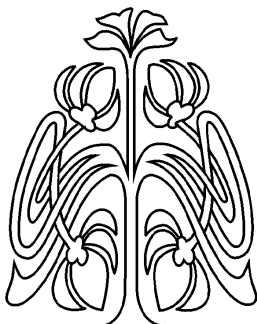




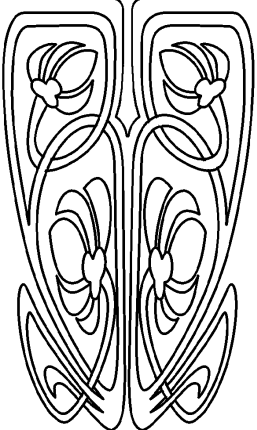
ОПТИКА И СПЕКТРОСКОПИЯ. ЛАЗЕРНАЯ ФИЗИКА

Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Физика. 2022. Т. 22, вып. 4. С. 338–349
Izvestiya of Saratov University. Physics, 2022, vol. 22, iss. 4, pp. 338–349
<https://fizika.sgu.ru> <https://doi.org/10.18500/1817-3020-2022-22-4-338-349>, EDN: OUMCVH

Научная статья
УДК 577.3



НАУЧНЫЙ
ОТДЕЛ



Экспериментальное и теоретическое исследование влияния температуры на колебательные спектры коллагена в водном растворе

Г. Н. Тен¹✉, А. Ю. Герасименко², М. С. Савельев², Н. Е. Щербакова³, М. М. Слепченков¹, О. Е. Глухова¹

¹Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Россия, 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, д. 83

²Национальный исследовательский университет «Московский институт электронной техники», Россия, 124498, г. Москва, г. Зеленоград, площадь Шокина, д. 1

³Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», 410005, Россия, г. Саратов, ул. Университетская, д. 46

Тен Галина Николаевна, доктор физико-математических наук, профессор кафедры радиотехники и электродинамики, TenGN@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5037-4105>

Герасименко Александр Юрьевич, кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник Института биомедицинских систем, gerasimenko@bms.zone, <https://orcid.org/0000-0001-6514-2411>

Савельев Михаил Сергеевич, кандидат физико-математических наук, доцент Института биомедицинских систем, savelyev@bms.zone, <https://orcid.org/0000-0003-1255-0686>

Щербакова Наталья Евгеньевна, научный сотрудник лаборатории молекулярной и оперативной диагностики, hainl@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3261-6128>

Слепченков Михаил Михайлович, кандидат физико-математических наук, доцент кафедры радиотехники и электродинамики, slepchenkovm@mail.ru, <https://orcid.org/org/0000-0002-4282-5629>

Глухова Ольга Евгеньевна, доктор физико-математических наук, заведующий кафедрой радиотехники и электродинамики, glukhova@info.sgu.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5670-2058>

Аннотация. *Объект и предмет исследования.* Проведено экспериментальное и теоретическое исследование влияния температуры на колебательные спектры водного раствора коллагена в интервале 60–90°C. *Результаты исследования.* Согласно выполненному эксперименту сначала при температуре 60°C наблюдается увеличение интенсивности полос поглощения ИК спектров коллагена по сравнению с комнатной температурой, а затем при дальнейшем нагревании водного раствора коллагена происходит уменьшение интенсивности полос поглощения. Для объяснения этого эффекта был использован метод молекулярного моделирования, когда в качестве основного структурного фрагмента был выбран олигопептид Gly-Pro-Hyp-Gly, наиболее часто повторяющийся в структуре коллагена любого типа. Выполненная интерпретация колебательных спектров выбранного молекулярного фрагмента коллагена показала качественное и количественное согласие с экспериментальными спектрами, что позволило использовать его для объяснения температурной зависимости. **Выводы.** Увеличение интенсивностей полос поглощения экспериментального ИК спектра коллагена при 60°C связано с изменением конформации цвиттер-ионной формы олигопептида Gly-Pro-Hyp-Gly, возникающей за счет поворота биполярных групп N^+H_3 и COO^- относительно друг друга. Дальнейшее повышение температуры приводит к понижению pH среды и, как



следствие, к образованию в водном растворе протонированных ионных форм Gly, расположенных на концах молекулярного фрагмента Gly-Pro-Hyp-Gly, что подтверждается расчётом теоретических спектров и их сравнением с экспериментом.

Ключевые слова: коллаген, моделирование ИК и КР спектров, водный раствор, конформеры, зависимость колебательных спектров от температуры

Благодарности: Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках государственного задания (проект № FSRR-2020-0004).

Для цитирования: Тен Г. Н., Герасименко А. Ю., Савельев М. С., Щербакова Н. Е., Слеченков М. М., Глухова О. Е. Экспериментальное и теоретическое исследование влияния температуры на колебательные спектры коллагена в водном растворе // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Физика. 2022. Т. 22, вып. 4. С. 338–349. <https://doi.org/10.18500/1817-3020-2022-22-4-338-349>, EDN: OUMCVH

Статья опубликована на условиях лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY 4.0)

Article

Experimental and theoretical study of the effect of temperature on collagen in aqueous solution

G. N. Ten¹✉, A. Yu. Gerasimenko², M. S. Savelyev², N. E. Shcherbakova³, M. M. Slepchenkov¹, O. E. Glukhova¹

¹Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia

²National Research University "Moscow Institute of Electronic Technology", 1 Shokin Square, Zelenograd, Moscow 124498, Russia

³Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", 46 Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russia

Galina N. Ten¹, TenGN@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5037-4105>

Aleksandr Yu. Gerasimenko², gerasimenko@bms.zone, <https://orcid.org/org/0000-0001-5037-4105>

Mikhail S. Savelyev², savelyev@bms.zone, <https://orcid.org/0000-0003-1255-0686>

Natalia E. Shcherbakova³, hainl@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3261-6128>

Mikhail M. Slepchenkov¹, slepchenkovm@mail.ru, <https://orcid.org/org/0000-0002-4282-5629>

Olga E. Glukhova¹, glukhovaoe@info.sgu.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5670-2058>

Abstract. Background and Objectives: An experimental and theoretical study of the effect of temperature on the vibrational spectra of an aqueous collagen solution in the range of 60–90°C was carried out. **Results:** According to the performed experiment, at first at a temperature of 60°C, an increase in the intensity of the absorption bands of the IR spectra of collagen is observed compared to room temperature, and then, with further heating of the aqueous collagen solution, the intensity of the absorption bands decreases. To explain this effect, a molecular modeling method was used, when the oligopeptide Gly-Pro-Hyp-Gly, the most frequently repeated in the structure of collagen of any type, was selected as the main structural fragment. The interpretation of the vibrational spectra of the selected molecular fragment of collagen showed qualitative and quantitative agreement with the experimental spectra, which made it possible to use it to explain the temperature dependence. **Conclusion:** An increase in the intensity of the absorption bands of the experimental IR spectrum of collagen at 60°C is associated with a change in the conformation of the zwitter-ion form of the oligopeptide Gly-Pro-Hyp-Gly, which occurs due to the rotation of the bipolar groups N^+H_3 and CO^- relative to each other. A further increase in temperature leads to a decrease in the pH of the medium, and, as a consequence, to the formation of protonated Gly ionic forms located at the ends of the Gly-Pro-Hyp-Gly molecular fragment in an aqueous solution, which is confirmed by the calculation of theoretical spectra and their comparison with experiment.

Keywords: collagen, modeling of IR and Raman spectra, aqueous solution, conformers, dependence of vibrational spectra on temperature

Acknowledgements: This work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation in the framework of the State Task (project No. FSRR-2020-0004).

For citation: Ten G. N., Gerasimenko A. Yu., Savelyev M. S., Shcherbakova N. E., Slepchenkov M. M., Glukhova O. E. Experimental and theoretical study of the effect of temperature on collagen in aqueous solution. *Izvestiya of Saratov University. Physics*, 2022, vol. 22, iss. 4, pp. 338–349 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1817-3020-2022-22-4-338-349>, EDN: OUMCVH

This is an open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC0-BY 4.0)

Введение

Коллаген является самым распространённым белком в организме человека и животных, составляя почти одну треть от общего количества белков. Благодаря своей высокой биосовместимости и низкой иммуногенности коллаген используют в различных биомедицинских приложениях. Например, в тканевой инженерии для заживления ран, создания заменителя кожи и регенерации костной ткани [1]; в сердечно-

сосудистой регенеративной медицине и генной терапии [2, 3]; при целевой доставке лекарств [4–6]. Перспективной является разработка коллагеновых скаффолдов [7].

Такое широкое применение коллагена является следствием многообразия его различных физических и биохимических характеристик. Это, в первую очередь, термическая стабильность, механическая прочность и способность вступать в специфические взаимодействия с другими био-



молекулами. Надо отметить, что всестороннее и глубокое исследование этих и других свойств коллагена позволит не только расширить области его использования, но и сделают процесс поиска применения коллагена более целенаправленным и эффективным. Учитывая, что свойства любого молекулярного соединения определяются, главным образом, его составом и строением, целесообразно использовать для этого хорошо зарекомендовавшие себя классические методы исследования структуры, одним из которых является колебательная спектроскопия, позволяющая получать достоверную информацию о структуре молекулы, о её конформационных изменениях и о взаимодействиях между отдельными структурными фрагментами.

Для научных исследований и масштабного применения коллаген извлекают либо из живых организмов, либо создают искусственно. Так, в тканевой инженерии часто используют свиную кожу и бычьи сухожилия. На сегодняшний день обнаружено не менее 29 различных типов коллагена, среди которых наиболее исследованы коллагены I, II, III и IV типов [8]. Несмотря на такое разнообразие, молекулярная структура всех типов коллагена состоит из трёх полипептидных цепей, образующих спираль, состоящую из повторяющихся в характерной последовательности фрагментов Gly-X-Y, где «Gly» – это глицин. На месте «X» и «Y» могут быть любые аминокислотные остатки (кроме триптофана), но чаще всего здесь располагаются пролин (Pro) и гидроксипролин (Hyp), т. е. Gly, Pro, Hyp являются основными аминокислотами, составляющими молекулу коллагена [9].

Надо отметить, что колебательные спектры различных типов коллагена были изучены, главным образом, экспериментальными методами [10–14]. Была показана роль водородной связи Pro...Gly (C=O...NH) и дана оценка её прочности через изменение термодинамического потенциала Гиббса ΔG° , величина которого лежит в пределах от -1.4 до -2.0 ккал/моль [15, 16]. Анализ Фурье-ИК спектров коллагена II типа, выделенного из кожи парусной рыбы (PSC), показал, что валентному колебанию связи NH отвечают полосы поглощения в области 3423, 3337 см^{-1} (Амид А) и 2928, 2924 см^{-1} (Амид В) соответственно. Полосы поглощения Амид I для PSC лежат в области 1600–1700 см^{-1} , а полосы поглощения Амид II и Амид III – в области 1549–1560 и 1240 см^{-1} . Аналогичные проявления, характерные для колебаний типа Амид, можно

наблюдать и для других биоматериалов, используемых для выделения коллагена II типа, обширный материал по исследованию ИК спектров которых представлен в работе [14].

При расчёте колебательных спектров коллагена авторы работ [17–20] использовали модельные расчёты фрагментов коллагена, таких как Gly-Hyp-Pro-Ala или (Pro-Hyp-Gly)₁₀ с заменой Gly на Ala с целью анализа и интерпретации полос поглощения в области ~ 1400 – 1700 см^{-1} .

Цель данной работы – выполнить экспериментальное исследование температурной зависимости ИК и КР спектров коллагена в водном растворе в интервале 60–90°C и определить влияние конформационных изменений цвиттер-ионной и протонированных форм олигопептида Gly-Pro-Hyp-Gly на интенсивность колебательных спектров методом молекулярного моделирования.

1. Методы и подходы

Измерение температурной зависимости спектров коллагена. Для регистрации колебательных спектров коллагена II типа готовилась его водная 2%-ная дисперсия, которая затем с помощью дозатора наносилась на предметное стекло и высушивалась при комнатной температуре. При исследовании влияния температуры на колебательные спектры коллагена было проведено облучение водной дисперсии лазерным излучением с использованием установки для лазерной сварки биотканей. Длина волны основного лазерного излучения составляла 808 нм. Нагрев контролировался, эксперимент проводился при температурах 60, 70, 80 и 90°C. Исследование проводилось с помощью Фурье-ИК спектрометра марки Nicolet iS50 (Thermo Scientific, США), оборудованного приставкой из алмазного кристалла, работающей по принципу нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО). Спектры КР регистрировались с помощью спектрометра марки LabRAM HR Evolution (HORIBA Scientific, Франция), оснащенного конфокальным микроскопом MPlan BX-43 с объективами разрешением 10x/0,25, 50 x/0,75 и 100 x/0,90 (Olympus, Япония). В качестве источника генерирующего лазерное излучение, в установке имеются гелий-неоновый (He-Ne) лазер с длиной волны 633 нм (оптическая мощность – 10 мВт) и аргоновый (Ar) с перестраиваемой длиной волны на 514 и 488 нм (оптическая мощность – 5 мВт).



Метод расчёта. Расчёт колебательных спектров был выполнен методом DFT на уровне V3LYP/6-31g(d,p) по программе Gaussian 09 [21]. Влияние водного раствора на ИК и КР спектры коллагена учитывалось методом самосогласованного реакционного поля SCRF. Вычисленные значения интенсивностей спектров ИК и КР приведены соответственно в «км/моль» и «Å⁴/а. е.м.».

2. Результаты и их обсуждение

Интерпретация ИК и КР спектров коллагена при комнатной температуре. Экспериментальные колебательные спектры коллагена II типа при комнатной температуре приведены на рис. 1.

В качестве структурного фрагмента, позволяющего выполнить интерпретацию колебательных ИК и КР спектров коллагена, был выбран олигопептид Gly-Pro-Hyp-Gly (модель M1), наиболее часто повторяющийся в структуре коллагена любого типа. Данный фрагмент представлен на рис. 2 с учётом того, что в нейтральном водном растворе молекулы аминокислот, в данном случае Gly, имеют цвиттер-ионную форму (N⁺H₃-(R)-COO⁻).

Ранее было показано, что стабилизация цвиттер-ионных форм аминокислот в водных растворах возможна двумя способами: либо методом SCRF, либо за счёт образования водородных связей аминокислот с молекулами воды [22].

Вычисленные методом реактивного поля (SCRF) колебательные ИК и КР спектры цвиттер-

ионной формы молекулярного фрагмента коллагена M1 приведены на рис. 3. Для адекватного сравнения вычисленных и экспериментальных спектров в теоретических ИК спектрах полуширина линий составляла 70 см⁻¹, а в спектрах КР – 20 см⁻¹. Надо отметить, что расчёты спектров были выполнены без учета ангармонизма колебаний и влияния водородных связей, поэтому отнесение теоретических полос поглощения и линий КР было выполнено на основе анализа форм колебаний. Кроме того, это позволит в дальнейшем при моделировании спектров коллагена в температурном интервале 60–90°C учитывать его денатурацию.

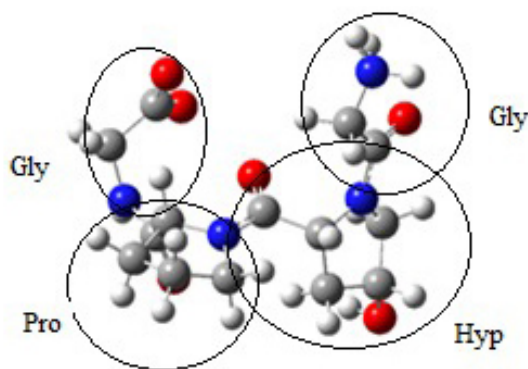
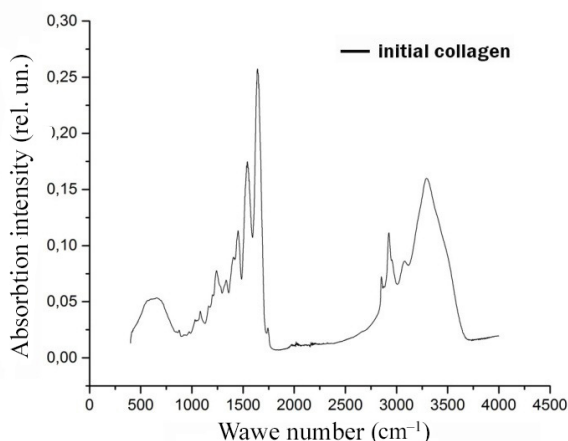


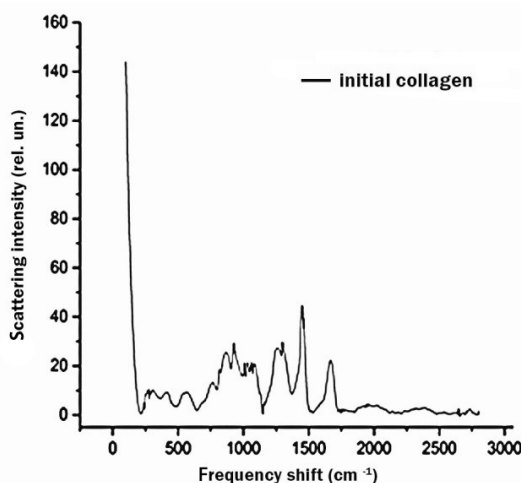
Рис. 2. Цвиттер-ионная форма структурного фрагмента коллагена Gly-Pro-Hyp-Gly (M1) (цвет online)

Fig. 2. Zwitter-ionic form of the structural fragment of collagen Gly-Pro-Hyp-Gly (M1) (color online)

В высокочастотной области ~3000–4000 см⁻¹ проявляются три полосы поглощения, формы которых отвечают валентным колебаниям



a/a



б/б

Рис. 1. Экспериментальные ИК (а) и КР (б) спектры коллагена второго типа

Fig. 1. Experimental IR (a) and Raman (b) spectra of collagen of the second type

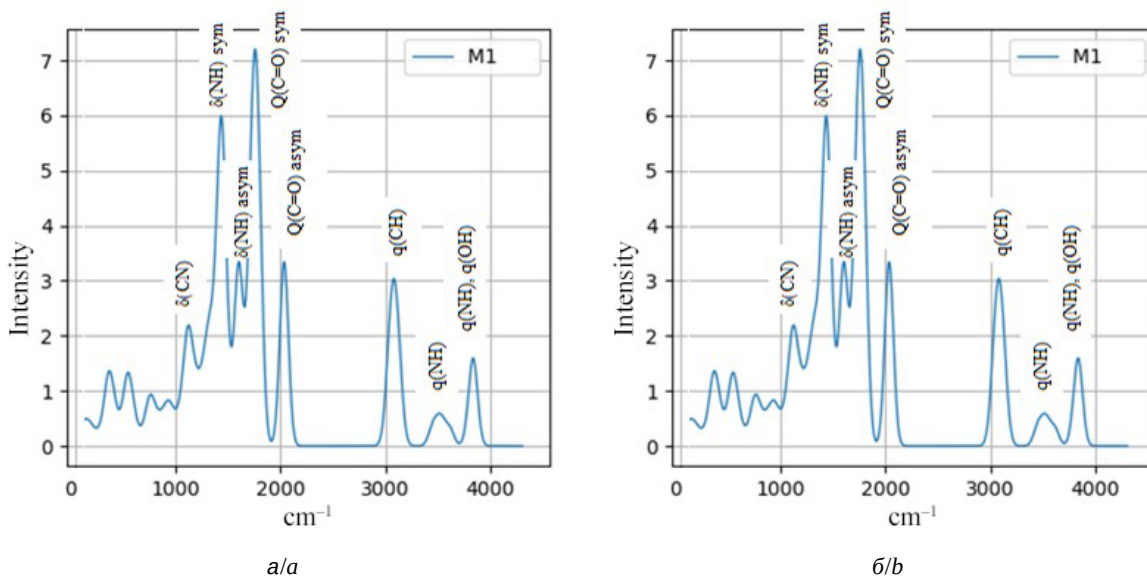


Рис. 3. Вычисленные ИК (а) и КР (б) спектры фрагмента коллагена М1 (цвет online)
Fig. 3. Calculated IR (a) and Raman (b) spectra of the M1 collagen fragment (color online)

связей NH, OH и CH (рис. 3, а). Поскольку цепи коллагена связаны между собой водородными связями типа NH...O, то в экспериментальных спектрах полосы, отвечающие валентным колебаниям q(NH), имеют, в отличие от теоретических спектров, существенно бóльшую интенсивность и смещаются в низкочастотную область на $\sim 200\text{--}300\text{ см}^{-1}$. В спектральной области ниже $\sim 2000\text{ см}^{-1}$ проявляются колебания Амид I, Амид II и Амид III, отвечающие валентным колебаниям связей C=O, деформационным и валентным колебаниям $\delta(\text{NH})$ и q(CN) соответственно. В области $\sim 1000\text{ см}^{-1}$ формы колебаний характеризуются, главным образом, деформационными $\delta(\text{CH})$ и валентными Q(CC) колебаниями Pro и Hур колец. Аналогичное отнесение наблюдается и для линий КР (рис. 3, б).

Сравнение экспериментальных спектров коллагена и вычисленных колебательных спектров модельного фрагмента коллагена М1 показало их качественное согласие, позволяющее использовать структурный фрагмент М1 для дальнейшего рассмотрения свойств коллагена, в данном случае выяснения причины изменения интенсивности его ИК и КР спектров в зависимости от температуры.

Отметим, что характеристичность колебаний амидного фрагмента по частоте и интенсивности приводят к подобию ИК спектра коллагена со спектром альбумина [23].

Экспериментальные колебательные спектры коллагена в температурном интервале 60–90°C. Экспериментальные ИК спектры коллагена в зависимости от температуры приведены на рис. 4. Для объяснения температурной зависимости спектров коллагена нужно принимать во внимание следующий хорошо известный экспериментальный факт. Повышение температуры приводит к ослаблению (и в дальнейшем к разрыву) водородной связи типа CO...HN. Данный процесс сопровождается постепенным уменьшением интенсивности полосы поглощения, отвечающей валентному колебанию связи NH, и смещению ее максимума в высокочастотную область. Но, как показывает экспериментальное исследование, в спектрах коллагена наблюдается нарушение такой монотонной зависимости: сначала при 60°C происходит рост интенсивностей всех полос поглощения ИК спектра коллагена, а затем – уменьшение (см. рис. 4).

Другой, не менее важной причиной, влияющей на изменение интенсивности полос поглощения коллагена при увеличении температуры, может быть изменение конфигурации аминокислотных остатков. Поскольку повышение температуры приводит к увеличению кислотности, т. е. понижению pH водной среды, а изоэлектрическая точка Gly, расположенного на концах молекулярного фрагмента коллагена М1, наблюдается при $pI=6$, то, вероятнее всего, при повышении температуры сначала происходит из-

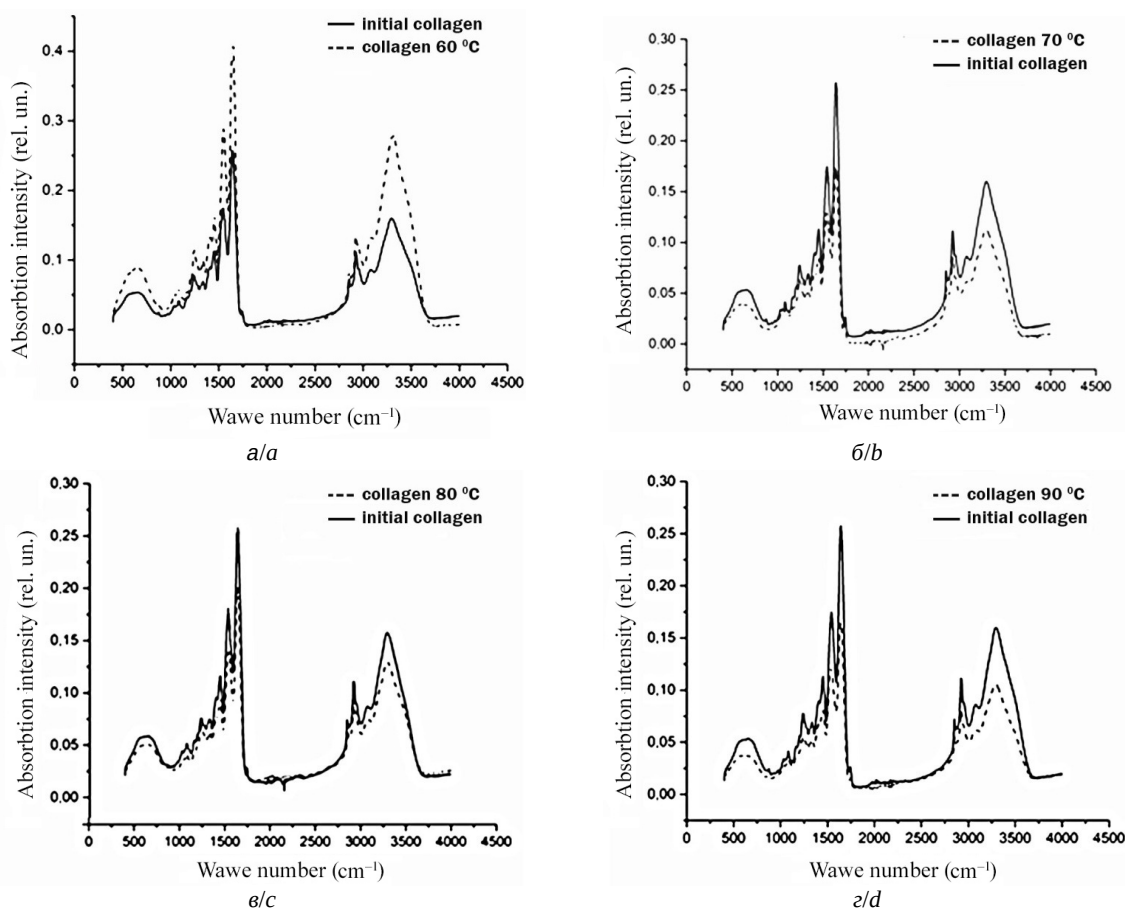


Рис. 4. Экспериментальные ИК спектры коллагена, измеренные при комнатной температуре, и их изменение при увеличении температуры от 60 до 90°C

Fig. 4. Experimental IR spectra of collagen measured at room temperature and their change with an increase in temperature from 60 to 90°C

менение конфигурации цвиттер-ионной формы аминокислотных остатков Gly [24].

Влияние изменения конфигурации цвиттер-ионной формы Gly на интенсивность ИК спектров. Рассмотрим, как изменение конфигурации цвиттер-ионных форм Gly влияет на интенсивность ИК полос поглощения. Ранее

было показано, что в водном растворе цвиттер-ионная форма Gly может занимать разные конфигурации, отличающиеся расположением биполярных групп N^+H_3 и COO^- относительно друг друга, из которых наиболее сильно отличаются две: это заторможенная (шахматная, Gly 1, рис. 5, а) и заслонённая (эллиптическая,

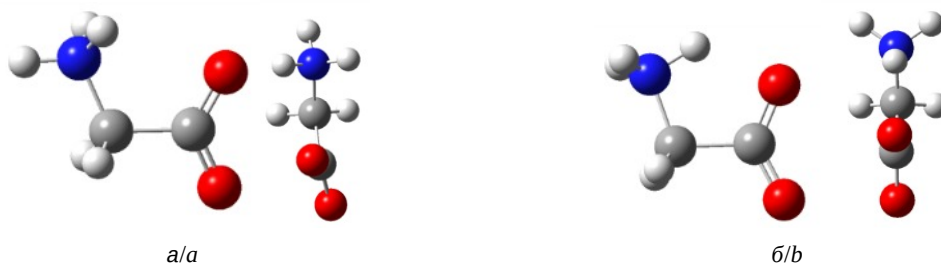


Рис. 5. Пространственное расположение группы N^+H_3 относительно связи COO^- для разных конформеров цвиттер-ионных форм Gly: а – Gly 1; б – Gly 2 (цвет online)

Fig. 5. Spatial arrangement of the N^+H_3 group relative to the COO^- bond for different conformers of zwitter-ion forms of Gly: Gly 1 (a) and Gly 2 (b) (color online)



Gly 2, рис. 5, б). О том, что в водном растворе в результате взаимодействия с молекулами воды наблюдается изменение конфигурации Gly, отмечается также в работе [22].

На рис. 6, а приведены ИК спектры двух конформеров цвиттер-ионной формы Gly, отличающихся друг от друга поворотом группы N^+H_3 вокруг связи CN на 15 град. Такое изменение конфигурации Gly приводит к увеличению интенсивности всех полос поглощения (полуширина линий составляет 10 см^{-1}). Аналогичный результат был получен для другой алифатической аминокислоты Ala (рис. 6, б).

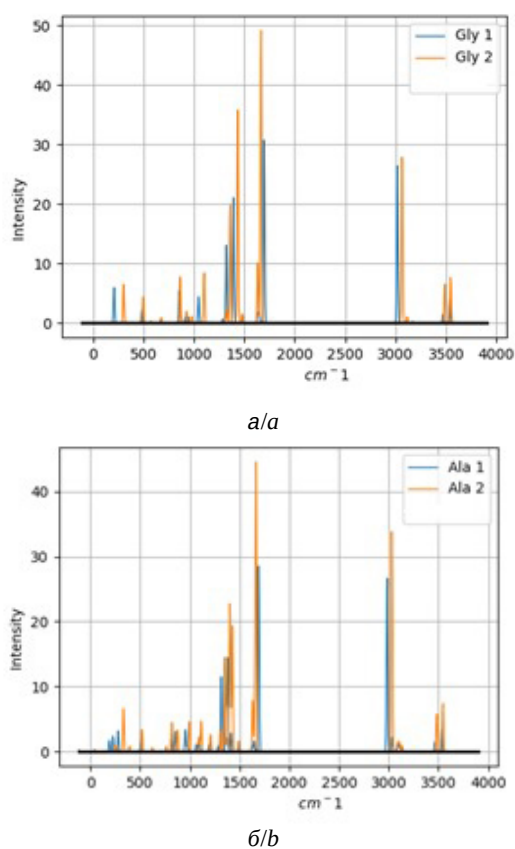


Рис. 6. ИК спектры двух конформеров цвиттер-ионных форм Gly (а) и Ala (б) (цвет online)

Fig. 6. IR spectra of two conformers of zwitter-ion forms Gly (a) and Ala (b) (color online)

Колебательные спектры цвиттер-ионных и протонированных форм молекулярного фрагмента Gly-Pro-Нур-Gly. Учитывая, что второй устойчивой конфигурацией фрагмента Gly-Pro-Нур-Gly в водном растворе является конфигурация M2 (рис. 7), отличающейся от M1 энергией в 11.5 кДж/моль и поворотом группы N^+H_3 вдоль связи CN на 17° , был выполнен расчёт ИК спектра молекулярного фрагмента M2 (рис. 8).

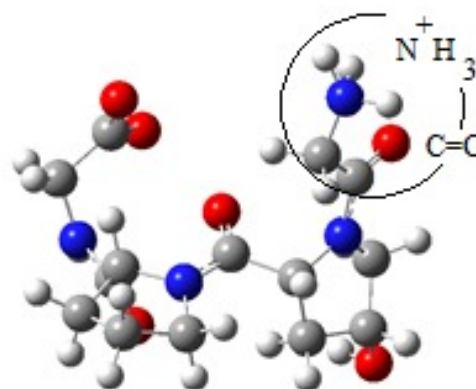


Рис. 7. Молекулярный фрагмент M2 (цвет online)

Fig. 7. Molecular fragment M2 (color online)

Сравнение ИК спектров M1 и M2 подтверждает, что увеличение интенсивности полос поглощения коллагена при повышении температуры до 60°C можно объяснить, главным образом, изменением конформации цвиттер-ионной формы Gly (см. рис. 8).

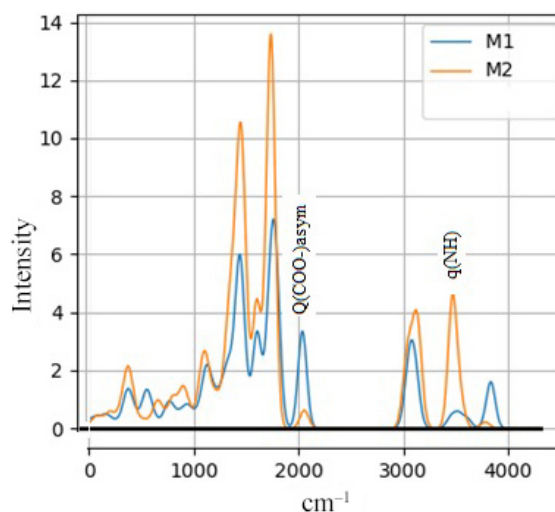


Рис. 8. Вычисленные ИК спектры двух конформеров цвиттер-ионных форм молекулярных фрагментов коллагена M1 и M2

Fig. 8. Calculated IR spectra of two conformers of zwitter-ion forms of molecular fragments of collagen M1 and M2

Кроме того, в ИК спектре M2 наблюдается смещение частоты колебания $q(NH)$ в низкочастотную область с одновременным увеличением интенсивности соответствующей полосы поглощения, а также уменьшение интенсивности полосы поглощения, отвечающей колебанию $Q(CO)$ (см. рис. 8). Эти изменения связаны с образованием ион-дипольного взаимодействия групп N^+H_3 и $C=O$ (см. рис. 7).



Дальнейшее повышение температуры приводит к понижению рН среды, и, как следствие, к образованию в водном растворе протонированных ионных форм М3, М4 и М5 (рис. 9).

Энергии структурных форм М3, М4 и М5 отличаются друг от друга на 3-4 кДж/моль, что в 2-3 раза меньше энергии водородных связей между молекулярными группами, участвующими в образовании пептидных связей. Эти данные также соответствуют значениям энергий аналогичных протонированных конформеров Glu и Ala [22].

Были вычислены ИК спектры всех трех конформеров М3, М4 и М5. Поскольку эти спектры незначительно отличаются друг от друга, то ниже приведен ИК спектр только для М3 (рис. 10, а). Сравнение ИК спектров М1 и М3 показывает, что интенсивности полос поглощения исходного молекулярного фрагмента М1 практически во всех областях спектра незначительно, но превышают

соответствующие интенсивности фрагмента М3, кроме областей проявления валентных $\nu(\text{OH})$ и деформационных $\delta(\text{OH})$ колебаний. В то же время изменение конформации цвиттер-ионной формы коллагена (модель М2) приводит к существенному увеличению интенсивности полос поглощения ИК коллагена по сравнению с ИК спектрами конформеров М3, М4 и М5 и значительно лучше согласию с экспериментом, что позволяет утверждать, что в водном растворе доминирует цвиттер-ионная форма М2 (рис. 10, б).

Для подтверждения результатов анализа ИК спектров были рассчитаны и проведено сравнение спектров КР цвиттер-ионной формы М2 и одной из моделей протонированных форм М4 (рис. 11).

Экспериментальные спектры КР показывают, что в области проявления валентных колебаний $\nu(\text{C}=\text{O})$ повышение температуры приводит

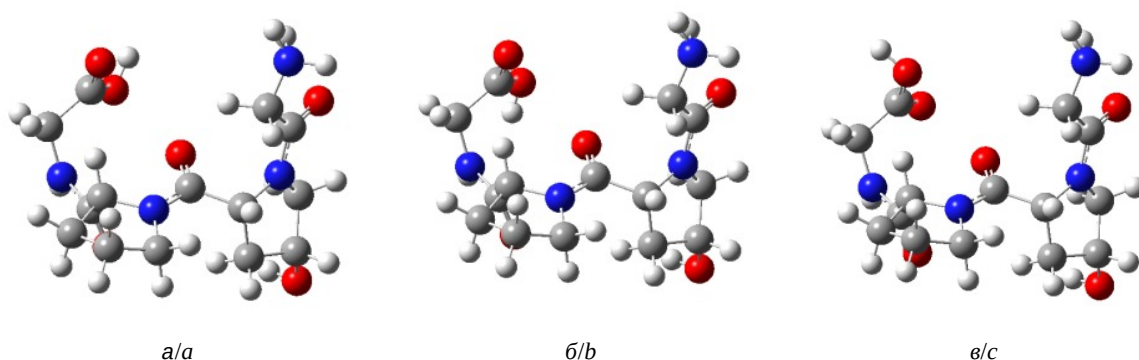


Рис. 9. Молекулярные структуры протонированных ионных форм: а – М3, б – М4, в – М5 (цвет online)

Fig. 9. Molecular structures of protonated forms M3 (a), M4 (b) and M5 (c) (color online)

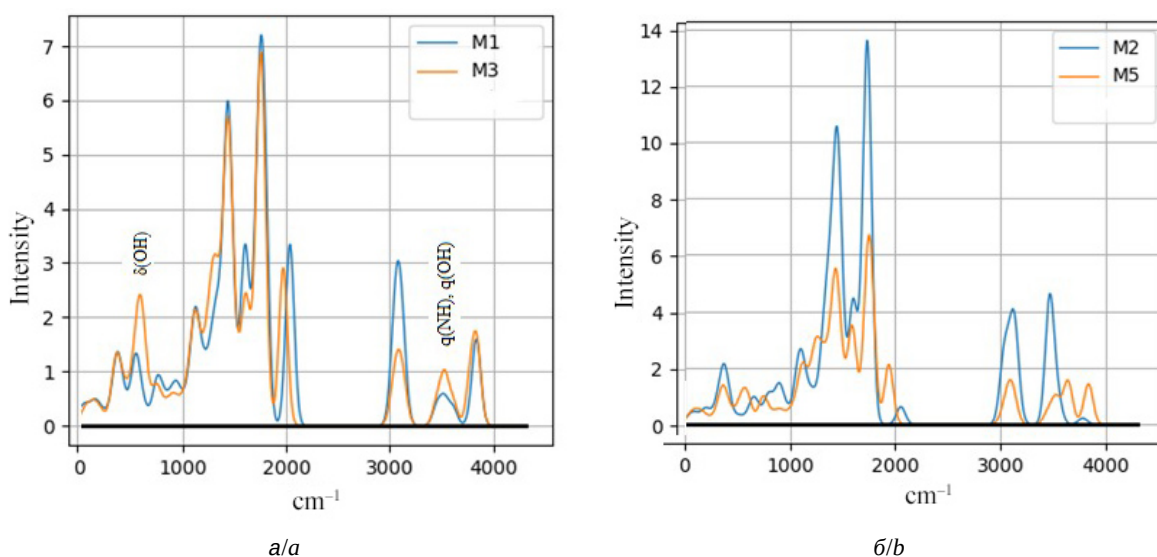


Рис. 10. ИК спектры молекулярных моделей М1 с М3 (а) и М2 с М5 (б) (цвет online)

Fig. 10. IR spectra of molecular models M1 with M3 (a) and M2 with M5 (b) (color online)

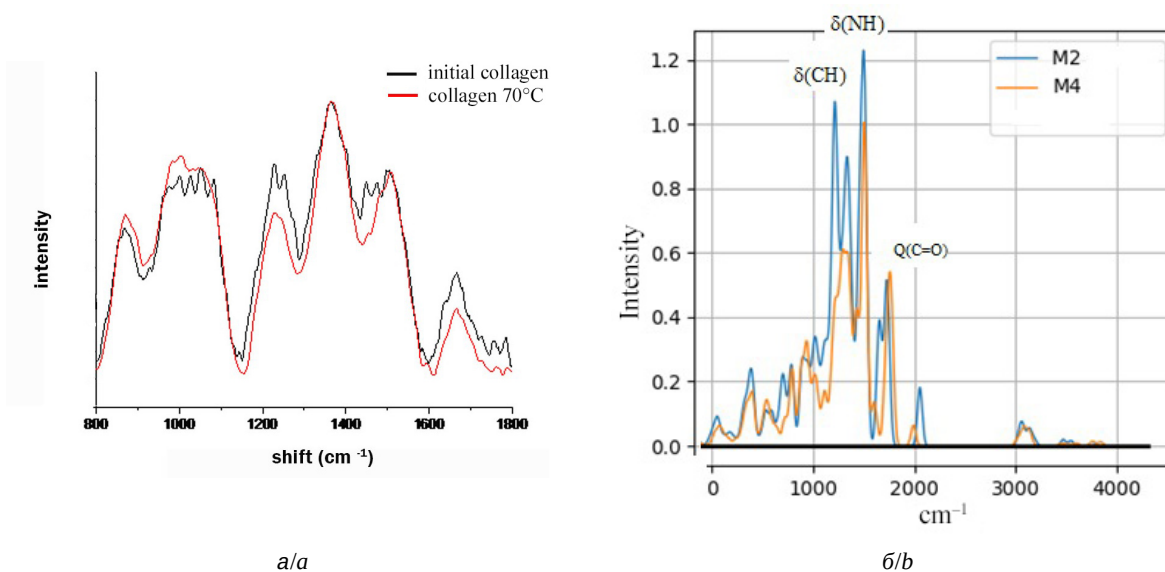


Рис. 11. Экспериментальные (а) и вычисленные (б) спектры КР (цвет online)
Fig. 11. Experimental (a) and calculated (b) Raman spectra (color online)

к уменьшению интенсивности линий КР и они становятся менее структурированными, а в спектральной области $\sim 1400 \text{ cm}^{-1}$ температура мало влияет на интенсивность наиболее сильной линии. Интенсивность двух других сильных по интенсивности линий КР цвиттер-ионной формы для деформационных колебаний $\delta(\text{NH})$ и $\delta(\text{CH})$ понижается, и они сливаются в одну линию (см. рис. 11, а). Аналогичные изменения наблюдаются и для вычисленных спектров М2 и М4 (см. рис. 11, б).

Заключение

Выполнено моделирование колебательных спектров коллагена и проведено исследование их температурной зависимости в интервале 60–90°C. Для этого первоначально была выполнена экспериментальная регистрация ИК и КР спектров коллагена II типа при комнатной температуре и при температурах 60, 70, 80 и 90°C в водном растворе.

В качестве молекулярной модели был выбран фрагмент Gly-Pro-Hyp-Gly (модель М1) как один из наиболее часто встречающихся олигопептидов в структуре коллагена любого типа.

Для интерпретации экспериментальных колебательных ИК и КР спектров коллагена был выполнен расчёт цвиттер-ионной формы М1 методом SCRF в гармоническом приближении. На основе интерпретации полос поглощения молекулярного фрагмента, позволяющей однозначно выполнить отнесение полос поглощения,

отвечающих колебаниям Амид I, Амид II и Амид III, было показано качественное и количественное согласие экспериментальных и теоретических спектров коллагена и фрагмента М1.

Для объяснения увеличения интенсивностей полос поглощения экспериментального ИК спектра коллагена при 60°C были вычислены колебательные спектры структурных фрагментов коллагена цвиттер-ионных форм М1 и М2 с учетом результатов влияния воды на конформационные изменения цвиттер-ионной формы алифатических аминокислот Gly и Ala, приводящих к повороту биполярных групп N^+H_3 и COO^- относительно друг друга.

Далее были выполнены расчёты трех протонированных конформеров молекулярного фрагмента Gly-Pro-Hyp-Gly, образование которых отвечает увеличению кислотности водного раствора коллагена с увеличением температуры. Вычисленные ИК спектры показывают уменьшение интенсивности полос поглощения ИК спектра в полном соответствии с экспериментом. Этот результат также подтверждается сравнением спектров КР коллагена, зарегистрированных экспериментально при комнатной температуре и при температуре выше 60°C, с вычисленными спектрами М1 и М2, причём с учётом тонкой структуры спектра.

Таким образом, выполненное моделирование колебательных спектров коллагена показало, что существенный вклад в изменение интенсивностей ИК и КР спектров коллагена при



повышении температуры вносит конформационное изменение концевых фрагментов коллагена.

Список литературы

1. Chamberlain L., Yannas I., Hsu H., Strichartz G., Spector M. Collagen-GAG substrate enhances the quality of nerve regeneration through collagen tubes up to level of autograft // *Exp. Neurol.* 1998. Vol. 154. P. 315–329. <https://doi.org/10.1006/exnr.1998.6955>
2. Ott H. C., Matthiesen T. S., Goh S.-K., Black L. D., Kren S. M., Netoff T. I., Taylor D. A. Perfusion-decellularized matrix: Using nature's platform to engineer a bioartificial heart // *Nat. Med.* 2008. Vol. 14. P. 213–221. <https://doi.org/10.1038/nm1684>
3. Teebken O., Puschmann C., Breitenbach I., Rohde B., Burgwitz K., Haverich A. Preclinical development of tissue-engineered vein valves and venous substitutes using re-endothelialised human vein matrix // *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 2009. Vol. 37. P. 92–102. <https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2008.10.012>
4. Takeshita F., Hokaiwado N., Honma K., Banas A., Ochiya T. Local and systemic delivery of siRNAs for oligonucleotides therapy // *Methods. Mol. Biol.* 2009. Vol. 487. P. 83–92. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-547-7_4
5. Takeshita F., Ochiya T. Therapeutic potential of RNA interference against cancer // *Cancer Sci.* 2006. Vol. 97. P. 689–696. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2006.00234.x>
6. Sano A., Maeda M., Nagahara S., Ochiya T., Honma K., Itoh H. Atelocollagen for protein and gene delivery // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2003. Vol. 55, № 12. P. 1651–1677. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.08.005>
7. Yang C., Hillas P. J., Baez J. A., Nokelainen M., Balan J., Tang J., Spiro R., Polarek J. W. The application of recombinant human collagen in tissue engineering // *BioDrugs.* 2004. Vol. 18. P. 103–119. <https://doi.org/10.2165/00063030-200418020-00004>
8. Riaz T., Zeeshan R., Zarif F. A., Ilyas K., Muhammad N., Safi S. Z., Rahim A., Rizvi S. A., Rehman I. U. FTIR analysis of natural and synthetic collagen // *Appl. Spectrosc. Rev.* 2018. Vol. 53. P. 703–746. <https://doi.org/10.1080/05704928.2018.1426595>
9. Shoulders M. D., Raines R. T. Collagen structure and stability // *Annu. Rev. Biochem.* 2009. Vol. 78. P. 929–958. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833>
10. Qin L., Bi J.-R., Li D.-M., Dong M., Zhao Z.-Y., Dong X.-P., Zhou D.-Y., Zhu B.-W. Unfolding/refolding study on collagen from sea cucumber based on 2d fourier transform infrared spectroscopy // *Molecules.* 2016. Vol. 21. P. 1546–1560. <https://doi.org/10.3390/molecules21111546>
11. Tamilmozhi S., Veeruraj A., Arumugam M. Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilized collagen from the skin of sailfish (*Istiophorus platypterus*) // *Food Res. Int.* 2013. P. 1499–1505. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.10.002>
12. Veeruraj A., Arumugam M., Ajithkumar T., Balasubramanian T. Isolation and characterization of collagen from the outer skin of squid (*Doryteuthis singhalensis*) // *Food Hydro-colloids.* 2015. Vol. 43. P. 708–716. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.07.025>
13. Chen J., Li L., Yi R., Xu N., Gao R., Hong B. Extraction and characterization of acid-soluble collagen from scales and skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*) // *LWT-Food Sci. Technol.* 2016. Vol. 66. P. 453–459. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.070>
14. Lee J. K., Kang S. I., Kim Y. J., Kim M. J., Heu M. S., Choi B. D., Kim J. S. Comparison of collagen characteristics of sea- and freshwater-rainbow trout skin // *Food Sci. Biotechnol.* 2016. Vol. 25. P. 131–136. <https://doi.org/10.1007/s10068-016-0020-z>
15. Jenkins C. L., Vasbinder M. M., Miller S. J., Raines R. T. Peptide bond isosteres: Ester or (E)-alkene in the backbone of the collagen triple helix // *Org. Lett.* 2005. Vol. 7. P. 2619–2622. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/ol050780m>
16. Boryskina O. P., Bolbukh T. V., Semenov M. A., Gasan A. I., Maleev V. Y. Energies of peptide-peptide and peptide-water hydrogen bonds in collagen: Evidences from infrared spectroscopy, quartz piezogravimetry, and differential scanning calorimetry // *J. Mol. Struct.* 2007. Vol. 827. P. 1–10. <https://doi.org/10.1016/J.MOLSTRUC.2006.05.002>
17. Eifler J. Q. Application of ab initio calculations to collagen and brome mosaic virus. Kansas City, Missouri, 2014. 92 p.
18. Téllez S. C. A., Pereira L., Santos L., Rajasekaran R., Fávero P., Martin A. A. DFT:B3LYP/3–21G theoretical insights on the confocal Raman experimental observations in skin dermis of healthy young, healthy elderly, and diabetic elderly women // *Journal of Biomedical Optics.* 2016. Vol. 21 (12). P. 125002. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.21.12.125002>
19. Bryan M. A., Brauner J. W., Anderle G., Flach C. R., Brodsky B., Mendelsohn R. FTIR Studies of Collagen Model Peptides: Complementary Experimental and Simulation Approaches to Conformation and Unfolding // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. Vol. 129. P. 7877–7884. <https://doi.org/10.1021/ja071154i>
20. Eifler J., Rulis P., Tai R., Ching W.-Y. Computational Study of a Heterostructural Model of Type I Collagen and Implementation of an Amino Acid Potential Method Applicable to Large Proteins // *Polymers.* 2014. Vol. 6. P. 491–514. <https://doi.org/10.3390/polym6020491>
21. Frisch M. J., Trucks G. W., Schlegel H. B., Scuseria G. E., Robb M. A., Cheeseman J. R., Scalmani G., Barone V., Mennucci B., Petersson G. A., Nakatsuji H., Caricato M., Li X., Hratchian H. P., Izmaylov A. F., Bloino J., Zheng G., Sonnenberg J. L., Hada M., Ehara M., Toyota K., Fukuda R., Hasegawa J., Ishida M., Nakajima T., Honda Y., Kitao O., Nakai H., Vreven T., Montgomerly J. A., Jr., Peralta J. E., Ogliaro F., Bearpark M., Heyd J. J., Brothers E., Kudin K. N., Staroverov V. N., Kobayashi R., Normand J., Raghavachari K., Rendell A., Burant J. C., Iyengar S. S., Tomasi J., Cossi M., Rega N., Millam J. M., Klene M., Knox J. E., Cross J. B., Bakken V., Adamo C., Jaramillo J., Gomperts R., Stratmann R. E., Yazyev O.,



- Austin A. J., Cammi R., Pomelli C., Ochterski J. W., Martin R. L., Morokuma K., Zakrzewski V. G., Voth G. A., Salvador P., Dannenberg J. J., Dapprich S., Daniels A. D., Farkas O., Foresman J. B., Ortiz J. V., Cioslowski J., Fox D. J. Gaussian 09. Gaussian Inc., Wallingford CT, 2009. 394 p.
22. Тен Г. Н., Щербакова Н. Е., Баранов В. И. Колебательные спектры основных аминокислот в разных фазовых состояниях. Саратов : Изд-во Саратовского университета, 2017. 188 с.
23. Тен Г. Н., Герасименко А. Ю., Щербакова Н. Е., Баранов В. И. Интерпретация ИК и КР спектров альбумина // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия : Физика. 2019. Т. 19, вып. 1. С. 43–57. <https://doi.org/10.18500/1817-3020-2019-19-1-43-57>
24. Хохлов В. Ю., Селеменев В. Ф., Хохлова О. Н., Загородний А. А. Ионные равновесия в растворах аминокислот при различных температурах // Вестник ВГУ. Сер. химия, биология, фармация. 2003. № 1. С. 18–22.
- analysis of natural and synthetic collagen. *Appl. Spectrosc. Rev.*, 2018, vol. 53, pp. 703–746. <https://doi.org/10.1080/05704928.2018.1426595>
9. Shoulders M. D., Raines R. T. Collagen structure and stability. *Annu. Rev. Biochem.*, 2009, vol. 78, pp. 929–958. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833>
10. Qin L., Bi J. R., Li D. M., Dong M., Zhao Z. Y., Dong X. P., Zhou D. Y., Zhu B. W. Unfolding/refolding study on collagen from sea cucumber based on 2d fourier transform infrared spectroscopy. *Molecules*, 2016, vol. 21, pp. 1546–1560. <https://doi.org/10.3390/molecules21111546>
11. Tamilmozhi S., Veeruraj A., Arumugam M. Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilized collagen from the skin of sailfish (*Istiophorus platypterus*). *Food Res. Int.*, 2013, pp. 1499–1505. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.10.002>
12. Veeruraj A., Arumugam M., Ajithkumar T., Balasubramanian T. Isolation and characterization of collagen from the outer skin of squid (*Doryteuthis singhalensis*). *Food Hydro-colloids*, 2015, vol. 43, pp. 708–716. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.07.025>
13. Chen J., Li L., Yi R., Xu N., Gao R., Hong B. Extraction and characterization of acid-soluble collagen from scales and skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *LWT-Food Sci. Technol.*, 2016, vol. 66, pp. 453–459. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.070>
14. Lee J. K., Kang S. I., Kim Y. J., Kim M. J., Heu M. S., Choi B. D., Kim J. S. Comparison of collagen characteristics of sea-and freshwater-rainbow trout skin. *Food Sci. Biotechnol.*, 2016, vol. 25, pp. 131–136. <https://doi.org/10.1007/s10068-016-0020-z>
15. Jenkins C. L., Vasbinder M. M., Miller S. J., Raines R. T. Peptide bond isosteres: Ester or (E)-alkene in the backbone of the collagen triple helix. *Org. Lett.*, 2005, vol. 7, pp. 2619–2622. <https://doi.org/10.1021/ol050780m>
16. Boryskina O. P., Bolbukh T. V., Semenov M. A., Gasan A. I., Maleev V. Y. Energies of peptide-peptide and peptide-water hydrogen bonds in collagen: Evidences from infrared spectroscopy, quartz piezogravimetry, and differential scanning calorimetry. *J. Mol. Struct.*, 2007, vol. 827, pp. 1–10. <https://doi.org/10.1016/J.MOLSTRUC.2006.05.002>
17. Eifler J. Q. *Application of ab initio calculations to collagen and brome mosaic virus*. Kansas City, Missouri, 2014. 92 p.
18. Téllez S. C. A., Pereira L., Santos L., Rajasekaran R., Fávero P., Martin A. A. DFT:B3LYP/3–21G theoretical insights on the confocal Raman experimental observations in skin dermis of healthy young, healthy elderly, and diabetic elderly women. *J. Biomed. Opt.*, 2016, vol. 21 (12), pp. 125002. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.21.12.125002>
19. Bryan M. A., Brauner J. W., Anderle G., Flach C. R., Brodsky B., Mendelsohn R. FTIR Studies of Collagen Model Peptides: Complementary Experimental and Simulation Approaches to Conformation and Unfolding. *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, vol. 129, pp. 7877–7884. <https://doi.org/10.1021/ja071154i>



20. Eifler J., Rulis P., Tai R., Ching W. Y. Computational Study of a Heterostructural Model of Type I Collagen and Implementation of an Amino Acid Potential Method Applicable to Large Proteins. *Polymers*, 2014, vol. 6, pp. 491–514. <https://doi.org/10.3390/polym6020491>
21. Frisch M. J., Trucks G. W., Schlegel H. B., Scuseria G. E., Robb M. A., Cheeseman J. R., Scalmani G., Barone V., Mennucci B., Petersson G. A., Nakatsuji H., Caricato M., Li X., Hratchian H. P., Izmaylov A. F., Bloino J., Zheng G., Sonnenberg J. L., Hada M., Ehara M., Toyota K., Fukuda R., Hasegawa J., Ishida M., Nakajima T., Honda Y., Kitao O., Nakai H., Vreven T., Montgomery J. A., Jr., Peralta J. E., Ogliaro F., Bearpark M., Heyd J. J., Brothers E., Kudin K. N., Staroverov V. N., Kobayashi R., Normand J., Raghavachari K., Rendell A., Burant J. C., Iyengar S. S., Tomasi J., Cossi M., Rega N., Millam J. M., Klene M., Knox J. E., Cross J. B., Bakken V., Adamo C., Jaramillo J., Gomperts R., Stratmann R. E., Yazyev O., Austin A. J., Cammi R., Pomelli C., Ochterski J. W., Martin R. L., Morokuma K., Zakrzewski V. G., Voth G. A., Salvador P., Dannenberg J. J., Dapprich S., Daniels A. D., Farkas O., Foresman J. B., Ortiz J. V., Cioslowski J., Fox D. J. *Gaussian 09*. Gaussian Inc., Wallingford CT, 2009. 394 p.
22. Ten G. N., Shcherbakova N. E., Baranov V. I. *Kolebatel'nye spektry osnovnykh aminokislot v raznykh fazovykh sostoyaniyakh* [Vibrational spectra of basic amino acids in different phase states]. Saratov, Izdatel'stvo Saratovskogo universiteta, 2017. 188 p. (in Russian).
23. Ten G. N., Gerasimenko A. Yu., Shcherbakova N. E., Baranov V. I. Interpretation of IR and Raman spectra of albumin. *Izvestiya of Saratov University. Physics*, 2019, vol. 19, iss. 1, pp. 43–57 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1817-3020-2019-19-1-43-57>
24. Khokhlov V. Yu., Selemenev V. F., Khokhlova O. N., Zagorodny A. A. Ionic equilibria in amino acid solutions at different temperatures. *Bulletin of VSU, Ser. chemistry, biology, pharmacy*, 2003, no. 1, pp. 18–22 (in Russian).

Поступила в редакцию 09.04.2022; одобрена после рецензирования 23.04.2022; принята к публикации 23.05.2022
The article was submitted 09.04.2022; approved after reviewing 23.04.2022; accepted for publication 23.05.2022