

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

ГИДРАТАЦИЯ КОЛЛАГЕНОВЫХ ВОЛОКОН НАТИВНОГО ТИПА

(Представлено академиком И. М. Лифшицем 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 кислотнорастворимого 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-НЛ. Для определения времен продольной (T_1) и поперечной (T_2) релаксации применяли импульсный спектрометр SXP-4-100 и релаксометр «Minispec» Р-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 H_2O на 1 г белка. Обращает на себя внимание тот факт, что существует критическая концентрация полимера в растворе (при 0,35 г H_2O 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 М 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 Нз. 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 Вильчоком ⁽⁷⁾ для определения «невращательной гидратации» ДНК.

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

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

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

молекуле воды; ω — 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-

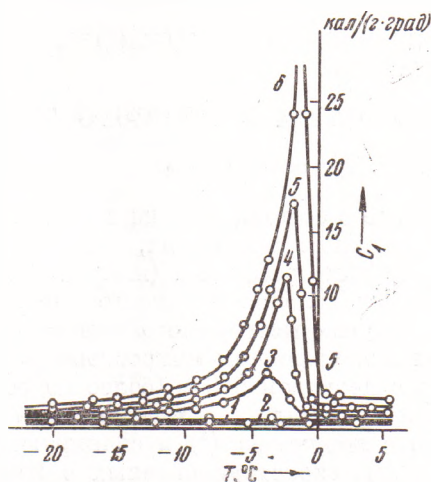


Рис. 1. Температурная зависимость теплоемкости 1 г коллагена при различном содержании воды (в граммах H_2O на 1 г белка): 1 — 0; 2 — 0,35; 3 — 0,64; 4 — 1,0; 5 — 1,3; 6 — 2,0

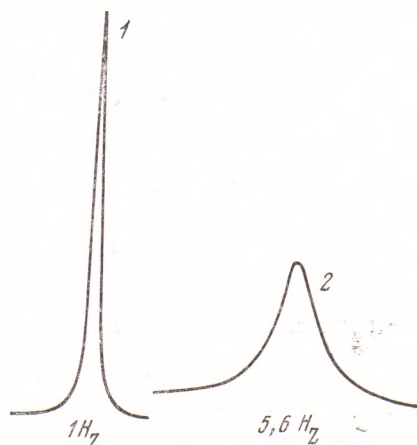


Рис. 2. Спектр я.м.р. высокого разрешения в 0,15 M NaCl (1) и в коллагеновых волокнах нативного типа (2) (pH 7,0; 0,15 M NaCl; $C=2,3\%$; $T=20^\circ$)

но, согласно ⁽⁸⁾, 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 ⁽⁸⁾:

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

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

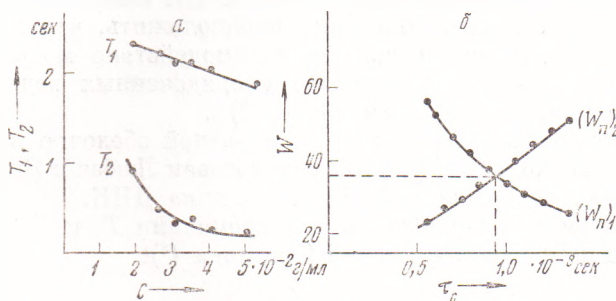


Рис. 3. а — зависимость времен релаксации T_1 и T_2 от концентрации коллагена, $\Delta T_1 = \pm 2\%$, $\Delta T_2 = \pm 2-3\%$; б — графическое решение уравнений (1) и (3) для определения «невозвратной гидратации» (W) и времени корреляции (τ), $\Delta W = \pm 10\%$

мостей $T_1 = f(C)$ и $T_2 = f(C)$ (рис. 3а) соответственно, можно получить графическое решение уравнений (1) и (3) ⁽⁸⁾. Точка пересечения кривых $W_1 = f(\tau)$ и $W_2 = f(\tau)$ представляет численное решение уравнений (1) и (3), содержащих неизвестные величины W и τ (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 H_2O на 1 г белка, что соответствует той критической концентрации, при которой на температурной зависимости теплоемкости растворов коллагена не

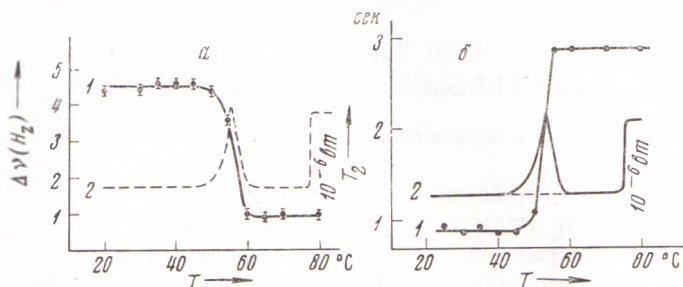


Рис. 4. 1 — температурная зависимость ширины линии я.м.р. воды (а) и времени спин-спиновой релаксации T_2 (б) в волокнах, $\Delta T_2 = \pm 2-3\%$; 2 — калориметрическая запись теплопоглощения при плавлении волокон

наблюдается никакого теплового эффекта, связанного с плавлением свободной воды (рис. 1, 2) б) внешнего гидратного слоя ($\sim 0,20$ г H_2O 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

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