

## ОРИЕНТАЦИЯ МОЛЕКУЛ ГЕМОГЛОБИНА—S В АГРЕГАТАХ

А. К. ДАДИВАНЯН, А. Р. ЦАГИКЯН

Исследовано двойное лучепреломление в серповидных эритроцитах при различных длинах волн. При сравнении максимального двойного лучепреломления серповидных эритроцитов с двойным лучепреломлением кристаллов дезоксигемоглобина—S определена ориентация молекул гемоглобина—S в жидкокристаллической фазе. Установлено, что ось, в направлении которой поляризуемость молекул гемоглобина наименьшая, составляет с осью микротрубки угол  $24 \pm 4^\circ$ .

*Ключевые слова:* серповидные эритроциты, двойное лучепреломление, жидкокристаллическая фаза.

При определенных условиях молекулы дезоксигемоглобина—S, который отличается от нормального гемоглобина тем, что шестой аминокислотный остаток в его  $\beta$ -цепи заменен (вместо глутамила валил [3]), агрегируют с образованием [5] «микротрубок» и дальнейшим переходом в жидкокристаллическую фазу. В результате эритроциты вытягиваются, теряют эластичность, закупоривают мелкие капилляры, перестают переносить кислород, и организм погибает. Эта болезнь носит название серповидной анемии.

Очевидно, что для лечения серповидной анемии надо блокировать участки молекулы гемоглобина, взаимодействие между которыми приводит к агрегации гемоглобина.

Для нахождения этих межмолекулярных контактов необходимо знать ориентацию молекул белка в агрегате, так как при этом поиск контактов существенно упрощается [4].

Первая попытка определить ориентацию молекул гемоглобина—S в агрегатах была сделана Перутцом и Митчисоном, которые исследовали линейный дихроизм и двойное лучепреломление кристаллов дезоксигемоглобина—A и двойное лучепреломление серповидных клеток [9]. Показав, что коэффициент поглощения кристаллами больше в случае, когда электрический вектор излучения перпендикулярен направлению наибольших размеров игольчатых кристаллов, авторы пришли к выводу, что группы гема, грубо говоря, перпендикулярны этому направлению. Установив затем, что кристаллы и серповидные эритроциты при скрещенных поляризаторах окрашиваются одинаково, когда они устанавливаются параллельно друг другу, авторы заключили, что эти группы ориентированы перпендикулярно направлению вытянутости серпо-

видных эритроцитов. Мурияма и сотр. на основании данных исследования линейного дихроизма серповидных эритроцитов пришли к противоположному заключению: группы гема ориентированы параллельно длине эритроцитов [8]. Об этом, по мнению Муриямы, свидетельствует также тот факт, что эритроциты в магнитном поле ориентируются перпендикулярно силовым линиям [7].

Следует отметить некорректность определения степени ориентации молекул в указанных работах. Действительно, отрицательный знак двойного лучепреломления можно получить при изменении угла между осью наименьшей поляризуемости молекулы и осью микротрубки в пределах  $0-54,5^\circ$ , а точность определения ориентации молекул в агрегатах в опытах по ориентации эритроцитов в магнитном поле не намного превосходит указанную выше.

Гофрихтер и др. сделали попытку количественно оценить степень ориентации молекул гемоглобина в агрегате [2]. Считая, что осциллятор, соответствующий поглощению полосы Сарье, находится в плоскости гема, авторы получили для коэффициентов поглощения молекулы  $\epsilon_k$  выражение:

$$\epsilon_k = \frac{3}{4} \bar{\epsilon} \sum_i \sin^2 \theta_{ki}, \quad (1)$$

где  $\theta_{ki}$  — угол между нормалью к плоскости  $i$ -ого порфирина и осью  $k$  ( $k = x, y, z$ ),  $\bar{\epsilon}$  — коэффициент поглощения гема,  $i$  — номер гема.

В предположении, что все молекулы имеют одинаковую ориентацию по отношению к оси микротрубки, коэффициенты поглощения в направлениях, параллельном ( $\epsilon_{\parallel}$ ) и перпендикулярном ( $\epsilon_{\perp}$ ) оси микротрубки, определяются соотношениями:

$$\epsilon_{\parallel} = \sum_k \epsilon_k \cos^2 \Phi_k, \quad (2)$$

$$\epsilon_{\perp} = \frac{1}{2} \sum_k \epsilon_k \sin^2 \Phi_k, \quad (3)$$

где  $\Phi_k$  — угол между  $k$ -ой молекулярной осью и осью микротрубки. Величина дихроичного отношения  $P_2$  оказывается равной:

$$P \equiv \frac{\epsilon_{\perp}}{\epsilon_{\parallel}} = \frac{\sum_k \epsilon_k \sin^2 \Phi_k}{2 \sum_k \epsilon_k \cos^2 \Phi_k} \quad (4)$$

Используя значения параметров, характеризующих ориентацию групп гемов по карте электронных плотностей гемоглобина, полученной с разрешением  $2,5 \text{ \AA}$  Тен Эйком и Арноном, авторы определили величины коэффициентов поглощения в трех взаимно перпендикулярных направлениях:

$$\epsilon_x = \frac{3}{2} \bar{\epsilon} \times 0,88; \quad \epsilon_y = \frac{3}{2} \bar{\epsilon} \times 3,15; \quad \epsilon_z = \frac{3}{2} \bar{\epsilon} \times 3,97. \quad (5)$$

Далее они находят максимальное и минимальное значения для  $\cos^2 \Phi_{ky}$  предполагая, что оси  $z$  или  $y$  перпендикулярны оси микротрубки:

$$\cos^2 \Phi_x^{\max} = \frac{2P\varepsilon_y - \varepsilon_z - \varepsilon_x}{(\varepsilon_y - \varepsilon_x)(2P + 1)}, \quad (6)$$

$$\cos^2 \Phi_x^{\max} = \frac{2P\varepsilon_z - \varepsilon_y - \varepsilon_x}{(\varepsilon_z - \varepsilon_x)(2P + 1)}. \quad (7)$$

Исследовав около 10-ти серповидных клеток с наиболее выраженным дихроизмом, авторы нашли наибольшее значение дихроичного отношения, равное  $3,0 \pm 0,1$ . Отсюда они заключили, что наибольшее значение угла между направлениями оси микротрубки и оси  $x$  равно  $22^\circ$ . Отмечая качественное различие результатов, полученных этими авторами по сравнению с результатами, приведенными выше, следует указать некоторые недостатки их работы, которые могли повлиять на полученный ими результат. Во-первых, при определении дихроичного отношения необходимо рассчитать площади, ограниченные кривой поглощения [10], что не было сделано этими авторами, а дихроичное отношение рассчитывалось по отношению максимальных значений коэффициентов поглощения или по отношению площадей, ограниченных не полными кривыми поглощения, а их частью. В связи с этим ошибка в определении угла может составить несколько градусов. Свидетельством того, что эта ошибка может играть существенную роль, является тот факт, что при определении дихроичного отношения поглощения излучения кристаллами авторы получили значение 4,2, в то время как максимальное значение величины  $P$ , согласно полученному в этой работе соотношению, не может быть больше 4,05.

В настоящей работе была определена ориентация молекул относительно направления оси микротрубки на основании результатов исследования двойного лучепреломления серповидных эритроцитов.

*Материал и методика.* Для изучения двойного лучепреломления кровь пациентов с серповидной анемией разбавлялась физиологическим раствором в соотношении 1:40, помещалась на предметное стекло, на которое накладывалось покровное. Далее образец помещался в атмосферу, содержащую 95% азота и 5% углекислого газа при температуре  $25^\circ$ . В течение 24 ч процессы деоксигенации и превращения клеток в серповидные завершались\*.

Исследование двойного лучепреломления проводилось на поляризационном микроскопе МП-3, который был усовершенствован нами: между поляризатором и объектом вставлялся компенсатор, укрепленный на лимбе, а источником света служила ртутная лампа ДРШ-500, пучок от которой проходил через монохроматор УМ-2. В качестве источника света использовался также гелий-неоновый лазер ЛГ-75 с длиной волны 633 нм.

Величина двойного лучепреломления  $\Delta n$  определялась по соотношению:

$$\Delta n = \frac{\lambda \sin \delta_0 \sin 2(\xi - \xi_0)}{2\pi l}, \quad (8)$$

\* Образцы для исследования были любезно предоставлены нам Б. Магдофф-Фейрчайлд, которой пользуясь случаем, авторы выражают искреннюю признательность.

чадьд, которой пользуясь случаем, авторы выражают искреннюю признательность.

где  $l$ —толщина анизотропного слоя,  $\xi$  и  $\xi_0$ —полутеневые азимуты компенсатора в присутствии двулучепреломляющего образца и при его отсутствии соответственно,  $\delta$ —максимальная разность хода,  $\lambda$ —длина волны.

*Результаты и обсуждение.* Зависимость максимальной для данной длины волны величины двойного лучепреломления от  $\lambda$  приведена на рисунке.

Следует отметить, что аналогичная зависимость была получена для кристаллов дезоксигемоглобина Перутцем и Митчисоном [9]. Двойное лучепреломление всех эритроцитов было отрицательным.

В связи с высокой концентрацией белка в жидкокристаллической фазе (около 35%) [6], плотной упаковкой надмолекулярных структур и малой асимметрией формы белковых молекул оптической анизотропией формы можно пренебречь и считать, что величина двойного лучепреломления обусловлена собственной оптической анизотропией отдельных белковых молекул.

Величина двойного лучепреломления  $\Delta n$  связана с анизотропией поляризуемости молекул соотношением [1]:

$$\Delta n = \frac{2\pi N}{n} \left( \frac{n^2 + 2}{3} \right)^2 (\bar{\alpha}_x - \bar{\alpha}_y), \quad (9)$$

где  $N$ —число анизотропных молекул в единице объема,  $n$ —показатель преломления среды,  $\bar{\alpha}_x$  и  $\bar{\alpha}_y$ —средние значения поляризуемости молекулы во взаимно перпендикулярных направлениях и перпендикулярных направлению распространения света соответственно.

Если свет распространяется в направлении, перпендикулярном оси симметрии надмолекулярного образования, в случае с аксиально симметричным эллипсоидом поляризуемости величина  $(\bar{\alpha}_x - \bar{\alpha}_y)$  может быть выражена через главные поляризуемости молекулы  $\alpha_1$  и  $\alpha_2$ .

$$(\bar{\alpha}_x - \bar{\alpha}_y) = \frac{3}{2} (\alpha_1 - \alpha_2) \left( \overline{\cos^2 \theta} - \frac{1}{3} \right), \quad (10)$$

где  $\theta$ —угол между осями симметрии надмолекулярного образования и эллипсоида поляризуемости молекулы.

Подставив  $(\bar{\alpha}_x - \bar{\alpha}_y)$  из (10) в (9), можно получить:

$$\Delta n = \frac{2\pi N}{n} \left( \frac{n^2 + 2}{3} \right)^2 (\alpha_1 - \alpha_2) \frac{3 \overline{\cos^2 \theta} - 1}{2}. \quad (11)$$

В связи с тем, что анизотропию оптической поляризуемости невозможно рассчитать, величину  $\overline{\cos^2 \theta}$  можно определить, сравнив с двойным лучепреломлением кристалла, в котором ориентация молекул известна. В случае с глобулярными белками определение  $\overline{\cos^2 \theta}$  таким образом правомерно, так как известно, что при переходе из раствора в кристалл молекулы белков не подвергаются большим деформациям, поэтому их анизотропию поляризуемости можно считать неизменной также в кристаллическом и жидкокристаллическом состояниях.

Сравнив соотношения (11), написанные для жидкокристаллического и кристаллического состояний, можно получить:

$$\overline{\cos^2 \theta_{жк}} = \frac{1}{3} + \left( \overline{\cos^2 \theta_k} - \frac{1}{3} \right) \frac{\Delta n_{жк} n_{жк} N_k (n_k^2 + 2)^2}{\Delta n_k n_k N_{жк} (n_{жк}^2 + 2)^2} \quad (12)$$

Здесь  $\Delta n_k$  и  $\Delta n_{жк}$  — величины двойного лучепреломления для кристалла и жидкого кристалла соответственно,  $N_k$  и  $N_{жк}$  — числа молекул в единице объема в кристаллическом и жидкокристаллическом состояниях,  $\theta_k$  — угол между осью молекулы гемоглобина и кристаллографической осью,  $\theta_{жк}$  — угол между осью  $\chi$  и осью микротрубки.

Значения  $\Delta n_{жк}$  приведены на рисунке.

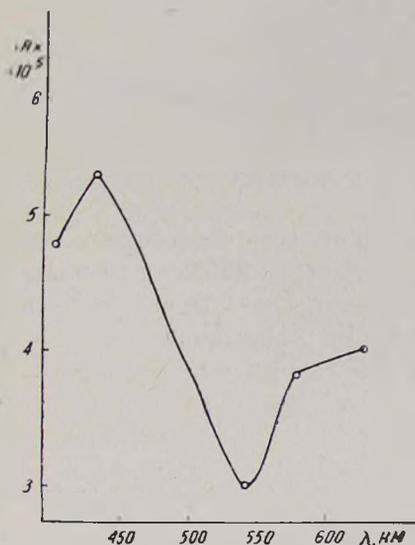


Рис. Зависимость двойного лучепреломления серповидных эритроцитов от длины волны.

Величина  $\Delta n_k$  была определена в работе Перутца и Митчисона [9].

Величины  $n_k = 1,47$ ,  $n_{жк} = 1,40$ , концентрация белка в кристаллах дезоксигемоглобина равна около 65%, поэтому отношение величины

$\frac{N_k}{N_{жк}}$  и равно 2. Величина  $\theta_k$  равна  $0^\circ$ . Подстановка этих значений в

соотношение (12) дает для величины  $\theta_{жк}$  значение  $24 \pm 4^\circ$ .

Таким образом, исследование двойного лучепреломления серповидных клеток и сравнение полученных результатов с результатами исследования кристаллов дезоксигемоглобина позволяет определить ориентацию молекул гемоглобина в микротрубках. Полученные данные согласуются с результатами, полученными при исследовании агрегатов методом линейного дихроизма. Следует отметить, что метод двойного лучепреломления можно применять при исследовании значительно большего числа объектов, чем линейный дихроизм электронных спектров, который в видимой области поглощает небольшое число объектов, а двойным лучепреломлением обладают практически все.

ՀԵՄՈԳԼՈՔԻՆ-S-ի ՄՈԼԵԿՈՒԼՆԵՐԻ ԿՈՂՄՆՈՐՈՇՈՒՄԸ  
ԱԳՐԵԳԱՏՆԵՐՈՒՄ

Ա. Կ. ԴԱԴԻՎԱՆՅԱՆ. Ա. Ռ. ՄԱԴԻԿՅԱՆ

Ուսումնասիրվել է մանգաղանման էրիտրոցիտաների երկբեկումը տարբեր երկարության լուսային ալիքների դեպքում:

Հեղուկ բյուրեղային փուլում, մանգաղանման էրիտրոցիտների առավելագույն երկբեկման և դեզօքսիհեմոգլոբինի բյուրեղների երկբեկման համեմատությունից, հայտնաբերվել է հեմոգլոբին-S-ի մոլեկուլների կողմնորոշումը:

Ցույց է տրվում, որ առանցքը, որի ուղղությամբ հեմոգլոբինի մոլեկուլի բևեռացվելիությունը նվազագույն է, «միկրոտուղովակի» առանցքի հետ կազմում է  $4^\circ$  անկյուն:

THE ORIENTATION OF HEMOGLOBIN-S MOLECULES  
IN AGGREGATES

A. K. DADIVANIAN, A. R. TSAGIKIAN

Double refraction in sicklelike erythrocytes at different wave lengths has been studied. The orientation of hemoglobin-S molecules in liquid crystalline phase has been determined. It has been established that the axis of the least hemoglobin molecule polarization makes with the axis of microtube an angle of ( $24^\circ-4$ ).

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Цветков В. Н., Эскин В. Е., Френкель С. Я. Структура макромолекул в растворах. М., 1964.
2. Hofrichter I., Hendricker D. G., Eaton W. A. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70, 3604, 1973.
3. Ingram V. M. Nature, 180, 328, 1957.
4. Levinthal C., Wodak S. J., Kahn P., Dadivanian A. K. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 1330, 1975.
5. Magdoff-Fairchild B., Swerdlow P. H., Bertles I. F. Nature, 239, 217, 1972.
6. Muirhead H., Cox I., Mazarella L., Perutz M. F. J. Mol. Biol., 28, 117, 1958.
7. Murayama M. Nature, 204, 420, 1965.
8. Murayama M., Olson R. A., Jounings W. H. Biochim. Biophys. Acta, 94, 194, 1965.
9. Perutz M. F., Mitchison I. M. Nature, 166, 677, 1950.
10. Vallance-Jones A., Thesis Ph. D. Cambridge, 1949.