

УДК 577.322

ВЛИЯНИЕ МИНЕРАЛИЗАЦИИ НА ГИДРАТАЦИЮ И СТРУКТУРНОЕ СОСТОЯНИЕ КОЛЛАГЕНА

Е.П. Борискина, М.А. Семенов, Т.В. Большух, Л.Б. Суходуб¹, Л.Ф. Суходуб²,
В.Я. Малеев

Институт радиофизики и электроники НАН Украины, Харьков, 61085, ул. Ак Проскуры, 12.

¹Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова АМН Украины, Харьков, 61057 ул. Пушкинская, 14.

²Институт прикладной физики НАН Украины, Сумы, 40030, ул. Петропавловская, 58.

Поступила в редакцию 13 января 2007 г.

С использованием методов ИК спектроскопии, пьезогравиетрии и анализа изотерм гидратации с помощью модели адсорбции Д'Арси и Ватта проведено комплексное исследование влияния минерализации гидроксиапатитом на гидратацию и структурное состояние коллагена. Получено, что минерализация приводит к частичному закрытию центров гидратации коллагена, при этом нарушается формирование наружного слоя гидратной оболочки тройной спирали и увеличивается энергия связывания молекул воды во внутреннем слое гидратной оболочки, минерализация коллагена сопровождается частичным изменением его конформации.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: коллаген, гидроксиапатит, минерализация, энергия гидратации, ИК спектроскопия, пьезогравиетрия

Интерес к изучению минерализации коллагена связан с важной ролью, выполняемой им в организме человека, так как минерализованные коллагеновые фибриллы составляют основу опорных тканей животных и человека и обуславливают их уникальную механическую прочность.

Минерализованный коллаген представляет собой упорядоченную и ориентированную двухфазную систему [1].

Органическая фаза - коллаген - образует сложную матрицу с несколькими уровнями организации. Надмолекулярным уровнем организации коллагена являются фибриллы, составленные из молекул тропоколлагена, уложенных последовательно конец в конец и сторона к стороне. Расстояние между соседними молекулами равно 15 Å, сдвиг D соседних молекул составляет 670 Å, зазоры между головными и хвостовыми концами молекул равны 400 Å. Участки перекрывания всех молекул тропоколлагена в фибрилле называются зонами "overlap", а участки, соответствующие зазорам между ними - зонами "gap" [2, 3]. Тропоколлагеновые молекулы представляют собой правые тройные суперспирали, скрученные из трех первичных левоспиральных аминокислотных цепей типа полипролин II, характеризующихся (Gly-X-Y)_n периодичностью [4, 5] (рис.1). В термодинамической стабилизации тройной спирали важную роль играют молекулы воды высокоупорядоченной гидратной оболочки, локализованные между трехспиральными тропоколлагеновыми молекулами и внутри "gap"-зон.

Минеральная фаза - биоапатит - представляет собой нанокристаллы нестехиометрического гидроксиапатита со структурной формулой $(Ca, X)_{10}(PO_4, Y)_6(OH, Z)_2$, где X - замещающие катионы (Mg^{2+} , Na^+ , Fe^{2+}), Y и Z - замещающие анионы (CO_3^{2-} ,

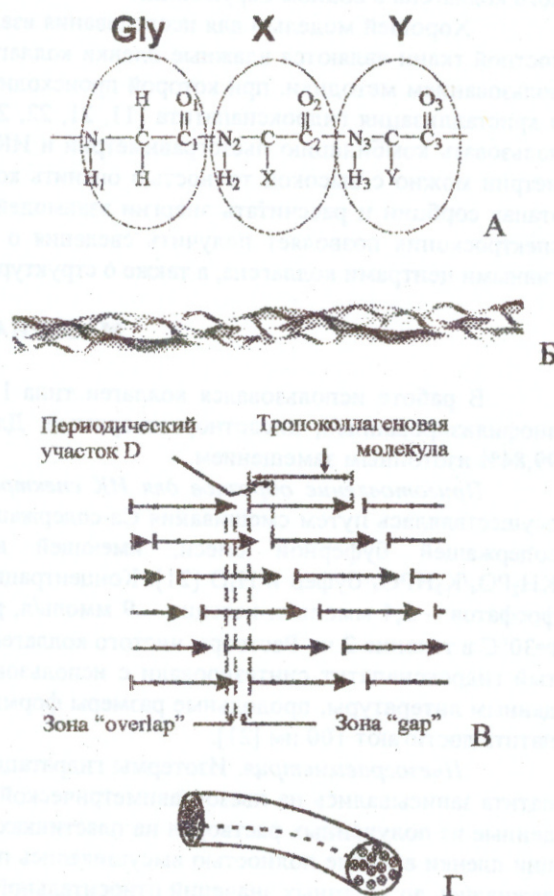


Рис. 1. Уровни организации коллагена: первичная структура (А), тропоколлагеновая молекула (Б), коллагеновая фибрилла (В), коллагеновое волокно (Г).

HPO_4^{2-} , F⁻, Cl⁻) [6, 7]. Размеры зрелых нанокристаллов биоапатита составляют 50x25x3 нм [8, 9].

Первичными центрами нуклеации кристаллов биоапатита являются участки тропоколлагеновых молекул, расположенные на границе зон "gap" и "overlap", богатые кислотными аминокислотными остатками, связывающими ионы Ca^{2+} формирующихся кристаллов биоапатита [10, 11]. Вторичные Ca^{2+} -связывающие участки находятся в зоне "gap" тропоколлагеновых молекул. Два Ca^{2+} -связывающих центра разделены зоной компактного расположения основных и гидрофобных аминокислотных остатков [12]. Кроме того, каждая тропоколлагеновая молекула при физиологических значениях pH и ионной силы содержит два участка, связывающих фосфат-анионы HPO_4^{2-} [13]. Один из фосфат-связывающих сайтов располагается на границе зон "gap" и "overlap" в непосредственной близости от Ca^{2+} -связывающего участка [13, 14].

Рост кристаллов гидроксиапатита при минерализации происходит таким образом, что с-ось большей части образующихся нанокристаллов ориентирована вдоль коллагеновых фибрилл. [15, 7, 16, 17]. Преципитация минеральной фазы, начинающаяся в пространствах между головками и хвостами соседних тропоколлагеновых молекул, продолжается в направлении продольных каналов между фибриллами [18, 19, 20]. При этом происходит вытеснение располагающихся в этих зонах молекул воды. В зрелой минерализованной кости содержание апатита по объему составляет 50-60%, остальная часть приходится на коллаген, воду и клетки соединительной ткани [18, 19].

Несмотря на то, что коллаген является хорошо исследованным биологическим объектом, многие вопросы, связанные с процессом его минерализации, остаются до конца не выясненными.

Целью данной работы является выяснение влияния минеральной фазы на конформационное состояние и гидратную оболочку трехспиральных тропоколлагеновых молекул и получение информации о молекулярных механизмах взаимодействия между органической и минеральной фазами минерализованного коллагена в водном окружении.

Хорошей моделью для исследования взаимодействия в системе коллаген-гидроксиапатит-вода в костной ткани являются влажные пленки коллагена, минерализованные гидроксиапатитом *in vitro* с использованием методики, при которой происходит одновременное формирование коллагеновых фибрилл и кристаллизация гидроксиапатита [11, 21, 22, 23]. В качестве методов исследования перспективно использовать комбинацию пьезограмметрии и ИК спектроскопии. С использованием метода пьезограмметрии можно с высокой точностью оценить количество молекул воды, связывающихся на различных этапах сорбции и рассчитать энергии взаимодействия молекул воды с коллагеном, в то время, как ИК спектроскопия позволяет получить сведения о процессе образования водородных связей гидратноактивными центрами коллагена, а также о структурном состоянии тройной спирали.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовался коллаген типа I из кожи теленка производства фирмы Sigma (C9791), лиофилизированный, кислотнорастворимый. Для дейтерообмена применялся оксид дейтерия (D_2O) с 99,84% изотопным замещением.

Приготовление образцов для ИК спектроскопии и пьезограмметрии. Минерализация коллагена осуществлялась путем смешивания Са-содержащего раствора коллагена в 0,01 молярной HCl и фосфат-содержащей буферной смеси, имеющей в своем составе гидроксиметиламинотетрагидроксиапатит, NaCl, $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ буфер и H_2O [21]. Концентрация коллагена в конечном растворе составляла 2,5 мг/мл, фосфатов – 5,4 ммоль/л, кальция – 9 ммоль/л, pH раствора 7,45. Конечный раствор выдерживался при $t=30^\circ\text{C}$ в течение 2 ч. Растворы чистого коллагена готовили по той же методике без добавления Са. Чистый гидроксиапатит синтезировали с использованием тех же растворов без добавления коллагена. По данным литературы, продольные размеры формирующихся при данной методике кристаллов гидроксиапатита достигают 100 нм [21].

Пьезограмметрия. Изотермы гидратации чистого и минерализованного коллагена и гидроксиапатита записывались на пьезограмметрической установке [24, 25]. Образцами служили пленки, высаженные из полученных растворов на пластинках кварцевого резонатора. Для изучения процесса гидратации пленки вначале полностью высушивались путем вакуумной откачки (вакуум до 10^{-3} торр), затем увлажнялись до заданных значений относительной влажности (ОВ) в диапазоне 0-95% методом дозированной подачи паров воды. Измерения проводились при температуре 20°C . Изотермы гидратации записывались в виде зависимости количества сорбируемой образцом воды, n (моль H_2O /моль $-\text{Gly}-\text{X}-\text{Y}-$ сорбента или г H_2O /г сорбента), от ОВ (%). Значения n определялись по формулам

$$n = \frac{\Delta f_i \cdot \Delta f_m}{\Delta f_m} \quad (\text{г } \text{H}_2\text{O}/\text{г сорбента}), \quad (1)$$

Влияние минерализации на гидратацию и структурное состояние коллагена

$$n = \frac{M_{\text{Gly-X-Y}}}{M_{\text{H}_2\text{O}}} \cdot \frac{\Delta f_i - \Delta f_m}{\Delta f_m} \quad (\text{моль H}_2\text{O/моль -Gly-X-Y- сорбента}), \quad (2)$$

где $M_{\text{Gly-X-Y}}$ и $M_{\text{H}_2\text{O}}$ – молекулярные массы трипептида –Gly-X-Y– и воды, соответственно, Δf_i – разность частот опорного и измерительного кварцевого резонатора при $i^{\text{о}}$ – влажности; Δf_m – разность частот опорного и измерительного кварцевого резонатора при ОВ=0%. Погрешность определения n составляла $\pm 0,1$ моль H_2O на 1 моль –Gly-X-Y–.

ИК спектроскопия. Образцами для ИК спектроскопии служили пленки чистого и минерализованного коллагена, высаженные из полученных растворов на окошках из CaF_2 , а также таблетки, приготовленные из гидроксиапатита (0,8-1,2 мг + 500 мг KBr). Для изучения процесса гидратации пленки сначала высушивались методом вакуумной откачки кювет (вакуум до 10^{-2} торр), затем увлажнялись до заданных значений ОВ в диапазоне 0-86% путем инкубирования пленок в атмосфере паров насыщенных растворов различных солей в H_2O и D_2O до достижения равновесного состояния [26, 27]. ИК спектры сухих и увлажненных пленок исследуемых веществ записывались с помощью двулучевого спектрометра UR-20 (Karl Zeiss, Jena, Германия) с использованием призмы NaCl при комнатной температуре. Спектр записывали в интервале частот $900\text{-}3700 \text{ см}^{-1}$, в котором поглощают сорбированная вода и колебательные группы исследуемых веществ, чувствительные к гидратации и структурному состоянию коллагеновой молекулы [28, 29].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 2 представлены зависимости массы воды, сорбированной пленками чистого коллагена, гидроксиапатита и минерализованного коллагена, от уровня ОВ окружающей среды, полученные с использованием различных экспериментальных методов. Изотермы гидратации (рис. 2А) получены путем микровзвешивания образцов с помощью пьезограмметрии, зависимость пиковой интенсивности полосы поглощения с максимумом при 3450 см^{-1} , отнесенной к валентным колебаниям ОН групп воды, от уровня ОВ (рис. 2Б), построена с использованием результатов ИК спектроскопии.

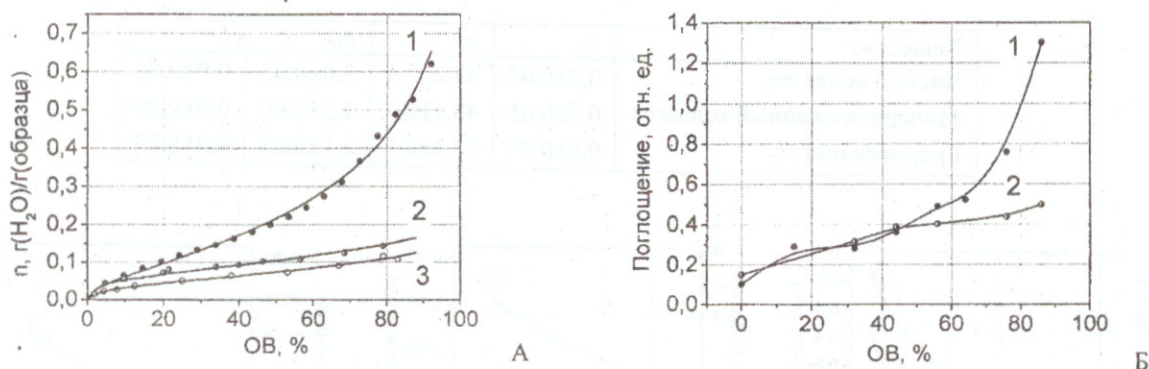


Рис. 2. Зависимости массы воды, сорбированной пленками чистого коллагена (1), минерализованного коллагена (2) и гидроксиапатита (3) от уровня ОВ: А) изотермы гидратации, полученные с использованием пьезограмметрии, Б) зависимости пиковой интенсивности полосы валентных колебаний ОН групп воды от уровня ОВ, построенные с использованием данных ИК спектроскопии. Значения пиковой интенсивности нормированы на массу коллагена в пленке образца.

Из графиков видно, что способность сорбировать воду при увеличении уровня ОВ в ряду исследуемых образцов снижается в такой последовательности: чистый коллаген, минерализованный коллаген, гидроксиапатит. По данным пьезограмметрии, при 90% ОВ соотношение массы воды, сорбированной пленками образцов, составляет соответственно 5,2 : 1,3 : 1. Эти результаты свидетельствуют о том, что сорбционная способность гидроксиапатита значительно ниже, чем коллагена, кроме того, в присутствии гидроксиапатита центры гидратации коллагеновых молекул частично закрыты для доступа молекул воды. Снижение сорбционной способности коллаген-апатитного композита по сравнению с сорбционной способностью чистого коллагена было ранее показано в [30] для коллагена, минерализованного взвесью гидроксиапатита.

Кроме того, из зависимостей пиковой интенсивности полосы 3450 см^{-1} от ОВ (рис. 2Б) можно грубо оценить остаточное количество воды в пленках после их высушивания. Получено, что при высушивании пленок в условиях вакуума 10^{-2} торр, которое применяется для образцов, исследуемых методом

ИК спектроскопии, количество остаточной воды не превышает 0,5 молекул воды на один фрагмент -Gly-X-Y-. Учитывая, что при пьезограмметрии условия высушивания более жесткие (вакуум 10^{-3} торр), мы полагаем, что количество остаточной воды в образцах после высушивания близко к нулю.

Количественный анализ сорбции воды проводили с использованием изотерм гидратации, полученной методом пьезограмметрии, так как этот метод является более точным.

Для нахождения количественных параметров гидратации было получено аналитическое описание экспериментальных изотерм гидратации согласно модели адсорбции воды Д'Арси и Ватта [24], учитывающей гетерогенность адсорбента:

$$n(x) = \frac{V_m \cdot a_L \cdot x}{1 + a_L \cdot x} + a_H \cdot x + \frac{b \cdot x}{1 - b \cdot x}, \quad (3)$$

где x – относительная влажность, первый член описывает стадию адсорбции молекул воды сильно связывающими центрами монослоя по закону Лэнгмюра; второй – адсорбцию молекул воды слабо связывающими центрами по закону Генри; третий – мультислойную адсорбцию молекул воды; V_m – емкость монослоя; a_L , a_H и b – активности воды, соответственно, на стадиях лэнгмюровской, генриевской и мультислойной адсорбции.

Параметры уравнения Д'Арси и Ватта найдены с помощью алгоритма оптимизации по методу деформируемого многогранника, целевой функцией в котором выступала невязка между экспериментальной и рассчитанной изотермой. Найденные в ходе разложения параметры уравнения Д'Арси и Ватта представлены в таблице 1.

С использованием рассчитанных параметров изотерма гидратации была разложена на три кривые, которые соответствуют лэнгмюровской, генриевской и мультислойной адсорбции, по которым можно легко оценить процесс сорбции воды во внутреннем и наружном слое гидратной оболочки исследуемых веществ. Результаты разложения изотерм гидратации приведены на рис. 3.

Таблица 1. Параметры уравнения Д'Арси и Ватта, где V_m – емкость монослоя; a_L , a_H и b – активности воды, соответственно, а стадиях лэнгмюровской, генриевской и мультислойной адсорбции.

Вещество	V_m	a_L	a_H	b
Чистый коллаген	$0,5 \pm 0,05$	$43,2 \pm 0,1$	$3,0 \pm 0,05$	$0,9 \pm 0,05$
Минерализованный коллаген	$0,7 \pm 0,05$	$48,1 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,05$	$0,9 \pm 0,05$
Гидроксиапатит	$0,9 \pm 0,05$	$28,3 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,05$	$0,9 \pm 0,05$

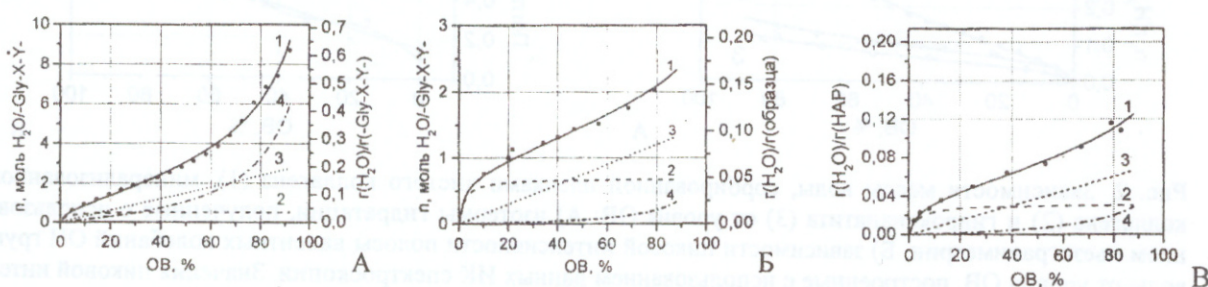


Рис. 3. Изотермы гидратации (1), и их разложение на кривые лэнгмюровской (2), генриевской (3) и мультислойной (4) адсорбции по модели адсорбции Д'Арси и Ватта для чистого коллагена (А), минерализованного коллагена (Б) и гидроксиапатита (В)

Из рис. 3 видно, что при 90% ОВ внутренний слой гидратной оболочки тройной спирали, в котором молекулы воды сорбируются по законам Лэнгмюра и Генри, у чистого коллагена состоит соответственно из $3,2 \pm 0,1$ ($0,5 \pm 0,1 + 2,7 \pm 0,1$), а у минерализованного коллагена из $2,0 \pm 0,1$ ($0,7 \pm 0,1 + 1,3 \pm 0,1$) молекул воды на один -Gly-X-Y- фрагмент. Эти молекулы воды образуют наиболее прочные водородные связи с гидратноактивными центрами исследуемых веществ.

Количество молекул воды, сорбируемых при 90% ОВ в мультислой, для чистого коллагена равно $5,3 \pm 0,1$, для минерализованного – $0,3 \pm 0,1$ на один один -Gly-X-Y- фрагмент. Общее количество воды, сорбированной одним -Gly-X-Y- фрагментом чистого и минерализованного коллагена при 90% ОВ составляет соответственно $8,6 \pm 0,1$ и $2,3 \pm 0,1$ молекул на -Gly-X-Y- фрагмент.

Влияние минерализации на гидратацию и структурное состояние коллагена

Таким образом, снижение сорбционной способности минерализованного коллагена по сравнению с чистым проявляется в уменьшении количества молекул воды, сорбируемых в слое Генри и в мультислойе, сорбция воды в слое Лэнгмюра не изменяется.

У гидроксиапатита сорбция воды происходит в основном по закону Генри, при 90% ОВ в этом слое сорбируется $0,06 \pm 0,01$ г воды на 1 г образца, мультислойная сорбция практически не наблюдается, сорбция по закону Лэнгмюра выходит на насыщение при присоединении $0,03-0,04$ г воды на 1 г образца, что в 1,5-2 раза ниже, чем аналогичные значения для чистого и минерализованного коллагена.

По данным рентгеноструктурного анализа (РСА), с одним трипептидом коллагеновых структур в отсутствие гидроксиапатита в среднем непосредственно связаны три молекулы воды, одна молекула с карбонильной группой глицина и две с карбонильной группой аминокислоты Y [31, 32, 33]. Эти молекулы воды образуют внутренний слой гидратной оболочки трехспиральной коллагеновой молекулы. Кроме того, 3-4 молекулы образуют водородные связи с молекулами воды внутреннего слоя, формируя наружный слой гидратной оболочки [31].

Результаты, полученные нами для чистого коллагена, в целом согласуются с данными РСА. Для минерализованного коллагена показано, что количество молекул воды во внутреннем слое гидратной оболочки уменьшается до $2,0 \pm 0,1$ на один -Gly-X-Y- фрагмент, а процесс образования наружного слоя гидратной оболочки нарушен. Это, по-видимому, связано с тем, что формирующиеся нанокристаллы гидроксиапатита вытесняют молекулы воды из занимаемого ими ранее объема, кроме того, они могут создавать стерические препятствия для проникновения воды внутрь фибриллы.

Используя параметры уравнения Д'Арси и Ватта (таблица 1), полученные при разложении изотерм гидратации, можно вычислить теплоту адсорбции воды $\Delta Q_i = R \cdot T \cdot \ln a_i + T \cdot \Delta S_i$ в адсорбционных слоях Лэнгмюра и Генри, ΔQ_L и ΔQ_H , соответственно, а также энтальпию и энергию гидратации $\Delta E_{hydr} = \Delta H_{судр} = - \sum \Delta Q_i$ для чистого и минерализованного коллагена и гидроксиапатита. При этом $a_i =$

K_i / K_w , где K_i - константы адсорбционного равновесия Лэнгмюра и Генри в реакции (пар + вещество \rightarrow единичный комплекс), а K_w - константа конденсации воды в реакции (насыщенный пар \rightarrow жидкость). Таким образом, значения ΔQ_i представляют собой разность между полной теплотой адсорбции вода - адсорбент и теплотой конденсации молекул воды, а величины ΔH_{hydr} и ΔE_{hydr} являются разностными (избыточными) энтальпией и энергией гидратации соответственно [25]. К сожалению, используемый нами подход не позволяет оценить изменение энтропии системы ΔS_i при взаимодействии молекул воды с полимерной молекулой, однако, согласно [34], ее величина близка к нулю.

Рассчитанные таким образом теплоты адсорбции и общая энтальпия гидратации образцов приведены в таблице 2. Здесь же показано суммарное число молекул воды, сорбируемых по закону Лэнгмюра и Генри при 90% ОВ (n) и средняя энтальпия гидратации в пересчете на одну молекулу воды (ΔH_w).

Из таблицы видно, что суммарная энтальпия гидратации чистого коллагена выше, чем минерализованного за счет увеличения энергетического вклада слоя Генри, при этом теплоты сорбции воды в слое Лэнгмюра равны. Энтальпия гидратации гидроксиапатита в 2,5 раза ниже, чем коллагена.

Таблица. 2. Суммарное число молекул воды, сорбируемых по закону Лэнгмюра и Генри при 90% ОВ одним -Gly-X-Y- фрагментом чистого и минерализованного коллагена, n , и энергетические параметры гидратации: ΔH_w - средняя энтальпия гидратации в пересчете на одну молекулу воды; ΔQ_L и ΔQ_H - теплоты адсорбции воды по законам Лэнгмюра и Генри; ΔH_{hydr} - общая энтальпия гидратации. Формат представления ΔQ_L , ΔQ_H и ΔH_{hydr} : кДж/моль фрагмента -Gly-X-Y- (1) и Дж/г образца (2).

Вещество	n	ΔH_w	ΔQ_L		ΔQ_H		ΔH_{hydr}	
		кДж/моль H ₂ O	1	2	1	2	1	2
Чистый коллаген	$3,2 \pm 0,1$	$-3,9 \pm 0,3$	$9,5 \pm 0,2$	$37,5 \pm 0,8$	$2,7 \pm 0,1$	$10,7 \pm 0,4$	$-12,2 \pm 0,4$	$-48,2 \pm 1,6$
Минерализованный коллаген	$2,0 \pm 0,1$	$-5,3 \pm 0,3$	$9,6 \pm 0,2$	$37,9 \pm 0,8$	$1,0 \pm 0,1$	$3,95 \pm 0,4$	$-10,6 \pm 0,4$	$-41,8 \pm 1,6$
Гидроксиапатит				$17 \pm 0,8$		$3,7 \pm 0,4$		$-20,7 \pm 1,6$

Кроме того, получено, что энергия взаимодействия отдельных молекул воды с гидратноактивными центрами минерализованного коллагена в 1,4 раза превышает энергию взаимодействия воды с гидрофильными группами чистого коллагена. К этому могут приводить два различных механизма. Во-первых, уменьшение общего количества воды в гидратной оболочке тройной спирали может способствовать устранению стерических препятствий для свободного вращения молекул воды внутреннего слоя и формированию водородных связей с оптимальными геометрическими параметрами, что приведет к уве-

личению энергии связи. Во-вторых, нанокристаллы гидроксиапатита, располагаясь на поверхности тропоколлагеновых молекул и в зонах «гар», могут способствовать поляризации гидратноактивных центров коллагена, что также приведет к увеличению энергии взаимодействия с ними молекул воды. Для выяснения роли этих и других возможных механизмов необходимы дополнительные исследования.

Для изучения процесса образования водородных связей гидратноактивными центрами исследуемых веществ с водой и выявления механизмов взаимодействия между коллагеновой матрицей и кристаллами гидроксиапатита, были получены ИК спектры пленок исследуемых образцов в широком интервале значения ОВ (рис. 4). Учитывая, что информативные полосы поглощения гидроксиапатита и коллагена лежат в различных спектральных областях, метод ИК спектроскопии дает возможность одновременно следить за структурным состоянием обоих компонентов.

С использованием коэффициентов экстинкции фосфатных групп гидроксиапатита и С=О групп коллагена можно рассчитать отношение минерального и органического компонентов в полученных образцах минерализованного коллагена. По нашим оценкам, оно равно 15 : 85, что свидетельствует о том, что содержание апатита в образце ниже, чем в костной ткани. Тем не менее, большая часть гидроксиапатита в костной ткани располагается на поверхности фибрилл и между фибриллами, а отношение массы гидроксиапатита, непосредственно взаимодействующего с коллагеновой матрицей, к массе коллагена костной ткани, близко к тому, которое использовались нами [18]. Кроме того, согласно литературным данным, при благоприятных рН и ионном составе минерализующих растворов при проведении *in vitro* минерализации участками первичной нуклеации кристаллов гидроксиапатита являются коллагеновые фибриллы [21]. Таким образом, полученные образцы позволяют исследовать влияние на коллагеновую матрицу гидроксиапатита, непосредственно взаимодействующего с ней.

Из рис. 4 видно, что спектр коллагена, минерализованного гидроксиапатитом, в основном представляет собой суперпозицию спектров коллагена и гидроксиапатита, в котором положение и интенсивность основных полос, характерных для этих веществ [35, 36], сохраняется. В то же время, в нем имеются некоторые особенности, которые отражают взаимное влияние минеральной и органической фазы.

Влияние коллагеновой матрицы на формирующиеся кристаллы гидроксиапатита находит отражение в частотных сдвигах и изменении интенсивности полос трижды вырожденного антисимметричного валентного колебания Р-О связи фосфатных групп. Так, в минерализованном коллагене, по сравнению с чистым гидроксиапатитом наблюдается высокочастотный сдвиг полосы при 1039 см^{-1} до 1043 см^{-1} и уменьшение интенсивности «плеча» при 1097 см^{-1} (рис. 4В, 4Д).

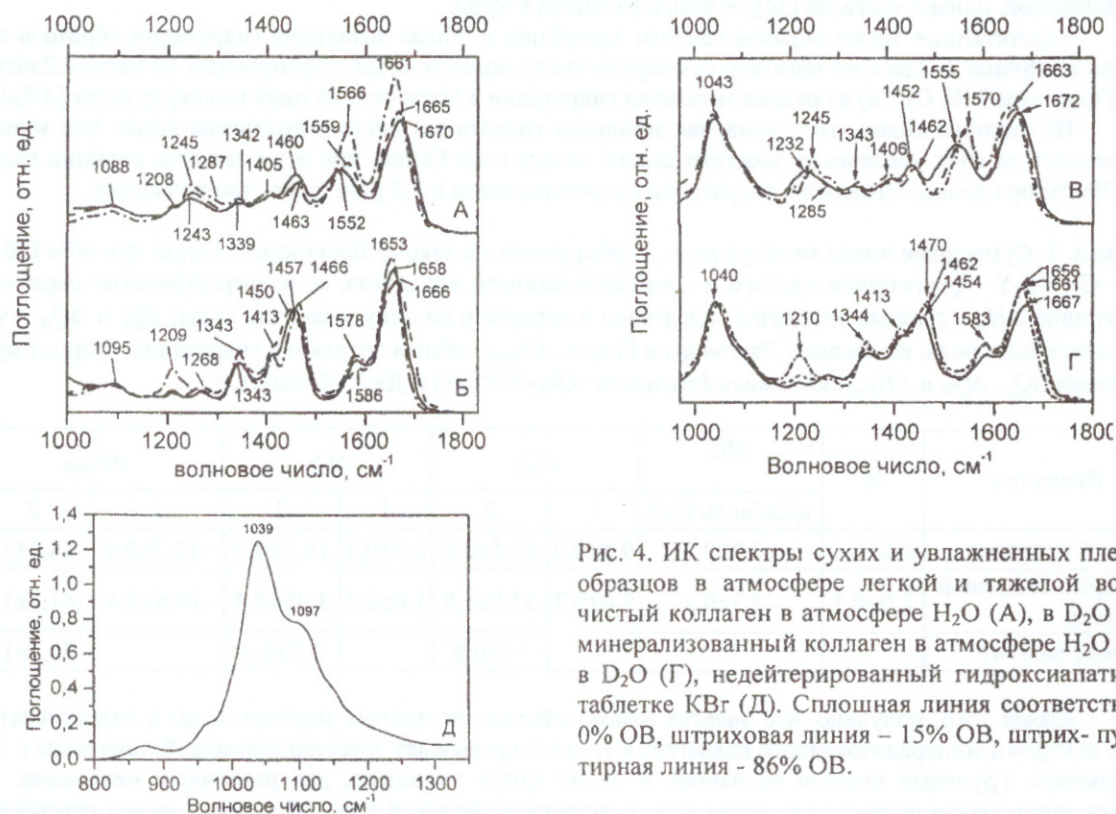


Рис. 4. ИК спектры сухих и увлажненных пленок образцов в атмосфере легкой и тяжелой воды: чистый коллаген в атмосфере H_2O (А), в D_2O (Б), минерализованный коллаген в атмосфере H_2O (В), в D_2O (Г), недегидрированный гидроксиапатит в таблетке КВг (Д). Сплошная линия соответствует 0% ОВ, штриховая линия – 15% ОВ, штрих-пунктирная линия – 86% ОВ.

Влияние минерализации на гидратацию и структурное состояние коллагена

Влияние гидроксиапатита на конформационное состояние коллагеновой матрицы и процесс ее гидратации рассмотрено ниже.

Для исследования процесса формирования водородных связей гидратноактивными группами чистого и минерализованного коллагена построены зависимости частот ν (см^{-1}) основных амидных полос от $OB(\%)$ и n , где n - количество молекул воды, сорбируемых одним $-\text{Gly-X-Y}-$ фрагментом, определяемое из изотерм гидратации. Кривые $\nu(OB)$ и $\nu(n)$ построены для полос поглощения Амид I, Амид II и Амид II' (рис. 5). Выбор данных полос объясняется тем, что по данным РСА модельных коллагеновых структур, C=O и N-H атомные группы, колебания которых обуславливают появление данных полос, участвуют в образовании межпептидных водородных связей и водородных связей с молекулами воды [31, 37].

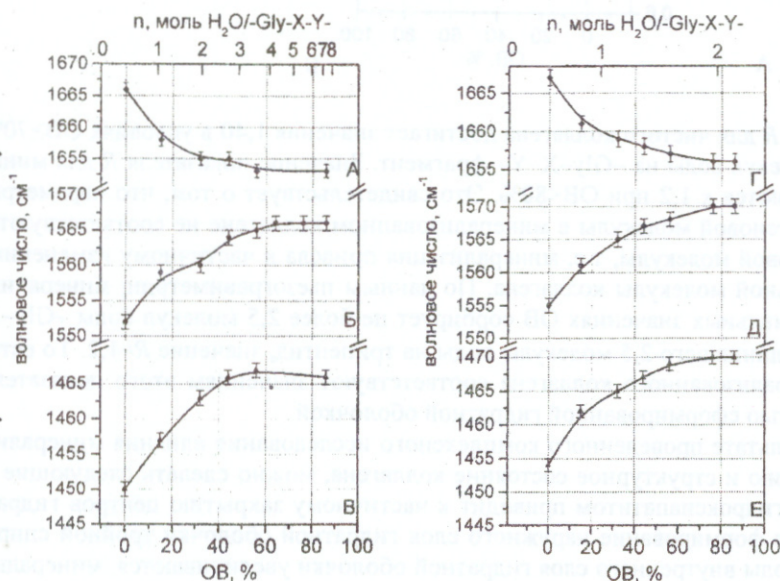


Рис. 5. Частоты полос Амид I, Амид II, Амид II' чистого коллагена (А, Б, В) и минерализованного коллагена (Г, Д, Е) в условиях различных значений OB в атмосфере H_2O и D_2O . Оси абсцисс представляют уровень гидратации образца: верхняя (n) показывает число молей воды, которая сорбируется одним молем трипептида $-\text{Gly-X-Y}-$, нижняя - $OB\%$. Зависимость $n(OB)$ найдена из изотерм гидратации.

Видно, что вызванные ростом OB частотные сдвиги полос поглощения Амид I и Амид II и Амид II' в ИК спектрах чистого и минерализованного коллагена по своим направлениям и величинам очень близки. Так, в обоих случаях наблюдается низкочастотный сдвиг полосы Амид I, и высокочастотный сдвиг полос Амид II и Амид II', которые связаны с формированием водородных связей с водой карбонильных групп глицина и аминокислот Y и N-H групп аминокислот X и Y, а также с усилением межпептидных водородных связей между N-H группами глицина и C=O группами аминокислот X [38, 39]. В то же время, можно отметить, что насыщение этих частотных сдвигов для чистого коллагена наступает при значении $OB=40-50\%$, в то время, как для минерализованного насыщение частотных сдвигов наблюдается при $OB=80\%$. По данным пьезограмметрии, при таких значениях OB в основном завершается формирование внутреннего слоя гидратной оболочки коллагена, который в случае чистого коллагена содержит 3-4 молекулы воды, а в случае минерализованного - только 2 молекулы воды. По-видимому, гидроксиапатит, имея в своем составе гидроксильные группы, частично заменяет молекулы воды гидратной оболочки коллагена.

Информация о конформационном состоянии тройной спирали тропоколлагеновых молекул может быть получена из анализа частоты и интенсивности полосы Амид III, которая чувствительна к изменению вторичной структуры белка. По данным различных авторов, частотный диапазон основного максимума полосы Амид III, характерный для коллагеновых структур, соответствует $1232 - 1247 \text{ см}^{-1}$ [36, 29]. Из полученных спектров видно, что в дегидратированном состоянии частота полосы Амид III минерализованного коллагена на 11 см^{-1} ниже, чем чистого. В то же время, в полностью гидратированном состоянии частоты полосы Амид III в обоих образцах совпадают. Это может свидетельствовать о том, что в дегидратированном состоянии конформации чистого и минерализованного коллагена различаются более значительно, чем в полностью гидратированном.

Известно, что одним из показателей нативности структуры трехспиральной коллагеновой молекулы является отношение R пиковых интенсивностей полос поглощения амид III и полосы поглощения при 1450 см^{-1} . Для высокоупорядоченной нативной трехспиральной структуры молекулы коллагена характерно значение $R \geq 1,38$ [40]. Зависимости $R(OB)$ для чистого и минерализованного коллагена приведены на рис. 6.

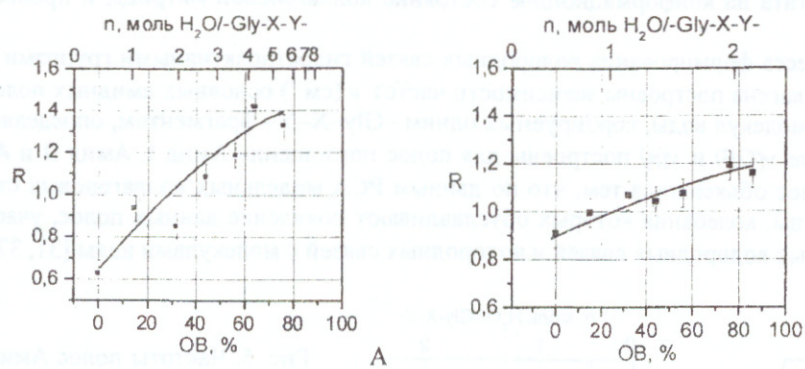


Рис. 6. Зависимость пиковых интенсивностей R полос поглощения Амид III и при 1450 см^{-1} от ОБ для чистого (А) для минерализованного (Б) коллагена.

Видно, что показатель R для чистого коллагена достигает значения 1,40 в условиях $\text{OB} \geq 70\%$, что соответствует сорбции 4-5 молекул воды на $-\text{Gly}-\text{X}-\text{Y}-$ фрагмент. Значение показателя R для минерализованного коллагена приближаются к 1,2 при $\text{OB} < 80\%$. Это свидетельствует о том, что параметры третичной структуры тропоколлагеновой молекулы в минерализованном коллагене не соответствуют параметрам чистой тропоколлагеновой молекулы, т.е. минерализация привела к частичному изменению третичной структуры трехспиральной молекулы коллагена. По данным пьезограмметрии, минерализованный коллаген даже при максимальных значениях ОБ сорбирует не более 2,5 молекул воды $-\text{Gly}-\text{X}-\text{Y}-$. Для чистого коллагена, присоединившего 2,5 молекулы воды на трипептид, значение $R \approx 1,2$. То есть, значения показателя R для минерализованного коллагена соответствуют значениям этого показателя для чистого коллагена с не полностью сформированной гидратной оболочкой.

Таким образом, в результате проведенного комплексного исследования влияния минерализации гидроксиапатитом на гидратацию и структурное состояние коллагена, можно сделать следующие выводы: минерализация коллагена гидроксиапатитом приводит к частичному закрытию центров гидратации коллагена, при этом нарушается формирование наружного слоя гидратной оболочки тройной спирали, а энергии связывания молекул воды внутреннего слоя гидратной оболочки увеличиваются, минерализация коллагена сопровождается частичным изменением конформации коллагена.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mythili J., Sastry T.P., Subramanian M. // *Biotechnol Appl Biochem.* – 2000. – V.32. – P.155–159.
2. Petruska J. A., Hodge A. J. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1964. – V.51. – P. 871-876.
3. Orgel J.P., Irving T.C., Miller A., Wess T.J. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2006. – V.103. – N.24. – P. 9001-9005.
4. Ramshaw JA, Shah NK, Brodsky B. // *J Struct Biol.* – 1998. – V.122. – N.1-2. – P.86-91.
5. Никитин В.Н., Перский Е.Э., Утевская Л.А. // *К: Наукова думка*, 1977. – 279 с.
6. LeGeros R. Z. In: Myers HM, editor. *Monogr Oral Sci.* – Basel: Karger. – 1991. – V.15. – P.1-201.
7. Weiner S., Wagner H.D. // *Annual Review of Materials Science.* – 1998. - V.28. - P.271-298
8. Landis W.J. // *Bone.* – 1995. – V.16. - N.5. - P.533-544.
9. Ziv V., Weiner S. // *Conn Tissue Res.* – 1994. – V.30. – P.165-175.
10. Goissis G., da Silva Maginador S.V., da Conceicao A.M.V. // *Artif Organs.* – 2003. – V.27. – N.5. – P.437-443.
11. Beniash E., Traub W., Veis A., Weiner S. // *J Struct Biol.* – 2000. – V.132. – N.3. P.212-225.
12. Chapman J.A., Tzaphlidou M., Meek K.M., Kadler K.E. // *Electron Microsc Rev.* – 1990. – V.3. – N.1. – P.143-182.
13. Mertz E.L., Leikin S. // *Biochemistry.* – 2004. – V.43. – N.47. – P.14901-14912.
14. San Antonio J.D., Lander A.D., Karnovsky M.J., Slayter H.S. // *J Cell Biol.* – 1994. – V.125. – N.5. – P. 1179-1188.
15. Traub W, Arad T, Weiner S. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1989. – V.86. – N.24. – P.9822-9826.
16. Sasaki N, Sudoh Y. // *Calcif Tissue Int.* – 1997. – V.60. – N.4. – P.361-367.
17. Zhang L.-J., Feng X.-S., Liu H.-G., Qian D.-J., Zhang L., Yub X.-L., Cuic F.-Z. // *Materials Letters.* – 2004. – V.58. – P.719-722.
18. Lees S., Davidson CL. // *J Biomech.* – 1977. – V.10. – P.473-486.
19. Termine J.D., Robey P.G. In: Favus M.J., editor. *Osteoporosis: Fundamentals of Clinical Practice.* – New York: Lippencott. – 1997. – P.25-32.
20. Glimcher M.J. // *Instr. Course Lect.* – 1987. – V.36. – P.46
21. Bradt J.-H., Mertig M., Teresiak A., Pompe W. // *Chem. Mater.* – 1999. – V.11. – P.2694-2701.

Влияние минерализации на гидратацию и структурное состояние коллагена

22. Mertz E.L., Leikin S. // *Biochemistry*. – 2004. – V.43. – N.47. – P.14901-14912.
23. Paschalis E.P., Betts F., DiCarlo E., Mendelsohn R., Boskey A. L. // *Calcif Tissue Int.* – 1997. – V.61. – N.6. – P.480-486.
24. Semenov M.A., Starikov E.B., Bolbukh T.V. // *Studia biophysica*. – 1988. – V.123. – P.217-224.
25. Большух Т.В., Семенов М.А., Малеев В.Я., Сечкин В.В. Препринт № 228. ИРЭ НАНУ, Харьков, 1983, 18с.
26. Wexler A., Hasegawa S. // *J. Res. Nat. Bur. Stand.* – 1954. – V.53. – N.1. – P.19-26.
27. Семенов М.А., Большух Т.В., Малеев В.Я. // *Биофизика*. – 1985. – Т.30. – С.571-577.
28. Lazarev Yu.A., Chishkovsky B.A., Chromova T.B. // *Biopolymers*. – 1985. – 24(8). – P. 1449-1478.
29. Лазарев Ю. А. Дис. док. физ.-мат. наук. – М: МГУ. – 1987. – 325с.
30. Sukhodub L.F., Moska C., Sukhodub L.B., Sulkio-Cleff B., Maleev V.Ya., Semenov M.A., Bereznyak E.G., Bolbukh T.V. // *J.Mol.Structure*. – V.704. – 2004. – P.53-58.
31. Berisio R., Vitagliano L., Mazzarella L., Zagari A. // *Protein Sci.* – 2002. – 11. – P. 262-270.
32. Bella J, Brodsky B, Berman HM. // *Structure*. – 1995. – V.3. –N.9. – P.893-906.
33. Okuyama K., Hongo C., Fukushima R., Wu G., Narita H., Noguchi K., Tanaka Y., Nishino N. // *Biopolymers*. – 2005. – V.80. – N.5. – P.714-715.
34. Falk M. Hartman K.A., Lord R.C. // *J. Amer. Chem. Soc.* – 1962. – V.4. – N.20. – P.3843-3846.
35. Koutsopoulos S. // *Biomed Mater Res.* – 2002. – P.600-612.
36. Susi H, Ard JS, Carroll RJ. // *Biopolymers*. – 1971. – V.10. – N.9. – P.1597-1604.
37. Чиргадзе Ю.Н. Инфракрасные спектры и структура полипептидов и белков. М.: Наука. – 1965. – 136 с.
38. Lazarev Y.A, Grishkovsky B.A, Khromova T.B, Lazareva A.V, Grechishko V.S. // *Biopolymers*. – 1992. – V.32. – N.2. – P.189-195.
39. Борискина Е.П., Большух Т.В., Семенов М.А., Малеев В.Я. // *Біополімери та клітина*. – 2006. – Т.22. – N.6. – С.458-467.
40. Gordon P.L., Huang C., Lord R.C., Yannas I. L. // *Macromolecules*. – 1974. – V.7. – N.6. – P.954-956.