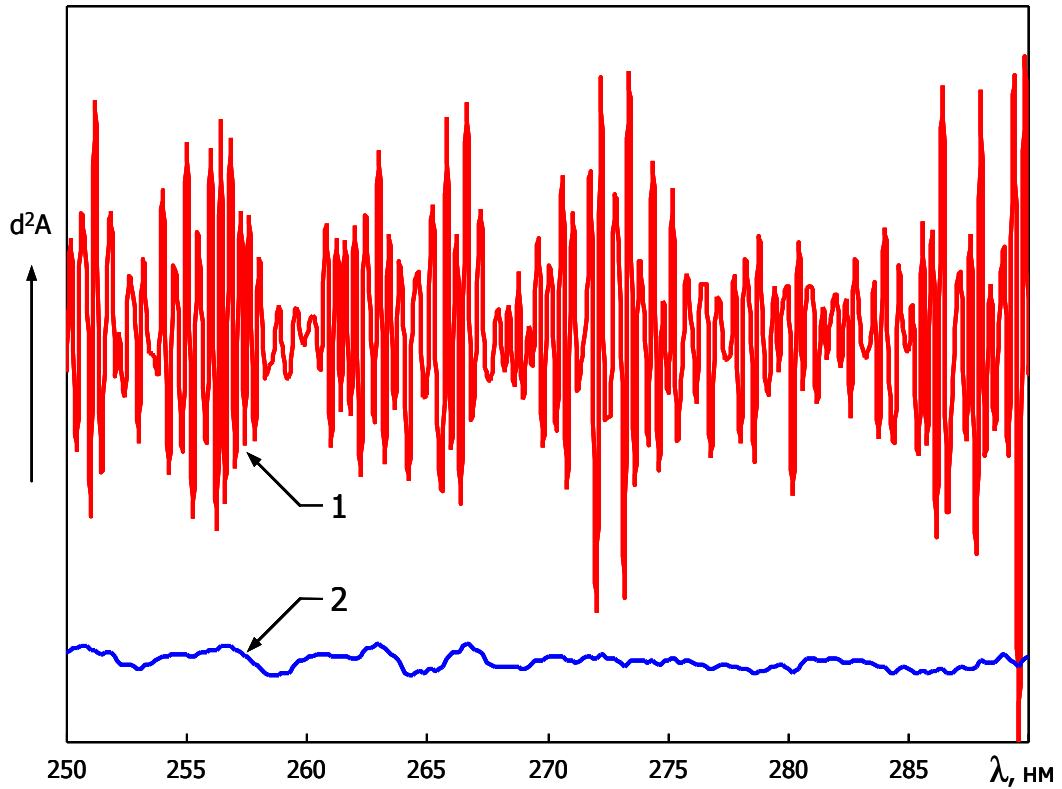


Рис. 4. Вторая производная спектра поглощения бычьего сывороточного альбумина (БСА) после его аппроксимации сглаживающим кубическим сплайном

Обозначения: 1 — вторая производная исходного спектра поглощения; 2 — вторая производная после аппроксимации спектра CSS; по оси ординат — вторая производная поглощения ( $d^2A$ )

Примечание: производные спектров поглощения приведены в одном масштабе, но смещены по ординате друг относительно друга на постоянное значение

Дополнительная фильтрация шумов при анализе второй производной осуществлялась аппроксимацией спектров поглощения неоднородными рациональными Безье-сплайнами различных порядков (*Non-Uniform Rational Bezier Spline, NURBS*), с передискретизацией (рис. 5, кривая 2) или с применением окна Кайзера-Бесселя с низкочастотной фильтрацией (*Kaiser-Bessel Lowpass Filtering, KBLF*) (рис. 5, кривая 3). При неоднозначности в интерпретации слабых сигналов в качестве альтернативы использовали сглаживание Савицкого-Голея (*Savitzky-Golay Smoothing Filters, SGSF*).

При некотором несоответствии оценок положения пиков полос поглощения в спектрах образцов, выявленных с помощью второй производной и полученных непосредственно из недифференцированного спектра, представлены оба значения (рис. 6, 7).

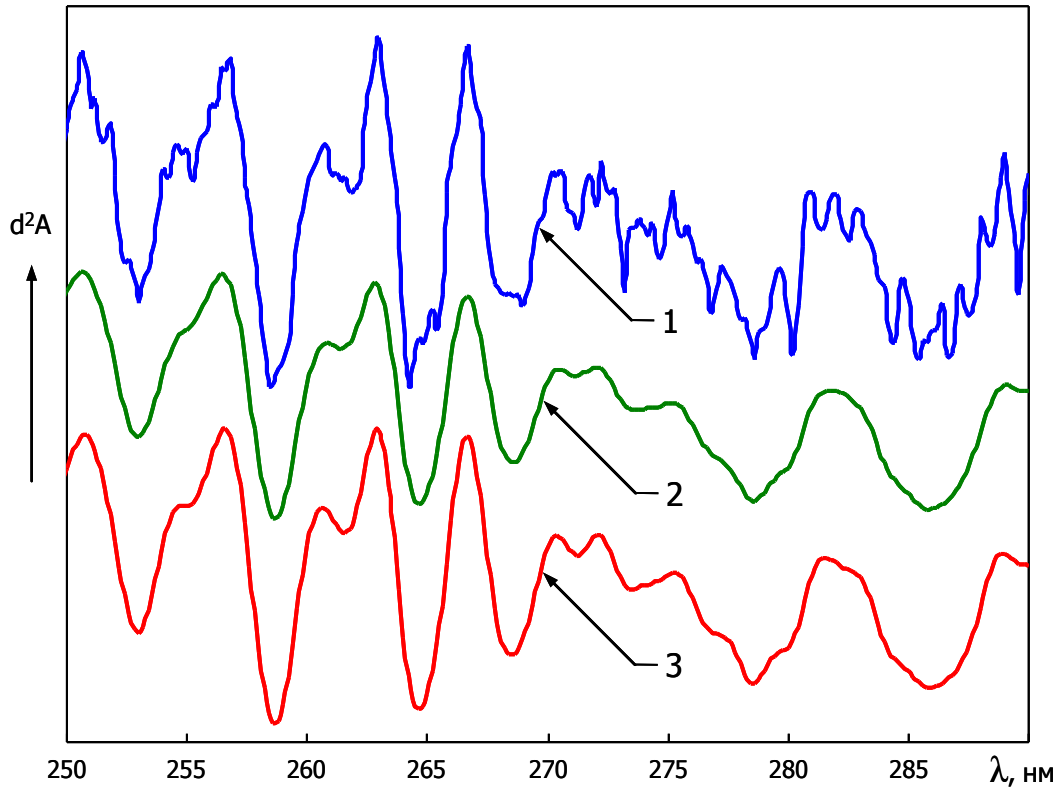


Рис. 5. Вторая производная спектра поглощения БСА после его аппроксимации неоднородным рациональным В-сплайном или фильтрацией окном Кайзера-Бесселя

Обозначения: 1 — вторая производная после аппроксимации спектра CSS; 2 — вторая производная спектра после аппроксимации CSS и NURBS; 3 — вторая производная спектра после аппроксимации CSS и KBLF; по оси ординат — вторая производная поглощения ( $d^2A$ )

Примечание: производные спектров поглощения приведены в одном масштабе, но по ординате смещены друг относительно друга на константу



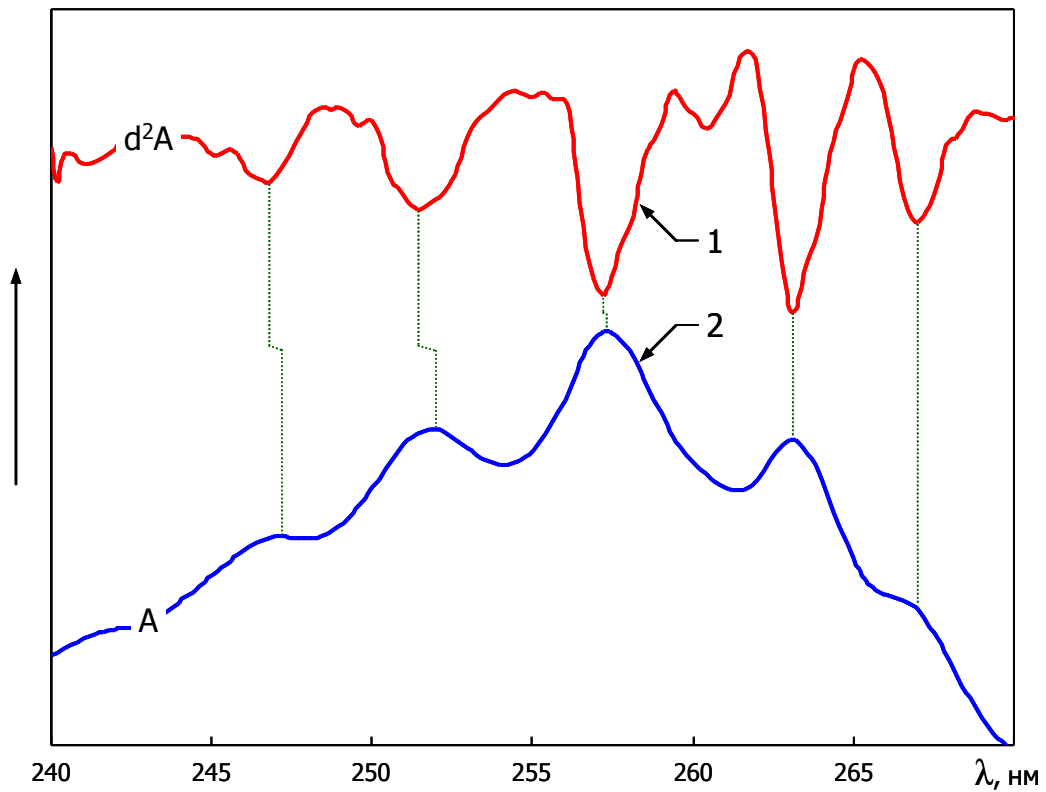


Рис. 6. Возможные несоответствия оценок положения пиков в спектрах поглощения фенилаланина, выявленных с помощью второй производной и полученных непосредственно из недифференцированного спектра

Обозначения: 1 — вторая производная спектра поглощения образца ( $d^2A$ ); 2 — исходный (недифференцированный) спектр поглощения ( $A$ )

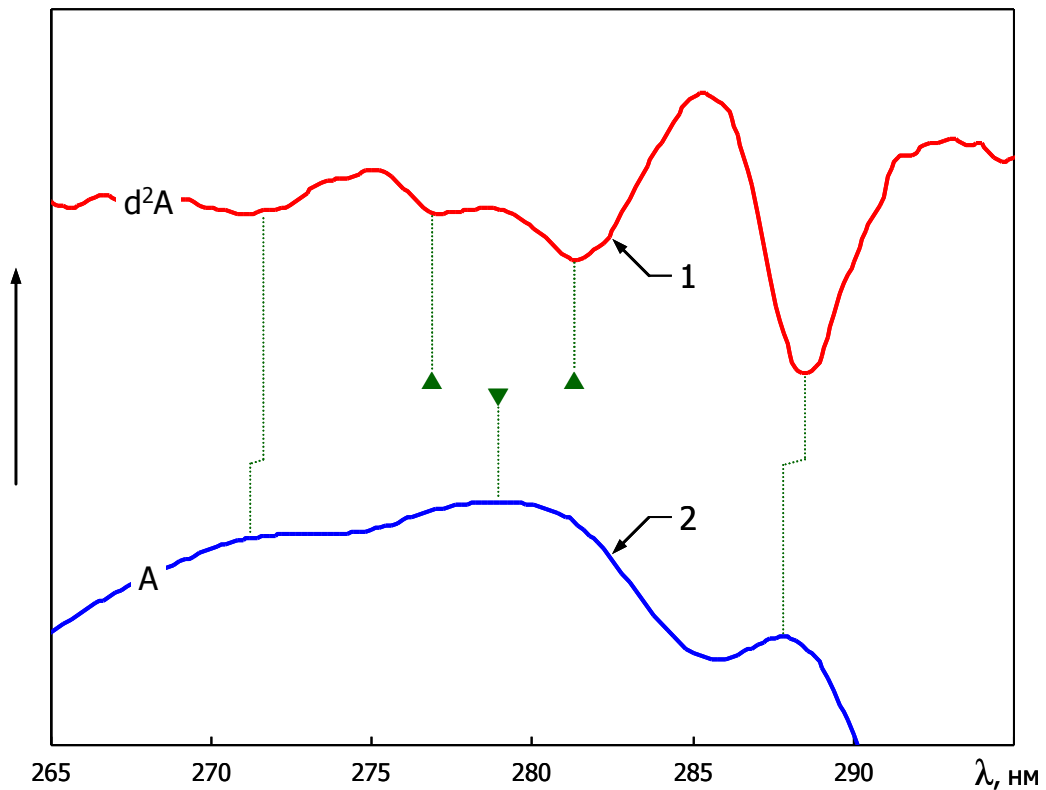


Рис. 7. Возможные несоответствия оценок положения пиков в спектрах поглощения триптофана, выявленных с помощью второй производной и полученных непосредственно из недифференцированного спектра

Обозначения: 1 — вторая производная спектра поглощения образца ( $d^2A$ ); 2 — исходный (недифференцированный) спектр поглощения ( $A$ )

Примечание: знаком «▼» показан пик в спектре поглощения, для которого не определяется экстремум по второй производной; знаком «▲» показаны пики второй производной, которые не идентифицируются на исходном спектре

### 2.2.10 Расчет концентрации гемоглобина

Общую концентрацию гемоглобина (выделенного из цельной крови) в его растворах определяли спектрофотометрически следующими способами: а) как сумму концентраций основных гемпроизводных по системе уравнений (1–3) [61]:

$$[\text{HbO}_2] = (1,7 \cdot A_{577} - 1,3 \cdot A_{569} - 0,15 \cdot A_{500}) \cdot 10^{-4}, \quad (1)$$

$$[\text{Hb}] = (-1,6 \cdot A_{577} + 2,5 \cdot A_{569} - 0,33 \cdot A_{500}) \cdot 10^{-4}, \quad (2)$$

$$[\text{MtHb}] = (0,2 \cdot A_{577} - 0,4 \cdot A_{569} + 0,33 \cdot A_{500}) \cdot 10^{-4}, \quad (3)$$

где  $[\text{HbO}_2]$ ,  $[\text{Hb}]$  и  $[\text{MtHb}]$  — концентрации (моль/л) окси-, дезокси- и метформ гемоглобина,  $A_{577}$ ,  $A_{569}$ ,  $A_{500}$  — значения поглощения при длинах волн 577, 569 и 500 нм, б) унифицированным метгемоглобинцианидным методом при длине волны 540 нм [172].

Концентрацию гемпроизводных  $\text{Hb}_A$  и  $\text{Hb}_F$  находили с помощью метгемоглобинцианидного метода.

Так как молярный показатель поглощения цианметгемоглобина при длине волны 540 нм является референтной величиной [172], значение которой составляет  $1,1 \cdot 10^4$  л/(моль·см) в пересчете на один гем, то концентрация гемопротеида может быть вычислена по следующему уравнению (4):

$$[\text{Hb}^{\text{total}}] = \frac{A_{540} \cdot k}{1,1 \cdot 10^4}, \quad (4)$$

где  $[\text{Hb}^{\text{total}}]$  — общая концентрация гемоглобина, моль/л;  $A_{540}$  — поглощение цианметгемоглобина неизвестной концентрации при длине волны 540 нм и  $k$  — коэффициент разбавления раствора за счет добавленного реагента в заданном объеме растворителя.

Тогда молярные показатели поглощения одной из производных гемоглобина могут быть определены по уравнению (5):

$$\varepsilon_{\lambda_i} = \frac{A_{\lambda_i}}{[\text{Hb}^{\text{total}}]}, \quad (5)$$

где  $\varepsilon_{\lambda_i}$  — молярный показатель поглощения гемоглобина на длине волны  $\lambda_i$ , л/(моль·см);  $A_{\lambda_i}$  — поглощение гемоглобина с неизвестной концентрацией на длине волны  $\lambda_i$ .

Для исследований использовали растворы гемоглобина с концентрацией  $(3,0 \div 4,0) \cdot 10^{-5}$  моль/л в пересчете на тетрамер.

### 2.2.11 Коррекция молярных спектров поглощения производных гемоглобина на присутствие неосновных компонент

Несмотря на принимаемые меры по достижению максимальной доли соответствующей производной гемоглобина в его растворах, полностью устранить присутствие других форм гембелка, а также различных примесей-хромофоров и рассеивающих свет частиц, практически невозможно.

Однако влияние таких примесей на спектр поглощения основной составляющей можно уменьшить до минимума математически, путем вычленения неосновной компоненты с ее соответствующими затрудняющими определению эффектами: поглощения, рассеяния и люминесценции света. Для этого достаточно найти доли и спектры поглощения этих примесей в заданном приближении, что является более простой задачей.

В связи с этим необходима модель с некоторыми допущениями.

Если предположить, что все компоненты системы и возникающие в ней эффекты не оказывают заметного влияния друг на друга в заданном диапазоне концентраций веществ, то тогда эту систему можно будет свести к аддитивной модели.

В спектроскопии такой моделью является система уравнений, количественный анализ которой построен на соблюдении принципа аддитивности

Фирордта в смеси веществ (а также подчинению закона Бугера-Ламберта-Бера). Причем эффекты рассеяния и люминесценции можно представить как мнимую компоненту поглощения света с положительными (рассеяние света) и отрицательными (люминесценция) значениями.

Тогда, в общем виде, нормированное поглощение производной гемоглобина с максимально возможным содержанием основной формы можно представить уравнением (6):

$$\varepsilon_{\lambda_i}^{\text{total}} = \omega_a \varepsilon_{\lambda_i}^a + \sum (\omega_b \varepsilon_{\lambda_i}^b)_j + \sum (\omega_c \varepsilon_{\lambda_i}^c)_k + \sum (\omega_d \varepsilon_{\lambda_i}^d)_l + \sum (\omega_e \varepsilon_{\lambda_i}^{\prime e})_m + \sum (\omega_f \varepsilon_{\lambda_i}^{\prime f})_n, \quad (6)$$

где  $\omega_a \varepsilon_{\lambda_i}^a$  — доля поглощения основной производной гемоглобина;  $\omega_b \varepsilon_{\lambda_i}^b$  — доля поглощения остальных производных гемоглобина;  $\omega_c \varepsilon_{\lambda_i}^c$  — доля поглощения продуктов распада гембелка;  $\omega_d \varepsilon_{\lambda_i}^d$  — доля поглощения хромофоров-примесей, не относящихся к гемоглобину;  $\omega_e \varepsilon_{\lambda_i}^{\prime e}$  — доля кажущегося поглощения, обусловленная рассеянием света;  $\omega_f \varepsilon_{\lambda_i}^{\prime f}$  — доля кажущегося поглощения, обусловленная люминесценцией (отрицательное значение);  $\omega$  — коэффициент (вес).

Если пренебречь некоторыми составляющими, т.е. коэффициенты  $\omega_{c,d,e,f}$  приравнять к нулю, то тогда получим следующее общее выражение (7) для поглощения производных гемоглобина:

$$\varepsilon_{\lambda_i}^{\text{total}} = \omega_1 \varepsilon_{\lambda_i}^{\text{Hb}^A \text{O}_2} + \omega_2 \varepsilon_{\lambda_i}^{\text{Hb}^A} + \omega_3 \varepsilon_{\lambda_i}^{\text{MtHb}^A} + \omega_4 \varepsilon_{\lambda_i}^{\text{Hb}^A \text{CO}} + \omega_5 \varepsilon_{\lambda_i}^{\text{Hb}^F \text{O}_2} + \omega_6 \varepsilon_{\lambda_i}^{\text{Hb}^F} + \omega_7 \varepsilon_{\lambda_i}^{\text{MtHb}^F} + \omega_8 \varepsilon_{\lambda_i}^{\text{Hb}^F \text{CO}}, \quad (7)$$

из которого можно найти скорректированные значения молярных показателей поглощения окси-, дезокси-, мет- и карбоксигемоглобина А и F.

Следует отметить, что производные гемоглобина могут быть позиционированы, как минимум, в 2 координатах: 1) вид гемового лиганда и степень окисления гемового железа (гемовая компонента) — форма гемоглобина; 2) комбинации субъединичного состава, а также лиганды (аддукты), связывающиеся с глобином (апобелковая компонента) — тип гемоглобина.

Так, например, по апобелковой компоненте гемоглобин А представляет

собой два известных варианта белка: основной ( $A_1$ , также обозначается как «А» или « $A_0$ ») и минорный ( $A_2$ ). Гемоглобин, прежде всего,  $Hb_{A1}$  также может быть гликирован (синоним: гликозилирован):  $A_{1a}$ ,  $A_{1b}$  и количественно преобладающий —  $A_{1c}$ .

Таким образом, коррекция молярных спектров поглощения производных гемоглобина с максимально возможным содержанием основной формы осуществлялась путем вычитания молярных спектров поглощения оставшихся производных гемоглобина. Для компенсации вычтенной доли неосновной компоненты полученные молярные спектры поглощения производных гемоглобина нормировались к исходному значению.

#### 2.2.11.1 Коррекция молярных спектров поглощения метгемоглобина А

При расчете молярного спектра поглощения метгемоглобина А за основу был принят спектр поглощения метформы гемоглобина, полученной окислением раствора гембелка, выделенного из крови доноров (и преимущественно содержащим оксигемоглобин А). В результате окисления реагентом в растворе, в основном, присутствует метформа гемоглобина А и F. В диапазоне длин волн от 320 нм и более спектры этих форм практически идентичны и присутствием  $MtHb_F$  можно пренебречь. Однако для диапазона поглощения апобелковой компоненты эту разность необходимо учитывать.

Для учета составляющей поглощения фетального гемоглобина в растворе гембелка, полученного из крови доноров, необходимо выделить из общего гемоглобина фракцию фетального гемопротеида (п. 2.2.6).

Из отношения поглощения оксиформы фетального гемоглобина к общему гемоглобину (его оксиформе) находим долю  $Hb_F O_2$  по уравнению (8):

$$\omega_{Hb_F O_2} = \frac{A_{540}^{Hb_F O_2}}{A_{540}^{Hb_A O_2 + Hb_F O_2}} \cdot \quad (8)$$

Измерения показателей поглощения оксигемоглобина F из крови доноров и кордовой крови осуществляли в атмосфере воздуха, при комнатной температуре.

В норме содержание фетального гемоглобина в крови доноров соответствует значению порядка 0,5 % от общего гембелка.

Чтобы вычесть из молярного спектра поглощения метгемоглобина, составляющую метгемоглобина F, необходимо получить спектр поглощения фетального гемоглобина из образца, где его концентрация достаточно высока (более 75 %). Это позволяет избежать применения реагентов (п. 2.2.6), оказывающих влияние на спектральные свойства гемоглобина F (а также в значительной степени на гемоглобин A), что актуально, прежде всего, для УФ-диапазона длин волн, в частности, области поглощения апобелковой компоненты. Кроме того, при использовании таких реагентов с уменьшением длины волны в растворах существенно увеличивается рассеяние света гембелком и соответственно эту составляющую компоненту необходимо будет учитывать (рис. 8). Это, в свою очередь, приводит к неоправданному увеличению объема вычислений.

В норме содержание фетального гемоглобина в кордовой крови рожениц соответствует значению порядка 80 % от общего гембелка. Точное его значение рассчитывается по уравнению (8). Общую концентрацию гемоглобина находили гемоглобинцианидным методом и рассчитывали по уравнению (4). Окисляя исходный раствор гембелка, выделенный из кордовой крови, получали преимущественно спектр поглощения фетального метгемоглобина.

Далее, из молярного спектра поглощения метгемоглобина (полученного исходно из крови доноров) вычитали молярный спектр поглощения метгемоглобина F (полученный исходно из кордовой крови). Доля, с которой будет вычитаться молярный спектр фетального метгемоглобина, рассчитывается как отношение доли фетального гемоглобина в растворе метгемоглобина, полученного из крови доноров ( $\omega_{\text{МгНб}_F}^K$ ), к доле такового, полученного из кордовой крови ( $\omega_{\text{МгНб}_F}^L$ ) по уравнению (9):

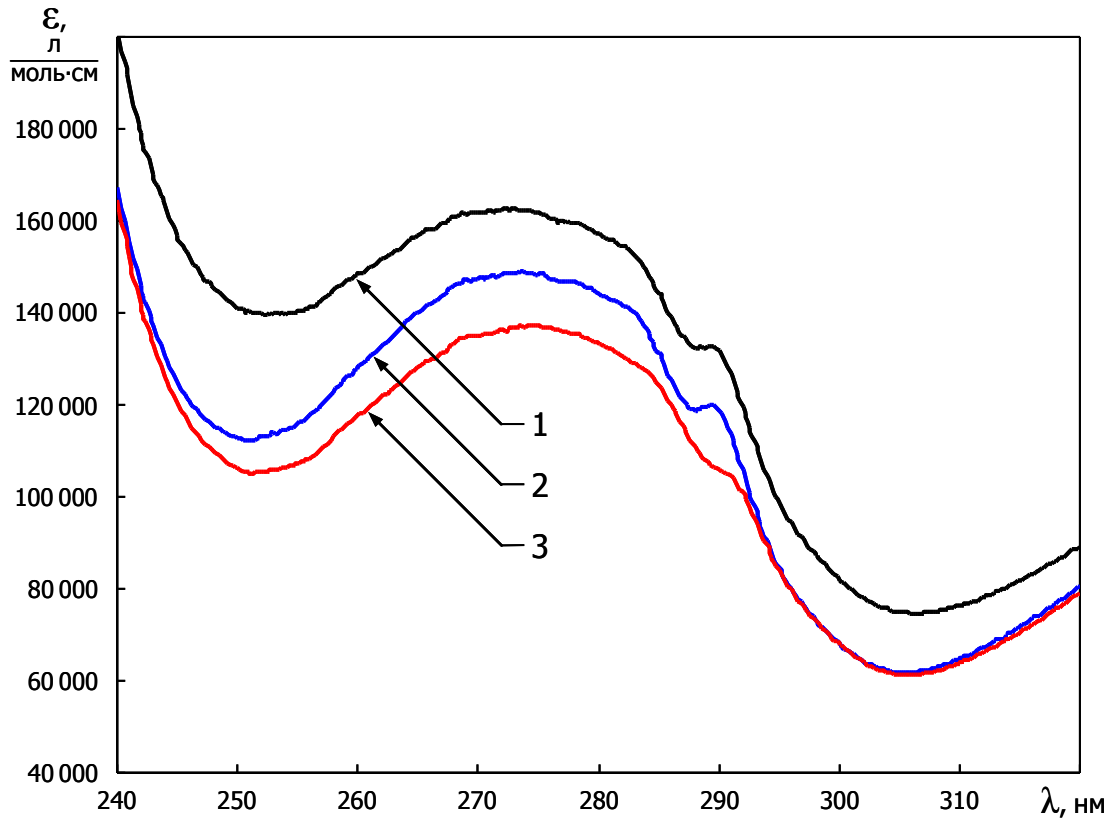


Рис. 8. Влияние химических реагентов, используемых для выделения фетального гемоглобина, на спектры поглощения белка

Обозначения: 1 — спектр поглощения оксигемоглобина F, выделенного по методике К. Зингера; 2 — спектр поглощения оксигемоглобина F, полученного вычитанием составляющей оксигемоглобина A; 3 — спектр поглощения оксигемоглобина A;  $\epsilon$  — молярный показатель поглощения

Примечание: кривая (1) содержит сравнительно высокую составляющую рассеяния света образцом относительно длинноволнового участка спектра ( $>500$  нм)



$$\omega_{\text{MтHb}_F} = \frac{\omega_{\text{MтHb}_F}^K}{\omega_{\text{MтHb}_F}^L}. \quad (9)$$

Так как при этом молярный показатель поглощения будет уменьшен на  $\omega_{\text{MтHb}_F} \varepsilon_{\lambda_i}^{\text{MтHb}_F}$ , то и результирующий спектр следует нормировать, умножая на  $g$ , уравнение (10):

$$g = \frac{1}{1 - \omega_{\text{MтHb}_F}}, \quad (10)$$

где  $g$  — нормирующий коэффициент.

Таким образом, получили откорректированный молярный спектр поглощения метгемоглобина А, который будет использован также и для последующей коррекции спектров других гемпроизводных.

#### 2.2.11.2 Коррекция молярных спектров поглощения дезоксигемоглобина А

При расчете молярного спектра поглощения дезоксигемоглобина А в основу был положен спектр поглощения дезоксиформы, полученной барботацией азотом раствора гембелка, выделенного, в свою очередь, из крови доноров.

Так как ранее вычисленная доля фетального гемоглобина в растворах гембелка (полученного из крови доноров) невелика и находится преимущественно в оксиформе (> 95 %), то долей фетального мет- и карбоксигемоглобина можно пренебречь.

Содержание метформы в исходном (до дезоксигенации) растворе гемоглобина было определено цианидным способом с помощью ацетонциангидрина (см. 2.2.5) и рассчитано по уравнению (11):

$$[\text{MтHb}_A] = \frac{\Delta A_{630} \cdot k}{\varepsilon_{630}^{\text{MтHb}_A} - \varepsilon_{630}^{\text{CNMтHb}_A}}, \quad (11)$$

где  $\Delta A_{630}$  — разность в поглощении растворов гемоглобина до и после добавления ацетонциангидрина;  $\varepsilon_{630}^{\text{MtHb}_A}$  и  $\varepsilon_{630}^{\text{CNMtHb}_A}$  — молярные показатели поглощения метгемоглобина и цианметгемоглобина при длине волны 630 нм соответственно;  $k$  — коэффициент разбавления раствора.

Доля метгемоглобина будет рассчитана из отношения (12):

$$\omega_{\text{MtHb}_A} = \frac{[\text{MtHb}_A]}{[\text{Hb}^{\text{total}}]} \quad (12)$$

Из молярного спектра поглощения дезоксигемоглобина (с максимальным содержанием его основной формы) будет вычтен, в соответствующей доле, полученный ранее (см. 2.2.11.1) итоговый спектр молярного поглощения метгемоглобина А.

Кроме учета доли метгемоглобина, необходимо также откорректировать спектр дезоксигемоглобина на присутствие в нем доли спектра карбоксигемоглобина.

Для этого в герметичной кювете к исходному раствору гемоглобина (из которого получали дезоксигемоглобин барботацией азотом) добавляли восстановитель — кристаллы дитионита натрия. При этом происходит восстановление метгемоглобина до дезоксиформы (в отличие от барботации азотом), а также дезоксигенация оксиформы.

Расчет выполняли по следующему уравнению (13) [107]:

$$[\text{Hb}_A \text{CO}] = \frac{A_{419}/A_{425,5} - 0,827}{0,712}, \quad (13)$$

где  $A_{419}$  — максимум поглощения карбоксиформы,  $A_{419}$  — изосбестическая точка  $\text{HbCO}/\text{Hb}$  (значение при 425,5 нм в данном случае получено интерполяцией точек в спектре с длиной волны 425 нм и 426 нм).

Доля карбоксигемоглобина будет рассчитана из отношения (14):

$$\omega_{\text{Hb}_A \text{CO}} = \frac{[\text{Hb}_A \text{CO}]}{[\text{Hb}^{\text{total}}]} \quad (14)$$

Из молярного спектра поглощения дезоксигемоглобина (с максимальным содержанием его основной формы) будет вычтен, в соответствующей доле, итоговый спектр молярного поглощения карбоксигемоглобина (см. ниже, 2.2.11.3).

Получение дезоксигемоглобина различными путями (барботация азотом и восстановление дитионитом натрия) обусловлено тем, что дитионит натрия сильно поглощает в УФ-области спектра. Это не позволяет выполнить вычитание оптически пустого раствора с этим восстановителем при заданных ограничениях на уровень сигнал/шум в спектрах поглощения образцов гемоглобина. Кроме этого, дитионит натрия в водных растворах очень хорошо окисляется не только за счет метформы, но и собственно за счет растворенного и дополнительно растворяющегося и связывающегося с гемоглобином кислорода из-за манипуляций, требующих разгерметизации кюветы. Это, в свою очередь, не позволяет контролировать в такой системе содержание продуктов окисления дитионита натрия (хотя бы на уровне постоянной систематической ошибки).

В совокупности, разность в поглощениях окисленной и восстановленной форм дитионита натрия, а также ошибок, возникающих из-за неконтролируемой концентрации и соотношения этих форм, приводит к существенным погрешностям в спектрах поглощения дезоксигемоглобина в областях, перекрывающихся с поглощением окисленного/восстановленного дитионита натрия (т.е. менее 380 нм). Аналогичная ситуация при определенных обстоятельствах (не избыточное содержание реагента) также может возникать для окисленной и восстановленной форм гексацианоферрата калия (см. 2.2.4.4 и 2.2.5).

Так как при дезоксигенации фетальный оксигемоглобин перешел в дезоксиформу, то из-за разницы в поглощении гемоглобинов А и F в области ароматических аминокислот (менее 320 нм) его также необходимо учесть.

Для этого раствор фетального гемоглобина, полученный из кордовой крови, дезоксигенируется азотом путем барботации. В результате раствор в основном содержит дезоксигемоглобин А и F (> 95 %). Долей мет- и

карбоксигемоглобина, в данном случае, можно пренебречь. Так как доля фетального гемоглобина известна (получена ранее, уравнение (8)), то тогда спектр дезоксигемоглобина, содержащий преимущественно долю фетального (порядка 80 %), будет вычтен из основного спектра дезоксигемоглобина (полученного из крови доноров), исходя из соотношений (15):

$$\omega_{\text{Hb}_F} = \frac{\omega_{\text{Hb}_F}^K}{\omega_{\text{Hb}_F}^L}, \quad (15)$$

где  $\omega_{\text{Hb}_F}$  — доля, с которой будет вычитаться молярный спектр фетального дезоксигемоглобина, рассчитывается как отношение доли фетального гемоглобина в растворе дезоксигемоглобина, полученного из крови доноров ( $\omega_{\text{Hb}_F}^K$ ), к доле такового, полученного из кордовой крови ( $\omega_{\text{Hb}_F}^L$ ).

Так как из молярного спектра поглощения дезоксигемоглобина вычитаются в соответствующих долях мет- и карбоксигемоглобин А, дезоксигемоглобин F, то итоговый спектр должен быть откорректирован путем умножения молярных показателей поглощения на коэффициент  $g$ , уравнение (16):

$$g = \frac{1}{1 - \omega_{\text{MnHb}_A} - \omega_{\text{Hb}_A\text{CO}} - \omega_{\text{Hb}_F}}. \quad (16)$$

Таким образом, получаем итоговый молярный спектр поглощения дезоксигемоглобина А.

### 2.2.11.3 Коррекция молярных спектров поглощения карбоксигемоглобина А

При расчете молярного спектра поглощения карбоксигемоглобина А в основу был положен спектр поглощения карбоксиформы гемоглобина, полученной барботацией угарным газом исходного или дезоксигенированного раствора гембелка (см. 2.2.4.3), выделенного из крови доноров. Полученный

спектр в основном карбоксигемоглобина А необходимо скорректировать на присутствие метгемоглобина А и карбоксигемоглобина F, получившегося из фетального окси-/дезоксигемоглобина (см. 2.2.11.2). Из молярного спектра поглощения карбоксигемоглобина вычитаем в соответствующей доле (уравнение (12)) молярный спектр поглощения метгемоглобина А.

Полученный ранее (из кордовой крови) исходный раствор или раствор дезоксигемоглобина барботируется угарным газом. В результате раствор в основном содержит карбоксигемоглобин А и F (> 95 %). Долей метгемоглобина, в данном случае, можно пренебречь. Так как доля фетального гемоглобина известна (получена ранее, уравнение (8)), то тогда спектр карбоксигемоглобина, содержащий преимущественно долю фетального (порядка 80 %), будет вычтен из основного спектра карбоксигемоглобина (полученного из крови доноров), исходя из соотношений (17):

$$\omega_{\text{Hb}_F} = \frac{\omega_{\text{Hb}_F}^K}{\omega_{\text{Hb}_F}^L}, \quad (17)$$

где  $\omega_{\text{Hb}_F}$  доля, с которой будет вычитаться молярный спектр фетального карбоксигемоглобина, рассчитывается как отношение доли фетального гемоглобина в растворе карбоксигемоглобина, полученного из крови доноров ( $\omega_{\text{Hb}_F}^K$ ), к доле такового, полученного из кордовой крови ( $\omega_{\text{Hb}_F}^L$ ).

Так как из молярного спектра поглощения карбоксигемоглобина вычитаются в соответствующих долях метгемоглобин А и карбоксигемоглобин F, то итоговый спектр должен быть откорректирован путем умножения молярных показателей поглощения на коэффициент  $g$ , уравнение (18):

$$g = \frac{1}{1 - \omega_{\text{MnHb}_A} - \omega_{\text{Hb}_F\text{CO}}}. \quad (18)$$

Таким образом, получаем итоговый молярный спектр поглощения карбоксигемоглобина А, который также будет необходим как при расчете итогового молярного спектра поглощения дезокси- (см. 2.2.11.2), так и

оксигемоглобина (см. ниже, 2.2.11.4).

#### 2.2.11.4 Коррекция молярных спектров поглощения оксигемоглобина А

При расчете молярного спектра поглощения оксигемоглобина в основу был положен спектр поглощения оксиформы, полученной барботацией кислородом раствора гембелка (см. 2.2.4.1), выделенного из крови доноров. Такой спектр оксигемоглобина необходимо скорректировать на присутствие мет- и карбоксигемоглобина А, а также фетального оксигемоглобина.

Так как в растворе с максимальной долей оксигемоглобина содержание мет- и карбоксигемоглобина известно, а их итоговые спектры рассчитаны (см. 2.2.11.1 и 2.2.11.3), то вычитанием получаем ненормированный спектр оксигемоглобина А и F.

Чтобы вычленить составляющую фетального оксигемоглобина, необходимо получить спектр его поглощения с максимальным содержанием оксиформы. Для этого раствор гемоглобина, полученный из кордовой крови, оксигенируется барботацией кислородом (см. 2.2.4.1). В результате раствор преимущественно содержит оксигемоглобин А и F (> 95 %).

Так как общая концентрация гемоглобина кордовой крови, а также доля фетального гембелка известны (см. 2.2.10 и 2.2.11, вкладом мет-, а также карбоксиформы фетального гемоглобина можно пренебречь, см. 2.2.11.2 и 2.2.11.3), то тогда спектр оксигемоглобина, содержащий преимущественно долю фетального (порядка 80 %), будет вычтен из основного спектра оксигемоглобина (полученного из крови доноров), исходя из соотношений (19):

$$\omega_{\text{Hb}_F\text{O}_2} = \frac{\omega_{\text{Hb}_F\text{O}_2}^K}{\omega_{\text{Hb}_F\text{O}_2}^L}, \quad (19)$$

где  $\omega_{\text{Hb}_F\text{O}_2}$  — доля, с которой будет вычитаться молярный спектр фетального

оксигемоглобина, рассчитывается как отношение доли фетального гемоглобина в растворе оксигемоглобина, полученного из крови доноров ( $\omega_{\text{Hb}_F\text{O}_2}^K$ ), к доле такого, полученного из кордовой крови ( $\omega_{\text{Hb}_F\text{O}_2}^L$ ).

Так как при этом молярный показатель поглощения был уменьшен на  $\omega_{\text{MnHb}_A} \varepsilon_{\lambda_i}^{\text{MnHb}_A}$ ,  $\omega_{\text{Hb}_A\text{CO}} \varepsilon_{\lambda_i}^{\text{Hb}_A\text{CO}}$  и  $\omega_{\text{Hb}_F\text{O}_2} \varepsilon_{\lambda_i}^{\text{Hb}_F\text{O}_2}$ , то и результирующий спектр следует нормировать, умножая на  $g$ , уравнение (20):

$$g = \frac{1}{1 - \omega_{\text{MnHb}_A} - \omega_{\text{Hb}_A\text{CO}} - \omega_{\text{Hb}_F\text{O}_2}}. \quad (20)$$

Таким образом, получаем итоговый молярный спектр поглощения оксигемоглобина А.

#### 2.2.11.5 Коррекция молярных спектров поглощения оксигемоглобина F

При расчете молярного спектра поглощения фетального оксигемоглобина в основу был положен спектр поглощения оксиформ А и F, доведенных в общей доле гембелка до максимальных значений за счет барботации кислородом (см. 2.2.4.1 и 2.2.11.4) раствора гемоглобина, выделенного из кордовой крови (с долей фетального гембелка порядка 80 %).

В силу того, что расчет молярного спектра поглощения фетального оксигемоглобина построен на растворе гембелка, выделенного из кордовой крови, то необходимо найти долю мет- и карбоксигемоглобина, т.к. их концентрация становится более существенной, нежели в общей доле фетального гемоглобина крови доноров (ориентировочно в 160 раз: 80 % — доля фетального гемоглобина кордовой крови к 0,5 % таковой для крови доноров). При этом общая доля мет- и карбоксигемоглобина в крови доноров и кордовой крови сопоставимы.

Содержание метформы в исходном (до оксигенации) растворе гемоглобина, полученного из кордовой крови, было определено цианидным

способом с помощью ацетонциангидрина (см. 2.2.5) и рассчитано по уравнению (21), аналогичному уравнению (11):

$$[\text{MtHb}] = \frac{\Delta A_{630} \cdot k}{\epsilon_{630}^{\text{MtHb}} - \epsilon_{630}^{\text{CNMtHb}}}, \quad (21)$$

где  $\Delta A_{630}$  — разность в поглощении растворов гемоглобина до и после добавления ацетонциангидрина;  $\epsilon_{630}^{\text{MtHb}}$  и  $\epsilon_{630}^{\text{CNMtHb}}$  — молярные показатели поглощения метгемоглобина и цианметгемоглобина при длине волны 630 нм соответственно;  $k$  — коэффициент разбавления раствора.

Доля метгемоглобина будет рассчитана из уравнения (22), подобному уравнению (12):

$$\omega_{\text{MtHb}} = \frac{[\text{MtHb}]}{[\text{Hb}^{\text{total}}]}. \quad (22)$$

Содержание карбоксигемоглобина кордовой крови вычислено способом, описанным ранее (см. 2.2.11.3).

Доля карбоксигемоглобина будет рассчитана из аналогичного отношения (23), подобному уравнению (14):

$$\omega_{\text{HbCO}} = \frac{[\text{HbCO}]}{[\text{Hb}^{\text{total}}]}. \quad (23)$$

Для получения ненормированного молярного спектра поглощения фетального оксигемоглобина необходимо вычесть составляющую поглощения оксигемоглобина А, а также составляющую поглощения метгемоглобина А и F и карбоксигемоглобина А и F.

В расчетах принимаем, что отношение долей поглощения оксигемоглобина А, метгемоглобина А и карбоксигемоглобина А пропорционально соответствующим долям фетального гемоглобина при известном соотношении суммарной доли гемоглобина А к суммарной доле гемоглобина F в кордовой крови (уравнение (8)). Так как итоговые спектры поглощения окси-, мет- и карбоксигемоглобина А известны (см. 2.2.11.4), а также получены спектры



поглощения мет- и карбоксигемоглобина из кордовой крови (см. 2.2.11.1 и 2.2.11.3) с рассчитанным общим содержанием фетального гемоглобина, то становится возможным вычислить доли этих спектров поглощения.

Молярные спектры поглощения мет- и карбоксигемоглобина А вычитаются в долях, рассчитанных по уравнениям (22) и (23) и скорректированных на относительное содержание гемоглобина А (уравнение (24)). Доля молярного спектра поглощения оксигемоглобина А рассчитана по следующему уравнению (24):

$$\omega_{\text{Hb}_A\text{O}_2} = \omega_{\text{Hb}_A}^{\text{total}} - \omega_{\text{Hb}_A}^{\text{total}} \cdot \omega_{\text{MтHb}_A} - \omega_{\text{Hb}_A}^{\text{total}} \cdot \omega_{\text{Hb}_A\text{CO}}, \quad (24)$$

где  $\omega_{\text{Hb}_A}^{\text{total}}$  — доля гемоглобина А в растворе гембелка, выделенного из кордовой крови (определяется по уравнению (8), как  $1 - \omega_{\text{Hb}_F\text{O}_2}$ , исходя из принятых допущений, см. 2.2.6 и 2.2.11.5).

Доли молярных спектров поглощения мет- и карбоксигемоглобина также могут быть рассчитаны из уравнений (12) и (14), исходя из принятых допущений.

Молярные спектры поглощения мет- и карбоксигемоглобина F вычитаются в долях, рассчитанных по уравнениям (25) и (26), исходя из уравнений (22) и (23):

$$\omega_{\text{MтHb}_F} = \omega_{\text{MтHb}} - \omega_{\text{Hb}_A}^{\text{total}} \cdot \omega_{\text{MтHb}_A}, \quad (25)$$

$$\omega_{\text{Hb}_F\text{CO}} = \omega_{\text{HbCO}} - \omega_{\text{Hb}_A}^{\text{total}} \cdot \omega_{\text{Hb}_A\text{CO}}. \quad (26)$$

Далее молярный спектр поглощения фетального оксигемоглобина должен быть нормирован по уравнению (27):

$$g = \frac{1}{1 - \omega_{\text{Hb}_A\text{O}_2} - \omega_{\text{MтHb}_A} - \omega_{\text{Hb}_A\text{CO}} - \omega_{\text{MтHb}_F} - \omega_{\text{Hb}_F\text{CO}}}. \quad (27)$$

В результате, получаем итоговый молярный спектр поглощения фетального оксигемоглобина.

Таким образом, коррекция молярных спектров поглощения осуществлялась для каждого из образцов гемоглобина. Причем для учета вклада производных фетального гемоглобина используется их среднее значение по

каждой из форм к каждому из спектров поглощения гемоглобина из крови доноров и наоборот (т.е. гемоглобина кордовой крови).

#### 2.2.12 Усреднение молярных показателей поглощения в спектрах производных гемоглобина

Конечное усреднение молярных показателей поглощения в спектрах производных гемоглобина осуществляется с помощью средней арифметической после получения итоговых спектров поглощения.

Расчет средней арифметической величины до получения итоговых спектров поглощения, как конечной операции, нецелесообразен, т.к. каждый из образцов крови доноров (или кордовой крови рожениц) характеризуется своим набором отношений производных гемоглобина, прежде всего мет- и карбокси форм. Это приведет к увеличению вариабельности в спектрах поглощения гемоглобина крови доноров (кордовой крови).

Однако при коррекции молярных спектров поглощения применялись вычисления средней арифметической по вспомогательным спектрам (см. 2.2.6 и 2.2.11).

### Глава 3. РАЗРЕШЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПЕРЕКРЫВАЮЩИХСЯ ПОЛОС ПОГЛОЩЕНИЯ ХРОМОФОРОВ БЕЛКОВ В ДИАПАЗОНЕ ДЛИН ВОЛН 240–320 НМ

#### 3.1 Разрешение полос поглощения в спектрах белков с помощью второй производной

Несмотря на развитие новых методов исследования, молекулярная абсорбционная спектроскопия электронных переходов остается одним из наиболее универсальных, эффективных и доступных методов при анализе как структурных, так и функциональных свойств биомакромолекул [4, 26, 53, 163]. С ее помощью накоплены обширные и наиболее существенные результаты о перестройках, происходящих в молекулах белков или их составных частях под влиянием целого ряда физико-химических факторов [4].

Полученные данные, преимущественно, относятся к исследованию спектральных свойств макромолекул в области поглощения боковых групп ароматических аминокислот и свидетельствуют об изменениях в диапазоне длин волн 240–320 нм ( $\lambda_{max} \approx 280$  нм [4, 51]). Зачастую эти вариации связываются с разворачиванием/сворачиванием белковой глобулы, сопровождающимся экспонированием/экранированием ее хромофорных групп относительно поверхности белковой макромолекулы [4]. Однако такого рода оценка является малоинформативной и не учитывает вклад отдельных компонент, поскольку, как правило, в ультрафиолетовом (и видимом) диапазонах длин волн спектры поглощения белков, в отличие от атомов и простых молекул, характеризуются широкими перекрывающимися полосами, что существенно затрудняет их интерпретацию.

Увеличение разрешения в этих спектрах можно достичь с помощью дифференцирования, т.е. исследования зависимостей вида:  $d^n A/d\lambda^n = f^{(n)}(\lambda)$ , где  $n$  — порядок производной. Физический смысл производной заключается в том, что

оценивается мгновенная скорость изменения дифференцируемой величины, в данном случае поглощения. Повторное дифференцирование будет означать скорость изменения скорости (ускорения в классической механике) и т.д. Следовательно, производные различных порядков позволяют оценить степень «выраженности изменения» исследуемой величины при  $\Delta\lambda \rightarrow 0$ , что дает возможность выявить плохо разрешенные полосы поглощения в макромолекуле.

Для производной первого порядка отсутствие изменений прироста величины обращает ее в ноль, что означает наличие экстремума в исходном спектре. Однако для второй производной эта нулевая точка будет представлять собой экстремум — минимальный прирост величины относительно соседних точек, что соответствует пику поглощения недифференцированного спектра. Дальнейшее увеличение порядка дифференцирования сопряжено с рядом определенных трудностей методического характера [3, 9].

В ходе проведенных экспериментов нами были получены спектры поглощения растворов гемоглобина человека и его производных, спектры поглощения каталазы, выделенной из печени быка, спектры поглощения бычьего сывороточного альбумина и спектры поглощения трипсина, выделенного из поджелудочной железы быка.

Несмотря на принимаемые меры по снижению систематических ошибок при регистрации спектров поглощения (см. 2.2.9), окончательно разрешить эту проблему не представляется возможным. Это обусловлено тем, что такие ошибки возникают на всех этапах исследования: начиная от примесей в той или иной партии реактивов, степени их очистки и аппаратной ошибки при калибровке приборов в серии экспериментов и заканчивая методиками определения концентрации веществ и алгоритмами фильтрации шумов получаемых данных.

В связи с этим, чтобы минимизировать вклад данных ошибок, эксперименты проводились по различным протоколам. Эти протоколы включали в себя позиции, начиная от использования наборов реагентов разных производителей, молярности/ионной силы растворов и концентрации веществ до применения в работе различающихся по серии и типу спектрофотометров, шагу

сканирования спектров и последующей обработки результатов измерений. Тем не менее, цель работы не предусматривала исследование спектров поглощения образцов на предмет их воспроизводимости для широкого класса устройств: от полевых приборов до стационарного оборудования исследовательского класса, работающих в различных режимах измерения, а также вариабельности экспериментов по другим показателям. В табл. 1 приведены протоколы наших исследований только в тех позициях, где существуют различия между ними.

Таблица 1. Протоколы экспериментов

Параметр	Вариант		
	А	В	С
Образец белка	Выделен из крови человека в лаборатории		Коммерческий препарат
Отмывка эритроцитов: изотонический раствор (производитель реагентов)	INEOS Enterprises	PanEco	—
pH-метр	Hanna 211	S20-K Seven Easy	
Натрий- фосфатный буфер (производитель реагентов)	Sigma-Aldrich	PanEco	
Молярность буфера, моль/л	0,1	0,01	
Спектрофотометр	Shimadzu-2401(PC)	Shimadzu-2550(PC)	
Шаг сканирования, нм	0,5	0,2	
Фильтрация шумов	NURBS	KBLF	
Определение концентрации белка (метод)	Спектрофотометрически, по системе уравнений	Метгемоглобин-цианидный	Навеска образца в заданном объеме растворителя
Набор аминокислот для создания аддитивной модели белка (производитель реагентов)	Ajinomoto	PanEco	
Определение концентрации аминокислот (метод)	Навеска образца в заданном объеме растворителя		

На рис. 9 показан спектр поглощения гемоглобина человека (содержащего в основном оксиформу гемоглобина А), в диапазоне длин волн 240–320 нм с  $\lambda_{max}=274,2$  нм (кривая 1;  $n = 6$ , протокол эксперимента — вариант «А»).

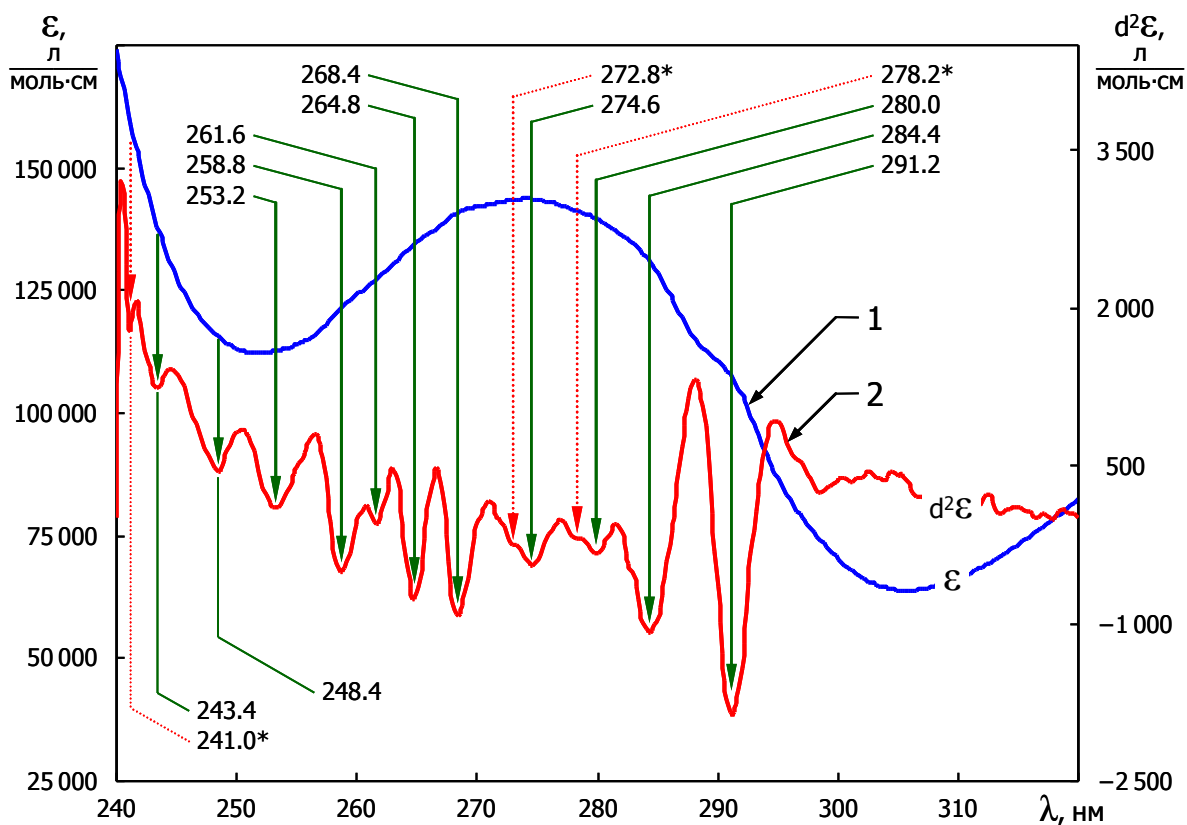


Рис. 9. Молярный спектр поглощения гемоглобина человека

Обозначения: гемоглобин (1), его вторая производная (2). Здесь и на других аналогичных рисунках: пунктиром и знаком «\*» отмечены возможные полосы поглощения;  $\epsilon$  — молярный показатель поглощения;  $d^2\epsilon$  — вторая производная молярного показателя поглощения

Примечание: протокол эксперимента — вариант «А»

Полученные результаты полностью согласуются с литературными данными [4, 15].

Анализ второй производной этих спектров позволил выявить ряд скрытых полос, обусловленных, прежде всего, поглощением боковых групп ароматических аминокислотных остатков, входящих в состав белковой молекулы (рис. 9, кривая 2). Кроме установленной с помощью второй производной полосы поглощения с  $\lambda_{max}=274,6$  нм, нами обнаружено еще 10 плохо разрешенных полос, которые просуммированы в табл. 2 (столбец «Hb<sup>total</sup>»).

Таблица 2. Плохо разрешенные полосы в спектрах поглощения белков, выявленные с помощью второй производной (часть 1)

Полоса, №	Длина волны, нм					
	Hb <sup>total</sup>	Hb <sub>A</sub> O <sub>2</sub>	Hb <sub>A</sub> CO	Hb <sub>A</sub>	MtHb <sub>A</sub>	Hb <sub>F</sub> O <sub>2</sub>
1	241,0*	240,8*	240,8*	241,2*	241,2*	241,6*
2	243,4	243,0	243,2	242,2	243,0	243,4
3	—	244,8*	244,4*	244,0*	245,4*	245,0*
4	—	246,0*	245,4*	245,8*	247,0*	246,8*
5	248,4	247,8	247,8	248,0	248,2	248,6
6	—	249,8*	250,4*	250,0*	250,2*	250,0*
7	—	252,0*	252,0*	252,0*	252,2*	252,2*
8	253,2	253,6	253,0	253,2	253,2	253,4
9	—	255,4*	255,2*	255,6*	255,6*	255,6*
10	258,8	258,6	258,6	258,6	258,8	258,6
11	261,6	261,8	261,6	261,8	261,8	261,8
12	264,8	264,8	264,8	264,6	264,6	264,4
13	268,4	268,6	268,4	268,6	268,4	268,0
14	—	271,6*	271,8*	271,4*	271,4*	271,2*
15	272,8*	273,2	273,8	273,2	273,4	273,8
16	274,6	275,0	275,4	274,8	274,8	275,2
17	278,2*	278,2	278,8	280,2	278,6	278,0
18	280,0	280,8	280,2	282,4	280,6	279,2
19	284,4	284,4	284,6	285,8	284,4	283,2
20	291,2	291,4	291,2	291,4	291,2	289,8

Примечание: «\*» — возможные пики полос поглощения, «—» — пики не определялись

Для того чтобы выяснить роль гемовой компоненты в формировании пиков второй производной спектров поглощения гембелка в исследуемом диапазоне длин волн нами были изучены спектры светопоглощения оксигемоглобина  $A$ , карбоксигемоглобина  $A$ , дезоксигемоглобина  $A$  и метгемоглобина  $A$ . В такой постановке эксперимента апобелковая компонента макромолекулы постоянна, как минимум, в первичной структуре, что позволяет отследить на начальном этапе сигнал, представляющий собой суперпозицию сигналов от спектра поглощения гема в составе белка и сигналов, обусловленных изменением микроокружения хромофоров боковых групп аминокислот при изменении типа лиганда и/или степени окисления гемового железа.

В этой части исследований был использован вариант «В» протокола эксперимента. Это позволяет контролировать возможные систематические ошибки. Так, если обнаруженные ранее для гемоглобина (табл. 2, «Hb<sup>total</sup>») плохо разрешенные полосы поглощения не выявляются или регистрируются новые, которые прежде не были отмечены, то вероятно имеет место систематическая ошибка, интерпретируемая как плохо разрешенный пик. В то же время, отсутствие тех или иных пиков поглощения может указывать и на очень слабый сигнал, который, в свою очередь, может маскироваться шумовой составляющей в спектрах поглощения.

На недифференцированных спектрах поглощения производные гемоглобина человека характеризуются следующими максимумами: Hb<sub>A</sub>O<sub>2</sub> — 274,6 нм; Hb<sub>A</sub>CO — 269,0 нм; Hb<sub>A</sub> — 269,0 нм и MtHb<sub>A</sub> — 268,8 нм (рис. 10–13, кривая 1).

Анализ второй производной полученных спектров гемоглобина ожидаемо показал ряд плохо разрешенных полос (рис. 10–13, кривая 2), которые сведены в табл. 2.

Из представленных данных следует, что вариации гемовой компоненты по типу лиганда и степени окисления гемового железа не оказывают заметного влияния на положение пиков вторых производных спектров поглощения гемоглобина. Таким образом, для второй производной спектры поглощения



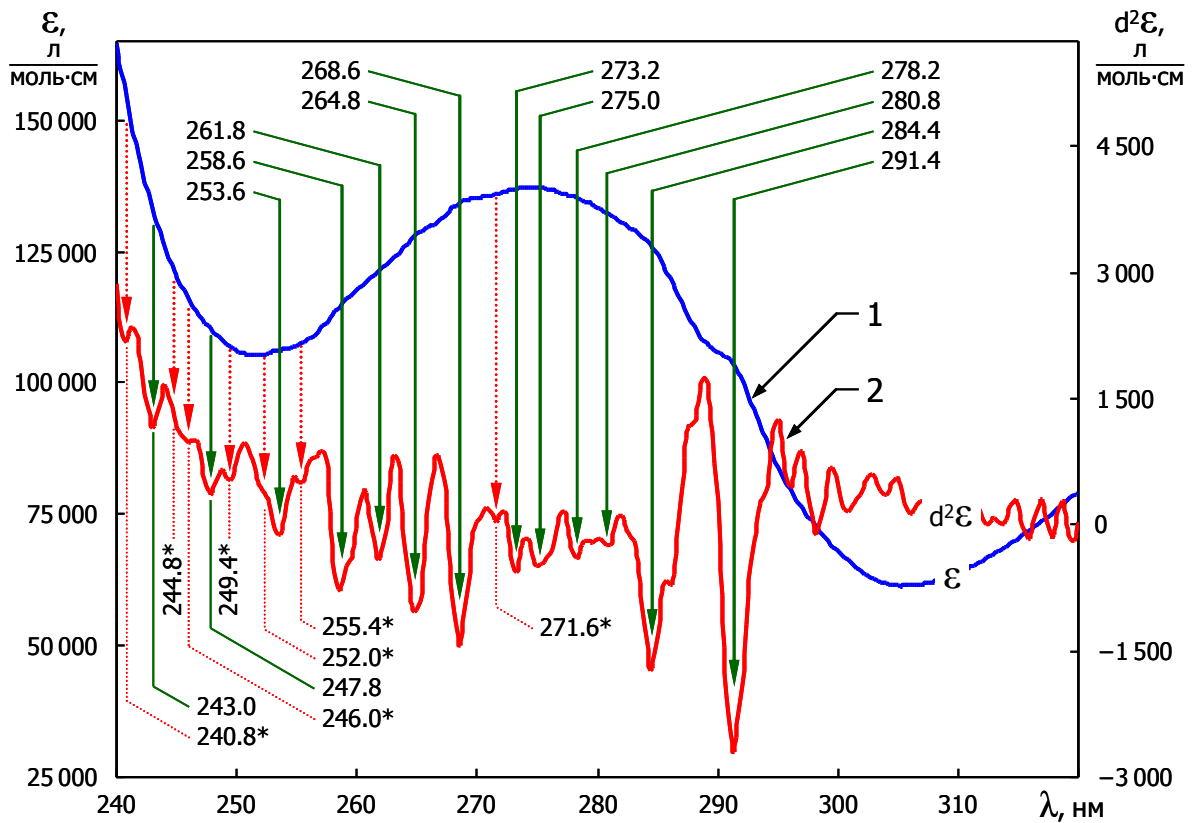


Рис. 10. Молярный спектр поглощения оксигемоглобина А

Обозначения: оксигемоглобин (1), его вторая производная (2)

Примечание: протокол эксперимента — вариант «В»

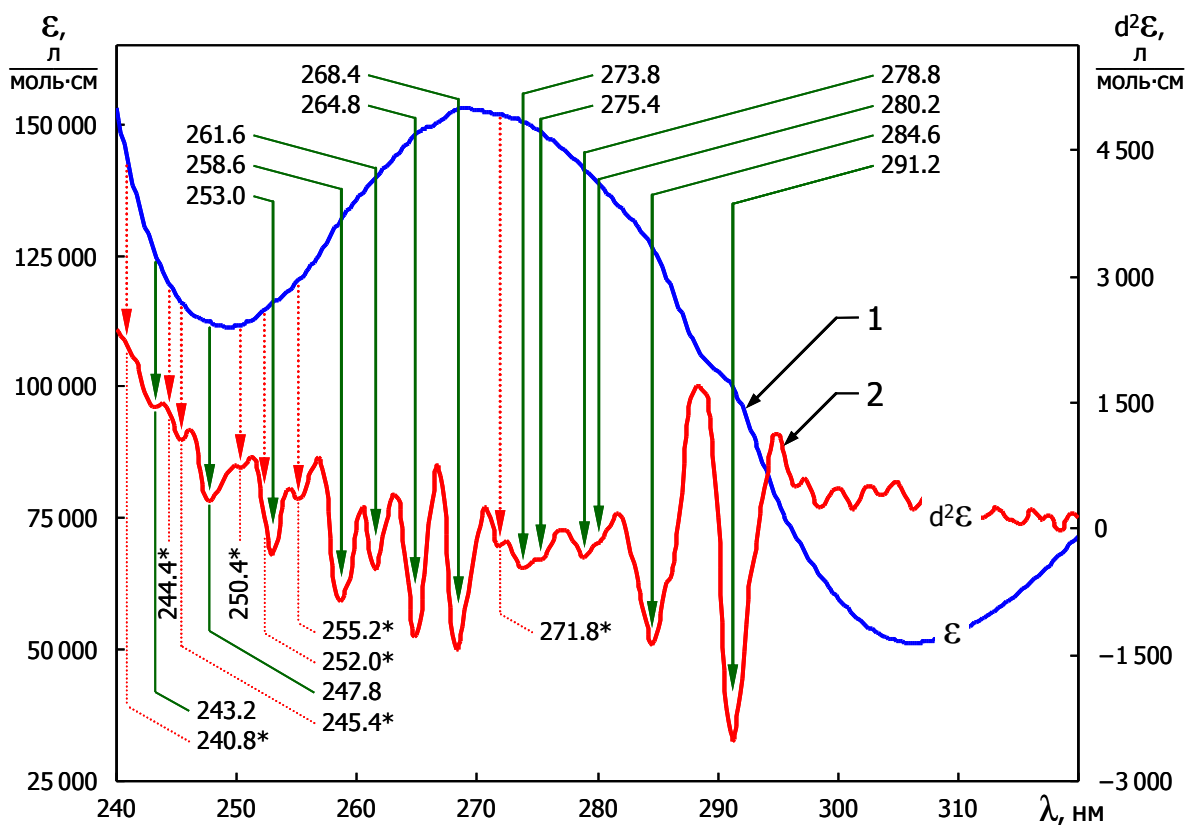


Рис. 11. Молярный спектр поглощения карбоксигемоглобина А  
 Обозначения: карбоксигемоглобин (1), его вторая производная (2)  
 Примечание: протокол эксперимента — вариант «В»

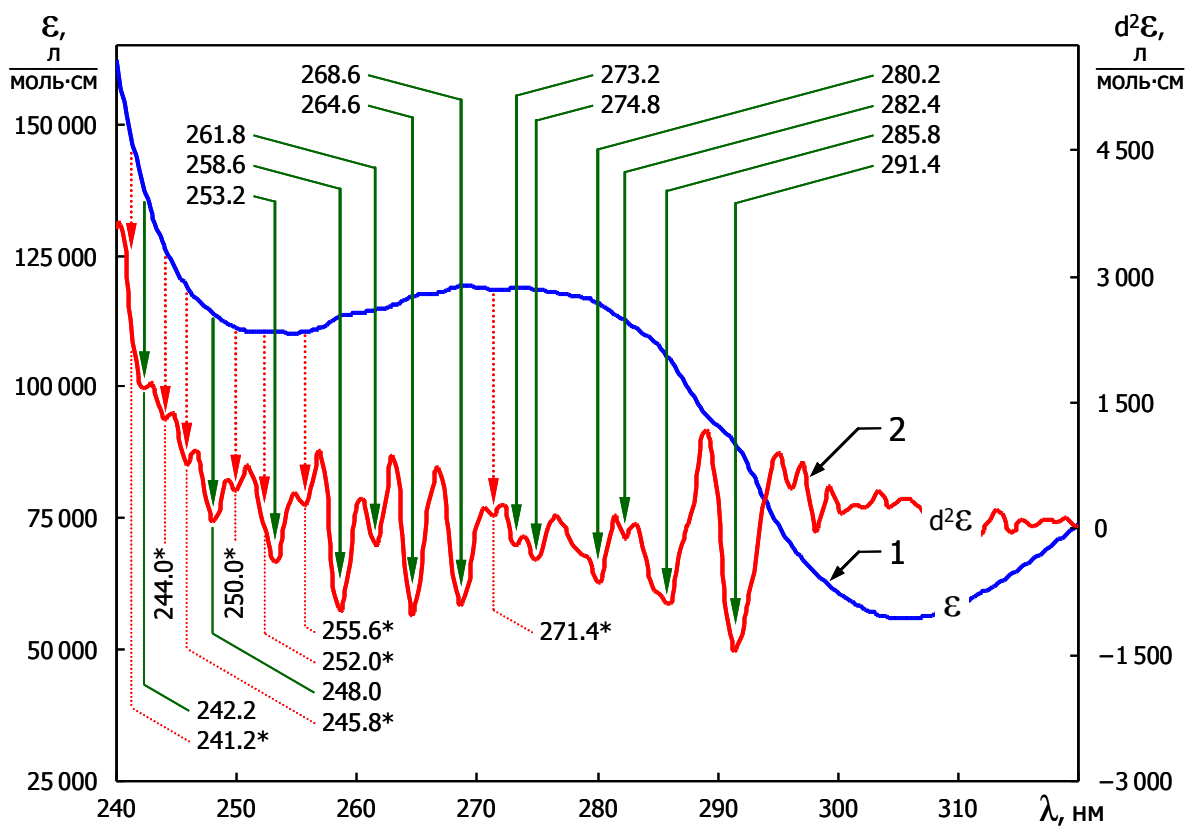


Рис. 12. Молярный спектр поглощения дезоксигемоглобина А  
 Обозначения: дезоксигемоглобин (1), его вторая производная (2)  
 Примечание: протокол эксперимента — вариант «В»

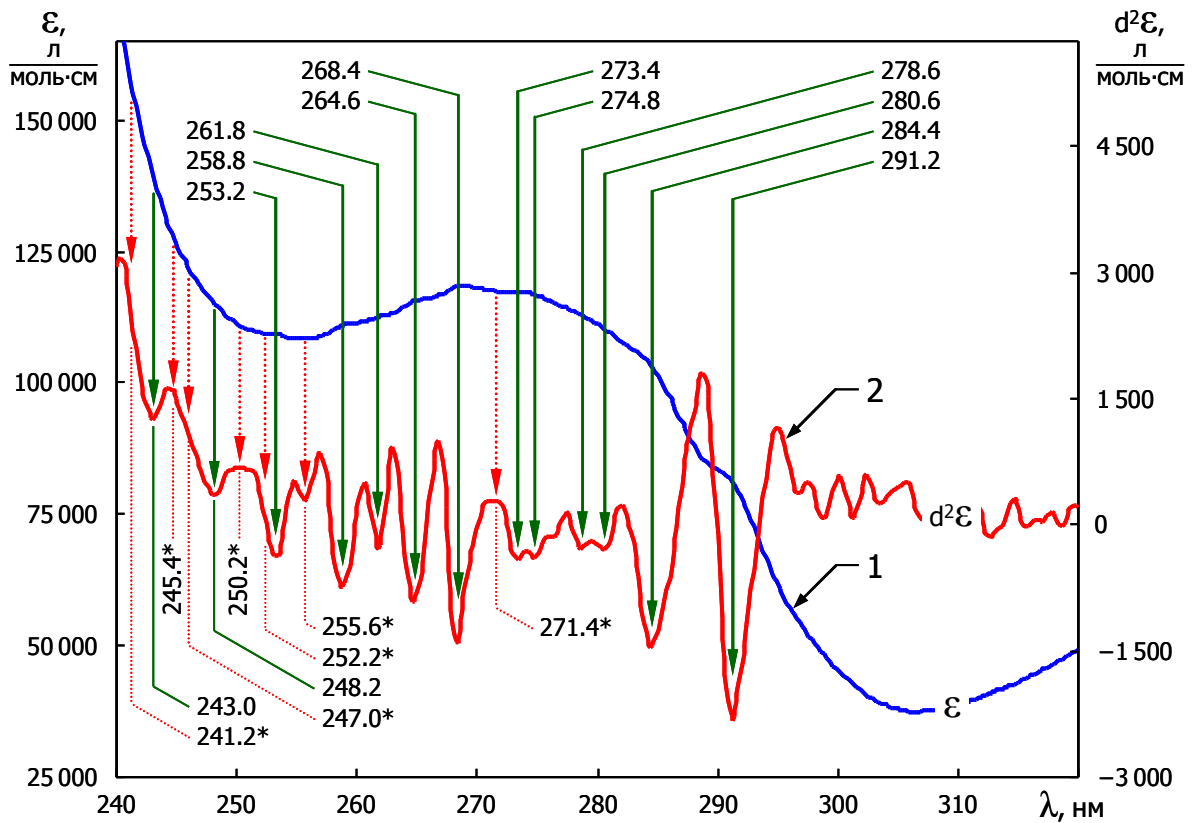


Рис. 13. Молярный спектр поглощения метгемоглобина А

Обозначения: метгемоглобин (1), его вторая производная (2)

Примечание: протокол эксперимента — вариант «В»

гемовой составляющей в первом приближении «оптически прозрачны». Это обстоятельство может указывать или на отсутствие полос поглощения гемов вообще, или на их слишком большую спектральную полуширину (размытость). Из-за ограничений, накладываемых шумом в спектре, нахождение таких полос поглощения представляет определенную трудность. Однако с позиции анализа второй производной спектров поглощения апобелковой компоненты, эта особенность позволяет исследовать хромофоры боковых групп аминокислот в составе белка без его разделения на апобелковую и небелковую составляющие.

Следует также отметить, что положение пиков второй производной спектров поглощения по оси абсцисс, в целом, консервативно. Девиации положения пиков связаны как со случайной ошибкой, так и вероятно, с полезным сигналом: изменениями в спектре поглощения гема и спектрах поглощения радикалов боковых групп аминокислот, зависящими от их микроокружения в процессе окисления/восстановления или оксигенации/дезоксигенации молекулы гембелка.

Для оценки степени изменения в положении пиков второй производной спектров поглощения гемоглобина при варьировании аминокислотного состава макромолекулы нами был исследован спектр поглощения оксигемоглобина F. Данный тип гембелка отличается от оксигемоглобина A только апобелковой составляющей в части замены одних аминокислотных остатков другими при их одинаковом количестве в  $\beta$ - и  $\gamma$ -цепях (146 остатков). В видимом диапазоне спектры поглощения оксигемоглобина A и F идентичны [170]. Следует ожидать совпадения спектров поглощения их гемовых компонент и в диапазоне длин волн 240–320 нм. Таким образом, система  $\text{Hb}_A\text{O}_2/\text{Hb}_F\text{O}_2$  является «инверсной» моделью к системе  $\text{Hb}_A\text{O}_2/\text{Hb}_A\text{CO}/\text{Hb}_A/\text{MtHb}_A$ .

На рис. 14 (кривая 1) представлен спектр поглощения оксигемоглобина F с  $\lambda_{\text{max}}=273,6$  нм (протокол эксперимента — вариант «B»). Вторая производная спектров поглощения гембелка также показала ряд плохо разрешенных полос (рис. 14, кривая 2), которые представлены в табл. 2.

Замена одних аминокислотных остатков другими вызывает

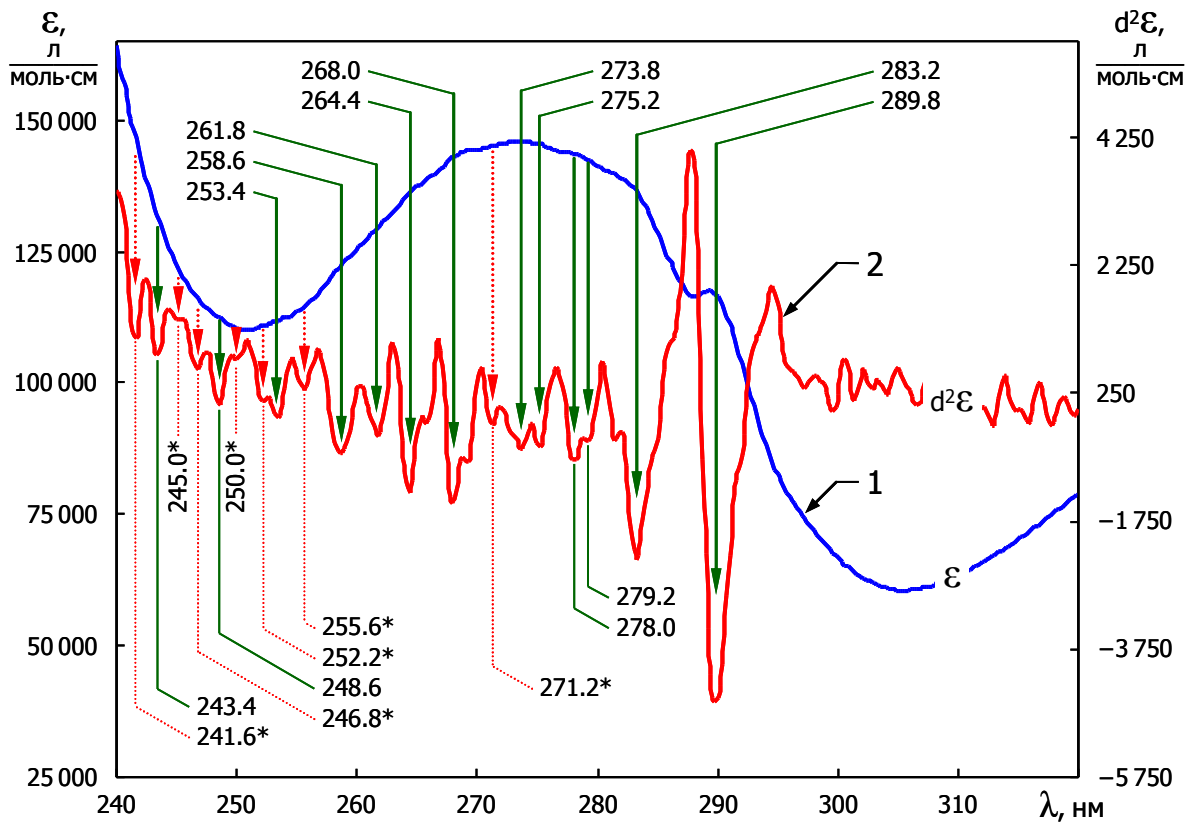


Рис. 14. Молярный спектр поглощения оксигемоглобина F

Обозначения: оксигемоглобин (1), его вторая производная (2)

Примечание: протокол эксперимента — вариант «B»

соответствующие изменения в положении пиков второй производной в спектре поглощения  $\text{Hb}_F\text{O}_2$  относительно  $\text{Hb}_A\text{O}_2$  (№ полосы: 19, 20, табл. 2). Однако положение остальных пиков поглощения второй производной, в целом, сохраняет свою устойчивость.

Из данных также следует, что изменения в апобелковой части молекулы сильнее отражаются на положении пиков второй производной спектров поглощения, нежели изменения в гемовой части. Вероятно, для дезоксигемоглобина более выраженные отличия в изменении положения пиков второй производной относительно других форм гемоглобина А являются, соответственно, следствием бóльшего изменения в микроокружении хромофоров апобелка, чем для других гемпроизводных биополимера, а не спецификой поглощения света гемом в дезоксиформе (табл. 2, полосы № 18, 19). Эти особенности будут проанализированы в следующих главах.

Представляет интерес, как хорошо могут быть разрешены пики второй производной в спектрах поглощения белков в зависимости от их аминокислотного состава, массовой доли простетических групп и насколько консервативно положение этих пиков.

С этой целью изучены спектры поглощения некоторых простых и сложных белков, являющихся коммерческими продуктами: гемоглобин человека (CAS 9008-02-0, Sigma-Aldrich), каталаза печени быка (CAS 9001-05-2, Sigma-Aldrich), альбумин бычий сывороточный (CAS 9048-46-8, Sigma-Aldrich), трипсин поджелудочной железы быка (CAS 9002-07-7, Sigma-Aldrich). В этой части работы исследования осуществлялись по протоколу эксперимента в варианте «С».

Спектр поглощения гемоглобина человека (содержащего преимущественно окисленную форму, вероятно, различного состава по типу присоединенного лиганда, т.е.  $\text{MtHb}(\text{H}_2\text{O})$  и  $\text{MtHb}(\text{OH}^-)$ ) представлен на рис. 15 ( $\lambda_{\text{max}}=274,4$  нм, кривая 1). Спектры поглощения каталазы ( $\lambda_{\text{max}}=277,0$  нм), альбумина ( $\lambda_{\text{max}}=278,6$  нм) и трипсина ( $\lambda_{\text{max}}=278,6$  нм) показаны на рис. 16–18 (кривая 1). Примечателен тот факт, что уменьшение доли гемовой компоненты (каталаза) приводит к смещению максимума поглощения в спектре этого белка в

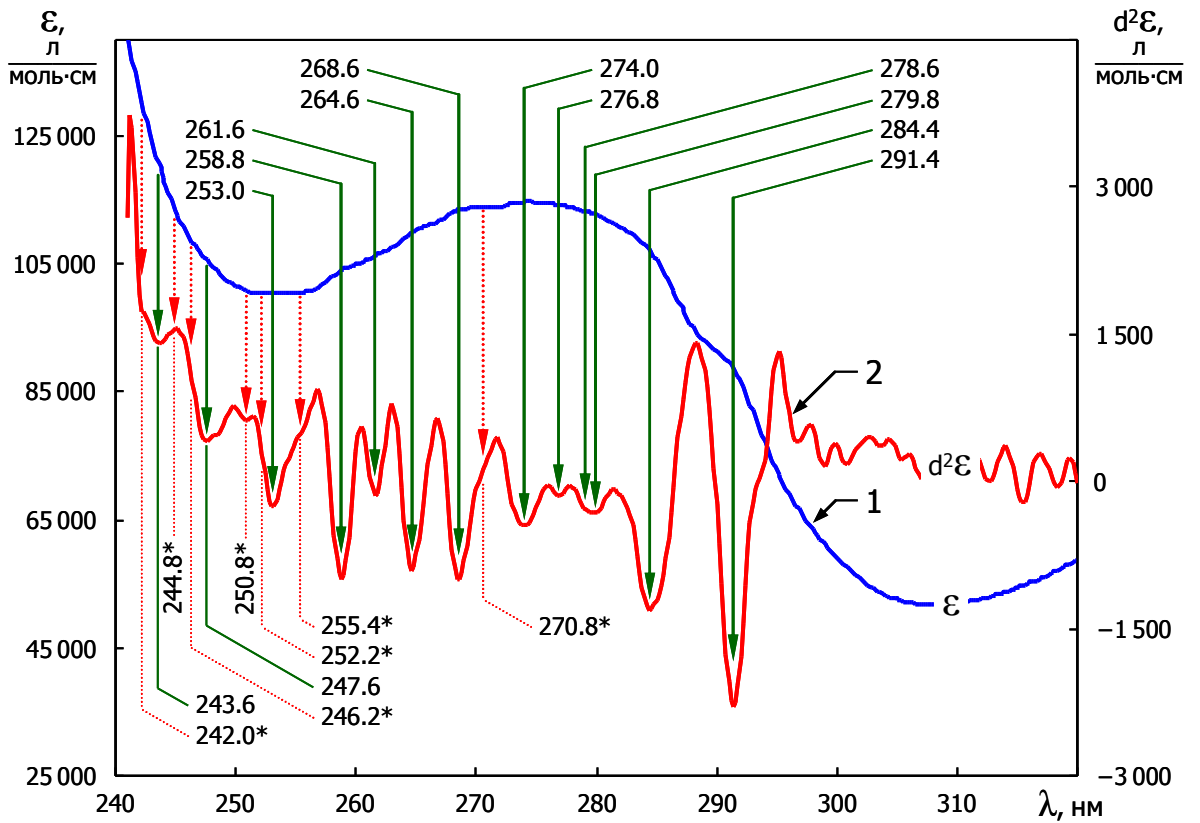


Рис. 15. Молярный спектр поглощения гемоглобина  
(CAS 9008-02-0)

Обозначения: гемоглобин (1), его вторая производная (2)

Примечание: протокол эксперимента — вариант «С»



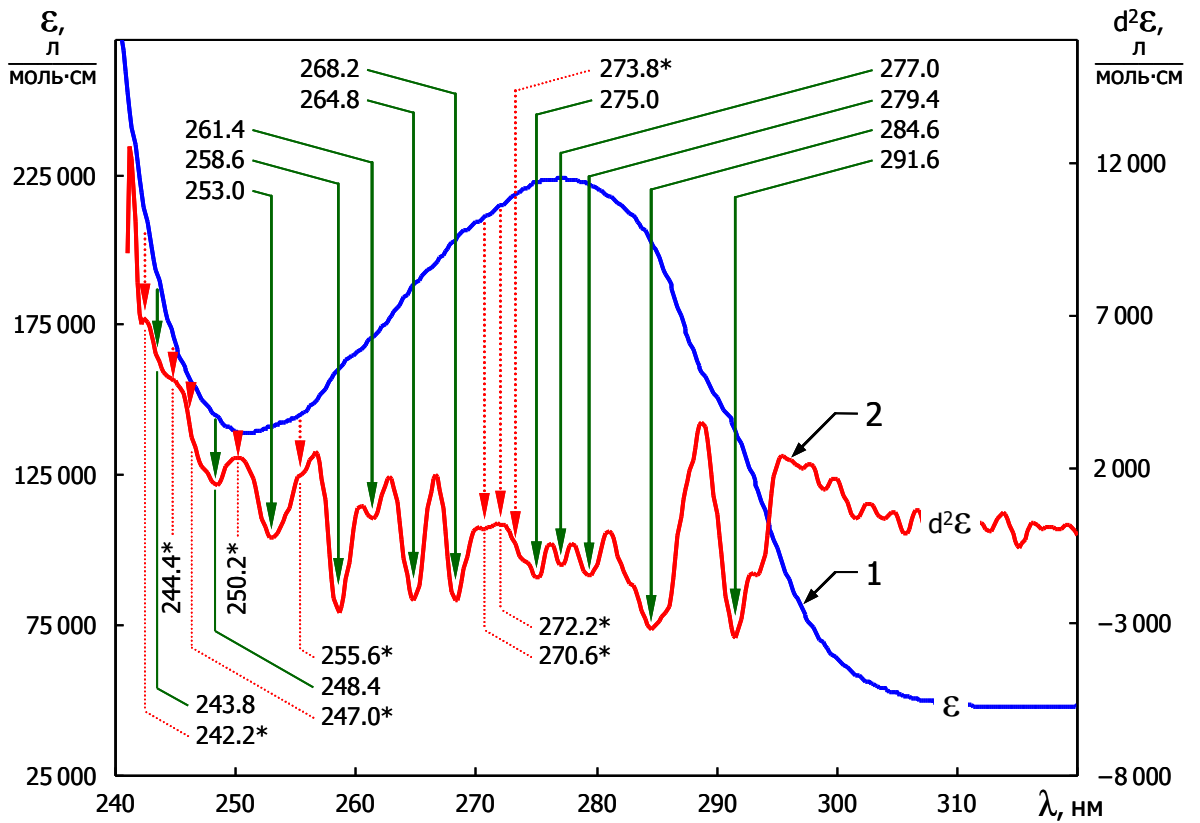


Рис. 16. Молярный спектр поглощения каталазы (CAS 9001-05-2)

Обозначения: каталаза (1), его вторая производная (2)

Примечание: протокол эксперимента — вариант «С»

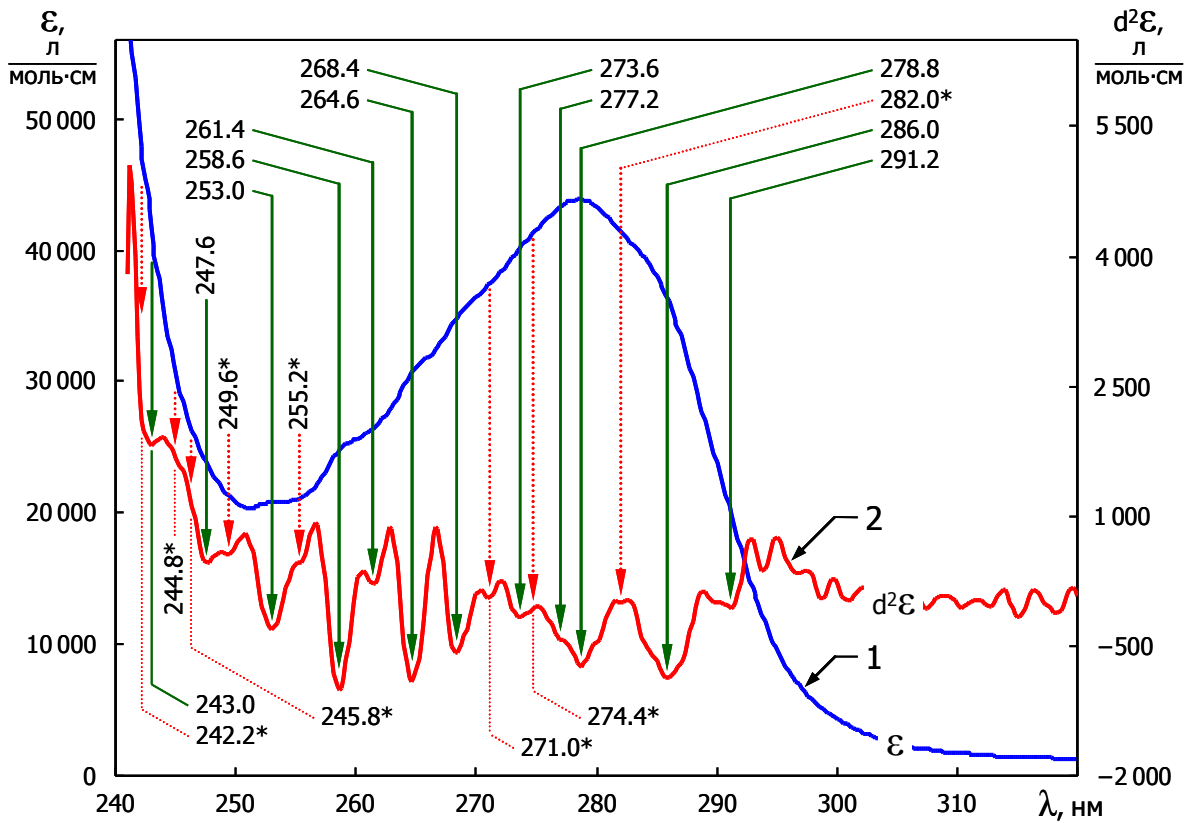


Рис. 17. Молярный спектр поглощения альбумина  
(CAS 9048-46-8)

Обозначения: альбумин (1), его вторая производная (2)

Примечание: протокол эксперимента — вариант «С»

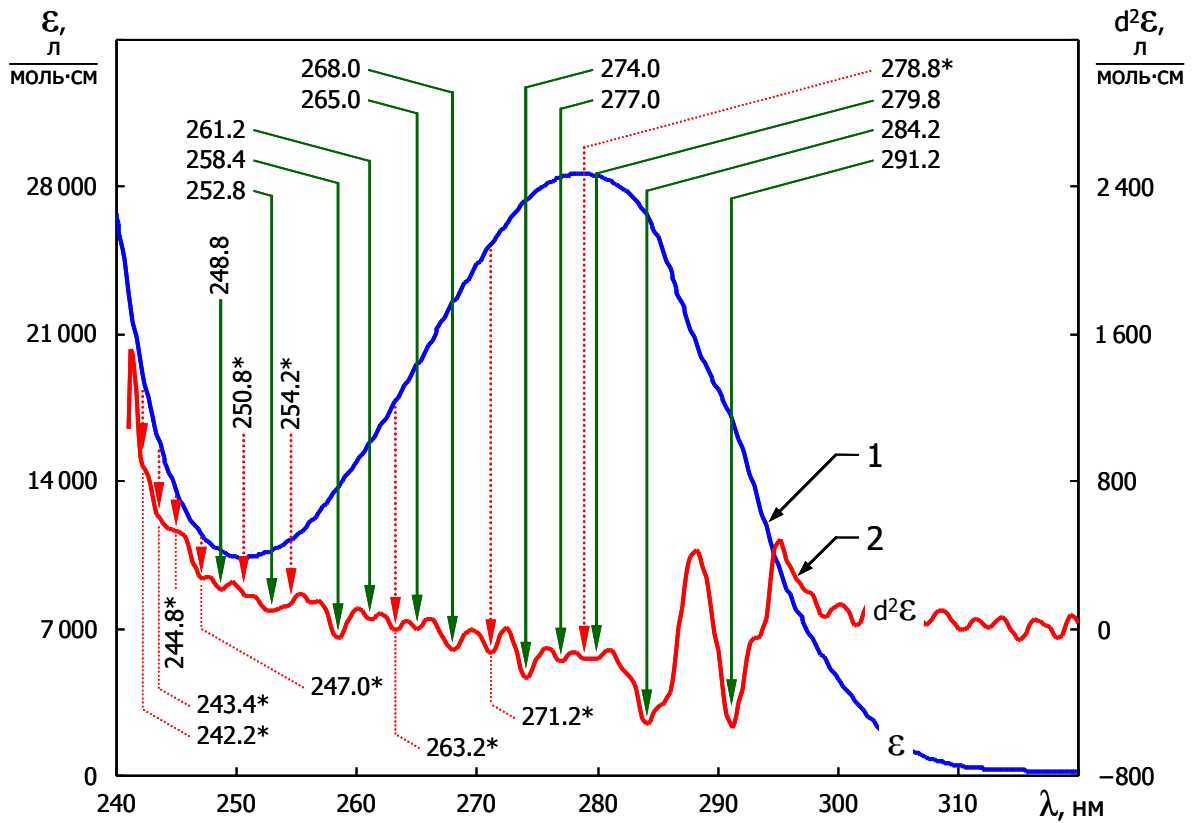


Рис. 18. Молярный спектр поглощения трипсина  
(CAS 9002-07-7)

Обозначения: трипсин (1), его вторая производная (2)

Примечание: протокол эксперимента — вариант «С»

сторону бóльших длин волн, к значениям пиков поглощения простых белков.

Анализ второй производной полученных спектров белков ожидаемо показал ряд скрытых полос поглощения (рис. 15–18, кривая 2, табл. 3).

Таблица 3. Плохо разрешенные полосы в спектрах поглощения белков, выявленные с помощью второй производной (часть 2)

Полоса, №	Длина волны, нм			
	Гемоглобин, CAS 9008-02-0	Каталаза, CAS 9001-05-2	Альбумин, CAS 9048-46-8	Трипсин, CAS 9002-07-7
1	242,0*	242,2*	242,2*	242,2*
2	243,6	243,8	243,0	243,4*
3	244,8*	244,4*	244,8*	244,8*
4	246,2*	247,0*	245,8*	247,0*
5	247,6	248,4	247,6	248,8
6	250,8*	250,2*	249,6*	250,8*
7	252,2*	—	—	—
8	253,0	253,0	253,0	252,8
9	255,4*	255,6*	255,2*	254,2*
10	258,8	258,6	258,6	258,4
11	261,6	261,4	261,4	261,2
12	264,6	264,8	264,6	263,2* 265,0
13	268,6	268,2	268,4	268,0
14	270,8*	270,6* 272,2*	271,0*	271,2*
15	274,0	273,8* 275,0	273,6 274,4*	274,0
16	276,8	277,0	277,2	277,0
17	278,6	—	278,8	278,8*
18	279,8	279,4	282,0*	279,8
19	284,4	284,6	286,0	284,2
20	291,4	291,6	291,2	291,2

*Примечание: «\*» — возможные пики полос поглощения, «—» — пики не определялись*

На рис. 19 показаны области поглощения гомологичных пиков второй

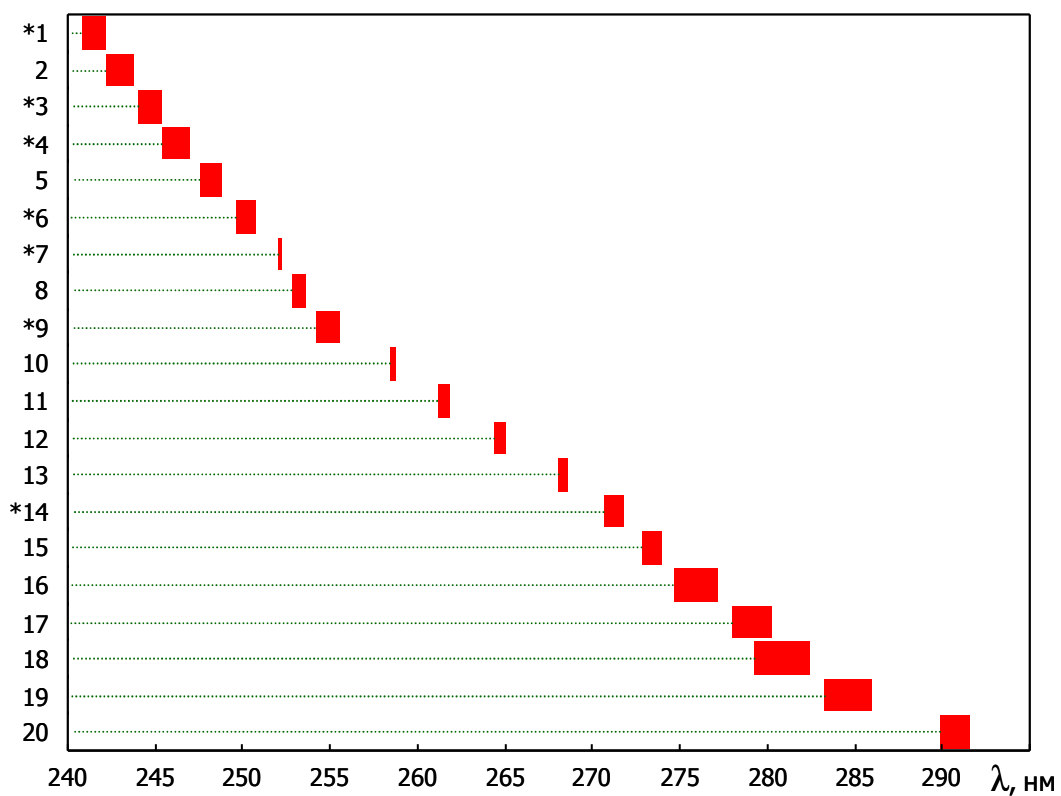


Рис. 19. Диаграмма расположения областей, в которых наблюдаются гомологичные пики вторых производных спектров поглощения белков

Обозначения: по оси ординат — номер полосы поглощения в соответствии с табл. 3 и 4; «\*» — области с возможными полосами поглощения

производной спектров белков. Сформированные области представляют собой интервал между наименьшим и наибольшим значением (по оси абсцисс) гомологичных пиков для всех изучаемых нами белков.

В данном случае использование крайних членов вариационного ряда позволяет наиболее строго указать диапазон варьирования положения соответствующего пика.

Применение таких статистических показателей как средние величины, ошибка средней, стандартное отклонение и доверительный интервал потребует, с одной стороны, проведение дополнительных избыточных оценок (однородность и равенство выборки, тест на нормальность распределения и т.д.), с другой — сужает искомую область, и поэтому нецелесообразно.

Наличие подобных устойчивых обособленных областей пиков вторых производных позволяет осуществлять прогноз положения данных максимумов, вероятно, для всех белков, а аномалии в их расположении могут представлять дополнительный интерес при изучении макромолекул. С другой стороны, в рамках проведенного исследования, такие зоны также позволяют выполнять самоконтроль, сузить поиск и облегчают дифференцировку полезного сигнала относительно случайных и систематических ошибок, как например, в случае со второй производной спектра поглощения трипсина в области 240–270 нм, где такой сигнал слабо выражен. Варьирование  $\Delta\lambda$  для этих областей может указывать как на различные соотношения типов боковых групп аминокислот, так и на изменение их микроокружения.

Таким образом, по второй производной удалось выявить в общей сложности 20 пиков, которые ассоциированы с полосами поглощения в спектрах белков. Вместе с тем на данном этапе некоторые пики, отмеченные как «возможные», дифференцировать относительно систематических ошибок не удалось. Для того чтобы снять эту неопределенность, в дальнейшем потребуется проведение дополнительных тестов (см. 3.2).

### 3.2 Соотнесение полос поглощения в спектрах белков к полосам поглощения в спектрах аддитивных моделей

Очевидным решением в установлении происхождения полос в спектрах поглощения белков может быть их сопоставление с таковыми для хромофоров боковых групп свободных аминокислот, входящих своими остатками в состав макромолекулы [23].

Однако это не совсем корректно. Суперпозиция поглощения аминокислотных остатков формирует некоторое подобие интерференционной картины. Так, в крайних случаях, наблюдаемые полосы поглощения в белке могут отсутствовать в спектрах светопоглощения отдельно взятых аминокислот, или полосы поглощения этих аминокислот могут быть нивелированы локальными минимумами в макромолекуле. Кроме этого, возможна масса комбинаций, когда полосы поглощения в белке могут быть смещены по абсциссе относительно таковых для свободных аминокислот.

Одним из возможных путей в идентификации полос поглощения белков является сравнительный анализ спектра светопоглощения раствора биополимера и аддитивного спектра, полученного в результате суммирования парциальных спектров растворов аминокислот, входящих в состав макромолекулы. Очевидно, что при этом не учитываются наличие внутримолекулярных связей, полярность локального окружения, расположение боковых групп в молекуле белка и т. д.

Тем не менее, такой подход позволяет более корректно установить происхождение полос поглощения в молекуле белка, относительно сравнения по отдельным свободным аминокислотам, а также дает возможность использовать модельный спектр в качестве базового при анализе особенностей микроокружения экспонированных аминокислотных остатков макромолекулы и оценки их приблизительного количества.

Таким образом, при идентификации полос поглощения в спектрах белков в наших исследованиях первым шагом стало сопоставление пиков второй производной в спектрах светопоглощения макромолекул и их аддитивных

моделей.

Так как существуют вполне определенные устойчивые области пиков поглощения второй производной спектров белков (рис. 19), то для сопоставления спектров нативных макромолекул и их моделей достаточно биополимера одного типа. Для этих целей был использован спектр поглощения гемоглобина человека (рис. 9, 20 кривая 2), к которому была построена его аддитивная модель по апобелку (рис. 20, кривая 1, протокол эксперимента — вариант «А»).

Исходная модель спектра поглощения апогемоглобина получена путем сложения парциальных спектров молярного поглощения фенилаланина (F), тирозина (Y), триптофана (W), гистидина (H), цистеина (C) и метионина (M) в соотношении 30:12:6:38:6:6 по данным аминокислотного состава этого белка (PDB 1BZ0) [144].

Как следует из представленных данных (рис. 20), пики второй производной спектра поглощения нативного гемоглобина находятся в хорошем соответствии с таковыми для аддитивной модели по критериям: форма, относительные соотношения их амплитуды и положения. Для пиков нативного гемоглобина характерен положительный волновой сдвиг относительно модельного спектра, что хорошо соотносится с теоретическими представлениями [28].

Аномалий в положении пиков нативного гемоглобина относительно модели не обнаружено. Пики, отмеченные как возможные, также имеют положительные сдвиги, а  $\Delta\lambda$  таких сдвигов коррелирует с ближайшими значениями для надежно определяемых максимумов.

В совокупности это не позволяет исключить ненадежно определяемые пики как систематические ошибки. Другими словами, чтобы подтвердить наличие такой ошибки, необходимо отсутствие волнового сдвига между гомологичными пиками в спектре белка и его модели, и что может быть предложено в качестве обратного к указанному тесту (т.е. «от противного»). Кроме этого, предыдущий тест (см. 3.1), который базировался на отсутствии соответствия между гомологичными пиками, находящимися на одной длине волны для спектров



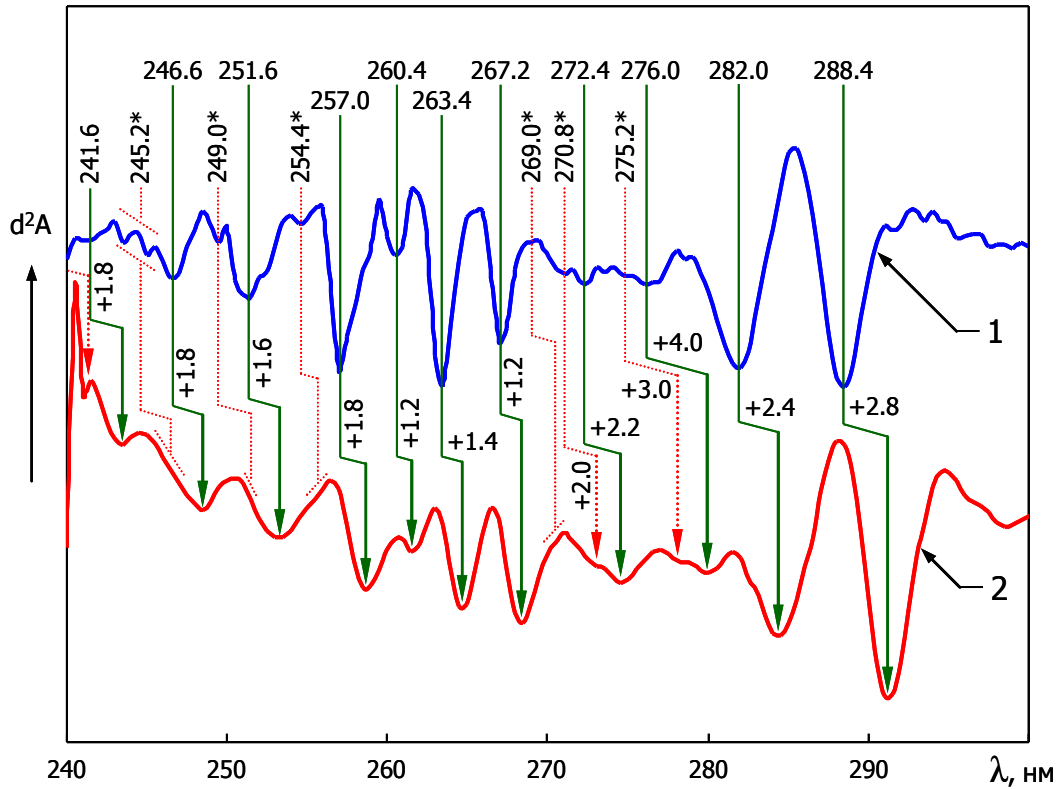


Рис. 20. Вторые производные спектров поглощения гемоглобина и его аддитивной модели по апобелку

Обозначения: гемоглобин (2), его аддитивная модель (1). Пунктиром и знаком «\*» отмечены возможные полосы поглощения; по оси ординат — вторая производная поглощения ( $d^2A$ )

Примечание: производные спектров поглощения нормированы по амплитуде и смещены друг относительно друга по оси ординат на константу; протокол эксперимента — вариант «А»

нативных белков, полученных по различным протоколам эксперимента, также не разрешил эту неопределенность.

Вместе с тем, хорошая корреляция между исходным и модельным спектром позволяет прогнозировать области, в которых ожидается наличие гомологичного пика, что удобно для его поиска, если он слабо выражен и маскируется шумом (в частности, остатки фенилаланина в молекуле трипсина, см. далее).

Неоднородность волнового сдвига может быть объяснена совокупностью различных по своей природе факторов: случайными ошибками в определении положения пика, неизбежными артефактами фильтрации сигнала, нелинейностью между энергией перехода и длиной волны, различием по типу хромофора (бокового радикала аминокислоты), его микроокружением и т.д.

Так как различные белки характеризуются своим набором отношений аминокислот, отличающихся по типу радикала, то представляет интерес, вопрос о том, как это обстоятельство оказывает влияние на положение пиков вторых производных спектров поглощения. Для этого был проведен «чистый» эксперимент: исследованы аддитивные модели гемоглобинов А и F, каталазы, альбумина и трипсина (рис. 21).

Аддитивные модели были построены исходя из данных аминокислотного состава этих белков, табл. 4 (uniprot.org: гемоглобин —  $\alpha$ -цепь P69905,  $\beta$ -цепь P68871,  $\gamma$ -цепь P69891; каталаза — P00432; бычий сывороточный альбумин — P02769; трипсин — P00760) [165].

Как следует из представленных результатов модельного эксперимента (рис. 21, табл. 5), изменение соотношения типов хромофорных групп приводит к некоторому различию в положении пиков по оси абсцисс, особенно в диапазоне 270–295 нм. Причем, это смещение сопровождается выраженным изменением соотношения интенсивности пиков второй производной для данного диапазона.

В спектрах поглощения нативных белков, из-за неодинакового волнового сдвига различающихся по типу хромофоров и различий в микроокружении аминокислотных остатков, изменения по положению (а также амплитуде) пиков

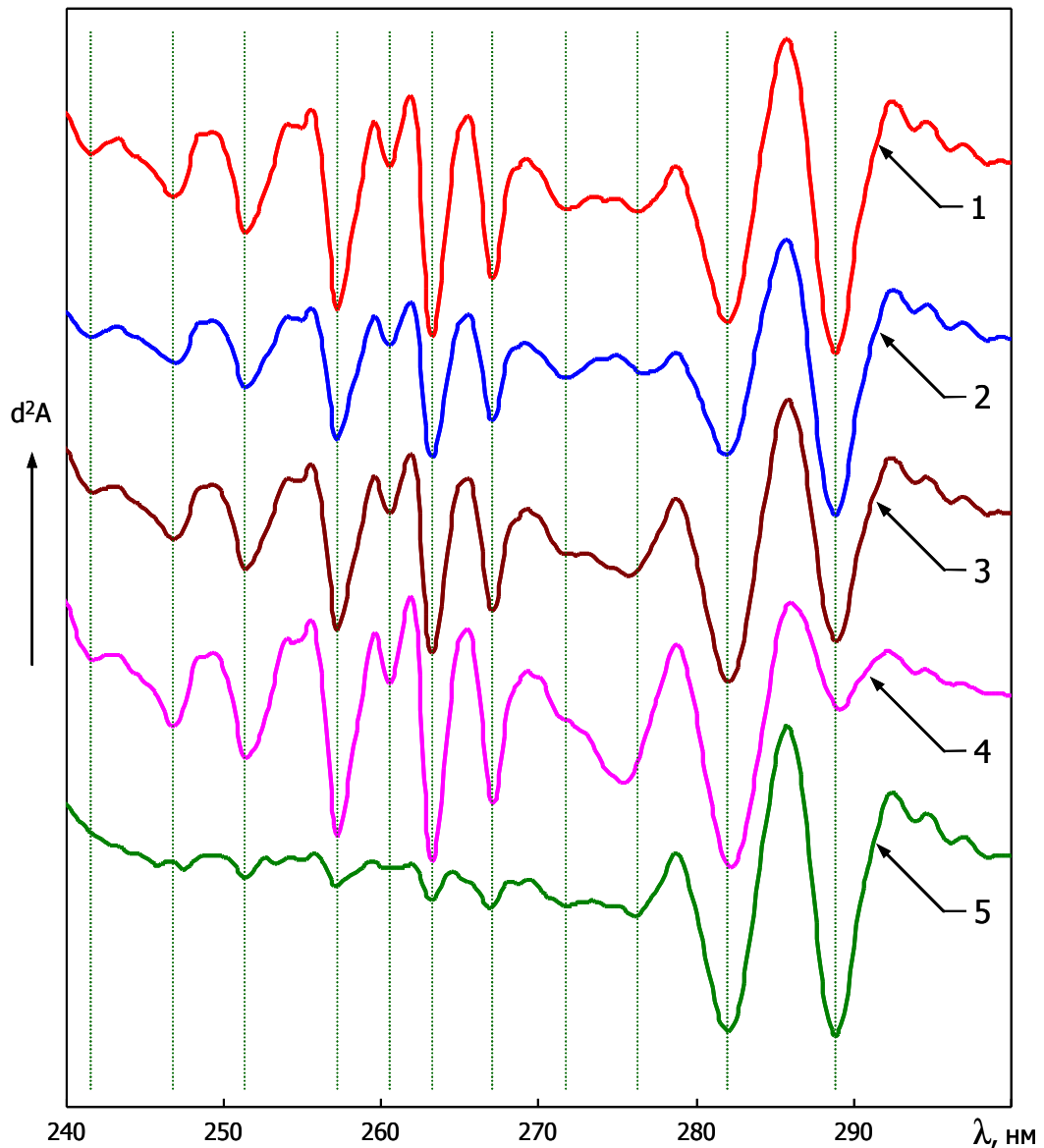


Рис. 21. Вторые производные спектров поглощения аддитивных моделей белков

*Обозначения: гемоглобин А (1), гемоглобин F (2), каталаза (3), альбумин (4) и трипсин (5); вертикальные пунктирные линии проведены по подтвержденным пикам второй производной гемоглобина А; по оси ординат — вторая производная поглощения ( $d^2A$ )*

*Примечание: производные аддитивных моделей спектров поглощения нормированы по амплитуде и смещены друг относительно друга по оси ординат на константу; протокол эксперимента — вариант «В/С»*

второй производной ожидаются более существенными.

Таблица 4. Аминокислотные составы гемоглобина, каталазы, альбумина и трипсина по типу и количеству хромофоров (боковых групп некоторых аминокислот)

Белок	Аминокислотный состав						
Гемоглобин А <sub>1</sub>	30F	12Y	6W	38H	6C	6M	—
Гемоглобин F	30F	10Y	8W	34H	4C	8M	—
Каталаза	124F	84Y	24W	96H	16C	40M	—
Альбумин (БСА)	27F	20Y	2W	17H	1C	4M	17C2
Трипсин	3F	10Y	4W	3H	0C	2M	6C2

*Примечание: C2 — димер цистеина (цистин); число перед аминокислотой — количество остатков в макромолекуле*

Вместе с тем (табл. 5), наблюдаемые отличия качественно не мешают сопоставлению перекрывающихся полос поглощения, принадлежащих разным по типу боковой группы, аминокислотам (см. 3.3).

Мы проследили связь между отношением количества аминокислотных остатков тирозина к триптофану (табл. 4) и отношением интенсивностей пиков второй производной спектров поглощения с номерами полос 19 и 20 как для аддитивных моделей (табл. 5), так и для нативных белков (табл. 2 и 3). Результаты анализа сведены в табл. 6. Так как в диапазоне длин волн от 270 нм и выше поглощение апобелковой компонентой практически полностью определяется тирозиновыми и триптофановыми остатками, а полосы №19 и №20 наиболее выражены, то это обстоятельство позволило наиболее точно оценить характер данной зависимости.

Отношение количества аминокислотных остатков тирозина к триптофану к соответствующему отношению амплитуд пиков второй производной может быть аппроксимировано экспоненциальной зависимостью с коэффициентом детерминации ( $r^2$ ), равным 99,999 % (рис. 22). Это позволяет выполнять прогнозы

исходя из известного соотношения аминокислотных остатков в макромолекуле или соотношения амплитуд пиков второй производной в ее спектре поглощения. Однако высокое значение  $r^2$  для этой зависимости не означает, что данная функция имеет физический смысл.

Таблица 5. Плохо разрешенные полосы в аддитивных спектрах поглощения (модельных по апобелку), выявленные с помощью второй производной

Полоса, №	Длина волны, нм					
	Hb <sub>A</sub>	Hb <sub>F</sub>	Каталаза	Альбумин	Трипсин	R
1	—	—	—	—	—	—
2	241,6	241,6	241,6	241,6	241,6 <sup>^</sup>	0,0
3	242,4*	—	242,6*	—	242,8*	0,4
4	244,2*	244,2*	244,2*	244,2*	244,2*	0,0
5	246,8	246,8	246,8	246,8	245,8*-? 247,4*-?	1,0-? 0,6-?
6	—	—	—	—	—	—
7	248,8*	248,8*	248,8*	248,8*	249,0*	0,2
8	251,4	251,4	251,4	251,4	251,4	0,0
9	254,8*	255,0*	254,8*	254,8*	255,0*	0,2
10	257,2	257,2	257,2	257,2	257,2	0,0
11	260,6	260,4	260,6	260,6	260,2 <sup>^</sup>	0,2
12	263,2	263,2	263,2	263,2	263,2	0,0
13	267,0	267,0	267,0	267,0	267,0	0,0
14	268,6*	268,6*	268,6*	268,6*	268,6*	0,0
15	269,8*	269,8*	269,8*	269,8*	—	0,0
16	271,6	271,6	272,4	271,4	271,8	1,0
17	274,2*	274,2*	274,4*	274,2*	274,4*	0,2
18	276,4	276,6	275,8	275,4	276,0	1,2
19	282,0	282,0	282,0	282,2	282,0	0,2
20	288,8	288,8	289,0	289,2	288,8	0,4

*Примечание: № полосы аддитивных моделей спектров поглощения ассоциирован с № полосы в спектрах поглощения нативных белков; «\*» — возможные полосы, «?» — неточная оценка, «^» — предполагаемые полосы на основе прогноза, «—» — полосы не определялись, R — размах выборки*

Таблица 6. Соотношение количества аминокислотных остатков тирозина к триптофану и соотношение амплитуд некоторых пиков вторых производных в спектрах поглощения белков

Белок	$mY/nW$	$d^2 A_{19/20}$	
		Аддитивная модель	Нативный белок
Оксигемоглобин F	1,25	0,62	0,51
Карбоксигемоглобин А	2,00	0,83	0,55
Гемоглобин (CAS 9008-02-0)			0,57
Гемоглобин А			0,58
Дезоксигемоглобин А			0,62
Метгемоглобин А			0,63
Оксигемоглобин А			0,64
Трипсин (CAS 9002-07-7)			2,50
Каталаза (CAS 9001-05-2)	3,50	1,36	0,92
Альбумин (CAS 9048-46-8)	10,00	20,33	13,84

*Примечание:  $mY/nW$  — отношение количества аминокислотных остатков тирозина к триптофану;  $d^2 A_{19/20}$  — отношение амплитуд пиков вторых производных спектров поглощения с номерами полос 19 и 20*

Зависимость соотношений амплитуд пиков второй производной между аддитивным спектром и спектром поглощения нативной макромолекулы может быть представлена линейной моделью с  $r^2 = 99,963\%$  (рис. 23).

Таким образом, становится возможным связать соотношения амплитуд пиков вторых производных в спектрах поглощения нативных белков с соотношением боковых групп аминокислот в их макромолекулах. Известное значение содержания того или иного аминокислотного остатка позволяет через такое соотношение найти недостающее значение по другому остатку.

Вероятно, таким способом можно будет находить недостающие значения

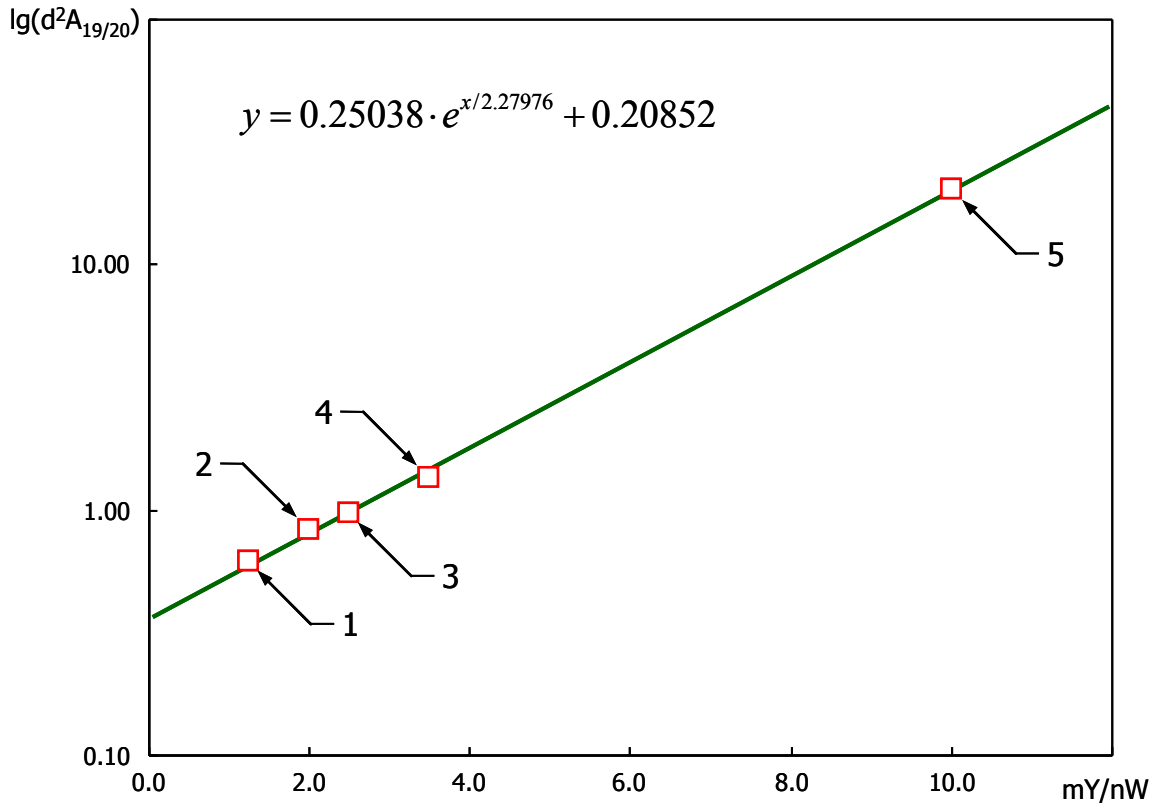


Рис. 22. Зависимость отношения амплитуд пиков вторых производных в аддитивных спектрах поглощения от отношения количества аминокислотных остатков тирозина к триптофану

Обозначения: оксигемоглобин F (1), оксигемоглобин A (2), трипсин (3), каталаза (4), альбумин (5); по оси абсцисс — отношение количества аминокислотных остатков тирозина к количеству аминокислотных остатков триптофана  $mY/nW$ ; по оси ординат — десятичный логарифм отношения пика полосы №19 к №20 ( $\lg(d^2A_{19/20})$ )

Примечание: номера полос указывают на области поглощения гомологичных пиков (положение пиков по оси ординат варибельно и зависит от типа белка и микроокружения его аминокислотных остатков, точные значения приведены в табл. 2, 3 и 5)

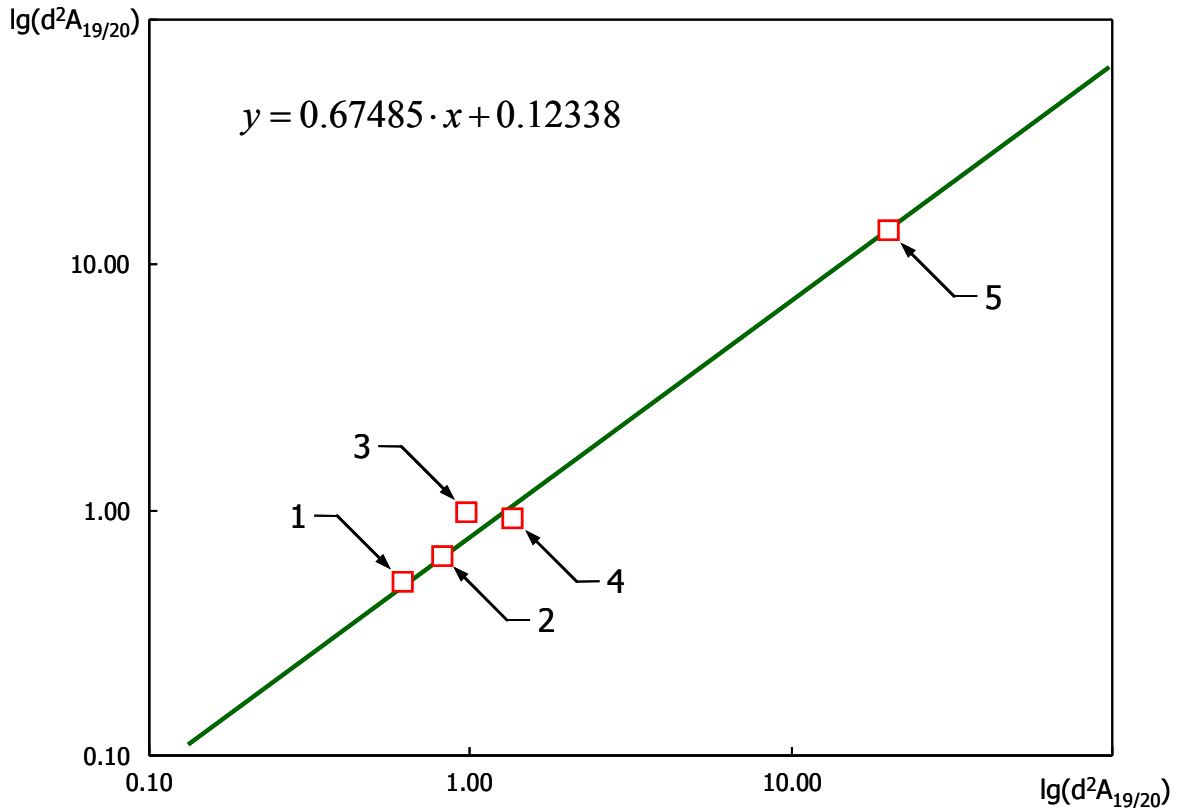


Рис. 23. Зависимость соотношения амплитуд пиков вторых производных в спектрах поглощения (диаграмма рассеяния)

Обозначения: оксигемоглобин F (1), оксигемоглобин A (2), трипсин (3), каталаза (4), альбумин (5); по оси абсцисс — десятичный логарифм отношения пика полосы №19 к №20 ( $\lg(d^2A_{19/20})$ ) в аддитивном спектре; по оси ординат тоже — в спектре поглощения нативного белка

Примечание: номера полос указывают на области поглощения гомологичных пиков (положение пиков по оси ординат вариабельно и зависит от типа белка и микроокружения его аминокислотных остатков, точные значения приведены в табл. 2, 3 и 5)



для аминокислотных остатков и в других парах отношений: F/Y, F/W.

Следующим шагом исследований стала идентификация перекрывающихся полос поглощения хромофоров нативного белка путем их переноса в систему «аддитивная модель спектра апобелка→спектры свободных аминокислот, взятые в парциальных отношениях». Возникающая при этом неизбежная формализация, не меняет качественного представления о роли того или иного аминокислотного остатка в формировании соответствующих полос в спектре поглощения нативной молекулы белка (рис. 19–21).

Так, несмотря на то, что суперпозиция пика поглощения в нативной молекуле белка и его модели может сильно отличаться друг относительно друга по положению на оси абсцисс (рис. 20), однако относительная разность хода между формирующими эти суперпозиции пиками аминокислотных остатков может быть существенно меньше из-за однонаправленного волнового сдвига последних.

### 3.3 Идентификация полос поглощения в спектрах белков путем их сопоставления в системе «аддитивная модель апобелка–свободные аминокислоты»

Так как вторые производные спектров поглощения аддитивных моделей различных белков демонстрируют сходство (см. 3.2), то для качественной оценки происхождения полос поглощения, как нам представляется, достаточно одной модели. В этом виде была использована аддитивная модель альбумина (табл. 4 и 5, рис. 24). Дополнительным аргументом являлось наличие в этой белковой макромолекуле дисульфидных связей, отсутствующих у гемоглобина и каталазы. Это позволяет рассмотреть все возможные хромофоры апобелка в заданном диапазоне длин волн.

На рис. 24 представлены вторые производные аддитивного спектра альбумина ( $\Sigma_A$ ) и входящих в него парциальных спектров поглощения

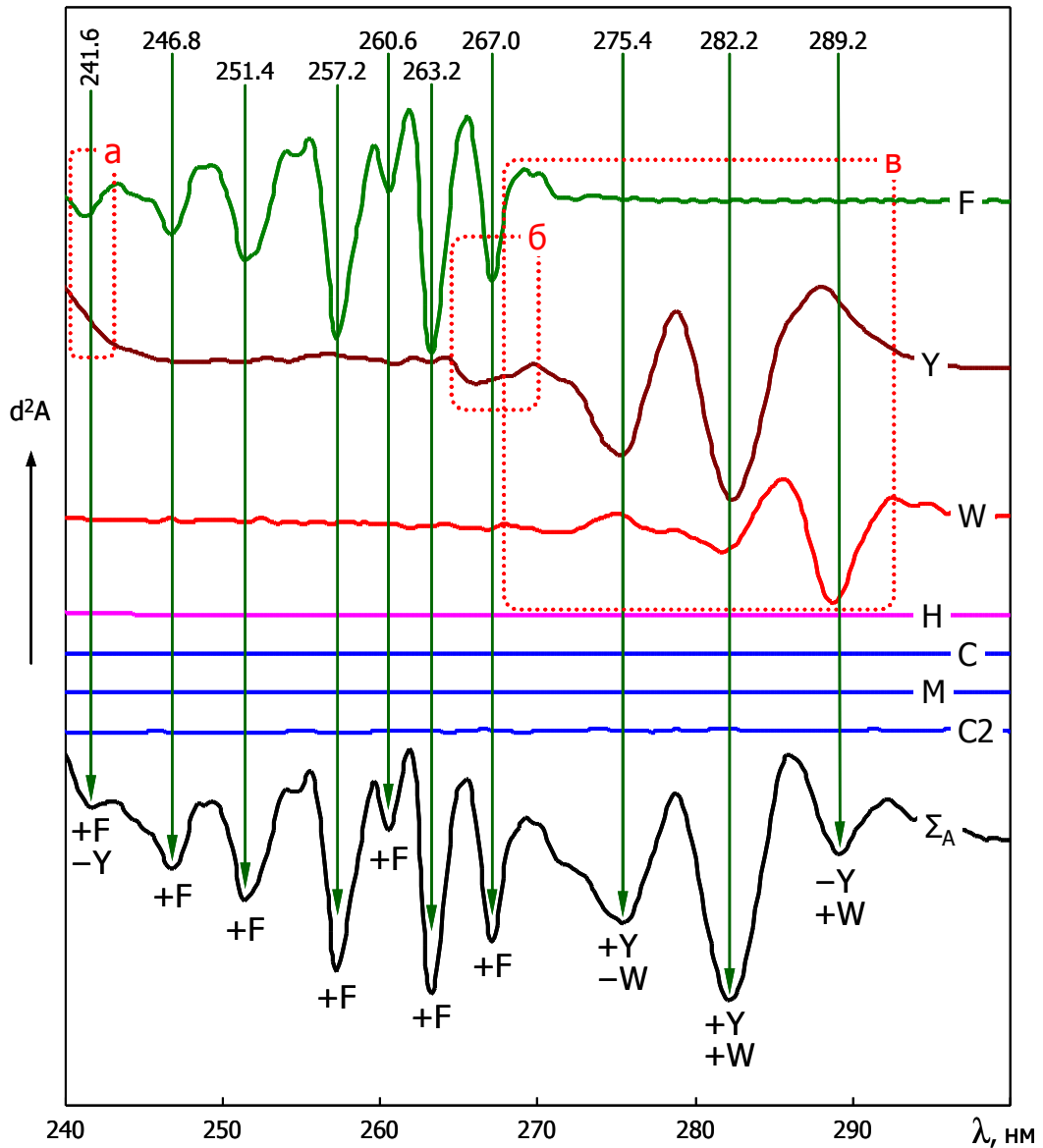


Рис. 24. Вторые производные спектров поглощения аддитивной модели альбумина и парциальных спектров поглощения составляющих ее аминокислот

Обозначения: альбумин ( $\Sigma_A$ ), фенилаланин (F), тирозин (Y), триптофан (W), гистидин (H), цистеин (C), метионин (M), цистин (C2). Вертикальные линии проведены по пикам второй производной аддитивной модели альбумина; знаком «-» и «+» показан вклад аминокислоты в формирование результирующего пика аддитивной модели; по оси ординат — вторая производная поглощения ( $d^2A$ )

Примечание: производные спектров поглощения приведены в одном масштабе, но по ординате смещены друг относительно друга на константу; протокол эксперимента — вариант «С»

аминокислот: фенилаланина (F), тирозина (Y), триптофана (W), гистидина (H), цистеина (C), метионина (M) и цистина (C2). Производная аддитивного спектра (кривая « $\Sigma_A$ ») получена суммированием производных спектров аминокислот и совпадает со спектром производной, полученной из интегрального аддитивного спектра (исходя из правил дифференцирования).

Из анализа спектров светопоглощения гистидина и серосодержащих аминокислот следует, что данные компоненты не вносят изменений в спектр поглощения аддитивной модели по второй производной. Это объясняется тем, что, во-первых, относительная доля поглощения в аддитивном спектре (240–320 нм) для них незначительна (гистидин, цистеин, метионин; табл. 7), а во-вторых, что более важно, спектры этих аминокислот не имеют пиков поглощения в исходных (недифференцированных) спектрах (цистеин, метионин; рис. 24). Кроме этого, если спектральная полуширина таких пиков, а также ширина областей для точек перегиба слишком велика (гистидин, цистин; рис. 24), то это обстоятельство также не позволяет разрешить тонкую структуру спектров, обусловленных присутствием данных аминокислот. Вероятно, это также справедливо по отношению и к нативным макромолекулам. Так, аналогичная ситуация наблюдалась для гемовой компоненты (см. 3.1).

Как следует из представленных данных (табл. 5, а также табл. 3 и 2, рис. 24), полосы в аддитивном спектре с длинами волн 241,6 (№2), 246,8 (№5), 251,4 (№8), 257,2 (№10), 260,6 (№11), 263,2 (№12) и 267,0 нм (№13) определяются поглощением аминокислотных остатков фенилаланина. Вклад боковых групп аминокислот тирозина и триптофана в аддитивный спектр поглощения, который оценивается по способности формировать суперпозицию полос (1–13) в этом участке спектра, очень мал. Это обстоятельство связано, прежде всего, со слабой выраженностью или отсутствием пиков поглощения хромофоров этих аминокислот, несмотря на достаточно высокое интегральное значение поглощения (табл. 7). Как уже отмечалось (см. выше), при дифференцировании таких спектров поглощения вторая производная не разрешает их тонкую структуру (исходя из ее свойств).

Таблица 7. Абсолютные интегральные значения (S) и относительные доли ( $\omega$ , %) поглощения аминокислот в аддитивном (модельном) спектре светопоглощения бычьего сывороточного альбумина в диапазоне длин волн 240–320 нм

Тип аминокислоты	Количество аминокислотных остатков	S	( $\omega$ , %)
Фенилаланин	27	95557,3	6,63
Тирозин	20	718541,5	49,87
Триптофан	2	430568,0	29,88
Гистидин	17	695,5	0,05
Цистеин	1	131,4	0,01
Метионин	4	604,8	0,04
Цистин	17	194732,3	13,52

Вместе с тем, формирование полос в аддитивном спектре зависит также и от соотношения интенсивностей поглощения боковых групп аминокислот. Полоса поглощения может быть сформирована в результате возникновения определенной суперпозиции светопоглощения аминокислот, даже если их спектры (или участки спектров) монотонны, т.е. без экстремумов. При этом, результирующий пик, соответствующий определенному пику боковой группы некоторой аминокислоты из-за наложения монотонных участков спектра других аминокислотных остатков макромолекулы, может быть усилен, ослаблен или смещен [41].

Так, для пика аддитивной модели БСА ( $\lambda=241,6$  нм) отмечается его некоторое смещение и незначительное снижение интенсивности относительно пика фенилаланина (241,2 нм) (область «а» на рис. 24, рис. 25-а), что обусловлено вкладом составляющей тирозина. Несмотря на постоянное по абсциссе значение этого пика (№2) в аддитивных моделях белков (с различным отношением фенилаланин/тирозин, табл. 5), для вторых производных спектров поглощения нативных белков, его положение несколько меняется (табл. 2 и 3). Это может указывать на разность хода при «красным» волновом сдвиге для фенилаланина и

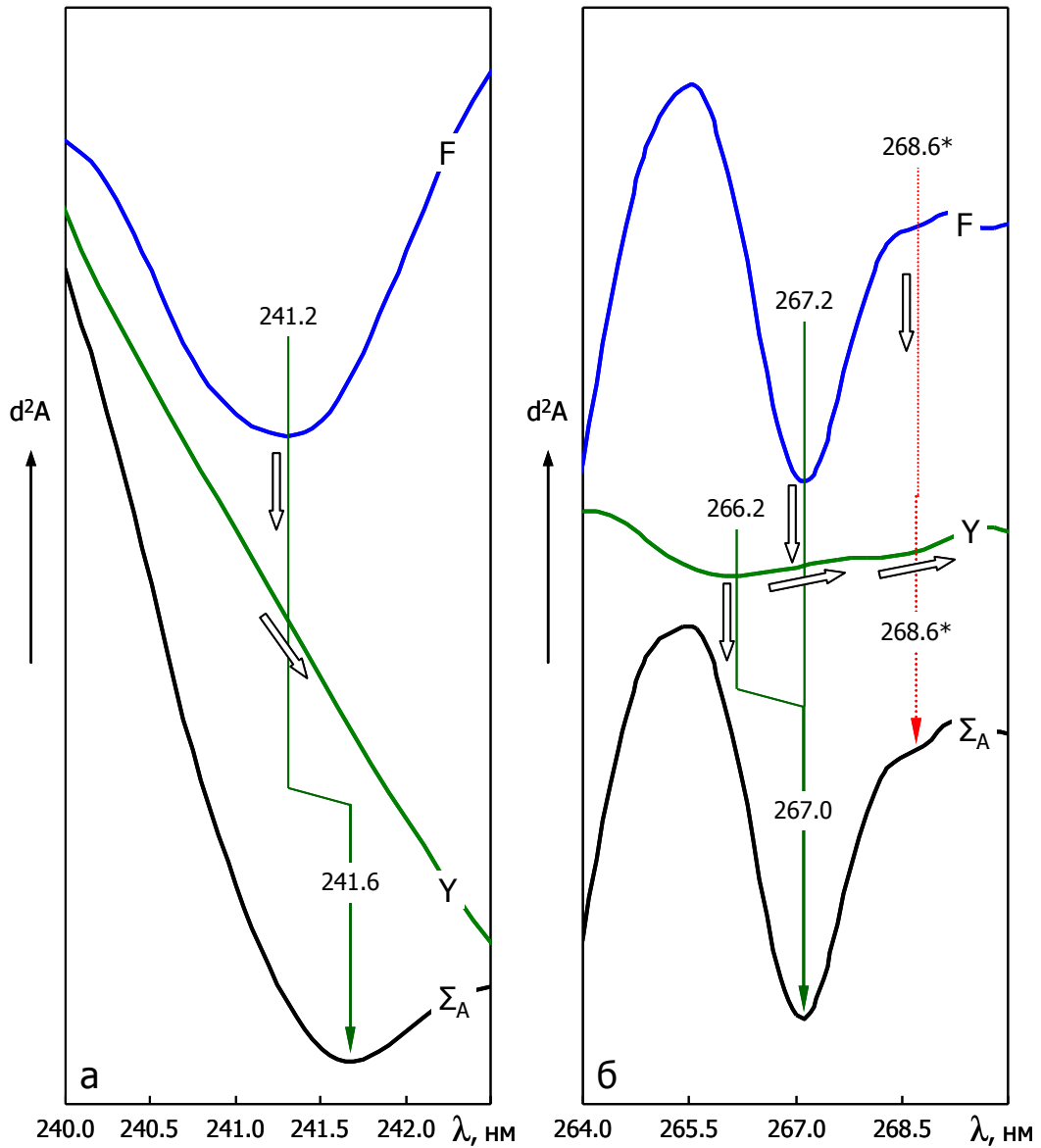


Рис. 25. Вторые производные аддитивного спектра альбумина и входящих в него парциальных спектров поглощения аминокислот: фенилаланина и тирозина

Обозначения: аддитивный спектр альбумина ( $\Sigma_A$ ), парциальные спектры фенилаланина ( $F$ ) и тирозина ( $Y$ ); по оси ординат — вторая производная поглощения ( $d^2A$ ); пунктиром и знаком «\*» отмечены возможные полосы поглощения; контурные стрелки показывают направление вклада тех или иных боковых групп аминокислот в формирование суперпозиции соответствующей результирующей полосы

Примечание: производные приведенных спектров поглощения смещены друг относительно друга по оси ординат на константу; в аддитивную модель также входят парциальные спектры поглощения триптофана, гистидина, цистеина, метионина и цистина; протокол эксперимента — вариант «С»

тирозина в нативном белке относительно модели и зависящем от микроокружения хромофоров этих аминокислот.

Кроме этого, пик аддитивной модели альбумина с  $\lambda=267,0$  нм (наряду с его формированием фенилаланином), по-видимому, определяется отчасти плохо разрешенной полосой тирозина с большой полушириной пика и с близким значением длины волны как у фенилаланина (область «б» на рис. 24, рис. 25-б).

Однако для вторых производных спектров поглощения белков этот пик (полоса №13) из-за минимального вклада составляющей тирозина будет варьировать несущественно, а наблюдаемые девиации (табл. 2 и 3), вероятно, связаны со случайной ошибкой.

Возможная полоса №14 (для аддитивных моделей белков — 268,6 нм), вероятно, формируется как суперпозиция плохо разрешенных локальных неоднородностей фенилаланина и тирозина (рис. 25-б).

Следует отметить, что пики полос №5, №8, №10, №11, №12 и №13 вторых производных спектров поглощения нативных белков меняют свое положение незначительно, в пределах ошибки (табл. 2 и 3), что хорошо согласуется с аддитивной моделью (в частности, альбумина). Так, в этой области формирование полос поглощения принадлежит исключительно аминокислотным остаткам фенилаланина (или главным образом фенилаланина — полоса №13). Соответственно, отклонения по абсциссе пиков этих полос, обусловленные разностью волнового сдвига различных по типу аминокислотных остатков, отсутствуют.

В связи с этим, данные пики полос могут быть использованы как калибровочные, для компенсации систематических ошибок по точности установки длины волны при исследовании спектров белков (рис. 19, например, пик полосы №10).

Пики второй производной спектра поглощения белков, отмеченные ранее как «возможные пики полос поглощения» (№3, №4, №6, №7 и №9), попадают в область, где они могут быть сформированы практически только аминокислотными остатками фенилаланина. Следовательно, если эти пики не

являются систематической ошибкой, то они обязаны своим происхождением данной аминокислоте.

Для убеждения в такой версии мы сравнили вторые производные спектров поглощения оксигемоглобина F и фенилаланина. Чтобы исключить систематическую ошибку, интерпретируемую как пик второй производной в спектре поглощения фенилаланина, дополнительно использовали альтернативный протокол эксперимента (D) (табл. 8).

Таблица 8. Протоколы экспериментов

Параметр	Вариант	
	C	D
рН-метр	S20-K Seven Easy	Hanna 211
Натрий- фосфатный буфер (производитель реагентов)	PanEco	Sigma-Aldrich
Молярность буфера, моль/л	0,01	0,1
Спектрофотометр	Shimadzu-2550(PC)	Shimadzu-2401(PC)
Скорость сканирования	Slow	Very Slow
Фильтрация шумов	KBLF	SGSF
Фенилаланин (производитель)	PanEco	Ajinomoto

*Примечание: приведены протоколы только в тех позициях, где существуют различия между ними*

Как следует из представленных данных (рис. 26, кривая 1 и 2), вторые производные спектров поглощения фенилаланина, полученные по разным протоколам эксперимента, находятся в хорошем соответствии друг с другом. Связь между плохо разрешенными полосами поглощения, обозначенными как «возможные» также хорошо прослеживается (рис. 19). Степень выраженности пиков для образцов фенилаланина и некоторое их варьирование по оси абсцисс определяются, в первую очередь, как неизбежными артефактами используемых алгоритмов сглаживания, так и уровнем фильтрации сигнала в пределах каждого из этих алгоритмов.

Сравнение вторых производных спектров поглощения гембелка и

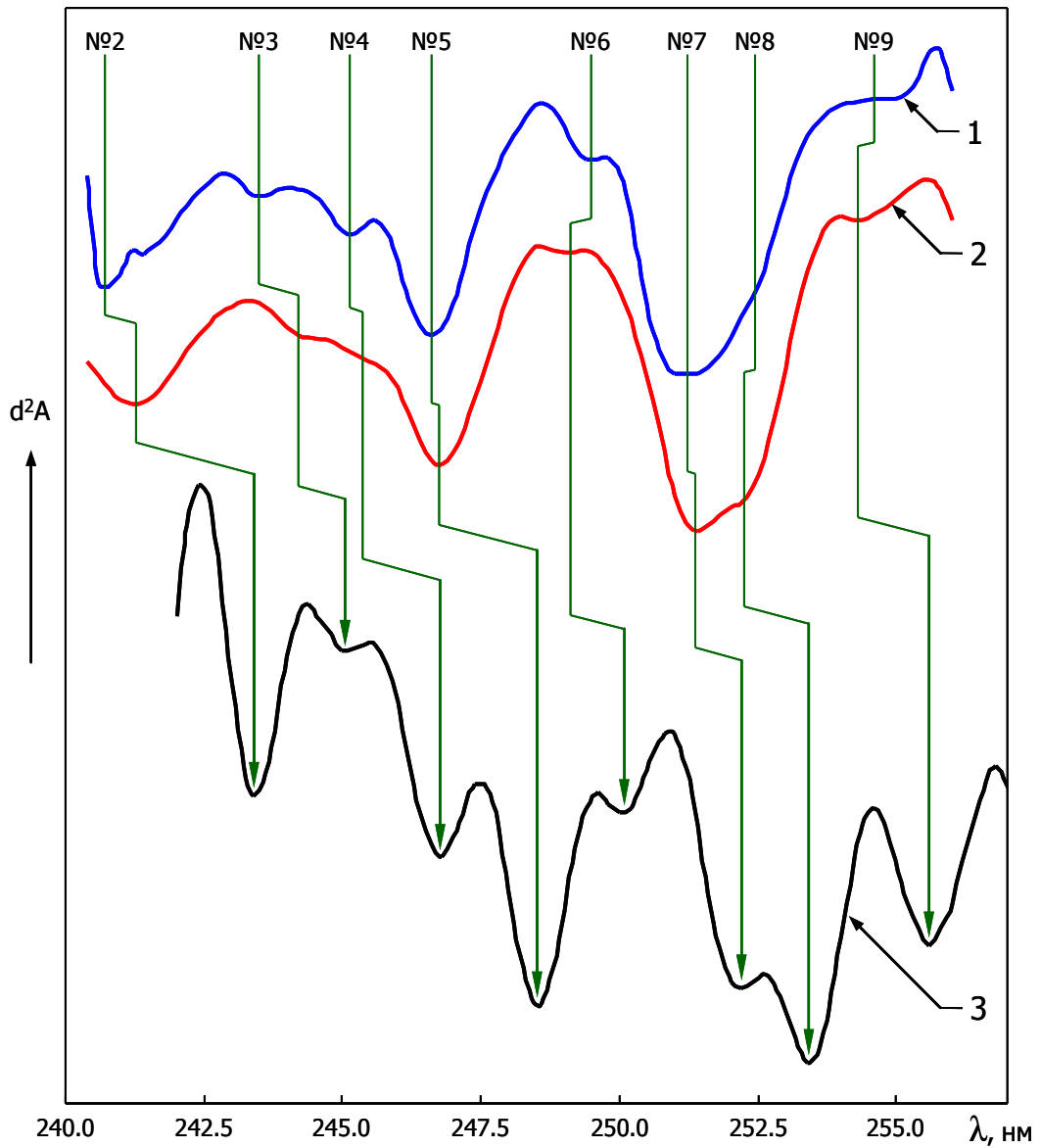


Рис. 26. Вторые производные спектров поглощения оксигемоглобина F и фенилаланина

Обозначения: фенилаланин (1) и (2), оксигемоглобин (3); по оси ординат — вторая производная поглощения ( $d^2A$ )

Примечание: производные приведенных спектров поглощения нормированы по амплитуде и смещены друг относительно друга по оси ординат на константу; протокол эксперимента для оксигемоглобина — вариант «B», фенилаланина (1) — «D», фенилаланина (2) — «C»



фенилаланина позволяет отклонить версию, что полосы №3, №4, №6, №7 и №9 являются только лишь систематическими ошибками спектров поглощения образцов.

Следовательно, таким способом стало возможным подтвердить наличие пиков с указанными номерами полос поглощения и установить их происхождение. Однако использование данных пиков в качестве реперных точек в целях исследования изменения волнового сдвига и/или интенсивности этих пиков при изменении микроокружения хромофоров из-за очень слабого и плохо разрешенного сигнала представляется весьма затруднительным.

Несоотнесенная полоса с номером 1 (для нативного альбумина — 242,2 нм), также, вероятно, обусловлена поглощением аминокислотных остатков фенилаланина с длиной волны менее 240 нм (ориентировочно на –3 нм относительно текущего).

Возможно, положение этой полосы в некоторой степени зависит и от тирозиновых остатков в молекуле нативного белка, аналогично соотнесенной полосе №2.

Сопоставляя пик полосы №14 по вторым производным спектров поглощения фенилаланина, полученных по разным протоколам эксперимента, подтвердить его происхождение не удалось из-за наличия вместо пика слабо выраженной точки перегиба в контрольном спектре фенилаланина (D). Вероятно, этот пик может быть обусловлен как поглощением тирозина, так и возникшей систематической ошибкой. Тем не менее, во вторых производных спектров поглощения белков данному пику в аддитивной модели можно соотнести пик в области 270,6÷271,8 нм.

Таким образом, с помощью аддитивной модели нами были проанализированы полосы поглощения с порядковыми номерами от 1 до 14 для некоторых нативных белков, а именно их апобелковой компоненты в диапазоне длин волн 240–269 нм.

Как следует из диаграммы (рис. 19), пики полос поглощения с номерами 15–20 характеризуются большей вариабельностью в положении по оси длин волн

относительно рассмотренных ранее (1–14). Более высокая лабильность пиков полос поглощения №3, №4, №6, №7, №9 в местоположении по оси абсцисс относительно более выраженных по амплитуде пиков фенилаланина (полосы: №5, №8, №10, №11, №12 и №13) объясняется влиянием случайных ошибок.

Однако для полос с номерами 15–20, кроме случайных ошибок в случае низкоамплитудных сигналов, варьирование положения пиков может быть обусловлено их характерной суперпозицией по второй производной спектров поглощения тирозина и триптофана, а также фенилаланина (полосы №15 и №16), при этом их экстремумы могут находиться в противофазе, нивелируя результирующий пик (область «в» на рис. 24, рис. 27) [41].

Различное соотношение парциальных спектров поглощения тирозина и триптофана вызывает уже в аддитивных моделях белков изменение положения результирующих полос (рис. 21, табл. 5). Для спектров поглощения нативных белков, из-за относительно высокой лабильности спектров светопоглощения триптофановых и особенно тирозиновых остатков аминокислот, с изменением их микроокружения такие вариации станут еще более ощутимыми (рис. 19) [41].

Как следует из представленных данных (рис. 27), на второй производной аддитивного спектра поглощения альбумина обнаруживаются слабо разрешенные пики с длиной волны 269,8 и 271,4 нм (полосы №15 и №16). Несмотря на достаточно низкую выраженность этих пиков, в спектре поглощения альбумина им можно сопоставить значения: 273,6 и 274,4 нм, и, вероятно, 277,2 нм. Эти пики представляют собой суперпозицию поглощения боковых групп фенилаланина, тирозина и триптофана. Плохая выраженность (и обособленность) пиков этих полос поглощения друг относительно друга определяется достаточно высоким отношением  $Y/W$  (10,00) для БСА (табл. 6).

Например, для спектров поглощения нативного оксигемоглобина А и F эти полосы (№15: 273,2 и 273,8 нм и №16: 275,0 и 275,2 нм, табл. 2) выглядят более изолированно из-за снижения отношения  $Y/W$  до 2,00 и 1,25 соответственно (рис. 21 и табл. 6).

Пик с длиной волны 269,8 нм на второй производной аддитивного спектра

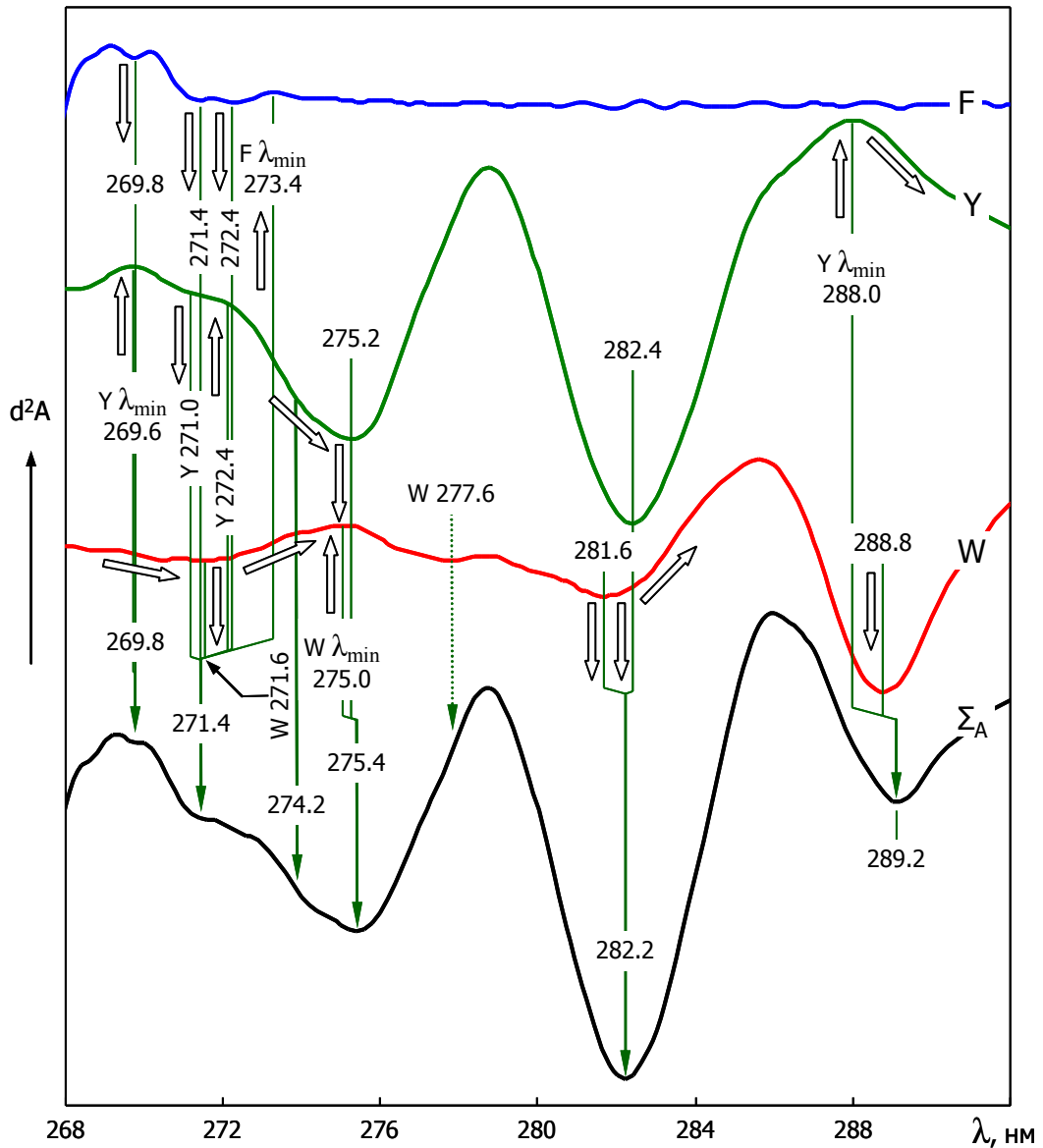


Рис. 27. Вторые производные аддитивного спектра альбумина и входящих в него парциальных спектров поглощения аминокислот: фенилаланина, тирозина и триптофана

Обозначения: альбумин ( $\Sigma_A$ ), фенилаланин (F), тирозин (Y) и триптофан (W); по оси ординат — вторая производная поглощения ( $d^2A$ ); контурные стрелки показывают направление вклада тех или иных боковых групп аминокислот в формирование суперпозиции соответствующей результирующей полосы

Примечание: производные приведенных спектров поглощения смещены друг относительно друга по оси ординат на константу; в аддитивную модель также входят парциальные спектры поглощения гистидина, цистеина, метионина и цистина; протокол эксперимента — вариант «С»

поглощения альбумина, как нам представляется, формируется следующим образом (рис. 27). На слабовыраженный размытый пик триптофана с  $\lambda=271,6$  нм (т.е. на его область) накладывается локальный минимум тирозина (269,6 нм). Однако на длине волны 269,8 нм у фенилаланина также наблюдается плохо разрешенный пик. Этот пик обеспечивает выраженность рассматриваемой суперпозиции (269,8 нм) за счет последовательной (от триптофана) компенсации локального минимума тирозина по его «интенсивности» и положению. При этом сам пик фенилаланина (269,8 нм) в аддитивном спектре несколько вырождается. Так, на второй производной аддитивного спектра поглощения трипсина из-за низкого содержания фенилаланина данный пик (269,8 нм) не проявляется (рис. 21 и табл. 5).

Естественно, что анализируемая очередность шагов формирования полосы с  $\lambda=269,8$  нм условна, т.к. процесс образования пиков синхронен, а использованный порядок анализа определялся, в основном, величиной абсолютного поглощения тех или иных боковых групп аминокислот по степени убывания их интенсивности поглощения в дифференцированном спектре.

Формирование полосы поглощения с длиной волны 271,4 нм может быть таким. Пик фенилаланина с  $\lambda=271,2$  нм, а также его возможный спутник (локальная неоднородность: 272,4 нм), усиленные размытым пиком триптофана (271,6 нм), задают пик (271,4 нм). Локальные неоднородности тирозина (точки перегиба: 271,0 и 272,4 нм), по-видимому, несколько увеличивают разрешение пика в аддитивной модели альбумина. Некоторый локальный минимум фенилаланина (273,4 нм), в совокупности с разнонаправленными изменениями интенсивности поглощения, представленной по второй производной триптофана и тирозина, делают эту полосу более контрастной.

Для спектров поглощения альбумина принимаем во внимание волновые сдвиги хромофоров боковых групп аминокислот, а также их неоднородность в силу целого ряда причин [23]. Однако хорошее соответствие спектров исследуемого белка и его аддитивной модели, позволяет, как нам кажется, успешно перенести полученные результаты интерпретации формирования пиков

269,8 и 271,4 нм на исходный (моделируемый) спектр с поправками на волновой сдвиг и интенсивность пиков этих полос поглощения.

Следует отметить, что, в целом, для вторых производных спектров поглощения белков положение полосы №15, и в большей степени — №16, достаточно вариабельно (рис. 19). Это обусловлено как слабой выраженностью этих полос, так и их высокой зависимостью от соотношения аминокислотных остатков фенилаланина, тирозина и триптофана, а также особенностями микроокружения хромофоров боковых групп данных аминокислот. Характерно следующее: для аддитивных моделей спектров поглощения белков положение полосы №15 практически не меняется, а степень варьирования полосы №16 меньше, чем у спектров поглощения нативных белков, что подтверждает роль микроокружения радикалов аминокислот в составе макромолекулы.

Следующий пик с  $\lambda=274,2$  нм (полоса №17) представляет собой суперпозицию восходящих к экстремумам для тирозина (275,2 нм) и нисходящих для триптофана (275,0 нм) участков спектра. Аналогично предыдущим полосам поглощения (№15 и №16), для нативных белков положение данного результирующего пика варьирует в большей степени, чем для аддитивных спектров (рис. 19, табл. 5).

Полоса №18 (для аддитивной модели альбумина — 275,4 нм) представляет собой суперпозицию пика полосы поглощения тирозина (275,2 нм) и диффузного, но достаточно выраженного минимума триптофана, который находится между размытыми пиками по второй производной спектра поглощения последнего (271,6 и 277,6 нм). В результате пик поглощения тирозина, кроме снижения своей интенсивности, становится несколько диффузным, приобретая качества локальной области поглощения триптофана. Очевидно, что выраженный, но размытый минимум триптофана в этой области не приводит к сколь-нибудь значимому смещению положения результирующего пика. Поглощением аминокислотных остатков фенилаланина в области 274–320 нм можно пренебречь, из-за его крайне низкой величины  $S$  и, соответственно,  $\omega$ , %.

Положение данной полосы по оси абсцисс максимально вариабельно

относительно других, как ранее рассмотренных (2–17), так и последующих анализируемых полос поглощения (см. далее). Это свойство позволяет использовать пик полосы №18 в качестве маркера при оценке характера микроокружения боковых групп тирозина. Кроме этого, существенное варьирование интенсивности данной полосы по второй производной спектра поглощения позволяет использовать ее пик и при оценке отношения количества боковых групп тирозина к триптофану.

Полоса с  $\lambda=282,2$  нм возникает в результате сложения полос поглощения тирозина (282,4 нм) и триптофана (281,6 нм). Результирующая полоса (№19) приобретает при этом форму, близкую к форме полосы поглощения тирозина, но выражена несколько более интенсивно, чем полоса последнего.

Пик поглощения 289,2 нм (полоса №20) является результирующей полосы триптофана (288,8 нм) и приходящейся на эту полосу несимметричной областью с минимумом поглощения тирозина при 288,0 нм. Суперпозиция сохраняет форму полосы поглощения триптофана с некоторым смещением последней, но выражена менее интенсивно.

Разнонаправленный вклад тирозина и триптофана в результирующие полосы 18–20, и особенно выраженные по интенсивности полосы №19 и №20 позволяют их использовать в оценке соотношения количества аминокислотных остатков тирозина к триптофану (табл. 6, рис. 22 и 23). Примечателен тот факт, что для вторых производных аддитивных спектров поглощения варьирование полос поглощения 19–20 по оси абсцисс незначительно (рис. 21, табл. 5). Это позволяет задействовать пики поглощения данных полос в аддитивных спектрах как реперные точки при анализе особенностей микроокружения аминокислотных остатков тирозина и триптофана при их различных соотношениях в составе нативной макромолекулы.

Высокое разрешение и интенсивность пиков полос поглощения №19 и №20 минимизируют вклад случайных ошибок в девиацию положения их экстремумов по оси длин волн. Из этого следует, что такие ошибки для высокоинтенсивных полос, где наблюдается варьирование их местоположения, не

являются определяющими.

Следовательно, используя аддитивную модель, можно с достаточно хорошей степенью приближения проанализировать выявленные плохо разрешенные полосы в спектре поглощения нативного белка на предмет особенностей формирования их составляющими полосами поглощения боковых групп аминокислот.

Обнаружение большинства пиков поглощения фенилаланина в составе молекулы белка представляет собой сравнительно простую задачу в силу хорошей выраженности полос, которые почти не перекрываются с полосами поглощения других аминокислот.

Перекрывание полос поглощения и локальных минимумов тирозина и триптофана формирует области, суперпозиция полос которых зависит от соотношения данных аминокислотных остатков, если рассматривать это применительно к различным белкам. Учитывая, что боковые группы тирозина и триптофана относительно групп фенилаланина в большей степени подвержены возмущениям микроокружения среды, это еще больше затрудняет обнаружение, идентификацию и анализ таких полос, особенно в диапазоне длин волн 268—276 нм, где наблюдается суперпозиция их поглощения для рассматриваемых аминокислот.

Таким образом, из 20 полос, зафиксированных по вторым производным спектров поглощения белков и их моделей, только полоса с №14 была отмечена как «возможная». И хотя другая полоса (№1) не была соотнесена к полосе в аддитивной модели из-за ограничения по выбранному диапазону длин волн, тем не менее, вероятно, его возникновение связано с поглощением одного из пиков фенилаланина (в аддитивной модели), лежащего в области 238–240 нм.

При анализе формирования суперпозиции пиков полос поглощения представляется удобным в графиках-схемах указывать направления изменений в спектре поглощения с помощью стрелок-векторов. В принципе, определяя, кроме направления, еще и величину такого вектора, можно будет использовать в перспективе и аппарат линейной алгебры.

## Глава 4. РАЗЛОЖЕНИЕ УФ-СПЕКТРОВ ПОГЛОЩЕНИЯ ХРОМОПРОТЕИДОВ НА СПЕКТРЫ СВЕТОПОГЛОЩЕНИЯ ПРОСТЕТИЧЕСКИХ ГРУПП И АПОБЕЛКА С ПОМОЩЬЮ АДДИТИВНОЙ МОДЕЛИ

### 4.1 Разработка способа разложения УФ-спектров поглощения хромопротеидов на составляющие светопоглощения апобелковой и небелковой компонент

Большую роль в поддержании нативной структуры и функционировании сложных белков играют прочно связанные с ними простетические группы. Среди белков, содержащих такие группы, хромопротеиды занимают особое положение, так как они обладают интенсивными полосами поглощения в ближнем УФ- и видимом диапазонах спектра. Это обстоятельство позволяет широко использовать методы спектрального анализа при исследовании структурно-функциональных свойств данных макромолекул [4, 52, 57, 126, 167].

Вместе с тем, из-за перекрытия спектров поглощения простетических групп и апобелка в средневолновом УФ-диапазоне, изучение спектральных свойств этих частей хромопротеида в составе макромолекулы затруднено [28].

Разделение физико-химическими методами белка на отдельные составляющие зачастую приводит к весьма ненадежным результатам исследований вследствие нарушения системы внутримолекулярных взаимодействий. При этом изменения в локальном окружении хромофоров зачастую влекут за собой соответствующие изменения их спектральных свойств. В конечном итоге дезинтеграция макромолекулы может приводить, например, к окислению сульфгидрильных групп апобелка или железа простетических групп, т.е. затрагивается непосредственно структура хромофоров [55, 68].

Таким образом, выделение той или иной составляющей биополимера вызывает различную по степени модификацию частей макромолекулы, что ведет к различию в спектрах поглощения изолированных апобелковой и небелковой



компонент относительно их спектров поглощения в нативной макромолекуле.

Возможным путем исследования спектров поглощения различных типов хромофорных групп, входящих в состав белка, является разложение его интегрального спектра поглощения математическими методами, которые лишены рассмотренных недостатков (но имеющих, безусловно, свои ограничения).

Исходя из вышеизложенного, нами предложен и продемонстрирован на примере гемоглобина способ разложения УФ-спектра поглощения хромопротеидов на составляющие светопоглощения апобелковой и небелковой компонент в диапазоне длин волн 240,0–320,0 нм с помощью аддитивной модели. В ходе работы для гемоглобина также определена относительная доля поглощения его апобелка и гемовых групп как функция от длины волны, а также интегральная относительная доля поглощения последних в указанном диапазоне длин волн.

В основу предлагаемого способа разложения интегрального спектра поглощения хромопротеида на апобелковую и небелковую составляющие, положен следующий алгоритм с определенными условиями и допущениями:

1) Вклад апобелковой и небелковой компонент в спектр поглощения белка представляется аддитивной моделью общего вида:

$$A + B = C, \quad (28)$$

где  $A$  и  $B$  — взаимосвязанные спектры поглощения апобелка и его простетических групп, которые необходимо найти, а  $C$  — известный спектр поглощения белковой макромолекулы.

2) Используемый диапазон длин волн должен быть практически свободен от поглощения пептидными группами белка.

3) В качестве исходной модели спектра поглощения апобелка ( $A_0$ ) используется аддитивная модель спектра, которая получена в результате суммирования парциальных спектров поглощения аминокислот, входящих в состав макромолекулы.

4) Исходная модель спектра поглощения небелковой компоненты ( $B_0$ ) получается вычитанием  $A_0$  из  $C$ .

5) Повышение степени соответствия модельного спектра  $A_0$  к целевому спектру  $A$  достигается смещением  $A_0$  по оси абсцисс на величину, необходимую для компенсации сдвига относительно спектра  $C$  (его апобелковой составляющей). В результате вычислений получается смещенный на  $\Delta x$  модельный спектр  $A_1$ .

6) Предполагается [23, 28, 60], что существующая разность в интенсивности, ширине и форме полос поглощения боковых групп аминокислот для спектров  $A_0$  и  $A$  не столь значительна и может быть нивелирована аппроксимацией (п. 10 и 11 алгоритма).

7) Необходимая величина спектрального сдвига ( $\Delta x$ ) задается формальным критерием.

8) Полученный вычитанием спектра  $A_1$  из  $C$ , спектр  $B_1$ , используется, в том числе, как тест на корректность и эффективность трансформации спектра  $A_0$ .

9) Эмпирическим критерием оптимально заданной величины  $\Delta x$  по этому тесту является минимальное присутствие «отпечатков» полос поглощения хромофоров аминокислотных остатков в модельном спектре  $B_1$ .

10) Для устранения дефектов спектра  $B_1$ , обусловленных остаточным присутствием «следов» полос поглощения хромофоров аминокислот, выполняется его аппроксимация по заданному критерию. В результате получается итоговый модельный спектр поглощения протетических групп ( $B$ ).

11) Вычитанием  $B$  из  $C$  рассчитывается итоговый модельный спектр поглощения апобелка ( $A$ ).

12) Сравнением вторых производных спектров  $A$  и  $B$  (их экстремумов) осуществляется оценка корректности выполненных преобразований.

Мы апробировали предложенный алгоритм на спектрах поглощения гемоглобина и свободных аминокислот, полученных в экспериментах по протоколу: вариант «А» (см. 3.1, табл. 1).

На рис. 28 приведены рассчитанные ранее молярные показатели поглощения спектра гемоглобина (кривая 1), и полученная путем суммирования парциальных спектров светопоглощения аминокислот аддитивная модель спектра

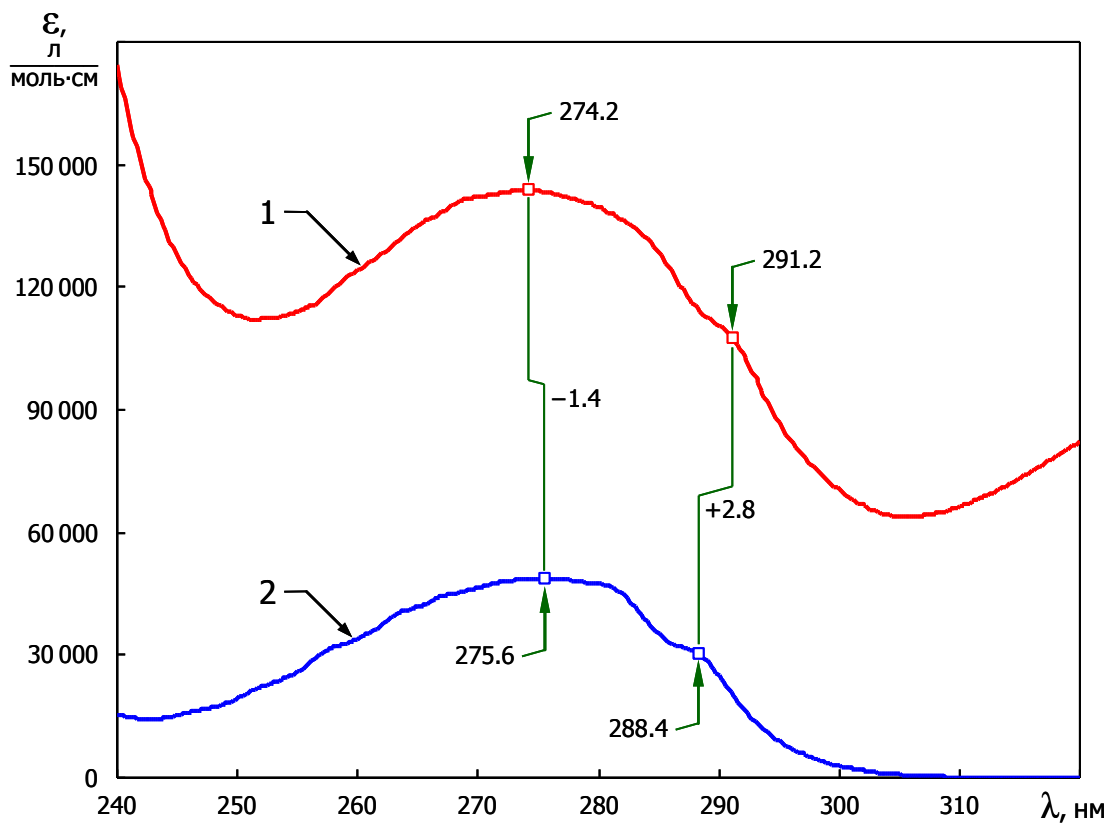


Рис. 28. Спектры поглощения гемоглобина и его аддитивной модели по апобелку

Обозначения: гемоглобин (1), его аддитивная модель по апобелку (2);  $\epsilon$  — молярный показатель поглощения

Примечание: пики «274,2» и «275,6» определены из недифференцированных спектров, пики «291,2» и «288,4» — по второй производной; протокол эксперимента — вариант «А»

поглощения апогемоглобина ( $A_0$ ) (рис. 28, кривая 2; рис. 29, кривая 1) в исследуемом диапазоне длин волн [41].

Вычитанием из спектра поглощения гемоглобина ( $C$ ) спектра  $A_0$  получена модель спектра поглощения гемовой составляющей ( $B_0$ ) (рис. 30, кривая 1). Предварительный анализ показал, что спектр протетических групп имеет, вероятно, одну полосу поглощения. Наблюдаемые возмущения в спектре  $B_0$  представляют собой ожидаемые дефекты, обусловленные разностью в положении полос в спектрах поглощения боковых групп аминокислот в составе макромолекулы (целевой спектр  $A$ ) относительно таких полос в спектре  $A_0$ .

При смещении по абсциссе спектра  $A_0$  относительно  $C$  необходимо выработать критерий (п. 7 алгоритма), на основании которого будет задано численное значение для такого сдвига.

В качестве простого критерия, используемого для вычисления  $\Delta x$ , может выступить разность пиков поглощения двух спектров: белка (гемоглобина) с  $\lambda_{max}=274,2$  нм и модели спектра апобелка ( $A_0$ ) с  $\lambda_{max}=275,6$  нм. Значение  $\Delta x$  составило  $-1,4$  нм, что не согласуется с полученными ранее данными по растворам альбумина [28] и результатам наших исследований [41]. Таким образом, в отличие от простых белков, данный способ расчета  $\Delta x$  по отношению к спектрам поглощения гемоглобина неадекватен. Это связано с присутствием в составе биополимера гемовой компоненты, один из пиков поглощения которой находится в области спектра с длиной волны менее 275,6 нм.

Другой критерий, эффективность которого мы проанализировали, заключается в определении  $\Delta x$ , основанном на сопоставлении однозначно идентифицируемых полос поглощения [41], принадлежавших аминокислоте одного типа и имеющей максимальную долю (как произведение молярного показателя поглощения на количество аминокислотных остатков) в спектре поглощения белка ( $C$ ) и в спектре  $A_0$ . Такой аминокислотой в спектре гемоглобина является триптофан (см. 3.2, рис. 20–21, табл. 6). Один из пиков поглощения аминокислоты в спектре гембелка соответствует длине волны 291,2 нм, в модельном спектре апобелка — 288,4 нм. Величина  $\Delta x$  составила при этом

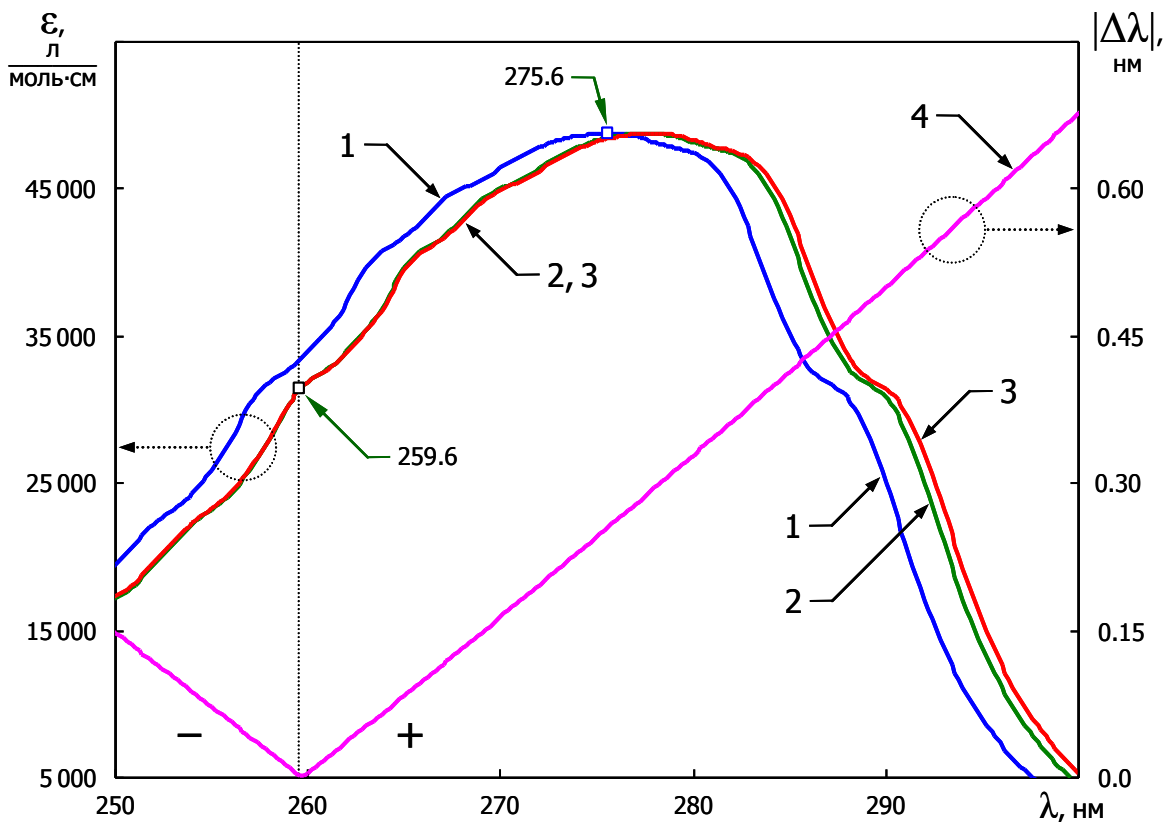


Рис. 29. Модели спектров поглощения по апобелку в диапазоне длин волн 250–300 нм

Обозначения: исходная модель (1), модель со смещением по шкале длин волн (2), модель со смещением по шкале волновых чисел (3), зависимость уширения смещенного по волновому числу спектра относительно спектра со смещением по длине волны (4);  $\varepsilon$  — молярный показатель поглощения;  $|\Delta\lambda|$  — модуль значения уширения по шкале длин волн для спектра модели (3) относительно (2)

Примечание: области положительного и отрицательного уширения спектра показаны знаком «+» и «-» соответственно;  $\lambda_{259,6}$  — значение поглощения, которому соответствует одинаковый аргумент по шкале длин волн и волновых чисел для моделей (2) и (3); протокол эксперимента — вариант «А»

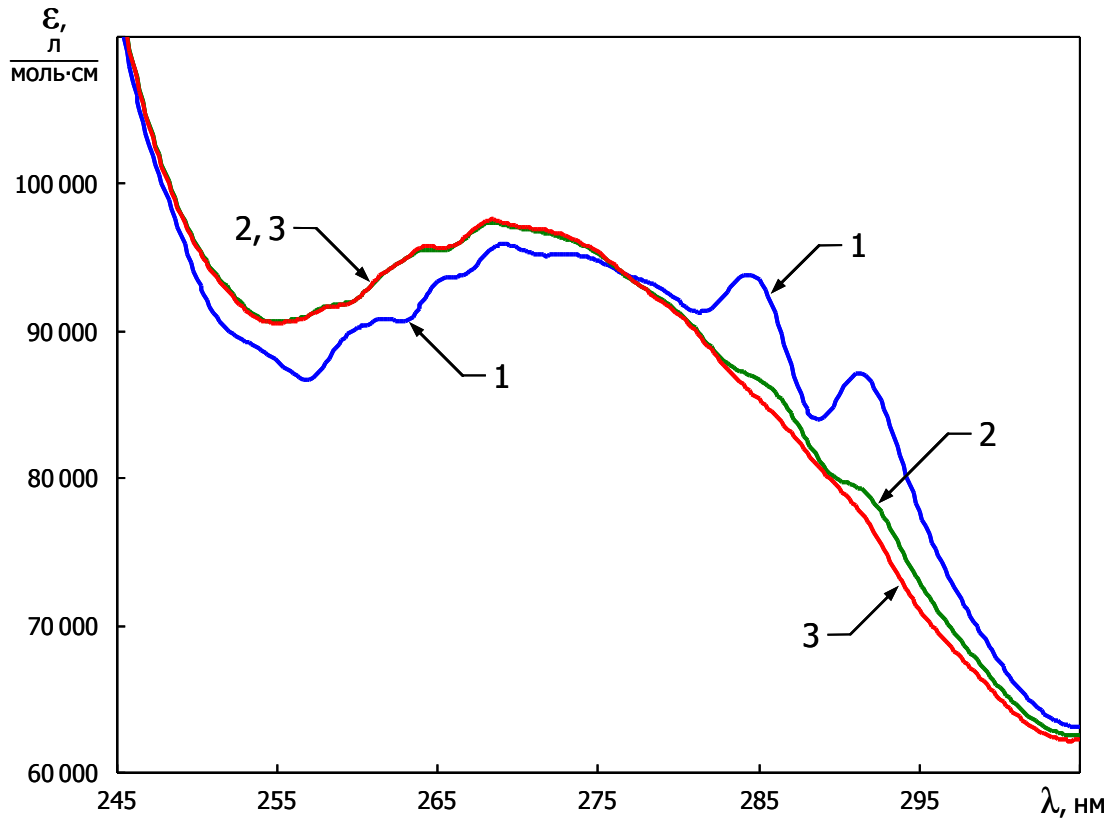


Рис. 30. Модельный спектр поглощения гемовой составляющей в диапазоне длин волн 245–305 нм

Обозначения: исходная модель  $B_0$ , как разность  $C-A_0$  (1), модель  $B_1$ , как разность  $C-A_1$ , т.е. после смещения апобелковой аддитивной модели по шкале длин волн (2), по шкале волновых чисел (3);  $\varepsilon$  — молярный показатель поглощения

Примечание: протокол эксперимента — вариант «А»

+2,8 нм. Этот результат хорошо согласуется с литературными данными [28].

Однако для белков, спектр поглощения которых в большей степени определяется отличными от триптофана аминокислотами, могут быть определенные трудности в выборе длин волн, по которым будет произведено вычитание. Так, например, в случае тирозина, его пики поглощения могут быть взаимно нивелированы в спектре макромолекулы белка, находящимися рядом локальными максимумами триптофана (см. 3.3, рис. 27) [41].

Так как белки имеют различный аминокислотный состав, то при вычислении  $\Delta\lambda$ , в качестве реперных точек могут быть использованы любые пики поглощения разных по своему типу аминокислот с высокой парциальной долей поглощения соответствующей боковой группы. Однако данный подход не позволяет его использовать в качестве универсального из-за неодинакового спектрального сдвига пиков поглощения различающихся по своему типу радикалов аминокислот, что может давать в конечном итоге различные  $\Delta\lambda$ , и как следствие — разные модельные спектры апобелка ( $A_1$ ).

Этот подход имеет также и другой недостаток. Если сравниваемые пики поглощения будут иметь относительно узкую полуширину, и доля площади пиков этих полос в спектре будет невысокой, то это, в свою очередь, может привести к дополнительным артефактам. То есть, такие пики поглощения будут нерепрезентативны по отношению ко всей площади сравниваемых спектров  $A_0$  и  $C$ .

При использовании в качестве критерия некоторого усредненного значения, например, для пар точек 274,2/291,2 и 275,6/288,4, получается величина +0,7 нм. Это значение ниже минимальной разности по длине волны между экспериментальным и модельным спектрами (+1,2 нм), полученной нами ранее для остатков фенилаланина [41]. Другими словами, смещение спектра  $A_0$  на  $\Delta\lambda$  меньше, чем минимальное смещение для полос поглощения аминокислоты, радикал которой наименее подвержен возмущениям микроокружения среды.

В связи с этим, мы отказались от подходов, базирующихся на вычислениях  $\Delta\lambda$  по разности положения реперных точек в спектрах поглощения  $A_0$  и  $C$ . Для

того чтобы получить более достоверные значения  $\Delta x$ , необходимо сопоставить эти спектры по всем измеренным точкам диапазона. В таком случае ординаты спектров  $A_0$  и  $C$  можно представить в виде модели парной линейной регрессии. В качестве критерия оценки степени соответствия (подобия) в спектрах поглощения можно использовать линейный коэффициент корреляции (коэффициент корреляции Пирсона,  $r$ ) или его квадрат — коэффициент достоверности аппроксимации (т.е. коэффициент детерминации) [43].

Таким образом, сравнение спектров  $A_0$  и  $C$  можно рассматривать как кросс-корреляцию сигналов, где взаимная корреляционная функция описывает степень их подобия ( $r$ ) и взаимное расположение по оси абсцисс ( $\Delta x$ ).

Смещая модельный спектр ( $A_0$ ) относительно спектра гембелка ( $C$ ) в длинноволновую область, можно найти максимум коэффициента корреляции ( $r$ ), которому соответствует определенное значение  $\Delta x$ . Так как величина  $r$  будет рассчитана по парам двух массивов в диапазоне 240,0–320,0 нм, то исходные спектры поглощения аминокислот, по которым построен модельный спектр ( $A_0$ ), должны быть получены в расширенном (к области меньших значений) диапазоне: 230,0–320,0 нм. Это позволяет смещать спектр  $A_0$  на максимальную величину  $\Delta x$  вплоть до 10,0 нм с инкрементом 0,2 нм и соответствующим максимальным количеством шагов ( $n$ ) 50.

Однако в наших расчетах (рис. 31, кривая 1), с увеличением  $\Delta x$  коэффициент корреляции неуклонно снижался. Вторая производная по коэффициенту корреляции ожидаемо не позволила обнаружить максимум  $r$  для  $\Delta x$ . Мы проанализировали эти данные и установили, что величина  $r$  в таком тесте очень сильно зависит от глобальных изменений в спектре поглощения, но практически не учитывает особенностей его тонкой структуры.

Принимая во внимание вышесказанное, нами был вычислен коэффициент корреляции второй производной спектра гемоглобина ( $C$ ) и модели спектра по апобелку ( $A_0$ ) (рис. 32, кривая 1). Максимум величины  $r$  соответствовал  $\Delta x = +2,0$  нм (против  $+2,8$  нм, в случае оценки по пику триптофана,  $-1,4$  нм по абсолютной разности и  $+0,7$  нм по среднему значению для рассмотренных ранее полос



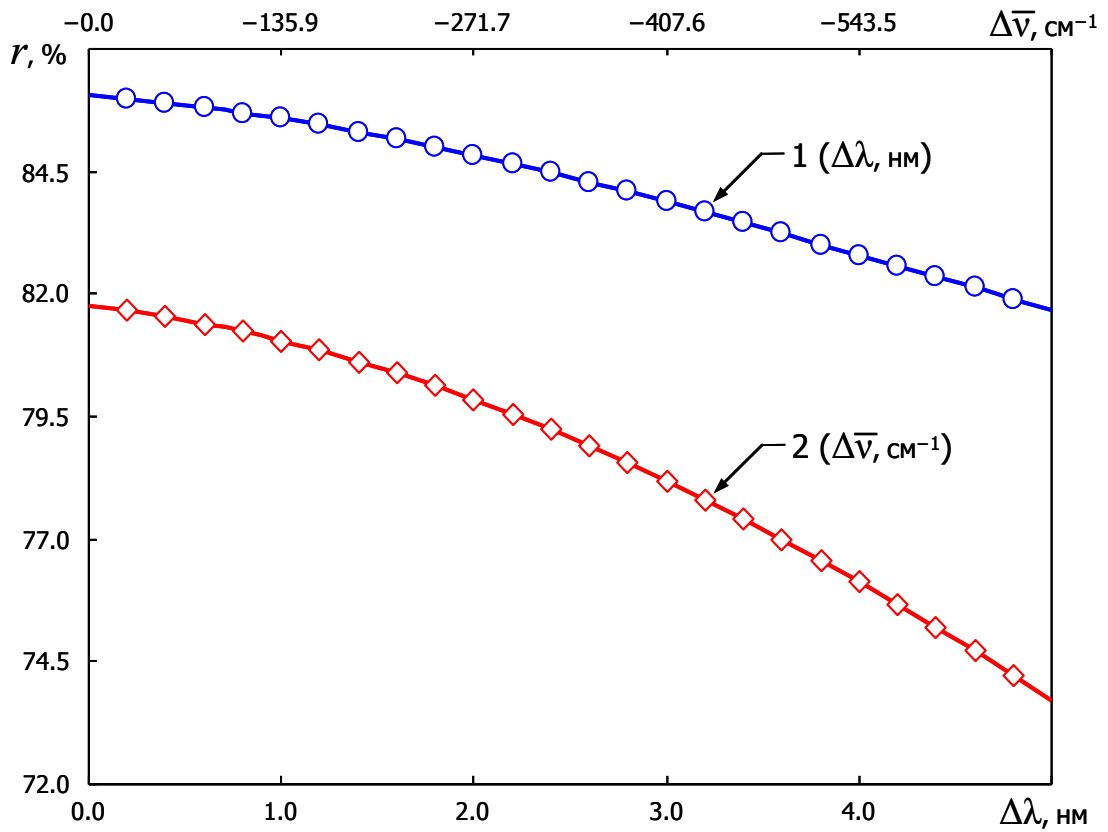


Рис. 31. Зависимость коэффициента корреляции от шага смещения для недифференцированного модельного спектра апобелка относительно такового для нативного гемоглобина

Обозначения: аргументом выступает длина волны (1), волновое число (2);  $r$  — коэффициент корреляции

Примечание: протокол эксперимента — вариант «А»

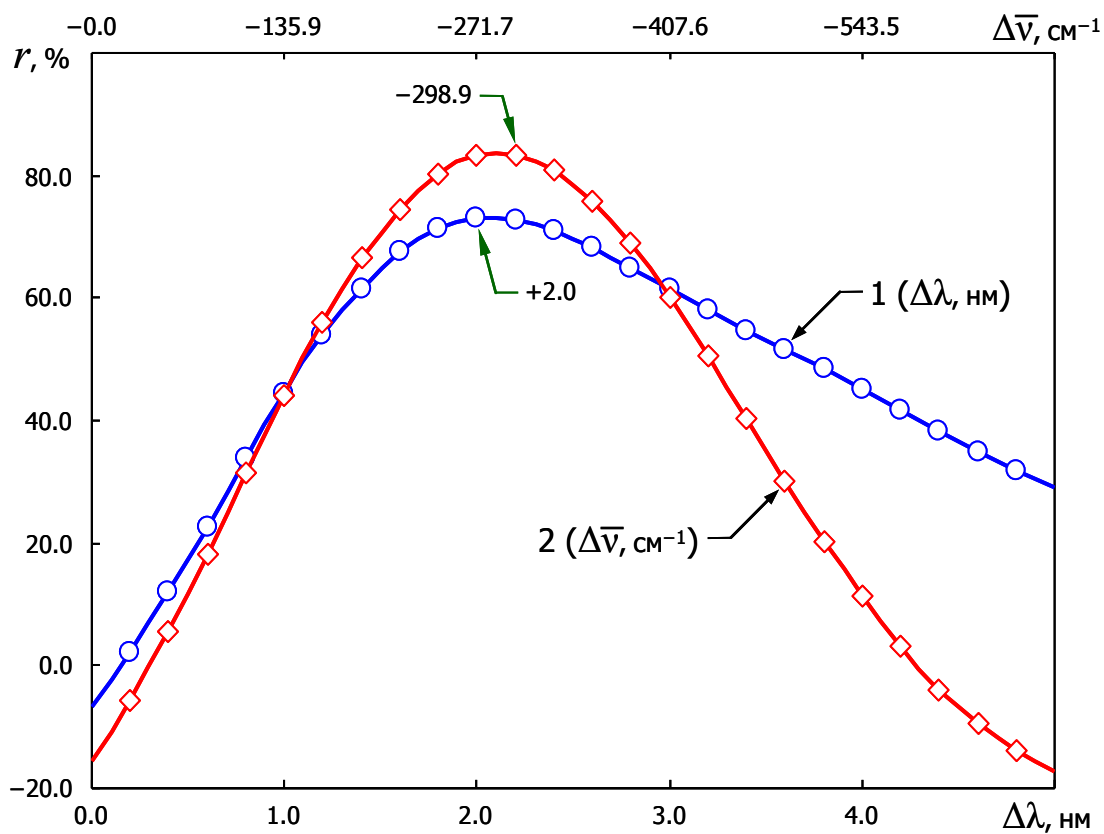


Рис. 32. Зависимость коэффициента корреляции от шага смещения второй производной модельного спектра апобелка относительно такого для нативного гемоглобина

Обозначения и примечания как на предыдущем рисунке

поглощения (рис. 28)). Смещенный на  $\Delta\lambda$  модельный спектр ( $A_1$ ) представлен на рис. 29, кривая 2. Соответствующий ему вычисленный модельный спектр поглощения гемовой компоненты ( $B_1$ ) изображен на рис. 30, кривая 2. Следовательно, нам удалось существенно снизить дефекты полученного спектра поглощения небелковой составляющей путем сдвига модельного спектра ( $A_0$ ) предложенным способом (п. 8 и 9 алгоритма).

Как известно, сдвиги в спектрах поглощения белков связаны с изменением энергии переходов хромофоров [23, 28]. Следовательно, для компенсации спектрального сдвига для модели спектра ( $A_0$ ) относительно спектра белка ( $C$ ) все вычисления более правильно выполнять в шкале абсцисс, линейно пропорциональной энергии таких переходов. Обычно в ИК-спектроскопии этой шкале соответствует волновое число ( $\bar{\nu}$ ,  $\text{см}^{-1}$ ), радиофизике — частота ( $\nu$ , Гц), физике элементарных частиц — непосредственно энергия ( $E$ , эВ).

Для того чтобы оценить, насколько целесообразно выполнять смещение модельного спектра  $A_0$  относительно  $C$  в координатах обратной длине волны, мы получили модельный спектр  $A_1$ , где аргументом является волновое число, и сравнили полученный спектр  $B_1$  с предыдущим результатом.

Значения длин волн были конвертированы в соответствующие значения волновых чисел в диапазоне от 230,0 нм до 320,0 нм (т.е., от 43478,30  $\text{см}^{-1}$  до 31250,00  $\text{см}^{-1}$  соответственно). Чтобы обеспечить эквивалентное количество точек спектра, теперь уже в линейной шкале волновых чисел, этот диапазон был разделен на  $k$  одинаковых интервалов с декрементом 27,17  $\text{см}^{-1}$ , где  $k=(320-230)/0,2=450$ . Таким образом, увеличение длины волны с 230,0 нм на 27,17  $\text{см}^{-1}$  при ней соответствует изменению на 0,14 нм; с 240,0 нм — на 0,16 нм и с 320,0 нм — на 0,28 нм.

Рассчитаны коэффициенты корреляции для спектров поглощения, где аргументом выступает волновое число (рис. 31, кривая 2). По отношению к предыдущему способу (рис. 31, кривая 1) следует отметить более выраженный характер снижения величины  $r$ , что может косвенно указывать на бóльшую чувствительность по абсциссе обратной длине волны. Вторая производная также

ожидаемо не позволила выявить максимум этой функции.

Нами был вычислен коэффициент корреляции второй производной спектров гемоглобина ( $C$ ) и модели спектра по апобелку ( $A_0$ ) (рис. 32, кривая 2). Максимум величины  $r$  соответствовал  $\Delta x = -298,9 \text{ см}^{-1}$ . Сопоставляя величины коэффициентов корреляции для осей абсцисс  $\lambda$  и  $\bar{\nu}$  (рис. 32), и полуширину их максимумов, можно утверждать, что использование волновых чисел в качестве абсциссы дает лучшие результаты.

Кроме того, максимум на кривой 2 (рис. 32) имеет еще меньшую полуширину, чем представлено на данном рисунке. Это обусловлено тем, что кривые 1 и 2 связаны между собой только лишь количеством шагов смещения ( $n=25$ ) в длинноволновую область спектра (т.е.,  $\Delta\lambda=2,0 \text{ нм}$  и  $\Delta\bar{\nu}=-298,9 \text{ см}^{-1}$  по определению не эквивалентны друг другу). Максимальное значение  $\Delta\bar{\nu}=-679,3 \text{ см}^{-1}$  на шкале соответствует  $\Delta\lambda=3,85 \text{ нм}$ . Приведение 2 типов шкал абсцисс к единому масштабу в пределах заданного диапазона смещений  $\Delta x$  потребует дополнительных (избыточных) преобразований, не определяющих конечный результат.

Смещенный на  $\Delta\bar{\nu}$  модельный спектр апобелка ( $A_1$ ) был обратно конвертирован кубическим сплайном к линейной шкале длин волн (240,0–320,0 нм, с шагом интерполирующей сетки — 0,2 нм, рис. 30, кривая 3). По сравнению с предыдущим спектром (рис. 30, кривая 2), текущий спектр выглядит графически несколько шире, с преимущественным уширением в длинноволновую область. Точка по оси ординат, для которой значение поглощения по шкале длин волн и волновых чисел эквивалентно, соответствует длине волны 259,6 нм (рис. 30).

Так как волновое число обратно пропорционально длине волны, то дифференцирование функции:

$$\frac{d}{dx} \left( \frac{1}{x^c} \right) = \frac{d}{dx} (x^{-c}) = -\frac{x^c}{x^{c+1}} \quad (29)$$

при  $c=1$  приводит зависимость  $\Delta\lambda=f(\lambda)$  к уравнению вида:

$$y = a + bx^2, \quad (30)$$

где  $a=\Delta x=\Delta\lambda$ , а  $b$  — коэффициент, связывающий волновое число и длину волны. Зависимость абсолютного значения  $\Delta\lambda=f(\lambda)$ , показывающая уширение смещенного по волновому числу спектра, представлена на рис. 30 (кривая 4).

Соответствующая спектру  $A_1$ , полученная модель спектра поглощения гемовой составляющей ( $B_1$ ) изображена на рис. 30 (кривая 3), рис. 33 (кривая 1). Использование модельного спектра ( $A_1$ ), смещение для которого выполнялось по абсциссе  $\bar{\nu}$ , позволило в большей степени минимизировать дефекты в спектре  $B_1$  относительно его предыдущей версии (рис. 30, кривая 2), где аргументом выступает  $\lambda$  (традиционно используемая в УФ- и видимой спектrophотометрии).

Таким образом, использование шкалы абсцисс, прямо пропорциональной энергии переходов, является вполне оправданным.

Тем не менее, полностью устранить дефекты в спектре  $B_1$ , возникшие в результате вычитания модельного спектра апобелка ( $A_1$ ) из спектра гемоглобина ( $C$ ), не удалось.

Характер девиаций в спектре  $B_1$  указывает на источники происхождения этих артефактов, которые обусловлены, прежде всего, неоднородностью спектрального сдвига полос поглощения аминокислотных остатков в спектре белка ( $C$ ) по их типу, положению и особенностям микроокружения относительно таковых для спектра  $A_1$ . Это подтверждается тем, что наблюдаемые дефекты в спектре  $B_1$  коррелируют с полосами поглощения аминокислотных остатков как в модельном спектре апобелка ( $A_0$  и  $A_1$ ), так и в спектре гемоглобина ( $C$ ).

Ранее [41], с помощью второй производной нами были соотнесены все полосы (их пики) в спектре поглощения гемоглобина и его аддитивной модели спектра в исследуемом диапазоне длин волн (см. 3.2, рис. 20). Однако пиков поглощения протетических групп белка таким способом обнаружить не удалось (см. также 3.1).

Это позволяет устранить дефекты спектра  $B_1$  путем его сглаживания сплайнами (локальная интерполяция) или аппроксимирующими функциями (глобальная интерполяция, прежде всего, полиномами) без риска потери пиков

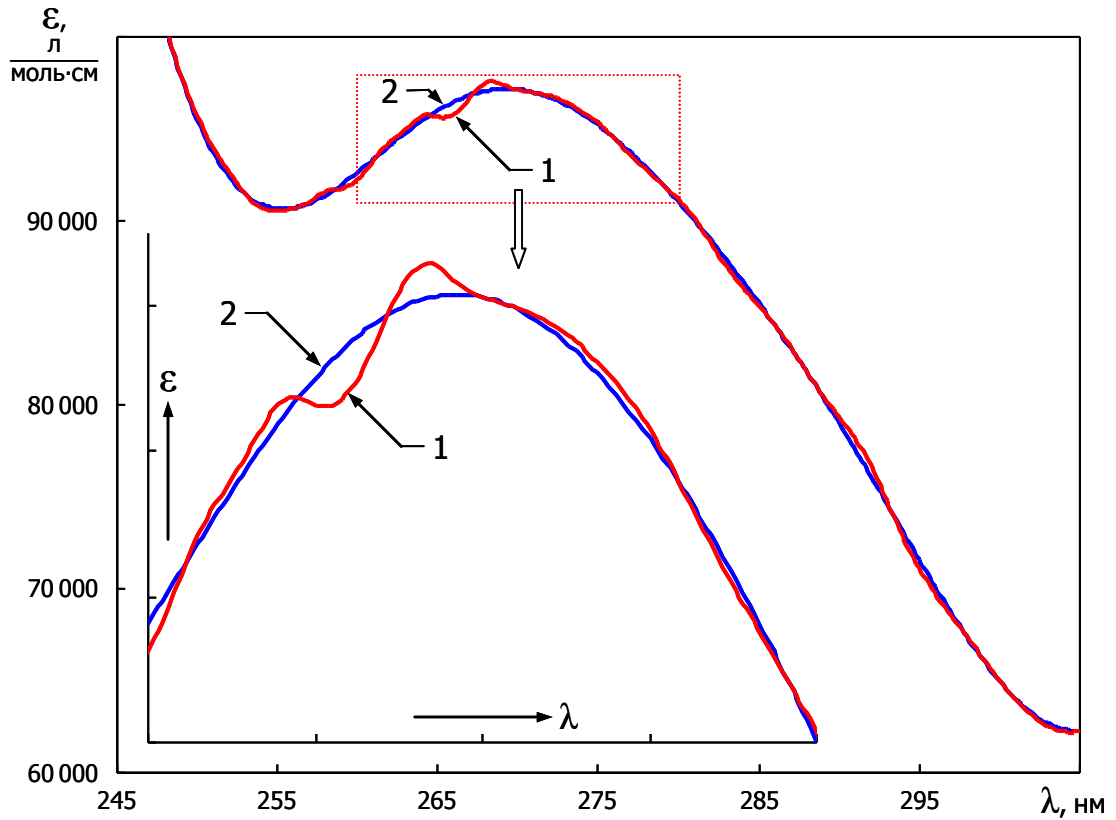


Рис. 33. Модельный спектр поглощения гемовой компоненты, полученный аппроксимацией полиномом Чебышева

Обозначения: модельный спектр  $B_1$  (1) (как разность  $C-A_1$ , после смещения апобелковой аддитивной модели по шкале  $\bar{\nu}$ ), аппроксимация  $B_1$  полиномом (2);  $\epsilon$  — молярный показатель поглощения

Примечание: протокол эксперимента — вариант «А»

поглощения гемовых групп или их существенного искажения. Для решения этой задачи могут быть использованы, например, фильтры Савицкого-Голея, Кайзера-Бесселя, ряды Фурье, а также непосредственно полиномы, лежащие, в том числе, в основе сплайнов Лагерра, Лежандра, Тейлора, Чебышева, Эрмита и др. [1, 2, 8, 9, 12, 24, 56, 148].

Критерием при подборе полинома (и его порядка ( $n$ ), п. 10 алгоритма) являлся оптимум, при котором достигались следующие сбалансированные между собой результаты:

1) наименьшее значение суммы квадратов остатков (RSS, Residual Sum of Squares) в окрестностях минимумов спектра  $B_1$  (что позволяет использовать данные минимумы в качестве отправной точки при построении полинома);

2) высокая однородность распределения остатков в окрестностях пика поглощения для  $B_1$  (при этом достигается более полное соответствие максимума полинома ожидаемому пику поглощения);

3) высокая гладкость функции между глобальными экстремумами  $B_1$  (RSS стремится к максимуму) позволяет отфильтровать дефекты спектра  $B_1$ .

Предпочтение отдавалось полиному с минимально возможным при этом используемым значением  $n$ .

В качестве интерполирующей функции был использован ортогональный полином Чебышева первого рода 10 порядка. Многочлены полинома были определены с помощью рекуррентных соотношений [13, 67]. Коэффициент достоверности аппроксимации к интерполируемому спектру составил при этом 99,98 %.

Следует отметить, что в предварительных вычислениях большинство сплайнов и полиномов различных типов и порядков в целом достаточно хорошо аппроксимируют спектр. Однако конструирование сплайнов под конкретную задачу требует несколько больше времени, чем подбор того или иного полинома. Кроме этого, полином позволяет представить спектр аналитически, в виде уравнения, коэффициенты которого приведены в табл. 9.

Таким образом, интерполяцией полиномом (рис. 33, кривая 2), получена

модель спектра поглощения гемовой части (*B*) (рис. 34, кривая 2) в составе белка (рис. 34, кривая 1) с  $\lambda_{max}=269,2$  нм ( $\epsilon=97163$ ). Найденная полоса поглощения не противоречит данным, полученным ранее [152]. Вычитая спектр поглощения простетических групп (*B*) из спектра поглощения гемоглобина (*C*), получаем «комплементарную» к нему модель спектра поглощения апобелка (*A*) (рис. 34, кривая 3) с  $\lambda_{max}=278,4$  нм ( $\epsilon=48669$ ).

Таблица 9. Коэффициенты ортогонального полинома Чебышева первого рода 10 порядка для модели спектра поглощения гемовой компоненты в составе белка

$T_n$	0	1	2	3	4	5
$f(T_n)$	+9,2E+04	-2,8E+04	+1,3E+04	-3,2E+03	+1,4E+04	-5,1E+03
$T_n$	—	6	7	8	9	10
$f(T_n)$	—	+3,5E+02	-6,2E+02	-2,7E+02	+7,7E+01	+5,4E+02

*Примечание:*  $T_n$  — порядок (номер) коэффициента многочлена,  $f(T_n)$  — значение коэффициента многочлена

Вычисленный нами модельный спектр апогемоглобина хорошо согласуется с известными литературными данными для белков (не содержащих хромофорных простетических групп в этом диапазоне), а также проферментов и апобелков (эу- и псевдоглобулины, альбумины: сывороточный и яичный, тиреоглобулин, лизоцим, трипсиноген, химотрипсиноген, апомиоглобин) [86, 90].

Относительный вклад в суммарное поглощение моделей спектров апобелковой и небелковой компонент представлен на рис. 35. Следует выделить некоторые длины волн: 269,2 нм ( $\lambda_{max}$  гемовой составляющей) — доля ее поглощения 68,6 %; 274,2 нм ( $\lambda_{max}$  гемоглобина) — 66,6 %; 278,4 нм ( $\lambda_{max}$  апобелка) — 65,5 % и 280,8 нм ( $\lambda_{min}$  гемовой компоненты) — 65,2 %.

Проинтегрировав спектры поглощения гемоглобина и модельного спектра гемовой компоненты на участке 240,0–320,0 нм, мы получили относительную долю поглощения небелковой составляющей — 78,8 %.

Корректность полученной модели спектра поглощения апобелковой компоненты также может быть подтверждена сравнением производных второго



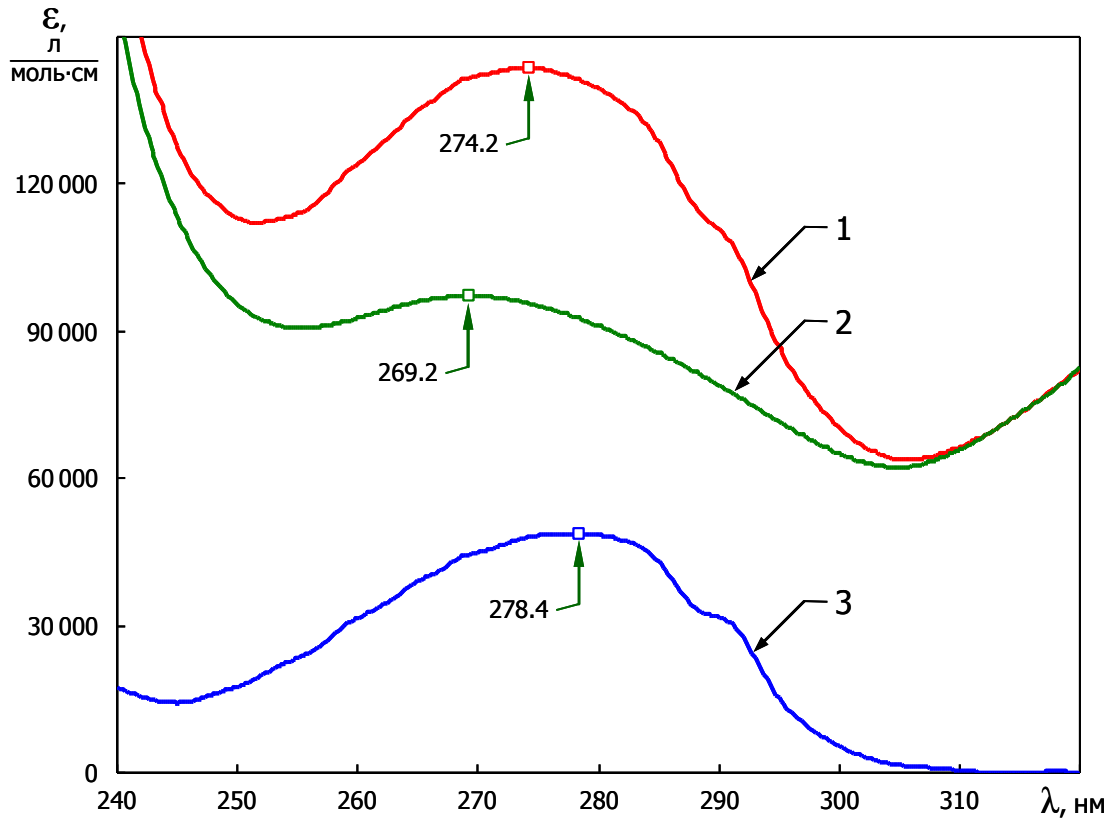


Рис. 34. Спектры поглощения гемоглобина, его апобелковой и небелковой компонент в диапазоне длин волн 240,0–320,0 нм

Обозначения: спектр поглощения гемоглобина (1), модельный спектр поглощения гемовой компоненты и апобелка (2 и 3, соответственно);  $\varepsilon$  — молярный показатель поглощения

Примечание: отмеченные пики поглощения определены из недифференцированных спектров; протокол эксперимента — вариант «А»

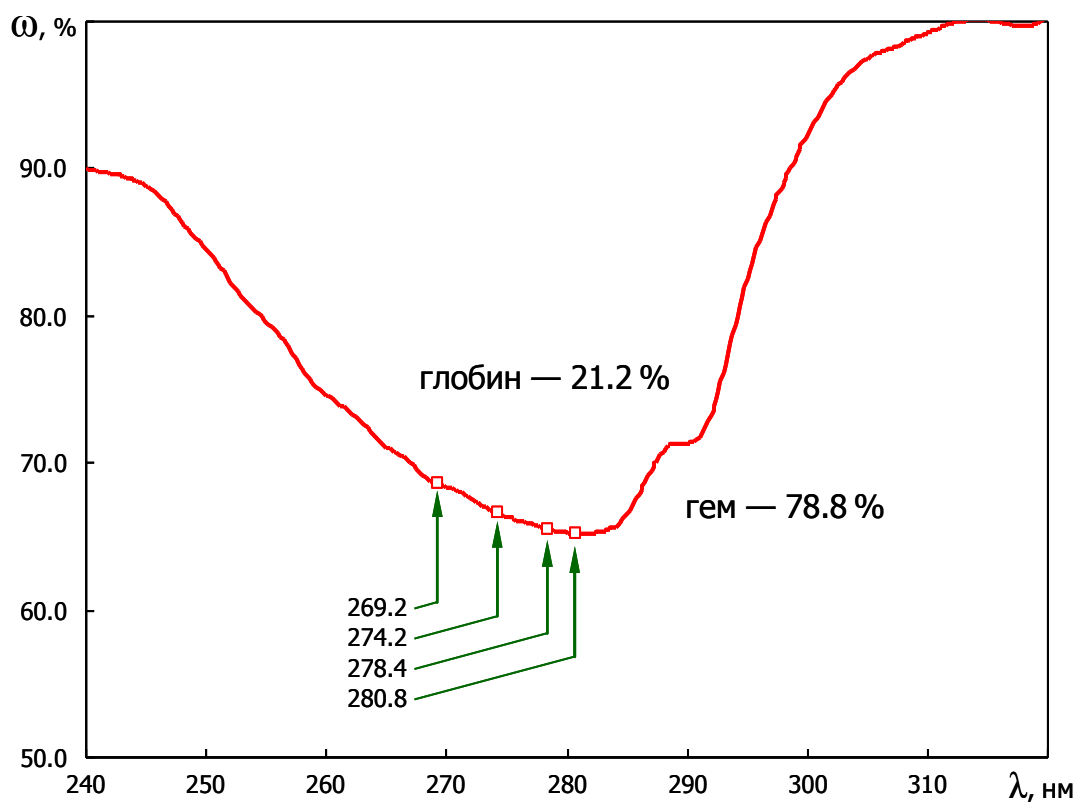


Рис. 35. Составляющая поглощения гемовой компоненты в диапазоне длин волн 240,0–320,0 нм

Обозначения:  $\omega$ , % — относительная доля поглощения протетических групп в спектре гемоглобина

Примечание: протокол эксперимента — вариант «А»

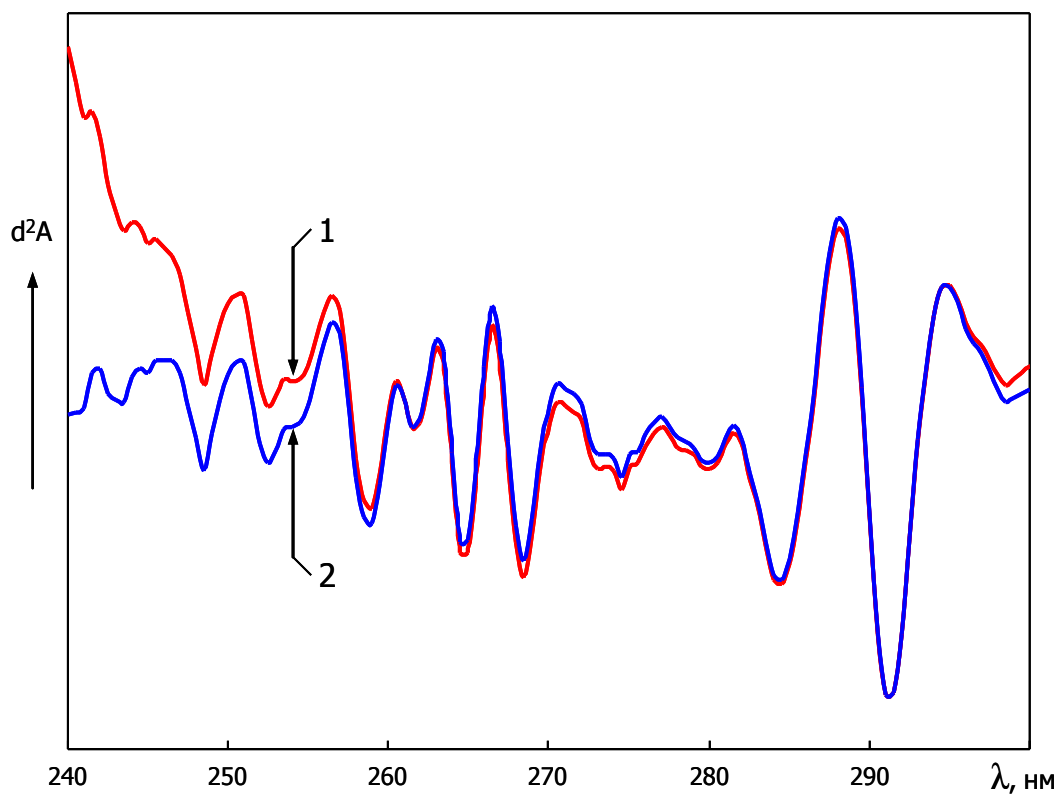


Рис. 36. Вторые производные спектра поглощения гемоглобина и модели спектра поглощения апобелка в составе макромолекулы в диапазоне длин волн 240,0–300,0 нм

Обозначения: гемоглобин (1), модель апобелка (2); по оси ординат — вторая производная поглощения ( $d^2A$ )

Примечание: производные спектров поглощения нормированы по амплитуде; протокол эксперимента — вариант «А»

порядка: спектра апобелка (*A*) и гемоглобина (*C*) (рис. 36, [41]). В свою очередь, полученная производная модели спектра поглощения апобелка указывает на правильность выполненных вычислений для спектра поглощения простетических групп.

Таким образом, предложенный способ разложения УФ-спектра поглощения хромопротеидов на спектры светопоглощения простетических групп и апобелка опирается на аддитивные модели двух типов: 1) как суммы парциальных спектров поглощения аминокислот, формирующей модель апобелка, 2) как суммы неизвестных, но взаимосвязанных спектров поглощения апобелка и простетических групп, которая представляет собой известный спектр поглощения биополимера.

При разработке алгоритма разложения УФ-спектров поглощения белков большое внимание уделялось его универсальности. Так, в вырожденном случае, для простых белков вычисленная составляющая небелковой компоненты будет представлять собой линию, лежащую на оси абсцисс.

Полученные результаты вычислений составляющих компонент спектра поглощения гемоглобина могут быть в дальнейшем полезны при изучении закономерностей действия различных физико-химических факторов, в частности, УФ-излучения на данный гемопротеид [19].

#### 4.2 Разложение УФ-спектров светопоглощения производных гемоглобина на составляющие поглощения апобелка и простетических групп

Способность гемоглобина связывать различные лиганды и аддукты как простетическими группами, так и апобелковой компонентой, делает эту макромолекулу удобной моделью при решении ряда биофизических, биохимических и физиологических задач [27, 36, 77, 81, 137].

Переменная валентность комплексообразователя и вариабельность

аминокислотного состава субъединиц данного гемопротейда позволяют качественно расширить диапазон проводимых исследований, а известная пространственная структура этого белка дает возможность корректно верифицировать предлагаемые модели состояний как интактной макромолекулы, так и при воздействии на нее целого ряда физико-химических агентов, в т.ч. УФ-излучения.

Таким образом, молекула гемоглобина является уникальной структурно-функциональной моделью, как в молекулярной биофизике, так и в спектрофотометрии белков.

Исходя из формализованных представлений: «общий апобелок–различное состояние гема»/«различный апобелок–одинаковое состояние гема» представляется возможным исследовать, насколько аддитивна система «апобелок/простетические группы» ( $A+B$ ) как модель интегрального спектра поглощения макромолекулы ( $C$ ).

С учетом вышеизложенного, нами было выполнено разложение спектров поглощения макромолекул наиболее значимых в физиологическом отношении производных гемоглобина А и F на составляющие компоненты уровня: «апобелковая/небелковая части биополимера». Кроме этого, были смоделированы спектры поглощения производных гемоглобина путем комбинирования различных небелковых и апобелковых компонент, полученных на предыдущем шаге исследований.

В качестве отправной точки были использованы полученные ранее спектры поглощения производных гемоглобина, а также аддитивные модели апобелка, созданные на основе спектров светопоглощения свободных аминокислот (см. 3.2, табл. 4), протокол эксперимента — вариант «В»).

На рис. 37 показана зависимость коэффициента корреляции от шага смещения по второй производной модельного спектра апобелка ( $A_0$ ) относительно нативного окси-, карбокси-, дезокси- и метгемоглобина А по аргументу  $\bar{\nu}$  (кривая 1, 2, 3 и 4 соответственно). Такое смещение выполняли для каждой из 4 пар спектров поглощения  $C/A_0$  индивидуально.

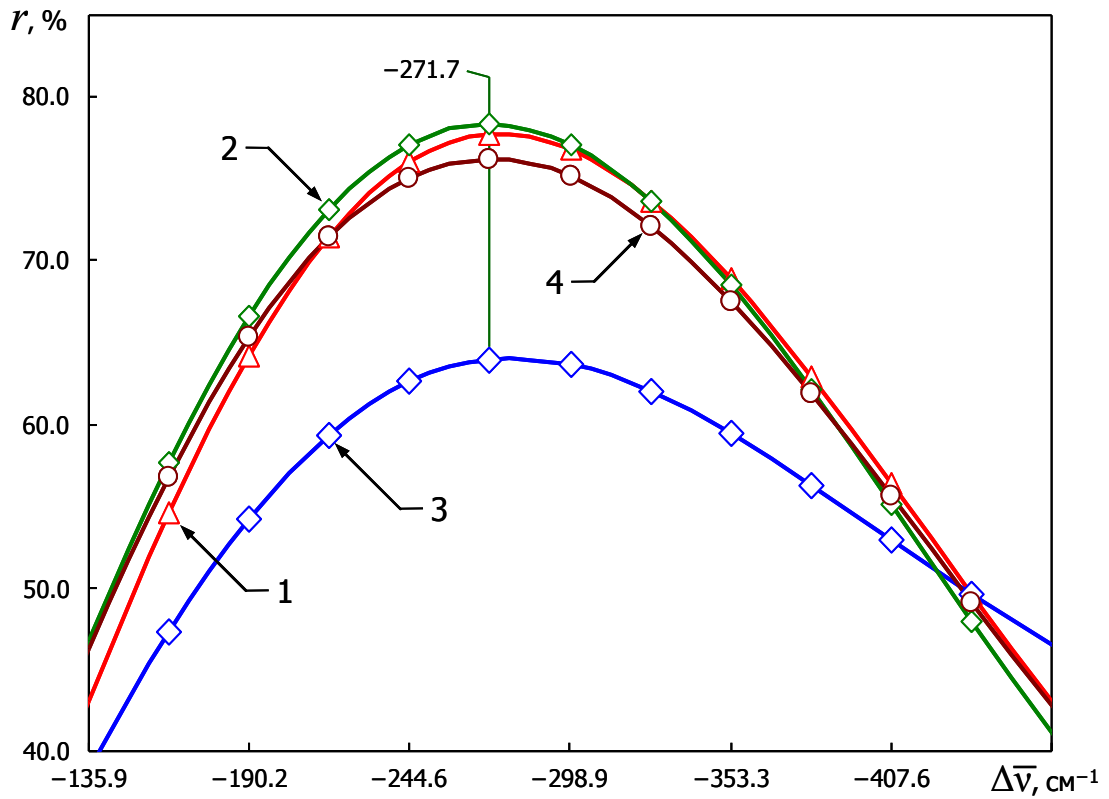


Рис. 37. Зависимость коэффициента корреляции от  $\Delta\bar{\nu}$  дифференцированного модельного спектра апобелка относительно такового для производных гемоглобина А

Обозначения: оксигемоглобин (1), карбоксигемоглобин (2), дезоксигемоглобин (3) и метгемоглобин (4);  $r$  — коэффициент корреляции

Примечание: протокол эксперимента — вариант «В»

Как следует из представленных данных (рис. 37), для всех пар спектров поглощения ( $C/A_1$ )  $\Delta\bar{\nu} = -271,7 \text{ см}^{-1}$  практически полностью (с точностью до цены деления дискретной шкалы в  $27,17 \text{ см}^{-1}$ ) совпадает с ранее полученным результатом, выполненным по данным протокола эксперимента вариант «А» (т.е.  $-298,7 \text{ см}^{-1}$ , рис. 32).

Однако коэффициент корреляции Пирсона для пары спектров «дезоксигемоглобин/модель его апобелка» существенно ниже и обособлен своей величиной относительно аналогичных пар для окси-, карбокси- и метгемоглобина А. Эта особенность ранее нами уже отмечалась (см. 3.1) при анализе пиков вторых производных спектров поглощения. Причем спектры светопоглощения мет- и дезоксигемоглобина А более сопоставимы друг к другу по сравнению с парой «окси-/карбоксигемоглобин А» (рис. 38).

Из этого следует, что разрешаемая тонкая структура спектров поглощения гембелка, обнаруживаемая по второй производной, не обязательно соответствует, а в данном случае, и казалось бы, противоречит результатам анализа недифференцированных спектров. Вместе с тем, предложенный метод контроля степени соответствия аддитивной модели к нативным спектрам белка позволяет оценивать также и степень сходства спектров производных гемоглобина между собой.

Таким образом, общая исходная модель апобелка ( $A_0$ ) может выступать как тест в оценке степени соответствия спектров производных гемоглобина друг к другу. Естественно, такое соответствие может быть установлено и непосредственно между этими производными гембелка путем корреляционного анализа по их дифференцированным спектрам поглощения. Другими словами, демонстрируемая особенность сопоставления исходного и модельных спектров при оптимизации шага смещения аддитивной модели является «полезным побочным эффектом», с помощью которого решаются две задачи: основная — поиск оптимума  $\Delta\bar{\nu}$  и вспомогательная — оценка степени соответствия спектров поглощения друг к другу.

Мы разложили на апобелковую и небелковую составляющие спектры

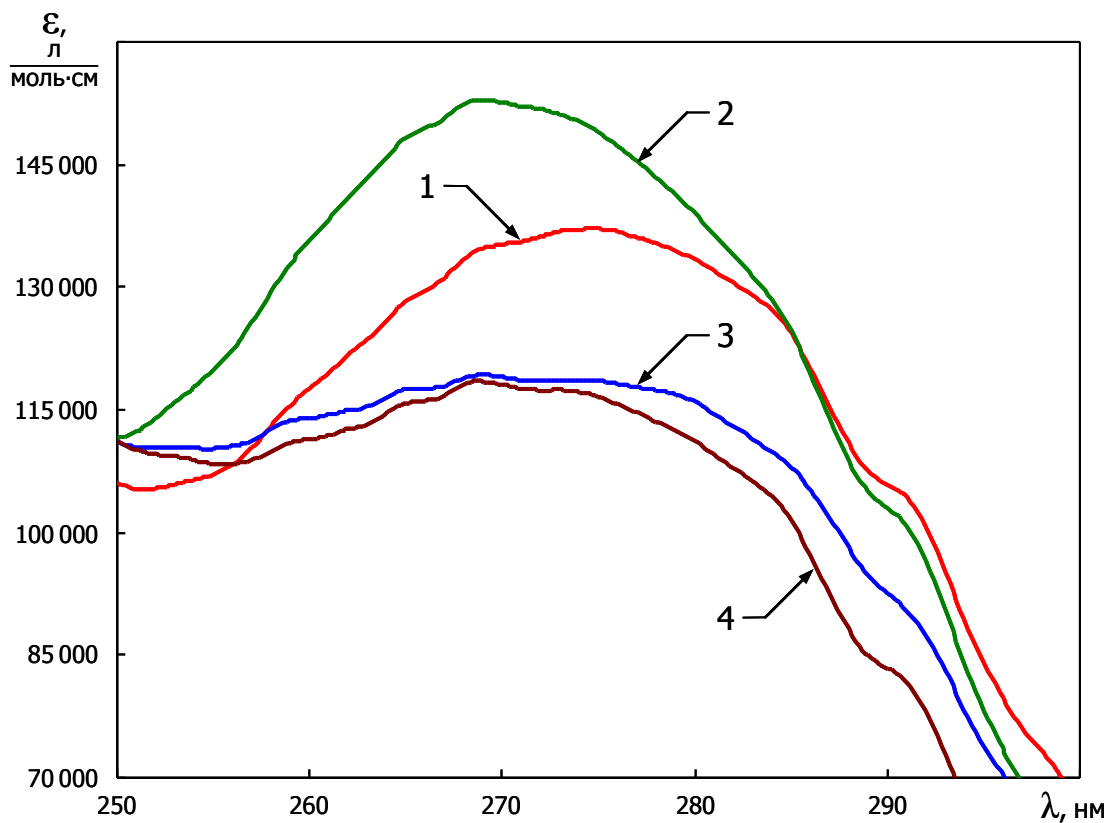


Рис. 38. Спектры поглощения производных гемоглобина А в диапазоне длин волн 250,0–300,0 нм

Обозначения: оксигемоглобин (1), карбоксигемоглобин (2), дезоксигемоглобин (3) и метгемоглобин (4);  $\epsilon$  — молярный показатель поглощения

Примечание: протокол эксперимента — вариант «В»



поглощения окси-, карбокси-, дезокси- и метгемоглобина А предложенным нами способом. В качестве интерполирующей функции выступил примененный ранее полином Чебышева первого рода 10 порядка. Коэффициент достоверности аппроксимации к интерполируемым спектрам  $B_1$  для  $\text{HbO}_2$ ,  $\text{HbCO}$ ,  $\text{Hb}$  и  $\text{MtHb}$  составил соответственно: 99,958 %, 99,978 %, 99,955 % и 99,978 %.

На рис. 39–42 приведены модели спектров поглощения простетических групп для окси-, карбокси-, дезокси- и метформ гемоглобина А, а также апобелковых компонент в составе этих макромолекул (кривая 1, 2, 3 и 4 соответственно).

В табл. 10 указаны молярные показатели максимумов поглощения интегральных нативных (С) и модельных спектров апобелковой (А) и небелковой компонент (В) для  $\text{HbO}_2$ ,  $\text{HbCO}$ ,  $\text{Hb}$  и  $\text{MtHb}$ .

Таблица 10. Максимумы поглощения и их молярные показатели для некоторых производных гемоглобина А

Образец	А		В		С	
	$\lambda_{\text{max}}$	$\varepsilon$	$\lambda_{\text{max}}$	$\varepsilon$	$\lambda_{\text{max}}$	$\varepsilon$
Оксигемоглобин	278,0	48984	269,2	90215	274,6	137172
Карбоксигемоглобин	278,2	48951	266,4	109342	269,0	152949
Дезоксигемоглобин	278,6	49272	—	—	269,0	119262
Метгемоглобин	278,2	48852	—	—	268,8	118463

*Примечание:* А — модель спектра поглощения апобелка, В — простетических групп, С — интегральный нативный спектр макромолекулы;  $\lambda_{\text{max}}$  — максимум поглощения (нм),  $\varepsilon$  — молярный показатель поглощения (л/(моль·см))

Следует отметить, на наш взгляд, важный аспект при оценке положения максимумов в недифференцированных спектрах поглощения белков.

Как следует из представленных данных (рис. 39–42), в спектрах карбокси-, дезокси- и метгемоглобина положение максимумов поглощения определяется одним из пиков боковой группы фенилаланина, который представляется локальным экстремумом (табл. 10, столбец С). Этот пик соответствует полосе №13 (см. 3.1, табл. 2) для спектров, дифференцированных по второй производной.

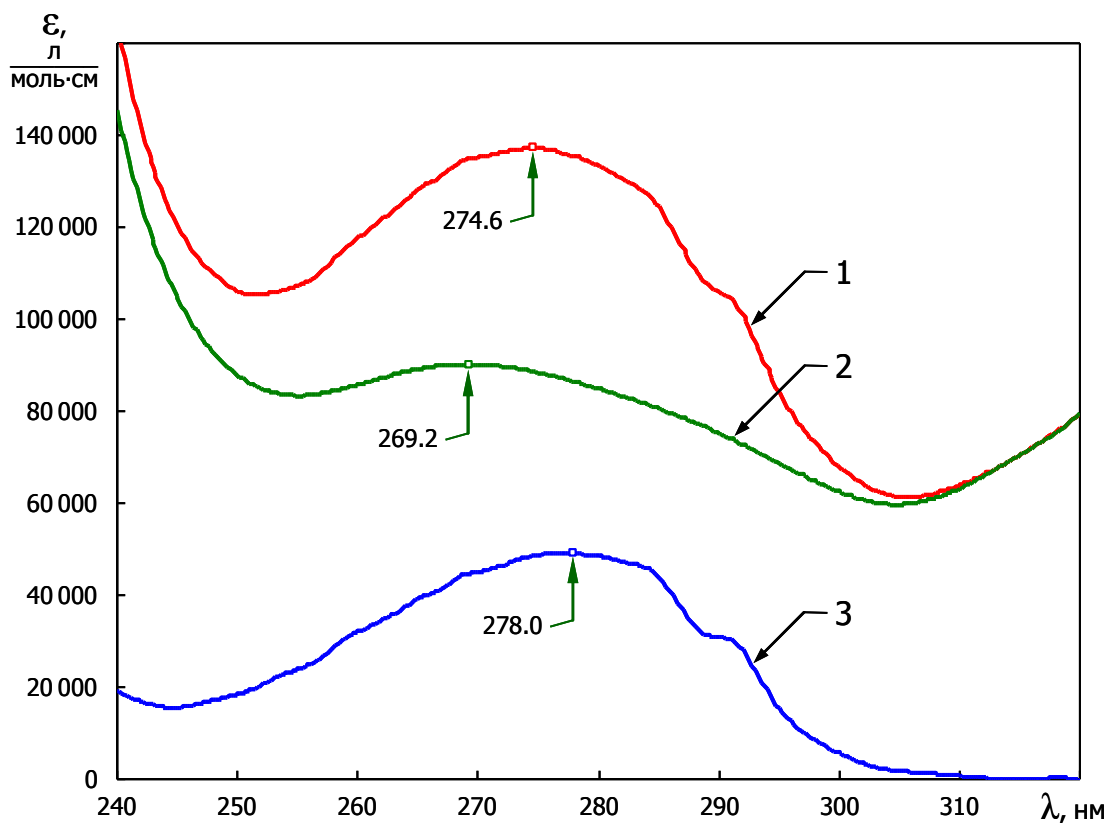


Рис. 39. Спектры поглощения оксигемоглобина А, его апобелковой и небелковой компонент в диапазоне длин волн 240,0–320,0 нм

Обозначения: спектр поглощения белка (1), модельный спектр поглощения гемовой компоненты и апобелка (2 и 3 соответственно);  $\epsilon$  — молярный показатель поглощения

Примечание: отмеченные пики поглощения определены из недифференцированных спектров; протокол эксперимента — вариант «В»

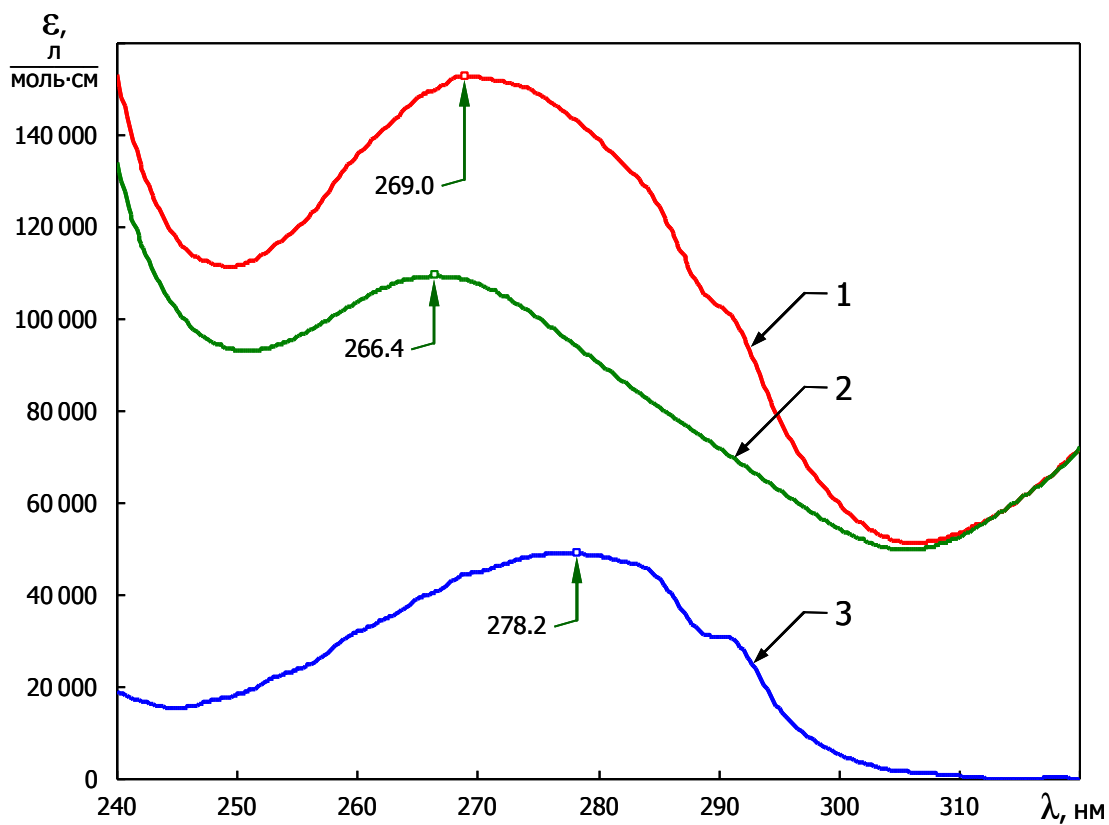


Рис. 40. Спектры поглощения карбоксигемоглобина А, его апобелковой и небелковой компонент в диапазоне длин волн 240,0–320,0 нм

Обозначения и примечание те же, что и на рис. 39

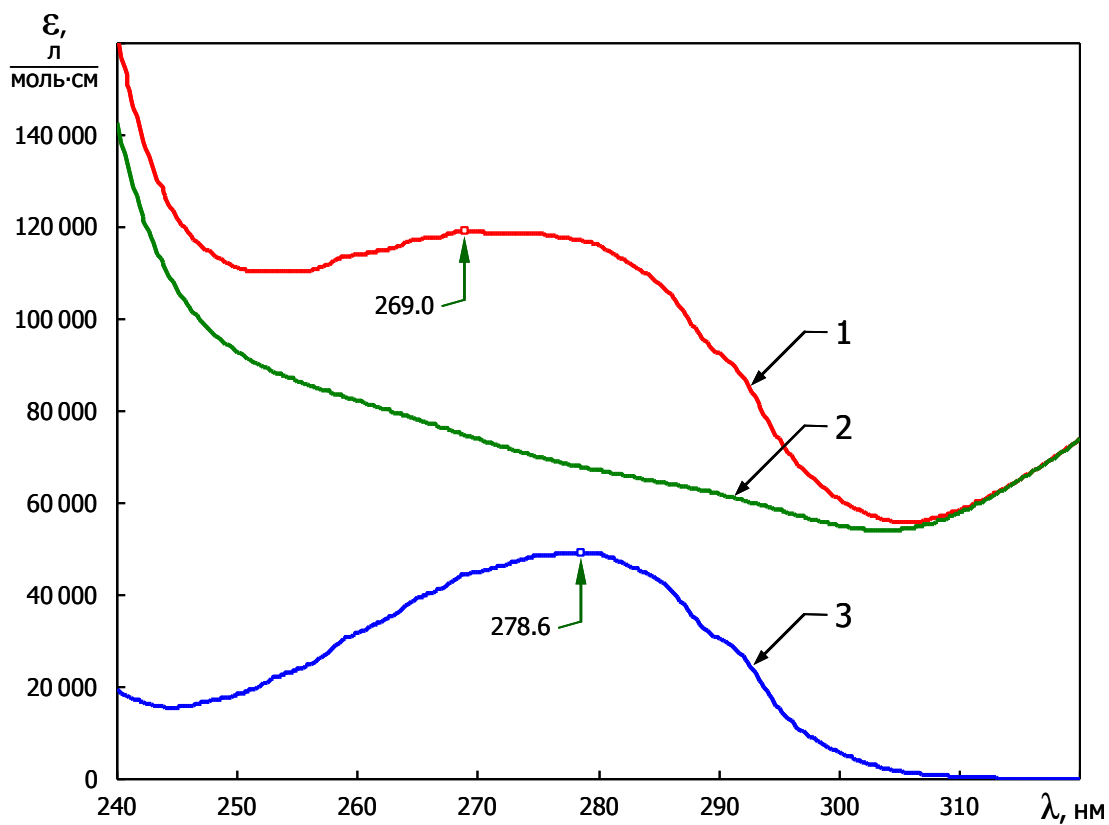


Рис. 41. Спектры поглощения дезоксигемоглобина А, его апобелковой и небелковой компонент в диапазоне длин волн 240,0–320,0 нм

Обозначения и примечание те же, что и на рис. 39

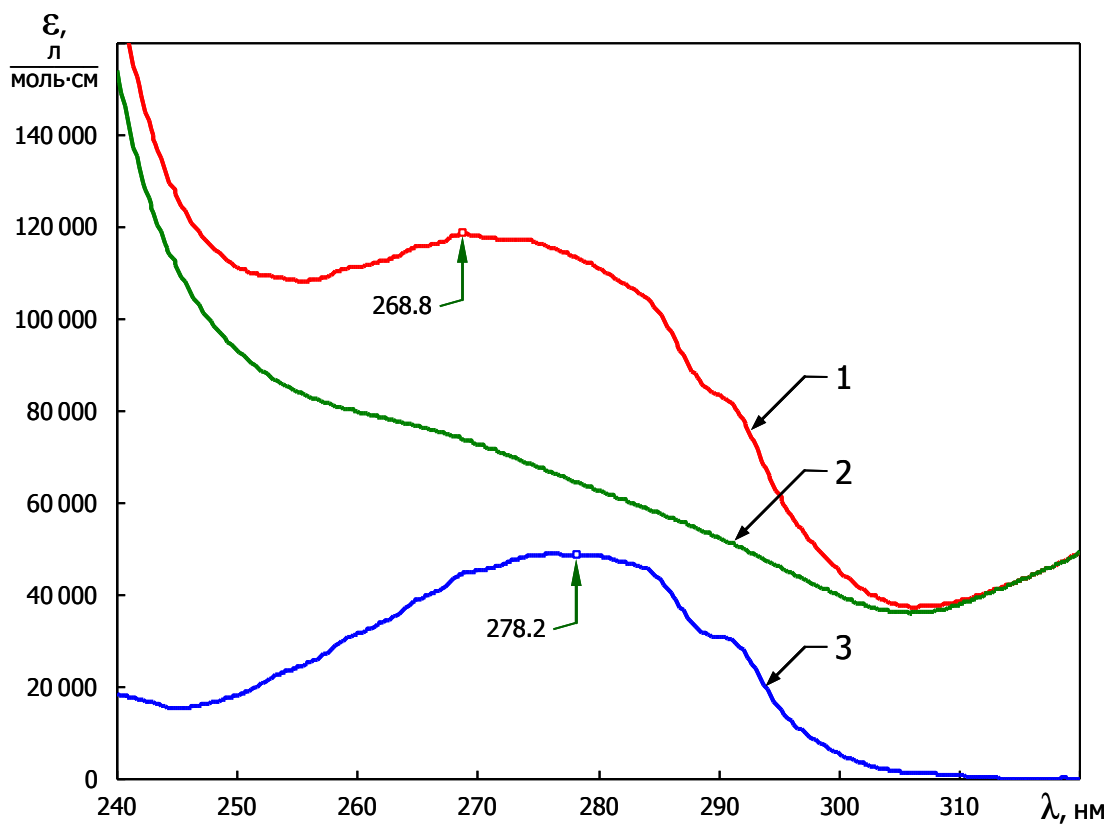


Рис. 42. Спектры поглощения метгемоглобина А, его апобелковой и небелковой компонент в диапазоне длин волн 240,0–320,0 нм

Обозначения и примечание те же, что и на рис. 39

Так как нахождение максимума поглощения осуществляется по поиску наибольшего значения по оси ординат (как формальный, простой и доступный в оценке критерий), то в некоторых случаях возможны неопределенности при соотнесении абсциссы для такого экстремума. Особенно, если суперпозиция формирующих этот максимум полос поглощения создает диффузный, с большой полушириной и локальными неоднородностями, пик.

Следовательно, незначительное снижение степени экспонирования или небольшие сдвиги в соотношении количества аминокислотных остатков, могут привести к смене приоритета при выборе максимума, что может выглядеть как определенное смещение его положения на недифференцированном спектре.

Это хорошо подтверждается, например, данными по найденным пикам поглощения апобелка (табл. 10, столбец *A*). Аналогичные эффекты отмечались ранее (см. 3.3, рис. 25-а) при анализе спектров поглощения альбумина.

Однако в хромопротеидах, в частности в гемоглобине, отмеченный эффект усиливается тем, что изменения в спектрах поглощения собственно простетических групп способны дать существенное расхождение в оценке положения соответствующих экстремумов в интегральных спектрах светопоглощения данных белков.

Так, для оксигемоглобина *A* пик поглощения определяется при длине волны 274,6 нм, что значительно больше по положению на абсциссе (>5 нм) относительно других форм гембелка. Но из этого не следует, что апобелковая компонента претерпела существенные спектральные модификации (рис. 39–42, табл. 10, столбец *A*), например, при замещении в гемовых группах одного лиганда на другой (в частности, O<sub>2</sub> на CO).

То есть, значимая роль простетических групп при оценке положения максимумов интегральных спектров определяется, прежде всего, их высокими молярными показателями поглощения в широком диапазоне длин волн, даже если эти группы имеют пики с большой полушириной или отсутствуют совсем.

Таким образом, поиск максимумов в интегральных спектрах поглощения белков в ряде случаев сопряжен с неустойчивым решением по определению

положения экстремума, а найденный максимум не всегда может корректно отражать структурные изменения хромофоров белка (особенно, если он представлен, как «макропоказатель» только лишь табличным значением). Использование методов производной спектрофотометрии позволяет снизить эту неопределенность.

Несущественное расхождение молярных показателей поглощения для гемоглобина (протокол эксперимента — вариант «А») и очищенного и скорректированного на примеси оксигемоглобина А (вариант «В», табл. 10) обусловлено, преимущественно, присутствием в исходном образце гемоглобина других его форм (см. 3.1). Отмечаемое небольшое несоответствие показателей поглощения связано также с различающимися методиками определения концентрации гембелка (см. 3.1, табл. 1).

Кроме этого, при оценке концентрации гемоглобина в клинико-диагностической лаборатории референтным метгемоглобинцианидным методом допускается погрешность измерения в 5 %, при этом ошибка соответствия фактической концентрации коммерческих калибровочных растворов цианметгемоглобина паспортным значениям эталона для различных партий, может достигать до 2 % [65].

Таким образом, различие показателей в пиках поглощения интегрального спектра, моделей спектров гемовой и апобелковой компонент оксигемоглобина А (вариант «В») относительно общего гемоглобина (вариант «А») составило соответственно: -4,53 %, -7,15 % и 0,65 %, что является вполне приемлемым результатом, позволяющим соотносить полученные данные по разным протоколам измерения.

На рис. 43 показано относительное поглощение гемовой компоненты для окси-, карбокси-, дезокси- и метгемоглобина А в зависимости от длины волны (240,0–320,0 нм). Интегральная относительная доля поглощения простетических групп в заданном диапазоне для этих гемпроизводных составила: 77,5 %, 77,9 %, 75,7 % и 73,7 % соответственно.

Как следует из представленных данных, минимальная доля поглощения

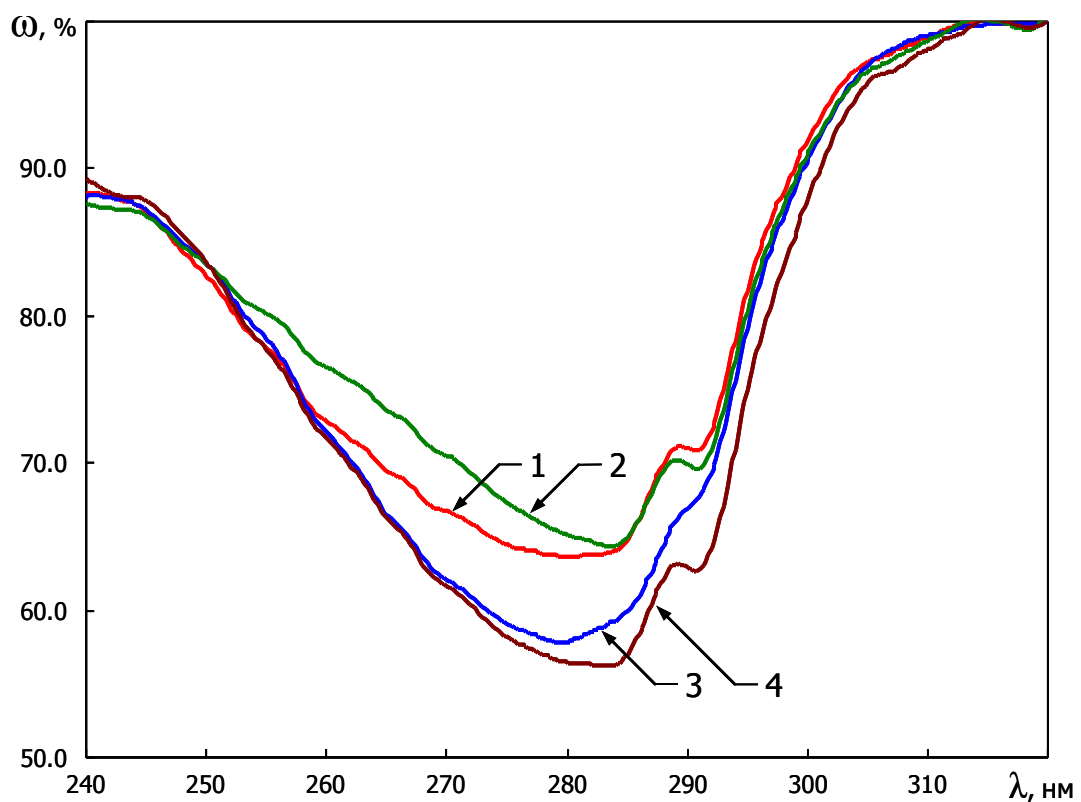


Рис. 43. Составляющая поглощения простетических групп производных гемоглобина А в диапазоне длин волн 240,0–320,0 нм  
Обозначения: оксигемоглобин (1), карбоксигемоглобин (2), дезоксигемоглобин (3) и метгемоглобин (4);  $\omega$ , % — относительная доля поглощения небелковой компоненты в спектрах производных гемоглобина

Примечание: протокол эксперимента — вариант «В»



гемовой составляющей в нативном спектре гембелка соответствует значениям не ниже 55 % (MtHb,  $\lambda \approx 284$  нм). Причем оценка по интегральной относительной доле ( $\omega$ ) дает еще большее минимальное значение — 73,7 % (MtHb).

Сопоставляя полученные результаты, следует отметить близкие величины для окси- и карбоксигемоглобина (разница менее 0,4 %), т.е. интегралы площадей поглощения практически одинаковы. Причем, существующая разность в долях светопоглощения между максимальным и минимальным значениями исследуемых форм гембелка не превышает 4,2 % ( $S_{\text{HbCO}} - S_{\text{MtHb}}$ ).

Мы оценили, насколько коррелируют полученные результаты вычислений спектров поглощения простетических групп с экспериментальными данными. Для этого связали модельные спектры поглощения гемов ( $B$ , 240,0–320,0 нм) со спектрами поглощения нативных молекул белка ( $C$ , 320,0–380,0 нм), где поглощает только небелковая компонента (рис. 44). Как следует из представленных данных, модельные и экспериментальные спектры, принадлежащие разным диапазонам, гармонизируют между собой по наличию/отсутствию максимумов, амплитуде и выраженности пиков. В совокупности это также подтверждает корректность выполненных расчетов в рамках предложенного способа разложения спектров поглощения.

Представляется интересным получить спектры поглощения апобелковых компонент хромопротеидов с различным аминокислотным составом путем вычитания из полученного экспериментального спектра  $C$  вычисленного модельного спектра  $B$ , если, разумеется, совпадают небелковые компоненты, в частности, по таким показателям как степень окисления и тип лиганда для комплексообразователя.

Кроме этого, появляется возможность проверить, насколько аддитивна предлагаемая модель (см. 4.1, уравнение (28)). Для этого было выполнено разложение спектра поглощения оксигемоглобина  $F$ .

На рис. 45 показана зависимость коэффициента корреляции от шага смещения по второй производной модельного спектра апобелка  $A$  и  $F$  ( $A_0$ ) относительно нативного оксигемоглобина  $A$  и  $F$  ( $C$ ) по аргументу  $\bar{\nu}$ . Для  $\text{Hb}_F\text{O}_2$

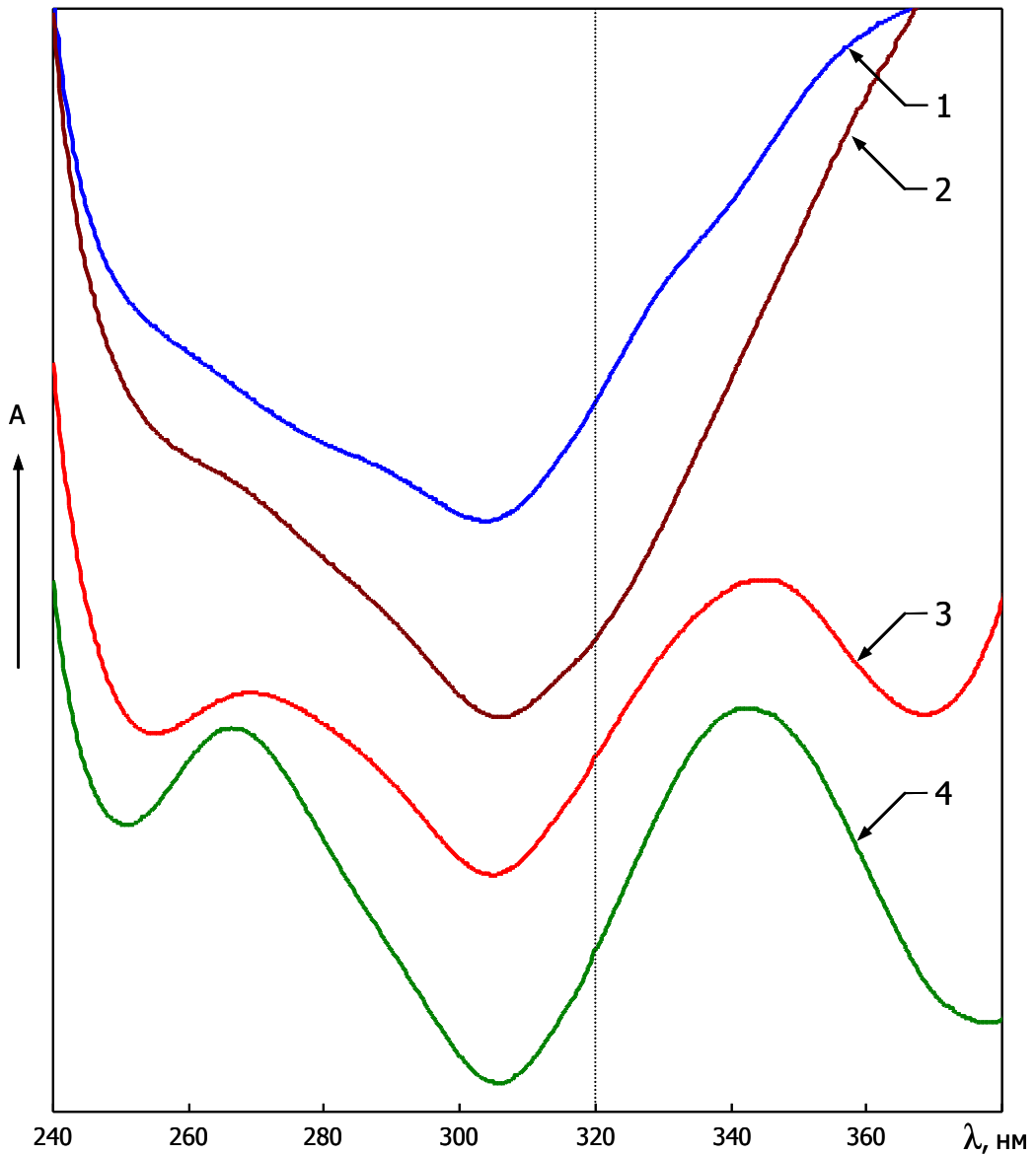


Рис. 44. Спектры поглощения производных гемоглобина А и его моделей: спектров простетических групп

*Обозначения: дезоксигемоглобин (1), метгемоглобин (2), оксигемоглобин (3) и карбоксигемоглобин (4); вертикальная пунктирная линия делит диапазон поглощения гемовых групп на вычисленные (слева) и экспериментальные (справа) области полученных данных; по оси ординат — поглощение (A)*

*Примечание: спектры поглощения смещены друг относительно друга по оси ординат на константу; протокол эксперимента — вариант «В»*

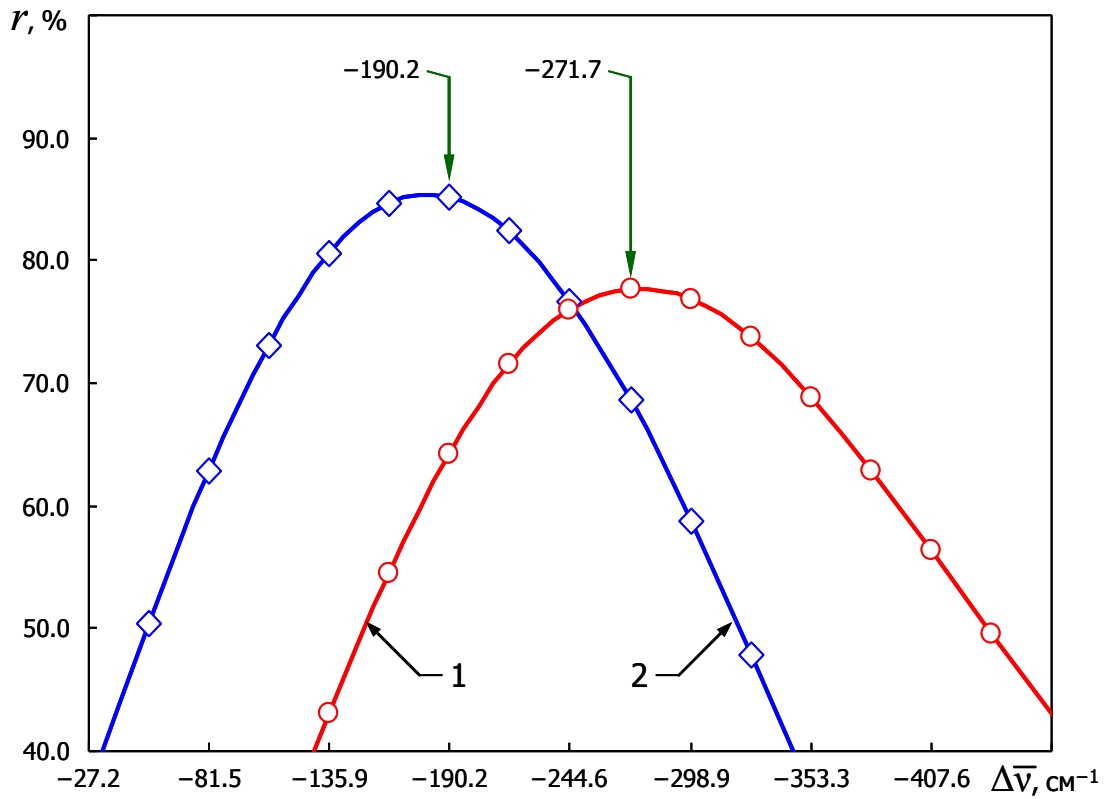


Рис. 45. Зависимость коэффициента корреляции от  $\Delta\bar{\nu}$  дифференцированного модельного спектра апобелка относительно такового для оксигемоглобина А и F

Обозначения: оксигемоглобин А (1) и оксигемоглобин F (2);  $r$  — коэффициент корреляции

Примечание: протокол эксперимента — вариант «В»

значение  $\Delta\bar{\nu}$  составило  $-190,2 \text{ см}^{-1}$ , что на  $-81,5 \text{ см}^{-1}$  отличается от  $\text{Hb}_A\text{O}_2$ .

Наблюдаемое расхождение  $\Delta\bar{\nu}$  и  $r$  обусловлено различиями в тонкой структуре спектров поглощения оксигемоглобина F и A (выявляемой с помощью второй производной). Так как коэффициент корреляции (в отличие от ковариации) не зависит от размерности величин сравниваемых массивов, то и значение  $r$  также не определяется величиной поглощения (как, например, функцией от концентрации) для сравниваемых спектров.

Подобное различие по коэффициенту корреляции также наблюдалось и ранее при сопоставлении данных по окси-, карбокси- и метформе белка относительно дезоксиформы (рис. 37 и 38, см. также 3.1).

На рис. 46 показаны в сравнении между собой спектры поглощения оксигемоглобина F и A (кривая 1 и 2 соответственно), модели спектров поглощения гемовой (кривая 3 и 4) и апобелковой (кривая 5 и 6) компонент.

Для оксигемоглобина F максимумы поглощения составили: 273,6 нм ( $\epsilon=145911$ , спектр нативного белка), 268,6 нм ( $\epsilon=91023$ , модель спектра гемовой составляющей) и 278,4 нм ( $\epsilon=57148$ , модель спектра поглощения апобелка).

Относительная доля поглощения простетических групп оксигемоглобина F (кривая 1) и A (кривая 2) в диапазоне длин волн 240,0–320,0 нм представлена на рис. 47. Интегральная относительная доля поглощения простетических групп этой формы гембелка составила 74,3 % (против 77,5 % для  $\text{Hb}_A\text{O}_2$ , т.е.  $\Delta=-3,2 \%$ ).

Сопоставляя положение максимумов недифференцированных спектров поглощения моделей апогемоглобина A и F, следует отметить (табл. 10) незначительное  $+0,4 \text{ нм}$  (относительно  $\text{Hb}_A\text{O}_2$ ) смещение экстремума.

С одной стороны, это смещение объясняется хотя и небольшими, но неизбежными, сопряженными с выбранным алгоритмом разложения спектра поглощения, артефактами, а также случайными ошибками, обусловленными, в том числе, погрешностями определения показателей светопоглощения для спектров белков и свободных аминокислот, входящих в аддитивную модель.

С другой стороны, такое смещение обуславливается характером и выраженностью волнового сдвига для различных по типу боковых групп

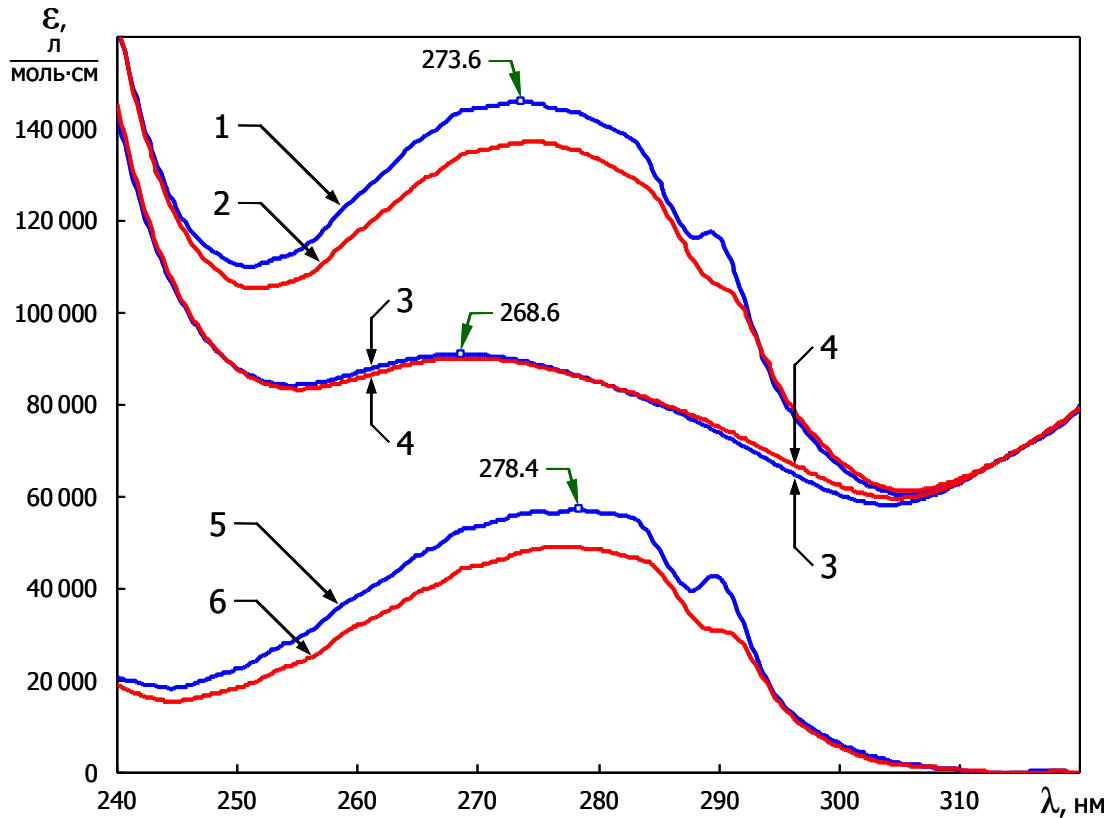


Рис. 46. Сравнительные спектры поглощения оксигемоглобина F и A, их апобелковой и небелковой компонент в диапазоне длин волн 240,0–320,0 нм

Обозначения: спектр поглощения гемоглобина F и A (1 и 2), модельный спектр поглощения гемовой компоненты F и A (3 и 4) апобелка (5 и 6 соответственно);  $\varepsilon$  — молярный показатель поглощения

Примечание: отмеченные пики поглощения определены из недифференцированных спектров; протокол эксперимента — вариант «B»

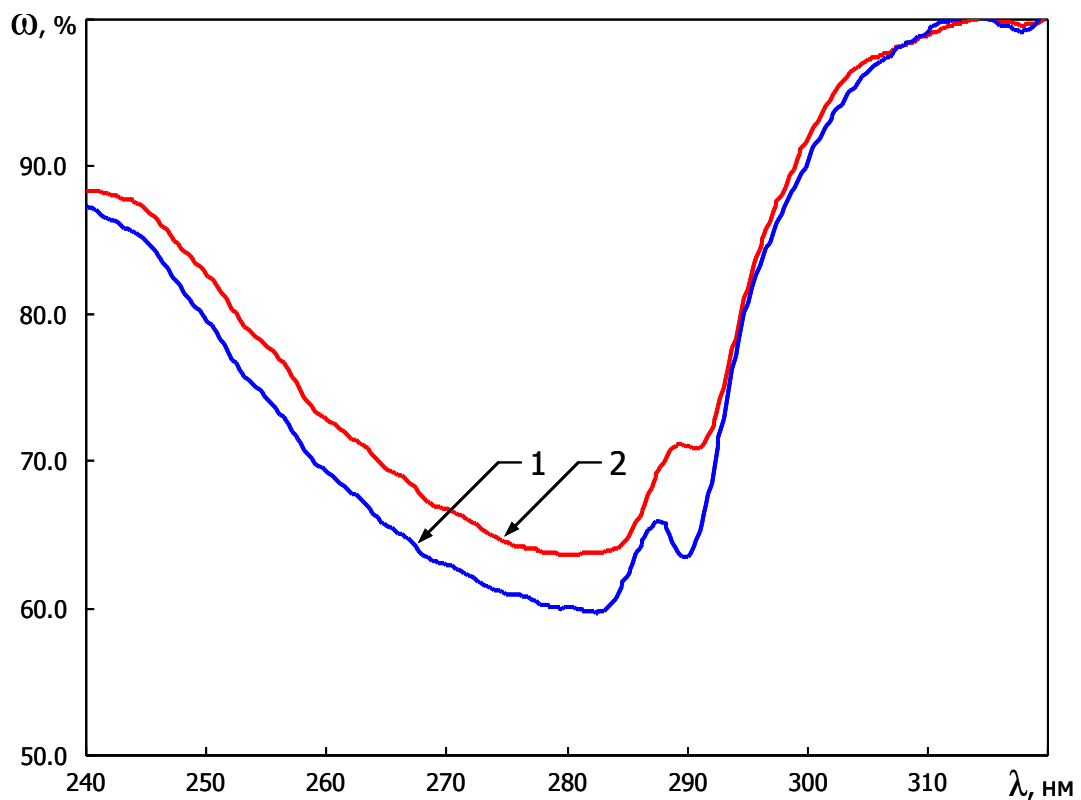


Рис. 47. Составляющая поглощения простетических групп гемоглобина F и A в диапазоне длин волн 240,0–320,0 нм

Обозначения: оксигемоглобин F (1) и A (2);  $\omega, \%$  — относительная доля поглощения небелковой компоненты в спектрах производных гемоглобина

Примечание: протокол эксперимента — вариант «B»

аминокислот в составе макромолекулы, прежде всего тирозина и триптофана. Так, из-за различного шага смещения пиков поглощения аминокислотных остатков при изменении соотношения последних в нативной макромолекуле спектр светопоглощения апобелковой составляющей будет претерпевать определенные модификации. Даже в «чистом» эксперименте (см. 3.2, табл. 4), изменение соотношения количества аминокислот приводит к сдвигу пиков полос поглощения в аддитивной модели апобелка.

Из этого следует, что при оценке положения максимумов в недифференцированных спектрах возможны неопределенности в соотношении их к оси абсцисс, что было рассмотрено нами ранее.

Так как спектр небелковой составляющей «комплементарен» апобелковой части макромолекулы (исходя из модели, лежащей в основе алгоритма разложения спектров поглощения как двухкомпонентной системы), то для гемовой части  $Hb_F O_2$  также наблюдаются некоторые отличия в положении максимума и его интенсивности относительно  $Hb_A O_2$ . Однако такие отличия для размытого пика несущественны как по положению ( $-0,6$  нм против  $Hb_A O_2$ ), так и по интенсивности (максимальная относительная разность для любой комбинации: отношение пиков при соответствующих  $\lambda_{max}$ , отношение при одной длине волны для любого из них, не превышает 1 %).

Таким образом, некоторое несоответствие модельных спектров поглощения гемовой компоненты для оксигемоглобина А и F скорее всего подчеркивает особенности микроокружения аминокислотных остатков и характер волнового сдвига для последних, что, однако, не является препятствием при построении базовых моделей спектров. Причем, такие несоответствия также могут нести в себе дополнительную информацию о структуре и спектральных свойствах молекулы белка (см. следующую главу).

Исходя из этого, становится возможным, опираясь на принцип аддитивности, смоделировать, как минимум в первом приближении, спектры поглощения окси-, карбокси-, дезокси- и метгемоглобина (рис. 48). Нами построены модели спектров поглощения гемоглобина F(\*), где апобелковая

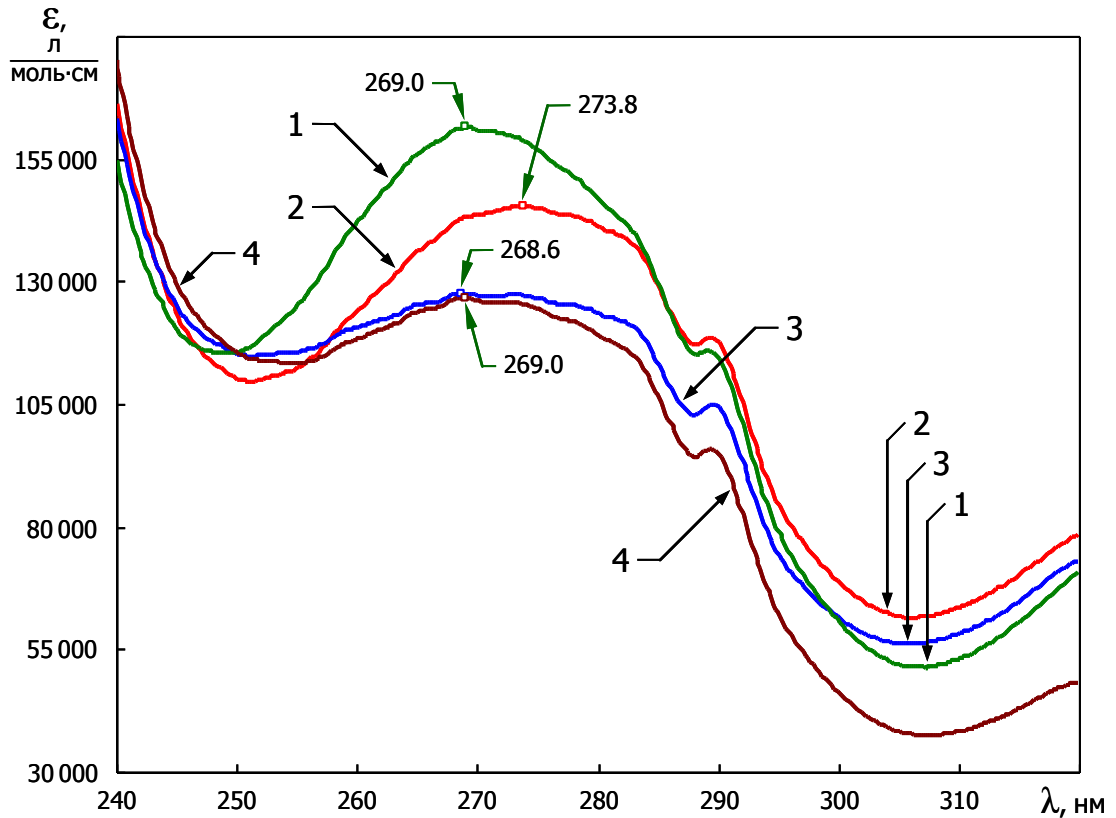


Рис. 48. Модели спектров поглощения гемоглобина F в диапазоне длин волн 240,0–320,0 нм

Обозначения: карбоксигемоглобин\* (1), оксигемоглобин\* (2), дезоксигемоглобин\* (3) и метгемоглобин\* (4);  $\epsilon$  — молярный показатель поглощения

Примечание: апобелковая компонента получена путем разложения спектра оксигемоглобина F, простетические группы — спектров производных гемоглобина A; знаком «\*» обозначены модели спектров; протокол эксперимента — вариант «B»



компонента была получена разложением спектра  $\text{Hb}_F\text{O}_2$ , а гемовая компонента — разложением производных гемоглобина А ( $\text{Hb}_F\text{CO}^*$  —  $\lambda_{\text{max}}=269,0$  нм,  $\text{Hb}_F\text{O}_2^*$  —  $\lambda_{\text{max}}=273,8$  нм,  $\text{Hb}_F^*$  —  $\lambda_{\text{max}}=268,6$  нм,  $\text{MtHb}_F^*$  —  $\lambda_{\text{max}}=269,0$  нм).

Соответственно, модельный спектр  $\text{Hb}_A\text{O}_2(*)$  также был получен аналогичной перегруппировкой апобелковой и гемовой компонент (рис. 49).

Таким образом, практически полное (ограниченное только лишь наличием примесей и случайной ошибкой измерения) совпадение спектров поглощения одинаковых по состоянию небелковой компоненты производных гемоглобина А и F (а фактически, именно простетических групп) в видимом диапазоне длин волн [171] распространяется и на диапазон, где происходит перекрытие светопоглощения гемов с апобелковой частью макромолекулы.

Это позволяет (как минимум, в первом приближении) рассматривать спектр поглощения гембелка в УФ-диапазоне длин волн как сумму спектров поглощения небелковой и апобелковой компонент.

Однако из наблюдаемой «спектральной» аддитивности для системы «небелковая/апобелковая компоненты» однозначно не следует аддитивность по другим оценочным критериям, т.к. такой «спектральный» вид аддитивности представляет собой следствие скоррелированности изменений в спектрах поглощения только лишь одной компоненты — гема в УФ- и видимом диапазонах спектра.

То есть, отсутствие подобной корреляции между видимым участком спектра гембелка и УФ-спектром поглощения простетических групп указывало бы и на соответствующее отсутствие аддитивности между апобелковой и небелковой компонентами (что, однако, не подтверждается нашими экспериментами).

Это означает, что данное качество позволяет оценивать модификации в апобелковой компоненте, в т.ч., и по изменению спектров поглощения гембелка в видимом диапазоне длин волн, а также рассматривать модели спектров светопоглощения соответствующих небелковых компонент как универсальное слагаемое для других форм биополимера, различающихся по апобелку (например,

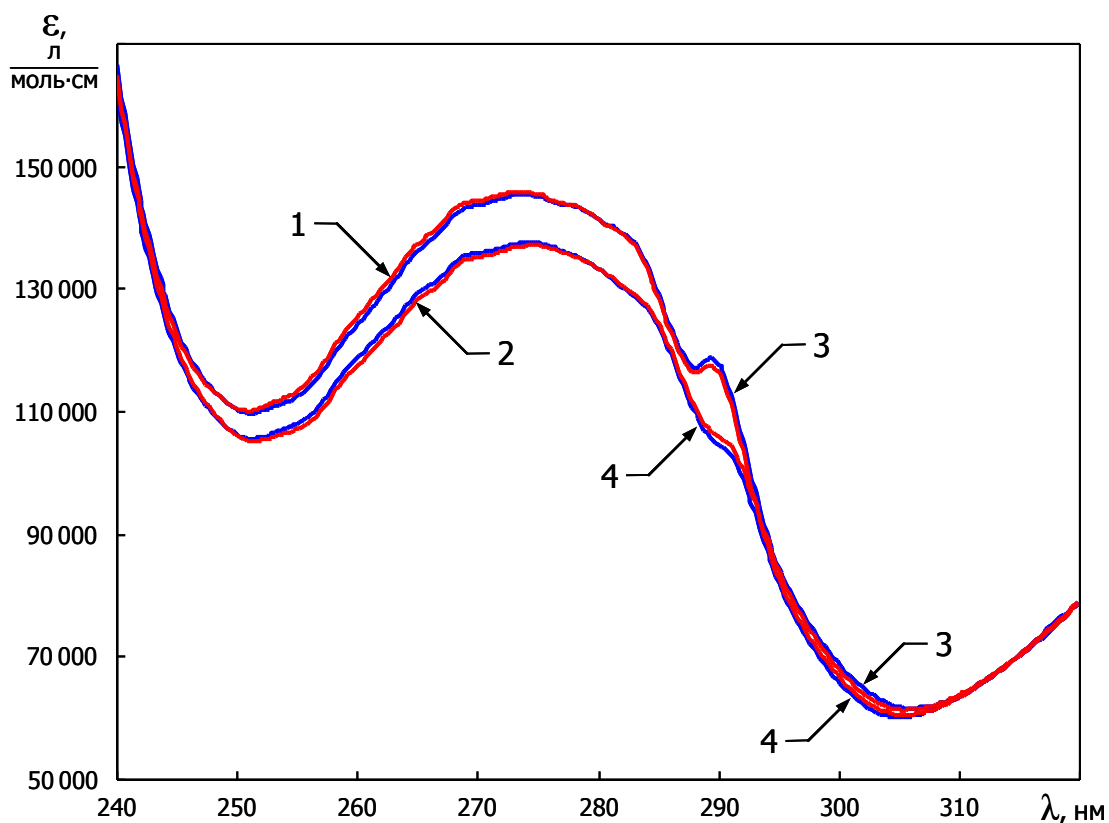


Рис. 49. Спектры поглощения нативного оксигемоглобина F и A, модели этих спектров в диапазоне длин волн 240,0–320,0 нм

Обозначения: спектр поглощения нативного оксигемоглобина F (1), A — (2), модель спектра поглощения оксигемоглобина F\* (3), A\* — (4);  $\epsilon$  — молярный показатель поглощения

Примечание: модели спектров поглощения (обозначены знаком «\*») получены рекомбинацией небелковых составляющих гембелка A и F в его оксиформе; протокол эксперимента — вариант «B»

гемоглобины A<sub>2</sub>, P: Gover 1 и 2, Portland I и II, а также S, C и т.п.).

Строго говоря, рассматриваемая нами аддитивность апобелковой и небелковой составляющей не является в известном смысле таковой из-за того, что спектр поглощения изолированного гема не аддитивен по отношению к спектру изолированного апобелка прежде всего из-за качественных отличий спектров свободной и интегрированной в макромолекулу небелковой компоненты (см. 4.1).

Другими словами, изолированные компоненты (прежде всего гемовые группы) спектрально не соответствуют соответствующим компонентам в составе макромолекулы, и поэтому аддитивность классическим способом не может быть физически подтверждена. Однако она может быть выявлена с помощью предложенного нами способа разложения спектров и рекомбинирования между собой апобелковой и гемовой составляющей по одинаковой лигандной форме гемоглобина А и F.

Следует также сказать, что из отмечаемой нами аддитивности в системе «небелковая/апобелковая компонента» вовсе не следует такая же аддитивность субкомпонент в апобелковой составляющей. Кроме этого, консервативность спектров поглощения апобелка при изменении состояния гемовой компоненты в рамках используемых моделей (точности ее аппроксимации) также поставлена под сомнение (см. 3.1, 4.2).

В заключение следует отметить, что, вероятно, спектральные модификации гемовой компоненты при изменении степени окисления или лигандирования комплексообразователя не взаимосвязаны напрямую с таковыми изменениями для апобелка. Однако они координированы через конформационные перестройки макромолекулы, как следствие приводящей к изменению микроокружения боковых групп аминокислот апобелка. Это представление хорошо соотносится с данными рентгеноструктурного анализа [144] и расчетов, выполненных с помощью различных методов компьютерной симуляции [59].

Особенности спектральных модификаций апобелковой компоненты гембелка при изменении лигандирования или степени окисления комплексообразователя, а также результаты исследований тонкой структуры

спектров небелковой компоненты в исследуемом диапазоне длин волн будут рассмотрены в следующей главе.

## Глава 5. АНАЛИЗ УФ-СПЕКТРОВ ПОГЛОЩЕНИЯ АПОБЕЛКОВОЙ И ГЕМОВОЙ КОМПОНЕНТ НЕКОТОРЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ГЕМОГЛОБИНА В СОСТАВЕ МАКРОМОЛЕКУЛЫ

### 5.1 Сравнительный анализ УФ-спектров поглощения апобелковой составляющей окси-, карбокси-, дезокси- и метгемоглобина

Изменение спектральных свойств гемоглобина при реконфигурации электронной структуры комплексообразователя в ходе его окисления/восстановления или замене гемового лиганда продемонстрировано рядом работ [14, 19]. Однако проекции этих модификаций в спектрах гембелка чаще всего приводят для видимого диапазона длин волн, где не поглощает апобелковая компонента [10].

Наблюдаемые изменения в УФ-спектрах при этом не дифференцируют на составляющие поглощения белковой и небелковой частей биополимера в силу ряда ограничений [4]. Одной из причин является невозможность физического разделения апобелковой и гемовой компонент без нарушения их структурного состояния и влекущее, критическое для адекватного анализа, изменение спектральных свойств этих составляющих относительно таковых для нативной макромолекулы.

В предыдущей главе нами была показана специфика и роль гемовой компоненты в поглощении гембелком УФ-света. Как было показано, общая доля в светопоглощении небелковой составляющей для УФ-диапазона и степень ее изменения достаточно велики относительно апобелковой части макромолекулы.

При этом полученные модели УФ-спектров поглощения простетических групп отлично коррелируют с их гомологичными участками спектра в видимом диапазоне, что подтверждает адекватность используемых подходов и получаемых моделей (рис. 44).

Вместе с тем, изменения в гемовой части макромолекулы, обусловленные

присоединением лигандов или окислением атома железа, приводят к выраженным в той или иной степени структурным перестройкам апогемоглобина [55]. По причинам, указанным выше, сопоставление интегральных спектров поглощения гемоглобина различных лигандных форм, даже с применением нормирования для этих спектров, не позволяет корректно оценить такого рода эффекты.

Решению данной задачи удовлетворяют два взаимодополняющих приема: дифференцирование спектра поглощения позволяет найти изменения в его тонкой структуре, а анализ модельного спектра апобелка ( $A$ ), полученного путем разложения интегрального спектра ( $C$ ), дает возможность оценить общую картину поглощения и характерные изменения компоненты  $A$ .

Особенность поглощения гемовой составляющей позволяет анализировать спектр апобелка с помощью второй производной, не разделяя интегральный спектр нативной макромолекулы на составные части (см. 3.1).

На рис. 50 показаны полученные на предыдущем этапе (см. 4.2) модели спектров поглощения апогемоглобина  $A$  для окси- (кривая 1), карбокси- (кривая 2), дезокси- (кривая 3) и метформы белка (кривая 4).

Из представленных данных следует, что модель спектра поглощения апобелковой составляющей для дезоксигемоглобина отличается от аналогичных моделей для окси-, карбокси- и метгемоглобина. Это различие нами было показано как при сопоставлении дифференцированных ( $d^2A$ ) спектров поглощения производных гемоглобина, так и путем сравнения величин  $r$  для вторых производных спектров поглощения моделей апобелка и спектров поглощения нативных макромолекул (или сравнением этих коэффициентов для вторых производных исходных спектров светопоглощения).

По всей видимости, наблюдаемые отличия в спектрах поглощения моделей апобелка связаны с присутствием гемовых лигандов ( $O_2$ ,  $CO$ ,  $H_2O$  или  $OH^-$ ) в шестом координационном положении атома железа для  $HbO_2$ ,  $HbCO$  и  $MtHb$  относительно  $Hb$ . Эта закономерность будет рассмотрена ниже.

Фиксируемые изменения в спектрах производных гемоглобина отмечаются, прежде всего, в диапазоне 272,5–320,0 нм (рис. 50, 51), т.е. там, где

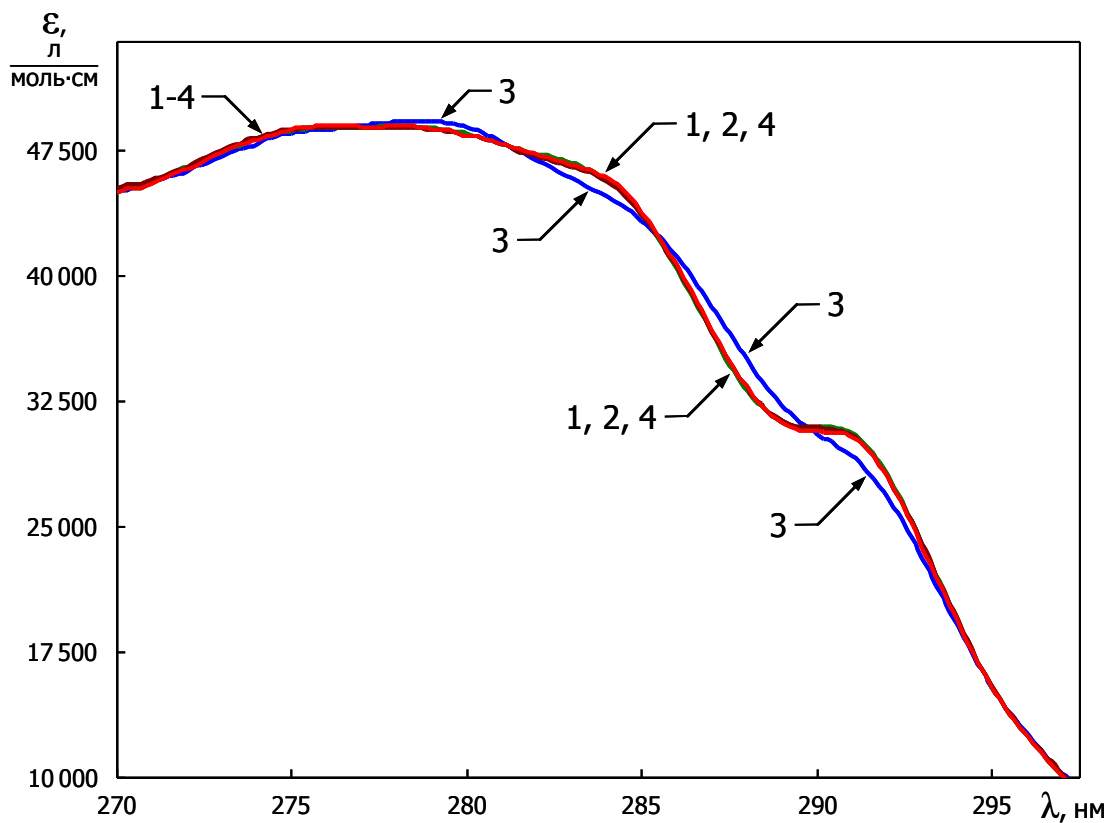


Рис. 50. Модели спектров поглощения апогемоглобина А в диапазоне длин волн 270,0–297,5 нм

Обозначения: оксигемоглобин (1), карбоксигемоглобин (2), дезоксигемоглобин (3) и метгемоглобин (4);  $\epsilon$  — молярный показатель поглощения

Примечание: протокол эксперимента — вариант «В»

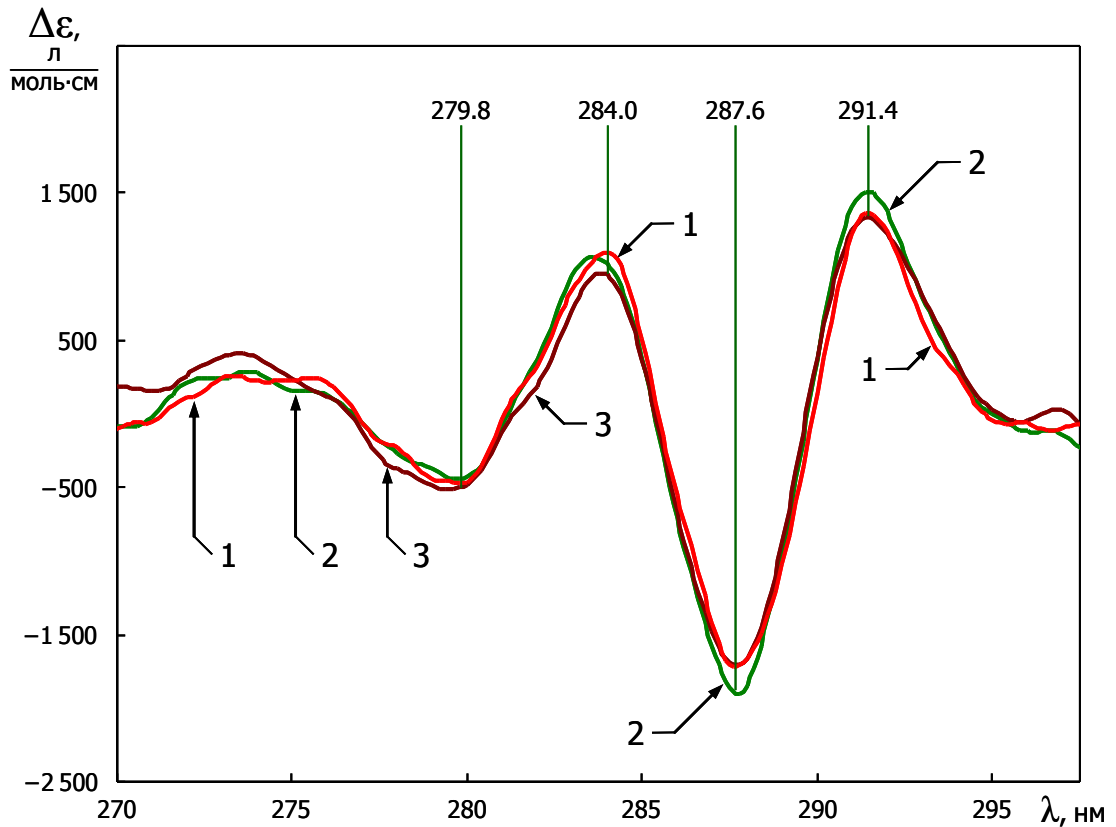


Рис. 51. Разностные спектры поглощения моделей спектров апобелка для окси-, карбокси- и метгемоглобина А относительно их дезоксиформы в диапазоне длин волн 270,0–297,5 нм

Обозначения: оксигемоглобин (1), карбоксигемоглобин (2) и метгемоглобин (3); вертикальные линии проведены по экстремумам для оксигемоглобина (максимальная разность поглощения в моделях апобелка для окси- и дезоксигемоглобина);  $\Delta\epsilon$  — разность в молярных показателях поглощения относительно дезоксигемоглобина

Примечание: протокол эксперимента — вариант «В»



практически полностью поглощают аминокислотные остатки тирозина и триптофана (полосы №№15–20, табл. 2).

Показано (рис. 50, 51), что при длинах волн от 295 нм и более не обнаруживаются существенные различия в спектрах поглощения окси-, карбокси- и метгемоглобина относительно дезоксиформы этого белка. Так как в данном диапазоне (295–320 нм) поглощение света практически полностью определяется боковыми группами триптофана и для них не наблюдается волновой сдвиг при переходе из дезоксиформы белка в другие дериваты, то из этого следует, что хромофоры радикалов этой аминокислоты значимо не меняют спектры поглощения производных апогемоглобина в ходе конформационных перестроек макромолекулы.

Отсутствие существенных изменений в спектре поглощения хромофоров триптофана при связывании лигандов  $O_2$  и  $CO$ , а также при изменении степени окисления гемового железа хорошо иллюстрируют вторые производные спектров поглощения дериватов гемоглобина (переход №20, рис. 52).

Поэтому, на наш взгляд, не стоит ожидать бóльших и главным образом нескоррелированных (прямо или опосредованно) изменений в спектрах поглощения хромофоров этой аминокислоты в более широком диапазоне длин волн, т.е. 240–320 нм. Сказанное относится и к другим хромофорам, их системам, которые выступают как единый ансамбль. Естественно, при этом не следует принимать во внимание изобестические точки в спектре поглощения (если они возникают) при переходе хромофора из одного электронного состояния в другое, т.к. такие точки отражают эквивалентность этих состояний по интенсивности поглощения для закрытой мультикомпонентной системы. Вместе с тем, изобестические точки очень важны с точки зрения спектрального анализа этих систем, в частности, определения концентрации компонент, входящих в нее [9].

Кроме этого, из полученных данных не следует, что «красный» волновой сдвиг для триптофана в макромолекуле гембелка относительно свободной аминокислоты также будет меньше, чем для тирозина. Другими словами, формирование пептидной связи с участием молекул триптофана или изменение

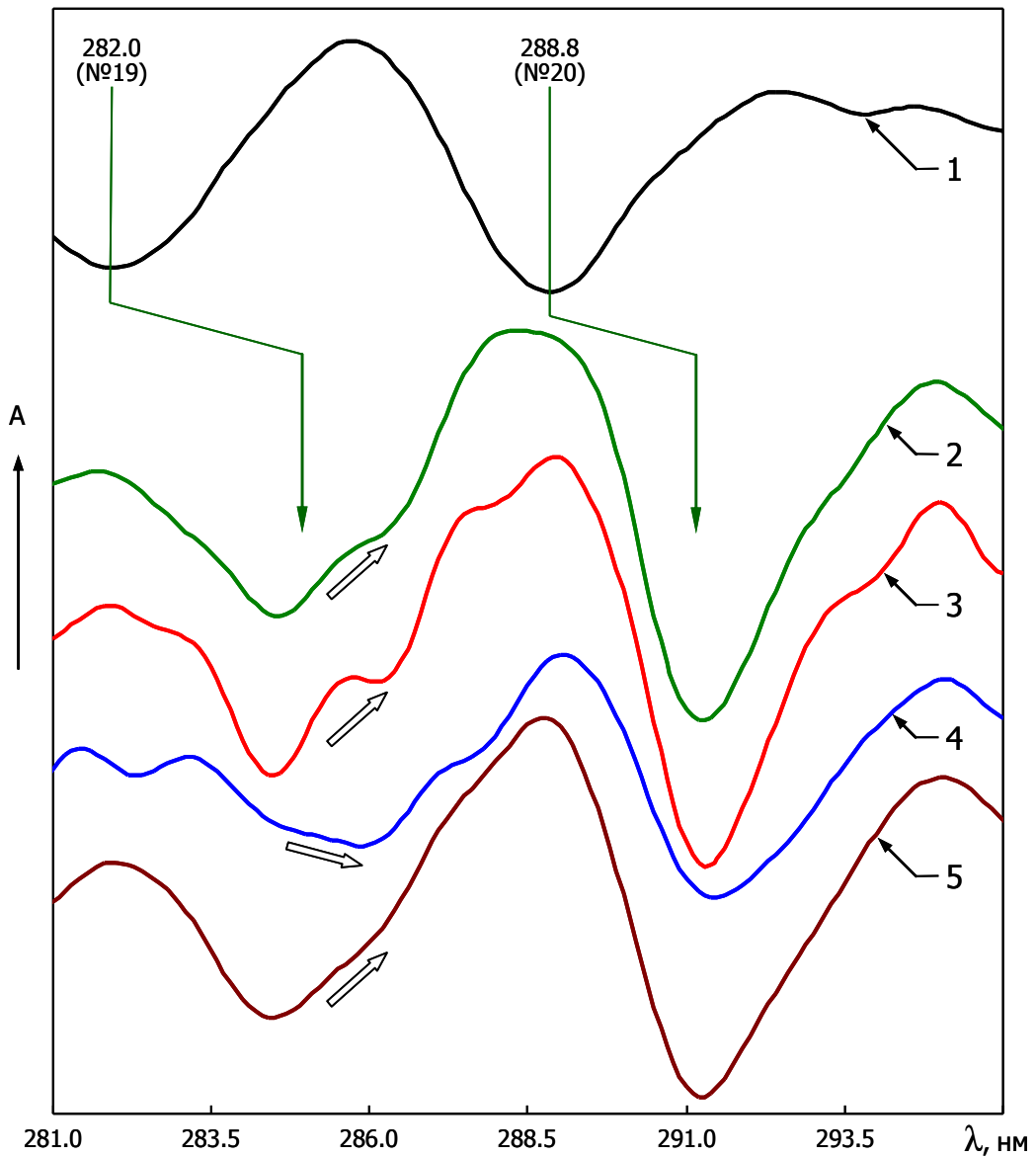


Рис. 52. Вторые производные аддитивной модели спектра поглощения апогемоглобина, спектров поглощения нативных гемпроизводных белка

Обозначения: модель апогемоглобина (1), карбоксигемоглобин (2), оксигемоглобин (3), дезоксигемоглобин (4) и метгемоглобин (5); по оси ординат — поглощение ( $A$ ); контурные стрелки показывают направление изменений в полосе №19

Примечание: спектры поглощения смещены друг относительно друга по оси ординат на константу; протокол эксперимента — вариант «В»

показателя преломления среды микроокружения его радикала, возможно, приводит к бóльшему волновому сдвигу в поглощении хромофоров боковой группы аминокислоты данного типа, чем для тирозина. Но в дальнейшем, влияние такого микроокружения для хромофоров радикалов аминокислот, как в случае тирозина, видимо, имеет бóльшее значение с точки зрения поглощения УФ-света. Возможно, следует рассматривать волновой сдвиг для свободных аминокислот формально как сумму составляющих: сдвиг, обусловленный образованием пептидной связи и сдвиг, связанный с изменением микроокружения хромофоров боковых групп, в т.ч., показателя преломления среды.

Таким образом, последовательным исключением компонент (различных по типу боковых групп аминокислот), становится возможным определить, какой тип аминокислотного остатка в этом случае вносит существенный вклад в изменение спектров поглощения апобелка при связывании гемового лиганда или изменении степени окисления комплексообразователя. Этой аминокислотой является тирозин.

Мы проанализировали изменение спектральных свойств тирозина в ходе конформационных перестроек макромолекулы белка альтернативным (к методу последовательного исключения) способом.

Как уже отмечалось (см. 3.3), полоса №19 в спектрах белков и их моделей представляет собой суперпозицию пиков поглощения тирозина (282,4 нм) и триптофана (281,6 нм). Тогда, в случае смещения спектра поглощения тирозина в сторону бóльших длин волн при отрыве гемового лиганда, будет происходить соответствующее смещение пика №19, что и представлено на рис. 52.

Следовательно, достаточно проанализировать параметры полос поглощения №19 и №20, чтобы оценить не только соотношение аминокислотных остатков тирозина и триптофана в макромолекуле (см. 3.2, рис. 22 и 23, а также см. 3.3), но и выявить волновой сдвиг в спектре поглощения тирозина в составе апобелка при изменении микроокружения боковых групп этой аминокислоты.

Представляет интерес, насколько заметно будет изменяться спектр поглощения тирозина в полосах №№15–18 (для нативного гембелка — область

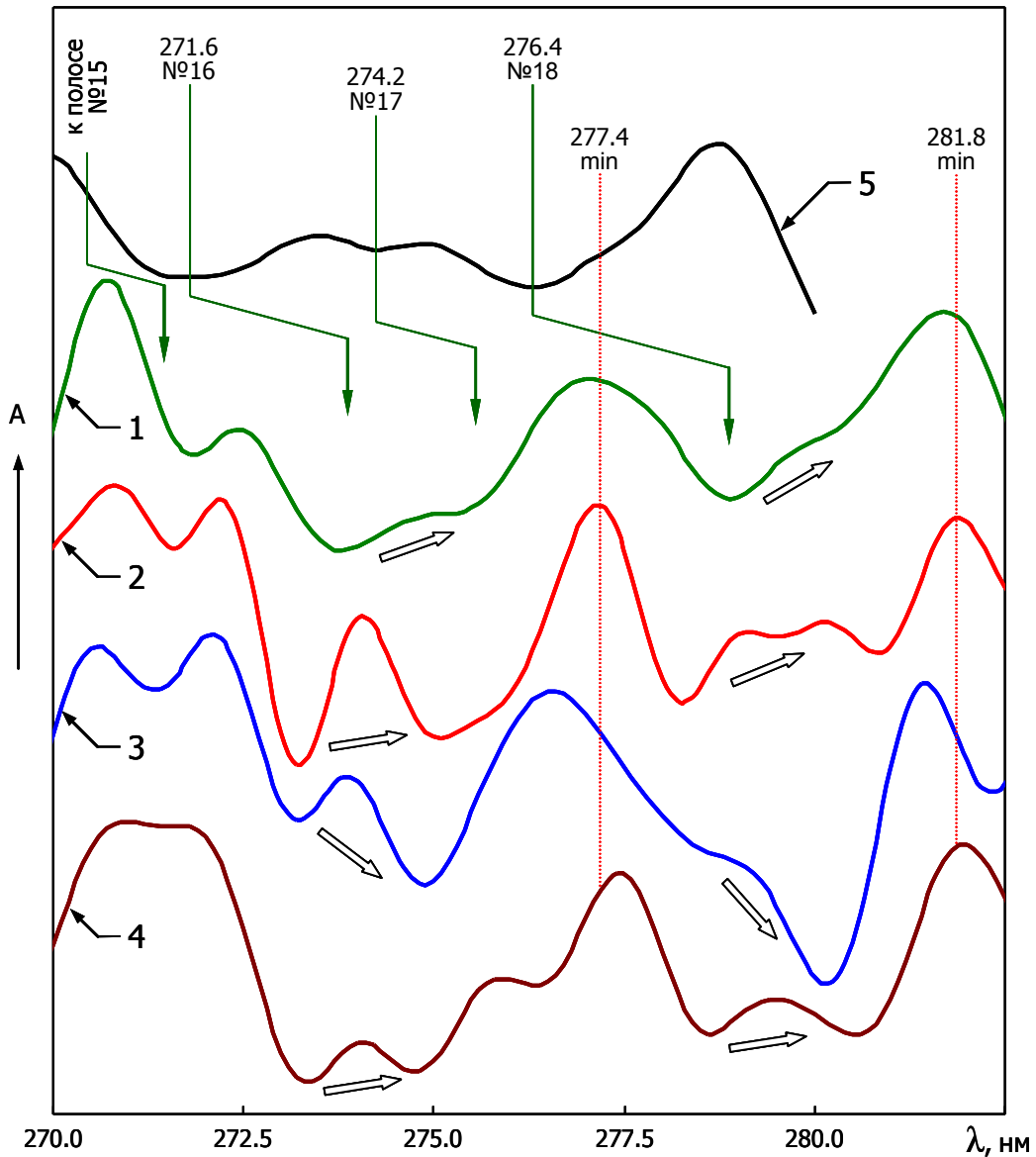


Рис. 53. Вторые производные спектров поглощения карбокси-, окси-, дезокси- и метгемоглобина, аддитивной модели апогемоглобина

Обозначения: карбоксигемоглобин (1), оксигемоглобин (2), дезоксигемоглобин (3), метгемоглобин (4), модель апогемоглобина (5); вертикальные пунктирные линии проведены по минимумам в спектрах поглощения для оксигемоглобина (оцениваемых по второй производной); по оси ординат — поглощение (A); контурные стрелки показывают направление изменений в полосах поглощения №№15–18

Примечание: спектры поглощения смещены друг относительно друга по оси ординат на константу; протокол эксперимента — вариант «B»

272,5–282,5 нм), т.к. на этом участке спектра он сильно перекрывается и интерферирует со спектром поглощения триптофана (рис. 53) [23].

Однако даже на этом фрагменте спектра удается достаточно отчетливо наблюдать изменения, обусловленные «красным» волновым сдвигом в поглощении тирозина при переходе гембелка в дезоксиформу. Ранее, на примере молекулы гемоглобина [41] и альбумина (см. 3.3), нами детально проанализирован вклад полос поглощения тирозина и триптофана (регистрируемых по второй производной) в формирование аддитивного спектра светопоглощения этих белков.

Хорошее соответствие спектров поглощения аддитивной модели гемоглобина к нативному белку (см. 3.2), позволяет, по нашему мнению, успешно переносить результаты анализа вклада отдельных аминокислот в модельный (аддитивный) спектр поглощения не только для гембелка и его производных, но и использовать результаты такого анализа, полученные для других белков, в частности, альбумина.

Другими словами, исследование роли боковых групп аминокислот в формировании аддитивной модели спектра поглощения одного простого белка (альбумина) позволяет в конечном итоге экстраполировать результаты к спектрам поглощения нативной молекулы другого сложного белка (гемоглобина), что обобщает этот подход.

Итак, изменение микроокружения аминокислотных остатков тирозина в макромолекуле приводит к регистрируемым вариациям в спектрах поглощения лигандных форм гемоглобина, что хорошо согласуется с данными, представленными на рис. 19, где показана лабильность полос поглощения, пики которых формируются с участием этой аминокислоты.

Из рис. 19 и 24 также следует, что положение пиков поглощения аминокислотных остатков фенилаланина для различных белков меняется незначительно (в пределах случайной ошибки).

Мы сравнили положение пиков поглощения боковых групп фенилаланина для различных производных гемоглобина (рис. 54). Из представленных данных

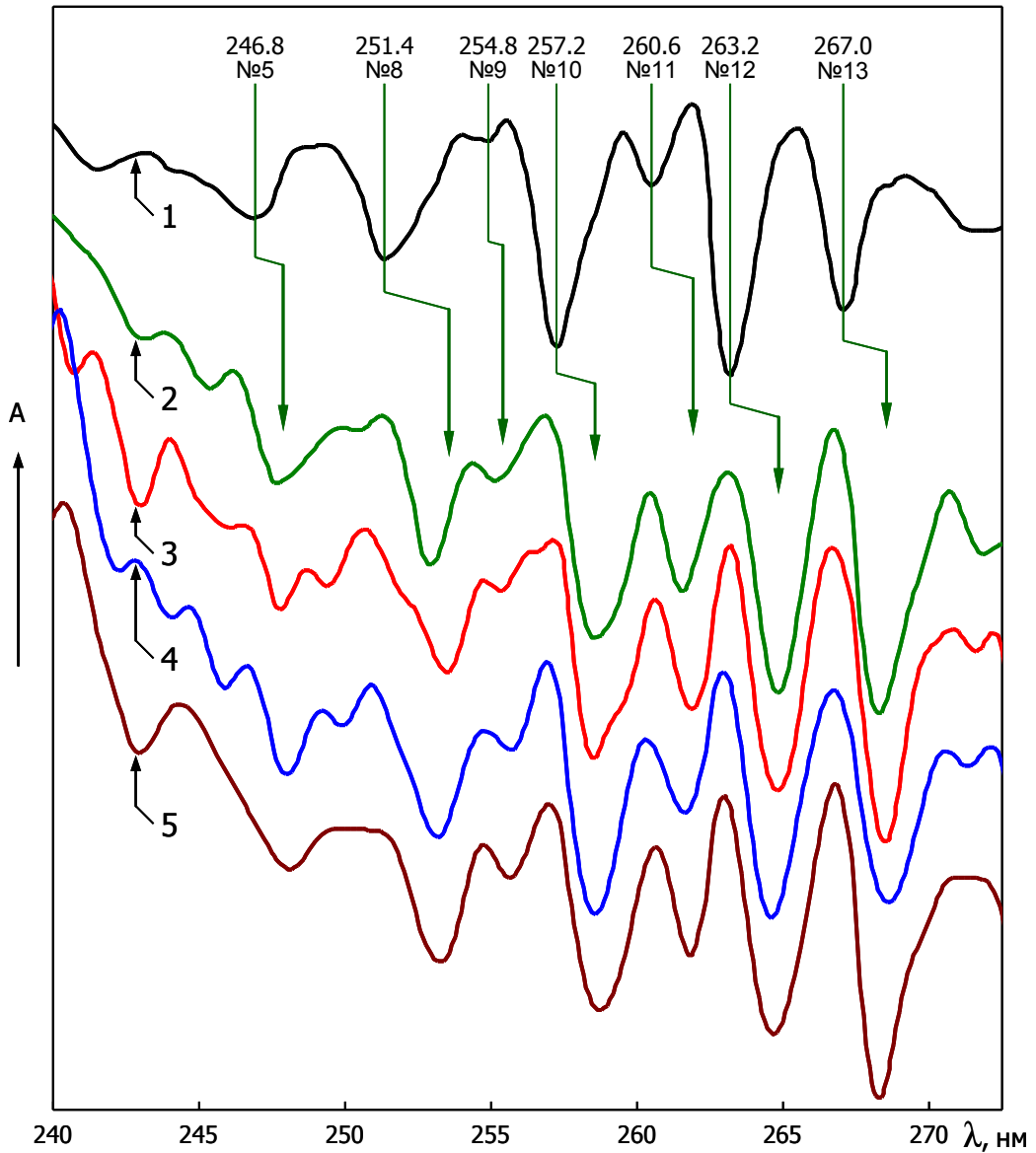


Рис. 54. Вторые производные аддитивной модели спектра поглощения апогемоглобина, спектров поглощения нативных гемпроизводных белка

Обозначения: модель апогемоглобина (1), карбоксигемоглобин (2), оксигемоглобин (3), дезоксигемоглобин (4) и метгемоглобин (5); по оси ординат — поглощение (A)

Примечание: спектры поглощения смещены друг относительно друга по оси ординат на константу; стрелками отмечены только некоторые полосы поглощения; протокол эксперимента — вариант «B»

следует, что положение полос поглощения фенилаланина практически не меняется, а небольшое варьирование их местоположения обусловлено, вероятно, случайными ошибками.

Закономерностей в изменении интенсивности и положении полос поглощения для дезоксигемоглобина по отношению к остальным производным гембелка нами также не зафиксировано. Следовательно, боковые группы фенилаланина, аналогично группам триптофана, не вносят сколько-нибудь значимого вклада в трансформацию спектра поглощения гемоглобина при переходе из дезокси- в другие лигандные формы этого белка.

При этом, как отмечалось ранее (см. 3.3), на положение пиков поглощения аминокислотных остатков фенилаланина радикалы других аминокислот практически не влияют.

Изменение спектров поглощения боковых групп серосодержащих аминокислот и гистидина в составе гембелка с помощью дифференциальной спектрофотометрии второго порядка, а также путем разложения интегрального спектра макромолекулы обнаружить не удалось. Это обусловлено их низкой парциальной долей светопоглощения и отсутствием при этом выраженных пиков в спектрах поглощения для данных аминокислот.

Таким образом, регистрация изменений в спектрах поглощения гемоглобина, связанных с соответствующим изменением спектров светопоглощения аминокислотных остатков требует выполнения следующих условий: 1) высокая доля поглощения того или иного типа хромофора аминокислоты или наличие выраженного пика светопоглощения (этому условию в заданном диапазоне длин волн удовлетворяют только фенилаланин, тирозин и триптофан); 2) «чувствительность» боковой группы аминокислоты к изменению микроокружения ее хромофора (в основном тирозин) и 3) фактическое изменение микроокружения при перестройке макромолекулы из одного конформационного состояния в другое (главным образом тирозин).

Так как близость места протонирования гидроксильной группы тирозина к  $\pi$ -электронной системе бензойного кольца приводит в полярном растворителе к

значительному волновому сдвигу относительно фенилаланина, а снижение локальной симметрии бокового радикала (до  $C_{2v}$ ) за счет наличия –ОН группы увеличивает интенсивность поглощения этой аминокислоты, то данное обстоятельство делает тирозин удобным «индикатором» конформационных превращений макромолекулы белка (во всяком случае, для гемоглобина) [23].

Вместе с тем, для триптофана варьирование концентрации протонов в среде мало влияет на поглощение его боковых групп [23]. Причем значения  $pK_a$  для этой аминокислоты выходят за пределы диапазона pH, где сохраняется функциональная активность белка [28].

Однако следует отметить, что высокий квантовый выход флуоресценции для триптофана (достигающий значения  $\approx 0,2$ ) позволяет использовать данную аминокислоту при исследовании структурно-функциональных свойств белков люминесцентными методами в тех случаях, когда не происходит тушения возбужденных состояний исследуемым биополимером (например, за счет протетических групп [34]).

Из схемы оксигенации М. Перутца [138], следует, что аминокислотные остатки  $Y^{140}\alpha$  и  $Y^{145}\beta$ , а также  $Y^{42}\alpha$  играют важную роль в ходе связывания кислорода гемоглобином. Исходно в дезоксигемоглобине остатки  $Y^{140}\alpha$  и  $Y^{145}\beta$  жестко закреплены в полостях F и H ван-дер-ваальсовыми и водородными связями, однако, в процессе оксигенации эти боковые группы становятся лабильными, причем остатки  $Y^{42}\alpha$  формируют водородную связь с  $D^{99}\beta$  [18].

Следовательно, представляется возможным связать изменение структурно-функционального состояния молекулы апогемоглобина в процессе оксигенации [138] со спектральными свойствами изолированных аминокислот, созданными на их основе моделями апобелка и, в дальнейшем, соотнести полученные результаты к структурному состоянию апопротеиновой компоненты карбокси- и метгемоглобина.

Так как гемовое железо жестко связано с проксимальным лигандом  $H^8$ , а порфириновое кольцо, контактируя с глобиновой частью, выступает в качестве «опоры» для этого «рычага», приводящего макромолекулу, ее субъединицы в



новое конформационное состояние [38], то становится возможным связать изменения в спектрах поглощения моделей апобелка различных дериватов гемоглобина с положением комплексообразователя относительно плоскости протопорфирина IX.

Из полученных модельных спектров поглощения апобелковой составляющей и их анализа следует ожидать, что только для дезоксиформы белка положение атома железа в геме должно сильно отличаться от других производных. При этом сходство между собой моделей спектров светопоглощения остальных форм белка также должно быть проекцией местоположения железа в плоскости порфиринового кольца.

Так как данные литературы по значению положения гемового железа относительно плоскости порфиринового кольца для одной и той же формы белка сильно разнятся [38, 60], то мы провели собственные вычисления, базируясь на данных рентгеноструктурного анализа.

Определение положения атома железа к порфириновому кольцу выполнено с помощью приведенной формулы:

$$h_a = 2\sqrt{p(p-a)(p-b)(p-c)}/a, \quad (31)$$

$$p = (a+b+c)/2, \quad (32)$$

где  $h_a$  — высота разностороннего треугольника с атомом железа в вершине к основанию  $a$ , как отрезку между диагональными атомами азота (N–N),  $b$  и  $c$  — отрезок между атомами азота и железа (Fe–N) (рис. 55).

Результаты измерения межатомных расстояний между атомами азота и железа для окси- (PDB 2DN1), карбокси- (PDB 3HYN), дезокси- (PDB 2DN2) и метгемоглобина (PDB 3ODQ) [144] представлены в табл. 11.

Средние значения расстояний между атомом железа и плоскостью порфиринового кольца для каждой из форм гемоглобина при этом составили: 0,0 пм (0,000 Å; HbO<sub>2</sub>), 4,9 пм (0,049 Å; HbCO), 34,4 пм (0,344 Å; Hb) и 3,6 пм (0,036 Å; MtHb).

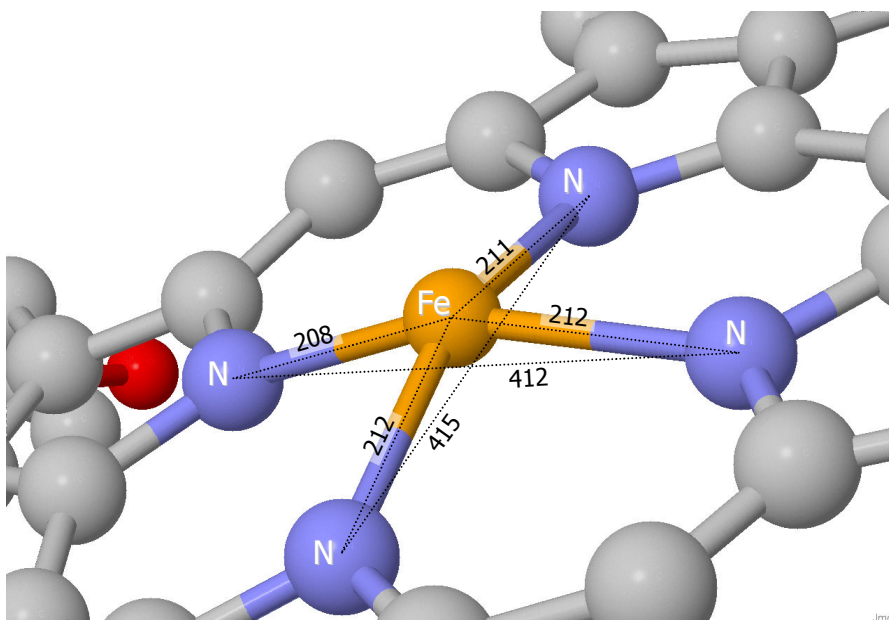


Рис. 55. Положение атома железа в плоскости порфиринового кольца молекулы дезоксигемоглобина

*Обозначения: в вершине 4-х сторонней пирамиды атом железа (Fe) с 4-мя координационными связями с атомами азота (N) в ее основании; расстояния между атомами железа и азота показаны пунктирными линиями с метками расстояний; дистанция выражена в пикометрах*

*Примечание: расстояние между атомом железа и плоскостью порфиринового кольца рассчитано как среднее арифметическое высот к основанию 2-х треугольников, перпендикулярных своими плоскостями (X) и (Y) друг к другу для всех субъединиц белка*

Ввиду того, что дезоксигемоглобин (исходя из представлений модели Моно-Уаймена-Шанжэ [127]), находится, в основном, в T-состоянии, а оксиформа — в R-конфигурации, можно предположить, что карбокси- и метгемоглобин также могут находиться в R-состоянии как по причине подобия моделей их спектров поглощения с таковым спектром для HbO<sub>2</sub>, так и по сходному положению железа в плоскости порфиринового кольца.

Таблица 11. Расстояние между атомом железа и плоскостью порфиринового кольца в молекулах окси-, карбокси-, дезокси- и метгемоглобина

Образец	Отрезок	Расстояние между атомами в субъединицах (пм)							
		$\alpha_1$		$\beta_1$		$\alpha_2$		$\beta_2$	
		Плоскость		Плоскость		Плоскость		Плоскость	
		X	Y	X	Y	X	Y	X	Y
HbO <sub>2</sub>	<i>a</i> (N–N)	403,0	402,0	410,0	398,0	—	—	—	—
	<i>b</i> (Fe–N)	202,0	202,0	211,0	200,0	—	—	—	—
	<i>c</i> (Fe–N)	201,0	200,0	199,0	198,0	—	—	—	—
	<i>a<sub>h</sub></i> (Fe⊥NN)	0,0	0,0	0,0	0,0	—	—	—	—
HbCO	<i>a</i> (N–N)	387,0	383,0	397,0	381,0	386,0	384,0	383,0	380,0
	<i>b</i> (Fe–N)	195,0	194,0	200,0	193,0	193,0	193,0	194,0	190,0
	<i>c</i> (Fe–N)	194,0	190,0	197,0	190,0	193,0	191,0	189,0	190,0
	<i>a<sub>h</sub></i> (Fe⊥NN)	19,7	13,8	0,0	19,5	0,0	0,0	0,0	0,0
Hb	<i>a</i> (N–N)	415,0	412,0	415,0	412,0	413,0	406,0	407,0	407,0
	<i>b</i> (Fe–N)	212,0	212,0	212,0	210,0	210,0	210,0	208,0	207,0
	<i>c</i> (Fe–N)	211,0	208,0	208,0	209,0	208,0	202,0	204,0	206,0
	<i>a<sub>h</sub></i> (Fe⊥NN)	40,9	40,8	32,3	38,1	32,2	35,0	32,0	35,1
MtHb	<i>a</i> (N–N)	412,0	405,0	405,0	399,0	412,0	405,0	405,0	399,0
	<i>b</i> (Fe–N)	209,0	203,0	203,0	203,0	209,0	203,0	203,0	203,0
	<i>c</i> (Fe–N)	203,0	202,0	202,0	196,0	203,0	202,0	203,0	196,0
	<i>a<sub>h</sub></i> (Fe⊥NN)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	14,2	0,0

*Примечание: молекула оксигемоглобина представлена димером; расстояния выражены в пикометрах (пм)*

Таким образом, полученные результаты вычислений положения атома

железа находятся в очень хорошем соответствии с результатами моделирования спектров поглощения производных гемоглобина (их апобелковой компоненты).

Причем реконфигурация структурного состояния макромолекулы гемоглобина при связывании лигандов  $O_2$  и  $CO$  (а также изменении степени окисления комплексообразователя), также приводит к соответствующему наблюдаемому изменению спектральных свойств апобелка, хотя и менее значимому, чем для гемовой составляющей.

Предложенную нами модель спектра поглощения дезоксигемоглобина F (рис. 48), полученную на основе апобелковой компоненты оксигемоглобина F и небелковой части гемоглобина A, следует считать менее точной, чем аналогичные модели окси-, карбокси- и метгемоглобина F. Однако такая аппроксимация, созданная в первом приближении, достаточно хорошо характеризует общее светопоглощение моделируемой дезоксиформы белка.

## 5.2 Исследование УФ-спектров поглощения простетических групп окси-, карбокси-, дезокси- и метгемоглобина

Как уже отмечалось (см. 3.1), исследование полос поглощения, принадлежащих хромофорам боковых групп аминокислот с помощью второй производной в интегральных спектрах светопоглощения гемоглобина большой трудности не представляет. Решение такой задачи облегчается тем, что гемовая компонента не содержит пиков поглощения, которые имеют малую спектральную полуширину (как например, у фенилаланина, тирозина или триптофана), и которые могли бы непосредственно и значимо искажать спектр поглощения апобелка. Естественно, такая «оптическая прозрачность» простетических групп гемоглобина как раз и затрудняет исследование последних.

Разложением интегрального спектра светопоглощения гембелка было подтверждено наличие некоторых размытых пиков поглощения небелковой компоненты для окси- и карбоксиформ биомacroмолекулы (см. 4.2, рис. 39 и 40).

Однако тонкая структура спектров поглощения гемовой составляющей остается невыясненной. Поиск плохо разрешенных полос поглощения для небелковой части макромолекулы, кроме вышеназванной проблемы, осложняется неизбежным присутствием стохастического шума в спектрах, который сильно осложняет обнаружение пиков с широкой полосой светопоглощения.

Возможным способом анализа тонкой структуры спектра поглощения небелковой компоненты макромолекулы могло быть следующее: модельный спектр протетических групп, т.е.  $B_1$  (рис. 56, кривая 1) дифференцируется по второй производной (кривая 2), далее выполняется сглаживание этой производной спектра с помощью полинома/сплайна (кривая 3).

Однако из-за наличия в модельном спектре (кривая 1) артефактов, обусловленных «следовым» присутствием полос поглощения хромофоров боковых групп аминокислот (см. 4.1), на второй производной спектра светопоглощения такие «следы», соответственно, наблюдаются наиболее отчетливо (кривая 2). Сглаживание дифференцированного спектра с целью подавления этих узкополосных пиков желаемого результата не дает (кривая 3).

Вместе с тем, предложенный нами способ разложения интегрального спектра поглощения гембелка содержит этап (№10, см. 4.1), на котором выполняется аппроксимация спектра  $B_1$  полиномом. Фактически осуществляется фильтрация высоких частот этого спектра. Такие частоты представляют собой как стохастический шум в виде узкополосных пиков, так и сами пики-артефакты от поглощения хромофоров боковых групп аминокислот с малой спектральной полушириной. Происхождение последних связано, как уже отмечалось, с неоднородностью волнового сдвига различных по своему типу аминокислотных остатков. Дифференцированная по второй производной аппроксимация  $B_1$  (она же — модель спектра поглощения гемовой компоненты —  $B$ ) позволяет разрешить тонкую структуру спектра (рис. 57).

Вторая производная спектра поглощения небелковой составляющей также может быть представлена как разность между соответствующими производными интегрального спектра поглощения и спектра апобелка гемоглобина (исходя из

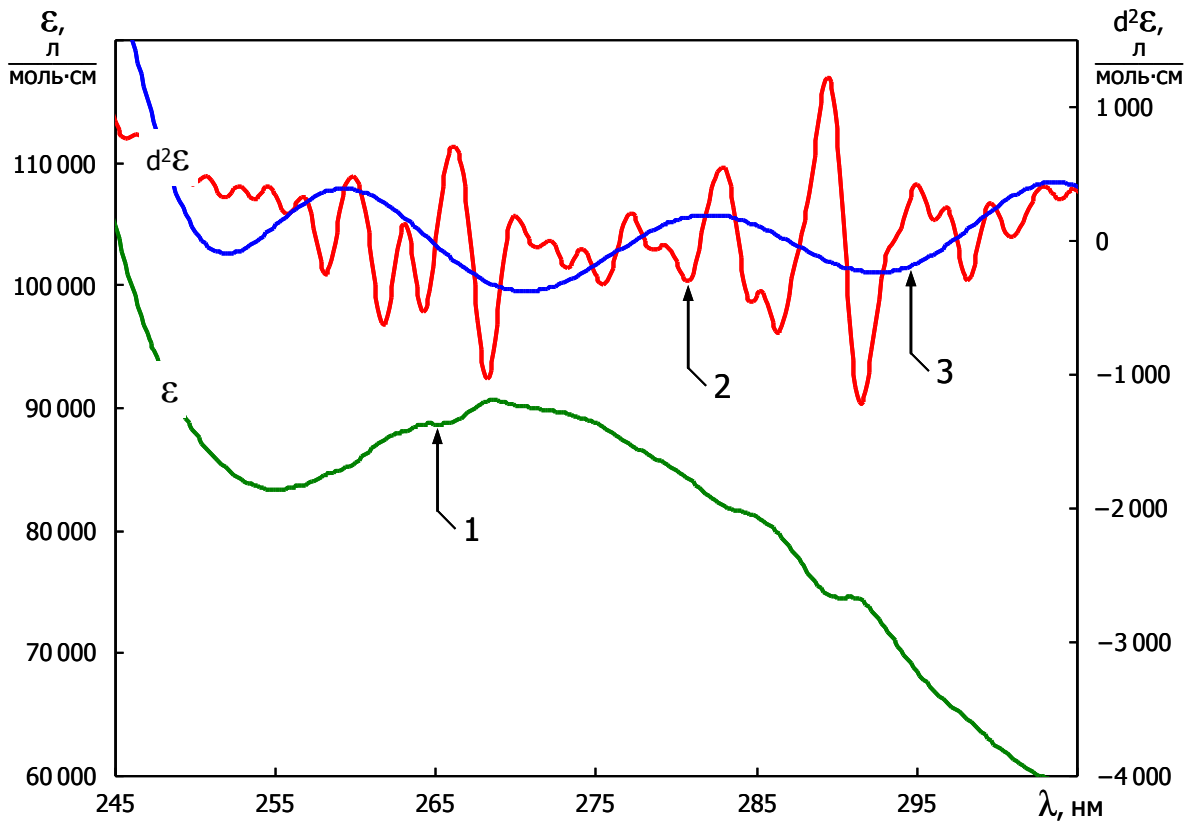


Рис. 56. Модель спектра поглощения небелковой компоненты карбоксигемоглобина

Обозначения: модель спектра поглощения небелковой компоненты как разность ( $B_1$ ) между интегральным спектром макромолекулы ( $C$ ) и смещенным по оси абсцисс модельным спектром ее апобелка ( $A_1$ ) (1), вторая производная модельного спектра поглощения  $B_1$  (2) и аппроксимация полиномом Чебышева спектра поглощения по второй производной (3);  $\varepsilon$  — молярный показатель поглощения;  $d^2\varepsilon$  — вторая производная молярного показателя поглощения

Примечание: протокол эксперимента — вариант «В»

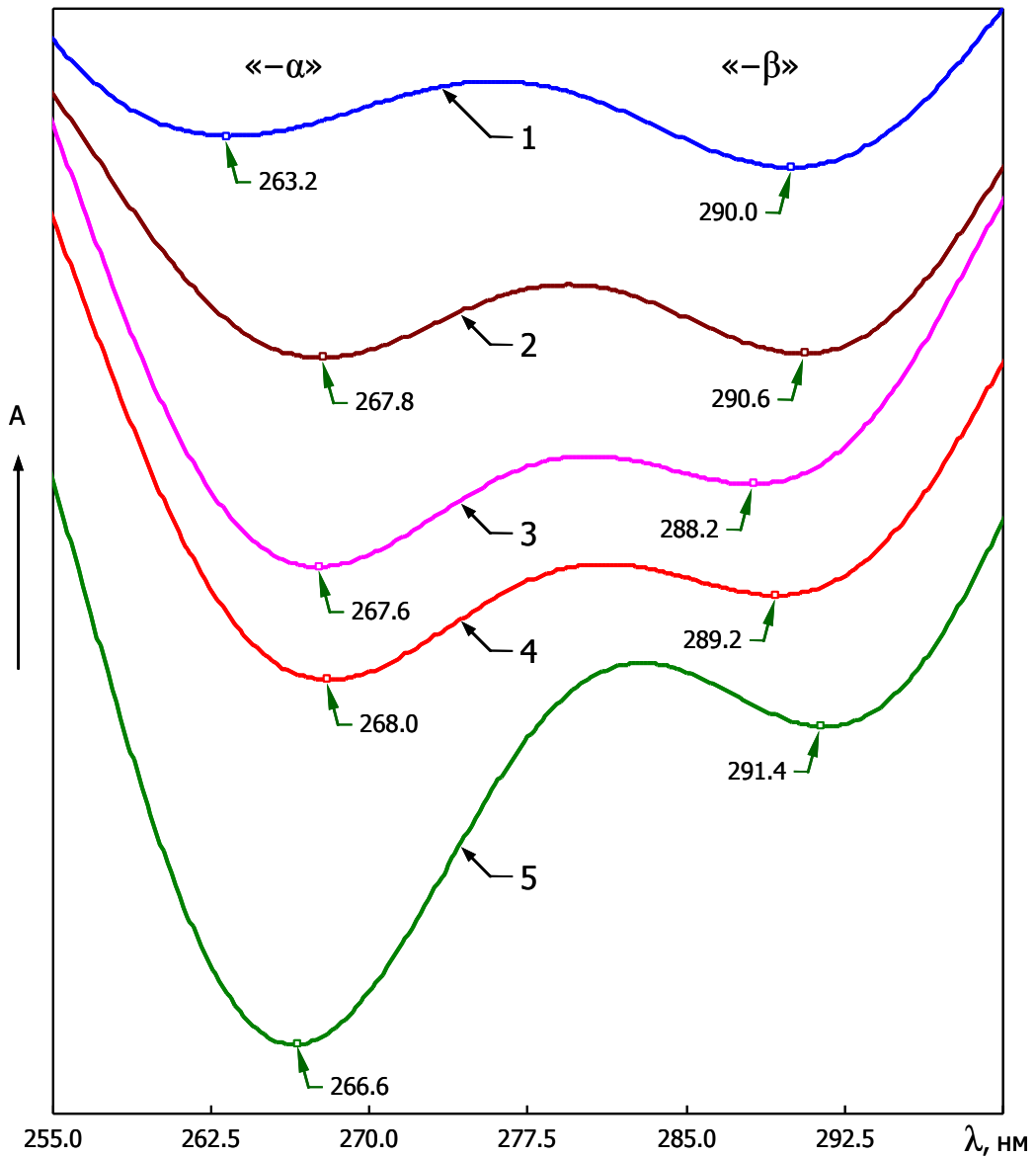


Рис. 57. Вторые производные моделей спектров поглощения протетических групп гемоглобина

Обозначения: дезоксигемоглобин А (1), метгемоглобин А (2), оксигемоглобин F (3), оксигемоглобин А (4) и карбоксигемоглобин А (5); «-α» и «-β» — анализируемые области спектра; по оси ординат — поглощение (A)

Примечание: модели спектров поглощения смещены друг относительно друга по оси ординат на константу; протокол эксперимента — вариант «В»

правил дифференцирования, рис. 36). Причем, простое сопоставление вторых производных интегрального спектра поглощения (кривая 1) и его апобелковой компоненты (кривая 2), не позволяет выявить плохо разрешенные пики поглощения гемовой части данного белка.

На рис. 57 показаны вторые производные модельных спектров поглощения небелковой составляющей макромолекулы гемоглобина: дезоксигемоглобина А (кривая 1), метгемоглобина А (кривая 2), оксигемоглобина F (кривая 3), оксигемоглобина А (кривая 4) и карбоксигемоглобина А (кривая 5).

На всех производных спектров светопоглощения отмечаются две полосы, которые можно временно обозначить как №1 и №2, или лучше, чтобы избежать путаницы с нумерацией полос апобелка (№№1–20), как « $-\alpha$ » и « $-\beta$ ». Положение пиков этих полос по оси длин волн представлено в табл. 12.

Таблица 12. Положение некоторых пиков в исходных и дифференцированных по второй производной спектрах поглощения простетических групп

Дериваты гемоглобина	Значение положения пиков поглощения по абсциссе, нм							
	Полосы УФ-диапазона				Полосы видимого диапазона			
	« $-\alpha$ »		« $-\beta$ »		$\beta$		$\alpha$	
	A	$d^2A$	A	$d^2A$	A	$d^2A$	A	$d^2A$
Оксигемоглобин А	269,2	268,0	—	289,2	541,6	543,4	576,6	577,8
Карбоксигемоглобин А	266,4	266,6	—	291,4	538,6	538,4	568,8	570,6
Дезоксигемоглобин А	—	263,2	—	290,0	554,8*	551,2	—	587,4
Метгемоглобин А	—	267,8	—	290,6	—	543,0	575,8	578,6
Оксигемоглобин F	268,6	267,6	—	288,2	541,4	+	576,4	+

*Примечание: исходный (A) и дифференцированный ( $d^2A$ ) спектр; вычисленные (« $-\alpha$ » и « $-\beta$ ») и регистрируемые ( $\alpha$  и  $\beta$ ) — полосы поглощения простетических групп; «\*» — для дезоксигемоглобина пик с  $\lambda_{555}$  [17] традиционно относят к  $\alpha$ -полосе; по абсциссе: длина волны, выраженная в нанометрах (нм); в УФ-диапазоне (в отличие от видимого) значения положения пиков получены из модели спектра поглощения гемовой компонент; все измерения положения пиков выполнены по данным, полученными в ходе наших экспериментов; «+» — данные не представлены; «—» — пики не определены*



Из представленных данных (табл. 12) видно, что для окси- и карбоксигемоглобина значения положения пиков полос поглощения, полученных по шкалам  $A$  и  $d^2A$ , хорошо соотносятся друг с другом. Возможное несовпадение пиков для той или иной производной гемоглобина обусловлено различающимися способами их определения (т.е., по  $A$  и  $d^2A$ ), что рассматривалось нами ранее (см. 2.2.9, рис. 6 и 7).

Тогда, по отношению к пику полосы « $-\alpha$ » для дезокси- и метгемоглобина, возникает вопрос: «Это артефакт различных математических преобразований и допущений или это действительно пик поглощения?».

В пользу версии о существовании « $-\alpha$ »-полосы говорит высокая скоррелированность модельных спектров поглощения производных гембелка к спектрам нативных макромолекул (см. 4.2, рис. 44).

Как было показано ранее (см. 3.1 и 5.1), в диапазоне длин волн от 270 нм и менее во вторых производных спектров поглощения дериватов гемоглобина как для нативных макромолекул (рис. 10–13, 54), так и для моделей апобелка, сколько-нибудь значимых изменений не происходит. Однако для моделей небелковой составляющей положение пика дезоксигемоглобина (263,2 нм) отстоит достаточно далеко от аналогичного пика метгемоглобина (267,8 нм), но пик метгемоглобина близок по своему положению к таковым для окси- (268,0 нм) и карбоксигемоглобина (266,6 нм) (рис. 57). Это, в свою очередь, хорошо соотносится с представлениями об особенностях лигандирования гемового железа [18], а также результатам наших вычислений по данным PDB (табл. 11).

Сложнее дело обстоит с « $-\beta$ »-полосой в части ее подтверждения. Данная полоса обнаруживается только на дифференцированных моделях спектров поглощения небелковой части макромолекулы. Положение этой полосы для всех исследуемых нами гемпроизводных меняется не очень сильно, что несколько настораживает, т.к. ее проекция приходится на область поглощения пиков вторых производных спектра триптофана (прежде всего, полоса №20, рис. 52) и отчасти тирозина.

Положение пика полосы поглощения №20 при изменении степени

окисления гемового железа или его лигандировании меняется очень незначительно (табл. 2), что может быть скоррелировано с положением пика « $-\beta$ »-полосы. Другими словами, возможно, что полоса « $-\beta$ » — это артефакт от пиков поглощения триптофана (и в некоторой степени тирозина).

В связи с этим, необходимо рассмотреть доступные факты и аргументы, опровергающие или подтверждающие версию существования « $-\beta$ »-полосы как полосы поглощения гемовой компоненты, а не артефакта, понимание природы которого имеет второстепенное значение.

Для того, чтобы проверить, насколько хорошо определяется и воспроизводится положение того или иного пика поглощения « $-\beta$ »-полосы в ходе вычислений, нами было проведено сравнение положения последнего по шкале длин волн для вторых производных спектров поглощения оксигемоглобина А и F (т.к. они имеют одинаковое состояние гема при различающейся апобелковой части макромолекулы).

Результат анализа для А и F оксиформ белка показывает некоторую вариабельность в положении « $-\beta$ »-полос (289,2 против 288,2 нм) относительно « $-\alpha$ »-полос (268,0 против 267,6 нм, табл. 12). Причем, как мы полагаем, эта разница теоретически должна отсутствовать, а фактически — быть в пределах  $\pm 0,2$  нм (шаг интерполирующей сетки). При этом, из-за размытого характера положения таких пиков и наложения шумовой компоненты, их местоположение может меняться и в бóльших пределах, что вполне допустимо (см. 4.2). Тем не менее, этот прием не позволил достичь существенного прогресса в оценке статуса данной « $-\beta$ »-полосы (т.е. насколько вероятно ее существование).

Как уже отмечалось, усугубляет ситуацию тот факт, что положение « $-\beta$ »-полосы попадает на область поглощения пика триптофана (полоса №20), и этот пик для оксигемоглобина F смещен относительно пика оксигемоглобина А в сторону меньших длин волн (табл. 2), причем коррелирует с положением пика « $-\beta$ » на второй производной оксигемоглобина А и F (табл. 12).

Для оценки роли пиков поглощения боковых групп аминокислот, как источников потенциальных артефактов, возникающих при разложении

интегрального спектра белка, мы сравнили амплитуды вторых производных дериватов гемоглобина (рис. 10–14) в областях « $-\alpha$ » и « $-\beta$ » полос поглощения и сопоставили их с соответствующими интенсивностями данных полос в дифференцированных модельных спектрах простетических групп (рис. 57).

Тогда, для карбоксигемоглобина отношение амплитуд « $-\alpha$ »/« $-\beta$ » максимально, а для дезоксигемоглобина — минимально (рис. 57). Однако сопоставление амплитуд вторых производных интегральных спектров поглощения гемоглобина, приходящихся своими проекциями на « $-\alpha$ » и « $-\beta$ » (рис. 10–14), дает следующий ряд: от дезоксигемоглобина А (максимальное отношение) до оксигемоглобина F (минимальное отношение), что не коррелирует с отношением амплитуд этих полос. И хотя данное сравнение несколько обнадеживает, оно не доказывает существование « $-\beta$ »-полосы, а только лишь ее допускает.

Для того чтобы оценить, как влияет «следовое» присутствие боковых групп аминокислот в спектре модели небелковой компоненты ( $B_1$ ) на формирование и положение пиков вторых производных аппроксимированной модели (т.е.,  $B$ ), нами проведен анализ остатков (*Residual*), представляющих собой разность  $B_1 - B$  ( $\Delta B$ ) (рис. 58).

Сопоставляя разностные спектры окси- (кривая 5), карбокси- (кривая 4) и метгемоглобина А (кривая 3) на участке длин волн 255–300 нм, следует отметить их высокое сходство. Тем не менее, у них разнятся полосы поглощения в своем местоположении как « $-\alpha$ », так и « $-\beta$ ». Если бы эти полосы являлись артефактами, то вероятней всего, они бы не различались по своему положению на оси длин волн, т.к. модельный спектр поглощения апобелковой составляющей карбокси-, окси- и метгемоглобина А практически идентичен (рис. 50). В противном случае, мы имели бы дело с одинаковыми модельными спектрами поглощения небелковой составляющей дериватов гемопротеида, т.е.  $B$ , однако, это не так (рис. 44).

Так как модельный спектр поглощения ( $B$ ) небелковой составляющей

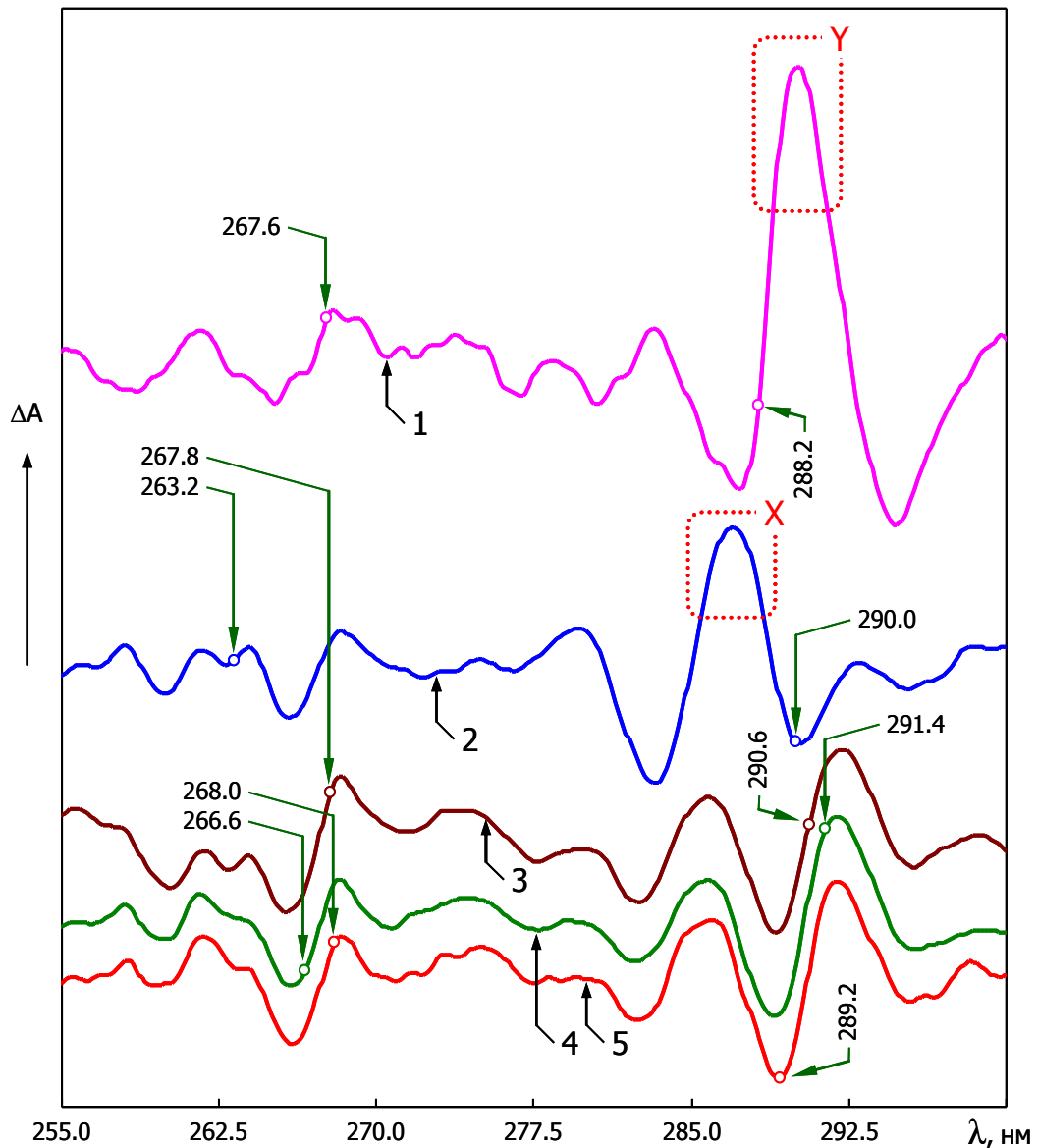


Рис. 58. Разность ( $\Delta B$ ) между моделями  $B_1$  и  $B$  спектров поглощения небелковой составляющей производных гемоглобина

Обозначения: оксигемоглобин  $F$  (1), дезоксигемоглобин  $A$  (2), метгемоглобин  $A$  (3), карбоксигемоглобин  $A$  (4) и оксигемоглобин  $A$  (5); маркеры на спектрах указывают проекцию полос поглощения « $-\alpha$ » и « $-\beta$ »;  $Y$  и  $X$  — области с высоким артефактом; по оси ординат — поглощение ( $\Delta A$ )

Примечание: модели спектров поглощения смещены друг относительно друга по оси ординат на константу; протокол эксперимента — вариант « $B$ »

оксигемоглобина А (кривая 5) и F (кривая 1), в т.ч., и по  $d^2A$ , идентичен (рис. 57), и отличия для этих форм гемоглобина заключаются только в апобелковой части, то тогда другое соотношение аминокислот тирозина и триптофана (табл. 4) вносило бы достаточно значимое изменение в местоположение « $-\alpha$ » и « $-\beta$ » (рис. 58). Но и это в данном случае не наблюдается.

Большое значение  $\Delta V$  по оси ординат для оксигемоглобина F относительно аналогичных для других гемпроизводных (область Y, кривая 1), должно было бы сместить полосу « $-\beta$ » с 288,2 нм в сторону бóльших длин волн и превысить значение 291,4 нм (HbCO, кривая 4), однако, и это не прослеживается.

На участке длин волн от 255 нм до 285 нм для оксигемоглобинов форм А и F показаны различия (рис. 58, кривая 5 и 1), обусловленные спецификой обработки зарегистрированных спектрофотометром результатов измерений и последующей обработки данных (т.е., эти различия не являются особенностью в поглощении той или иной формы гембелка, и, теоретически, данные спектры должны совпадать). Это обстоятельство позволяет увидеть, что аппроксимация полиномом Чебышева для спектров  $B_1$  оксиформ А и F дает очень хорошие результаты по сглаживанию артефактов. Причем результатом такого сглаживания является практически полное совпадение полос поглощения по их местоположению: « $-\alpha$ » — 267,6 нм (оксигемоглобин F) и — 268,0 нм (оксигемоглобин А).

Так как модели спектров поглощения небелковой компоненты дезокси- и метгемоглобина сходны (рис. 44), а их апобелковые составляющие различаются в области от 272,5 нм и более (рис. 50), то становится возможным провести еще одно сопоставление.

Как следует из представленных данных (рис. 58), несмотря на высокое сходство спектров  $\Delta V$  для Hb<sub>A</sub> (кривая 2) и MtHb<sub>A</sub> (кривая 3) на участке длин волн 255–270 нм и подобие модельных спектров поглощения для их небелковой компоненты (рис. 44), тем не менее, существуют различия в местоположении « $-\alpha$ »-полос:  $\Delta\lambda=4,6$  нм (что достаточно существенно).

Область X в спектре дезоксигемоглобина А (кривая 2) должна приводить к

смещению полосы « $-\beta$ » при аппроксимации полиномом в сторону меньших длин волн. Но фактически ее значение (290,0 нм) даже больше, чем для оксигемоглобина А и F (289,2 и 288,2 нм). Это обстоятельство говорит в пользу существования « $-\beta$ »-полосы. Причем выбранный способ аппроксимации хорошо «справляется» с присутствующими в спектре  $B_1$  артефактами.

Результативность аппроксимации полиномом можно проиллюстрировать на примере карбоксигемоглобина (рис. 59).

Следует также отметить, что сравнительный анализ полос поглощения « $-\alpha$ » и « $-\beta$ » как системы полос является более эффективным, чем их изучение по отдельности (см. 4.2), и в дальнейшем мы это используем.

Так как аргументов в пользу существования пика полосы « $-\beta$ », на наш взгляд, не вполне достаточно, была предпринята попытка доказать обратное путем аппроксимации спектра  $B_1$  различными полиномами на примере HbCO (рис. 60). В случае сильных расхождений положения « $-\beta$ »-полосы по второй производной  $B$  или ее отсутствия, это давало бы повод усомниться в существовании последней.

Выбор используемых нами полиномов ограничивался главным критерием: величиной  $r^2 > 99,9$  %. Применение полиномов с меньшей величиной этого коэффициента нецелесообразно, т.к. они плохо аппроксимируют на интерполируемом участке спектра и создают дополнительные артефакты.

Из большого многообразия примененных полиномов на рис. 60 представлены только некоторые: Фурье, Чебышева, Ньютона. Причем для этих полиномов приведены только их отдельные порядки.

Как следует из представленных данных, полиномы Чебышева 10 ( $r^2=99,978$  %, кривая 1) и 14 ( $r^2=99,983$  %, кривая 2) порядков; полиномы Фурье с порядками  $6 \times 2$  ( $r^2=99,981$  %, кривая 4) и  $4 \times 2$  ( $r^2=99,941$  %, кривая 5); степенные полиномы 14 ( $r^2=99,982$  %, кривая 3) и 9 ( $r^2=99,913$  %, кривая 6) порядков (кроме тестового полинома с  $r^2=99,717$  %, кривая 7) показывают, так или иначе, наличие « $-\beta$ »-полосы.

Ранее отмечалось (см. 5.1), что если хромофор меняет свое поглощение на

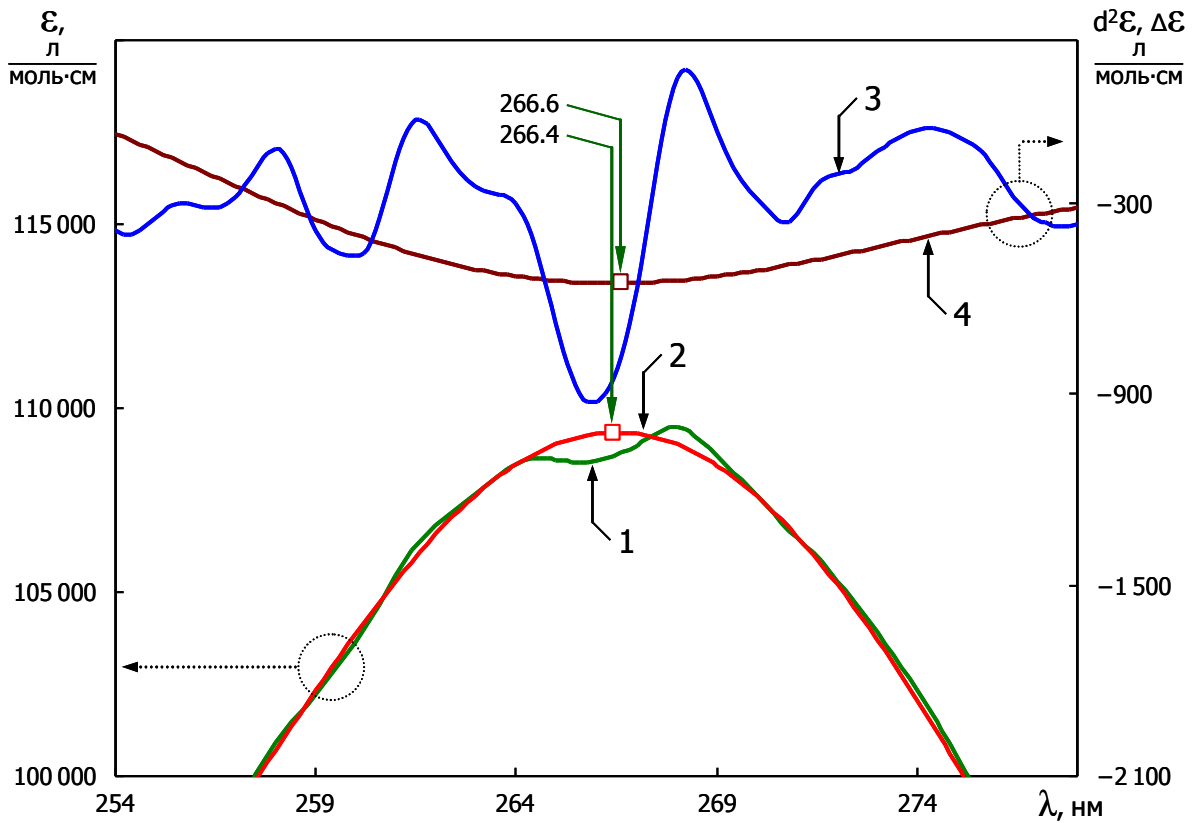


Рис. 59. Модель спектра поглощения небелковой компоненты карбоксигемоглобина А

Обозначения: модель спектра небелковой компоненты  $B_1$  (1), аппроксимация полиномом Чебышева, модель В (2), разностный спектр  $\Delta B$ , как  $B_1 - B$  (3) и вторая производная спектра В (4);  $\epsilon$  — молярный показатель поглощения;  $d^2\epsilon$  — вторая производная молярного показателя поглощения;  $\Delta\epsilon$  — разность в показателях молярного поглощения

Примечание: протокол эксперимента — вариант «В»

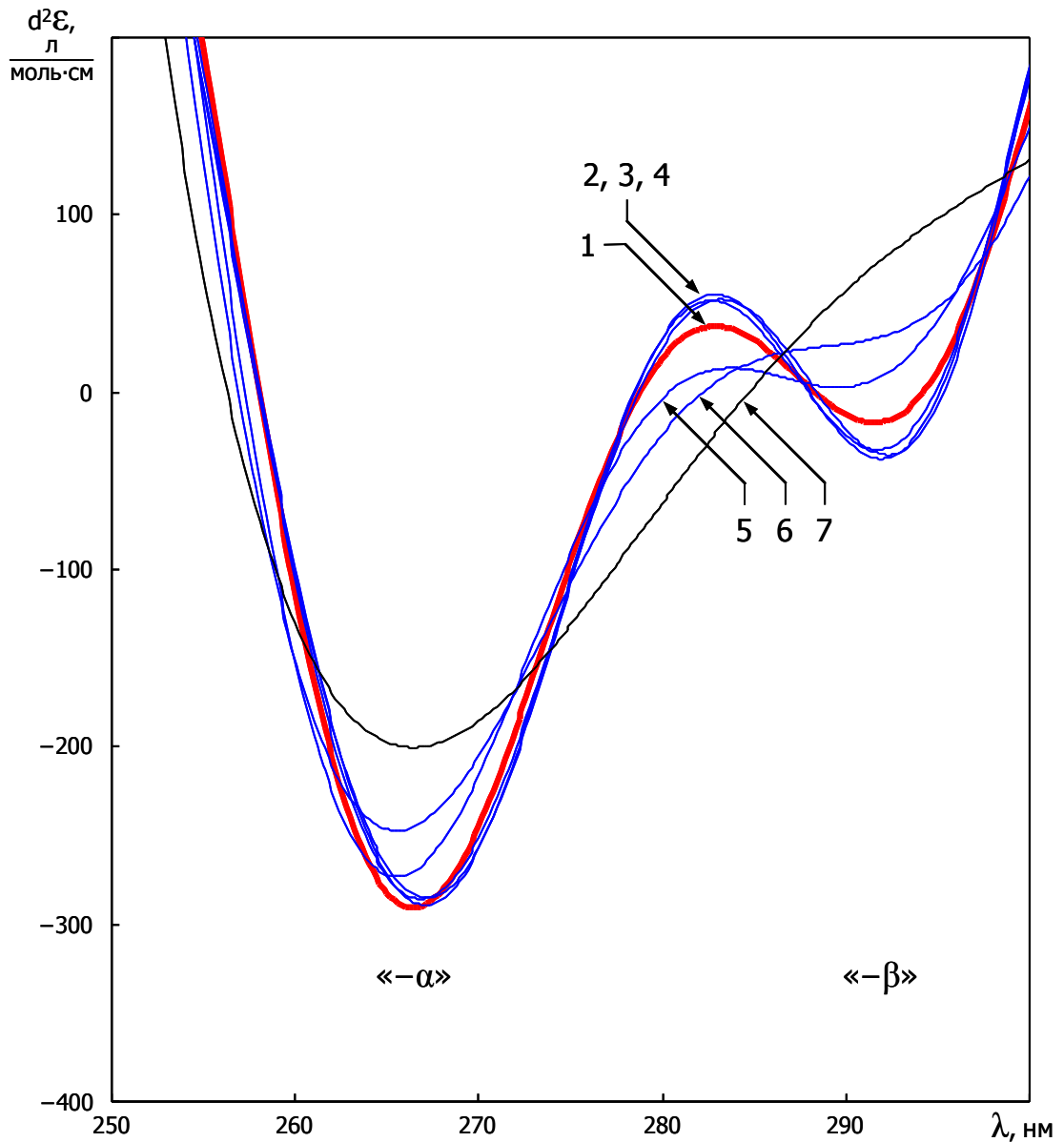


Рис. 60. Вторые производные моделей спектров поглощения небелковой составляющей карбоксигемоглобина (В), полученных аппроксимацией некоторыми полиномами

Обозначения: полином Чебышева 10 (1) и 14 (2) порядка; полином Фурье, порядок  $6 \times 2$  (4) и  $4 \times 2$  (5); степенной полином 14 (3) и 9 (6) порядка ( $n=1; 2; \dots; m$ ); степенной полином ( $n=0,5; 1,5; \dots; 4,5$ ) (7);  $d^2\varepsilon$  — вторая производная молярного показателя поглощения

Примечание: полином (7) приведен для сравнения, его  $r^2=99,7\%$ ; используемый в работе полином, как основной (1) выделен толстой линией; протокол эксперимента — вариант «В»



одном участке спектра, то следует ожидать скоррелированных изменений и на другом его участке. Следовательно, видоизменения в спектре поглощения небелковой компоненты в видимом диапазоне длин волн должны согласованно соотноситься с УФ-диапазоном.

Для этого мы сравнили вторые производные модельных спектров поглощения небелковой части макромолекулы в УФ-диапазоне (где отмечаются « $-\alpha$ »- и « $-\beta$ »-полосы), со вторыми производными спектров поглощения нативных дериватов гемоглобина (где фиксируются истинные  $\alpha$ - и  $\beta$ -полосы поглощения).

Вторые производные были получены как непосредственно из интегральных спектров поглощения (см. 2.2.9), так и путем дифференцирования ( $d^2A$ ) аппроксимирующих полиномов Фурье к этим спектрам с  $r^2 > 99,9985\%$  (рис. 61).

Использование полиномов к исходным спектрам поглощения с их последующим дифференцированием (рис. 61, утолщенные кривые) позволяет более эффективно устранить шумовую компоненту, чем непосредственное дифференцирование (тонкие линии) после применения «стандартной» фильтрации (т.е., принятой в настоящей работе, как основной, см. 2.2.9, рис. 4 и 5).

Сопоставление  $d^2A$  от аппроксимирующих полиномов к  $d^2A$ , вычисленных «стандартным» способом, позволяет в некоторой степени (из-за ограничений, накладываемых шумом) проверить наличие артефактов при замене исходного спектра таким полиномом.

Как следует из представленных данных (рис. 61), такая замена вполне корректна, полином новых экстремумов в спектр  $d^2A$  не привносит, что позволяет распространить это заключение и на предыдущие аппроксимации (Чебышева и Фурье), использовавшиеся нами в УФ-диапазоне длин волн. Ранее такой тест не мог быть выполнен из-за того, что в УФ-диапазоне происходит перекрытие спектров апобелковой и гемовой компонент макромолекулы.

Из рис. 61 следует, что положения  $\alpha$ - и  $\beta$ -полос  $\text{HbO}_2$  (кривая 3) и  $\text{MtHb}$  (кривая 2) сопоставимы и коррелируют с аналогичными данными на рис. 57. Для

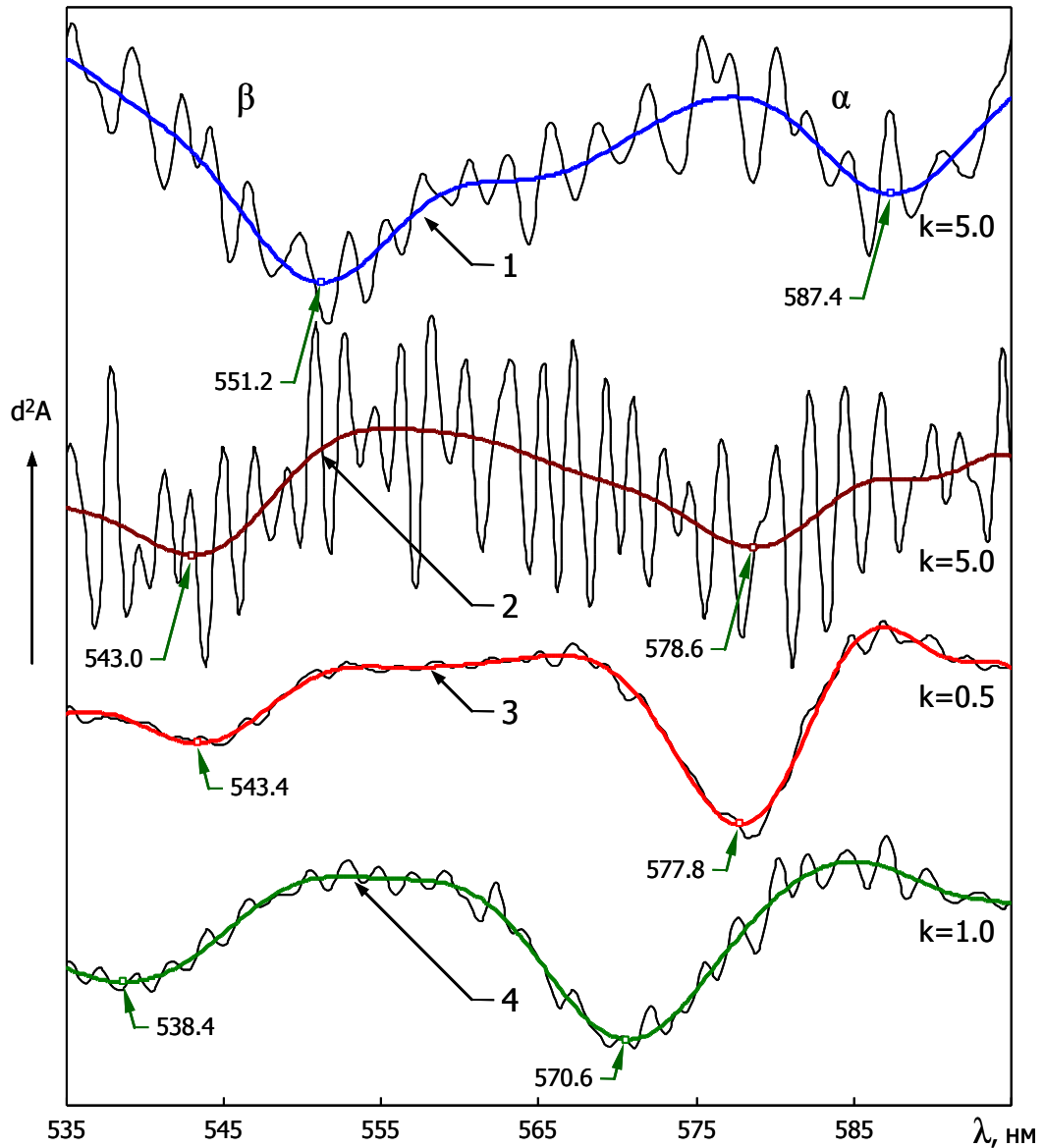


Рис. 61. Вторые производные спектров поглощения дериватов гемоглобина

Обозначения: тонкие линии — вторые производные спектров поглощения дериватов гемоглобина, толстые линии — вторые производные аппроксимирующих полиномов Фурье (порядок  $10 \times 2$ ) к спектрам поглощения этих дериватов; дезоксигемоглобин (1), метгемоглобин (2), оксигемоглобин (3) и карбоксигемоглобин (4); «-α» и «-β» — анализируемые области спектра;  $d^2A$  — вторая производная молярного показателя поглощения

Примечание: вторые производные спектров поглощения смещены друг относительно друга по оси ординат на константу и нормированы по амплитуде  $k$ ; протокол эксперимента — вариант «В»

НЬ (кривая 1) эти полосы смещены относительно полос  $\text{HbO}_2$  и  $\text{MtHb}$  в сторону бóльших длин волн. В УФ-диапазоне наблюдается некоторое зеркальное отображение по смещению « $-\alpha$ »-полосы. В видимом диапазоне полосы  $\text{HbCO}$  (кривая 4) смещены относительно полос  $\text{HbO}_2$  и  $\text{MtHb}$  в сторону меньших длин волн. В УФ-области — « $-\beta$ »-полоса смещается зеркально  $\beta$ , а « $-\alpha$ » — также, как и  $\alpha$ , смещается в сторону меньших длин волн. То есть, четкой зеркальной, относительно оси ординат, симметрии для полос УФ- и видимого диапазонов длин волн производных гемоглобина по  $d^2A$  не просматривается.

Однако если взять отношение интенсивностей поглощения данных полос по  $d^2\varepsilon$  как  $\alpha/\beta$ , то такая симметрия видна. Можно сформировать ряд от максимального к минимальному значению  $\alpha/\beta$ :  $\text{HbCO}$  и  $\text{HbO}_2$  ( $\alpha/\beta > 1$ ),  $\text{MtHb}$  ( $\approx 1$ ),  $\text{Hb}$  ( $< 1$ ).

Таким образом, наблюдаемые корреляции по положению и соотношению интенсивностей пиков полос поглощения УФ- и видимого диапазонов длин волн могут косвенно указывать на существование « $-\alpha$ »- и « $-\beta$ »-полос как «антиподов» к  $\alpha$  и  $\beta$ .

В заключение следует отметить, что, несмотря на приведенные аргументы в пользу наличия « $-\alpha$ »- и « $-\beta$ »-полос в спектрах поглощения гемпроизводных, однозначно утверждать о присутствии, прежде всего « $-\beta$ »-полосы, а также « $-\alpha$ »-полосы для дезокси- и метгемоглобина, на наш взгляд, несколько преждевременно. Вопрос об их существовании окончательно не решен, и для его разрешения в будущем потребуются анализ новых данных и применение новых методических приемов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Оптимизацией режимов работы спектрофотометров и комбинированной цифровой фильтрацией получаемых исходных интегральных и дифференцированных по второму порядку спектров поглощения некоторых протеиногенных аминокислот, несущих хромофоры в составе боковых групп, а также некоторых простых и сложных белков (трипсина, альбумина, каталазы и гемоглобина), достигнуты необходимые условия, позволяющие выявлять плохо разрешенные полосы в спектрах светопоглощения изучаемых образцов в диапазоне длин волн 240–320 нм.

Отмечается некоторое несоответствие в положении пиков для исходных и производных спектров поглощения исследуемых молекул, что связано с особенностями процедуры дифференцирования. Однако наблюдаемое несоответствие не представляет сложности для анализа таких экстремумов во вторых производных спектров поглощения, т.к. сопоставление пиков осуществляется в одной и той же «системе координат».

Систематически возникающие пики-сателлиты в некоторых областях проанализированных дифференцированных спектров также могут быть дополнительными реперными точками, что позволяет по ним сравнивать спектры поглощения белков как между собой, так и с аддитивными моделями этих биополимеров, построенных на основе парциальных спектров свободных аминокислот.

Установлено, что в диапазоне длин волн 240–320 нм для рассматриваемых нами белков: трипсина, альбумина, каталазы и гемоглобина, во вторых производных их спектров поглощения обнаруживаются до 20 пиков (ассоциируемых с полосами поглощения), положение которых достаточно консервативно.

Вариабельность местоположения этих экстремумов, как известно, зависит от соотношения аминокислотных остатков в макромолекуле и характера их

микроокружения.

Причем, как нами было показано, во вторых производных спектров поглощения нативных макромолекул небелковая компонента хромопротеидов не затрудняет определение местоположения пиков апобелка по причине отсутствия у гемовых групп полос с узкой полушириной поглощения, т.е. в некотором смысле они «оптически прозрачны».

Ввиду того, что диапазоны варьирования положения пиков апобелка по абсциссе, за некоторым исключением, не перекрываются, то целесообразно представить эти диапазоны в виде областей и присвоить им порядковые номера полос от 1 до 20, начиная от меньших длин волн.

Наличие таких устойчивых обособленных областей пиков вторых производных спектров поглощения макромолекул позволяет осуществлять прогноз положения данных максимумов, вероятно, для большинства белков, а аномалии в их расположении могут представлять дополнительный интерес при изучении структурно-функционального состояния этих биополимеров.

Так как соотнесение пиков во вторых производных спектров поглощения белков к таковым для свободных аминокислот не совсем корректно из-за возникающего в суперпозиции поглощения макромолекулы подобия интерференционной картины для ее экстремумов, то одним из способов решения данной проблемы является сопоставление с аналогичными пиками аддитивной модели апобелка, созданной на основе парциальных спектров аминокислот.

Из-за того, что вариабельность положения пиков во вторых производных аддитивных моделей апобелка, по понятным причинам (таким как, например, инвариантность микроокружения хромофоров), значимо меньше, т.е., амплитуда варьирования пиков в анализируемой системе «нативный белок—модель апобелка» лимитируется только лишь спектром нативной макромолекулы, то эффективность примененного нами подхода вполне очевидна.

Обнаруживаемый волновой сдвиг между исходным спектром нативного белка и его моделью позволяет оценивать роль микроокружения боковых групп аминокислот в составе макромолекулы, с одной стороны, с другой —

скоррелированность такого сдвига дает возможность, как найти, так и уточнить местоположение некоторых плохо разрешенных пиков полос поглощения биополимера.

Последующее разложение аддитивного спектра поглощения до исходных компонент позволяет оценить вклад каждого аминокислотного остатка, входящего в определенную модель, в спектр поглощения нативной макромолекулы.

Тогда, по нашим данным, пики во второй производной спектров поглощения белков в областях с 3 по 13 обусловлены боковыми группами фенилаланина, 2 — главным образом, фенилаланина и несущественно тирозина, 1 — по всей вероятности, фенилаланина и отчасти тирозина. Ненадежно разрешенный пик в области под номером 14, вероятно, — плохо выраженная суперпозиция поглощения тирозина и фенилаланина.

Пики областей 15–20 определяются, главным образом, комбинациями экстремумов тирозина и триптофана, с возрастающим вкладом последнего в суперпозицию этих пиков с увеличением длины волны в спектре поглощения белка. Высокая чувствительность боковой группы тирозина к параметрам своего микроокружения, наряду с интерферирующим эффектом ее спектра со спектром триптофана во вторых производных, делает положение результирующих пиков в областях 15–19 наиболее лабильным, а в области 17–18 — перекрывающимися.

Отношение количества аминокислотных остатков тирозина к триптофану к соответствующему отношению амплитуд пиков второй производной как в нативных белках, так и их апобелковых моделях, может быть аппроксимировано экспоненциальной зависимостью, что позволяет выполнять прогнозы, исходя из известного соотношения их аминокислотных остатков в макромолекуле или соотношения пиков второй производной в ее спектре поглощения.

Вкладом гистидина, цистеина и метионина в формирование интегрального спектра поглощения макромолекулы можно пренебречь, т.к. они имеют, по данным модельного спектра, низкую относительную долю светопоглощения.

Кроме этого, по результатам анализа спектра аддитивной модели, данные

аминокислоты, а также цистин, не вносят значимых изменений в спектр поглощения по второй производной, что объясняется отсутствием пиков в исходных (недифференцированных) спектрах этих аминокислот (цистеин, метионин), или имеющих очень большую спектральную полуширину (гистидин, цистин) в используемом диапазоне длин волн.

С целью изучения индивидуальных спектров поглощения белковой и небелковой компонент без нарушения нативной структуры макромолекулы из-за применения различных физико-химических методов разделения, нами предложен и протестирован способ разложения спектра поглощения биополимера математическими методами.

В основе этого способа используется алгоритм с определенными условиями и допущениями. Вклад белковой ( $A$ ) и небелковой ( $B$ ) частей в интегральный спектр ( $C$ ) макромолекулы представляется аддитивной моделью. В качестве исходной модели ( $A_0$ ) выступает модель спектра поглощения апобелка, полученная на основе парциальных спектров аминокислот, входящих в его состав. Повышение степени соответствия  $A_0$  к целевому  $A$  достигается смещением  $A_0$  на  $\Delta x$  по заданному критерию, при этом получается спектр  $A_1$ . Вычитанием  $A_1$  из  $C$  находится спектр поглощения простетических групп ( $B_1$ ). Так как  $B_1$  содержит артефакты, обусловленные остаточным присутствием «отпечатков» полос поглощения хромофоров апобелка, аппроксимация интерполирующим полиномом по определенным критериям дает целевой спектр  $B$ . Вычитанием  $B$  из  $C$  получается  $A$ . Сравнением вторых производных  $A$  и  $B$  проверяется корректность выполненных преобразований.

Разложение исходных спектров поглощения гемоглобина А и F в окси-, дезокси-, карбокси- и метформе на белковую и небелковую составляющие показало хорошее соответствие модельных спектров светопоглощения апобелковой компоненты к спектрам простых белков, полученным экспериментальным путем по результатам собственных исследований и данных литературных источников.

Сопоставление модельных спектров поглощения (гемпроизводных)

небелковой части макромолекулы (240–320 нм) со спектрами поглощения соответствующих нативных молекул гемоглобина (320–380 нм), где поглощают только простетические группы, показало, что эти части единого спектра гармонизируют между собой по наличию/отсутствию максимумов, интенсивности и степени выраженности пиков.

Практически полное (ограниченное только ошибкой измерения и неизбежными артефактами аппроксимации) совпадение модельных спектров поглощения гемовой составляющей оксигемоглобина А и F, указывает на высокую аддитивность между белковой и небелковой компонентами, что также подтверждается данными из спектров поглощения видимого диапазона (380–600 нм) для нативных макромолекул, в частности,  $Hb_AO_2$  и  $Hb_FO_2$ .

Это, в свою очередь, позволяет моделировать спектры поглощения гемоглобина путем рекомбинации белковой и небелковой частей макромолекулы не только для гемоглобинов А и F, но и, по всей вероятности, и для других форм.

Анализ вторых производных интегральных спектров поглощения гемоглобина и его дериватов, а также моделей спектров светопоглощения апобелковой составляющей этих макромолекул с помощью различных методических приемов показал, что апобелковая компонента гемоглобина в дезоксиформе достаточно существенно отличается от таковых для других лигандных форм гембелка.

Вместе с тем, апобелковые части макромолекулы для окси-, карбокси и метформ гемоглобина практически идентичны с точки зрения проявления ими своих спектральных свойств.

Дальнейшее исследование выявленных различий в интегральных, разностных и дифференцированных спектрах поглощения апобелковой компоненты показало ведущую роль тирозиновых аминокислотных остатков в возникновении таких изменений. Этот факт хорошо согласуется как с данными по чувствительности боковой группы тирозина к изменению ее микроокружения, так и находится в очень хорошем соответствии со схемой оксигенации Перутца.

Вычисленная нами на основании данных рентгеновской кристаллографии



дериватов гемоглобина дистанция положения гемового железа относительно плоскости порфиринового кольца для этих форм отлично коррелирует с изменениями в модельных спектрах поглощения апобелковых компонент различных гемпроизводных белка.

Анализ вторых производных аппроксимирующих полиномов как модельных спектров поглощения гемовой компоненты позволил выявить полосы в этих спектрах, обозначенные нами как « $-\alpha$ » и « $-\beta$ ». Данные полосы по соотношению интенсивностей поглощения (« $-\alpha$ »/« $-\beta$ ») во вторых производных модельных спектров небелковой компоненты коррелируют с полосами  $\alpha/\beta$  в видимом участке спектра для нативных гемпроизводных белка. Причем, сами полосы « $-\alpha$ » и « $-\beta$ » по их интенсивности имеют некоторую симметрию относительно оси ординат (и полосы Core) относительно  $\alpha$  и  $\beta$ .

Нами использован ряд тестов, позволяющих в той или иной степени ассоциировать « $-\beta$ »-полосу с гемовой компонентой, а не как с возможным артефактом модельного спектра вследствие различных математических преобразований и вычислений.

Однако, несмотря на приведенные аргументы в пользу наличия « $-\alpha$ » и « $-\beta$ »-полос в спектрах поглощения производных гембелка, однозначно утверждать о присутствии, прежде всего « $-\beta$ »-полосы, а отчасти « $-\alpha$ »-полосы для дезокси- и метгемоглобина, несколько преждевременно. Вопрос об их существовании, по нашему мнению, окончательно не снят, и для его разрешения в будущем потребуется анализ новых данных и применение новых методических приемов.

В конечном итоге, результаты наших исследований могут быть представлены в виде возможной схемы расположения областей идентифицированных пиков полос поглощения для некоторых простых и сложных белков (рис. 62).

Таким образом, комплекс мер, направленных на разрешение, идентификацию и анализ перекрывающихся полос поглощения хромофоров некоторых простых и сложных белков в диапазоне длин волн 240–320 нм

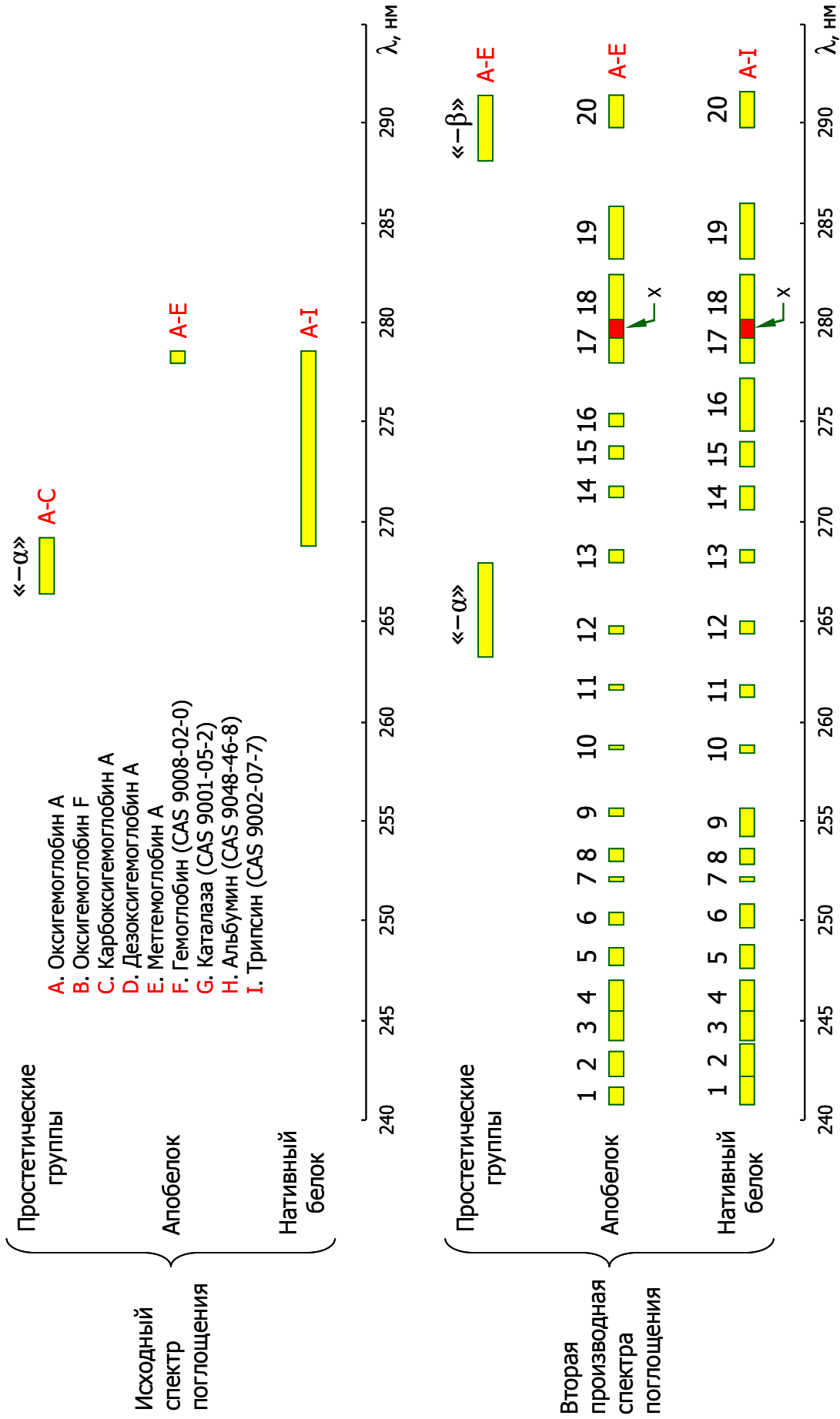


Рис. 62. Возможная схема расположения пиков полос поглощения электронных переходов, отвечающих за спектральные свойства белковых макромолекул

Обозначения: знаком «X» показана область перекрытия полос поглощения

позволил в определенной степени решить ряд задач, связанных с изучением коррелированного изменения структуры белковых макромолекул и соответствующим проявлением ими своих спектральных свойств.

Это, с одной стороны, показывает результативность спектральных методов и актуальность их применения, с другой — позволяет более эффективно исследовать влияние различных физико-химических агентов на структурно-функциональное состояние белков и их комплексов с помощью данного метода и приемов, рассмотренных и использованных в настоящей работе.

## ВЫВОДЫ

1. Вторые производные спектров поглощения белков — трипсина, альбумина, гемоглобина и каталазы, содержат пики полос поглощения, которые расположены в областях, обозначенных нами номерами от 1 до 20: №1 (240,8–242,2 нм), №2 (242,2–243,8 нм), №3 (244,0–245,4 нм), №4 (245,4–247,0 нм), №5 (247,6–248,8 нм), №6 (249,6–250,8 нм), №7 (252,0–252,2 нм), №8 (252,8–253,6 нм); №9 (254,2–255,6 нм), №10 (258,4–258,8 нм), №11 (261,2–261,8 нм), №12 (264,4–265,0 нм), №13 (268,0–268,6 нм), №14 (270,6–271,8 нм), №15 (272,8–274,0 нм), №16 (274,6–277,2 нм), №17 (278,0–280,2 нм), №18 (279,2–282,4 нм), №19 (283,2–286,0 нм) и №20 (289,6–291,6 нм).

2. Пики во второй производной спектров поглощения белков в областях с 3 по 13 обусловлены боковыми группами фенилаланина, 2 — главным образом фенилаланина и несущественно тирозина, 1 — по всей вероятности, фенилаланина и отчасти тирозина. Ненадежно разрешенный пик в области под номером 14, вероятно, — плохо выраженная суперпозиция поглощения тирозина и фенилаланина. Пики областей 15–20 определяются, главным образом, комбинациями экстремумов тирозина и триптофана.

3. Высокая чувствительность боковой группы тирозина к параметрам своего микроокружения, наряду с интерферирующим эффектом ее спектра со спектром триптофана во вторых производных, лабилизирует положения результирующих пиков в областях 15–19, а области 17–18 при этом становятся перекрывающимися.

4. Моделирование спектров поглощения гемоглобина путем рекомбинации белковой и небелковой составляющих оксиформ А и F показало высокую аддитивность в системе «апобелок—простетические группы».

5. Изменения в моделях спектров поглощения апобелка производных гемоглобина коррелируют с изменениями положения атома железа относительно порфиринового кольца простетических групп.

6. Лигандирование гемового железа приводит к изменению спектров поглощения тирозиновых аминокислотных остатков в молекуле гембелка.

7. Относительная интегральная доля поглощения небелковой части макромолекулы для гемоглобина А и F в диапазоне длин волн 240–320 нм превышает 70 % ( $\text{Hb}_A\text{O}_2$  — 77,5 %,  $\text{Hb}_A\text{CO}$  — 77,9 %,  $\text{Hb}_A$  — 75,7 %,  $\text{MtHb}_A$  — 73,7 % и  $\text{Hb}_F\text{O}_2$  — 74,3 %).

8. В модельных недифференцированных спектрах светопоглощения протетических групп окси- и карбоксигемоглобина обнаруживается полоса, обозначенная как « $-\alpha$ » с  $\lambda_{\max}=269,2$  нм ( $\text{Hb}_A\text{O}_2$ ), 266,4 нм ( $\text{Hb}_A\text{CO}$ ) и 268,6 нм ( $\text{Hb}_F\text{O}_2$ ).

9. В дифференцированных модельных спектрах протетических групп положения выявленных полос поглощения « $-\alpha$ » и « $-\beta$ » приходятся на длины волн: для  $\text{Hb}_A\text{O}_2$  — 268,0 и 289,2 нм;  $\text{Hb}_A\text{CO}$  — 266,6 и 291,4 нм;  $\text{Hb}_A$  — 263,2 и 290,0 нм;  $\text{MtHb}_A$  — 267,8 и 290,6 нм и  $\text{Hb}_F\text{O}_2$  — 267,6 и 288,2 нм соответственно.

10. Предложена схема расположения пиков полос поглощения электронных переходов, отвечающих за спектральные свойства белковых макромолекул.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алберг Дж. Теория сплайнов и ее приложения / Дж. Алберг, В. Нильсон, Дж. Уолш. — М. : Мир, 1972. — 316 с.
2. Алгоритмы: построение и анализ / Т. Х. Кормен [и др.]. — М. : Вильямс, 2005. — 1296 с.
3. Аналитическая химия. Физические и физико-химические методы анализа / [под. ред. О. М. Петрухина]. — М. : Химия, 2001. — 496 с.
4. Артюхов В. Г. Гемопротеиды: закономерности фотохимических превращений в условиях различного микроокружения / В. Г. Артюхов. — Воронеж : Изд-во Воронеж. ун-та, 1995. — 280 с.
5. Артюхов В. Г. Оптические методы исследования биологических систем и объектов: Учеб. пособие / В. Г. Артюхов, М. С. Бутурлакин, В. П. Шмелев. — Воронеж : Изд-во Воронеж. ун-та, 1980. — 116 с.
6. Афанасьев В. Г. Проблема целостности в философии и биологии / В. Г. Афанасьев. — М. : Мысль, 1964. — 416 с.
7. Барановский В. И. Квантовая механика и квантовая химия / В. И. Барановский. — М. : Академия, 2008. — 384 с.
8. Бейтмен Г. Высшие трансцендентные функции / Г. Бейтмен, А. Эрдейи : В 3 т. — М. : Наука, 1974. — Т. 2. — 296 с.
9. Берштейн И. Я. Спектрофотометрический анализ в органической химии / И. Я. Берштейн, Ю. Л. Каминский. — Л. : Химия, 1986. — 200 с.
10. Блюменфельд Л. А. Решаемые и нерешаемые проблемы биологической физики / Л. А. Блюменфельд. — М. : УРСС., 2002. — 157 с.
11. Браун Т. Химия — в центре наук / Т. Браун, Г.Ю.Лемей : В 2 ч. — М. : Мир, 1983. — Ч. 2. — 520 с.
12. Василенко В. А. Сплайн-функции: теория, алгоритмы, программы / В. А. Василенко. — Новосибирск : Наука, 1983. — 156 с.
13. Васильев Н. Многочлены Чебышева и рекуррентные соотношения / Н.

- Васильев, А. Зелевинский // Квант. — 1982. — № 1. — С. 12–19.
14. Вашанов Г. А. Роль субъединичных контактов в проявлении гемоглобином структурно-функциональных свойств в условиях различного микроокружения : автореферат дис. ... д-ра биол. наук / Г. А. Вашанов. — Воронеж, 2004. — 46 с.
  15. Вейсблут М. Физика гемоглобина / М. Вейсблут // Структура и связь. М. : Мир, 1969. — С. 11–74.
  16. Вовна В. И. Электронная структура органических соединений по данным фотоэлектронной спектроскопии / В. И. Вовна. — М. : Наука, 1991. — 247 с.
  17. Волькенштейн М. В. Биофизика / М. В. Волькенштейн. — 2-е изд., перераб. и доп. — М. : Наука, 1988. — 591 с.
  18. Волькенштейн М. В. Молекулярная биофизика / М. В. Волькенштейн. — М. : Наука, 1975. — 616 с.
  19. Гемоглобин человека в условиях воздействия различных физико-химических агентов / В. Г. Артюхов [и др.]. — Воронеж : ИПЦ Воронеж. гос. ун-та, 2013. — 364 с.
  20. Грей Г. Электроны и химическая связь / Г. Грей. — М. : Мир, 1967. — 233 с.
  21. Гуринович Г. П. Спектроскопия порфиринов / Г. П. Гуринович, А. Н. Севченко, К. Н. Соловьев // Успехи физ. наук. — 1963. — Т. 79, № 2. — С. 173–234.
  22. Давыдова М. Е. Стабильность и каталитические свойства глюкозооксидазы из *Penicillium funiculosum* G-15 / М. Е. Давыдова [и др.]. — Вестн. Моск. ун-та. Сер. : Химия. — 2002. — Т. 43, № 6. — С. 366–370.
  23. Демченко А. П. Ультрафиолетовая спектрофотометрия и структура белков / А. П. Демченко. — Киев : Наук. думка, 1981. — 208 с.
  24. Дзядык В. К. Введение в теорию равномерного приближения функций полиномами / В. К. Дзядык. — М. : Наука, 1977. — 512 с.
  25. Зайдель А. Н. Спектроскопия вакуумного ультрафиолета / А. Н. Зайдель,

- Е. Я. Шрейдер. — М. : Наука, 1967. — 470 с.
26. Зубова Н. Н. Спектральные и физико-химические свойства зеленого (GFP) и красного (drFP583) флуоресцирующих белков / Н. Н. Зубова, А. Ю. Булавина, А. П. Савицкий // Успехи биол. химии. — 2003. — Т. 43. — С. 163–224.
  27. Иржак Л. И. Гемоглобины и их свойства / Л. И. Иржак. — М. : Наука, 1975. — 240 с.
  28. Кантор Ч. Биофизическая химия / Ч. Кантор, П. Шиммел : В 3 т. — М. : Мир, 1984. — Т. 2. — 496 с.
  29. Квантовая механика. Сборник рекомендуемых терминов, вып. 104 / [под ред. Н. П. Клепикова]. — М. : Наука, 1985. — 32 с.
  30. Квантовая электроника. Сборник рекомендуемых терминов, вып. 75 / [под ред. М. Е. Жаботинского]. — М. : Наука, 1968. — 50 с.
  31. Кишкун А. Клиническая лабораторная диагностика / А. Кишкун // М. : ГЭОТАР-Медиа. — 2010.— 976 с.
  32. Клар Э. Полициклические углеводороды / Э. Клар. : в 2 т. — М. : Химия, 1971. — Т. 1. — 442 с.
  33. Кон В. Электронная структура вещества — волновые функции и функционалы плотности / В. Кон // Успехи физических наук. — 2002. — Т. 172, № 3. — С. 336–348.
  34. Конев С. В. Фотобиология / С. В. Конев, И. Д. Волоотовский. — Минск : Изд-во БГУ, 1979. — 384 с.
  35. Конев С. В. Электронно-возбужденные состояния полимеров / С. В. Конев; Лаб. биофизики и изотопов АН БССР. — Минск. : Наука и техника, 1965. — 185 с.
  36. Коржуев П. А. Гемоглобин. Сравнительная физиология и биохимия / П. А. Коржуев. — М. : Наука, 1964. — 288 с.
  37. Корольков Д. В. Основы неорганической химии / Д. В. Корольков — М. : Просвещение, 1982. — 271 с.
  38. Коттон Ф. А. Основы неорганической химии / Ф. А. Коттон, Дж.



Уилкинсон. — М. : Мир, 1979. — 678 с.

39. Кукушкин А. К. Задачи по квантовой химии и строению молекул / А. К. Кукушкин— М. : Изд-во Моск. ун-та, 1987. — 156 с.
40. Курс общей химии / [под ред. Н. В. Коровина]. — М. : Высш. шк., 1990. — 446 с.
41. Лавриненко И. А. Анализ вклада хромофоров боковых групп аминокислот в спектр поглощения гемоглобина / И. А. Лавриненко, Г. А. Вашанов, М. К. Рубан // Журнал прикладной спектроскопии. — 2013. — Т. 80, № 6. — С. 907–913.
42. Ладик Я. Квантовая биохимия для химиков и биологов / Я. Ладик. — М. : Мир, 1975. — 256 с.
43. Лакин Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин. — М. : Высш. школа, 1990. — 351 с.
44. Ландау Л. Д. Квантовая механика (нерелятивистская теория) / Л. Д. Ландау, Е. М. Лифшиц. — М. : Физматлит, 2004. — 800 с.
45. Математический энциклопедический словарь / [под. ред. Ю. В. Прохорова]. — М. : Сов. энциклопедия, 1988. — 847 с.
46. Мейсон С. Ф. Электронные спектры поглощения гетероциклических соединений / С. Ф. Мейсон // Физические методы в химии гетероциклических соединений. — Л. : Химия, 1966. — С. 319–397.
47. Минкин В. И. Теория строения молекул / В. И. Минкин, Б. Я. Симкин, Р. М. Миняев. — Ростов на Дону : «Феникс», 1997 — 560 с.
48. Мосур Е. Ю. Спектрофотометрический метод определения содержания основных производных гемоглобина : дис. ... канд. физ.-мат. наук / Е. Ю. Мосур. — Омск, 2007. — 118 с.
49. Неврюева Н. В. Определение некоторых биологически-активных веществ, основанное на эффекте сенсibilизированной флуоресценции в организованных средах : автореф. дис. ... канд. хим. наук / Н. В. Неврюева. — М., 2008. — 22 с.
50. Оганесян Э. Т. Химия: Краткий словарь / Э. Т. Оганесян. — Ростов на Дону : «Феникс», 2002. — 512 с.

51. Олигомерные белки: структурно-функциональные модификации и роль субъединичных контактов / В. Г. Артюхов [и др.]. — Воронеж : Изд-во Воронеж. ун-та, 1997. — 264 с.
52. Основы биохимии /А. Уайт [и др.]. : в 3 т. — М. : Мир, 1981. — Т. 1. — 535 с.
53. Пчелинцев Н. А. Новый метод спектрофотометрического определения каталитической активности поперечно сшитых агрегатов пенициллинацилазы / Н. А. Пчелинцев, М. И. Юшко, В. К. Швядас // Биохимия. — 2006. — Т. 71, №. 3. — С. 396–401.
54. Рабек Я. Экспериментальные методы в химии полимеров / Я. Рабек. : в 2 ч. — М. : Мир, 1983. — Ч. 1. — 384 с.
55. Рифкинд Д. М. Гемоглобин и миоглобин / Д. М. Рифкинд // Неорганическая биохимия / [под ред. Г. Эйхгорна]. : В 2 т. — М. : Мир, 1978. — Т. 2. — С. 256–338.
56. Роженко А. И. Теория и алгоритмы вариационной сплайн-аппроксимации : дис. ... д-ра физ.-мат. наук / А. И. Роженко. — Новосибирск, 2003. — 231 с.
57. Рубан М. К. Структурно-функциональные модификации нитрозилированного гемоглобина, индуцированные оксигенацией / М. К. Рубан, Г. А. Вашанов, И. А. Лавриненко // Вестн. Воронежского гос. ун-та. Сер. : Химия. Биология. Фармация. — 2010. — № 1. — С. 56–61.
58. Соловьев К. Н. Спектроскопия порфиринов: колебательные состояния / К. Н. Соловьев [и др.]. — Минск : Наука и техника, 1985. — 415 с.
59. Сравнительный квантовохимический анализ электронной структуры валентных областей кластерных моделей активных центров цитохромов f и c / Т. А. Романова [и др.]. // Журнал структурной химии. — 2004. — Т. 45, № 2. — С. 199–206.
60. Страйер Л. Биохимия / Л. Страйер : в 3 т. — М. : Мир, 1984. — Т. 1. — 232 с.
61. Стусь Л. К. Осцилляция форм гемоглобина в процессе хранения крови / Л. К. Стусь, Е. Д. Розанова // Биофизика. — 1992. — Т. 37, вып. 2. — С. 387–

388.

62. Успехи органической химии / [под ред. И. Л. Кнунянца] : в 5 т. — М. : Мир, 1968. — Т. 1. — 316 с.
63. Физическая оптика. Сборник рекомендуемых терминов, вып. 79 / [под ред. Ф. А. Королева]. — М. : Наука, 1970. — 51 с.
64. Финкельштейн А. В. Физика белка: Курс лекций с цветными и стереоскопическими иллюстрациями / А. В. Финкельштейн, О. Б. Птицын. — М. : Книжный Дом «Университет», 2002. — 491 с.
65. Фирма «Синтакон». — URL: <http://www.syntacon.spb.ru/> (дата обращения: 23.01.2014).
66. Фудзинага С. Метод молекулярных орбиталей / С. Фудзинага. — М. : Мир, 1983. — 462 с.
67. Хованский А. Г. Полиномы Чебышёва и их обращения / А. Г. Хованский // Математическое просвещение. — 2013. — № 17. — С. 93–106.
68. Чарный А. М. Патопфизиология гипоксических состояний / А. М. Чарный. — М. : Медгиз. — 1961. — 343 с.
69. Электронная спектроскопия / К. Зигбан [и др.]. — М. : Мир, 1971. — 493 с.
70. Abramson J. The structure of the ubiquinol oxidase from *Escherichia coli* and its ubiquinone binding site / J. Abramson [et al.]. // Nature Structural & Molecular Biology. — 2000. — Vol. 7, N 10. — P. 910–917.
71. Aloy P. Structural systems biology: modelling protein interactions / P. Aloy, R. B. Russell // Nature Reviews Molecular Cell Biology. — 2006. — Vol. 7, N 3. — P. 188–197.
72. Ankner J. F. Neutron scattering techniques and applications in structural biology / J. F. Ankner [et al.]. // Current Protocols in Protein Science. — 2013. — P. 1716.1–1716.34.
73. Argos P. A sequence motif in many polymerases / P. Argos // Nucleic Acids Research. — 1988. — Vol. 16, N 21. — P. 9909–9916.
74. Arnold K. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling / K. Arnold [et al.]. // Bioinformatics. —

2006. — Vol. 22, N 2. — P. 195–201.
75. Baker D. Protein structure prediction and structural genomics / D. Baker, A. Sali // *Science*. — 2001. — Vol. 294, N 5540. — P. 93–96.
76. Berova N. Circular dichroism: Principles and applications / N. Berova, K. Nakanishi, R. W. Woody. — New York: Wiley-VCH, 2000. — 912 p.
77. Bookchin R. M. Structure of hemoglobin A<sub>1c</sub>: Nature of the N-terminal  $\beta$  chain blocking group / R. M. Bookchin, P. M. Gallop // *Biochemical and biophysical research communications*. — 1968. — Vol. 32, N 1. — P. 86–93.
78. Brooks C. L. *Advances in Chemical Physics, Proteins: A Theoretical Perspective of Dynamics, Structure, and Thermodynamics* / C. L. Brooks, M. Karplus, B. M. Pettitt. — New York: John Wiley & Sons, 1990. — Vol. 71. — 259 p.
79. Butler P. H. *Point group symmetry applications: methods and tables*/ P. H. Butler. — Berlin Heidelberg : Springer Science & Business Media, 2012. — 576 p.
80. Carrion-Vazquez M. Mechanical design of proteins studied by single-molecule force spectroscopy and protein engineering / M. Carrion-Vazquez [et al.]. // *Progress in biophysics and molecular biology*. — 2000. — Vol. 74, N 1. — P. 63–91.
81. Cassoly R. Conformation, co-operativity and ligand binding in human hemoglobin / R. Cassoly, Q. H. Gibson // *J. Mol. Biol.* — 1975. — Vol. 91. — P. 301–313.
82. Chapman H. N. Femtosecond X-ray protein nanocrystallography / H. N. Chapman [et al.]. // *Nature*. — 2010. — Vol. 470. — P. 73–77.
83. Chi E. Y. Physical stability of proteins in aqueous solution: mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation / E. Y. Chi [et al.]. // *Pharmaceutical research*. — 2003. — Vol. 20, N 9. — P. 1325–1336.
84. Congreve M. Keynote review: Structural biology and drug discovery / M. Congreve, C. W. Murray, T. L. Blundell // *Drug discovery today*. — 2005. — Vol. 10, N. 13. — P. 895–907.

85. Cordone L. Optical absorption spectra of deoxy- and oxyhemoglobin in the temperature range 300—20 K: Relation with protein dynamics / L. Cordone [et al.]. // *Biophysical Chemistry*. — 1986. — Vol. 24, N 3. — P. 259–275.
86. Coulter C. B. The structure of the ultraviolet absorption spectra of certain proteins and amino acids / C. B. Coulter, F. M. Stone, E. A. Kabat // *J. Gen. Physiol.* — 1936. — Vol. 19, N 5. — P. 739–752.
87. Csizmadia I. G. Non-empirical LCAO-MO-SCF-CI calculations on organic molecules with Gaussian type functions / I. G. Csizmadia, M. C. Harrison, B. T. Sutcliffe // *Theoretica chimica acta*. — 1966. — Vol. 6, N 3. — P. 217–239.
88. Drabkin D. L. Spectrophotometric studies: I. Spectrophotometric constants for common hemoglobin derivatives in human, dog, and rabbit blood / D. L. Drabkin, J. H. Austin // *J. Biol. Chem.* — 1932. — Vol. 98. — P. 719–733.
89. Dudik J. M. UV resonance Raman studies of acetone, acetamide, and N-methylacetamide: models for the peptide bond / J. M. Dudik, C. R. Johnson, S. A. Asher // *The Journal of Physical Chemistry*. — 1985. — Vol. 89, N 18. — P. 3805–3814.
90. Edelhoch H. Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins / H. Edelhoch // *Biochemistry*. — 1967. — Vol. 6, N 7. — P. 1948–1954.
91. Fan J. S. Solution structure and dynamics of human hemoglobin in the carbonmonoxy form / J. S. Fan [et al.]. // *Biochemistry*. — 2013. — Vol. 52, N 34. — P. 5809–5820.
92. Flurry R. L. *Symmetry Groups : Theory and Chemical Applications* / R. L. Flurry. — Upper Saddle River, New Jersey : Prentice-Hall, 1980. — 384 p.
93. Formamide as the model compound for photodissociation studies of the peptide bond / M. Eckert-Maksić [et al.]. // *Kinetics and Dynamics*. — Springer Netherlands, 2010. — P. 77–106.
94. Frishman D. Knowledge-based protein secondary structure assignment / D. Frishman, P. Argos // *Proteins: structure, function, and genetics*. — 1995. — Vol. 23, N 4. — P. 566–579.
95. García S. V. *Dynamics of Soft Matter* / S. V. García, S. H. Chen (ed.), Alba- C.

- Simionesco. — Berlin Heidelberg : Springer, 2012. — 450 p.
96. Garnier J. Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins / J. Garnier, D. J. Osguthorpe, B. Robson // *Journal of molecular biology*. — 1978. — Vol. 120, N 1. — P. 97–120.
  97. Goldstein R. A. Protein tertiary structure recognition using optimized Hamiltonians with local interactions / R. A. Goldstein, Z. A. Luthey-Schulten, P. G. Wolynes // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 1992. — Vol. 89, N 19. — P. 9029–9033.
  98. Gouterman M. Spectra of porphyrins / M. Gouterman // *Journal of Molecular Spectroscopy*. — 1961. — Vol. 6. — P. 138–163.
  99. Gratzer W. B. Ultraviolet absorption spectra of polypeptides. — In: *Poly- $\alpha$ -amino acids* / W. B. Gratzer W. B. — New York.: Marcel Dekker, 1967. — P. — 177–238.
  100. Greenfield N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure / N. J. Greenfield // *Nature protocols*. — 2006. — Vol. 1, N 6. — P. 2876–2890.
  101. Gross E. K. U. Density functional theory / E. K. U. Gross, R. M. Dreizler (ed.). — Berlin Heidelberg : Springer Science & Business Media, 2013. — 676 p.
  102. Hatada K. NMR Spectroscopy of Polymers / K. Hatada, T. Kitayama. — Berlin Heidelberg : Springer, 2004. — 228 p.
  103. Haynie D. T. Superdomains in the protein structure hierarchy: The case of PTP - C2 / D. T. Haynie, B. Xue // *Protein Science*. — 2015. — Vol. 24, N 5. — P. 874–882.
  104. Henrick K. PQS: a protein quaternary structure file server / K. Henrick, J. M. Thornton // *Trends in biochemical sciences*. — 1998. — Vol. 23, N 9. — P. 358–361.
  105. Hodgman T. C. The elucidation of protein function by sequence motif analysis / T. C. Hodgman // *Computer applications in the biosciences: CABIOS*. — 1989. — Vol. 5, N 1. — P. 1–13.

106. Hooper A. B. Heme P460 of hydroxylamine oxidoreductase of *Nitrosomonas* / A. B. Hooper [et al.]. // European Journal of Biochemistry. — 1983. — Vol. 134, N 1. — P. 83–87.
107. Ishizawa F. A Study on the Spectrophotometric Determination of Carboxyhemoglobin in Blood — Isobestic Point Method. / F. Ishizawa // Jap. J. legal Med. — 1981. — Vol. 35, N 3. — P. 191–200.
108. Janin J. Protein–protein interaction and quaternary structure / J. Janin, R. P. Bahadur, P. Chakrabarti // Quarterly reviews of biophysics. — 2008. — Vol. 41, N 02. — P. 133–180.
109. Jones D. T. A new approach to protein fold recognition / D. T. Jones, W. R. Taylor, J. M. Thornton // Nature. — 1992. — Vol. 358. — P. 86–89.
110. Jones D. T. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices / D. T. Jones // Journal of molecular biology. — 1999. — Vol. 292, N 2. — P. 195–202.
111. Kadish K. M. Handbook of porphyrin science: With Applications to Chemistry, Physics, Materials Science, Engineering, Biology and Medicine:: Supramolecular Chemistry / K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guilard : In 35 Vol. — Singapore : World Scientific, 2010. — Vol. 1. — 600 p.
112. Kadish K. M. Handbook of porphyrin science: With Applications to Chemistry, Physics, Materials Science, Engineering, Biology and Medicine: Synthesis and Coordination Chemistry / K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guilard : In 35 Vol. — Singapore : World Scientific, 2010. — Vol. 2. — 408 p.
113. Kadish K. M. Handbook of porphyrin science: With Applications to Chemistry, Physics, Materials Science, Engineering, Biology and Medicine: Synthetic Methodology / K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guilard : In 35 Vol. — Singapore : World Scientific, 2010. — Vol. 3. — 576 p.
114. Kadish K. M. Handbook of porphyrin science: With Applications to Chemistry, Physics, Materials Science, Engineering, Biology and Medicine: Phototherapy, Radioimmunotherapy and Imaging / K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guilard : In 35 Vol. — Singapore : World Scientific, 2010. — Vol. 4. — 488 p.

115. Kadish K. M. Handbook of porphyrin science: With Applications to Chemistry, Physics, Materials Science, Engineering, Biology and Medicine: Heme Proteins / K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guilard : In 35 Vol. — Singapore : World Scientific, 2010. — Vol. 5. — 368 p.
116. Karplus M. How does a protein fold? / M. Karplus // Nature. — 1994. — Vol. 369. — P. 248–251.
117. Kelley W. L. Protein sequence motif / W. L. Kelley, S. J. Landry // Virology. — 1993. — Vol. 61. — P. 405–410.
118. Klotz I. M. Quaternary structure of proteins / I. M. Klotz, N. R. Langebman, D. W. Dahnall // Annual review of biochemistry. — 1970. — Vol. 39, N 1. — P. 25–62.
119. Kraus P. M. Observation of laser-induced electronic structure in oriented polyatomic molecules / P. M. Kraus [et al.]. // Nature communications. — 2015. — Vol. 6. — P. 1–8.
120. Kuhlman B. Design of a novel globular protein fold with atomic-level accuracy / B. Kuhlman [et al.]. // Science. — 2003. — Vol. 302, N 5649. — P. 1364–1368.
121. Kuntz I. D. Calculation of protein tertiary structure / I. D. Kuntz [et al.]. // Journal of molecular biology. — 1976. — Vol. 106, N 4. — P. 983–994.
122. Ladik J. Energy Band Structure of Proteins / J. Ladik // Nature. — 1964. — Vol. 202. — P. 1208–1209.
123. Lazaridis T. Thermodynamics of protein folding: a microscopic view/ T. Lazaridis, M. Karplus // Biophysical chemistry. — 2002. — Vol. 100, N 1. — P. 367–395.
124. McQuarrie D. A. Physical chemistry: a molecular approach / D. A. McQuarrie, J. D. Simon. — Sausalito, CA : University science books, 1997. — 1360 p.
125. Metzker M. L. Sequencing technologies — the next generation / M. L. Metzker. — Nature Reviews. Genetics. — 2010. — Vol. 11, N 1. — P. 31–46.
126. Michel B. Spectroscopic analysis of the interaction between cytochrome c and cytochrome c oxidase / B. Michel, H. R. Bosshard // J. Biol. Chem. — 1984. — Vol. 259, N 16. — P. 10085–10091.



127. Mono J. On the nature of allosteric transition: a plausible mode / J. Mono, J. Wyman, J. P. Changeux // *J. Mol. Biol.* — 1965. — Vol. 12, N 1. — P. 88–118.
128. Mulliken R. S. Electronic population analysis on LCAO–MO molecular wave functions. I / R. S. Mulliken // *The Journal of Chemical Physics.* — 1955. — Vol. 23, N 10. — P. 1833–1840.
129. Nakano H. Change in the UV-VIS Absorbance of Amino Acids as a Result of Femtosecond Laser Irradiation / H. Nakano [et al.]. // *Journal of Laser Micro/Nanoengineering.* — 2007. — Vol. 2, N. 1. — P. 100–102.
130. Noble J. E. Quantitation of protein / J. E. Noble, M. J. A. Bailey // *Methods in enzymology.* — 2009. — Vol. 463. — P. 73–95.
131. Oie T. Quantum chemical studies of a model for peptide bond formation: formation of formamide and water from ammonia and formic acid / T. Oie [et al.]. // *Journal of the American Chemical Society.* — 1982. — Vol. 104, N 23. — P. 6169–6174.
132. Parson W. W. *Modern Optical Spectroscopy, With Exercises and Examples from Biophysics and Biochemistry* / W. W. Parson. — Berlin Heidelberg : Springer, 2009 — 530 p.
133. Paul K. G. The splitting with silver salts of the cysteine-porphyrin bonds in cytochrome c / K. G. Paul [et al.]. // *Acta chem. scand.* — 1950. — Vol. 4. — P. 239–244.
134. Perrakis A. Automated protein model building combined with iterative structure refinement / A. Perrakis, R. Morris, V. S. Lamzin // *Nature Structural & Molecular Biology.* — 1999. — Vol. 6, N 5. — P. 458–463.
135. Perutz M. F. Identification of residues responsible for the alkaline Bohr effect in haemoglobin / M. F. Perutz [et al.]. // *Nature.* — 1969. — Vol. 222, N 5200. — P. 1240–1243.
136. Perutz M. F. Mechanism of denaturation of haemoglobin by alkali / M. F. Perutz // *J. Mol. Biol.* — 1965. — Vol. 13. — P. 646.
137. Perutz M. F. Regulation of oxygen affinity of haemoglobin: influence of structure of the globin on the haem-iron / M. F. Perutz // *Ann. Rev. Biochem.* —

1979. — Vol. 48. — P. 327–386.
138. Perutz M. F. Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin / M. F. Perutz // *Nature*. — 1970. — Vol. 228, N 5273. — P. 726–734.
139. Perutz M. F. Structure of haemoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5.5-Å. resolution, obtained by X-ray analysis / M. F. Perutz [et al.]. // *Nature*. — 1960. — Vol. 185. — P. 416–422.
140. Philipp D. M. Mixed ab initio QM/MM modeling using frozen orbitals and tests with alanine dipeptide and tetrapeptide / D. M. Philipp, R. A. Friesner // *Journal of computational chemistry*. — 1999. — Vol. 20, N. 14. — P. 1468–1494.
141. Pople J. A. Molecular orbital theory of the electronic structure of organic compounds. I. Substituent effects and dipole moments / J. A. Pople, M. Gordon // *Journal of the American Chemical Society*. — 1967. — Vol. 89, N 17. — P. 4253–4261.
142. Qian N. Predicting the secondary structure of globular proteins using neural network models / N. Qian, T. J. Sejnowski // *Journal of molecular biology*. — 1988. — Vol. 202, N 4. — P. 865–884.
143. Qin W. Spectrophotometric Studies on the Interaction of Carboxyazo I-Tb (III) Complex with Protein and Its Application / W. Qin [et al.]. // *Chinese Journal of Analytical Chemistry*. — 2005. — Vol. 33, N 8. — P. 1175–1178
144. RCSB Protein Data Bank. — URL: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> (дата обращения: 04.10.2014).
145. Richards F. M. Identification of structural motifs from protein coordinate data: Secondary structure and first-level supersecondary structure / F. M. Richards, C. E. Kundrot // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. — 1988. — Vol. 3, N 2. — P. 71–84.
146. Rosenheck K. The far ultraviolet absorption spectra of polypeptide and protein solutions and their dependence on conformation / K. Rosenheck, P. Doty // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 1961. — Vol. 47, N 11. — P. 1775–1785.
147. Russell R. B. Multiple protein sequence alignment from tertiary structure

- comparison: assignment of global and residue confidence levels / R. B. Russell, G. J. Barton // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. — 1992. — Vol. 14, N 2. — P. 309–323.
148. Savitzky A. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures / A. Savitzky, M. J. E. Golay // *Analytical chemistry*. — 1964. — Vol. 36, N 8. — P. 1627–1639.
149. Schläfer H. L. Basic principles of ligand field theory / H. L. Schläfer, G. Gliemann. — London, New York : John Wiley & Sons, 1969. — 535 p.
150. Schuler B. Single-molecule spectroscopy of protein folding dynamics — expanding scope and timescales / B. Schuler, H. Hofmann // *Current opinion in structural biology*. — 2013. — Vol. 23, N 1. — P. 36–47.
151. SCOP: Structural Classification of Proteins. — URL: <http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/> (дата обращения: 04.09.2014).
152. Shepherd M. A new class of [2Fe-2S]-cluster-containing protoporphyrin (IX) ferrochelatases / M. Shepherd, T. Dailey, H. Dailey // *Biochem. J.* — 2006. — Vol. 397. — P. 47–52.
153. Singer K. Studies on Abnormal Hemoglobins / K. Singer, A. I. Chernoff, L. Singer // *Blood*. — 1951. — V. 6, N. 5. — P. 413–428.
154. Skoog D. Fundamentals of analytical chemistry / D. Skoog [et al.]. — Belmont: Brooks/Cole Cengage Learning, 2013. — 1072 p.
155. Sreerama N. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set / N. Sreerama, R. W. Woody // *Analytical biochemistry*. — 2000. — Vol. 287, N 2. — P. 252–260.
156. Steinbrecher T. QM and QM/MM simulations of proteins / T. Steinbrecher, M. Elstner // *Biomolecular Simulations*. — Humana Press, 2013. — P. 91–124.
157. Stranneby D. Digital signal processing and applications / D. Stranneby, W. Walker. — Oxford: Elsevier, 2004. — 368 p.
158. Structural Classification of Proteins 2. — URL: <http://scop2.mrc-lmb.cam.ac.uk/> (дата обращения: 05.09.2014).

159. Suard M. Sur les états électroniques des protéines / M. Suard, G. Berthier, B. Pullman // *Biochimica et biophysica acta*. — 1961. — Vol. 52, N 2. — P. 254–265.
160. Suzuki S. Metal coordination and mechanism of multicopper nitrite reductase / S. Suzuki, K. Kataoka, K. Yamaguchi // *Accounts of chemical research*. — 2000. — Vol. 33, N 10. — P. 728–735.
161. Svergun D. I. Determination of domain structure of proteins from X-ray solution scattering / D. I. Svergun, M. V. Petoukhov, M. H. J. Koch // *Biophysical J*. — 2001. — Vol. 80, N 6. — P. 2946–2953.
162. Taylor W. R. Protein structural domain identification / W. R. Taylor // *Protein Engineering*. — 1999. — Vol. 12, N 3. — P. 203–216.
163. Tsai C. S. Biomacromolecules: Introduction to structure, function and informatics / C. S. Tsai. — New Jersey : Wiley-Liss, 2006. — 768 p.
164. Tsukihara T. The low-spin heme of cytochrome c oxidase as the driving element of the proton-pumping process / T. Tsukihara [et al.]. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2003. — Vol. 100, N 26. — P. 15304–15309.
165. Universal Protein Resource (UniProt). — URL: <http://www.uniprot.org/> (дата обращения: 12.02.2014).
166. Wang J. H. Synthetic biochemical models / J. H. Wang // *Accounts of Chemical Research*. — 1970. — Vol. 3, N 3. — P. 90–97.
167. Weber C. Spectroscopic analysis of the cytochrome c oxidase-cytochrome c complex: circular dichroism and magnetic circular dichroism measurements reveal change of cytochrome c heme geometry imposed by complex formation / C. Weber, B. Michel, H. R. Bosshard // *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. — 1987. — Vol. 84, N 19. — P. 6687–6691.
168. Wieland T. The world of peptides: a brief history of peptide chemistry / T. Wieland, M. Bodanszky. — Berlin Heidelberg : Springer Science & Business Media, 2012 — 298 p.
169. Yasuhide S. Siroheme as an active catalyst in sulfite reduction / S. Yasuhide, N. Sogawa, M. Ishimoto // *Journal of biochemistry*. — 1981. — Vol. 90, N 5. — P.

- 1487–1492.
170. Zijlstra W. G. Absorption spectra of human fetal and adult oxyhemoglobin, deoxyhemoglobin, carboxyhemoglobin, and methemoglobin / W. G. Zijlstra, A. Buursma, W. P. Meeuwssen-Van der Roest // *Clinical chemistry*. — 1991. — Vol. 37, N 9. — P. 1633–1638.
171. Zijlstra W. G. Visible and near infrared absorption spectra of human and animal haemoglobin: determination and application / W. G. Zijlstra, A. Buursma, O. W. van Assendelft (ed.). — Utrecht: VSP Publishing, 2000. — 368 p.
172. Zwart A. Recommendations for reference method for haemoglobinometry in human blood (ICSH standard 1995) and specifications for international haemoglobinocyanide standard (4th edition) / A. Zwart [et al.]. // *J. Clin. Pathol.* — 1996. — Vol. 49, N 4. — P. 271–274.