БИОФИЗИКА И МЕДИЦИНСКАЯ ФИЗИКА

УДК 577.32

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ПОДВИЖНОСТЬ В РАСТВОРАХ КОЛЛАГЕНА, СОДЕРЖАЩИХ ИОНЫ МЕТАЛЛОВ С РАЗЛИЧНЫМИ ИОННЫМИ РАДИУСАМИ

Г. П. Петрова, Ю. М. Петрусевич, И. А. Перфильева, М. С. Иванова, Чжан Сяолэй

(кафедра молекулярной физики; кафедра медицинской физики) E-mail: petrova@phys.msu.ru; perfilieva@phys.msu.ru

Методом фотонно-корреляционной спектроскопии определены динамические параметры молекул коллагена в растворах. Получены зависимости коэффициентов трансляционной диффузии от рН в чистых водных растворах коллагена и в растворах, содержащих соли различных металлов: Na, Ca, K, Pb. Обнаружено, что размер ионного радиуса металла влияет на межмолекулярные взаимодействия и подвижность молекул коллагена в растворе.

Введение

Безусловный интерес представляет изучение свойств водных растворов коллагена, принадлежащего к классу фибриллярных белков. Коллаген выполняет главную структурную роль в организме [1]. Около 40% всего коллагена находится в коже, 10-20 — в костях и зубах и 7-8% — в кровеносных сосудах. Необычная структура молекулы коллагена (тройная спираль) приводит к особенностям его оптических свойств и молекулярной подвижности.

Изменения показателя рН или концентрации соли в растворе могут привести к изменениям в структуре молекулы белка. В связи с этим очень важными являются исследования как структурных изменений коллагена в водных растворах, так и процессов, связанных с объединением молекул в коллагеновые цепи — фибриллы, что определяет уникальные свойства костей, кожи и других тканей.

Для изучения межмолекулярных взаимодействий и динамики молекул в растворе могут быть успешно использованы оптические методы. В настоящей работе для исследования динамики молекул коллагена применяется метод фотонно-корреляционной спектроскопии рассеянного света [2]. В этом методе исследуется корреляционная функция флуктуаций интенсивности рассеянного света.

Метод динамического светорассеяния

Динамическое рассеяние света связано с флуктуациями концентрации рассеивающих частиц. Для растворов макромолекул возможно связать корреляционную функцию сигнала g(t) для рассеянного света с коэффициентом трансляционной диффузии D_t :

$$g^{(1)}(t) = a\langle E^*(0)E(t)\rangle = c_0 \exp(-D_t k^2 t)$$
 (а и c_0 — константы).

Соответствующий метод определения корреляционных функций g(t) называется методом корреляции фотонов. При этом могут быть получены значения коэффициентов трансляционной диффузии частиц и их гидродинамических радиусов.

В работе [3] была исследована связь между статическими и динамическими параметрами рассеяния света для растворов макромолекул. Как оказалось, концентрационная зависимость коэффициента трансляционной диффузии D_t может быть представлена в виде вириального разложения по концентрации. В соответствии с этим связь между коэффициентом D_t , массой молекулы M и характеристической вязкостью белкового раствора $[\eta]$ определяется уравнением

$$D_t = D_0 \{ 1 + (2BM - [\eta])c \}. \tag{1}$$

Здесь D_0 — коэффициент диффузии, определяемый по формуле Стокса—Эйнштейна для сферической незаряженной частицы:

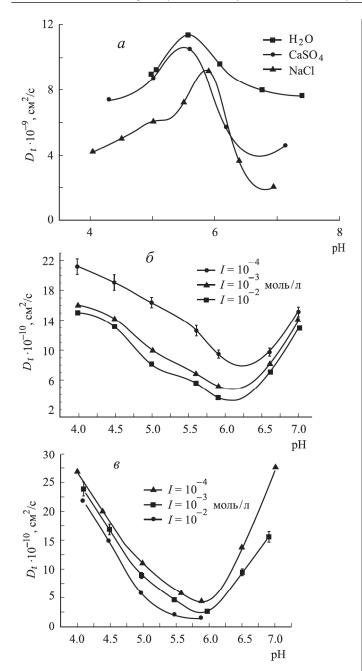
$$D_0 = \frac{kT}{6\pi\eta_0 R},$$

где R — радиус частицы.

Согласно формуле (1), в случае заряженных частиц в растворе коллагена коэффициент трансляционной диффузии D_t должен зависеть от концентрации макромолекул, их суммарного поверхностного заряда и ионной силы раствора.

Экспериментальные результаты и обсуждение

При исследовании динамических параметров молекул коллагена в чистом водном растворе и в растворах с добавлением солей CaSO₄ и NaCl были



Зависимость коэффициента трансляционной диффузии D_t коллагена от показателя pH: a — в чистом водном растворе (кривая I), с добавлением соли CaSO $_4$ (кривая 2), с добавлением соли NaCl (кривая 3); δ — для водных растворов коллагена с добавлением соли KCl (для трех ионных сил раствора $I=10^{-2}$, 10^{-3} , 10^{-4} моль/л); δ — для водных растворов коллагена с добавлением соли Pb(CH $_3$ COO) $_2$ (для трех ионных сил раствора $I=10^{-2}$, 10^{-3} , 10^{-4} моль/л)

получены нелинейные зависимости коэффициента трансляционной диффузии от показателя рН с максимумом вблизи изоэлектрической точки рН 6.0 (минимальное значение поверхностного заряда молекулы белка) (рисунок, а). Справа и слева от изоэлектрической точки коэффициент диффузии уменьшается.

В соответствии с формулой (1) коэффициент трансляционной диффузии белка должен уменьшаться, если его характеристическая вязкость превышает произведение массы молекулы на коэффициент межмолекулярного взаимодействия. Действительно, как следует из работы [4], характеристическая вязкость коллагена (1150 см³/г) более чем на два порядка выше, чем вязкость таких глобулярных белков, как, например, альбумин (3.7 см³/г).

Ранее в работе [5] нами было показано, что в водных растворах альбумина и гамма-глобулина коэффициент трансляционной диффузии D_t имеет минимум в изоэлектрической точке, а не максимум, как в растворах коллагена. Это определяется тем, что для этих белков произведение BM в (1) имеет большую величину по сравнению с коэффициентом характеристической вязкости $[\eta]$.

Характер зависимости коэффициента D_t коллагена резко меняется при добавлении в раствор солей КСІ и $Pb(CH_3COO)_2$ (рисунок, δ , θ).

Как было показано в [6], присутствие в растворе ионов с большим ионным радиусом приводит к преобладанию сил диполь-дипольного взаимодействия между молекулами белка по сравнению с силами кулоновского отталкивания и образованию макромолекулярных комплексов (кластеров) вблизи изоэлектрической точки. Ионный радиус K^+ и Pb^{2+} гораздо больше, чем у ионов Ca^{2+} и Na^+ (для сравнения: $R_{K^+}=1.33$ Å, $R_{Pb^{2+}}=1.2$ Å, $R_{Ca^{2+}}=0.99$ Å, $R_{Na^+}=0.8$ Å). Крупные частицы обладают меньшей подвижностью и большой массой. Как можно видеть, зависимость коэффициента диффузии D_t от показателя pH в растворах коллагена с ионами калия и свинца аналогична наблюдаемой для глобулярных белков.

Сравнение величин коэффициентов диффузии в водных растворах коллагена, содержащих соли KCl и $Pb(CH_3COO)_2$, показывает, что с ростом ионной силы раствора коэффициент диффузии уменьшается (рисунок, δ , δ). Это указывает на то, что с увеличением концентрации ионов K^+ и Pb^{2+} в растворе масса рассеивающих частиц также растет.

При ионной силе раствора $I=10^{-2}$ моль/л оказалось невозможно измерить D_t при показателе рН выше изоэлектрической точки белка (рН 6.0) (рисунок, θ). По-видимому, присутствие достаточно большой концентрации соли тяжелого металла свинца $Pb(CH_3COO)_2$ приводит к так называемому «высаливанию» белка (показатель рН раствора больше не растет; в растворе выпадает белый осадок).

Заключение

С помощью метода динамического светорассеяния были исследованы молекулярные параметры коллагена в водных растворах с добавлением солей

CaSO₄, NaCl, KCl и Pb(CH₃COO)₂. Было обнаружено, что размер ионных радиусов металлов сильно влияет на электростатические взаимодействия между макромолекулами белка. Взаимодействие ионов калия, так же как и иона тяжелого металла свинца, обладающих сравнительно большими ионными радиусами (K⁺ — 1.33 Å, Pb²⁺ — 1.2 Å), в растворах с коллагеном приводят к образованию макромолекулярных комплексов — дипольных белковых наноструктур. При наличии в растворах коллагена ионов кальция или натрия с меньшими ионными радиусами (Ca²⁺ — 0.99 Å, Na⁺ — 0.8 Å) наноструктуры не образуются.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 05-02-17838).

Литература

- 1. Ленинджер А.Л. Основы биохимии. М., 1985.
- 2. Камминс Г.З., Пайк Е.Р. Спектроскопия оптического смешения и корреляция фотонов. М., 1978.
- 3. Петрова Г.П., Петрусевич Ю.М. // Биомедицинская радиоэлектроника. 2000. № 3. С. 41.
- 4. Маршелл Э. Биофизическая химия. Т. 1. М., 1981.
- 5. *Бойко А.В., Гаркуша Е.В., Петрова Г.П.* и др. Структурные фазовые переходы в растворах белков, содержащих ионы легких и тяжелых металлов. Препринт МГУ № 2/2005. М., 2005.
- 6. *Петрова Г.П., Петрусевич Ю.М., Тен Д.И.* // Квантовая электроника. 2002. **32**, № 10. С. 897.

Поступила в редакцию 28.03.2008