

12. А. И. Лебедева, И. В. Новожилова, Изв. АН АрмССР, 15, 423, 1962.  
 13. В. П. Попов, Диссертация, 1971.  
 14. В. П. Попов, Р. М. Воропаева, А. Г. Иванова, Пласт. массы, 1969, № 12, 8.  
 15. G. Montanto, R. Passerini, Boll. Sci. Fac. chim. industr., Bologna, 24, 3, 1966.

УДК 541.64 : 547(21+962) : 539.2

## ВЛИЯНИЕ УГЛЕВОДОРОДОВ НА СТРУКТУРУ И СВОЙСТВА $\gamma$ -ГЛОБУЛИНА

*А. В. Волынская, В. А. Пчелин, К. С. Соловьева,  
В. Н. Измайлова, Г. П. Ямпольская*

Влияние органических соединений на молекулы белков в водных растворах определяется в основном тремя факторами: концентрацией органических молекул, длиной цепи их неполярной части и природой гидрофильной группы, причем осуществляется это влияние может как через непосредственное связывание органических молекул молекулами белка, так и путем изменения свойств воды как растворителя в присутствии малополярных веществ. При низких концентрациях органического вещества, когда его влияние на структуру воды невелико, эффект связывания преобладает над эффектом растворителя. Связывание в таких условиях не вызывает заметных конформационных изменений и даже способствует укреплению нативной белковой структуры [1–6]. При больших концентрациях органического вещества преобладает эффект растворителя, причем, чем длиннее углеводородная цепь, тем меньше концентрация, при которой проявляется эффект растворителя [7–9]. Изменение растворителя от полярного к неполярному приводит к ослаблению гидрофобных взаимодействий, поддерживающих компактную глобулярную структуру, вследствие чего понижается устойчивость нативной конформации белка к денатурации [10–12], происходит частичная или полная дезорганизация белковой глобулы [13, 14].

В настоящее время по рассматриваемому вопросу имеется обширный экспериментальный материал, однако в литературе нет достаточно четких представлений о природе изменений в структуре белка, вызываемых различными органическими веществами.

В данной работе исследовали влияние углеводородов (наиболее простого класса органических соединений) на структуру и свойства  $\gamma$ -глобулина человека.

### Экспериментальная часть

$\gamma$ -Глобулин – препарат, выделенный из донорской плазмы в Центральном институте гематологии и переливания крови. Чистоту углеводородов – бензола, гептана, декана и тетрадекана контролировали по величине показателя преломления.

$\gamma$ -Глобулин растворяли в 0,1 M NaCl. Нерастворившиеся примеси отделяли центрифугированием.

Для характеристики конформационного состояния белка использовали методы вискозиметрии и спектрополяриметрии. Вязкость растворов измеряли в термостатируемых капиллярных вискозиметрах типа Уббелоде с временами истечения  $\sim 200$  сек. Измерения дисперсии оптического вращения проводили на спектрополяриметре «JASCO» в кюветах 0,1 дм в области 290–550 нм. По уравнению Морфита

$$[\eta^*]_x = a_0 \frac{\lambda_0^2}{\lambda^2 - \lambda_0^2} + b_0 \frac{\lambda_0^4}{(\lambda^2 - \lambda_0^2)^2} \quad [15]$$

расчитывали коэффициенты  $a_0$  и  $b_0$ .

Влияние углеводородов на термическую денатурацию  $\gamma$ -глобулина (боратный буфер, pH 9,2) изучали методом оптического вращения и спектрофотометрически. Оптическое вращение измеряли на поляриметре «Zeiss» в кювете 2 дм при  $\lambda = 546$  нм. Спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре СФ-4 в термостатируемой кювете 0,1 дм при  $\lambda = 280$  нм.

Растворы белка насыщали углеводородами в делительных воронках в течение 7 час. при комнатной температуре. В кювете для измерения раствор белка со слоем углеводорода (во избежание десолюбилизации) выдерживали 30 мин. при температуре опыта.

### Результаты и их обсуждение

Как видно из рис. 1, вязкость растворов  $\gamma$ -глобулина не меняется после насыщения их бензолом. Не изменяются в этих условиях и коэффициенты  $a_0$  и  $b_0$  уравнения Моффита ( $a_0 = -280$ ,  $b_0 = -30$ ). Эти результаты согласуются с полученными ранее для других белков [1]. Таким образом,

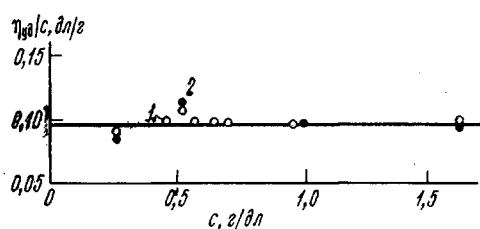


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость  $\eta_{ud}/c$  растворов  $\gamma$ -глобулина до (1) и после насыщения бензолом (2) от концентрации белка

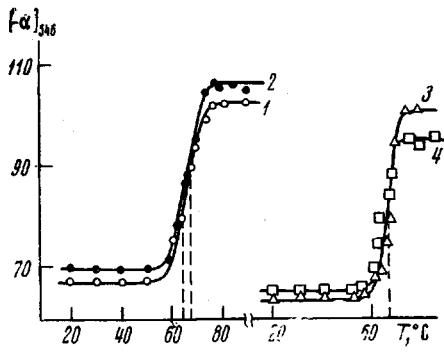


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость удельного оптического вращения растворов  $\gamma$ -глобулина от температуры: без углеводорода (1), с гептаном (2), с деканом (3) и с тетрадеканом (4)

можно заключить, что углеводороды не вызывают заметных изменений в структуре белка. Это не удивительно, поскольку растворимость углеводородов в воде слишком мала, чтобы изменить ее свойства. Кроме того, отсутствуют заряженные группы, которые иногда являются причиной развертывания молекул белков.

$\gamma$ -Глобулин относится к белкам, у которых дисульфидные связи соединяют близкие участки полипептидных цепей и не создают жесткий структурный каркас молекулы. Отличительной чертой таких белков является наличие резкого плавления структуры при повышении температуры. На рис. 2 представлено изменение удельной оптической активности растворов  $\gamma$ -глобулина без добавок углеводородов, а также в присутствии гептана, декана и тетрадекана в зависимости от температуры. Температура денатурации для  $\gamma$ -глобулина без углеводородов равна  $63^\circ$ , в присутствии гептана —  $67^\circ$ , декана и тетрадекана —  $66^\circ$ . Таким образом, углеводороды повышают температуру денатурации на 3–4°.

При спектрофотометрическом изучении тепловой денатурации обнаружено, что в присутствии гептана плавление структуры начинается на 4–5° выше, чем у чистого белка. Подобное явление наблюдалось и для других глобулярных белков [1].

### Влияние углеводородов на тепловую денатурацию $\gamma$ -глобулина

$\gamma$ -Глобулин без добавок		Гептан		Декан		Тетрадекан	
Т. пл., °C	$\Delta H$ , ккал/моль	Т. пл., °C	$\Delta H$ , ккал/моль	Т. пл., °C	$\Delta H$ , ккал/моль	Т. пл., °C	$\Delta H$ , ккал/моль
63 *	55 *	67 *	65 *	66	57	66	57
55 *	34 *	60 *	44 *	—	—	—	—

\* Спектрофотометрические измерения.

По уравнению [10, 16]

$$\Delta H = -Rd \ln K'/d(T^{-1}),$$

где  $K' = y/(1-y)$ ,  $y = \Delta[\alpha]/\Delta[\alpha]_{\max}$  или  $y = \Delta(E_{1\text{ см}}^{1\%})/\Delta(E_{1\text{ см}}^{1\%})_{\max}$  была вычислена теплота денатурации. Здесь  $\Delta[\alpha]$ , и  $\Delta(E)$  — инкремент удельного оптического вращения или оптической плотности, отсчитанный от исходного значения,  $\Delta[\alpha]_{\max}$  и  $\Delta(E)_{\max}$  — максимальный инкремент, соответствующий завершению перехода. Найденные таким образом величины  $\Delta H$  показывают, что углеводороды приводят к повышению устойчивости нативной глобулярной конформации белка к тепловой денатурации. При этом гептан увеличивает теплоту денатурации на 10 ккал/моль, декан и тетрадекан — на 2 ккал/моль (таблица).

Эти данные хорошо коррелируют с полученными результатами по связыванию различных углеводородов  $\gamma$ -глобулином [17]. Как было показано, декан и тетрадекан при связывании заполняют одну гидрофобную область емкостью  $8000 \text{ \AA}^3$ . Гептан же, кроме этой большой гидрофобной области, занимает еще 20 малых ( $\sim 300 \text{ \AA}^3$ ). Таким образом, повышение устойчивости нативной структуры к денатурации находится в прямой зависимости от степени заполнения глобулы углеводородом. Итак, связывание углеводородов белком не только не изменяет заметно его структуру, но и способствует ее укреплению.

Увеличение стабильности глобулы при связывании неполярных молекул можно объяснить следующим образом: при поглощении молекул углеводородов «внутренность» глобулы становится более гидрофобной, что должно привести к повышению устойчивости вторичных структур, поддерживаемых в основном водородными связями. Кроме того, если гидрофобные области, являющиеся местами связывания углеводородов [17], представляют собой не плотные ассоциаты неполярных аминокислотных остатков, а рыхлые, со свободными пространствами между цепями, то заполнение таких областей, по-видимому, не потребует никаких структурных перестроек и приведет к появлению дополнительных ван-дер-ваальсовых контактов. Подобные гидрофобные структуры могут быть следствием компромисса между стремлением неполярных остатков контактировать друг с другом и жесткостью молекулярного каркаса, который создается упорядоченными вторичными структурами, дисульфидными связями, взаимодействиями заряженных групп и др. Предполагаемая структура гидрофобных областей хорошо согласуется с результатами связывания неполярных молекул: отсутствием конформационных изменений, уплотнением глобул, повышением их устойчивости к различным денатурационным воздействиям [17]. Похожие соображения о структуре гидрофобных областей высказаны в недавно опубликованной работе Вишни [18].

Московский государственный  
университет им. М. В. Ломоносова

Поступила в редакцию  
31 I 1972

#### ЛИТЕРАТУРА

1. В. Н. Измайлова, Диссертация, 1971; В. Н. Измайлова, В. А. Пчелин, Л. В. Митюхина, Докл. АН СССР, **149**, 888, 1963.
2. R. M. Rosenberg, N. L. Crespi, J. J. Katz, Biochim. et biophys. acta, **175**, 31, 1969.
3. R. W. Cowgill, Biochim. et biophys. acta, **168**, 439, 1968.
4. В. Н. Витвицкий. Молек. биол., **3**, 678, 1969.
5. A. H. A. van der Oord, J. J. Wessdorp, Еurop. J. Biochem., **8**, 263, 1969.
6. С. Е. Бреслер, Е. А. Глазунов, А. Г. Попов, А. Г. Суходолова, Биохимия, **34**, 969, 1969.
7. T. T. Herscowitz, H. J. Jalliet, Science, **163**, 282, 652, 1969.
8. Е. А. Ануфриева, М. Ф. Волькенштейн, М. Г. Краковяк, Г. В. Шевелева, Докл. АН СССР, **186**, 834, 1969.
9. T. T. Herscowitz, B. Gadegbeku, H. Jalliet, J. Biol. Chem., **245**, 2588, 1970.

10. J. Hermans, H. A. Scheraga, J. Amer. Chem. Soc., 83, 3283, 1961.
11. E. Srier, L. Mackey, J. Phys. Chem., 72, 733, 1968.
12. J. Schnell, Arch. Biochem. and Biophys., 127, 496, 1968.
13. A. Ray, J. A. Reynolds, H. Tolet, J. Steinhardt, Biochemistry, 5, 2606, 1966.
14. J. Reynolds, S. Herbert, J. Steinhardt, Biochemistry, 7, 1357, 1968.
15. Новейшие методы исследования полимеров. «Мир», 1966, стр. 95.
16. С. Я. Френкель, В. П. Кундер, Биохимия, 28, 535, 1963.
17. А. В. Волынская, Диссертация, 1970; А. В. Волынская, В. Н. Измайлова, В. А. Пчелиц, Г. П. Ямпольская, Высокомолек. соед., A11, 2509, 1969.
18. A. Wishnia, Biochemistry, 8, 5070, 1969.

УДК 541.64 : 547.462

## ДОНОРНО-АКЦЕПТОРНЫЕ КОМПЛЕКСЫ МАЛЕИНОВОГО АНГИДРИДА С N-ВИНИЛЬНЫМИ МОНОМЕРАМИ В РЕАКЦИЯХ РАДИКАЛЬНОЙ ПОЛИМЕРИЗАЦИИ

*А. Ф. Николаев, В. М. Бондаренко, Н. К. Шакалова*

Донорно-акцепторные комплексы, образованные электронодонорными и электроноакцепторными мономерами, привлекают в последнее время внимание исследователей в связи с их специфическим влиянием на энергетические и статические параметры процессов свободно-радикальной полимеризации [1].

В данной работе исследовано комплексообразование между малеиновым ангидридом (МА) и некоторыми N-винильными мономерами (N-ваниллипирролидоном (ВП), N-венилсукининимидом (ВСИ) и N-венилфталимидом (ВФИ)) и закономерности их реакции сополимеризации.

Данные мономеры относятся к классу *n*-доноров, что обуславливает относительную стабильность комплексов с их участием, поскольку действие *n*-доноров локализовано при одном атоме в противоположность *π*-донорам. Следовательно, в этом случае появляется возможность наблюдать эффект увеличения силы донорно-акцепторного взаимодействия и его роль при реакциях сополимеризации.

Независимо от состава исходной смеси МА и N-винильного мономера, процесс сополимеризации протекает с образованием сополимеров постоянного состава (1 : 1) со строго чередующимися мономерными звеньями. Сополимер МА — ВП содержит 6,75% N и 34,39% ангидридных групп (вычислено, %: N 6,70; ангидридные группы 34,43); сополимер МА — ВСИ: 6,15% N и 32,41% ангидридных групп (вычислено, %: N 6,26; ангидридные группы 32,40); сополимер МА — ВФИ: 5,20% N (вычислено, %: N 5,16).

Изучение состава продуктов, образующихся при сополимеризации МА с N-винильными мономерами при высоких степенях превращения (40—100%) и соотношениях исходных компонентов, отличных от эквимольных, показывает, что в результате реакции образуются как чередующиеся сополимеры эквимольного состава, так и гомополимер N-винильного мономера. Если в избытке взят МА, то он выделяется в неизменном виде. Подобное явление наблюдалось при сополимеризации МА с акриловой кислотой [2], стиролом [3] и винилацетатом [3].

По-видимому, между МА и N-винильными мономерами образуется донорно-акцепторный комплекс типа КПЗ за счет смещения электронной плотности реагирующих компонентов (в частности, происходит значительное увеличение электронной плотности на двойной связи МА).

УФ-спектры растворов смесей МА с ВСИ и ВФИ в хлороформе содержат полосы поглощения, которые отсутствуют в спектрах индивидуальных мономеров в данном растворителе и лежат в более длинноволновой области. При слиянии хлороформенных растворов МА и ВП в видимой