

УДК 557.12.577.112:577.24

## ВЛИЯНИЕ МЕХАНИЧЕСКОГО НАПРЯЖЕНИЯ В КОЖЕ НА ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ СИНТЕЗИРУЕМОГО В НЕЙ КОЛЛАГЕНА

**Т.В. Жукова, Ю.Г. Кот, Е.Э. Перский**

*Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, кафедра биохимии, пл. Свободы, 4, 61077,  
Харьков, Украина, тел.: +38-057-707-5502, E-mail: [epersky@list.ru](mailto:epersky@list.ru).*

Поступила в редакцию 13 апреля 2007 г.

В работе *in vitro* исследовано влияние механического напряжения на параметры денатурации, а также степень гидроксирования остатков пролина, гликозирования остатков лизина и оксипролина коллагена I типа из кожи крыс. Показано, что коллаген, синтезируемый в коже под действием механического напряжения, образует менее термостабильные фибриллы, чем коллаген, синтезированный в отсутствие напряжения. Такой эффект, как было показано, обусловлен снижением интенсивности двух ферментативных реакций процессинга первичной структуры молекулы коллагена – гидроксирования остатков пролина и гликозирования остатков лизина и оксипролина.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** соединительная ткань, механическое напряжение, коллаген, гидроксирование, гликозирование, термостабильность, денатурация.

Известно, что внешнее механическое напряжение приводит к перестройке межклеточного матрикса соединительной ткани, необходимым условием которой является интенсификация синтеза коллагена – важнейшего компонента межклеточного матрикса. Функциональные, и в первую очередь биомеханические свойства соединительной ткани в значительной степени определяются как структурной стабильностью индивидуальных молекул коллагена, так и его надмолекулярных образований. Стабилизация обоих уровней структуры зависит от степени ряда посттрансляционных и постсинтетических модификаций первичной структуры синтезируемой коллагеновой молекулы [1,2]. Среди них – гидроксирование остатков пролина в молекулах коллагена и гликозирование в ней лизина и оксипролина. Известно, что температура и энтальпия денатурации практически линейно зависят от содержания оксипролина, а гликозидные связи, образуемые при гликозировании остатков лизина и оксипролина, участвуют в стабилизации надмолекулярных образований коллагена [3]. Однако вопрос о конкретном изменении степени этих двух модификаций и соответственно структурной стабильности коллагена синтезированного в соединительной ткани, под действием механической нагрузки, в настоящее время остается открытым.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования были проведены на беспородных крысах-самцах массой 200-230 грамм. Крыс усыпляли введением тиопентала натрия [4], после чего декапитировали.

Из кожи спины, предварительно очищенной от шерсти и подкожно-жирового слоя, образцы размером 50x20 мм и массой около 800 мг вырезали с помощью специального штампа так, что длинная сторона образца была параллельна позвоночнику.

Инкубацию образцов проводили в среде Рингера-Кребса в течение 6 часов при 37°C, растягивая их в продольном направлении под действием статического напряжения - (0,75; 1,2; 2,5; 4,7) x 10<sup>5</sup> Н/м<sup>2</sup>. Для изучения интенсивности синтеза коллагена в инкубационный раствор добавляли <sup>3</sup>H-пролин (Amersham) до конечной радиоактивности 0,4 МБк/г.

После инкубации образцы промывали раствором Рингера-Кребса, не содержащего глюкозу, и последовательно обезжиривали сначала ацетоном в течение 24 часов, а затем диэтиловым эфиром в течение 24 часов. Обезжиренные образцы кожи измельчали в жидком азоте до порошкообразного состояния.

Коллаген I типа экстрагировали из полученного порошка кожи 1М NaCl [5]. Экстрагирующий раствор добавляли к полученному порошку кожи из расчета 10 мл 1М NaCl на 250 мг порошка. Экстракцию проводили при постоянном перемешивании в течение 72 часов при 4°C.

Для обессоливания полученных белковых растворов и удаления из них низкомолекулярных веществ использовали гель-фильтрацию на Sephadex G-25 (Pharmacia chemicals, предел эксклюзии 100-5000) [ 6 ]. Содержание ионов  $\text{Na}^+$  в отбираемых аликвотах определяли методом атомно-адсорбционной спектрофотометрии. Содержание ионов  $\text{Na}^+$  в белковых растворах после гель-фильтрации составляло в среднем 57 мг/л.

О количестве коллагена в экстрактах и ткани в целом судили по содержанию в них оксипролина, который определяли методом [ 7 ]. Для исследования включения  $^3\text{H}$ -пролина в коллаген проводили разделение радиоактивных пролина и оксипролина методом [ 8, 9 ]. Радиоактивность всех исследованных образцов измеряли на счетчике Beckman LC-7800.

Степень гидроксирования пролина определяли по соотношению  $^3\text{H}$ -Опро/ $(^3\text{H}$ -Про+ $^3\text{H}$ -Опро) после разделения радиоактивных пролина и оксипролина. Уровень гликозилирования остатков лизина и оксилизина в свежесинтезированном коллагене оценивали по разнице между содержанием общих и свободных гексоз [ 10 ].

Для проведения калориметрических измерений растворы коллагена (рН 7.0), синтезированного в отсутствие механической нагрузки, с концентрацией в среднем 1,584 мг/мл экстракта и растворы коллагена, синтезированного под действием механической нагрузки, с концентрацией в среднем 1,839 мг/мл экстракта оставляли на 24 часа при  $10^\circ\text{C}$  для спонтанного образования фибрилл. Наличие фибрилл в растворе контролировали микроскопически. Термостабильность коллагеновых фибрилл оценивали по параметрам денатурации, которые измеряли на микрокалориметре DASM-4. Исследование проводили при скорости прогрева калориметрических камер  $1^\circ\text{C}/\text{мин}$ . Концентрация белка в кюветках составляла 2,36 - 2,76 моль/кювету DASM-4. По кривым теплопоглощения определяли температуру плавления и энтальпию денатурации.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенных исследований представлены на рисунках 1-4 и в таблице 1. Как видно из рис.1., удельная доля суммарной радиоактивности оксипролина в общем коллагене, экстрагированном из исследованной ткани (отражающая интенсивность его синтеза) растет с увеличением напряжения, а затем, достигнув максимума, несколько снижается.

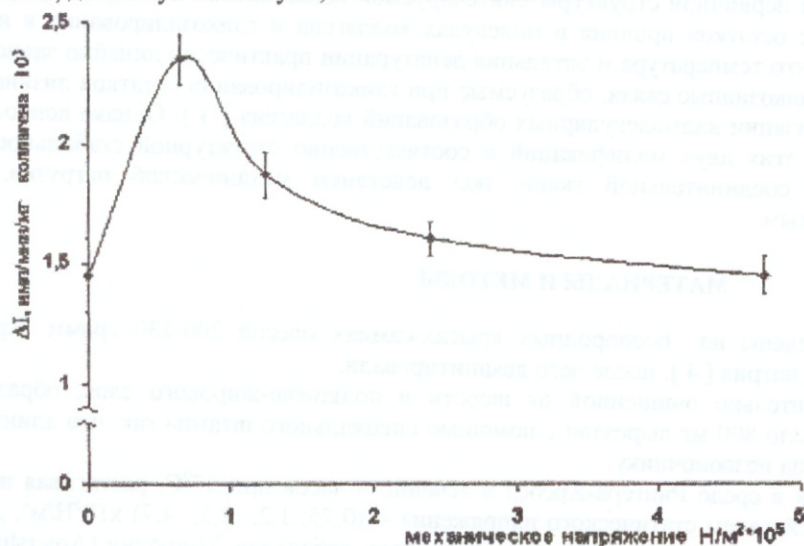


Рис.1. Влияние механического напряжения на удельную радиоактивность  $^3\text{H}$ -Опро в коллагене кожи крыс после инкубации *in vitro*.

Максимум интенсивности синтеза коллагена I типа наблюдается при механическом напряжении  $0,75 \times 10^5 \text{H}/\text{m}^2$ . Дальнейшие исследования проводили на коллагене, который синтезирован в максимуме интенсивности его синтеза.

На рисунке 2 приведены усредненные по всем исследованным образцам кривые теплопоглощения фибрилл, образованных из коллагена I типа синтезированного в коже в отсутствие механического напряжения и под действием механического напряжения, при котором наблюдается максимум интенсивности синтеза коллагена.

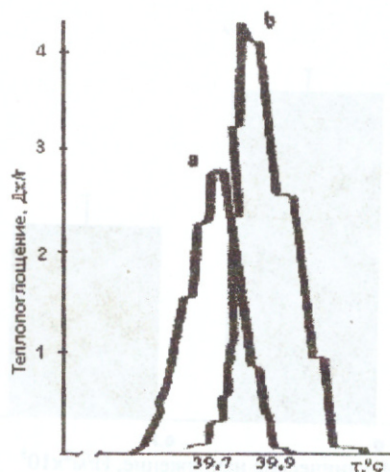


Рис.2.

Кривые теплопоглощения для коллагена кожи крысы синтезированного в отсутствие механической нагрузки (а), и под действием механического напряжения (б) Концентрация белка в кювете микрокалориметра составляла в среднем: а- 2,36 моль/кювету DASM-4 б- 2,76 моль/кювету DASM-4

Рассчитанные по этим кривым значения термодинамические параметры денатурации коллагена представлены в таблице 1.

Табл.1. Температура и энтальпия денатурации коллагена, синтезированного в коже в отсутствие и под действием механического напряжения

		Температура денатурации, К		Энтальпия, кДж/моль	
		0	0,75	52,56	25,78
Механическое напряжение $\times 10^5 \text{ Н/м}^2$	0	312,9	52,56		
	0,75	312,7	25,78		

Полученные величины температуры и энтальпии денатурации коллагена лежат в пределах, свойственных этому белку [ 11 ]. В то же время, как видно, коллаген, синтезируемый в коже под действием механического напряжения, образует менее термостабильные фибриллы, чем коллаген, синтезированный в отсутствие напряжения.

Этот эффект может объясняться тем, что действие механической нагрузки приводит к снижению интенсивности двух ферментативных реакций процессинга первичной структуры – гидроксирования остатков пролина и гликозилирования остатков лизина и оксипролина.

Как видно из рис. 3., степень гидроксирования коллагена, который синтезируется в соединительной ткани под действием механического напряжения, снижена по сравнению с нормой.

Этот результат можно объяснить по-разному. В виду того, что синтез коллагена происходит на рибосомах шероховатого ретикулума, мембраны которого являются частью клеточной мембраны, деформация последней должна в какой-то степени передаваться и мембранам шероховатого ретикулума. Возникающие в них при этом структурные изменения могут сопровождаться и снижением ферментативной активности пролилгидроксилазы. Возможно также, что резкий рост синтеза коллагена не сопровождается увеличением содержания в клетке пролилгидроксилазы. При соответствующем соотношении субстрата и фермента это может приводить к снижению тотального выхода оксипролина.

В любом случае полученные данные свидетельствуют о том, что деформация коллагенсинтезирующих клеток, возникающая при действии на ткань механического напряжения, вызывает уменьшение степени гидроксирования коллагена, что в свою очередь должно сыграть свою роль, по-видимому, в снижении структурной стабильности индивидуальных молекул коллагена.

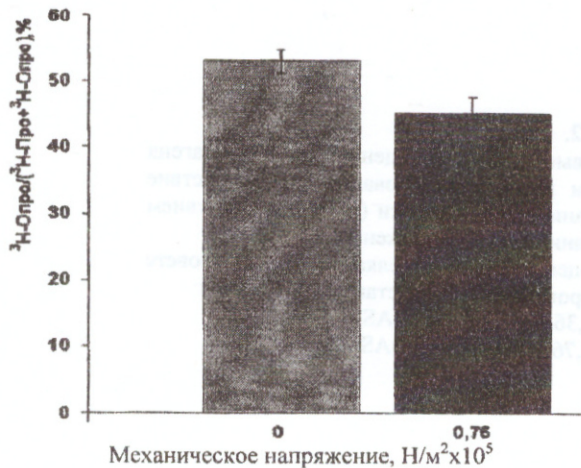


Рис.3. Влияние механического напряжения на степень гидроксирования пролина в коллагене кожи крыс в максимуме интенсивности синтеза после инкубации *in vitro*.

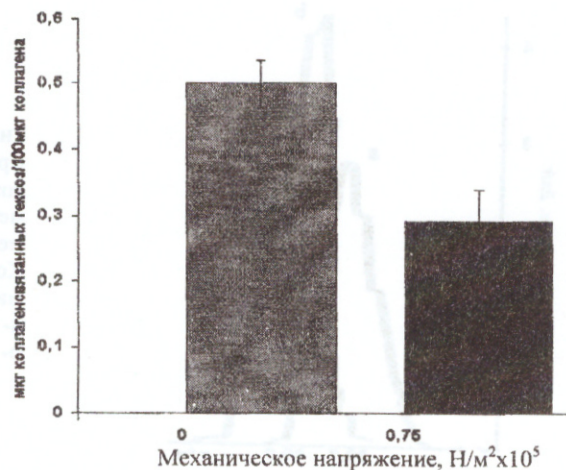


Рис.4. Влияние механического напряжения на степень неферментативного гликозирования коллагена кожи крыс в максимуме интенсивности синтеза после инкубации *in vitro*.

Проведенные исследования по определению степени гликозирования коллагена (рис.4.) показали, что увеличение напряжения приводит к снижению содержания в коллагене кожи гексоз, присоединившихся к нему неферментативным путем.

Снижение степени неферментативного гликозирования при растяжении можно объяснить тем, что при воздействии напряжения на ткань нарушаются внутримолекулярные связи коллагена, возможно, в том числе и гликозидные связи, что приводит к уменьшению количества белоксвязанных углеводных групп. Говоря о возможном влиянии выявленного эффекта на структурную стабильность надмолекулярных коллагеновых структуры, в становлении и поддержании структурной стабильности которых процессы гликозирования занимают одно из важнейших мест, можно предположить, что выявленное снижение степени неферментативного гликозирования молекул коллагена I типа из кожи крыс вполне вероятно приводит к уменьшению структурной стабильности надмолекулярных коллагеновых структур в изученной ткани.

Авторы благодарят проф. Зинченко А.И. за предоставленную возможность провести калориметрические исследования в ее лаборатории.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Yutani Y., Ohashi H., Kubo T., Yamano Y. Effects of mechanical stress on expression of differentiated phenotypes of chondrocytes// *Osaka City Med. J.* – 2000. – Vol.46, N1. – P.23 - 29.
2. Juliano R., Haskill S. Signal transduction from the extracellular matrix// *J. Cell Biol.* – 1993. – Vol. 120. – P. 577 - 585.
3. Есипова Н.Г., Айзенхабер Ф., Айзенменгер Ш., Туманян Б.Г. Новая трактовка термодинамической роли иминокислот в коллагене. Разрешение термодинамического парадокса// *Биофизика.* – 1992. – Т.37. – №1. – С.68-72.
4. Stephen A. Greene. *Veterinary anesthesia and pain management secrets.* – Henlay&Belfus inc., 2002. – P.266.
5. Гарбузенко О.Б., Емец Е.Б., Перский Е.Э. Влияние деформации на обмен белков и механические свойства аорты и кожи крыс *in vitro*// *Вестн. пробл. биол. и мед.* – 1997. - №25. – С.19 - 26.
6. Скоупс Р. *Методы очистки белков.* – М.: Мир, 1985. – С. 32,203.
7. Утевская Л.А., Перский Е.Э. Простой метод определения суммарного и свободного оксипролина// *Вестн. Харьк. ун-та.* - 1982. - №226. - С. 18 - 20.
8. Bishop J.E. Increased collagen synthesis and decreased collagen degradation in right ventricular by pressure overload// *Cardiovasc. Res.* – 1994. – Vol. 28. – P.1501 - 1585.
9. Замараева Т.В. Определение <sup>14</sup>С-оксипролина как метод для изучения синтеза коллагена в модельных системах// *Совр. методы в биохимии.* – М.: Медицина, 1977. – С. 265 - 270.
10. Dubous M., Gilles K.A., Hamilton J.K. at al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances// *Anal. Chem.* – 1986. – V. 28. – №3. – P.350-356.
11. Буржанадзе Т.В. Термодинамическое обоснование структуры коллагена// *Биофизика.* – 1992. – Т. 37. - №2. – С. 231-237.