

Л.А. БУЛАВІН, Ю.Ф. ЗАБАШТА, Л.Ю. ВЕРГУН, О.С. СВЕЧНІКОВА,
А.С. ЄФІМЕНКО

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, фізичний факультет
(Просп. Академіка Глушкова, 2, Київ 03022)

ПРИМЕЖОВІ ШАРИ ТА ЗСУВНА ПРУЖНІСТЬ СИСТЕМИ “КОЛАГЕН–ВОДА”

УДК 538.9

Висунуто гіпотезу про існування в гідрогелях колагену примежових водних шарів, що оточують колагенові спіралі. Пропонується модель примежового водного шару. Встановлено, що ця модель не суперечить отриманим експериментальним даним по зсувній пружності гідрогелів колагену. Стверджується, що такі примежові шари можуть існувати в пухкій з'єднувальній тканині, забезпечуючи її опорну функцію.

Ключові слова: колаген, модуль зсуву, полімерна сітка, конфігурація ланцюга.

1. Вступ

Дослідження систем “колаген–вода” має довгу, майже столітню історію (див., наприклад, [1–6]). Такий сталий інтерес до цих систем пояснюється тим, що і колаген, і вода входять в склад людського організму. Взаємодіючи між собою, вони приймають участь у складних процесах, що відбуваються в організмі. Важливість дослідження систем “колаген–вода” полягає в тому, що вони дозволяють вивчати характер згаданої взаємодії *in vitro*.

Досліджувались ці системи різноманітними методами: віскозиметричним [1, 6], рентгенографічним [2], калориметричним [3] та ін.

У даній роботі вивчається зсувна пружність вказаних систем. Авторам не вдалося виявити в літературі робіт, де б вимірювався зсувний модуль цих систем. Для цієї мети авторами розроблено метод [7–9], який дозволяє провадити такі виміри для згаданих систем.

Як відомо (див., наприклад, [10] та ін.), молекула колагену у витягнутій формі має довжину $L = 3000 \text{ \AA}$ і діаметр $d = 15 \text{ \AA}$. Вона побудована із

трьох поліпептидних ланцюгів, що сплетені в єдину спіраль. Молекулярна маса $M = 350000$.

Відомо також (див., наприклад, [11] та ін.), що колаген є головною компонентою з'єднувальної тканини. Розрізняють хрящову та пухку з'єднувальні тканини. Щодо хрящової тканини відомо, що в ній міститься 70–80% води. Від 50 до 70% сухої речовини становить колаген. Його молекули утворюють фібрилярну структуру – вони об'єднуються в фібрили з діаметром 20–100 нм; агрегація фібрил призводить до утворення волокон з діаметром 1–10 мкм. Волокна складаються в пучки з діаметром до 150 мкм.

Пухка з'єднувальна тканина, як і будь-яка з'єднувальна тканина, складається з клітин та міжклітинної речовини. Остання являє собою желеподібну субстанцію, в склад якої входять колаген, еластин та аморфний матрикс, що містить воду. Кількість колагену суттєво менша, ніж у хрящовій тканині – утворення фібрил не спостерігається. Натомість молекули колагену утворюють сітку.

У роботах [12, 13] проводилися розрахунки структури примежового водного шару на межі з колагеном у хрящовій тканині. Як уже згадувалось, в цій тканині колагенові ланцюги утворюють фібри-

© Л.А. БУЛАВІН, Ю.Ф. ЗАБАШТА, Л.Ю. ВЕРГУН,
О.С. СВЕЧНІКОВА, А.С. ЄФІМЕНКО, 2019

лярну структуру. У зв'язку із значною жорсткістю такої структури для неї прийнята модель абсолютно твердого середовища. Відповідно вважалось, що вода контактує з абсолютно твердою стінкою.

Було встановлено, що молекули води розташовуються в шарах, паралельних стінці так, щоб вектор \mathbf{n} – одиничний вектор, що є нормаллю до площини, в якій розташовані атоми молекули води – був направлений перпендикулярно стінці (рис. 1).

Відстань між шарами дорівнювала 2 Å. В пухкій з'єднувальній тканині, як було згадано, фібрилярна структура відсутня. Що собою являють примежові шари в цьому випадку? Відповідь на це запитання шукатимемо в даній статті.

Для експериментального дослідження наміченої проблеми необхідно мати в своєму розпорядженні об'єкт, який міг би служити моделлю міжклітинної речовини. Як уже вказувалось, ця речовина являє собою гель. Тому, як її модель, вибрано гідрогель колагену. Звичайно, це – спрощена модель. Але в ній збережена головна, визначальна риса міжклітинної речовини – наявність колагенової сітки.

2. Експеримент

Досліджувались гідрогелі колагену з концентраціями $c = 50, 70, 100$ і 200 г/л. Отримувались гідрогелі із розчинів желатини. Для контролю за процесом утворення гідрогелю проводилося вимірювання показника заломлення p розчину. На рис. 2 наведена типова залежність показника заломлення p від часу t .

Як видно з цього рисунка, утворення гелю практично закінчується через 10 хвилин з моменту приготування розчину.

Вимірювались (динамічний модуль) дійсна G' та уявна (модуль втрат) G'' частина комплексного модуля зсуву гідрогеля. Методика експерименту описана в [7–9]. Згідно з цією методикою зразками слугували циліндричні поліетиленові кювети, що заповнювались розчином желатини. Через 10 хвилин після заповнення, що гарантувало згідно з рис. 2 утворення гідрогелю в кюветі, проводились виміри. На рис. 3 наведена залежність динамічного модуля G' від концентрації c' , отримана при температурі $T = 293$ К.

Отримувались також залежності від температури динамічного модуля та модуля втрат замороженого гелю желатини з концентрацією 50 г/л

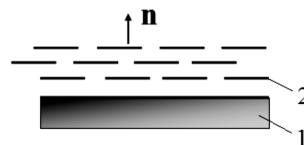


Рис. 1. Схема розташування молекул води в примежовому шарі хрящової тканини: 1 – фібрилярна структура (стінка), 2 – молекули води

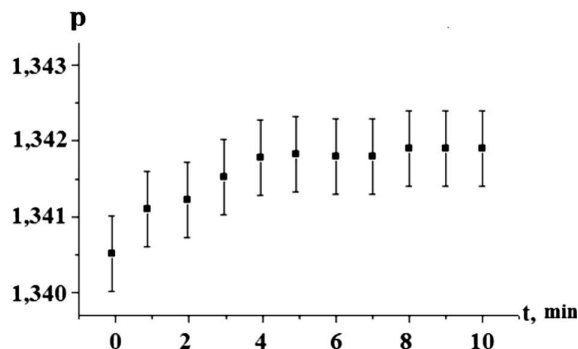


Рис. 2. Залежність показника заломлення розчину від часу ($c = 70$ г/л)

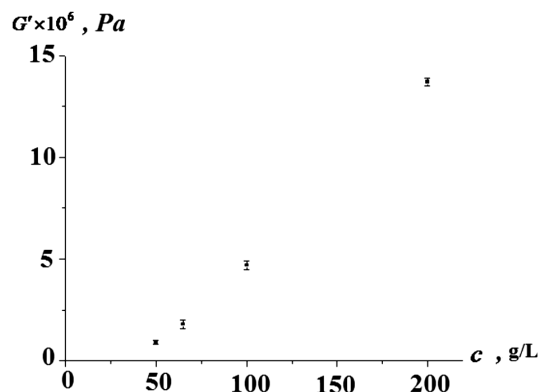


Рис. 3. Залежність динамічного модуля G' гідрогелю від концентрації колагену c ($T = 293$ К)

(рис. 4), що приблизно відповідає концентрації колагену в міжклітинній речовині пухкої з'єднувальної тканини.

Для порівняння наведено аналогічні залежності для льоду (рис. 5).

3. Обговорення результатів експерименту

Як відомо (див., наприклад, [14]) та ін.), полімерна сітка формується за рахунок утворення зв'язків між ланцюгами – вузлів. Розташування вузлів у просторі носить випадковий характер, а самі лан-

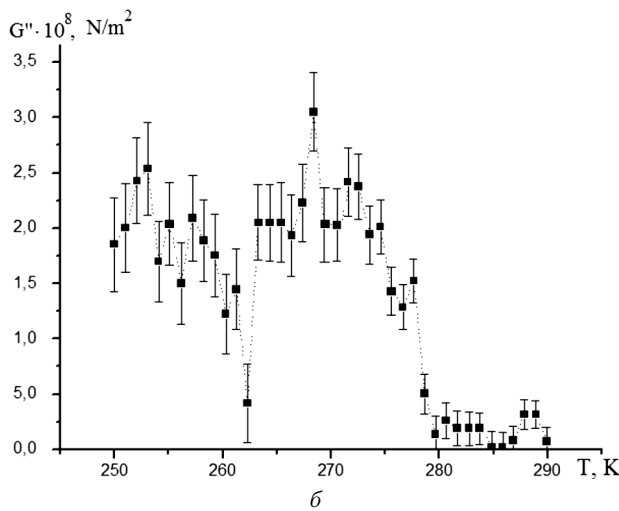
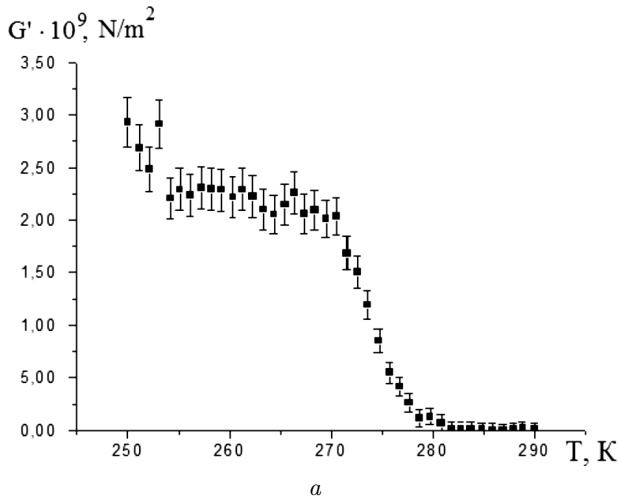


Рис. 4. Температурна залежність динамічного модуля G' (а) та модуля втрат G'' (б) замороженого гелю колагену ($c' = 50$ г/л)

цюги можуть з певною імовірністю приймати різні конфігурації (рис. 6, а).

Спрощуючи ситуацію, введемо в розгляд модель ідеальної сітки, в якій конфігурації ланцюгів повністю витягнуті, утворюючи ґратку. Вузлами ґратки є вузли сітки. Комірка ґратки має форму куба. Аргументом на користь цієї моделі є той факт, що колаген відноситься до класу жорстколанцюгових полімерів, які, як відомо (див., наприклад, [14] та ін.), схильні утворювати витягнуті конфігурації.

Визначимо залежність довжини ℓ ребра куба-елементарної комірки від концентрації c .

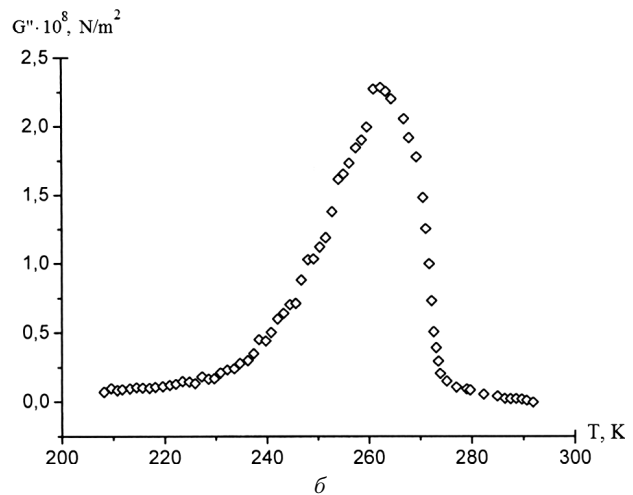
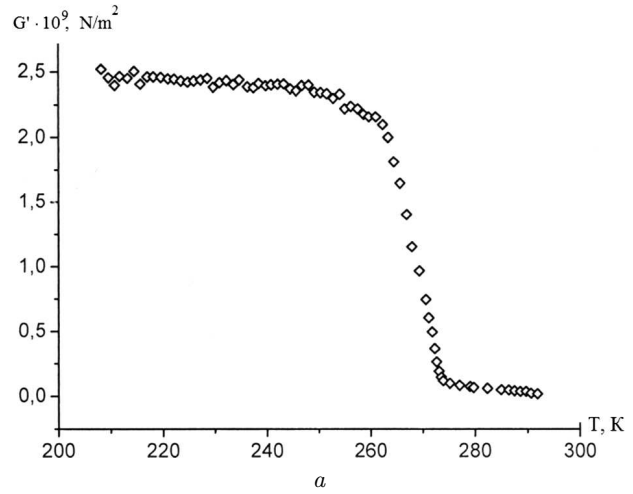


Рис. 5. Температурна залежність динамічного модуля G' (а) та модуля втрат G'' (б) льоду [8]

Площа поперечного перерізу ребра $S = \pi d^2/4$. Кожне ребро має об'єм $S \times \ell$. Вона входить в склад чотирьох сусідніх комірок, тому тільки $\frac{1}{4}$ згаданого об'єму відноситься до однієї комірки. Куб оточує 12 ребер, отже, об'єм V_p полімеру в комірці становить

$$V_p = 3S\ell. \quad (1)$$

Враховуючи те, що об'єм комірки дорівнює $V_c = \ell^3$, маємо для об'ємної частки φ полімеру вираз

$$\varphi_p = \frac{V_p}{V_c} = \frac{3S}{\ell^2}. \quad (2)$$

За визначенням,

$$\varphi_p = \frac{c}{\rho_p}, \quad (3)$$

де ρ_p – густина полімеру, яку обчислюватимемо за формулою

$$\rho_p = \frac{M}{SL}. \quad (4)$$

Скориставшись формулами (2)–(4), запишемо

$$\ell = \left(\frac{3M}{cL}\right)^{1/2}. \quad (5)$$

Згідно з формулою (5) при концентрації $c = 50$ г/л довжина ребра дорівнює 100 Å.

Слідуючи наближенню, прийнятому в [12, 13], де колагенова структура розглядається як абсолютно тверде середовище, вважатимемо спіраль колагену абсолютно твердим стержнем. Тоді по аналогії із випадком, розглянутим в [12, 13], в околі цього стержня молекули води мусять розташовуватись так, щоб їхні вектори \mathbf{n} були направлені по нормалі до поверхні стержня (рис. 7)

Таким чином, розрахунки, виконані в [12, 13], наводять на думку, що в гідрогелі кожна молекула колагену оточена примежовим шаром, структура якого відрізняється від структури води в об'ємі. Цей шар має форму порожнистого циліндра і може складатися з декількох елементарних шарів.

Оцінимо, скільки молекул води може розміститись по колу, наприклад, в шарі, найближчому до поверхні стержня – спіралі колагену.

Як уже згадувалось, радіус стержня дорівнює $\frac{d}{2} = 7,5$ Å. Згідно з розрахунками, виконаними в [12, 13], найближчий до межі розподілу шар знаходиться від неї на відстані 2 Å. То ж коло, про яке йдеться, має радіус 9,5 Å. Приймаючи, що відстань між молекулами води дорівнює 2,76 Å, як це має місце в ґратці льоду, отримуємо, що по колу в даному елементарному шарі розташовується 22 молекули води.

Як було вказано, пропонується модель примежового шару ґрунтується на припущенні, що колагенова спіраль є абсолютно твердим стержнем. Однак, в принципі, можлива ситуація, коли молекули води проникають в середину спіралі, відділяючи один від одного поліпептидні ланцюги, що входять в склад спіралі. В цьому випадку модель,

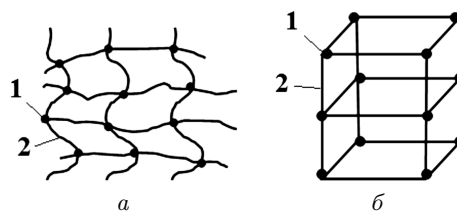


Рис. 6. Схематична будова полімерної сітки: а – модель випадкової сітки, б – модель ідеальної сітки (1 – вузли, 2 – ланцюги)

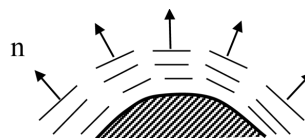


Рис. 7. Схема розташування молекул води поблизу поверхні спіралі колагену

зображена на рис. 7, втрачає сенс. Покажемо, що така ситуація в нашому випадку не має місця.

Як відомо (див., наприклад, [15, 16] та ін.), модуль G' та G'' характеризують деформаційні властивості фізичного нескінченно малого об'єму. За визначенням, розмір Δr цього об'єму мусить суттєво перевищувати мікроскопічні розміри, що описують розташування частинок в цьому об'ємі.

У нашому випадку ця умова набуває вигляду

$$\Delta r \gg d, \ell. \quad (6)$$

При вимірюванні модулів G' та G'' в фізичному нескінченно малому об'ємові в середньому створюється стан чистого зсуву. В той самий час на мікроскопічному рівні можуть виникати деформації різного типу: розтяг, вигин та ін. Для опису таких деформацій вводяться мікроскопічні пружні константи. До них належить, наприклад, E -модуль Юнга спіралі, що описує розтяг спіралей в напрямку її осі.

Як відомо (див., наприклад, [17] та ін.), значення E для полімерних спіралей лежить в інтервалі 10^{10} – 10^{11} Па.

Визначимо модуль Юнга E , скориставшись експериментальними даними, наведеними на рис. 2. Якщо ми отримаємо значення E , яке вкладається в згаданий інтервал, то це означатиме, що в гідрогелі спіраль зберігає свою цілісність.

Перш за все, необхідно в'яснити, як деформується спіраль, коли провадиться вимірювання модуля G' . Існування нерівності $d \ll \ell$ означає, що

спіраль при зовнішньому навантаженні переважно схильна до вигину. Перевіримо, чи дійсно в процесі вимірювання динамічного модуля відбувається вигин спіралей.

Як відомо (див., наприклад, [16] та ін.), здатність стержня (спіралі) до вигину характеризується вигинною жорсткістю Q , що визначається формулою

$$Q = EI, \quad (7)$$

де $I = \frac{\pi d^4}{64}$ – осьовий момент інерції поперечно-го перерізу стержня (спіралі). Відповідно, якщо в процесі вимірювання динамічного модуля відбувається вигин спіралей, то модуль G' мусить залежати від Q .

Модель ідеальної сітки, яку використовуємо, має два характерні розміри: d і ℓ . Динамічний модуль G' мусить залежати від обох цих величин. Розмір d вже задіяний в формулі (7). То ж приходимо до висновку, що модуль G' є функцією двох величин Q і ℓ , тобто

$$G' = f(Q, \ell). \quad (8)$$

Вигляд цієї функції знайдемо, використовуючи міркування розмірності. Для двох величин Q і ℓ тільки комбінація $Q\ell^4$ має розмірність Ра. Тому вираз (8) слід переписати у вигляді

$$G' \approx \frac{\pi}{64} E \frac{d^4}{\ell^4}. \quad (9)$$

Із формул (1)–(5) впливає співвідношення

$$c \sim d^2 / \ell^2, \quad (10)$$

що, в свою чергу, приводить до виразу

$$G' \sim c^2. \quad (11)$$

Відповідно до цього виразу, якщо при вимірюванні G' відбувається вигин спіралей, модуль G' мусить бути пропорційним квадрату концентрації. Цей висновок узгоджується з експериментальними даними рис. 3. Таким чином, в дійсності відбувається вигин спіралей і для розрахунку E може бути використана формула (9).

Підставляючи в цю формулу числові значення, отримуємо для модуля Юнга $E = 4 \cdot 10^{10}$ Ра. Отже, в гідрогелі спіраль зберігає свою цілісність, що

узгоджується із уявленням про спіраль, як абсолютно жорсткий стержень, на якому ґрунтується модель примежового шару.

Мета експерименту, наведеного на рис. 4, 5, як і попереднього експерименту, довести існування примежового шару, що оточує кожен спіраль колагенової сітки.

Як видно з рис. 5, б, на залежності $G''(T)$ для льоду в температурному інтервалі 240–273 К спостерігається пік. Назвемо його А-піком.

Згідно з рис. 4, б залежність $G''(T)$ для замороженого гідрогелю має два піки: в інтервалі 250–260 К та в інтервалі 260–273 К. Другий пік передє плавленню, то ж, вочевидь, він має ту ж природу, що й А-пік, спостережений для льоду. Тому за ним збережемо ту саму назву. Перший же пік назвемо В-піком.

Температурні залежності $G'(T)$ (рис. 4, а, 5, а) використовувались для визначення температури плавлення. Як і слід було чекати, температура плавлення льоду виявилась рівною 273 К. Для замороженого гелю ця температура дорівнювала 283 К.

Таким чином, згідно з рис. 4, 5 в поведінці замороженого гідрогелю та льоду спостерігаються такі відмінності:

- порівняно із льодом на залежності $G''(T)$ замороженого гідрогелю з'являється новий пік (В);
- інтенсивність А-піка для гідрогелю нижча, ніж інтенсивність цього піка для льоду;
- температура плавлення гідрогелю вища за температуру плавлення льоду.

Порівняно із льодом заморожений гідрогель містить нову компоненту – колаген. То ж логічним є припущення, що поява В-піка зумовлена релаксаційним процесом, який відбувається в межах колагенових спіралей. Але якщо б це мало місце, то і інтенсивність А-піка для замороженого гідрогелю, зважаючи на малу концентрацію колагену, мусила б залишитись практично такою ж як для льоду. Та й температура плавлення, як і для льоду, мусила б дорівнювати 273 К.

В дійсності, цього не спостерігається, то ж залишається стверджувати, що, крім льоду, існує ще інша структура, утворена молекулами води.

Ґрунтуючись на розрахунках [12, 13], можна говорити, що ця структура являє собою примежові шари навколо колагенових спіралей. Додатковим аргументом на користь цього висновку є той факт,

що температура плавлення замороженого гелю вища за температуру плавлення льоду. Цей факт свідчить, що густина нової структури більша за густину льоду, а це відповідає розрахунковим даним [12, 13].

Обчислимо товщину примежового шару на основі даних рис. 4, б, 5, б. За визначенням, площа під піком на залежності $G''(T)$ пропорційна об'ємові, який займає структура, відповідальна за цей пік. Позначивши через I_g та I_e – площі під А-піком замороженого гелю та льоду, а через V_g та V_e – відповідні об'єми, маємо

$$\frac{I_e - I_g}{I_e} = \frac{V_e - V_g}{V_e} = \varphi_n. \quad (12)$$

Згідно з рівнянням (12) φ_n – відносний об'єм, як в системі займають не льодові структури – колаген та примежові шари. Відповідно записуємо

$$\varphi_n = \varphi_p + \varphi_s, \quad (13)$$

де φ_s – відносний об'єм, зайнятий примежовими шарами.

Використовуючи формули (3), (4), для значення $c = 50$ г/л маємо $\varphi_p = 0,05$. Обчисливши значення I_e та I_g для графіків рис. 4, б, 5, б. Згідно з формулою (12) отримуємо $\varphi_n = 0,43$. Таким чином, для відносного об'єму φ_s маємо значення 0,38.

Як уже згадувалось в моделі ідеальної сітки примежовий шар має форму порожнистого циліндра, що оточує колагенову спіраль. Позначимо через D зовнішній діаметр цього циліндра. В межах комірки довжина цього циліндра дорівнює ℓ . Площа поперечного перерізу становить $\frac{\pi}{4}(D^2 - d^2)$. По аналогії з формулою (3) записуємо

$$\varphi_s = \frac{3\pi}{4} \frac{(D^2 - d^2)}{\ell^2}. \quad (14)$$

Підставляючи в (8) числові значення величин, отримуємо $D = 404$ Å. Відповідно для товщини примежового шару маємо $\frac{D-d}{2} = 12,5$ Å.

Про існування примежових шарів у системах "колаген-вода" свідчать і літературні дані.

В роботі [3] досліджувався перехід, зумовлений денатурацією колагену. Вивчалась залежність теплоти переходу від вмісту амінокислотних залишків (Про, Опро). Було встановлено, що теплота переходу зростає із збільшенням вмісту цих груп. Такий ріст неможливо пояснити тим, що

спіралі колагену стабілізуються лише внутрішньо-молекулярними водневими зв'язками, бо амінокислотні залишки їх не утворюють. То ж було зроблено висновок про те, що спіралі стабілізуються впорядкованою водною структурою, яка існує навколо них.

Примежовий шар являє собою впорядковану водну структуру. То ж можна говорити, що висновок про їх існування в системах "колаген-вода" узгоджується з результатами попередніх досліджень [3, 4]. Новим в даній роботі порівняно з попередніми є те, що в ній висновок про існування впорядкованої водної структури отримано на основі інших експериментальних даних, а саме: характеристик зсувної пружності і, крім того, запропонована модель такої структури.

Уже згадувалось, що досліджуваний гідрогель колагену може служити моделлю міжклітинної речовини пухкої з'єднувальної тканини. Тому факт утворення примежових шарів у гідрогелі колагену дає підстави стверджувати, що такі шари утворюються і в міжклітинній речовині.

Завдяки примежовому шарові молекула не має змоги набути згорнутої форми внаслідок теплового руху. В свою чергу, цей факт зумовлює здатність міжклітинної речовини опиратись дії зсувних деформацій – то, чого позбавлена вода і те, що робить міжклітинну речовину гелем. Цей факт означає здатність зберігати форму – те, що прийнято пов'язувати (див., наприклад, [11] та ін.) із опорною (біомеханічною) функцією з'єднувальної тканини.

4. Висновки

Виконані в даній статті експерименти та розрахунки, а також літературні дані дають підґрунття стверджувати, що в системі "колаген-вода" спіралі колагену оточені водним примежовим шаром, що має форму порожнистого циліндра з товщиною стінки 12,5 Å. Цей шар складається з декількох елементарних шарів, в кожному з яких молекули води розташовані таким чином, що одиничні вектори, перпендикулярні до площини молекул, направлені по нормалі до поверхні згаданого циліндра.

Примежовий шар стабілізує спіраль – витягнутої конфігурації молекули колагену, не даючи можливості молекулі перейти внаслідок теплового

руху в згорнуту конфігурацію. Ця обставина може мати важливе значення для функціонування пухкої з'єднувальної тканини людського організму, забезпечуючи її опорну (біомеханічну) функцію.

1. M.J. Kunitz. Hydration of gelatin Solution. *Gen. Physiol.* **10**, No. 5, 811 (1927).
2. F. Crick, A. Rich. Structure of Polyglycine. *Nature* **176**, 780 (1955).
3. P.L. Privalov, E.I. Tiktopulo. Thermal conformational transformation of tropocollagen. I. Calorimetric study. *Biopolymers* **9**, No. 2, 127 (1970).
4. M. Viabourov, J. Zeblond, P. Papon. Gelation of aqueous gelatin solutions. I. Structural investigation. *J. Phys. France* **49**, 319 (1988).
5. И.Е. Стась, В.Ю. Чиркова, М.И. Минин. Вязкость растворов желатина, приготовленных на облучённой электромагнитным полем воде. *Вестник ВГУ* № 2, 32 (2016).
6. S. Kupper, I. Kiosowska-Chomiczewska, P. Szumaia. Collagen and hyaluronic acid hydrogel in water-in-oil microemulsion delivery systems. *Carbohydr Polym.* **175**, 347 (2017).
7. Л.А. Булавін, О.Ю. Актан, Ю.Ф. Забашта, Т.Ю. Ніколаенко. Спосіб визначення реологічних характеристик консистентних рідин. Пат. 78094 Україна, МПК 7G01N11/16, Бюл. № 2 (2007).
8. Н.Л. Шейко, О.Ю. Актан, Ю.Ф. Забашта, Т.Ю. Ніколаенко. Зсувна пружність льоду в околі температури плавлення. *УФЖ* **55** (3), 300 (2010).
9. Л.А. Булавін, О.Ю. Актан, Ю.Ф. Забашта, Т.Ю. Ніколаенко, Н.Л. Шейко. Применение метода крутильных колебаний для изучения переходов между жидким и твердым агрегатными состояниями вещества. *Письма в журнал технической физики* № 6, 66 (2010).
10. М.В. Волькенштейн. *Молекулярная биофизика* (Наука, 1975).
11. Ю.И. Афанасьев, Н.А. Юрина. *Гистология, цитология и эмбриология* (Медицина, 2002).
12. В.Я. Антонченко. *Физика воды* (Наукова думка, 1986).
13. В.Я. Антонченко, В.В. Ильин, Н.Н. Маковский. Эффекты молекулярной упорядоченности в тонких пленках воды. *Докл. АН УССР* сер. А № 1, 54 (1983).
14. А.Ю. Гросберг, А.Р. Хохлов. *Статистическая физика макромолекул* (Наука, 1989).
15. L.D. Landau, E.M. Lifshitz. *Gidrodinamika* (Nauka, 1988).
16. Л.Д. Ландау, Е.М. Лифшиц. *Теория упругости* (Наука, 1987).
17. Sakurada Ichiro, Kaji Keisuke, Nakamae Katsuhiko, Wadano Susumu. Experimental Determination of the Elastic Moduli of Polymer Crystals in the Direction Perpendicular to the Chain Axis. *Bulletin of the Institute for Chemical Research Kyoto University* **44**, No. 2, 168 (1966).

Одержано 04.03.18

L.A. Bulavin, Yu.F. Zabashta,
L.Yu. Vergun, O.S. Svechnikova, A.S. Yefimenko

INTERFACIAL LAYERS AND THE SHEAR ELASTICITY OF THE COLLAGEN-WATER SYSTEM

S u m m a r y

A hypothesis has been put forward that, in collagen hydrogels, there exist interfacial water layers surrounding the collagen helices. A model of interfacial water layer is proposed which does not contradict experimental data on the shear elasticity of collagen hydrogels. Such layers can exist in a loose connective tissue and prove its supporting function.