

РАЗЛОЖЕНИЕ УФ-СПЕКТРА ПОГЛОЩЕНИЯ ГЕМОГЛОБИНА НА СПЕКТРЫ ПОГЛОЩЕНИЯ ПРОСТЕТИЧЕСКИХ ГРУПП И АПОБЕЛКА С ПОМОЩЬЮ АДДИТИВНОЙ МОДЕЛИ

© 2015 г. И.А. Лавриненко, Г.А. Вашанов, В.Г. Артюхов

Воронежский государственный университет, 394006, Воронеж, Университетская площадь, 1

E-mail: box_624@smtp.ru

Поступила в редакцию 07.05.14 г.

Предложен и обоснован способ разложения УФ-спектра поглощения гемоглобина на спектры поглощения белковой и небелковой составляющих с помощью аддитивной модели. Установлено, что в диапазоне длин волн 240–320 нм гемовая компонента белка имеет полосу поглощения с $\lambda_{\max} = 269,2$ нм ($\epsilon = 97163$), апобелковая компонента – полосу с $\lambda_{\max} = 278,4$ нм ($\epsilon = 48669$). Определена интегральная относительная доля поглощения гемовой (78,8%) и апобелковой (21,2%) частей в спектре гембелка в указанном диапазоне длин волн.

Ключевые слова: хромопротеид, гемоглобин, апобелок, аминокислотные остатки, простетическая группа, аддитивная модель спектра.

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 [1–5].

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 [6].

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 [7,8].

Таким образом, выделение той или иной составляющей биополимера вызывает различ-

ную по степени модификацию частей макромолекулы, что ведет к различию в спектрах поглощения изолированных белковой и небелковой компонент относительно их спектров поглощения в нативной макромолекуле.

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

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

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использованы растворы гемоглобина человека, полученные из крови доноров в 0,1 моль/л Na-фосфатном буфере (Sigma, США) с pH 7,4 [9]. Концентрация гембелка ($2,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л) определена спектрофотометрически по значениям поглощения при 500, 569 и 577 нм [10,11].

Растворы ароматических, гетероциклических и серосодержащих L-аминокислот получены из кристаллических коммерческих препаратов (Ajinomoto, Япония) с содержанием основного вещества более 98,5%. Концентрация (моль/л) фенилаланина – $3,3 \cdot 10^{-3}$, тирозина – $3,3 \cdot 10^{-4}$, триптофана – $1,2 \cdot 10^{-4}$, гистидина – $9,2 \cdot 10^{-2}$, цистеина – $6,9 \cdot 10^{-2}$ и метионина – $1,0 \cdot 10^{-1}$ в 0,1 моль/л Na-фосфатном буфере (pH 7,4). Во избежание возможного окисления SH-группы цистеина применяли деаэрированный буфер в атмосфере гелия.

Спектры поглощения исследуемых образцов в диапазоне 230–320 нм зарегистрированы на спектрофотометре UV-2401(PC) (Shimadzu, Япония), спектральная ширина щели 0,5 нм, шаг сканирования 0,5 нм, скорость сканирования соответствовала режиму Slow. Измерения проведены в стандартной кварцевой кювете Hellma (QS, Германия) с длиной оптического пути 10 мм.

С целью снижения случайных ошибок фотометрических измерений, обусловленных тепловым шумом фотодетектора, спектры поглощения сглаживались и интерполировались кубическими сплайнами (Cubic Spline Smoothing) [12,13] с точностью аппроксимации до 0,2 нм. Уменьшение фотометрической ошибки базовой линии спектрофотометра, а также ошибки, обусловленной асимметрией кювет, обеспечивалось путем регистрации спектров поглощения образцов в режиме Split-beam. Увеличение разрешения в их спектрах поглощения достигалось вычислением второй производной [14].

Исходная модель спектра поглощения апогемоглобина получена путем сложения парциальных спектров молярного поглощения фенилаланина, тирозина, триптофана, гистидина, цистеина и метионина в соотношении 30:12:6:38:6:6 по данным аминокислотного состава этого белка (PDB 1BZ0) [15,16].

Необходимые вычисления выполнены с помощью программы Microsoft Excel с модулем Visual Basic for Applications (Microsoft, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

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

1. Вклад белковой и небелковой компонент в спектр поглощения белка представляется аддитивной моделью общего вида:

$$A + B = C, \quad (1)$$

где A и B – взаимосвязанные спектры поглощения апобелка и его простетических групп, которые необходимо найти, а C – известный спектр поглощения полипептида.

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 Δx модельный спектр A_1 .

6) Предполагается [6,17,18], что существующая разница 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 (Δx) 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 Δx 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 простетических 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.

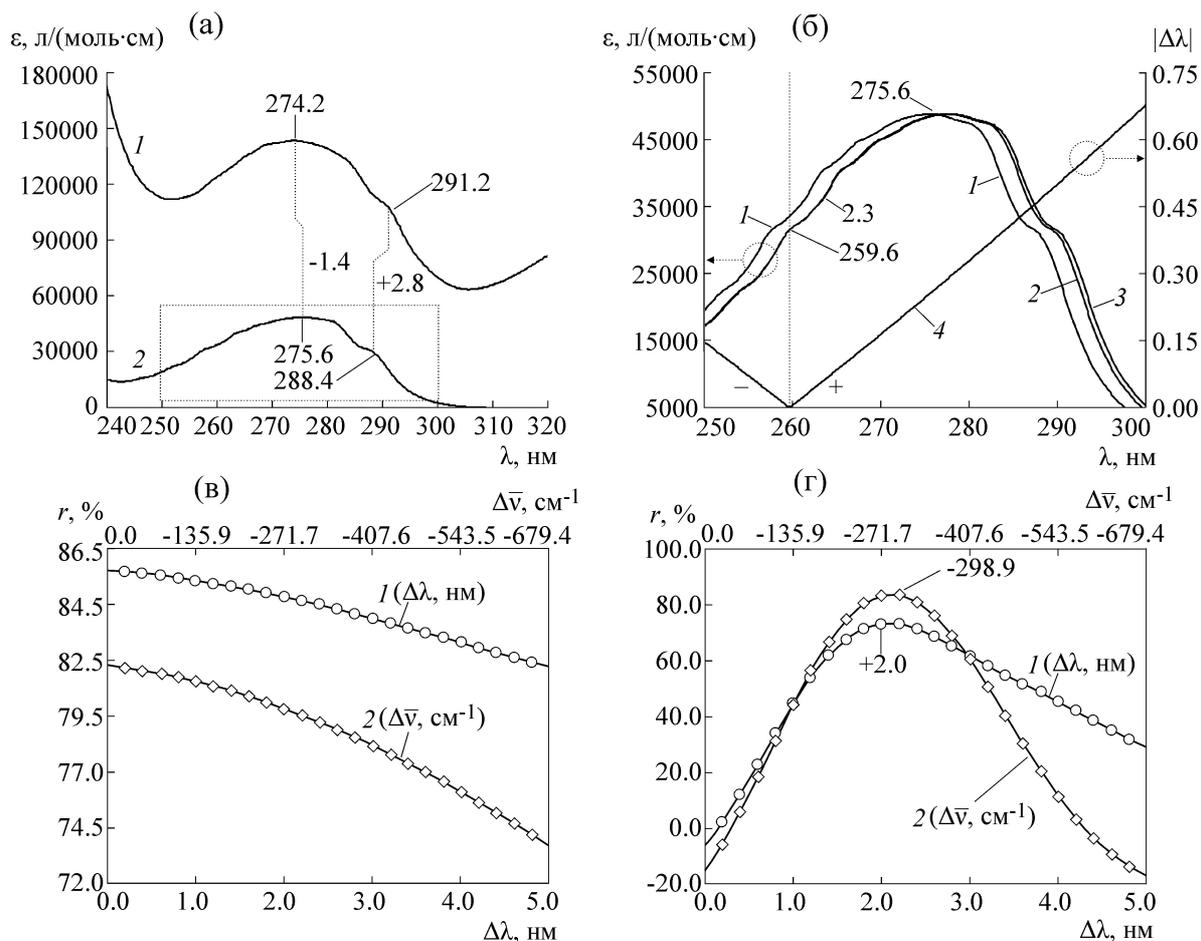


Рис. 1. (а) – Спектры поглощения раствора гемоглобина в диапазоне длин волн 240–320 нм (спектр 1) и исходной модели спектра по апобелку (спектр 2); (б) – модели спектров поглощения по апобелку в диапазоне длин волн 250–300 нм – исходная (спектр 1), со смещением по шкале длин волн (спектр 2), по шкале волновых чисел (спектр 3), зависимость уширения смещенного по волновому числу спектра относительно спектра со смещением по длине волны (спектр 4); зависимость коэффициента корреляции от шага смещения по исходному спектру (в) и его второй производной (г) по шкале длин волн (спектры 1), волновых чисел (спектры 2). Области положительного и отрицательного уширения спектра (б) показаны знаком «+» и «-» соответственно.

Мы протестировали предложенный алгоритм.

Для этого были рассчитаны показатели молярного поглощения для спектра гемоглобина в исследуемом диапазоне длин волн (рис. 1а, спектр 1). Путем суммирования парциальных спектров поглощения аминокислот создана аддитивная модель спектра поглощения апогемоглобина (компонента A_0) (рис. 1а, спектр 2; рис. 1б, спектр 1) [19]. Вычитанием из спектра поглощения гемоглобина (спектр С в модели (1)) спектра A_0 получена модель спектра поглощения гемовой компоненты (B_0) (рис. 2а, спектр 1). Предварительный анализ показал, что спектр простетических групп имеет, вероятно, одну полосу поглощения. Наблюдаемые возмущения в спектре B_0 (рис. 2а, спектр 1) представляют собой ожидаемые дефекты, обус-

ловленные разностью в положении переходов в спектрах поглощения боковых групп аминокислот в составе макромолекулы (целевой спектр А) относительно таких переходов в спектре A_0 .

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

В качестве простого критерия, используемого для вычисления Δx , 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 Δx составило $-1,4$ нм, что не согласуется с полученными ранее данными по растворам альбумина [5] и результатам наших исследований [19]. Таким образом, в отличие от простых

белков, данный способ расчета Δx 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 Δx , основанном на сопоставлении однозначно идентифицируемых переходов [19], принадлежавших аминокислоте одного типа и имеющей максимальную долю (как произведение показателя молярного поглощения на количество аминокислотных остатков) в спектре поглощения белка (C) и в спектре A_0 . Такой аминокислотой в спектре гемоглобина является триптофан. Один из переходов аминокислоты в спектре поглощения гембелка соответствует 291,2 нм, в модельном спектре апобелка – 288,4 нм. Величина Δx составила при этом 2,8 нм. Этот результат хорошо согласуется с литературными данными [5]. 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 переходы могут быть взаимно нивелированы находящимися рядом локальными пиками поглощения триптофана в спектре макромолекулы [19].

Так как белки имеют различный аминокислотный состав, то при вычислении Δx , 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 Δx 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 переходов в спектре будет невысокой, то это, в свою очередь, может привести к дополнительным артефактам. Таким образом, эти пики поглощения будут нерепрезентативны по отношению ко всей площади сравниваемых спектров A_0 и C .

При использовании в качестве критерия некоего 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 [19]. Другими словами, смещение спектра A_0 на Δx 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 Δx по разности положения реперных точек в спектрах поглощения A_0 и C . Для того чтобы получить более достоверные значения Δx , 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 (коэффициент детерминации, r^2) [20].

Таким образом, сравнение спектров A_0 и C можно рассматривать как кросскорреляцию сигналов, где взаимная корреляционная функция описывает степень их подобия (r) и взаимное расположение по оси абсцисс (Δx).

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

Однако в наших расчетах (рис. 1в, спектр 1) с увеличением Δx коэффициент корреляции неуклонно снижался. Вторая производная по коэффициенту корреляции ожидаемо не позволила обнаружить максимум r для Δx . 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 вто-

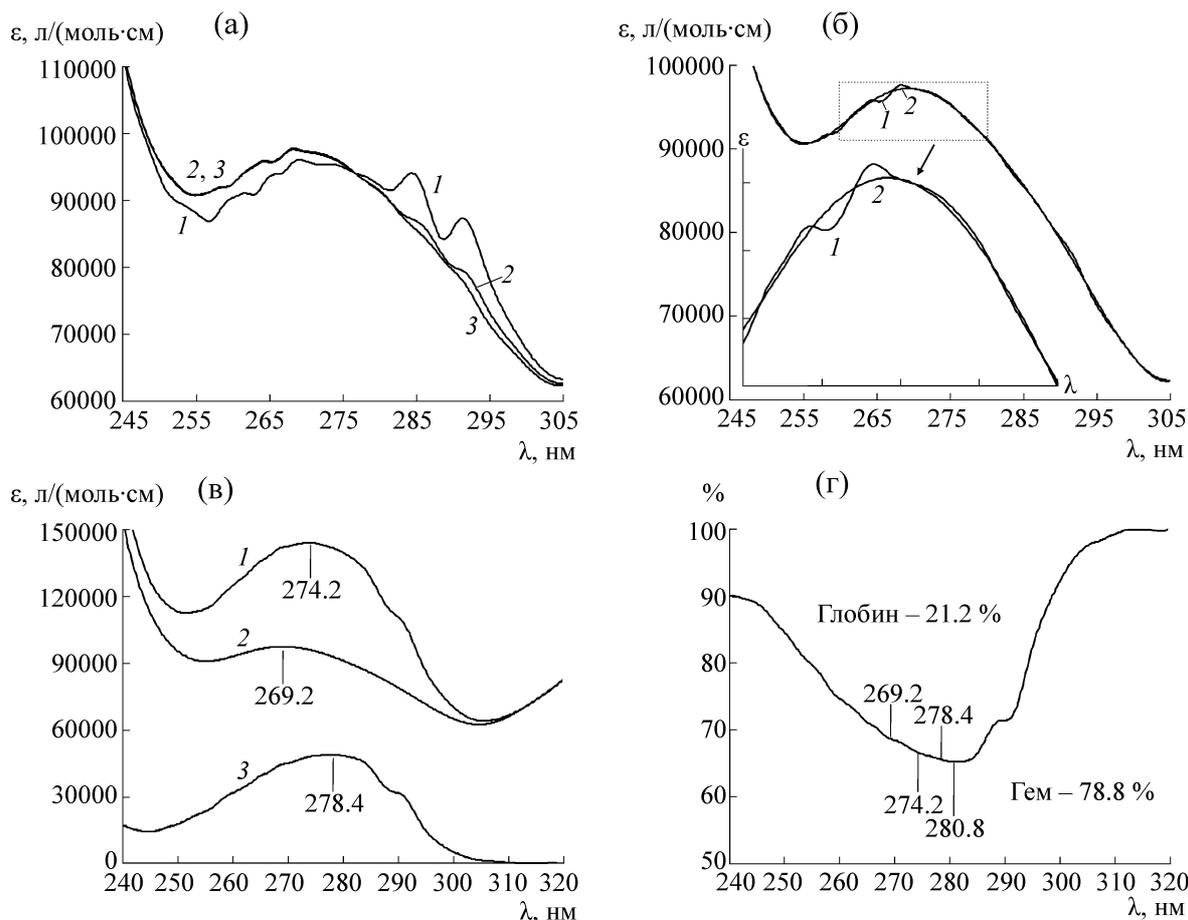


Рис. 2. (а) – Модельные спектры поглощения гемовой компоненты (245–305 нм): исходный (спектр 1), после смещения по шкале длин волн (спектр 2), волновых чисел (спектр 3); (б) – модельные спектры гемовой компоненты: спектр волновых чисел (1) и в виде полинома Чебышева (спектр 2); (в) – спектры поглощения гемоглобина в диапазоне длин волн 240–320 нм (спектр 1), модельный спектр поглощения гемовой компоненты и апобелка (спектры 2 и 3 соответственно); (г) – составляющая поглощения гемовой компоненты.

рой производной спектра гемоглобина (С) и модели спектра по апобелку (A_0) (рис. 1г, спектр 1). Максимум величины r соответствовал $\Delta\lambda = 2,0$ нм (против +2,8 нм в случае оценки по переходу триптофана, -1,4 нм по абсолютной разности и +0,7 нм по среднему значению для рассмотренных ранее переходов (рис. 1а)). Смещенный на $\Delta\lambda$ модельный спектр (A_1) представлен на рис. 1б, спектр 2. Соответствующий ему вычисленный модельный спектр поглощения гемовой компоненты (B_1) изображен на рис. 2а, спектр 2. Следовательно, нам удалось существенно снизить дефекты полученного спектра поглощения небелковой составляющей путем сдвига модельного спектра (A_0) предложенным способом (пп. 8 и 9 алгоритма).

Как известно, сдвиги в спектрах поглощения белков связаны с изменением энергии переходов хромофоров [6,17]. Следовательно, для компенсации спектрального сдвига для модели спектра

(A_0) относительно спектра белка (С) все вычисления более правильно выполнять в шкале абсцисс, линейно пропорциональной энергии таких переходов. Обычно в ИК-спектроскопии этой шкале соответствует волновое число (ν , см⁻¹), в радиофизике – частота (ν , Гц), в физике элементарных частиц – непосредственно энергия (E , эВ).

Для того, чтобы оценить, насколько целесообразно выполнять смещение модельного спектра A_0 относительно С в координатах, обратных 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 нм до 320 нм (т.е. от 43478,3 см⁻¹ до 31250,0 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 нм на $27,17 \text{ см}^{-1}$ при ней соответствует изменению на $0,14 \text{ нм}$; с 240 нм – на $0,16 \text{ нм}$ и с 320 нм – на $0,28 \text{ нм}$.

Рассчитаны коэффициенты корреляции для спектров поглощения, где аргументом выступает волновое число (рис. 1в, спектр 2). По отношению к предыдущему способу (рис. 1в, спектр 1) следует отметить более выраженный характер снижения величины r , что может косвенно указывать на большую 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. 1г, спектр 2). Максимум величины r соответствовал $\Delta x = -298,9 \text{ см}^{-1}$. Сопоставляя величины коэффициентов корреляции для осей абсцисс λ и ν (рис. 1г) и полуширину их максимумов, можно утверждать, что использование волновых чисел в качестве абсциссы дает лучшие результаты. Кроме того, максимум на спектре 2 (рис. 1г) имеет еще меньшую полуширину, чем представлено на данном рисунке. Это обусловлено тем, что спектры 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 $\Delta \nu = -298,9 \text{ см}^{-1}$ по определению не эквивалентны друг другу). Максимальное значение $\Delta \nu = -679,3 \text{ см}^{-1}$ на шкале соответствует $\Delta \lambda = 3,85 \text{ нм}$. Приведение двух типов шкал абсцисс к единому масштабу в пределах заданного диапазона смещений Δx потребует дополнительных (избыточных) преобразований, не определяющих конечный результат.

Смещенный на $\Delta \nu$ модельный спектр апобелка (A_1) был обратно конвертирован кубическим сплайном к линейной шкале длин волн ($240\text{--}320 \text{ нм}$, с шагом интерполирующей сетки – $0,2 \text{ нм}$, рис. 1б, спектр 3). По сравнению с предыдущим спектром (рис. 1б, спектр 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 $259,6 \text{ нм}$ (рис. 1б). Так как волновое число обратно пропорционально длине волны, то дифференцирование функции:

$$\frac{d}{dx} \left(\frac{1}{x^c} \right) = \frac{d}{dx} (x^{-c}) = -\frac{x^c}{x^{c+1}} \quad (2)$$

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

$$y = a + bx^2, \quad (3)$$

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. 1б, спектр 4.

Соответствующая спектру A_1 полученная модель спектра поглощения гемовой составляющей (B_1) изображена на рис. 2а (спектр 3), рис. 2б (спектр 1) и в увеличенном виде на врезке на рис. 2б. Использование модельного спектра (A_1), смещение для которого выполнялось по абсциссе ν , позволило в большей степени минимизировать дефекты в спектре B_1 относительно его предыдущей версии (рис. 2а, спектр 2), где аргументом выступает λ (традиционно используемая в УФ- и видимой спектродетекции).

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 [19] с помощью второй производной нами были соотнесены все переходы в спектре поглощения гемоглобина и его аддитивной модели спектра в исследуемом диапазоне длин волн. Однако пиков поглощения простетических групп белка таким способом обнаружить не удалось.

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 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. [21–28].

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-го порядка. Многочлены полинома были определены с помощью рекуррентных соотношений [29,30]. 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 таблице.

Таким образом, интерполяцией полиномом (рис. 2б (спектр 2), врезка на рис. 2б (спектр 2) получена модель спектра поглощения гемовой части (B) (рис. 2в, спектр 2) в составе белка (рис. 2в, спектр 1) с $\lambda_{\max} = 269,2$ нм ($\epsilon = 97163$). Найденная полоса поглощения не противоречит данным, полученным ранее [31]. Вычитая спектр поглощения протестических групп (B) из спектра поглощения гемоглобина (C), получаем «комплементарную» к нему модель спектра по-

Коэффициенты ортогонального полинома Чебышева первого рода 10-го порядка для модели спектра поглощения гемовой компоненты в составе белка

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

Обозначения: T_n – порядок (номер) коэффициента многочлена, $f(T_n)$ – значение коэффициента многочлена.

глощения апобелка (A) (рис. 2в, спектр 3), с $\lambda_{\max} = 278,4$ нм ($\epsilon = 48669$). Вычисленный нами модельный спектр апогемоглобина хорошо согласуется с известными литературными данными для белков (не содержащих хромофорных протестических групп в этом диапазоне), а также проферментов и апобелков (эу- и псевдоглобулины, альбумины: сывороточный и яичный, тиреоглобулин, лизоцим, трипсиноген, химотрипсиноген, апомиоглобин) [32,33].

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

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

Корректность полученной модели спектра поглощения апобелковой компоненты также может быть подтверждена сравнением производных второго порядка: спектра апобелка (A) и гемоглобина (C) (рис. 3, [19]). В свою очередь, полученная производная модели спектра поглощения апобелка указывает на правильность выполненных вычислений для спектра поглощения протестических групп.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, предложенный способ разложения УФ-спектра поглощения гемоглобина на спектры светопоглощения протестических групп и апобелка опирается на аддитивные

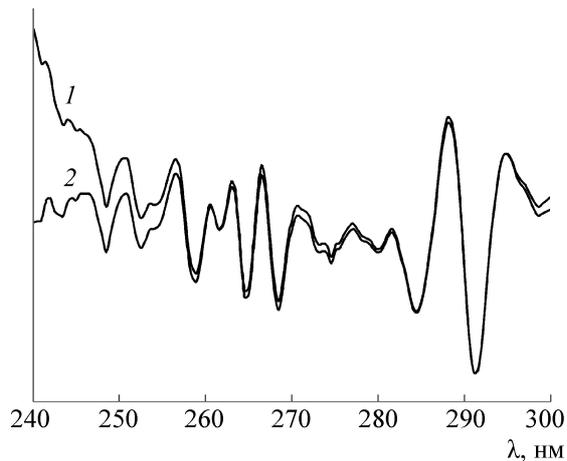


Рис. 3. Вторые производные спектра поглощения раствора гемоглобина (1) и модели спектра поглощения апобелка в составе макромолекулы (2) в диапазоне длин волн 240–300 нм. Для наглядности производные спектров поглощения нормированы по амплитуде.

модели двух типов: 1) как суммы парциальных спектров поглощения аминокислот, формирующей модель апогемоглобина, 2) как суммы неизвестных, но взаимосвязанных спектров поглощения апобелка и гемовой компоненты, которая представляет собой известный спектр поглощения белка.

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 полезны при изучении закономерностей действия различных физико-химических факторов, в частности УФ-излучения на данный гемопроteid [34].

Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (ФЦП ИР14-20), соглашение № 14.593.21.0001, SPIN 3406-0566, с использованием оборудования Центра коллективного пользования научным оборудованием Воронежского государственного университета.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. В. Г. Артюхов, *Гемопротеиды: закономерности фотохимических превращений в условиях различного микроокружения* (Воронеж. ун-т, Воронеж, 1995).
2. В. Michel and H. R. Bosshard, *J. Biol. Chem.* **259** (16), 10085 (1984).
3. С. Weber, В. Michel, and H. R. Bosshard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84** (19), 6687 (1987).
4. А. Уайт, Ф. Хендлер, Э. Смит и др., *Основы биохимии* (Мир, М., 1981), т. 1.
5. М. К. Рубан, Г. А. Вашанов и И. А. Лавриненко, *Вестн. Воронежского гос. ун-та. Сер. Химия. Биология. Фармация*, № 1, 56 (2010).
6. Ч. Кантор и П. Шиммель, *Биофизическая химия* (Мир, М., 1984), т. 2.
7. А. М. Чарный, *Патофизиология гипоксических состояний* (Медгиз, М., 1961).
8. Д. М. Рифкинд, в кн. *Неорганическая биохимия* (Мир, М., 1978), т. 2, сс. 256–338.
9. D. Drabkin, *J. Biol. Chem.* **164** (2), 703 (1947).
10. Zwart, A. Buursma, E. J. van-Kampen, et al., *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **19** (7), 457 (1981).
11. Л. К. Стусь и Е. Д. Розанова, *Биофизика* **37** (2), 387 (1992).
12. M. J. Schimek, *Statist. Plann. Inference*, № 91, 525 (2000).
13. J. Wang and L. Yang, *Ann. Inst. Statist. Math.*, № 61, 663 (2009).
14. G. Talsky, *Derivative Spectrophotometry: Low and Higher Order* (Weinheim: VCH, 1994).
15. G. Fermi, M. F. Perutz, B. Shaanan, and R. Fourme, *J. Mol. Biol.*, № 175, 159 (1984).
16. J. S. Kavanaugh, W. F. Moo-Penn, and A. Arnone, *Biochemistry*, № 32, 2509 (1993).
17. А. П. Демченко, *Ультрафиолетовая спектроскопия и структура белков* (Наук. думка, 1981).
18. Л. Страйер, *Биохимия* (Мир, М., 1984), т. 1.
19. И. А. Лавриненко, Г. А. Вашанов и М. К. Рубан, *Журн. прикл. спектроскопии* **80** (6), 907 (2013).
20. Г. Ф. Лакин, *Биометрия* (Высш. школа, М., 1990).
21. A. Savitzky and M. J. E. Golay, *Analytical Chemistry* **36** (8), 1627 (1964).
22. И. Я. Берштейн и Ю. Л. Каминский, *Спектрофотометрический анализ в органической химии* (Химия, Ленинград, 1986).
23. А. И. Роженко, Дис. ... д-ра физ.-мат. наук (Новосибирск, 2003).
24. Г. Бейтмен и А. Эрдейи, *Высшие трансцендентные функции* (Наука, М., 1974), т. 2.
25. Т. Х. Кормен, Ч. И. Лейзерсон, Р. Л. Ривест и К. Штайн, *Алгоритмы: построение и анализ* (ИД «Вильямс», М., 2005).
26. Дж. Алберг, В. Нильсон и Дж. Уолш, *Теория сплайнов и ее приложения* (Мир, М., 1972).
27. В. А. Василенко, *Сплайн-функции: теория, алгоритмы, программы* (Наука, Новосибирск, 1983).

28. В. К. Дзядык, *Введение в теорию равномерного приближения функций полиномами* (Наука, М., 1977).
29. А. Г. Хованский, *Математ. просвещение*, № 17, 93 (2013).
30. Н. Васильев и А. Зелевинский, *Квант*, № 1, 12 (1982).
31. M. Shepherd, T. A. Dailey, and H. A. Dailey, *Biochem. J.* **397**, 47 (2006).
32. C. V. Coulter, F. M. Stone, and A. J. Kabat, *J. Gen. Physiol.*, № 19, 739 (1936).
33. H. Edelhofer, *Biochemistry* **6** (7), 1948 (1967).
34. В. Г. Артюхов, О. В. Путинцева, Е. А. Калаева и В. С. Савостин, *Гемоглобин человека в условиях воздействия различных физико-химических агентов* (Воронеж. ун-т, Воронеж., 2013).

Decomposition of Hemoglobin UV Absorption Spectrum into Absorption Spectra of Prosthetic Group and Apoprotein by Means of an Additive Model

I.A. Lavrinenko, G.A. Vashanov, and V.G. Artyukhov

Voronezh State University, Universitetskaya pl. 1, Voronezh, 394006 Russia

The decomposition pathways of hemoglobin UV absorption spectrum into the absorption spectra of the protein and non-protein components are proposed and substantiated by means of an additive model. We have established that the heme component has an absorption band with a maximum at $\lambda_{\max} = 269.2$ nm ($\epsilon = 97163$) and the apoprotein component has an absorption band with a maximum at $\lambda_{\max} = 278.4$ nm ($\epsilon = 48669$) for the wavelength range from 240.0 to 320.0 nm. An integral relative proportion of absorption for the heme fraction (78.8%) and apoprotein (21.2%) in the investigating wavelength range is defined.

Key words: chromoprotein, hemoglobin, apoprotein, amino acid residues, prosthetic group, an additive model of the spectrum