

Г. М. МРЕВЛИШВИЛИ, В. Г. ХУЦИШВИЛИ, Д. Р. МОНАСЕЛИДЗЕ,  
Г. Ш. ДЖАПАРИДЗЕ

## ГИДРАТАЦИЯ КОЛЛАГЕНОВЫХ ВОЛОКОН НАТИВНОГО ТИПА

(Представлено академиком И. М. Лифишицем 27 XI 1973)

В настоящей работе приводятся данные о состоянии воды в коллагеновых волокнах в нативном и денатурированном состояниях, полученные методами калориметрии и ядерного магнитного резонанса (я.м.р.). В опытах использовали препараты коллагеновых волокон нативного типа, полученные по методу (1) из растворов кислотно-растворимого проколлагена кожи крыс. Волокна при исследовании в электронном микроскопе давали характерную полосатую исчерченность с периодом 640 Å (более подробно см. (2)). Калориметрические измерения проводили с помощью новой модели низкотемпературного адиабатного калориметра (3) и сканирующего дифференциального микрокалориметра (2), сконструированных в Институте физики АН ГрузССР. Для изучения протонного резонанса воды в волокнах применяли спектрометр я.м.р. высокого разрешения INM-C60-HL. Для определения времен продольной ( $T_1$ ) и поперечной ( $T_2$ ) релаксации применяли импульсный спектрометр SXP-4-100 и релаксометр «Minispec» P-20. Время  $T_1$  измеряли с помощью нуль-метода Карра и Перселла (4); время  $T_2$  тем же методом, модифицированным Мейбумом и Джиллом (5). Погрешность в определении  $T_1$  и  $T_2$  не более 3%.

На рис. 1 приведена температурная зависимость теплоемкости 1 г коллагена в присутствии различного количества воды. Исходя из этой зависимости, мы рассчитываем количество невымораживаемой — связанной с биополимером воды (3). Для влажных коллагеновых волокон эта величина составляет  $0.50 \pm 0.01$  г  $\text{H}_2\text{O}$  на 1 г белка. Обращает на себя внимание тот факт, что существует критическая концентрация полимера в растворе (при 0,35 г  $\text{H}_2\text{O}$  на 1 г белка), при которой вся имеющаяся в системе вода находится в невымораживаемом — гидратированном состоянии (рис. 1, 2).

На рис. 2 приведены линии протонного резонанса, наблюдаемые в растворах 0,15 M NaCl и в коллагеновых волокнах нативного типа. Ширина линии на полувысоте пика поглощения во влажных волокнах и в суспензиях коллагеновых волокон варьирует между 5,6—7,2 Hz. Исходя из калориметрических результатов естественно было предположить, что причиной уширения линии я.м.р. является сильное взаимодействие молекул проколлагена с молекулами воды и образование упорядоченных водных слоев вблизи поверхности макромолекул (см. также (6)).

Для оценки времени корреляции протонов в гидратной оболочке макромолекул мы применили подход, который был использован Любас и Вильчиком (7) для определения «невращательной гидратации» ДНК.

Зависимость между временем корреляции  $\tau$  и временами  $T_1$  и  $T_2$  может быть представлена с помощью выражений Соломона (8)

$$\frac{1}{T_{1n}} = \frac{6}{80} \frac{j^4 \hbar^2}{b^6} \left[ \frac{\tau}{1 + \omega^2 \tau^2} + \frac{4\tau}{1 + 4\omega^2 \tau^2} \right],$$
$$\frac{1}{T_{2n}} = \frac{3}{80} \frac{j^4 \hbar^2}{b^6} \left[ 3\tau + \frac{5\tau}{1 + \omega^2 \tau^2} + \frac{2\tau}{1 + 4\omega^2 \tau^2} \right], \quad (1)$$

где  $\tau$  — время корреляции;  $j$  — гиромагнитное отношение для протонов;  $\hbar = h/2\pi$ , где  $h$  постоянная Планка;  $b$  — расстояние между протонами в

молекуле воды;  $\omega$  — частота ядерной прецессии во внешнем поле  $H_0$ . Имея в виду наличие в волокнах нативного типа по крайней мере двух фракций воды (связанной — невымораживаемой и свободной воды) и допустив обмен между протонами, принадлежащими этим фракциям, мож-

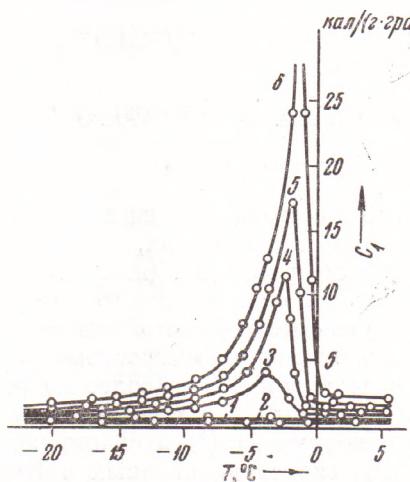


Рис. 1. Температурная зависимость теплоемкости 1 г коллагена при различном содержании воды (в граммах  $H_2O$  на 1 г белка): 1 — 0; 2 — 0,35; 3 — 0,64; 4 — 1,0; 5 — 1,3; 6 — 2,0

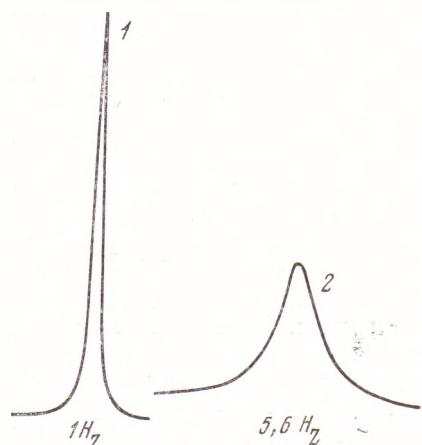


Рис. 2. Спектр я.м.р. высокого разрешения в 0,15 M NaCl (1) и в коллагеновых волокнах нативного типа (2) (pH 7,0; 0,15 M NaCl;  $C=2,3\%$ ;  $T=20^\circ$ )

но, согласно <sup>(8)</sup>, следующим образом представить значения времен  $T_1$  и  $T_2$ :

$$1/T_1 = 1/T_{1w} + CW/T_{1n}, \quad 1/T_2 = 1/T_{2w} + CW/T_{2n}, \quad (2)$$

где  $T_1$  и  $T_2$  — экспериментальные значения времен релаксации;  $T_{1w}$  и  $T_{2w}$  — времена релаксации для растворителя;  $T_{1n}$  и  $T_{2n}$  — времена релаксации протонов молекул воды, связанных с макромолекулами;  $C$  — концентрация вещества;  $W$  — количество связанной воды в весовых процентах.

Имея в виду следующие соотношения <sup>(8)</sup>:

$$W_1 = K_1 T_{1n} \quad \text{и} \quad W_2 = K_2 T_{2n}, \quad (3)$$

где  $W_1$  и  $W_2$  — весовые проценты «невращательно гидратированной» воды;  $K_1$  и  $K_2$  — экспериментальные константы, определяемые из зависи-

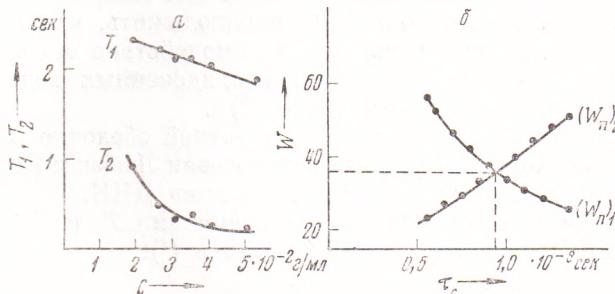


Рис. 3. а — зависимость времен релаксации  $T_1$  и  $T_2$  от концентрации коллагена,  $\Delta T_1 = \pm 2\%$ ,  $\Delta T_2 = \pm 2-3\%$ ; б — графическое решение уравнений (1) и (3) для определения «невращательной гидратации» ( $W$ ) и времени корреляции ( $\tau$ ),  $\Delta W = \pm 10\%$

мостей  $T_1 = f(C)$  и  $T_2 = f(C)$  (рис. 3а) соответственно, можно получить графическое решение уравнений (1) и (3) <sup>(8)</sup>. Точка пересечения кривых  $W_1 = f(\tau)$  и  $W_2 = f(\tau)$  представляет численное решение уравнений (1) и (3), содержащих неизвестные величины  $W$  и  $\tau$  (рис. 3б).

Таким образом, мы можем предложить модель гидратации коллагена, которая предполагает существование двух фракций гидратной воды:

а) внутреннего слоя «невращательно гидратированной» воды, имеющего регулярную структуру и характеризующегося временем корреляции  $\tau=0,9 \cdot 10^{-8}$  сек.; количество воды в этой фракции равно  $0,36 \pm 0,08$  г  $\text{H}_2\text{O}$  на 1 г белка, что соответствует той критической концентрации, при которой на температурной зависимости теплоемкости растворов коллагена не

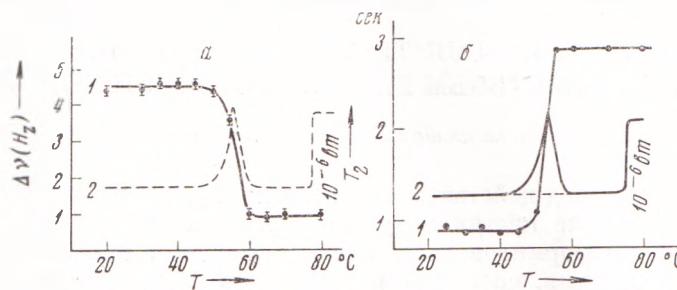


Рис. 4. 1 – температурная зависимость ширины линии я.м.р. воды (а) и времени спин-спиновой релаксации  $T_2$  (б) в волокнах,  $\Delta T_2 = \pm 2-3\%$ ; 2 – калориметрическая запись теплопоглощения при плавлении волокон

наблюдается никакого теплового эффекта, связанного с плавлением свободной воды (рис. 1, 2) б) внешнего гидратного слоя ( $\sim 0,20$  г  $\text{H}_2\text{O}$  на 1 г белка), являющегося более разупорядоченным и нестереоспецифичным и проявляющегося при большом содержании воды.

На рис. 4а приведена температурная зависимость ширины линии я.м.р. протонов воды в коллагеновых волокнах. Кривая имеет типичный вид, характерный для процессов конформационных переходов макромолекул в растворах. Такое же поведение проявляют и температурные зависимости времен  $T_1$  и  $T_2$ . Величина  $T_2$  изменяется резко (рис. 4б), и ее значение при высоких температурах соответствует величине времени спин-спиновой релаксации, характерной для чистой воды и буферных растворов. Как видно из рис. 4а, интервал температур, в котором происходят резкие изменения релаксационных параметров протонов молекул воды в волокнах, совпадает с температурной областью процесса теплопоглощения (рис. 4, 2), соответствующего переходу коллагеновых волокон нативного типа в клубкообразное состояние (2) (теплота перехода составляет 18 кал. на 1 г белка).

Таким образом, одновременно с переходом волокон в клубкообразное состояние происходит «плавление» упорядоченной – регулярной структуры гидратной воды. Следовательно, для полного описания конформационных переходов биополимеров и их надмолекулярных структур в растворах необходимо рассматривать не только переход порядок – беспорядок самих полипептидных или полинуклеотидных цепей, но и переход порядок – беспорядок в растворителе (воде).

Авторы выражают глубокую благодарность Э. Л. Андроникашвили за всестороннюю помощь и проф. Л. Л. Буишвили и Н. П. Гиоргадзе за обсуждение работы, а также проф. Э. И. Федину за предоставленную возможность проведения серии экспериментов на спектрометрах ИЭОС АН СССР.

Институт физики  
Академии наук ГрузССР  
Тбилиси

Поступило  
27 XI 1973

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> G. C. Wood, M. K. Keech, Biochem. J., v. 75, 588 (1960). <sup>2</sup> Э. Л. Андроникашвили, Д. Р. Монаселидзе и др., Молек. биол., т. 6, 915 (1972). <sup>3</sup> Э. Л. Андроникашвили, Г. М. Мрэвлишвили, В сборн. VI Всесоюзная конференция по калориметрии, Тбилиси, 1973, стр. 490. <sup>4</sup> H. V. Carr, E. M. Purcell, Phys. Rev., v. 94, 630 (1954). <sup>5</sup> S. Meiboom, D. Gill, Rev. Sci. Instr., v. 29, 688 (1958). <sup>6</sup> C. F. Hazlewood, B. U. Nichols, N. F. Chamberlain, Nature, v. 222, 747 (1969). <sup>7</sup> B. Lubas, T. Wilczek, Biochim. et biophys. acta, b. 120, 427 (1966). <sup>8</sup> I. Solomon, Phys. Rev., v. 99, 559 (1955).