

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ ЯМР ^1H ВЛИЯНИЯ *трет*-БУТИЛОВОГО СПИРТА НА КОЛЛАГЕН I

© 2022 г. М.Н. Машкин*, #, В.А. Машкина**, ##, С.Г. Козлова***, ****, ###

*Московский авиационный институт (национальный исследовательский университет), Волоколамское шоссе, 4, Москва, 125993, Россия

#E-mail: mnmashkin@yandex.ru

**Московский государственный университет пищевых производств, Волоколамское шоссе, 11, Москва, Российская Федерация 125080

##E-mail: vmashkina@yandex.ru

***Институт неорганической химии им. А.В. Николаева СО РАН, просп. Академика Лаврентьева, 3, Новосибирск, 630090, Россия

****Белгородский государственный технологический университет имени В. Г. Шухова, ул. Костюкова, 46, Белгород, 308012, Россия

###E-mail: sgk@niic.nsc.ru

Поступила в редакцию 15.06.2022 г.

После доработки 08.07.2022 г.

Принята к публикации 11.07.2022 г.

На образцах ахиллова сухожилия крупного рогатого скота методом ЯМР ^1H впервые исследовано влияние трет-бутилового спирта ($(\text{CH}_3)_3\text{COH}$) на динамическое состояние макромолекул коллагена I. Это влияние проявляется в изменениях подвижности CH_2 -групп, находящихся в составе макромолекул, и обусловлено взаимодействиями между водной подсистемой и макромолекулами коллагена. Наиболее сильно взаимодействия проявляются при фазовом переходе в системе «трет-бутиловый спирт – вода».

Ключевые слова: ахиллово сухожилие, ядерный магнитный резонанс, подвижность CH_2 -групп, фазовый переход.

DOI: 10.31857/S0006302922060059, EDN: LJSBMV

Структура коллагена соединительно-тканых структур, таких как кожи, сухожилий, аортальной стенки и др. относится к типу коллаген I [1]. Волокнистая структура коллагена I относится к пространственной группе P1 (триклинная, с параметрами решетки $a = 39.97 \text{ \AA}$, $b = 26.95 \text{ \AA}$, $c = 667.9 \text{ \AA}$; $\alpha = 89.24^\circ$, $\beta = 94.59^\circ$, $\gamma = 105.58^\circ$), образована параллельной укладкой стержнеобразных макромолекул тропоколлагена, представляющих собой тройную спираль из трех неидентичных цепочек по ~1040 аминокислотных остатков каждая [2, 3]. Пространство между макромолекулами (поры), заполнено молекулами воды и (в малых концентрациях) другими веществами, необходимыми для роста ткани и поддержания устойчивого ее состояния в условиях непрерывного молекулярного обмена [4, 5]. Изменение температуры и состава водной подсистемы может

привести не только к изменению подвижности молекул воды и макромолекул, но и к фазовым переходам [6, 7].

В настоящей работе методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР ^1H) исследованы изменения, происходящие в подвижности макромолекул коллагена, в поры которого были внедрены молекулы *трет*-бутилового спирта. Трет-бутиловый спирт ($(\text{CH}_3)_3\text{COH}$ или 2-метил-2-пропанол) широко используется в фармацевтической промышленности при синтезе лекарственных субстанций. Он плохо впитывается в кожу человека, но тем не менее вызывает ее раздражение [8]. Водный раствор *трет*-бутилового спирта характеризуется сложной фазовой диаграммой [9]. Мы использовали 65%-й водный раствор, который при комнатной температуре является жидкостью, ниже 4°C происходит образование дигидратов $(\text{CH}_3)_3\text{COH}$ в воде, а ниже -5°C возникает фаза льда с дигидратами $(\text{CH}_3)_3\text{COH}$.

Сокращение: BAT – ахиллово сухожилие крупного рогатого скота (Bovine Achilles Tendon).

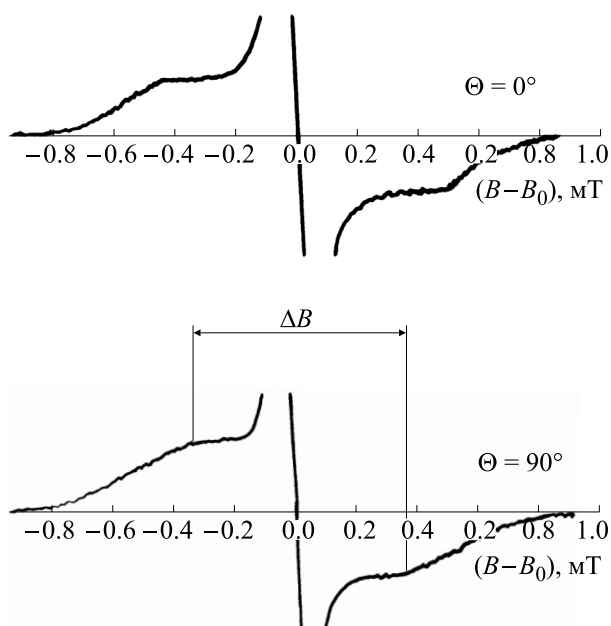


Рис. 1. Производные спектров поглощения ЯМР ^1H образца VAT2: Θ – угол между ориентацией внешнего магнитного поля и направлением волокон образца VAT2, ΔB – полуширина широкой составляющей спектра.

ОБРАЗЦЫ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ

Образцы. В исследованиях использовали образцы (массой 0.3 г) ахиллова сухожилия крупного рогатого скота (ВАТ – Bovine Achilles Tendon) трехлетнего возраста. Образец VAT1 являлся исходным (нативным) образцом и до проведения экспериментов находился в воде. Образец VAT2 находился в 65%-м водном растворе *трет*-бутилового спирта. Время пребывания образцов в жидкостях составило 26 ч при температуре 25°C. Объем жидкости в десять раз превышал объем каждого образца.

ЯМР ^1H исследование. ЯМР-эксперименты были проведены на модифицированном приборе JNM-4H100 (Jeol, Япония), предназначенном для регистрации спектров широких линий ЯМР ^1H . Регистрировали производные спектров поглощения на частоте резонанса 23МГц при изменении внешнего магнитного поля. Образцы VAT1 и VAT2 помещали в ампулы так, чтобы в экспериментах можно было бы реализовать две ориентации волокон ахиллова сухожилия по отношению к внешнему магнитному полю: под углом $\Theta = 0^\circ$ и 90° , где Θ – угол между направлением магнитного поля и направлениями волокон ахиллова сухожилия. Температуру образцов изменяли в интервале от 20 до -10°C продувкой паров газообразного азота через криостат спектрометра.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Формы спектров ЯМР ^1H в образцах VAT1 и VAT2 являются подобными, состоят из широкого компонента, обусловленного протонами CH_2 -, CH - и NH -групп макромолекул, а также узкого компонента, обусловленного протонами H_2O и $(\text{CH}_3)_3\text{COH}$ в жидком состоянии (рис. 1). В широком компоненте полученных спектров невозможно четко выделить спектр от CH_2 -, CH -, NH -групп и других водородсодержащих групп макромолекул коллагена, тем не менее видно, что наибольшим удельным весом среди протонсодержащих структурных единиц обладают CH_2 -группы, так как форма их ЯМР ^1H спектров совпадает с характерным дублетом Пейка для CH_2 -групп с полушириной $\Delta B \sim 1$ мТл [10].

Поскольку макромолекулы в структуре коллагена имеют некоторую кристаллическую упорядоченность, преобладающий вклад CH_2 групп приводит к ориентационной зависимости пейковского дублета, которая описывается соотношением для дублетного расщепления за счет диполь-дипольного взаимодействия между ядерными магнитными моментами атомов водорода в CH_2 -группе [10–12]:

$$\Delta B = 3 \cdot (\mu / r^3) \cdot (3 \times \cos^2 \vartheta - 1), \quad (1)$$

где μ – магнитный момент ядра атома водорода, r – расстояние (H–H) в CH_2 -группе и ϑ – угол между внешним магнитным полем и осью r .

Температурные зависимости полуширины спектра широкого компонента (ΔB) VAT1 и VAT2 при различных ориентациях представлены соответственно на рис. 2 и 3.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные температурные зависимости ΔB указывают на подвижность CH_2 -групп и отличаются при разных ориентациях волокон ВАТ по отношению к внешнему магнитному полю. Видно, что значения ΔB в образцах VAT1 и VAT2 при $\Theta = 0^\circ$ с понижением температуры меняются незначительно (рис. 2 и 3). Этот результат можно объяснить тем, что (H–H)-вектора при тепловых движениях для большинства CH_2 -групп остаются перпендикулярными к направлению внешнего поля и их колебания при такой ориентации не приводят к изменениям ΔB (см. уравнение (1)).

Значения ΔB в образце VAT1 при ориентации $\Theta = 90^\circ$ резко меняются в области от -1 до -6°C . Резкое уширение спектров ЯМР при понижении температуры как правило объясняется «вымерзанием» или торможением подвижности. Активационный барьер этой подвижности можно оце-

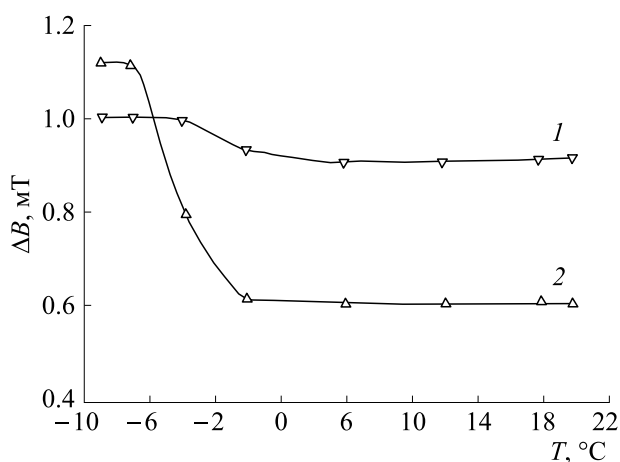


Рис. 2. Зависимость полуширины ΔB широкого компонента спектра ЯМР ^1H в образце VAT1 при различных углах ориентации $\Theta - 0^\circ$ (1) и 90° (2).

нить исходя из следующей формулы (уравнение Уо–Федина [13]):

$$U_a = 37T_x = 9.9 \text{ ккал/мол,}$$

где $T_x = 267 \text{ K}$ (-6°C) температура начала сужения широкого компонента спектра. Значения ΔB в образце VAT2 при $\Theta = 90^\circ$ также начинают сужаться при $T_x = 267 \text{ K}$. Следовательно, активационный барьер для подвижности макромолекул в образце остался прежним. Следует отметить, что полученное значение U_a по величине согласуется со значениями активационного барьера вымерзания подвижности водной подсистемы в сухожилии крысиного хвоста разного возраста [14].

Сравнительный анализ спектральных полос при комнатной температуре и $\Theta = 90^\circ$ показывает, что значения ΔB в образце VAT2 превосходят значения ΔB в образце VAT1 на 0.1 мТл. Поскольку активационные барьеры для обоих образцов одинаковы, то обнаруживаемое различие может быть связано с изменениями в предэкспоненциальном факторе (ν_a) активационного движения, описываемого законом

$$\nu = \nu_a \cdot \exp(-U_a/kT),$$

где k – константа Больцмана, T – температура и ν – частота движения. Поскольку ν_a характеризуется частотами $10^{10} - 10^{12} \text{ Гц}$, то изменения в подвижности CH_2 -групп можно ожидать и в колебательной спектроскопии. Отметим, что некоторое превышение значений ΔB в образце VAT2 над значениями ΔB в образце VAT1 сохраняется по всему температурному интервалу от $+20$ до -5°C (рис. 2 и 3).

На рис. 3 видно, что температурная зависимость ΔB в образце VAT2 при $\Theta = 90^\circ$ имеет ано-

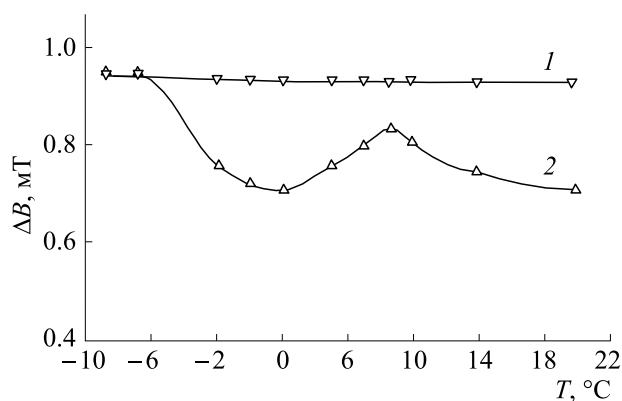


Рис. 3. Зависимость полуширины ΔB широкого компонента спектра ЯМР ^1H в образце VAT2 при различных углах ориентации $\Theta - 0^\circ$ (1) и 90° (2).

малию, которая локализуется в области температур от 4°C до 16°C и имеет максимум при 9°C . Можно полагать, что эта аномалия связана с фазовым переходом. Основанием для этого предположения является то, что в 65%-м водном растворе *трет*-бутилового спирта фазовый переход происходит при 4°C с образованием комплексов дигидрата *трет*-бутилового спирта [9]. Образование комплексов дигидрата возможно и в порах коллагена I, но структура и размер этих пор являются неоднородными [6, 7]. Молекулы в водной подсистеме взаимодействуют с макромолекулами, но это взаимодействие из-за неоднородных пор и сложной структуры макромолекул не может быть регулярным, что, по-видимому, и приводит к наблюдаемому температурному размытию образования комплексов дигидрата $(\text{CH}_3)_3\text{COH}$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые на образцах ахиллова сухожилия крупного рогатого скота методом ЯМР ^1H выявлено влияние молекул $(\text{CH}_3)_3\text{COH}$ на подвижность коллагена I. Это влияние обнаруживается в изменениях предэкспоненциального фактора активационного движения CH_2 -групп макромолекул. Выявленное влияние еще раз доказывает существование взаимодействия между водной подсистемой и макромолекулами коллагена I. Это взаимодействие проявляется наиболее заметно при фазовом переходе в системе « $(\text{CH}_3)_3\text{COH} - \text{H}_2\text{O}$ ». Полученные данные могут быть полезны при исследовании воздействия *трет*-бутилового спирта на кожу человека, а также при проектировании оборудования и разработки технологий для механохимических процессов обработки коллагенсодержащих сырья и материалов [15, 16].

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят профессора С. П. Габуду за постановку задачи при изучении взаимодействий в биологических соединительных тканях.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Госзадание № 121031700313-8).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Collagen I-IV*, Ed. by M. E. Nimni (CRS Press, Boca Raton, FL, 1988).
2. J. P. Orgel, A. Miller, T. C. Irving, et al., *Structure*, **9**, 1061 (2001).
3. J. P. Orgel, A. Miller, T. C. Irving, and T. J. Wess, *Fibre Diffraction Rev.*, **10**, 40 (2002).
4. S. Lees, *Int. J. Biol. Macromol.*, **8**, 66 (1986).
5. S. Lees, *Biophys J.*, **85** (1), 204 (2003). DOI: 10.1016/S0006-3495(03)74466-X
6. S. P. Gabuda, A. A. Gaidash, V. A. Drebushchak, and S. G. Kozlova, *JETP Lett.* **82**, 613 (2005). DOI: 10.1134/1.2161292
7. S. P. Gabuda, A. A. Gaidash, V. A. Drebushchak, and S. G. Kozlova, *J. Struct. Chem.*, **46**, 1131 (2005). DOI: 10.1007/s10947-006-0257-0
8. D. McGregor, *Crit. Rev. Toxicol.*, **40** (8), 697 (2010). DOI: 10.3109/10408444.2010.494249
9. K. Kasraian and P. P. DeLuca, *Pharm. Res.*, **12** (4), 484 (1995).
10. А. Леше, *Ядерная индукция* (ИЛ, М., 1963).
11. G. E. Pake, *J. Chem. Phys.*, **16**, 327 (1948).
12. С. П. Габуда и А. Г. Лундин, *Внутренняя подвижность в твердом теле* (Наука, Новосибирск, 1986).
13. Дж. Уо и Э. И. Федин, *Физика твердого тела*, **4** (6), 2233 (1962).
14. S. P. Gabuda, A. A. Gaidash, and E. A. Vyazovaya, *Biophysics*, **50** (2), 226 (2005).
15. С. А. Комиссаров, В. А. Машкина, М. Н. Машкин и др., *Кожевенно-обувная промышленность*, № 3, 30 (2000).
16. *Аппарат для непрерывной поштучной жидкостной обработки кожевенного сырья и полуфабриката*, Патент МПК C14C15/00 (1989).

A ¹H NMR Study of the Effect of *tert*-Butyl Alcohol on Collagen I

M.N. Mashkin*, V.A. Mashkina**, and S.G. Kozlova***, ****

*Moscow Aviation Institute (National Research University), Volokolamskoe shosse 4, Moscow, 125993 Russia

**Moscow State University of Food Production, Volokolamskoe shosse 11, Moscow, 125080 Russia

***Nikolaev Institute of Inorganic Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, prosp. Akademika Lavrentyeva 3, Novosibirsk, 630090 Russia

****Belgorod State Technological University named after V.G. Shukhov, ul. Kostukova 46, Belgorod, 308012 Russia

The effect of *tert*-butyl alcohol ((CH₃)₃COH) on dynamic states of collagen I macromolecules in bovine Achilles tendon was studied for the first time using ¹H NMR spectroscopy. It appears that being exposed to (CH₃)₃COH can cause changes in the mobility of CH₂-groups that are part of macromolecules and this effect is due to interactions between the aqueous subsystem and collagen macromolecules. The interactions are most strongly manifested during phase transition in the (CH₃)₃COH/H₂O system.

Keywords: Achilles tendon, nuclear magnetic resonance, mobility of CH₂-groups, phase transition