

Л. Б. Суходуб, Ю. М. Самченко, Л. Ф. Суходуб

## Ізотерми гідратації чистих та мінералізованих колагенових фібрил: дослідження з використанням п'єзогравіметрії та інфрачервоної спектроскопії

(Представлено академіком НАН України В. П. Кухарем)

*Influence of the mineralization of collagen fibrils on their hydration in vitro is considered using piezogravimetric and infrared data. A model illustrating the mineralization process with the consideration of two specific water structures is proposed to explain the obtained hydration isotherms.*

Кісткова тканина тварин і людини є ієрархічною структурою, найнижчому рівню якої відповідають мінералізовані колагенові фібрили. Мінералізація — гетерогенна нуклеація кальційфосфатних (СаР) нанокристалів усередині колагенових фібрил — дуже складний процес, який, незважаючи на інтенсивні дослідження протягом останніх двох декад [1–4], залишається по багатьох аспектах маловивченою проблемою. Для глибокого розуміння механізму біологічної мінералізації необхідно розглянути вплив молекул води на міжмолекулярні взаємодії в системі колаген — гідроксилапатит (Сg — НА). Причиною аналогічного підходу можуть бути два фактори: перший — це критичний вплив гідратного оточення на структуру та стабільність триспірального колагену [5]; другий — сильна електростатична взаємодія молекул води з іонами кальцію та фосфатними іонами кристалічної решітки гідроксилапатиту [6].

Метою даного дослідження є більш детальний аналіз ізотерм гідратації та інфрачервоних спектрів як для чистих, так і мінералізованих колагенових фібрил у рамках більш деталізованої фізичної моделі з використанням літературних даних [7, 8].

На основі базової хімічної реакції між нітратом кальцію ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ) і гідрофосфатом амонію ( $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ ) НА синтезували при  $37^\circ\text{C}$  та в лужному інтервалі рН 11–12 [7]. Усі отримані тверді преципітати були ідентифіковані за допомогою методики рентгенівської дифракції (прилад “Siemens D5000”). Фазовий аналіз дифрактограм відповідав стехіометричному гідроксилапатиту з відношенням Са/Р = 1,67 без інших кальційфосфатних фаз. Для приготування системи Сg–НА використовували кристали НА, які пройшли термічну обробку при  $1000^\circ\text{C}$  упродовж 1 год. Колаген (тип I) для хімічних реакцій брали з двох різних джерел: 1) колаген, виділений з хвостів шурів (біологічний факультет Харківського національного університету) та 2) колаген ліофілізований та кислоторозчинний (Sigma) з телячої шкіри. Концентрація колагену в розчинах становила 2,5 мг/мл. Мінералізацію колагену проводили двома методами: 1 — додаванням 1 мг НА (у вигляді дрібнодисперсного порошку) до розчину колагену [7–9] та 2 — використовуючи так звану синхронну мінералізацію [10].

Методику п'єзогравіметрії, що базується на залежності резонансної частоти кварцового кристалу від маси матеріалу на його поверхні, використовували для отримання ізотерм гідратації. Зразки у вигляді плівок отримували при повільному випарюванні води при  $4^\circ\text{C}$  як стосовно крапель чистого колагену, так і у випадку колагенового розчину з НА, які

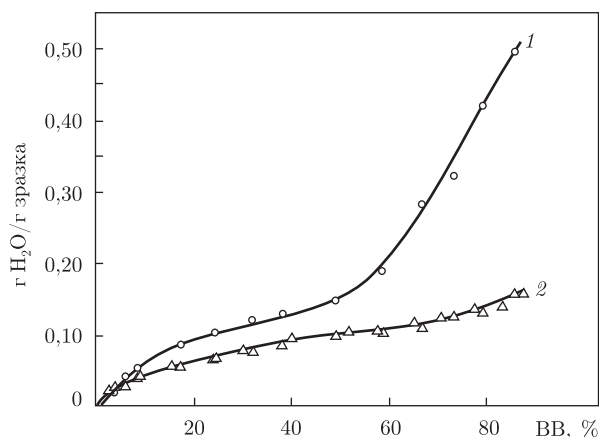


Рис. 1. Ізотерми гідратації для чистих (1) та мінералізованих (2) гідроксилапатитом колагенових фібрил

наносились прямо на кварцові пластини. Плівки зволожнювали дозованою кількістю води у спеціальній камері. Ізотерми гідратації, тобто залежності кількості сорбованої води ( $n$ ) при відносній вологості (ВВ) у грамах на грам сорбенту (або моль води на моль сорбенту Gly–X–Y), знаходили за формулою [8]:

$$n = \frac{M_{\text{Gly-X-Y}}}{M_{\text{H}_2\text{O}}} \cdot \frac{\delta f}{\Delta f_m}, \quad \delta f = \Delta f_i - \Delta f_m,$$

де  $\Delta f_i$  — різниця між базовою частотою кварцового резонатора та отриманою при  $i$ -вологості;  $\Delta f_m$  — різниця в частоті, яка зумовлена сухим зразком;  $M_{\text{Gly-X-Y}}$  й  $M_{\text{H}_2\text{O}}$  — молекулярні маси трипептиду Gly–X–Y й молекули води. Точність вимірювань дорівнювала  $\pm 0,01$  грам води на грам зразка або  $\pm 0,1$  моль води на 1 моль Gly–X–Y.

**Інфрачервона спектроскопія.** Плівки зразків чистого (Cq) та мінералізованого (Cq + НА) колагену отримували прямо з крапель відповідних розчинів на кюветних вікнах із CaF<sub>2</sub>. Також таблетки з НА (0,8–1,2 мг + 500 мг KBr) використовували як зразки для реєстрації відповідних спектрів. У експериментах по гідратації плівки висушували у вакуумі ( $10^{-2}$  тор), а потім зволожували до фіксованої вологості в інтервалі RH від 0 до 86% завдяки їх інкубації в атмосфері пара насичених сольових розчинів в умовах термодинамічної рівноваги з використанням H<sub>2</sub>O та D<sub>2</sub>O. ІЧ-спектри в інтервалі 900–3700 см<sup>-1</sup> вивчали на двопробеновому приладі (Karl Zeiss, Jena, Germany) з використанням призми з NaCl при кімнатній температурі.

Рис. 1 ілюструє ізотерми гідратації, які отримано при відносній вологості від 0 до 86%, для чистого та мінералізованого колагену (метод 1). Такі самі ізотерми (не показано) отримано для мінералізованих зразків (методом 2). Було відзначено (з використанням залежності інтенсивності піка з 3450 см<sup>-1</sup> від ВВ), що навіть після вакуумної сушки (ВВ = 0%) в зразках залишається не менше 1 молекули води на амінокислотний фрагмент Gly–X–Y. Ці молекули води з сильним зв'язуванням стабілізують триспиральну структуру колагену [5]. Подібну структуру з низьким рівнем гідратації можна переводити у стан максимальної гідратації при високих рівнях ВВ (див. рис. 1). Після мінералізації рівень гідратації колагенових фібрил значно зменшується (при ВВ 86% приблизно в 5 разів) (див. рис. 1) і цей феномен відбиває критичний вплив депозиції гідроксилапатитних нанокристалів усередині тривимірної (3D) колагенової структури, яка має місце при ранній мінералізації [10],

на гідратний стан фібрилярної структури. Згідно з п'єзогравіметричними даними, сорбційна властивість НА набагато менша у порівнянні з колагеном. Кількісні параметри гідратації отримували за допомогою моделі Дарсі й Ватта, яка містить гетерогенність абсорбату [8]:

$$n(x) = \frac{V_m a_L x}{1 + a_L x} + a_H x + \frac{bx}{1 - bx},$$

де  $x$  — ВВ, перший член формули відповідає за адсорбцію молекул води місцями сильної взаємодії у так званому ленгмюровському ( $L$ ) шарі: другий — за адсорбцію молекул води місцями слабшої взаємодії (відповідно до закону Генрі ( $H$ )), а третій — за мультишарову ( $ML$ ) адсорбцію;  $V_m$  — моношарова спроможність;  $a_L$ ,  $a_H$  і  $b$  — активності води.

Використовуючи даний підхід, показано, що кількість адсорбованих молекул води при ВВ 86% для чистого колагену становила 8,6 на фрагмент Gly–X–Y, а для мінералізованої системи — 2,3 молекули води (табл. 1). Більш того, детальним аналізом було доведено, що зменшення адсорбційної спроможності системи Cg + НА обумовлено як за рахунок ML-адсорбції, так і H-адсорбції. При цьому кількість молекул води в L-моношарі практично була незмінною (див. табл. 1).

Подальші дослідження пов'язані з вивченням ІЧ-спектрів тих самих зразків. Використовуючи значення відповідних коефіцієнтів екстинкції для мінерального (фосфатна група) та органічного (СО-група) компонентів, було знайдено співвідношення між цими компонентами, яке становило 15 : 85 [8], що менше, ніж те, яке має місце в натуральній кістковій тканині, де значна частина мінералу локалізована також у каналах і на поверхні колагенових фібрил. Крім того, згідно з літературними даними [10], за певних умов проведення реакції мінералізації (рН, іонний склад) *in vitro*, місцями ранньої мінералізації якраз і є колагенові фібрили, які знаходяться у відповідній конформації. З цього випливає, що досліджувані зразки дають змогу вивчати вплив початкової депозиції НА на гідратацію та конформаційні зміни колагенової матриці, яка прямо взаємодіє з молекулами НА. Типовий ІЧ-спектр для цієї мінералізованої системи є суперпозицією двох спектрів — положення та інтенсивності головних смуг НА та Cg в основному є незмінними. Було знайдено також незначні, але важливі особливості отриманого спектра, які відображають взаємний вплив обох компонентів. Так, наприклад, має місце незначний високочастотний зсув (1039 → 1043) і зменшення інтенсивності “плеча” (1097) у спектрі НА у випадку його входження в колагенову фібрилу [8]. Ідентифікацію головних амідних смуг отриманих ІЧ-спектрів [7, 8] разом з літературними даними наведено в табл. 2.

Ці смуги відповідають СО- й NH-атомним групам колагенової системи, які беруть участь у формуванні водневих зв'язків з молекулами води. Отже, головною особливістю для обох груп є наявність низькочастотного зсуву “Амід І” та високочастотного зсуву “Амід ІІ”. Такі зміни пов'язані з формуванням Н-зв'язків між молекулами води та карбонільними групами гліцину і NH-групами X (пролін) та Y (гідроксипролін) амінокислот [8]. Із залежностей

Таблиця 1. Кількісні параметри гідратації для чистого та мінералізованого колагену

Параметр	Cg	Cg + НА
Внутрішній шар, $n$ ( $L + H$ )	3,2 (0,5+2,7)	2,0 (0,7+1,3)
Зовнішній шар, $n$ ( $ML$ )	5,3	0,3
Сумарна кількість молекул води на фрагмент Gly–X–Y	8,6	2,3
Ентальпія гідратації, $\Delta H_h$ (kJ/H <sub>2</sub> O моль)	–3,9	–5,3

$\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) — ВВ (%), отриманих для головних амідних смуг, було знайдено, що насичення частотних зсувів має місце при різних значеннях ВВ: для Сg при ВВ 50%, в той час як для Сg + НА при ВВ 80% [8]. П'єзогравіметричні дані показують, що при цих величинах ВВ формування внутрішніх гідратних шарів усередині колагенових фібрил повністю завершується: для чистого колагену з 3–4 молекулами води на фрагмент  $\text{Gly-X-Y}$  і для мінералізованого колагену з 2 молекулами води на такий самий фрагмент колагену. Цілком припустимо, що деякі групи ОН від НА теж беруть участь у цьому процесі. Смуги поглинання “Амід ІІІ”, як відомо, є дуже чутливими до конформаційних перебудов протеїнів і, зокрема, колагену. Мінералізований колаген у дегідратованому стані має смугу поглинання “Амід ІІІ” з частотою, яка нижча порівняно з частотою чистого колагену:  $1232 \text{ cm}^{-1}$  проти  $1243 \text{ cm}^{-1}$ . У той самий час у повністю гідратованих станах смуги поглинання “Амід ІІІ” в обох системах практично однакові. Це означає, що конформації колагену змінюються при переході від дегідратованого стану до гідратованого. Таким чином, зміни в ІЧ-спектрах є дуже чутливими до структурних перебудов усередині колагенових молекул, які, як у даному випадку, зумовлені процесом мінералізації в зонах розривів та перекривання (gar і overlap зонах; рис. 2). Одним з доказів цього твердження є так званий червоний зсув смуги поглинання “Амід І” (СО-стреч коливання) [11] (див. табл. 2): ці смуги в колагені були ослабленими завдяки формуванню взаємодії між іонами кальцію та карбонільними групами на поверхні колагенових фібрил. У нашій роботі смуги “Амід І” після мінералізації мають практично незмінні частоти (див. табл. 2). Помітних змін у ІЧ-спектрі поглинання для НА не було знайдено. Отже, взаємодія НА з колагеном має нековалентний характер. Отримані результати досліджень були використані як базові дані для побудови фізичної моделі для пояснення феномена впливу мінералізації на гідратний стан колагенових фібрил. Загально відомо, що гідратація колагену є критичним фактором для утворення триспиральної конформації. Специфічна функція молекул води в кластеризації (утворення фібрил) окремих колагенових молекул є невідомою. Колагенові (тип І) фібрили мають періодичність уздовж довгої осі в 67 нм (див. рис. 2).

Стартова нуклеація мінеральних частинок починається в gar-зонах і продовжується в зонах перекривання [13, 14]. Електронно-мікроскопічні мікрографи зразків, отриманих з використанням синхронної мінералізації (метод 2) колагенових фібрил, демонструють періодичність в 67 нм з мінеральними кристалами у вигляді кластерів розміром до 100 нм [10]. Ми припускаємо, що повністю гідратований стан колагенових фібрил з 8–9 молекулами води на структурний фрагмент є важливим фактором для біомінералізації. Дві гідратні підсистеми імовірно є задіяними в ізотермах для чистого колагену. Перша з них (“ $W_L$ ” + “ $W_{H,ML}$ ” усередині фібрил) найімовірніше локалізована в зонах з відносно високою гідрофобністю та доступним простором [13], де специфічні водні кластери оточують N-, C-термінальні інтерфейсні зони (telopeptides) з властивостями, близькими до об'ємної води. Ці місця всере-

Таблиця 2. Розташування піків амідних смуг поглинання у ІЧ-спектрах для чистого та мінералізованого колагену систем при різних ВВ

Амідні смуги поглинання та відношення інтенсивностей	Сg			Сg + НА		
	ВВ = 0%	за [11]	ВВ = 86%	ВВ = 0%	за [11]	ВВ = 86%
I	1663	1658	1658	1665	1645	1660
II	1559	1546	1561	1561	—	1567
III	1243	1242	1243	1232	—	1245
I / II		> 1			< 1	

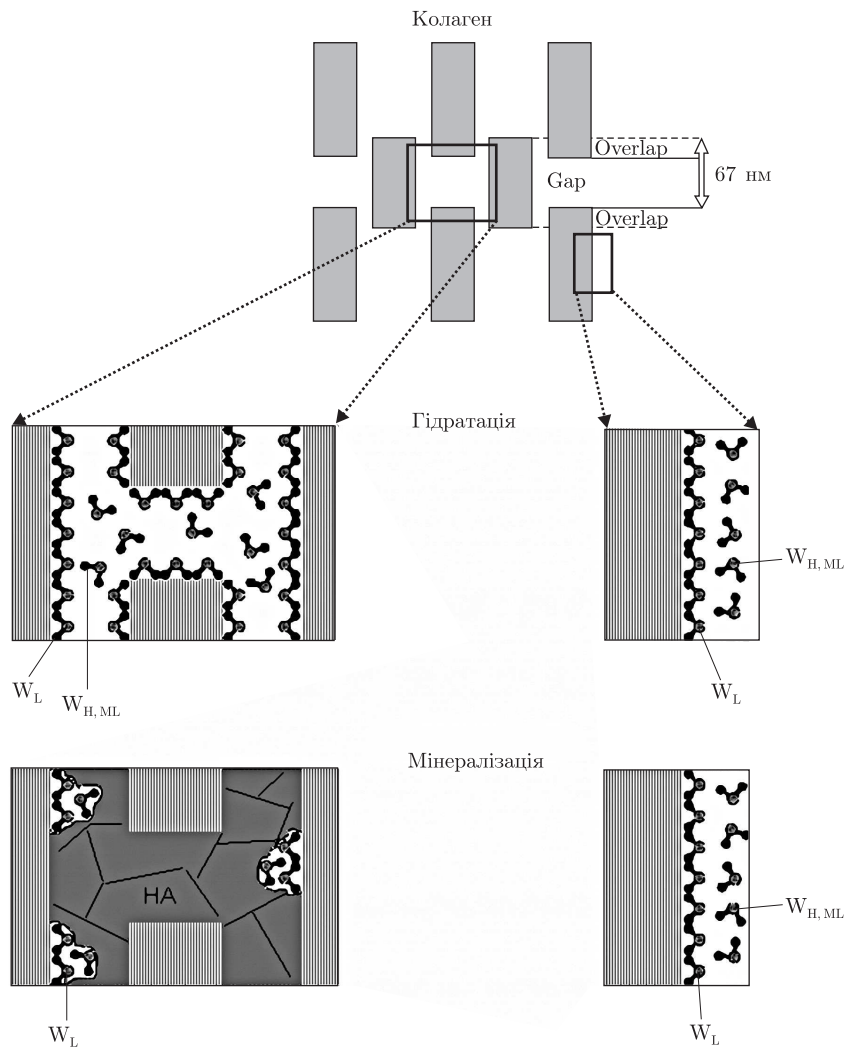


Рис. 2. Двовимірний модель з різними видами молекул води та їх змінами, які супроводжують процес мінералізації колагенових фібрил гідроксилапатитом

дині фібрил мають упорядковану структуру завдяки поперечним зв'язкам. Друга гідратна підсистема ( $W_L + W_{H,ML}$  на поверхні фібрил), так звана cylinder water shell [5], характеризується більш сильною взаємодією порівняно з водою всередині фібрил завдяки водним місткам за участю ОН-груп гідроксо-*L*-проліну (Нур) і СО-груп остова. Подібний тип взаємодії формує стабільну водну сітку в доменах, збагачених Нур [5]. Ми припускаємо, що гідратні сили певною мірою ініціюють нуклеацію і подальше зростання кристалів апатиту, тобто,  $W_L + W_{H,ML}$  усередині фібрил є більш придатною для ранньої стадії мінералізації завдяки меншій стабільності водних кластерів у зонах розривів та перекривання колагенових молекул. Підтвердженням цьому є раманівські ОН-спектри (характерні піки  $3250$  й  $3450 \text{ см}^{-1}$ ) гідратованого колагену, які близькі до об'ємної води [12]. Розрахунки показують, що перші гідратні шари в інтерфейсі "НА- $\text{H}_2\text{O}$ " мають певний структурний порядок, обумовлений утворенням водневих містків. Подальша мінералізація супроводжується перегрупуванням молекул води біля макромолекулярних поверхонь. У рамках запропонованої

моделі число молекул води (“ $W_L$ ” + “ $W_{H,ML}$ ”) на поверхні фібрил залишається практично незмінним (див. рис. 2; табл. 1). Частина молекул  $W_L$  усередині фібрил також зберігається, вірогідно з іншою структурою. Але більшість молекул води із цих зон витісняється нанокристалами апатиту, що і відображається на відповідних ізотермах гідратації (див. рис. 1). Мінералізація, певно, впливає на упаковку колагенових молекул усередині фібрил, а саме, скороченням міжмолекулярних контактів, і це також ініціює додаткове звільнення молекул води із зон депозиції апатитного мінералу.

Таким чином, експериментальний підхід, оснований на п'єзогравіметрії для отримання ізотерм гідратації для Cg і Cg + HA плівкових систем у комбінації з ІЧ спектроскопією, є дуже ефективним при дослідженні *in vitro* достатньо тонких ефектів гідратації, які виникають у процесі біомінералізації кісткових тканин. Для інтерпретації отриманих експериментальних даних, пов'язаних з драматичним впливом гідроксилапатиту на гідратацію колагенових фібрил, була запропонована фізична модель з двома типами гідратної води. Основний внесок у зміну гідратації після мінералізації найімовірніше пов'язаний з водою, яка локалізована в зонах розривів та перекривання всередині колагенових фібрил.

1. *Weiner S., Traub W.* Organization of hydroxyapatite crystals within collagen fibrils // *FEBS Lett.* – 1986. – **206**. – P. 262–266.
2. *Weiner S., Traub W.* Crystal size and organization in bone // *Connect. Tissue Res.* – 1989. – **21**. – P. 259–265.
3. *McEwen B. F., Song M. J., Landis W. J.* Quantitative determination of the mineral distribution in different collagen zones of calcifying tendon using high voltage electron microscopic tomography // *J. Comput. – Assist. Microsc.* – 1992. – **3**. – P. 201–210.
4. *Landis W. J., Silver F. H.* The structure and function of normally mineralizing avian tendons // *Comp. Biochem. and Physiol. A.* – 2002. – **133**. – P. 1135–1157.
5. *Bella J., Eaton M., Brodsky B.* Crystal and molecular structure of collagen-like peptide at 1.9 Å resolution // *Science.* – 1994. – **266**. – P. 75–81.
6. *Zhan D., Hochrein O.* Computational study of interfaces between hydroxyapatite and water // *Phys. Chem. and Chem. Phys.* – 2003. – **5**. – P. 4004–4007.
7. *Sukhodub L. F., Moseke C., Sukhodub L. B. et al.* Collagen-hydroxyapatite-water interactions investigated by XRD, piezogravimetry, infrared and Raman spectroscopy // *J. Mol. Struct.* – 2004. – **704**. – P. 53–58.
8. *Boriskina E. P., Semenov M. A., Bolbukh T. V. et al.* Influence of mineralization onto hydration and structural condition of collagen // *Біофіз. вісн.* – 2007. – **18**, No 1. – P. 5–13.
9. *Tampieri A., Celotti G., Landi E. et al.* Biologically inspired synthesis of bone-like composite: self-assemble collagen fibers/hydroxyapatite nanocrystals // *J. Biomed. Mater. Res.* – 2003. – 67A. – P. 618–625.
10. *Bradt J.-H., Mertig M., Teresiak A., Pompe W.* Biomimetic mineralization of collagen by combined fibril assembly and calcium phosphate formation // *Chem. Mater.* – 1999. – **11**. – P. 2694–2701.
11. *Zhai Y., Cui F. Z., Wang Y.* Formation of nano-hydroxyapatite on recombinant human-like collagen fibrils // *Curr. Appl. Phys.* – 2005. – **5**. – P. 429–432.
12. *Leikin S., Parsedian V. A., Yang W.-H., Walrafen G. E.* Raman spectral evidence for hydration forces between collagen triple helices // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1997. – **94**. – P. 11312–11317.
13. *Hodge A. J., Petruska J. A.* Recent studies with the electron microscope on ordered aggregates of the tropocollagen macromolecules // *Aspects of protein structure.* Ramachandran G.N. – New York: Acad. press, 1963. – P. 289–300.
14. *Landis W. J., Hodgens K. J., Arena J. et al.* Structural relations between collagen and mineral in bone as determined by high voltage electron microscopic tomography // *Microsc. Res. Techn.* – 1996. – **33**. – P. 192–202.

Інститут біологічної хімії  
і.м. Ф.Д. Овчаренка НАН України, Київ  
Інститут мікробіології та імунології  
і.м. І.І. Мечнікова АМН України, Харків  
Інститут прикладної фізики НАН України, Суми

Надійшло до редакції 07.11.2007