

14.3

Идентификация Н-связей кальцинированного аортального клапана

© В.И. Иванов-Омский¹, К.С. Рутковский², Н.И. Гуляев³, А.С. Галенко³, С.Г. Ястребов^{1,¶}

¹ Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

³ Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

¶ E-mail: yastrebov@mail.ioffe.ru

Поступило в Редакцию 19 марта 2019 г.

В окончательной редакции 10 июня 2019 г.

Принято к публикации 10 июня 2019 г.

Методом инфракрасной спектроскопии нарушенного полного внутреннего отражения измерены и проанализированы спектры поглощения субэндотелиальной области створок аортального клапана пациента, страдающего кальцинированным стенозом аорты, и здорового человека. Для сравнения исследованы спектры здоровой кости и аортального клапана свиньи. Исследования выполнены в диапазоне частот $2500\text{--}3600\text{ см}^{-1}$. С помощью разложения на гауссовы компоненты исследована структура полосы поглощения в этой спектральной области. Проведена оценка энергий водородных связей с участием групп О–Н. Показано, что из всех исследованных образцов энергия Н-связи между гидроксильными группами достигает своего максимального значения в образце костной ткани.

Ключевые слова: водородная связь, кальциноз, гидроксипатит.

DOI: 10.21883/PJTF.2019.18.48233.17792

С увеличением продолжительности жизни населения промышленно развитых стран значительно возрастает актуальность исследований, посвященных изучению основ патогенеза заболеваний, присущих лицам пожилого и старческого возраста. Одним из наиболее ярких примеров такого рода патологии может служить кальцинированный аортальный стеноз — заболевание, развивающееся главным образом у лиц старше 70 лет, основное проявление которого заключается в кальцинации створок аортального клапана и связанных с этим расстройствах гемодинамики.

Патогенез кальцинированного аортального стеноза до конца неясен, соответственно в настоящее время не разработано и сколь-нибудь эффективных методов его профилактики, что автоматически делает актуальными исследования, посвященные выявлению основ этого загадочного процесса, которые могут в итоге привести к разработке средств его профилактики и лечения. В патогенезе этой группы заболеваний могут играть роль особенности формирования водородных связей как при образовании самих кальцинатов, так и между кальцинатами и остатками аминокислот в белках [1,2]. В работе [2] высказана гипотеза нуклеации нанокластеров костной ткани — гидроксипатита — при участии водородной связи. В [1] с помощью методов рентгеновской дифракции показано, что нуклеация гидроксипатита происходит в поровом пространстве субэндотелиальных структур аорты, доступ к которым току крови открывается вследствие развития патологического состояния — эндотелиальной дисфункции. В настоящей работе с помощью метода ИК-спектроскопии нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) подтверждается эта гипотеза. Особенностью данного метода является возможность

измерения ИК-спектров с приповерхностной области образцов, т. е. в случае аортальных полулуний получения информации о колебаниях атомов в ближнем порядке, находящихся в субэндотелиальной области.

Известно, что водородная связь (Н-связь), будучи наиболее слабой среди межмолекулярных взаимодействий, обладает способностью обратимого разрушения и восстановления под действием теплового движения молекул при характерных для живого организма температурах. В настоящей работе приведены результаты сравнительного анализа структуры полосы ИК-поглощения белковых тканей различного происхождения, причем основное внимание обращено на комбинированную полосу, называемую Амид А. Интерес к ней определяется прежде всего тем, что она содержит линии поглощения гидроксильными ($-\text{OH}$) и аминными ($=\text{NH}$ и $-\text{NH}_2$) группами, участвующими в образовании комплексов с Н-связями.

Если влияние образования Н-связей на колебательные частоты ОН-групп и их интенсивности довольно хорошо изучено [3,4], то про азотсодержащие группы этого сказать нельзя. По этой причине в дальнейшем для характеристики Н-связей более детально рассматриваются только первые, проведена оценка величины их энергий [4]. Для анализа выбраны образцы разнородных тканей: (i1) аортальный клапан здорового мужчины; (i2) фрагмент створки аортального клапана пациента с кальцинированным стенозом аорты; (i3) фрагмент здоровой кости; (i4) синтетический коллаген и для сравнения клапан свиньи. Образцы тканей у пациента с кальцинированным аортальным стенозом брали при оперативном вмешательстве (протезировании клапана). Кальцинированные полулуния высушивались. Взвешен-

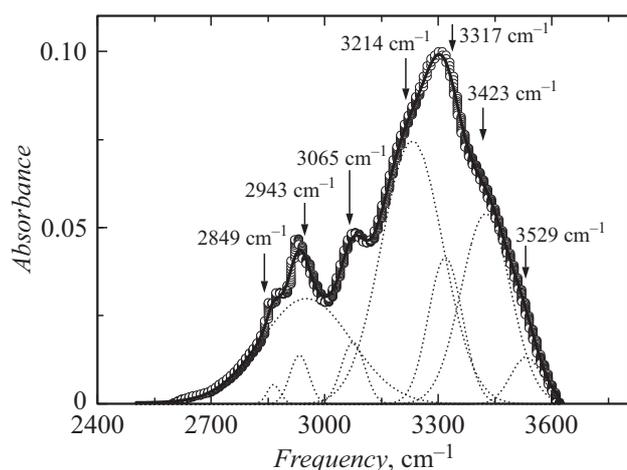


Рис. 1. Спектр полосы Амид А здорового человека и разложение на гауссовы компоненты. Кружки — эксперимент, пунктирными линиями показаны гауссовы контуры, жирная сплошная линия — огибающая гауссовых контуров.

ная по поверхности плотность для области, занимаемой кальцинатами, измеряемая в единицах Хаунсфилда [5], умножается на общую площадь кальцинатов. В работе приведена типичная для всех исследованных отложений кривая рентгеновской дифракции образцов кальцинатов пациента средней тяжести (индекс Агатсона 143) (см также [1]). Регистрация ИК-спектров поглощения непрозрачных образцов проведена с помощью приставки НПВО с однократным отражением и рабочим элементом из материала ZnSe (ATR sampling accessory) с разрешением 4 cm^{-1} на фурье-спектрометре Nicolet-6700 (число сканов выбиралось в пределах 30–100). Измерения выполнены на приборах ресурсного центра СПбГУ Geomodel. В этом методе спектры измеряются для слоя толщиной порядка длины световой волны, т.е. при записи спектров аорты захватываются именно ее субэндотелиальные области.

На рис. 1 представлен фрагмент спектра ИК-поглощения клапана здорового мужчины с целью использования его в качестве базового для дальнейшего сравнения. Для его анализа воспользуемся алгоритмом метода наименьших квадратов [6] для наилучшей нелинейной подгонки эксперимента гауссовыми контурами. Результат этой процедуры представлен на рис. 1 пунктирными кривыми гауссовых контуров и сплошной кривой их огибающей. Видно, что для успешной подгонки достаточно восьми контуров. При этом среднеквадратичное отклонение составляет величину не более 0.01%. Контур с максимумами при 2849 и 2943 cm^{-1} соответствуют хорошо известным полосам поглощения метил-метиленовыми группами, которые, как правило, не участвуют в формировании Н-связей и по этой причине исключены из дальнейшего рассмотрения. Полоса при 3065 cm^{-1} соответствует поглощению валентными колебаниями аминокислотных NH_2 -групп, которые хотя и охватываются

Н-связями, но по причине, указанной выше, оказываются также вне рамок анализа. Зато полоса при 3214 cm^{-1} может быть отнесена к поглощению ОН-группой, участвующей в образовании Н-связей. Именно параметры контура этой полосы использованы в дальнейшем для оценки величины энергии Н-связи. Дополнительным подтверждением предложенной интерпретации является установленное ранее соответствие полосы при 3317 cm^{-1} валентным колебаниям NH-группы коллагена [7,8] и полос при 3423 и 3529 cm^{-1} валентным колебаниям групп –ОН [8]. Контур при 3317 cm^{-1} типичен для валентных колебаний NH-группы коллагена [7,8]. Воспользуемся теперь полученными нами значениями величин частот колебаний ОН-групп для оценки величин энергий комплексов с водородной связью типа ОН...А по величине сдвига этих частот от частоты валентных колебаний

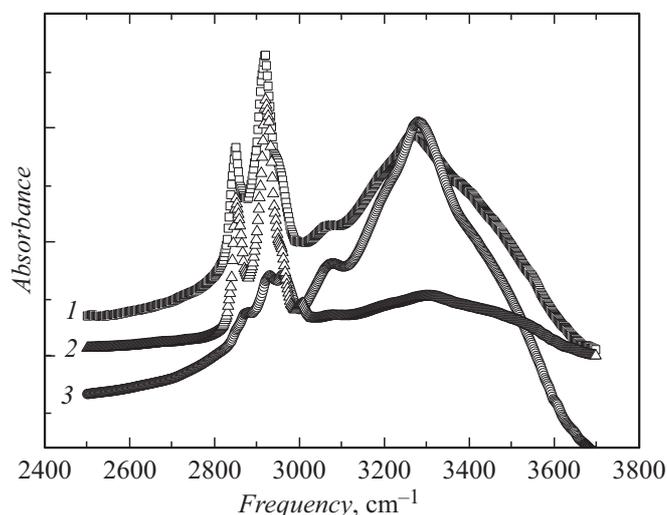


Рис. 2. Спектры полосы Амид А для поврежденного кальцинозом аортального клапана (1), кости (2) и створки аортального клапана здорового человека (3).

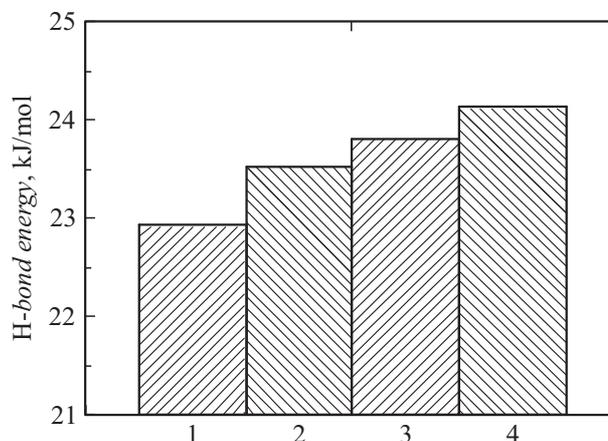


Рис. 3. Сравнительная диаграмма энергий Н-связей. 1 — клапан здорового человека, 2 — аорта, поврежденная стенозом, 3 — синтетический коллаген, 4 — кость.

Энергии Н-связей в клапанах здорового человека

Частоты ОН-групп, cm^{-1}	Сдвиг частоты ОН-групп, cm^{-1}	Энергия Н-связи, kJ/mol
3214 ± 25	421	22.9
3423 ± 15	227	15.8
3529 ± 18	121	7.1

свободных от Н-связей ОН-групп (3650 cm^{-1}) [3]. Пользуясь теперь эмпирическим корреляционным соотношением между сдвигом частоты и величиной энергии образования водородной связи [6], проведем ее оценку. Полученные таким образом результаты представлены в таблице. Видно, что в сердечном клапане здорового человека энергия Н-связи близка к ее энергии в воде ($20\text{--}25 \text{ kJ/mol}$ [9]).

Представляется интересным сравнить данные для образца тканей аортального клапана здорового человека с аналогичными данными для его кости, а также с данными для поврежденного клапана аорты. Соответствующие спектры представлены на рис. 2. Все три спектра сохраняют в основном свою форму, но сильно различаются по взаимному вкладу в поглощение в областях спектра, связанных с ОН- и NH_2 -группами с одной стороны и метил-метиленовыми с другой. Обращает на себя внимание близкая аналогия спектров ткани поврежденного клапана аорты и кости. Видно также, как отличаются они от спектра здоровой ткани. Это отличие может быть интерпретировано как свидетельство того, что поражение аорты происходит по механизму зарождения элементов костной ткани в субэндотелиальных структурах аорты. Перейдем теперь от качественной характеристики спектров на рис. 2 к количественной. С этой целью подвергнем их процедуре, использованной выше для анализа формы спектральных полос на рис. 1. Результат оценки величины энергий Н-связей представлен на рис. 3 в виде диаграммы. На этой диаграмме приведена для сравнения энергия для синтетического обезвоженного коллагена.

Видно, что энергия Н-связи между гидроксильными группами достигает своего максимального значения в костной ткани, при этом она превышает даже ее величину в синтетическом коллагене. Такое увеличение энергии (по абсолютной величине) отвечает уменьшению расстояния между соответствующими гидроксильными группами, а значит, большей плотности белковой ткани в рассматриваемом случае.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют в пользу образования в субэндотелиальных структурах аортальных полулуний элементов костной ткани у пациентов с кальцинированным аортальным стенозом.

Вывод о значимости и применимости предложенного метода напрашивается.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов исследования.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] Ястребов С.Г., Гуляев Н.И., Галенко А.С., Прус М., Сиклицкая А.В. // Письма в ЖТФ. 2019. Т. 45. В. 4. С. 46–48.
- [2] Гуляев Н.И., Жуков М.В., Куранов Г.Л., Борисов Ю.А., Суглобова Е.Д., Ястребов С.Г., Пелешок А.С. // Ульяновск. мед.-биол. журн. 2017. № 1. С. 23–31.
- [3] Libowitzky E. // Monatsh. Chem. 1999. V. 130. N 8. P. 1047–1059.
- [4] Иванов-Омский В.И. // Письма в ЖТФ. 2014. Т. 40. В. 16. С. 29–35.
- [5] Hoffmann U., Brady T.J., Muller J. // Circulation. 2003. V. 108. N 8. P. e50–e53.
- [6] Marquardt D.W. // SIAM J. Appl. Math. 1963. V. 11. N 2. P. 431–441.
- [7] Kudo S., Ogawa H., Yamakita E., Watanabe Sh., Suzuki T., Nakashima S. // Appl. Spectrosc. 2017. V. 71. N 7. P. 1621–1632.
- [8] Movasaghi Z., Rehman S., Rehman I. // Appl. Spectrosc. Rev. 2008. V. 43. N 2. P. 134–179.
- [9] Suresh S.J., Naik V.M. // J. Chem. Phys. 2000. V. 113. N 21. P. 9727–9732.