

УДК 541.183.12

СОСТОЯНИЕ И ПОДВИЖНОСТЬ ВОДЫ В БЕЛКАХ СОЕДИНИТЕЛЬНЫХ ТКАНЕЙ И ПЛАЗМЫ КРОВИ ПО ДАНЫМ ЯМР С ИМПУЛЬСНЫМ ГРАДИЕНТОМ МАГНИТНОГО ПОЛЯ¹

Жебелева И.А.*, Волкова Л.Д.***, Волков В.И***.

* *Российский университет кооперации, г.Мытищи*

** *РГАУ-МСХА им.К.А.Тимирязева, г.Москва*

*** *Институт проблем химической физики РАН, г. Черноголовка,
vitwolf@mail.ru*

Введение

Вопросы взаимодействия воды с биополимерами имеют принципиальное значение для понимания механизмов водного обмена и функционирования живых систем. Одним из наиболее прямых методов исследования особенностей гидратации белковых молекул и диффузионной подвижности воды в белках различной природы и, в частности, в коллагенах являются методы ЯМР [1-4]. В данных работах основные выводы о состоянии воды и частотах молекулярных движений были сделаны на основании данных по ЯМР релаксации и носят, к сожалению, весьма оценочный характер. Более прямую информацию о распределении молекул воды, жира и их трансляционной подвижности может дать метод ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля (ЯМР ИГМП), который был успешно применен к исследованию процесса водного обмена в биологических клетках [5,6].

Цель работы заключалась в исследовании самодиффузии воды и компонентов жира в белковых препаратах, полученных путем обезживания и измельчения свиной шкурки (белок А - коллагенсодержащий) и фракционированием и сушкой свиной крови (белок Б – плазма крови) методом ЯМР ИГМП.

Методика эксперимента

Коэффициенты самодиффузии измеряли методом стимулированного спинового эхо на частоте ЯМР для протонов 100МГц. Особенности методики измерения и расчетов проницаемости и размеров ограничений

¹ Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект № 07-03-00828-а

изложены в [5,6]. Диффузионное затухание $A(g)$ аппроксимировали суммой экспоненциальных спадов

$$A(g) = \sum_{i=1}^m p_i \cdot \exp(-\gamma^2 \cdot g^2 \cdot \delta^2 \cdot t_d \cdot D_{si}) \quad (1)$$

$$\sum_{i=1}^m p_i = 1; \quad (2)$$

где D_{si} – коэффициент самодиффузии воды в i -ом участке (фазе); p_i – относительная доля молекул воды в i -ом участке, заселенность i -ой фазы; γ – гиромагнитное отношение; Δ – интервал между импульсами градиента магнитного поля, $t_d = \Delta \cdot \delta / 3$ – время диффузии, δ – длительность импульса градиента магнитного поля; g – импульс градиента.

Состав исследуемых объектов: белков коллагена (А) и белков плазмы крови (Б) приведены в Табл.1.

Таблица 1. Характеристика образцов.

Образцы	Содержание г на 100 г продукта			
	белок	жир	вода	зола
белок А. соединительнотканый белок	87,6	8,1	2,9	0,37
белок Б. плазма свиной крови	69,0	0,06	8,7	14,6

Видно, что в отличие от белка (Б), который в виде низкомолекулярной фракции содержит воду, в белке (А) имеются также жиры. В соответствии с этим диффузионное затухание является экспоненциальным для белков Б ($i=1$), двух экспоненциальным ($i=2$) в белках А при малом влагосодержании и трех экспоненциальным для образцов А в контакте с водой ($i=3$). Замена обычной воды на дейтерированную в белках А показала, что веса компонент с меньшими коэффициентами самодиффузии возрастают при дейтерировании (Табл.2) и, таким образом, эти компоненты относятся к фракции жира в коллагенах.

Таблица 2. Значения коэффициентов самодиффузии и относительных доле компонентов в белках А в контакте с H_2O и D_2O .

	коэфф. самодиффузии воды	доля воды	коэфф. самодиффузии жира	доля жира
	$D_{s2}, \text{ м}^2/\text{с} \cdot 10^{-10}$	p_1	$D_{s1}, \text{ м}^2/\text{с} \cdot 10^{-12}$	$p_2=1-p_1$
обычная вода	9	0,83	8	0,17
дейтерированная вода	9	0,48	8,7	0,52

Коэффициенты самодиффузии в белках Б и близкие к ним коэффициенты самодиффузии в белках А относятся к молекулам воды в этих белках. Относительная доля этих компонент при высушивании коллагенов А уменьшалась. Это обстоятельство позволило установить, что при осушке как белков А, так и белков Б потеря веса происходит за счет десорбции воды. Влагосодержание белков характеризовали отношением разности масс контрольного образца и сухого образца к массе сухого образца, выраженного в %. За массу сухого образца принимали массу образца высушенного в эксикаторе с серной кислотой.

Результаты и обсуждения

На Рис.1 представлены зависимости коэффициентов самодиффузии водных и масляных компонентов в белках А (кривые 3 и 1, соответственно) и молекул воды в белке Б (кривая 2) от потери веса в процессе высушивания белков.

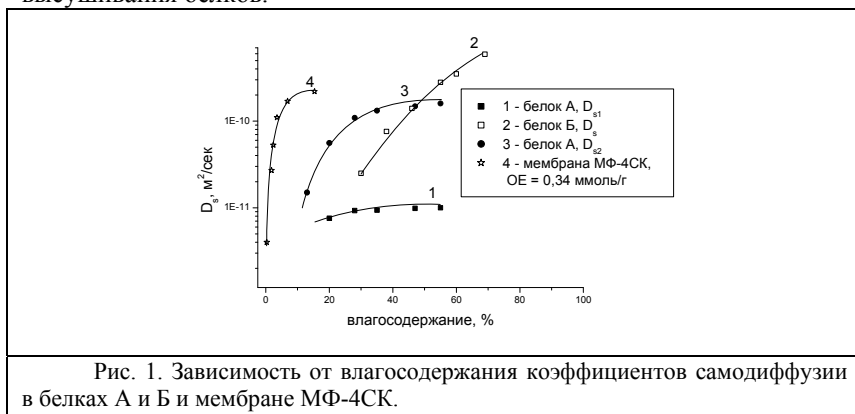
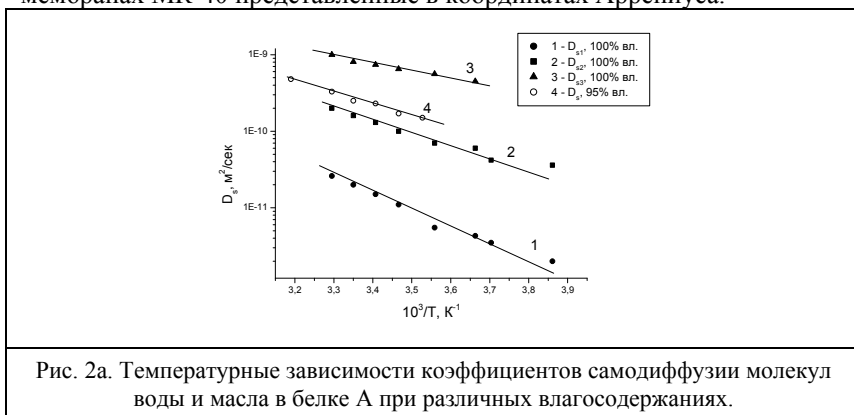


Рис. 1. Зависимость от влагосодержания коэффициентов самодиффузии в белках А и Б и мембране МФ-4СК.

Как уже указывалось выше, основная причина потери веса белков-это десорбция воды в процессе высушивания. Видно, что коэффициенты самодиффузии водных компонентов уменьшаются, а, следовательно, трансляционная подвижность воды уменьшаются с уменьшением содержания воды в белках (кривые 2,3 Рис.1), в то время как подвижность масла в белке зависит от влагосодержания в значительно меньшей степени. Можно выделить две характерные особенности подвижности воды в белках: подвижность воды резко уменьшается при уменьшении влагосодержания ниже некоторого порогового значения; зависимость коэффициентов самодиффузии от влагосодержания более резкая в белках Б полученных из плазмы крови, по сравнению с белками коллагена А (кривые 2 и 3 Рис.1). Как это следует из сопоставления

кривых 2, 3 и кривой 4, Рис.1, на которой приведена зависимость коэффициентов самодиффузии воды от влагосодержания в перфторированных сульфокатионитовых мембранах, такая пороговая зависимость характерна для подвижности воды в ионогенных каналах ионообменных мембран. Отсюда можно предположить, что перемещение молекул воды в ионных каналах белков и в ионогенных каналах полимерных ионообменников осуществляется аналогичным образом. Более резкая зависимость коэффициентов самодиффузии воды в белках плазмы крови может быть вызвана тем обстоятельством, что с уменьшением влагосодержания диаметры транспортных каналов белков плазмы крови уменьшаются в большей степени по сравнению с диаметрами транспортных каналов коллагенов, обладающих более жесткой структурой. Предположение о схожести поведения воды в исследуемых белках и синтетических полиэлектролитах подтверждается при анализе температурных зависимостей коэффициентов самодиффузии воды. На Рис.2 показаны температурные зависимости коэффициентов самодиффузии воды в исследуемых белках и в ионообменных сульфокатионитовых мембранах МК-40 представленные в координатах Аррениуса.



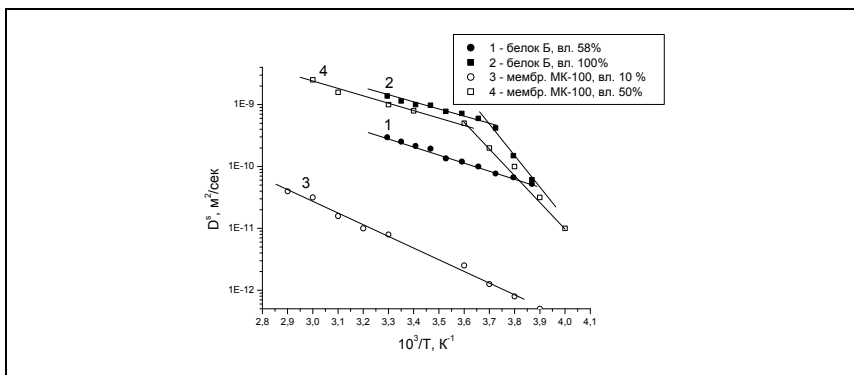


Рис. 26. Температурные зависимости коэффициентов самодиффузии молекул воды и масла в белке Б и мембране МК-40 при различных влагосодержаниях.

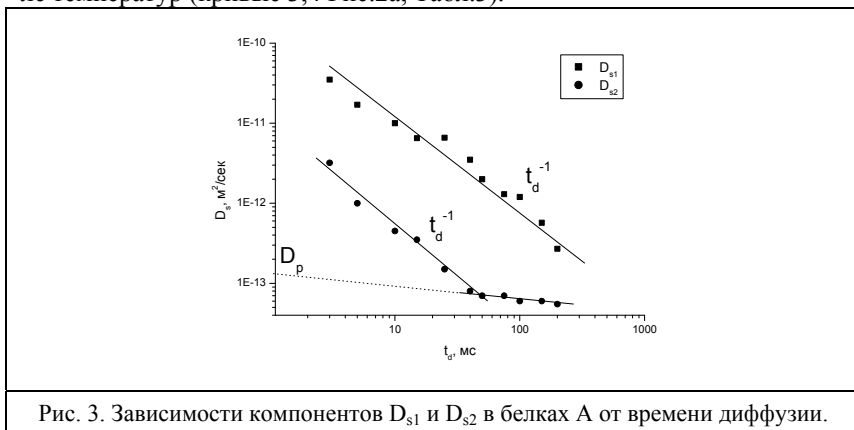
Для образцов белков и мембран с максимальным содержанием воды наблюдается возрастание энергии активации самодиффузии с уменьшением температуры ниже 0°C. Значения энергий активации для высокотемпературных и низкотемпературных участков приведены в таблице 3. В высокотемпературной области энергия активации самодиффузии воды практически равна энергии активации самодиффузии объемной воды и составляет около 20 кДж/моль, а в низкотемпературной области энергия активации значительно выше (кривые 2,4 Рис2б, Табл.3).

Таблица 3. Значения энергий активации самодиффузии в белках различного типа при разных влагосодержаниях.

Образец	Влажность	$E_{акт}$, кДж/моль
Белок А	95%	24 кДж/моль
	100%	$E_{акт1} = 30$ кДж/моль
		$E_{акт2} = 38$ кДж/моль
Белок Б	58%	24 кДж/моль
	95%	27 кДж/моль
	контакт с водой	$E_{акт1} = 19$ кДж/моль
		$E_{акт2} = 95$ кДж/моль
мембр. МК-40	10%	38 кДж/моль
	100%	$E_{акт1} = 22$ кДж/моль $E_{акт2} = 80$ кДж/моль

С уменьшением влагосодержания температурные зависимости коэффициентов самодиффузии имеют арренисуовый вид во всем интервале температур и характеризуются промежуточными значениями энер-

гии активации (кривые 3,4 Рис. 2а, кривые 1,3 Рис.2б, Табл.3). Такие особенности температурных зависимостей коэффициентов самодиффузии воды имеют следующие объяснения. В условиях больших влагосодержаний как в ионообменных мембранах, так и в белках существуют два типа сорбированных молекул воды: слабосвязанная вода, поведение которой подобно объемной воде, и вода более сильно связанная с полимерной матрицей. Между молекулами слабо и сильно связанной воды осуществляется быстрый молекулярный обмен, по этой причине наблюдается экспоненциальное диффузионное затухание сигнала суммарного спинового эхо, которое характеризуется средним коэффициентом самодиффузии. В области температур выше 0°C, температурная зависимость коэффициентов самодиффузии определяется слабо связанной водой, при температурах ниже 0°C слабо связанная вода замерзает, а сильно связанная вода сохраняет высокую подвижность и трансляционные перемещения сильно связанной воды происходят с более высокой энергией активации. В процессе высушивания образцов слабо связанная вода десорбируется, а для оставшейся сильно связанной воды изменения энергии активации в области 0°C не происходит (кривые 3,4 Рис.2б, Табл.3). До сих пор мы обсуждали поведение воды в белках плазмы крови. Отметим, что поведение воды в коллагенах совершенно аналогично, в то время как для масляных компонентов наблюдали аррениусовую зависимость коэффициентов самодиффузии воды во всем интервале температур (кривые 3,4 Рис.2а, Табл.3).



В заключении обсудим поведение компонентов жиров в коллагене А, как уже было отмечено, наблюдали два типа молекул жиров, трансляционная подвижность которых ниже подвижности воды на по-

рядок и два порядка, соответственно (Рис.1 и Рис.2а). Самодиффузия молекул жира носит ограниченный характер и, по самодиффузии от времени диффузии. Как видно из Рис.3, коэффициенты самодиффузии D_{s1} , D_{s2} обратно пропорциональны времени диффузии t_d .

Отсюда, исходя из уравнения Эйнштейна $D_{si}=a^2/6t_d$, были определены размеры ограничений $a_1=10^{-6}$ м и $a_2=3\cdot 10^{-7}$ м, соответственно. При больших временах диффузии коэффициент самодиффузии D_{s1} не зависит от времени диффузии (кривая 2, Рис.3), отсюда, из соотношения [5,6] определена проницаемость P^{eff} областей характеризующихся размерами a_1 , которая составила, $4\cdot 10^{-7}$ м/сек.

$$\frac{1}{D_p} = \frac{1}{D_0} + \frac{1}{P^{eff} \cdot a} \quad (3)$$

где D_p -коэффициент самодиффузии соответствующий плато на кривой 2, Рис.3 $D_0 \gg D_p$ -коэффициент самодиффузии свободного жира.

Заключение

Показано, что поведение воды связанной с белками коллагена и белками из плазмы крови имеют схожий характер и аналогично поведению воды в ионогенных каналах полиэлектролитов.

Изучено распределения жировых компонентов в белках коллагена. Определены размеры микро фракций жира и степень связанности между ними.

Литература

1. Вода в полимерах: Пер. с англ./Под ред. С. Роуланда.— М.: Мир, 1984. — 555 с.
2. В.В.Родин, Д.П.Найт, Биофизика, 2004, т.49, в.5, с.800
3. В.В.Родин, Биофизика, 2005, т.50, в.2, с.223
4. С.П.Габуда, А.А.Гайдаш, Е.А.Вязовая, Биофизика, 2005, т.50, в.2, с.231
5. Suh K.J., Hong Y.S., Skirda V.D., Volkov V.I. Biophys. Chem. 104 (1): 121 (2003)
6. Cho J.H., Hong Y.S., Skirda V.D., Volkov V.I. Magnetic Resonance Imaging 21,1009, (2003)
- 7.