



МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

---

Физический факультет

На правах рукописи

**Сергеева Ирина Александровна**

**Особенности межмолекулярного взаимодействия молекул  
коллагена в водных растворах**

03.00.02 – биофизика, 03.00.16 – экология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата физико-математических наук

Москва-2009

Работа выполнена на кафедре молекулярной физики физического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

Научный руководитель: доктор физико-математических наук,  
профессор Петрова Галина Петровна

Официальные оппоненты: доктор физико-математических наук,  
профессор Рууге Энно Куставич

кандидат физико-математических наук,  
ведущий научный сотрудник  
Захаров Станислав Дмитриевич

Ведущая организация: Институт проблем нефти и газа РАН

Защита диссертации состоится \_\_\_\_\_ июня 2009 года в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 501.002.11 в МГУ им. М.В. Ломоносова по адресу: 119992, ГСП-1, Москва, Ленинские горы, МГУ им. М.В.Ломоносова, Физический факультет, аудитория \_\_\_\_\_.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке физического факультета МГУ имени Ломоносова.

Автореферат разослан \_\_\_\_\_ мая 2009 года.

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 501.002.11,  
доктор физико-математических наук

Г.Б. Хомутов

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность исследования

Коллаген является одним из наиболее важных и распространённых белков в живых организмах, составляя одну треть всех белков массы человеческого тела. Различают около двух десятков типов коллагенов, самыми распространёнными из них являются первые четыре. Коллаген типа 1 - главный компонент кожи, сухожилий, связок и костей. Коллаген типа 2 - главный компонент хрящевой ткани. Коллаген типа 3 - упрочняющий компонент стенок полых органов, в том числе кровеносных сосудов и кишечника. Коллаген типа 4 - упрочняющий компонент базальной пластины эпителия, фильтров в кровеносных капиллярах и других структурах. Коллаген выполняет главную структурную роль в организме. 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.

Металлы необходимы для нормальной жизнедеятельности человеческого организма. Тем не менее, превышение допустимой концентрации металлов в окружающей среде создает серьезную угрозу здоровью человека. Особенно опасны тяжелые металлы. Попадая в организм человека, они даже в небольших концентрациях способны серьезно нарушить нормальное течение физиологических процессов в организме.

В значительной мере это связано с биологической активностью многих из них. Многие тяжелые металлы проявляют комплексообразующие свойства. Так, в водных средах ионы этих металлов гидратированы и способны образовывать различные гидроксокомплексы, состав которых зависит от кислотности раствора. Если в растворе присутствуют какие-либо анионы или молекулы органических соединений, то ионы этих металлов образуют разнообразные комплексы различного строения и устойчивости.

Белки в водных растворах имеют тенденцию к агрегации в зависимости от их физико-химического состояния. Этот процесс часто бывает необратимым и может являться признаком некоторых серьезных заболеваний в организме человека.

Агрегация и другие процессы, происходящие с белковыми макромолекулами в

растворах, зависят от природы белков, их концентрации, типа растворителя, солей, ионов металлов, кислот, оснований, показателя  $pH$ , температуры и других факторов.

Патологические изменения в структуре коллагеновых фибрилл являются причиной ряда заболеваний соединительной ткани и характеризуются поражением органов, а именно, суставов, сердца, сосудов, мышечной и кожной ткани.

### **Цель и задачи исследования**

**Целью данной работы** было исследование молекулярно-динамических процессов, происходящих в растворах молекул коллагена при воздействии различных параметров среды ( $pH$ , концентрация белка, ионная сила, температура), в том числе вредное воздействие ионов токсичных металлов методами статического и динамического рассеяния света.

Исходя из общей цели, в диссертации ставился ряд практических задач:

- исследование растворов макромолекул коллагена при изменении показателя  $pH$  среды с помощью метода статического рассеяния света;
- изучение влияния ионов металлов с различными ионными радиусами на динамические свойства молекул белка в водных растворах методом фотонно - корреляционной спектроскопии;
- получение и обработка угловых зависимостей интенсивности рассеянного света водных растворов коллагена при добавлении солей различных металлов с помощью метода динамического светорассеяния;
- исследование температурных зависимостей коэффициента трансляционной диффузии молекул в водных растворах коллагена в интервале температур от  $24 \div 50^{\circ}C$ .

### **Научная новизна диссертации**

Научная новизна диссертации обусловлена рядом экспериментальных результатов, впервые полученных в данной работе:

1. С помощью метода статического светорассеяния были получены зависимости эффективной массы макромолекул коллагена в водных растворах при различных значениях показателя  $pH$  среды. При  $pH$  4.5 значение молекулярной массы

коллагена  $M=297000$  г/моль хорошо согласуется с литературными данными.

2. Впервые была определена изоэлектрическая точка белка коллагена –  $pH$  6.0 методом интегрального рассеяния света. Для определения изоэлектрической точки коллагена исследовалась зависимость коэффициента деполаризации от  $pH$  раствора. Экстремум этой зависимости наблюдается при значении  $pH$  6.0.
3. Получено, что зависимость коэффициента межмолекулярного взаимодействия от  $pH$  в водных растворах коллагена нелинейна и имеет параболический характер с минимумом в изоэлектрической точке  $pH$  6.0 белка.
4. Впервые с помощью метода фотонно - корреляционной спектроскопии получены значения коэффициента трансляционной диффузии в чистом водном растворе коллагена и в растворах, содержащих соли  $CaSO_4$  и  $NaCl$ .  $pH$  – зависимости коэффициента  $D_t$  имеют максимум близи изоэлектрической точки белка.
5. Впервые обнаружено, что размер ионных радиусов металлов сильно влияет на характер электростатического взаимодействия между макромолекулами коллагена. Взаимодействие ионов калия и тяжелого металла свинца, обладающих сравнительно большими ионными радиусами ( $K^+$  - 1,33Å,  $Pb^{2+}$  - 1,2Å), в растворах с коллагеном приводят к образованию макромолекулярных комплексов – дипольных белковых наноструктур.
6. Было показано, что значения коэффициентов трансляционной диффузии в водных растворах коллагена, содержащих соли  $KCl$  и  $Pb(CH_3COO)_2$ , уменьшаются с ростом ионной силы раствора. Это указывает на увеличение массы частиц в растворах с ростом концентрации ионов  $K^+$  и  $Pb^{2+}$ .
7. С помощью данных по угловому рассеянию света в водных растворах коллагена с солями  $CaSO_4$ ,  $NaCl$ ,  $KCl$  и  $Pb(CH_3COO)_2$  оказалось возможным определить наиболее вероятную форму и размер наноструктур, образующихся в результате взаимодействия ионов металлов с молекулами белка.
8. Установлено, что коэффициент трансляционной диффузии при нагревании водного раствора коллагена имеет характерную зависимость с минимумом в области оптимальной температуры тела человека ( $37^{\circ}C$ ). В области данной температуры наблюдается, вероятно, фазовый переход и дальнейшее нагревание

приводит к необратимым изменениям в структуре молекул белка - его денатурации.

9. Получено, что коэффициент трансляционной диффузии  $D_t$  при нагревании водных растворах коллагена, содержащих ацетат свинца, резко увеличивается в области температур 37-40°C, что вероятно, связано с разрушением дипольных кластеров.

### **Научно – практическая значимость исследования**

*Практическая ценность* предлагаемого исследования заключается в том, что полученные в работе результаты способствуют развитию представлений о молекулярно-динамических процессах, происходящих в растворах белковых макромолекул, содержащих ионы легких и тяжелых металлов, а также вносят вклад в понимание природы межмолекулярных взаимодействий.

Изученное в работе поведение макромолекул коллагена в растворах и их взаимодействие с ионами различных солей, в том числе с ионами тяжелых металлов, позволяет установить возможные патологические процессы в организме человека, происходящие под воздействием неблагоприятных факторов окружающей среды.

Как известно, токсичные и ядовитые вещества могут проникать внутрь организма через кожу и накапливаться в нем. Именно в коже содержится большая часть коллагена первого типа, который и являлся объектом исследования в данной работе. Содержание тяжелых металлов в окружающей нас среде увеличивается быстрыми темпами в результате деятельности человека, в связи с этим, изучение воздействия этих вредных факторов на организм человека, в том числе на слизистые оболочки и кожный покров, имеет важное практическое значение для медицины, экологии и косметологии.

### Защищаемые положения

1. На основании данных по статическому рассеянию света было получено, что коэффициент межмолекулярного взаимодействия имеет минимальное значение при  $pH\ 6.0$  в водных растворах коллагена; эффективная масса молекул коллагена изменяется при различных значениях  $pH$  раствора, причем максимальное значение молекулярной массы белка соответствует  $pH\ 6.0$ . Впервые была определена изоэлектрическая точка коллагена  $pH\ 6.0$  по зависимости коэффициента деполяризации от показателя раствора  $pH$ .
2. Впервые обнаружено образование наночастиц – белковых кластеров коллагена в водных растворах при взаимодействия молекул белка с ионами калия и свинца.
3. Показано, что массы образующихся наночастиц зависят от ионной силы растворов - увеличиваются с ростом концентрации ионов.
4. Обнаружен фазовый переход в водных растворах коллагена при температуре  $37^{\circ}C$ . Дальнейшее увеличение температуры приводит к необратимым изменениям в структуре молекул белка.
5. Обнаружено, что нагревание растворов коллагена, содержащих соль ацетата свинца, приводит к разрушению нанокластеров в области температур  $37-40^{\circ}C$ .

### Апробация работы

Основные результаты диссертационной работы были представлены на конференциях: Международные конференции студентов, аспирантов и молодых ученых по фундаментальным наукам «Ломоносов-2005, 2008» (Москва, 2005, 2008), «2nd Meeting “NMR in Life Sciences”» (Saint Petersburg, 2005), Международная конференция молодых ученых, посвященная всемирному дню физика (Москва, 2005), International conference ALT-06 (Romania, 2006), International conference ALT-07 (Finland, 2007), Научная конференция «Ломоносовские чтения – 2007» (Москва, 2007), Научная конференция «Ломоносовские чтения – 2009» (Москва, 2009), International Conference on Laser Applications in Life Sciences (LALS-2007) (Moscow, 2007).

### ***Публикации***

По материалам диссертационной работы имеется 16 публикаций, в числе которых 6 статей в российских и международных научных журналах.

### ***Структура и объем работы***

Диссертация состоит из введения, 6 глав, заключения и списка литературы, содержащего 104 наименований. Объем работы составляет 108 страниц, включая 47 рисунков и 6 таблиц.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

**Во введении** дана общая характеристика диссертационной работы, обоснована актуальность темы, сформулированы цели и задачи исследования, изложены научная новизна и практическая ценность полученных результатов.

**Первая глава** содержит общие сведения о химическом составе и строении белковых макромолекул, и их физических свойствах. Дана краткая характеристика объекта исследования – коллагена I типа.

Изложены основные положения теории Дебая-Хюккеля, описывающей поведение полиэлектролитов в растворе в свете простейшей модели твердых сфер, погруженных в сплошную среду и взаимодействующих по закону Кулона. Согласно этой теории, каждая молекула оказывается окруженной атмосферой противоионов, что приводит к частичной экранировке кулоновских взаимодействий.

Введены понятия ионной силы, водородного показателя среды и изоэлектрической точки, определена связь водородного показателя с поверхностным зарядом макромолекулы.

**Во второй главе** описывается метод статического светорассеяния. Изложены основные положения теории интегрального рэлеевского рассеяния света на флуктуациях концентрации растворенного вещества. Освещены особенности влияния анизотропии рассеивающих частиц на деполяризацию рассеянного света и ослабление света в растворах.

Согласно теории Рэлея-Дебая с помощью экспериментально измеренного коэффициента рэлеевского рассеяния

$$R_{90} = \frac{I_{90} r^2}{I_0 \Omega} = \frac{2 \pi^2 n_0^2}{\lambda_0^4 N_A} \left( \frac{dn}{dc} \right)^2 cM = cHM$$

можно определить массу рассеивающих частиц  $M$  и коэффициент межмолекулярного взаимодействия  $B$  для неидеальных разбавленных растворов с учетом вириального разложения осмотического давления по степеням концентрации  $c$ , поскольку в этом случае

$$\left( \frac{cHK}{R_{90}} \right) = \frac{1}{M} + 2Bc + \dots,$$

где  $R_{90}$  – рэлеевский коэффициент рассеяния,  $K$  – фактор Кабанна –

$K(\Delta_v) = \frac{3 + 3\Delta_v}{3 - 4\Delta_v}$ , определяемый оптической анизотропией рассеивающих частиц

и связанный с коэффициентом депolarизации рассеянного света  $\Delta_v = \frac{I_h^v}{I_v^v}$ , где  $I_h^v$  –

интенсивность компоненты рассеянного света с горизонтальным направлением поляризации по отношению к вертикальной поляризации падающего света и  $I_v^v$  – интенсивность вертикально поляризованной компоненты рассеянного излучения.

Метод дает возможность прямого определения молекулярной массы  $M$ , для чего необходимо измерить  $R_{90}$  при нескольких концентрациях и экстраполировать полученную зависимость  $cHK/R_{90} = f(c)$  к концентрации  $c=0$ . Наклон этой прямой, равный  $2B$ , позволяет вычислить второй вириальный коэффициент  $B$ , который характеризует степень отклонения поведения раствора от идеального и служит мерой межмолекулярного взаимодействия в растворе.

**В главе 3** описывается метод динамического светорассеяния. Динамические параметры макромолекул могут быть изучены с помощью метода корреляционной спектроскопии. В этом методе исследуется корреляционная функция флуктуаций интенсивности рассеянного света, обусловленных броуновским движением частиц раствора.

Для растворов макромолекул возможно связать корреляционную функцию  $g(t)$  для рассеянного света, с коэффициентом трансляционной диффузии  $D_i$ :

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

При этом могут быть определены коэффициенты трансляционной диффузии частиц и их гидродинамические радиусы.

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 уравнение

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

Здесь  $D_0$  – коэффициент диффузии, определяемый по формуле Стокса – Эйнштейна  $D_0 = \frac{kT}{f}$ , а характеристическая вязкость  $[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta - \eta_0}{c\eta_0}$  – предельное значение вязкости при  $c \rightarrow 0$ , где  $\eta_0$  – вязкость растворителя. Величина  $[\eta]$  связана с размерами и формой макромолекул в растворе и используется для их определения.

**Глава 4** содержит литературный обзор, посвященный исследованию физических свойств коллагена в растворах.

Первые две части главы освещают основные результаты работ по измерению коэффициентов трансляционной  $D_t$  и вращательной  $D_r$  диффузий молекул коллагена, исследованию молекулярных параметров белка (массы, структуры, размеров), механизмов межмолекулярного взаимодействия и процессов фибриллообразования в растворах коллагена методами статического и динамического светорассеяния. Особое внимание уделено работам Доти, Флетчера и Пекора.

В третьей части описываются процессы, происходящие в водных растворах коллагена при нагревании: структурные изменения макромолекул белка с ростом температуры и превращение его в желатин.

Также обсуждается особое значение и место данной работы в современном представлении молекулярно-динамических процессов, происходящих в водных растворах коллагена.

**Глава 5** содержит подробное описание эксперимента и результаты исследования водных растворов коллагена при различных значениях  $pH$  среды и включает в себя несколько разделов.

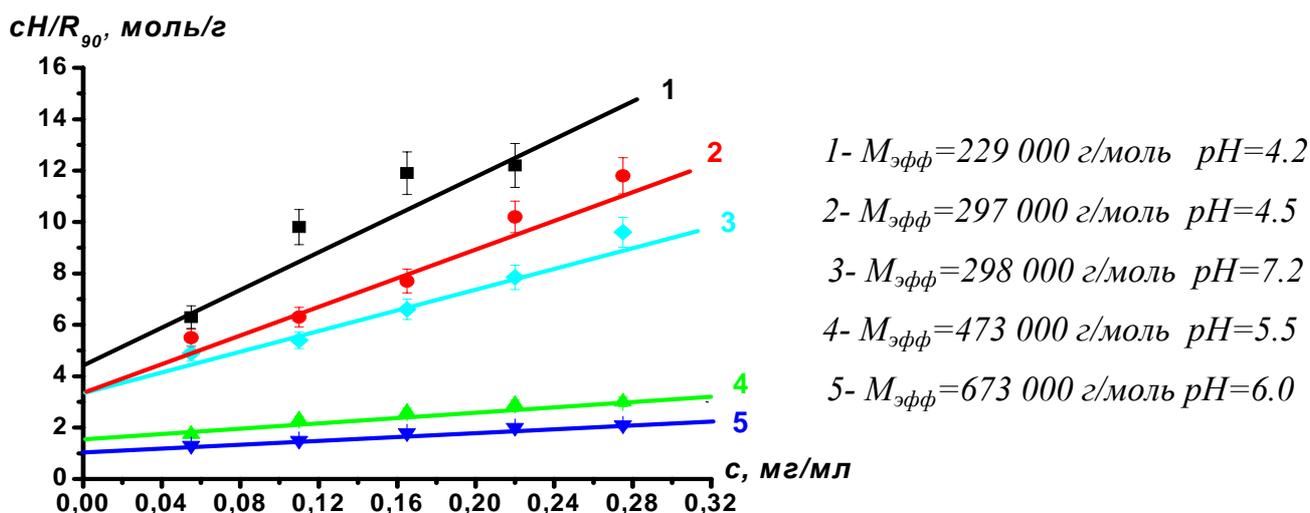
**Раздел 5.1** посвящен описанию объекта исследования и подготовки образцов. В работе был исследован растворимый коллаген I типа из телячьей кожи немецкой фирмы "Sigma-Aldrich". Для изменения показателя  $pH$  среды применялись слабые растворы уксусной кислоты  $CH_3COOH$  и щёлочи  $KOH$ . Подробно изложена методика и условия приготовления исследуемых систем с заданными параметрами.

**В разделе 5.2** приводится описание экспериментальной установки. Измерения проводились на установке с  $He-Ne$  лазером  $ГН 25-1$  и фотоэлектрической регистрацией рассеянного излучения. Система позволяет разделить поляризованную и деполаризованную компоненты рассеянного излучения и измерять их интенсивности независимо. Обработка сигнала проводилась в автоматическом режиме с помощью компьютера непосредственно в течение эксперимента. В качестве эталонной жидкости использовался обеспыленный бензол в стеклянной запаянной ампуле.

**В разделе 5.3** представлены результаты экспериментального исследования водных растворов коллагена методом статического светорассеяния.

На *рис.1* представлены зависимости параметра рассеяния растворов коллагена от его концентрации для различных значений  $pH$ . При  $pH$  4.2 наблюдается наибольший наклон этой зависимости, а минимальный - при  $pH$  6.0. Значение эффективной массы коллагена увеличивается с ростом показателя  $pH$ :

$M_{эфф}=229\ 000$  г/моль ( $pH$  4.2) и  $M_{эфф}=673\ 000$  г/моль ( $pH$  6.0).



*Рис.1* Концентрационная зависимость параметра рассеяния  $cH/R_{90}$  в водных растворах коллагена при различных значениях  $pH$ .

Согласно теории Скэтчарда коэффициент межмолекулярного взаимодействия должен иметь минимальное значение в изоэлектрической точке белка. При обработке экспериментальных данных была рассчитана зависимость коэффициента межмолекулярного взаимодействия для молекул коллагена при различных значениях  $pH$  (рис.2). Видно, что кривая имеет зависимость, близкую к параболической с минимумом при  $pH$  6.0.

Независимое исследование коэффициента деполяризации рассеянного света при изменении  $pH$  в растворах коллагена (рис. 3) показывает наличие экстремума при  $pH$  6.0, что связано с минимизацией суммарного поверхностного заряда на молекуле коллагена.

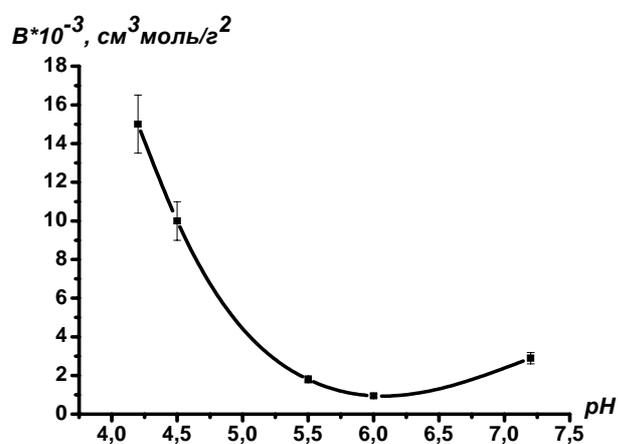


Рис.2 Зависимость коэффициента межмолекулярного взаимодействия от  $pH$  среды.

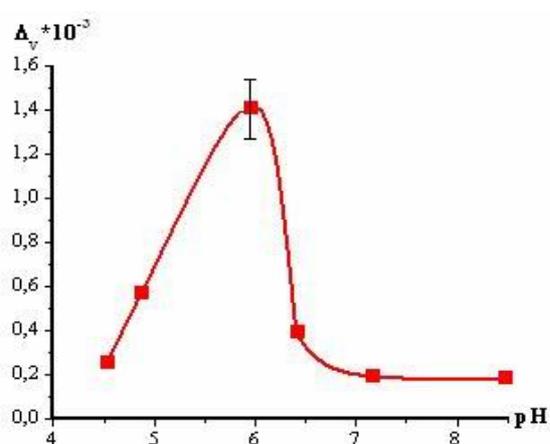


Рис.3 Зависимость коэффициента деполяризации от  $pH$ .

**Раздел 5.4** посвящен обсуждению полученных результатов и выводам к главе 5.

Из сопоставления экспериментальных данных видно, что эффективная масса рассеивающих частиц увеличивается в области изоэлектрической точки белка (рис.1). Это дает основание предполагать, что при увеличении показателя  $pH$  раствора, возможно, наблюдается тенденция к слипанию двух или даже трех молекул коллагена. Этот процесс может происходить, когда поверхностный заряд на белке минимален. При этом возможно взаимодействие между молекулами за счет сил Ван-дер-Ваальсова притяжения, в результате чего эффективная масса молекул коллагена

увеличивается.

При  $pH$  4.2, полученное значение эффективной массы молекулы коллагена:  $M_{эфф}=297000$  г/моль близко к литературному значению:  $M_{лит}=340000$  г/моль.

Для определения изоэлектрической точки коллагена были получены зависимости коэффициента межмолекулярного взаимодействия и коэффициент деполяризации от  $pH$  в водных растворах (рис.2,3). Экстремумы этих зависимостей связаны с минимизацией суммарного поверхностного заряда на молекулах белка и определяют изоэлектрическую точку коллагена –  $pH$  6.0.

**Глава 6** содержит описание экспериментального исследования водных растворов коллагена, содержащих ионы легких и тяжелых металлов -  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Pb^{2+}$ , при различных значениях показателя  $pH$  среды методом динамического светорассеяния. Глава включает в себя несколько разделов и пунктов.

**В разделе 6.1** дано описание фотонно-корреляционного спектрометра. Источником света в установке служит *He-Ne* лазер, дающий линейно-поляризованный свет. Луч от лазера с помощью  $90^\circ$ -призмы попадает в кювету с образцом. Рассеянный под углом  $90^\circ$  свет регистрируется при помощи ФЭУ, затем сигнал подаётся на коррелятор, соединенный с компьютером. Данная система позволяет проводить измерения при различных углах рассеяния и температурах. Температура устанавливается с помощью термостата, регулируемого компьютером.

**В разделе 6.2** описываются динамические свойства молекул коллагена в водных растворах с добавлением различных солей ( $CaSO_4$ ,  $NaCl$ ,  $KCl$  и  $Pb(CH_3COO)_2$ ). Кратко описывается схема приготовления образцов и расчет ионной силы растворов.

**В пункте 6.2.1** представлены результаты экспериментального исследования.

Было обнаружено, что зависимость коэффициента трансляционной диффузии молекул коллагена от показателя  $pH$  в *чистом* водном растворе и в растворах с добавлением солей  $CaSO_4$  и  $NaCl$  имеет нелинейную зависимость с максимумом вблизи изоэлектрической точки –  $pH$  6.0 (рис.4). Справа и слева от изоэлектрической точки коэффициент трансляционной диффузии уменьшается.

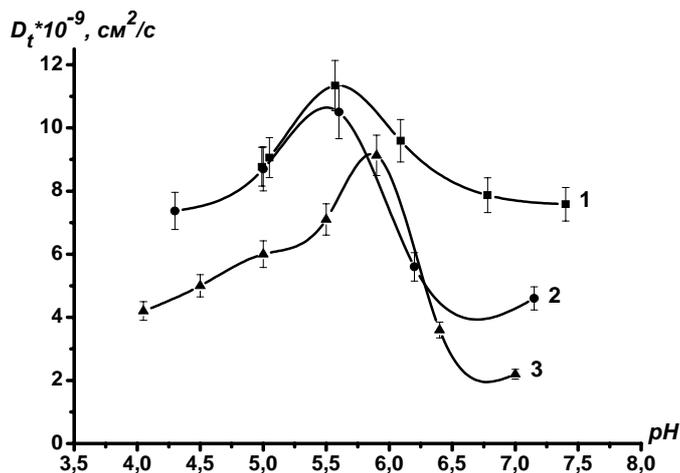


Рис.4 Зависимость коэффициента трансляционной диффузии  $D_t$  коллагена от показателя  $pH$ : в чистом водном растворе (кривая 1), с добавлением соли  $CaSO_4$  (кривая 2), с добавлением соли  $NaCl$  (кривая 3), ионная сила растворов  $\mu=10^{-3}$  моль/л.

Совершенно противоположные зависимости наблюдаются в случае добавлении в раствор коллагена солей  $KCl$  и  $Pb(CH_3COO)_2$  (рис. 5,6). Видно, что значение ионной силы растворов влияет на величину коэффициента  $D_t$ , он уменьшается с ростом концентрации ионов калия и свинца.

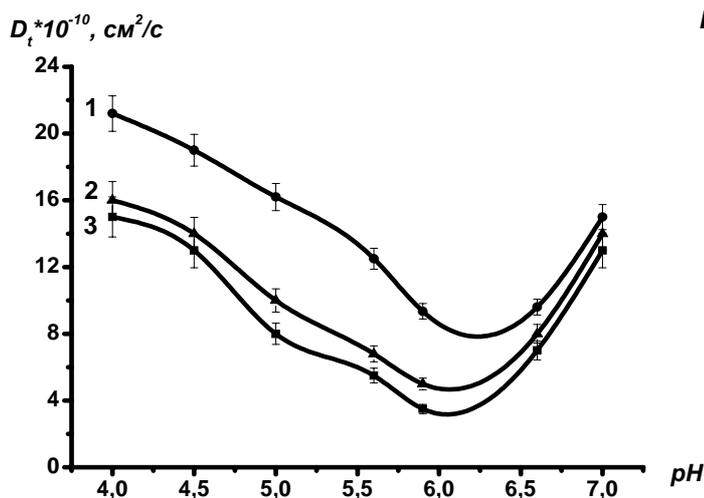


Рис.5 Зависимость коэффициента  $D_t$  коллагена от показателя  $pH$  для водных растворов коллагена с добавлением соли  $KCl$ .

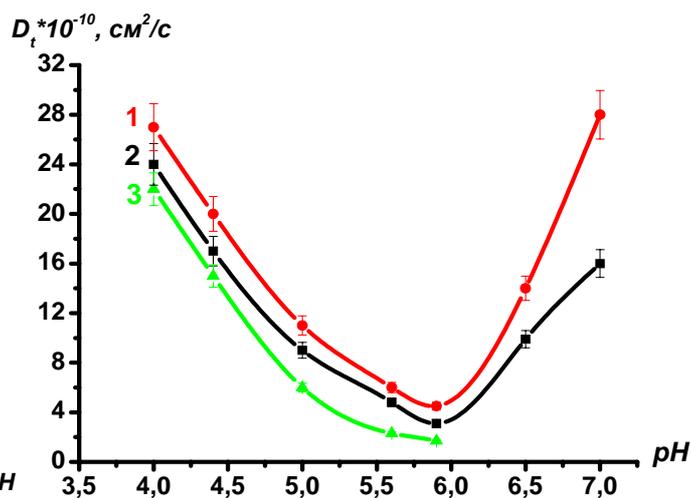


Рис.6 Зависимость коэффициента  $D_t$  коллагена от показателя  $pH$  для водных растворов коллагена с добавлением соли  $Pb(CH_3COO)_2$ .

(для трех ионных сил раствора:  $\mu=10^{-4}$  моль/л – кривая 1,  $\mu=10^{-3}$  моль/л – кривая 2,  $\mu=10^{-2}$  моль/л – кривая 3);

**Пункт 6.2.2** посвящен обсуждению полученных результатов.

При исследовании динамических параметров молекул коллагена было получено, что при добавлении в раствор ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Na}^+$ , имеющих небольшой ионный радиус ( $R_{\text{Ca}^{2+}}=0,99\text{Å}$ ,  $R_{\text{Na}^+}=0,8\text{Å}$ ), наблюдается нелинейная зависимость коэффициента  $D_t$  с максимумом в области изоэлектрической точки ( $pH \sim 6.0$ ), так же как и в чистом водном растворе белка (рис.4). Справа и слева от изоэлектрической точки коэффициент трансляционной диффузии уменьшается, поскольку белок приобретает либо положительное либо отрицательное значения суммарного поверхностного заряда.

В соответствии с формулой:  $D_t = D_o \{1 + (2BM - [\eta])c\}$  коэффициент трансляционной диффузии белка должен уменьшаться, если его характеристическая вязкость превышает произведение массы молекулы на коэффициент межмолекулярного взаимодействия. Действительно, характеристическая вязкость коллагена ( $1150 \text{ см}^3/\text{г}$ ) более чем на два порядка выше, чем вязкость таких глобулярных белков как, например, альбумина ( $3,7 \text{ см}^3/\text{г}$ ). Ранее в нашей лаборатории 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  $BM$  (формула выше) имеет бóльшую величину по сравнению с коэффициентом характеристической вязкости  $[\eta]$ . Величина  $B$  увеличивается с ростом заряда на белке, что и определяет рост коэффициента трансляционной диффузии. Для коллагена модуль разности  $(2BM - [\eta])$  уменьшается с ростом заряда, что приводит к уменьшению  $D_t$  по сравнению с его значением в изоэлектрической точке.

Характер зависимости коэффициента  $D_t$  коллагена резко меняется при добавлении в раствор солей  $\text{KCl}$  и  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  – вместо максимума  $pH$  – зависимости  $D_t$ , наблюдается минимум (рис. 5,6). Это указывает на влияние сильных электростатических взаимодействий между ионами и молекулами белка. Наличие 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. На рисунках 5,6 видно, что с ростом

ионной силы  $\mu$  раствора коэффициент трансляционной диффузии уменьшается. Это указывает на то, что с увеличением концентрации ионов  $K^+$  и  $Pb^{2+}$  в растворах масса рассеивающих частиц также растет.

Если сравнить полученные значения коэффициента трансляционной диффузии в *чистом* водном растворе коллагена и в растворах с добавлением различных ионов -  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Pb^{2+}$  при одном и том же значении  $pH$  (табл.1), то можно увидеть, что с ростом ионных радиусов коэффициент  $D_t$  уменьшается.

<b>ИОНЫ</b>	<b><math>R_{ион}</math> (Å)</b>	<b><math>D_t * 10^{-9}</math> (см<sup>2</sup>/с)</b>
<b><math>H_2O</math></b>		<b>11,2</b>
<b><math>Ca^{2+}</math></b>	<b>0,99</b>	<b>10,5</b>
<b><math>Na^+</math></b>	<b>0,8</b>	<b>7,1</b>
<b><math>K^+</math></b>	<b>1,33</b>	<b>0,73</b>
<b><math>Pb^{2+}</math></b>	<b>1,2</b>	<b>0,45</b>

Табл.1 Значения коэффициентов  $D_t$  молекул коллагена в водных растворах, содержащих соли металлов с различными ионными радиусами (ионная сила растворов:  $\mu=10^{-3}$  моль/л;  $pH=5.5$ ).

Значения коэффициентов трансляционной диффузии в *чистом* водном растворе коллагена и в растворах с ионами кальция и натрия имеют значения почти на два порядка больше, чем в растворах, содержащих ионы калия и свинца, что также свидетельствует об образовании крупных частиц в растворах.

**Раздел 6.3** содержит результаты, полученные при исследовании угловой зависимости интенсивности рассеянного света в водных растворах коллагена с помощью динамического метода при добавлении различных солей ( $NaCl$ ,  $KCl$  и  $Pb(CH_3COO)_2$ ). Кратко дается характеристика исследуемых растворов и порядок эксперимента.

**В пункте 6.3.1** описываются результаты эксперимента, представленные в виде зависимостей интенсивности рассеянного света в чистом растворе коллагена и с добавлением солей калия, натрия и свинца при трех углах:  $45^0$ ,  $90^0$ ,  $135^0$ . Для получения полезной информации о белке-коллагене, а именно – размерах и форме рассеивающих частиц, необходима была проведена обработка экспериментальных

данных с помощью методов асимметрии и двойной экстраполяции.

**В пункте 6.3.2** описаны методы обработки экспериментальных данных (методы асимметрии и двойной экстраполяции).

**А. В методе асимметрии** рассчитывается значение характеристической асимметрии избыточного рассеяния:  $|Z| = (I_{45^\circ}/I_{135^\circ})_{c=0}$ , которое обычно определяется графической экстраполяцией к  $c=0$  величины  $1/(Z-1)$  по измерениям рассеяния в растворах 5-8 убывающих концентрациях. По величине  $|Z|$ , пользуясь соответствующей таблицей или графиком, можно определить относительные размеры частиц в растворе, а также фактор рассеяния  $P_v(90^\circ)$ , необходимый для вычисления молекулярного веса.

**Б. Зиммом** был предложен метод интерпретации данных светорассеяния, получивший название **метода двойной экстраполяции**. Следуя этому методу, измеряют  $I_{\Theta}$  для ряда концентраций и различных углов рассеяния  $\Theta$ , а затем строят график зависимости величины  $cH/I_{\Theta}$  от сложного аргумента  $(\sin^2 \frac{\Theta}{2} + kc)$ . Иногда использование метода двойной экстраполяции в его обычном виде затруднительно (в частности, для весьма больших молекулярных весов), поэтому в данной работе использовался видоизмененный метод двойной экстраполяции для вычисления размеров и формы частиц.

**В пункте 6.3.3** представлены результаты, полученные при обработке с помощью методов асимметрии и двойной экстраполяции.

Ниже (табл.2) приведены табличные значения (Цветков В.Н., Эскин В.Е., Френкель С.Я. "Структура макромолекул в растворах") и экспериментальные данные, полученные из обработки эксперимента с помощью метода асимметрии:

**1. В чистом водном растворе коллагена:**

$$|Z|_{\text{эксп}}=1,277; \quad |Z|_{\text{теор}}=1,279.$$

$D=1898 \text{ \AA}$  – относительный размер частицы (в нашем случае, предполагаемая длина);

$$P_v(90^\circ)=0,83 \text{ - фактор рассеяния.}$$

Форма молекулы – палочка.

Для сравнения: для сферических частиц идеальной формы:  $P_v(90^\circ)=1$ .

**2. В водном растворе коллагена с солью NaCl:**

$$|Z|_{\text{эксп}}=1,35; \quad |Z|_{\text{теор}}=1,372.$$

Форма молекулы – палочка.

$$D=2215 \text{ \AA} \text{ - размер частицы;}$$

$$P_v(90^\circ)=0,776.$$

**3. В водном растворе коллагена с солью KCl:**

$$|Z|_{\text{эксп}}=3; \quad |Z|_{\text{теор}}=3,06.$$

$$D=3797 \text{ \AA} \text{ - размер частицы; } P_v(90^\circ)=0,34.$$

Форма молекулы – клубок.

**4. В водном растворе коллагена с солью Pb(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>:**

$$|Z|_{\text{эксп}}=3,2; \quad |Z|_{\text{теор}}=3,303.$$

$$D=4113 \text{ \AA}; \quad P_v(90^\circ)=0,3.$$

Форма молекулы – клубок.

	$ Z _{\text{теор}}$	$ Z _{\text{эксп}}$	$P_v(90^\circ)$	Форма частицы	Размер частицы, $\text{\AA}$
<b>В чистом водном растворе коллагена</b>	<b>1,279</b>	<b>1,277</b>	<b>0,83</b>	<b>палочка</b>	<b>1898</b>
<b>С солью NaCl</b>	<b>1,372</b>	<b>1,35</b>	<b>0,776</b>	<b>палочка</b>	<b>2215</b>
<b>С солью KCl</b>	<b>3,06</b>	<b>3</b>	<b>0,34</b>	<b>клубок</b>	<b>3797</b>
<b>С солью Pb(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub></b>	<b>3,303</b>	<b>3,2</b>	<b>0,3</b>	<b>клубок</b>	<b>4113</b>

Табл.2 Формы и размеры частиц в водных растворах коллагена, рассчитанные с помощью метода асимметрии.

По результатам, полученных с помощью метода двойной экстраполяции, были рассчитаны относительные размеры частиц в водных растворах коллагена с солями KCl и  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  (в данном случае клубков, как было определено методом асимметрии):

1. В растворах коллагена с солью KCl :

$$\langle R \rangle^2 / \lambda^2 = 0,17; R = 2830 \text{ \AA} - \text{относительный размер частиц.}$$

2. В растворах коллагена с солью  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  :

$$\langle R \rangle^2 / \lambda^2 = 0,15; R = 2451 \text{ \AA} - \text{относительный размер частиц.}$$

**Пункт 6.3.4.** посвящен обсуждению полученных результатов.

Из данных (*табл. 1*), полученных при обработке методом асимметрии, следует, что в *чистых* водных растворах коллагена и в растворах с солью NaCl частицы имеют стержнеобразную форму с размером около  $\sim 2000 \text{ \AA}$  (предполагаемая длина). В растворах с солями KCl и  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  частицы становятся крупнее и приобретают форму клубка с размером  $\sim 4000 \text{ \AA}$ . Как мы предполагаем, это форма соответствует образующимся в растворах кластерам, составленным из молекул коллагена.

С помощью видоизмененного метода двойной экстраполяции получены размеры частиц белка в водных растворах с солями KCl и  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ :  $2830 \text{ \AA}$  и  $2450 \text{ \AA}$  соответственно. Предполагаемая форма частиц в данном случае – клубки.

**В разделе 6.4** описывается исследование температурных зависимостей коэффициента трансляционной диффузии молекул коллагена в водных растворах методом динамического светорассеяния.

**В пункте 6.4.1** представлены результаты экспериментального исследования водных растворов коллагена в диапазоне температур от  $23$  до  $50^\circ\text{C}$  при пяти различных концентрациях (*рис. 8*). На *рис. 9* изображена температурная зависимость коэффициента трансляционной диффузии для водного раствора коллагена с солью  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  в области изоэлектрической точки белка (*pH 5.8*).

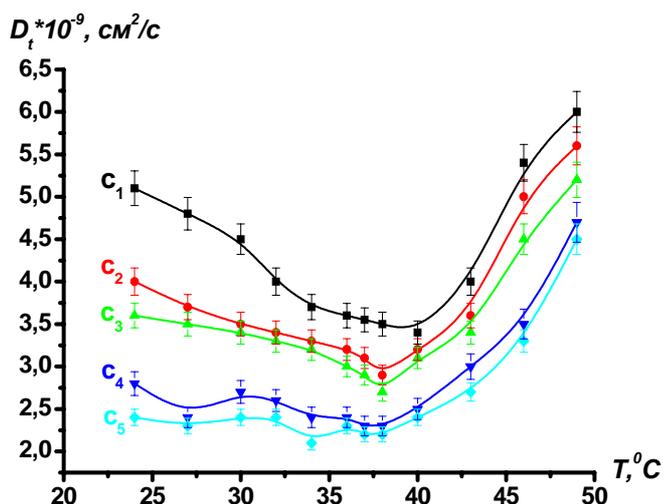


Рис.8 Зависимость коэффициента трансляционной диффузии  $D_t$  от температуры для водных растворов коллагена при 5 концентрациях. ( $c_1=0.055\text{мг/мл}$ ,  $c_2=0.11\text{мг/мл}$ ,  $c_3=0.165\text{мг/мл}$ ,  $c_4=0.22\text{мг/мл}$ ,  $c_5=0.275\text{мг/мл}$ )

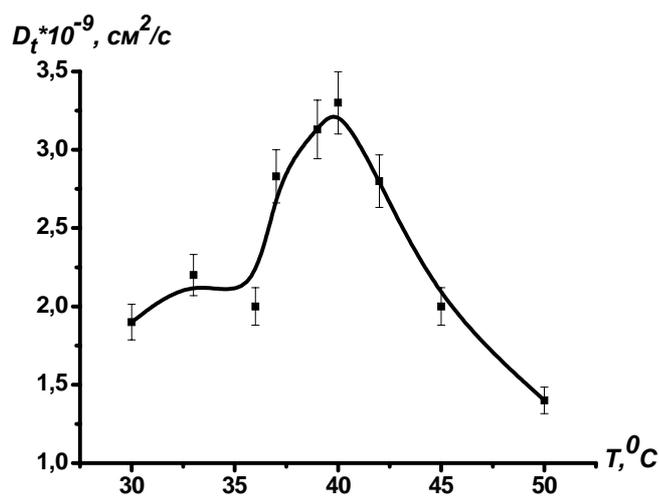


Рис.9 Зависимость коэффициента трансляционной диффузии  $D_t$  от температуры для водного раствора коллагена с добавлением соли  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  ( $\mu=10^{-4}$  моль/л,  $c=0.055$  мг/мл, pH 5.8).

#### Пункт 6.4.2. посвящен обсуждению полученных результатов.

Характер зависимости коэффициента трансляционной диффузии от температуры (рис.8) для водных растворов коллагена (при 5 концентрациях) имеет характерный минимум в области  $37^\circ\text{C}$ .

Область температур от  $24^\circ\text{C}$  до  $37^\circ\text{C}$  характеризуется постепенным уменьшением коэффициента диффузии с ростом температуры. В соответствии с формулой  $D_t = D_o \{1 + (2BM - [\eta])c\}$ ,  $D_t$  зависит от характеристической вязкости  $[\eta]$  раствора и уменьшается с ее ростом. Это означает, что характеристическая вязкость имеет максимальное значение при температуре  $T=37^\circ\text{C}$ , которая близка к оптимальной температуре тела человека.

В области температуры  $37^\circ\text{C}$  наблюдается, вероятно, фазовый переход в растворах коллагена и дальнейшее нагревание приводит к необратимым изменениям в структуре молекул белка. При этом значение характеристического трения

уменьшается и диффузионный коэффициент резко возрастает.

Как мы выяснили ранее, наличие в растворах ионов с большим ионным радиусом приводит к образованию вблизи изоэлектрической точки коллагена крупных наночастиц.

Из *рис.9* видно, что в случае добавления в раствор коллагена соли  $Pb(CH_3COO)_2$  при *pH* 5.8 коэффициент трансляционной диффузии  $D_t$  до температуры  $37^\circ C$  не изменяется, от  $37^\circ C$  до  $40^\circ C$ , по-видимому, происходит тепловое разрушение дипольных кластеров. Можно предположить, что при нагревании выше  $40^\circ C$  в растворах, содержащих ионы свинца, образуются крупные малоподвижные макромолекулярные структуры, в результате чего коэффициент  $D_t$  резко падает.

## ВЫВОДЫ

1. Из экспериментально полученных  $pH$  - зависимостей коэффициента межмолекулярного взаимодействия и коэффициента деполаризации растворов коллагена, имеющих экстремумы при  $pH$  6.0, можно сделать вывод, что изоэлектрическая точка коллагена (I-типа) равна 6.0.
2. Обнаружено, что масса рассеивающих частиц в водных растворах коллагена изменяется при изменении  $pH$  и имеет максимальное значение -  $M_{eff}=673\ 000$  при  $pH$  6.0.
3. Поведение коэффициента трансляционной диффузии в водных растворах коллагена, содержащих ионы  $K^+$  и  $Pb^{2+}$ , с минимумом в изоэлектрической точке ( $pH$  6.0), дает основание предполагать, что в этих растворах образуются нанокластеры. Максимальную величину образующиеся наночастицы имеют вблизи изоэлектрической точки белка.
4. Результаты, полученные с помощью методов угловой зависимости интенсивности рассеянного света, показывают, что при добавлении в раствор коллагена ионов  $K^+$  и  $Pb^{2+}$  возникают крупные наноструктуры, имеющие форму клубка.
5. В области физиологической температуры  $37^{\circ}C$  в водных растворах коллагена наблюдается минимум молекулярной подвижности. При дальнейшем увеличении температуры коэффициент  $D_t$  молекул коллагена резко увеличивается.

**Результаты диссертационной работы изложены в следующих публикациях:**

**Статьи:**

1. Петрова Г.П., Петрусевич Ю.М., Бойко А.В., Тен Д.И., Гаркуша Е.В., Перфильева И.А., Щеславский В.И., Яковлев В.В. «*Особенности межмолекулярного взаимодействия и динамики молекул коллагена в водных растворах*» // Вестник МГУ, Сер. 3. Физика. Астрономия. 2006. № 2, стр. 41-44.
2. A.V. Boiko, G.P. Petrova, Y.M. Petrushevich, I.A. Perfil'eva "Static and dynamic light scattering studies of collagen solutions" // Int. Conf. Advanced Laser Technologies "ALT-06", Proc. SPIE 6606, 66061H (2007).
3. A.V. Boiko, G.P. Petrova, Y.M. Petrushevich, D.I. Ten, I.A. Perfil'eva, S.S. Koshel, D.V. Matyushenko "Physical methods for studying the effect of cooper and cadmium ions on protein solutions" // Int. Conf. Advanced Laser Technologies "ALT-07", Proc. SPIE, 7022, 70220V-1(2008) .
4. I.A. Perfil'eva, G.P. Petrova, Y.M. Petrushevich, A.V. Boiko "Dynamic properties of collagen molecules in water and salt solutions" // Int. Conf. Advanced Laser Technologies "ALT-07", Proc. SPIE, 7022, 70220W-1(2008).
5. Г.П. Петрова, Ю.М. Петрусевич, И.А. Перфильева, М.С. Иванова, Чжан Сяолэй «*Молекулярная подвижность в растворах коллагена, содержащих ионы с различными ионными радиусами*» // Вестник МГУ, Сер. 3. Физика. Астрономия. 2008. № 4, стр. 68-70
6. G.P. Petrova, A.V. Boiko, K.V. Fedorova, I.A. Sergeeva, N.V. Sokol, T.N. Tichonova "Optical properties of solutions consisting of albumin and  $\gamma$ -globulin molecules in different ratio modeling blood serum" // Int. Conf. Advanced Laser Technologies "ALT-08", Laser Physics, 2009, Vol.19, No.5.

Тезисы докладов:

1. Бойко А.В., Перфильева И.А. «*Особенности межмолекулярного взаимодействия и динамики молекул коллагена в водных растворах*» // Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых по фундаментальным наукам «Ломоносов-2005», Физический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова, Сборник тезисов, стр. 198.
2. A.V. Boiko, I.A. Perfil'eva, G.P. Petrova, Yu.M. Petrusevich, V.I. Shcheslavskiy “*Mobility of the Collagen in Water Solution*” // 2<sup>nd</sup> Meeting “NMR in Life Sciences”, Saint Petersburg, Petrodvorets, Russia, 11-15 July, 2005, Book of Abstracts, p. 64.
3. Бойко А.В., Перфильева И.А., Д.И. Тен. «*Динамические и статические параметры молекул коллагена в водных растворах*» // Межд. Конф. молодых ученых, посвященная всемирному дню физика, Физ-фак МГУ им. М.В. Ломоносова, 2005, Сб. тезисов, стр.80-81.
4. A.V. Boiko, G.P. Petrova, Y.M. Petrusevich, I.A. Perfil'eva “*Static and dynamic light scattering studies of collagen solutions*” // International conference ALT-06 (Brashov, Romania), 8-12 Sep., 2006, Book of abstracts, P. 39.
5. Петрова Г.П., Петрусевич Ю.М., Бойко А.В., Тен Д.И., Перфильева И.А. «*Исследование молекулярных параметров белков сыворотки крови методами светорассеяния*» // Научная конференция «Ломоносовские чтения – 2007», секция «Физика», Подсекция – Биохимическая и медицинская физика, Физический факультет МГУ, апрель 2007, Сборник тезисов докладов, стр. 102.
6. Петрова Г.П., Петрусевич Ю.М., Бойко А.В., Тен Д.И., Перфильева И.А. «*Динамические свойства молекул коллагена в водных растворах*» // Научная конференция «Ломоносовские чтения – 2007», секция «Физика», Подсекция – Биохимическая и медицинская физика, Физический факультет МГУ, апрель 2007, Сборник тезисов докладов, стр. 101.
7. G.P. Petrova, Yu.M. Petrusevich, A.V. Boiko, I.A. Perfilieva, D.I. Ten “*Special role of potassium ions in the functioning of living organisms measured by laser light scattering*”// Technical Digest of International Conference on Laser Applications in Life Sciences (LALS-2007), 11-14 June 2007, Moscow, Russia, p. ThL03-III/2 (2007).
8. A.V. Boiko, G.P. Petrova, Y.M. Petrusevich, D.I. Ten, I.A. Perfil'eva, S.S. Koshel, D.V.

Matyushenko “*Physical methods for studying the effect of copper and cadmium ions on protein solutions*” // International conference ALT-07 (Levi, Finland), 3-7 Sep., 2007, Book of abstracts, p. 121.

9. I.A. Perfil’eva, G.P. Petrova, Y.M. Petrusevich, A.V. Boiko “*Dynamic properties of collagen molecules in water and salt solutions*” // International conference ALT-07 (Levi, Finland), 3-7 Sep., 2007, Book of abstracts, p. 123.

10. I.A. Perfil’eva, G.P. Petrova, Y.M. Petrusevich, A.V. Boiko “*Dynamic properties of collagen molecules in water and salt solutions*” // Int. Conf. Advanced Laser Technologies “ALT-07”, Proc. SPIE, 7022, 70220W-1(2008).