

## ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ХОНДРОИТИНСУЛЬФАТА В АГГРЕКАНЕ

Е.А. Ноговицын, Н.Н. Каликин, Н. И. Железняк

Евгений Анатольевич Ноговицын\*, Николай Николаевич Каликин

Физический факультет, Ивановский государственный университет, ул. Ермака, 39, Иваново, Российская Федерация, 153025

E-mail: nea282006@yandex.ru\*, nikolaiKalikin@gmail.com

Николай Иванович Железняк

Кафедра неорганической химии, Ивановский государственный химико-технологический университет, просп. Шереметевский, 10, Иваново, Российская Федерация, 153000

*В работе проведено теоретическое исследование физико-химических свойств хондроитинсульфата в агрекане в рамках приближения самосогласованного поля. Для моделирования агрекана выбрана модель цилиндрической полимерной щетки. Агрекан рассматривается как система из  $n$  полимерных гауссовых цепей, состоящих из  $N$  сегментов, прикрепленных одним концом к цилиндрической поверхности корового белка. Основываясь на результатах предыдущей работы, где в рамках гауссова эквивалентного представления для функциональных интегралов было получено уравнение состояния для водного раствора хондроитинсульфата, а также вычислены осмотическое давление, степень диссоциации, радиус гирации и перенормированная персистентная длина с учетом электростатических взаимодействий мономеров и эффекта контрионной конденсации, можно записать конфигурационный интеграл для цилиндрической полимерной щетки. Вместо длины сегмента Куна вводится персистентная длина, что, как предполагается, позволяет учесть жесткость полимерной цепи, обусловленную электростатическим отталкиванием мономеров (дисахаридных групп). В настоящей работе получено выражение для свободной энергии полимерной щетки, представляющей из себя цепи хондроитинсульфата, привитые к цилиндрической поверхности (коровой белок). Представлена зависимость степени диссоциации хондроитинсульфата в агрекане как функция расстояния от цилиндрической поверхности. Для данной системы она незначительно отличается от степени диссоциации для свободных цепей в растворе. Результаты для плотности полимера как функции расстояния от цилиндрической поверхности, полученные в рамках приближения среднего поля, качественно соответствуют результатам, полученным при численном исследовании методом функционала плотности. Однако, вычисления в рамках среднеполевого приближения недостаточно устойчивы, а потому требуют использования методов регуляризации.*

**Ключевые слова:** агрекан, хондроитинсульфат, биополимеры, теория среднего поля

## PHYSICAL-CHEMICAL PROPERTIES OF CHONDROITIN SULFATE IN AGGREGAN

E.A. Nogovitsyn, N.N. Kalikin, N.I. Zheleznyak

Evgeniy A. Nogovitsyn\*, Nikolaiy N. Kalikin

Department of Physics, Ivanovo State University, Ermaka st., 39, Ivanovo, 153025, Russia

E-mail: nea282006@yandex.ru\*, nikolaiKalikin@gmail.com

Nikolaiy I. Zheleznyak

Department of Inorganic Chemistry, Ivanovo State University of Chemistry and Technology, Sheremetevskiy ave., 10, Ivanovo, 153000, Russia

*In current work theoretical study of physical-chemical properties of chondroitin sulfate in aggrecan within the self-consistent field theory was developed. As a model for aggrecan a model of cylindrical polymer brush was chosen. Aggrecan is considered as a system of  $n$  gaussian polymer chains consisting of  $N$  segments tethered to cylindrical surface of core protein. Basing on the results of previous work where using gaussian equivalent representation for functional integrals equation of state for chondroitin sulfate in aqueous solution was obtained and also osmotic pressure, dissociation degree, radius of gyration and renormalized persistent length were calculated with respect to monomers electrostatic interactions and effect of counterion condensation, one can obtain configuration integral for cylindrical polymer brush. Persistent length is introduced instead of Kuhn segment length which supposedly helps one to take into account rigidity of polymer chain determined by electrostatic repulsion of monomers (disaccharides groups). Expression for free energy of a polymer brush modeled as chondroitin sulfate chains tethered to a cylindrical surface was obtained. Dependence of chondroitin sulfate in aggrecan dissociation degree as a function of distance from the cylindrical surface is represented. For given system it varies insignificantly from the one for free chains in solution. Results for a polymer density as a function of distance from the cylindrical surface obtained within mean-field approximation are in qualitative agreement with those obtained using density functional method. However, calculations within a mean field framework are understable, thus it is necessary to use regularization methods.*

**Key words:** aggrecan, chondroitin sulfate, biopolymers, mean-field theory

**Для цитирования:**

Ноговицын Е.А., Каликин Н.Н., Железняк Н.И. Физико-химические свойства хондроитинсульфата в агрекане. *Изв. вузов. Химия и хим. технология.* 2018. Т. 61. Вып. 2. С. 35–39

**For citation:**

Nogovitsyn E.A., Kalikin N.N., Zheleznyak N.I.

Physical-chemical properties of chondroitin sulfate in aggrecan. *Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved. Khim. Khim. Tekhnol.* 2018. V. 61. N 2. P. 35–39

## ВВЕДЕНИЕ

Агрекан является крупным протеогликаном и одним из важнейших компонентов внеклеточного матрикса. Его функцией является противодействие механическим нагрузкам и обеспечение осмотического давления, необходимого для нормального функционирования клеток и тканей [1]. На рис. 1 изображен протеогликановый агрегат хрящевого матрикса, который состоит, примерно, из одной молекулы гиалуроновой кислоты и около 100 молекул агрекана [2].

Молекула агрекана (рис. 1 в рамке) состоит примерно из 100 цепей хондроитинсульфата и кератансульфата, связанных ковалентной связью с линейным белком (200-300 кДа) длиной, примерно, 400 нм [1]. Он имеет три глобулярных домена, обеспечивающих связывание агрекана с гиалуроновой кислотой и низкомолекулярным белком.

Хондроитинсульфат является важным составным компонентом агрекана. Он стимулирует регенерацию тканей, способствует синтезу и защите коллагена, который является структурной основой всех соединительнотканых структур.

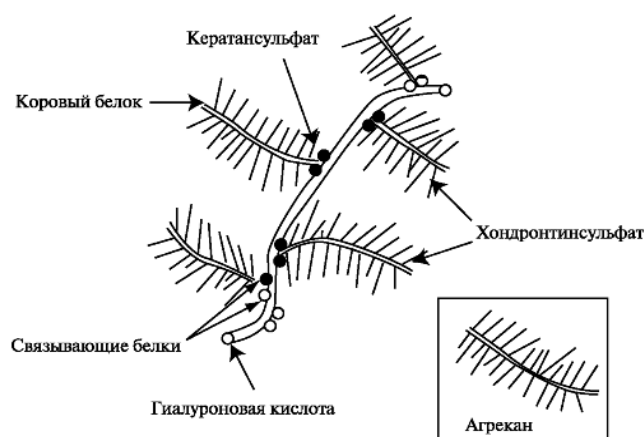


Рис. 1. Протеогликановый агрегат хрящевого матрикса. Протеогликановый агрегат состоит из одной молекулы гиалуроновой кислоты и около 100 молекул агрекана [2]

Fig. 1. Proteoglycan aggregate of cartilage matrix. It consists of one hyaluronic acid molecule and about 100 aggrecan molecules [2]

Особенностью хондроитинсульфата среди протеогликанов является его способность сохранения воды в толще хряща в виде водных полостей (микропространства – водные подушки), создающих хорошую амортизацию и поглощающих удары, что в итоге повышает прочность соединительной

ткани. Хондроитинсульфат – самый распространенный гликозаминогликан в организме человека; он содержится в хряще, коже, сухожилиях, связках, артериях, роговице глаза. В организме человека встречаются 2 вида хондроитинсульфата: хондроитин-4-сульфат и хондроитин-6-сульфат. Они построены одинаковым образом, отличие касается только положения сульфатной группы в молекуле N-ацетилгалактозамина [3]. Структурные различия между ними минимальны, и для определенности мы будем рассматривать хондроитин-6-сульфат с молекулярной массой мономера 513 Da/дисахарид и степенью полимеризации  $N = 34$ . Хондроитинсульфат является полиэлектролитом. В водных растворах его мономеры могут приобретать заряд  $z_m = -2$ .

В работах [4,5] нами исследовались водные растворы свободных цепей хондроитинсульфата и гиалуриновой кислоты в рамках гауссовой модели гибких полимерных цепей, а в работе [6] – в рамках «wormlike» [7] модели полужестких цепей.

Цель настоящей работы – исследование свойств полимерных цепей хондроитинсульфата, связанных ковалентной связью с коровым белком, в агреконе.

### МОДЕЛЬ

В качестве модели агрекана может быть выбрана модель цилиндрической полимерной щетки [2]. Мы рассматриваем агрекан как систему из  $n$  полимерных гауссовых цепей, состоящих из  $N$  сегментов, прикрепленных одним концом к цилиндрической поверхности радиуса  $R_0$  и длиной  $L_0$ .

#### Водный раствор хондроитинсульфата

Сначала кратко рассмотрим статистический ансамбль полиэлектролитных цепей, не «пришитых» к коровому белку.

Конфигурационный интеграл для такой системы полимерных цепей, не «пришитых» к поверхности, можно записать в виде:

$$Q_n = \int D\vec{r}_1 \dots \int D\vec{r}_n \exp \left\{ -\beta \sum_{j=1}^n H_0[\vec{r}_j] - \beta H_{\text{int}} \right\}. \quad (1)$$

Интегрирование проводится вдоль кривых полимерных цепей. Первое слагаемое в показателе экспоненты описывает невзаимодействующие полужесткие полимерные цепи:

$$\beta H_0[\vec{r}] = \frac{3}{4l_0} \int_0^{L_c} ds [\dot{\vec{r}}^2(s) + l_0^{-2} \ddot{\vec{r}}^2(s)]. \quad (2)$$

Второе слагаемое в выражении (2) отвечает за жесткость полимерной цепи, точки означают производные по  $s$ ,  $l_0$  – персистентная длина свободной полимерной цепи,  $L_c = Na$ ,  $a$  – линейный раз-

мер мономера,  $N$  – степень полимеризации [6]. Идеальную цепь можно разделить на отрезки длиной  $l_0$  и считать их прямолинейными и независимыми друг от друга. Электростатическое отталкивание между мономерами приводит к увеличению персистентной длины  $l_0 \rightarrow l_1$  ( $l_0 < l_1$ ) [6].

Электростатическое взаимодействие между мономерами имеет вид DLVO-потенциала [6]:

$$\beta H_{\text{int}} = \frac{\beta}{2l_0^2} \sum_{i,j=1}^n \int_0^{L_c} ds_1 \int_0^{L_c} ds_2 \Phi[\vec{r}_i(s_1) - \vec{r}_j(s_2)],$$

$$\Phi(r) = (z_m \alpha)^2 A(k_D, a) \frac{\lambda_B \exp(-k_D r)}{\beta r}, \quad (3)$$

$$A(k_D, a) = \frac{\exp(ak_D)}{(1 + k_D a/2)^2},$$

где  $k_D$  – параметр экранирования Дебая,  $\lambda_B$  – постоянная Бьерума,  $z_m$  – заряд мономера,  $\alpha$  – степень диссоциации мономеров,  $N$  – индекс полимеризации,  $a$  – размер мономера ( $w = \pi a^3/6$  – исключенный объем мономера). Растворитель рассматриваем как непрерывную среду с диэлектрической проницаемостью  $\epsilon$ .

В работе [6] в рамках гауссова эквивалентного представления для функциональных интегралов нами было получено уравнение состояния для водного раствора хондроитинсульфата, вычислены осмотическое давление, степень диссоциации, радиус гирации и перенормированная персистентная длина  $l_1$  с учетом электростатических взаимодействий мономеров и эффекта контрионной конденсации. Все вычисления проведены при различных концентрациях мономеров хондроитинсульфата и низкомолекулярной соли NaCl и хорошо согласуются с имеющимися экспериментальными данными.

Уравнение для перенормированной персистентной длины  $l_1$  имеет вид:

$$\frac{1}{l_0} - \frac{1}{l_1} = \frac{\beta}{9L_c l_0^2} \int_0^{L_c} ds_1 \int_0^{L_c} ds_2 (s_1 - s_2)^2 \int \frac{d^3 k}{(2\pi)^3} k^2 \tilde{D}(k^2) \times$$

$$\times \exp \left\{ -\frac{2k^2 l_1^2}{3} \left[ \frac{|s_2 - s_1|}{l_1} + e^{-\frac{|s_2 - s_1|}{l_1}} - 1 \right] \right\}, \quad (4)$$

где  $D(\vec{r}) = \int \tilde{D}(q^2) e^{i\vec{q}\vec{r}} \frac{d^3 p}{(2\pi)^3}$ ,  $\tilde{D}(q^2) = \frac{\tilde{\Phi}(q^2)}{1 + c G(q^2) \tilde{\Phi}(q^2) / \tilde{\Phi}(0)}$ ,  $D(r)$  – потенциал средней силы,  $\tilde{\Phi}(q^2)$  – Фурье-образ потенциала (3),  $G(q^2)$  – структурный фактор.

На рис. 2 представлен график зависимости степени диссоциации хондроитинсульфата от концентрации NaCl. Степень диссоциации монотонно убывает с добавками соли и очень слабо зависит от концентрации мономеров в интервале 0,1–0,3 моль/л [6].

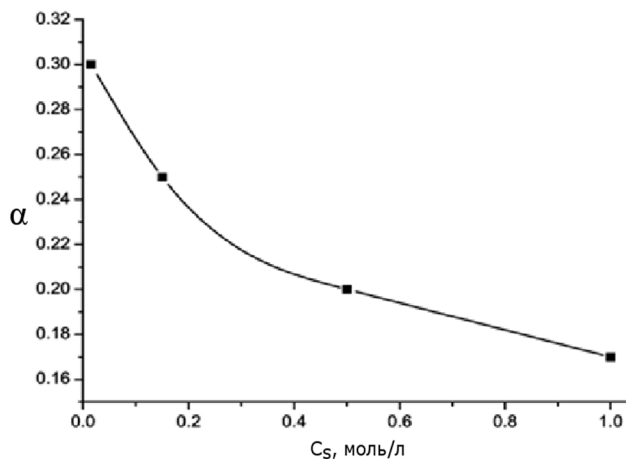


Рис.2. Зависимость степени диссоциации хондроитинсульфата от концентрации NaCl [6]

Fig. 2. Chondroitin sulfate dissociation degree as a function of NaCl concentration [6]

*Хондроитинсульфат в агрекате*

Мы рассматриваем цилиндрическую поверхность радиуса  $R_0 = 0,5$  нм и длиной  $L_0 = 400$  нм, к которой пришиты 100 полимерных цепей со степенью полимеризации  $N = 40$  и размером мономеров  $a = 0,9$  нм.

Следуя работе [8], запишем конфигурационный интеграл для цилиндрической полимерной щетки в следующей форме:

$$Z = \prod_{i=1}^n \left[ \int D\vec{r}_i \exp \left[ -\frac{3}{4l_i} \int_0^{l_i} ds (\dot{\vec{r}}^2(s)) \right] \exp \left[ -\frac{w}{2} \int d\vec{r} \Theta^2(\vec{r}) \right] \right], \quad (5)$$

где  $w$  – исключенный объем. Вместо длины сегмента Куна мы ввели в (5) персистентную длину  $l_i$ , определенную из уравнения (4). Мы предполагаем, что это позволяет учесть жесткость полимерной цепи, обусловленную электростатическим отталкиванием мономеров (дисахаридных групп). В выражении (5)  $\Theta(\vec{r}) = \sum_{i=1}^n \int_0^{l_i} ds \delta[\vec{r} - \vec{r}_i(s)]$  определяет локальную плотность мономеров. Далее, следуя работе [8], используем равенства  $1 = \int D\Psi \delta(\Psi - \Theta)$  и  $\delta(\Psi - \Theta) = \int D\Omega \exp \left[ \int \Omega(\Psi - \Theta) d\vec{r} \right]$ , и вычисляем гауссов интеграл по  $\Psi$ . Тогда  $Z \propto \int D\Omega e^{-A\sigma F[\Omega]}$ , где

$F[\Omega] = -\frac{1}{2a\sigma_0} \int dz \Omega^2[z] - \ln Q[\Omega]$ ,  $Q[\Omega]$  – функция распределения для одной полимерной цепи во внешнем поле  $\Omega$ ,  $\sigma_0 = n/(2\pi R_0 L_0) = 0,08$  нм<sup>-2</sup> – плотность покрытия цилиндрической поверхности (коровий белок) полимерными цепями (хондроитинсульфат). Для цилиндрической полимерной щетки можно ввести поверхностную плотность цепей на расстоянии  $z$  от поверхности белка

$\sigma(z) = n / [2\pi(R_0+z)L_0] = \sigma_0 R_0 / (R_0 + z)$ . Свободная энергия системы определяется минимумом функционала  $F[\Omega]$  [8], т.е. условием  $\frac{\delta F[\Omega]}{\delta \Omega} = 0$ , которое приводит к приближению среднего поля

торое приводит к приближению среднего поля

$$\overline{\omega}(z) = -\sigma(z)a \frac{\delta \ln Q[\overline{\omega}]}{\delta \overline{\omega}} = w \rho_m(z), \quad (6)$$

где  $\rho_m(z)$  – усредненная по ансамблю полимерных цепей плотность мономеров,  $z$  – расстояние от цилиндрической поверхности. В приближении среднего поля свободную энергию, приходящуюся на одну полимерную цепь, в единицах  $k_B T$  можно записать в виде:

$$F = -w \int_0^\infty dz \frac{\rho_m^2(z)}{2\sigma(z)} - \ln Q. \quad (7)$$

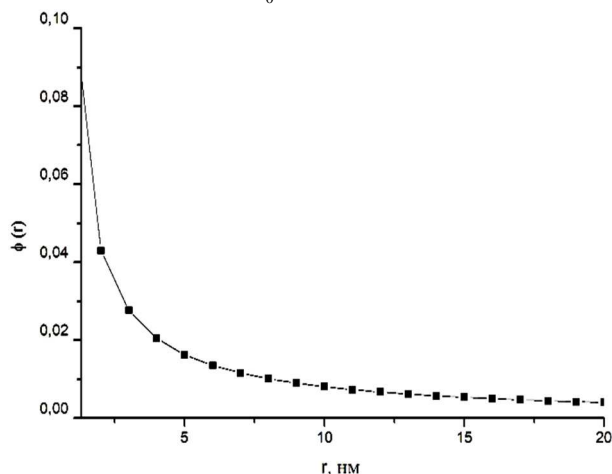


Рис. 3. Зависимость плотности мономеров от расстояния до цилиндрической поверхности белка при  $C_s = 0,1$  моль/л  
Fig. 3. Monomer density as a function of distance from cylindrical surface of protein

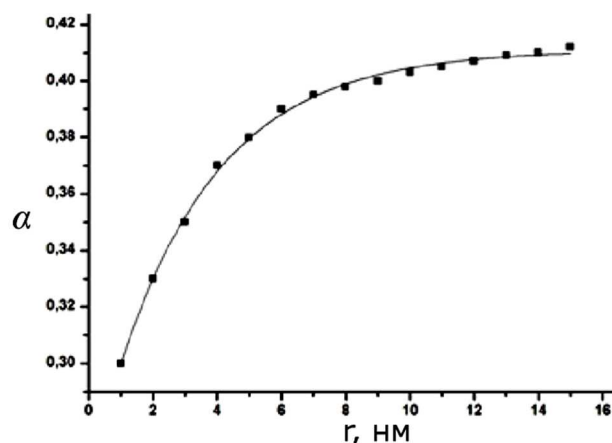


Рис. 4. Зависимость степени диссоциации мономеров от расстояния до цилиндрической поверхности белка при  $C_s = 0,1$  моль/л  
Fig. 4. Dissociation degree of monomers as a function of distance from cylindrical surface of protein

Функцию распределения для одиночной полимерной цепи  $Q$  можно вычислить численно [2,9]. В работе [8] приведено аналитическое решение в рамках приближения среднего поля. В работе [2] агрекан рассматривался как цилиндрическая полимерная щетка и численно исследовался методом функционала плотности. Результаты для плотности полимера как функции расстояния от цилиндрической поверхности качественно соответствуют результатам, полученным в рамках приближения среднего поля (6) при  $N(3w^2\sigma^2/4l_1^2)^{1/3} < 1$  [8]. Вычисления, проводимые в рамках теории среднего поля, недостаточно устойчивы и требуют использования методов регуляризации [10]. На

рис. 3 представлен график зависимости безразмерной полимерной плотности  $\varphi(r) = \rho(r)a^3/6$  от расстояния до цилиндрической поверхности белка.

На рис. 4 представлена степень диссоциации хондроитинсульфата в агрекане как функция расстояния от цилиндрической поверхности при концентрации соли  $C_s = 0,1$  моль/л [2]. Так как с увеличением расстояния от белка плотность мономеров уменьшается, то увеличивается степень их диссоциации. Для хондроитинсульфата в агрекане она незначительно отличается от степени диссоциации для свободных цепей в растворе.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 15-43-03195.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. **Вавилова Т.П.** Биохимия тканей и жидкостей полостей рта: учебное пособие. М.: ГЭОТАР-Медиа. 2008. 208 с.
2. **Nap R. J., Szleifer I.** Structure and interactions of aggrecans: statistical thermodynamic approach. *Biophys. J.* 2008. V. 95. P. 4570–4583. DOI: 10.1529/biophysj.108.133801.
3. **Bathe M., Rutledge G.C., Grodzinsky A.J., Tidor B.** A coarse-grained molecular model for glycosaminoglycans: application to chondroitin, chondroitin sulfate, and hyaluronic acid. *Biophys. J.* 2005. V. 88. P. 3870–3887. DOI: 10.1529/biophysj.104.058800.
4. **Baeurle S.A., Kiselev M.G., Makarova E.S., Nogovitsyn E.A.** Effect of the counterion behavior on the frictional-compressive properties of chondroitin sulfate solutions. *Polymer.* 2009. V. 50. P. 1805–1813. DOI: 10.1016/j.polymer.2009.01.066.
5. **Ноговицын Е.А., Колесников А.Л., Будков Ю.А.** Теоретико-полевая модель электролитической диссоциации в растворах полиэлектролитов. *Изв. вузов. Химия и хим. технология.* 2013. Т. 56. Вып. 2. С. 36–39.
6. **Kolesnikov A.L., Budkov Yu.A., Nogovitsyn E.A.** Coarse-grained model of glycosaminoglycans in aqueous salt solutions. A field-theoretical approach. *J. Phys. Chem. B.* 2014. V. 118. P. 13037–13049. DOI: 10.1021/jp503749a.
7. **Fredrickson G.H.** The equilibrium theory of inhomogeneous polymers. Oxford: Clarendon Press. 2005. 407 p.
8. **Netz R.R., Schick M.** Classical theory of polymer brushes. *Euro. Phys. Lett.* 1997. V. 38. N 1. P. 37–42.
9. **Binder K., Milchev A.** Polymer brushes on flat and curved surfaces: How computer simulation can help to test theories and to interpret experiments. *J. Polym. Sc. B. Polymer Phys.* 2012. 50. P. 1515 - 1555. DOI: 10.1002/polb.23168.
10. **Алибеков И.Ю.** Численные методы. М.: МГИУ. 2008. 220 с.

#### REFERENCES

1. **Vavilova T.P.** Biochemistry of tissues and fluids of the oral cavity. M.: GEOTAR-MEDIA. 2008. 208 p. (in Russian).
2. **Nap R. J., Szleifer I.** Structure and interactions of aggrecans: statistical thermodynamic approach. *Biophys. J.* 2008. V. 95. P. 4570–4583. DOI: 10.1529/biophysj.108.133801.
3. **Bathe M., Rutledge G.C., Grodzinsky A.J., Tidor B.** A coarse-grained molecular model for glycosaminoglycans: application to chondroitin, chondroitin sulfate, and hyaluronic acid. *Biophys. J.* 2005. V. 88. P. 3870–3887. DOI: 10.1529/biophysj.104.058800.
4. **Baeurle S.A., Kiselev M.G., Makarova E.S., Nogovitsyn E.A.** Effect of the counterion behavior on the frictional-compressive properties of chondroitin sulfate solutions. *Polymer.* 2009. V. 50. P. 1805–1813. DOI: 10.1016/j.polymer.2009.01.066.
5. **Nogovitsyn E.A., Kolesnikov A.L., Budkov Yu.A.** Field-theoretical model of electrolytic dissociation in polyelectrolyte solutions. *Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved. Khim. Khim. Tekhnol.* 2013. V. 56. N 2. P. 36–39 (in Russian).
6. **Kolesnikov A.L., Budkov Yu.A., Nogovitsyn E.A.** Coarse-grained model of glycosaminoglycans in aqueous salt solutions. A field-theoretical approach. *J. Phys. Chem. B.* 2014. V. 118. P. 13037–13049. DOI: 10.1021/jp503749a.
7. **Fredrickson G.H.** The equilibrium theory of inhomogeneous polymers. Oxford: Clarendon Press. 2005. 407 p.
8. **Netz R.R., Schick M.** Classical theory of polymer brushes. *Euro. Phys. Lett.* 1997. V. 38. N 1. P. 37–42.
9. **Binder K., Milchev A.** Polymer brushes on flat and curved surfaces: How computer simulation can help to test theories and to interpret experiments. *J. Polym. Sc. B. Polymer Phys.* 2012. 50. P. 1515. DOI: 10.1002/polb.23168.
10. **Alibekov I.Yu.** Numerical Methods. Moscow: MSIU. 2008. 220 p. (in Russian).

Поступила в редакцию 16.06.2017  
Принята к опубликованию 28.08.2017

Received 16.06.2017  
Accepted 28.08.2017