

ИЗМЕНЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-МАССОВЫХ ХАРАКТЕРИСТИК КОЛЛАГЕНА, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ШКУР РЫБ, ПРИ ОБЛУЧЕНИИ СВЧ ИЗЛУЧЕНИЕМ

**Н.В. Кулешова¹, Л.Л. Семенычева¹, И.А. Лузин¹,
М.В. Астанина², А.И. Цветков³**

¹ Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,
г. Нижний Новгород

² ООО «Хеликсан», г. Воронеж

³ Институт прикладной физики Российской академии наук, г. Нижний Новгород

Проведено электромагнитное облучение шкур рыб с частотой 2,45 и 263 ГГц с энергией от 400 до 900 Дж, из которых выделен коллаген. Анализ молекулярно-массовых характеристик коллагена показал, что начиная с облучения с энергией ~400 Дж происходит уменьшение доли высокомолекулярного коллагена и образование фракций коллагена с меньшей молекулярной массой. Коэффициент полидисперсности исходного белка в процессе облучения изменяется незначительно.

Ключевые слова: СВЧ излучение, молекулярно-массовые характеристики коллагена, деструкция.

Введение

Коллаген – фибриллярный белок, имеющий уникальную правозакрученную трехспиральную структуру, является основным структурным белком человека. Он составляет треть общей массы белка в организме в качестве структурных единиц кожи, сосудов и мышц [1].

Множество современных приемопередающих устройств различного назначения работает в S-диапазоне частот (2–4 ГГц). В частности, одной из индустриальных частот является широко распространенная для разных приложений частота 2,4 ГГц (WiFi, DECT, Bluetooth и т. п.). С другой стороны, в настоящее время идет активное освоение терагерцового диапазона частот: такое излучение начинает внедряться в медицину в качестве терагерцовых томографов, с помощью которых можно исследовать кожу, сосуды, мышцы для выявления опухолей и т. п. [2]. В связи с этим важно знать пороговые значения, до которых можно использовать излучение различных диапазонов без вреда для организма, т. е. не вызывающее разрушения тканей, в частности коллагена. Поэтому актуальной задачей является изучение влияния излучения различных диапазонов на состояние коллагена. Особый интерес представляет терагерцовый диапазон.

Целью данной работы является выявление изменений молекулярно-массовых характеристик высокомолекулярного коллагена, свидетельствующее о его разрушении, под влиянием СВЧ излучения. В качестве модельного объекта выбран морской коллаген, имеющий большее структурное сходство с коллагеном человека. Главной задачей стал анализ коллагена методом ГПХ до и после облучения с различной частотой и энергией.

Экспериментальная часть

Образцы шкур рыб облучали электромагнитным излучением различными частотами. В качестве источников излучения использовался магнетрон с частотой 2,45 ГГц и автоматизированный терагерцовый комплекс на основе 263 ГГц гиротрона (фотография представлена на рисунке), созданного в ИПФ РАН (Нижний Новгород) [3].

Коллаген извлекали из образцов методом, описанным в работе [4]. Для выделенного коллагена определяли молекулярно-массовые параметры методом ГПХ. Пробоподготовку осуществляли путем фильтрования образцов с использованием насадочных мембран Millipore Millex-LCR (PTFE 0.45 м). Хроматографическое разделение проводили с применением высокоэффективного жидкостного хроматографа фирмы SHIMADZU CTO-20A/20AC (Япония) с программным модулем LC-Solutions-GPC. Разделение проводили с применением колонки Tosoh Bioscience TSKgel

G3000SWx1 с диаметром пор 5 мкм. В качестве детектора использовали низкотемпературный светорассеивающий детектор ELSD-LT II. Элюентом служил 0,5 М раствор уксусной кислоты. Скорость потока 0,8 мл/мин. Для калибровки применяли узкодисперсные образцы декстрана с диапазоном молекулярных масс 1000–410000 Да (Fluca).



Фотография 263 ГГц гиротрона в криомагните

Обсуждение результатов

Для достижения поставленной цели проводили облучение шкур рыб СВЧ излучением с частотами 2,45 и 263 ГГц так, что поглощенная энергия (доза облучения) составляла от 300 до 900 Дж. При облучении как с частотой 2,45 ГГц, так и 263 ГГц с увеличением дозы облучения наблюдались следующие закономерности: увеличение энергии до 400 Дж мало влияет на молекулярно-массовые характеристики коллагена, выделенного из шкуры рыб. Так в контрольном необлученном образце (табл. 1, строка 1) содержание высокомолекулярного коллагена (ММ~250–300 кДа) составляет ~70 % (~30 % приходится на параллельно образующийся при выделении коллагена из шкур рыб гидролизат с низкой ММ~15 кДа).

Таблица 1

Данные о соотношении фракций коллагена, выделенного из шкур рыб,
после электромагнитного облучения с частотой 2,5 ГГц

№ образца	Энергия, Дж	Доля коллагена, %	
		Высокомолекулярный	Низкомолекулярный
1	–	73±3	27±3
2	300	71±3	29±3
3	400	65±3	35±3
4	450	60±3	40±3
5	500	58±2	42±2
6	550	52±3	45±3
7	600	46±2	56±2
8	650	41±3	59±3
9	700	37±2	63±2
10	750	36±2	64±2
11	800	31±3	69±3
12	850	26±2	74±2

Аналогичный состав имеет место и для первых двух образцов в табл. 1, где представлены результаты исследований состава коллагена по значениям ММ после облучения с частотой 2,45 ГГц. При дальнейшем постепенном увеличении энергии до 850 Дж происходит равномерное уменьшение в образцах доли высокомолекулярного коллагена с 73 до 26 % и соответствующее увеличение низкомолекулярной фракции с 27 до 74 % (табл. 1, столбцы 3 и 4, соответственно). Следует также обратить внимание на то, что разрушение исходных макромолекул происходит не путем постепенного уменьшения ММ исходного образца, а благодаря деструкции отдельных высокомолекулярных цепей до практически олигомерных фрагментов. Об этом свидетельствует незначительное изменение коэффициента полидисперсности (M_w/M_n) высокомолекулярной фракции в пределах 1,1–1,2.

При облучении с более высокой частотой – 263 ГГц наблюдаются следующие закономерности (табл. 2). В контрольном необлученном образце (табл. 2, строка 1) содержание высокомолекулярного коллагена (ММ~250–300 кДа) составляет ~86 %, ~11 % приходится на параллельно образующийся при выделении коллагена из шкур рыб гидролизат с ММ~15 кДа (фракция 1) и ~8 кДа (фракция 2)). При облучении с энергией 150, 200, 300 кДж состав коллагена практически не меняется (табл. 2, строки 2–4). При дальнейшем постепенном увеличении энергии до 450 Дж происходит равномерное уменьшение в образцах доли высокомолекулярного коллагена с 86 до 66 % и соответствующее увеличение низкомолекулярной фракции с ММ ~15 кДа с 11 до 39 % с неизменным содержанием фракции с ММ ~8 кДа в количестве 3 % (табл. 2, строки 2–6).

Таблица 2

Данные о соотношении фракций коллагена, выделенного из шкур рыб, после электромагнитного облучения с частотой 263 ГГц

№ образца	Энергия, Дж	Доля коллагена, %			
		Высокомолекулярный	Низкомолекулярный, фракции		
			1	2	3
1	–	86±1	11±2	3	–
2	150	86±2	12±3	3	–
3	200	85±3	12±2	3	–
4	300	86±2	19±3	2	–
5	400	78±3	39±2	3	–
6	450	66±2	7	5	38±2
7	500	50±2	7	3	40±1
8	600	50±1	6	3	41±2
9	900	50±2		3	

При последующем увеличении поглощенной энергии происходит дальнейшее сокращение в образцах доли высокомолекулярного коллагена до 50 %, при этом наряду с двумя ранее обсужденными фракциями появляется коллаген с ММ ~75–80 кДа в заметных количествах 38–41 %. Как и в случае с облучением с частотой 2,45 ГГц разрушение исходных макромолекул происходит не путем постепенного разрушения с равномерным уменьшением ММ, а благодаря деструкции отдельных высокомолекулярных цепей до практически олигомерных фрагментов при облучении с мощностью до 450 кДж. Дальнейшее увеличение дозы облучения приводит к деструкции до фракций с ММ~15 кДа и с ММ ~75–80 кДа. Как и в случае облучения с частотой 2,45 ГГц изменение (M_w/M_n высокомолекулярной фракции происходит незначительно в пределах 1,1–1,2.

Выводы

Таким образом, установлено, что при обработке шкур рыб электромагнитным излучением с частотой 2,45 ГГц при значении поглощенной энергии от 400 Дж, в образцах выделенного из них коллагена происходит уменьшение доли высокомолекулярного и возрастание доли одной фракции низкомолекулярного коллагена. При облучении с более высокой частотой – 263 ГГц – изменение состава фракций выделенного коллагена происходит также при величине поглощенной энергии выше 400 Дж, но при этом наблюдается деструкция высокомолекулярного коллагена с образованием двух новых фракций с различной молекулярной массой.

Литература

1. Mapping the Ligand-binding Sites and Disease-associated Mutations on the Most Abundant Protein in the Human, Type I Collagen / A. Di LulloGloria, M. Sweeney Shawn, Kőrkkö Jarmo et al. // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277, № 6. – P. 4223–4231. DOI:10.1074/jbc.M110709200.
2. Чекрыгин, В.Э. Терагерцовый диапазон на страже здоровья / В.Э. Чекрыгин // *Известия Южного федерального университета. Технические науки.* – 2009. – Т. 96, № 7. – С. 102–106.
3. Experimental tests of 263 GHz gyrotron for spectroscopy applications and diagnostic of various media / M.Y. Glyavin, A.V. Chirkov, G.G. Denisov et al. // *Review of Scientific Instruments.* – 2015. – V. 86, № 5. – P. 054705-1 – 054705-3.
4. Пат. 2567171 Российская Федерация, МПКА 23 J 1/04; С 08 Н 1/06. Способ получения ук-сусной дисперсии высокомолекулярного рыбного коллагена / Л.Л. Семенычева, М.В. Астанина, Ю.Л. Кузнецова, Н.Б. Валетова, Е.В. Гераськина, О.А. Таранкова. – № 2014140300/13; заявл. 06.10.2014; опубл. 10.11.2015, Бюл. № 31. – 11 с.

Кулешова Надежда Вячеславовна – кандидат химических наук, доцент кафедры аналитической химии Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского. 603950, г. Нижний Новгород, пр. им. Ю.А. Гагарина, 23. E-mail: nvku@yandex.ru

Семенычева Людмила Леонидовна – доктор химических наук, доцент, зав. лабораторией нефтехимии НИИ химии, Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского. 603950, г. Нижний Новгород, пр. им. Ю.А. Гагарина, 23. E-mail: llsem@yandex.ru

Лузин Иван Александрович – студент кафедры аналитической химии, Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского. 603950, г. Нижний Новгород, пр. им. Ю.А. Гагарина, 23. E-mail: vanogreen@mail.ru.

Астанина Маргарита Викторовна – директор, ООО «Хеликсан», 394088, г. Воронеж, ул. Генерала Лизюкова, д. 74., оф. 51.m.astanina@helixan.ru

Цветков Александр Игоревич – научный сотрудник, Институт прикладной физики РАН, 603950, г. Нижний Новгород, БОКС – 120, ул. Ульянова, д. 46. E-mail: tsvetkov@ipfran.ru

Поступила в редакцию 22 марта 2017 г.

DOI: 10.14529/chem170205

CHANGE IN THE CHAIN LENGTH OF COLLAGEN EXTRACTED FROM THE SKIN OF FISH IRRADIATED WITH MICROWAVES

N.V. Kuleshova¹, nvku@yandex.ru

L.L. Semenycheva¹, llsem@yandex.ru

I.A. Luzin¹, vanogreen@mail.ru

M.V. Astanina², m.astanina@helixan.ru

A.I. Tsvetkov³, tsvetkov@ipfran.ru

¹ Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod, Nizhny Novgorod, Russian Federation

² Helixan Ltd., Voronezh, Russian Federation

³ Institute of Applied Physics of the Russian Academy of Sciences, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Electromagnetic irradiation of fish skins, from which collagen had been isolated, was carried out at frequency of 2.45 and 263 GHz with the energy of 400 to 900 J. Analysis of the molecular mass characteristics of collagen showed that starting from irradiation with energy of ~400 J, the decrease in the fraction of high molecular weight and the formation of collagen

fractions with lower molecular mass occurred. The polydispersity coefficient of the initial protein changed insignificantly during the irradiation process.

Keywords: microwave radiation, molecular mass characteristics of collagen, destruction.

References

1. Gloria A. DiLullo, Shawn M. Sweeney, Jarmo K rkk , Leena Ala-Kokko James D. San Antonio. Mapping the Ligand-binding Sites and Disease-associated Mutations on the Most Abundant Protein in the Human, Type I Collagen. *J. Biol. Chem.*, 2002, vol. 277, no. 6, pp. 4223–4231. DOI: 10.1074/jbc.M110709200.
2. Chekrygin V.E. [Terahertz Range on the Guard of Health]. *Izvestija Juzhnogo federal'nogo universiteta. Tehnicheskie nauki* [Proceedings of the Southern Federal University. Technical Science]. 2009, vol. 96, no. 7, pp. 102–106. (in Russ.).
3. Glyavin M.Y., Chirkov A.V., Denisov G.G., Fokin A.P., Kholoptsev V.V., Kuftin A.N., Luchinin A.G., Golubyatnikov G.Y., Malygin V.I., Morozkin M.V., Manuilov V.N., Proyavin M.D., Sedov A.S., Sokolov E.V. Experimental Tests of 263 GHz Gyrotron for Spectroscopy Applications and Diagnostic of Various Media. *Review of Scientific Instruments*. 2015, vol. 86, no. 5, pp. 054705-1 – 054705-3.
4. Semenycheva L.L., Astanina M.V., Kuznezova L.L., Valetova N.B., Geraskina E.V., Tarankova O.A. *Sposob poluchenija uksusnoj dispersii vysokomolekuljarnogo rybnogo kollagena* [Method for Obtaining Acetic Dispersion of High Molecular Weight Fish Collagen]. Patent RF, no. 2567171, 2015.

Received 22 March 2017

ОБРАЗЕЦ ЦИТИРОВАНИЯ

Изменение молекулярно-массовых характеристик коллагена, выделенного из шкур рыб, при облучении СВЧ излучением / Н.В. Кулешова, Л.Л. Семенычева, И.А. Лузин и др. // Вестник ЮУрГУ. Серия «Химия». – 2017. – Т. 9, № 2. – С. 40–44. DOI: 10.14529/chem170205

FOR CITATION

Kuleshova N.V., Semenycheva L.L., Luzin I.A., Astanina M.V., Tsvetkov A.I. Change in the Chain Length of Collagen Extracted from the Skin of Fish Irradiated with Microwaves. *Bulletin of the South Ural State University. Ser. Chemistry*. 2017, vol. 9, no. 2, pp. 40–44. (in Russ.). DOI: 10.14529/chem170205
