

## ДІЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ

УДК 577.12:577.112:577.24+577.17.05

## МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ ВЯЗКО-УПРУГИХ СВОЙСТВ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ВНЕШНЕГО МЕХАНИЧЕСКОГО НАПРЯЖЕНИЯ

А.Э. Кузьмис, О.Б. Гарбузенко, Е.Э. Перский, Л.А. Утевская

г. Харьков, 61077

пл. Свободы, 4,

ХНУ им В.Н. Каразина

25 ноября 1999

Исследовали влияние механического напряжения на концентрацию, интенсивность синтеза коллагена и вязко-упругие свойства сухожилий, кожи и аорты крыс разного возраста *in vivo* и *in vitro*. Для этого использовали иминокислотный и радиоизотопный анализы. Конкретные величины вязко-упругих свойств тканей рассчитывали по соответствующим кривым напряжение-деформация. Показано, что механическое напряжение, действующее на органы, приводит к изменению обменных процессов в их соединительной ткани и в конечном итоге к формированию вязко-упругих свойств оптимальных по отношению к данному воздействию.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** механическое напряжение, вязко-упругие свойства, деформация, коллаген, синтез, возраст.

Механическое напряжение - постоянно действующий в соединительной ткани физический фактор. Естественно, что в определенной степени оно должно участвовать в формировании ее структурно-функциональных и, в первую очередь, вязко-упругих свойств. В каждой из разновидностей соединительной ткани эти свойства должны соответствовать величинам и распределению приходящихся на них механических нагрузок. Многочисленные экспериментальные данные подтверждают существование такого соответствия для различных соединительно-тканых структур [1, 2].

Однако до сих пор молекулярные механизмы подстройки структурно-функциональных свойств к действию внешней механической нагрузки практически не изучались. В связи со сказанным, настоящая работа посвящена изучению данного вопроса.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты были проведены на сухожилиях и аорте 1-, 3-, 12- и 24-месячных крыс *in vivo*, а также на коже и аорте 3-месячных крыс *in vitro*. Сухожилия извлекали из средней трети хвоста; образцы дермы кожи спины размером 20мм x 5мм вырезали с помощью специального штампа, так, чтобы длинная сторона образца была параллельна позвоночнику; аорту очищали от посторонних тканей и использовали в опыт целиком. Образцы всех тканей растягивали на установке с автоматической регистрацией растяжения в координатах сила-удлинение при скорости деформации 4 % в минуту. Предварительно было показано, что при этом не сказывается свойственная полимерам зависимость вязко-упругих свойств от скорости удлинения [3, 4]. Аорту и сухожилия растягивали в продольном направлении, кожу вдоль длинной стороны образца. На полученных кривых измеряли область нелинейной деформации и модуль Юнга в области упругой деформации [4]. В опытах *in vitro* образцы кожи и аорты предварительно инкубировали при различных напряжениях ( $0.5 \times 10^5$  Н/м<sup>2</sup>) по методике [5, 6]. Изучали также интенсивность синтеза коллагена [7] и его концентрацию [8].

Полученные результаты обрабатывали стандартными статистическими методами [9].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 приведены кривые напряжение-деформация для кожи и аорты, инкубированных при различных напряжениях по сравнению с аналогичными зависимостями для образцов, инкубированных без напря-

жения, а в табл.1 величины модуля Юнга и участка нелинейной деформации для этих образцов, рассчитанные по соответствующим кривым.

Как видно, в обоих случаях повышение напряжения приводит вначале к уменьшению области неупругой деформации и увеличению крутизны кривых в области упругой деформации, что свидетельствует о росте жесткости тканей. Дальнейшее же повышение напряжения сопровождается релаксацией этих свойств – увеличением области неупругой деформации и снижением модуля Юнга, характеризующего жесткость. Необходимо подчеркнуть, что для образцов, инкубированных при изученных напряжениях во всех случаях жесткость остается большей, а область неупругой деформации меньшей, чем величины этих параметров для образцов, инкубированных без напряжения (табл.1).

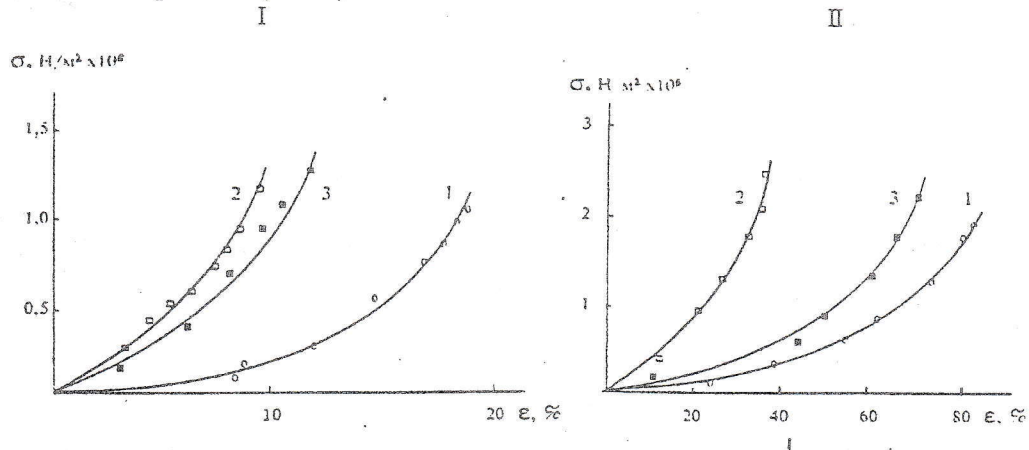


Рис. 1. Кривые напряжение-деформация для кожи и аорты 3-месячных крыс, инкубированных при различных напряжениях: кожа (I): 1)  $\sigma=0$ ; 2)  $\sigma=2,4 \times 10^5$  Н/м<sup>2</sup>; 3)  $\sigma=4,8 \times 10^5$  Н/м<sup>2</sup>; аорта (II): 1)  $\sigma=0$ ; 2)  $\sigma=2,2 \times 10^5$  Н/м<sup>2</sup>; 3)  $\sigma=4,4 \times 10^5$  Н/м<sup>2</sup>

Таблица 1

Модуль Юнга и величина нелинейной деформации кожи и аорты, инкубированных при различных напряжениях.

Параметры	КОЖА			АОРТА		
	$\sigma=0$	$\sigma=2,4 \times 10^5$ Н/м <sup>2</sup>	$\sigma=4,8 \times 10^5$ Н/м <sup>2</sup>	$\sigma=0$	$\sigma=2,2 \times 10^5$ Н/м <sup>2</sup>	$\sigma=4,4 \times 10^5$ Н/м <sup>2</sup>
Модуль Юнга, Е, Н/м <sup>2</sup> × 10 <sup>7</sup>	7,5 ± 0,91	12,0 ± 1,38	9,7 ± 1,08	0,7 ± 0,09	2,0 ± 0,41*	1,8 ± 0,36*
Неупругая деформация, ε, %	16	7	10	65	31	60

Примечание: Здесь и далее знаком «\*» обозначаются результаты, разница между которыми не достоверна ( $P > 0,05$ )

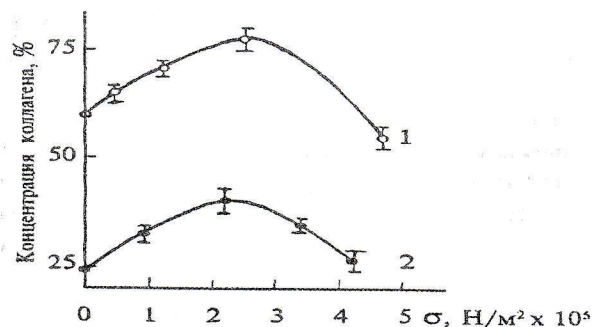


Рис. 2. Влияние механического напряжения на концентрацию коллагена в коже (1) и аорте (2) 3-месячных крыс (% на сухую массу)

На рис.2 приведены кривые зависимости концентрации коллагена в коже и аорте от напряжения. В соответствии с полученными результатами концентрация коллагена в обоих органах при инкубации увеличива-



ется с ростом напряжения, достигая максимума в области  $(2,2-2,4) \times 10^5 \text{ Н/м}^2$ , после чего начинает снижаться. Обнаруженные зависимости концентрации коллагена в коже и аорте от приложенного к ним напряжения являются результатом соответствующих изменений в интенсивности синтеза этого белка в процессе инкубации. Как видно из рис.3, повышение напряжения приводит вначале к резкому увеличению, а затем к медленному снижению удельной радиоактивности  $^3\text{Н}$ -оксипролина в суммарном коллагене тканей. При этом максимумы интенсивности синтеза коллагена в обоих органах находятся в близких областях -  $0,8 \times 10^5 \text{ Н/м}^2$  и  $0,4 \times 10^5 \text{ Н/м}^2$  для кожи и аорты соответственно. Повышение интенсивности синтеза коллагена при деформации как изолированных фибробластов, так и в клеточной культуре было показано в работах [10, 11].

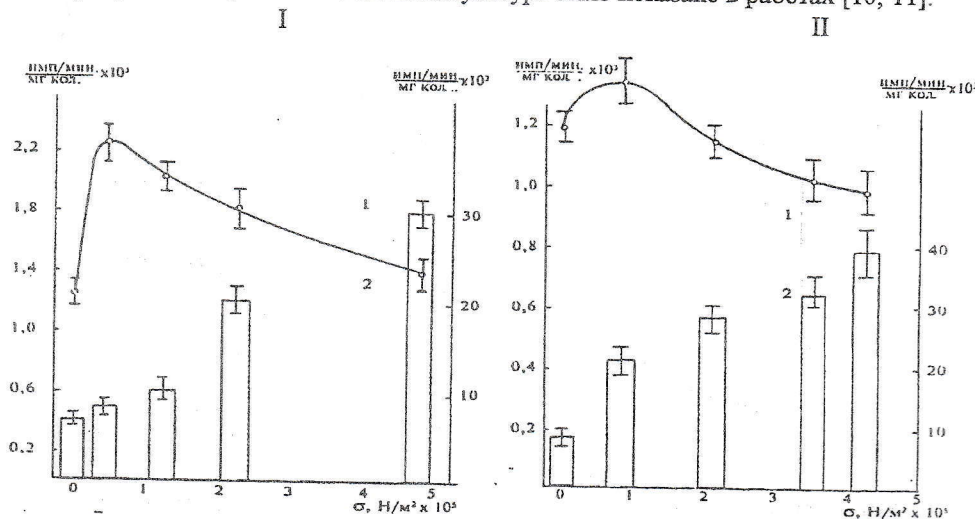


Рис. 3. Влияние механического напряжения на удельную радиоактивность  $^3\text{Н}$ -Опро в общем (1) и свежесинтезированном (2) коллагене кожи (I) и аорты (II) 3-месячных крыс

Следует указать, что общая интенсивность синтеза коллагена в ткани - это интегральный показатель, зависящий как от всего количества клеток, так и от интенсивности синтеза в каждой из них. Данные рис.3 показывают, что в области  $(0,9 - 5,0) \times 10^5 \text{ Н/м}^2$  на фоне снижения удельной радиоактивности  $^3\text{Н}$ -оксипролина в общем коллагене кожи и аорты удельная радиоактивность свежесинтезированного коллагена продолжает повышаться. Такой эффект может свидетельствовать об увеличении интенсивности синтеза коллагена в отдельных клетках на протяжении всего исследованного диапазона напряжений. Снижение же общей интенсивности синтеза коллагена может быть связано с нарушением целостности части синтезирующих клеток или структуры межклеточного матрикса в процессе инкубации, или двумя этими эффектами одновременно.

Обнаруженное увеличение жесткости и снижение величины неупругой деформации обеих тканей может являться результатом ориентационного упорядочения надмолекулярных коллагеновых образований (фибрилл, волокон) в них. Такое упорядочение, в свою очередь, может быть результатом, во-первых, концентрационного эффекта - увеличения содержания надмолекулярных структур в единице объема ткани за счет интенсификации синтеза коллагена при деформации, во-вторых, - от остаточной деформации ткани после снятия нагрузки - эффект аналогичный происходящему в низкомолекулярных поликристаллических веществах.

По-видимому, оба эффекта имеют место *in vivo*, о чем свидетельствуют кривые напряжение-деформация для аорты и волокон сухожилий крыс, приведенные на рис.4 и данные, приведенные в табл.2.

Модуль Юнга, величина нелинейной деформации и концентрация коллагена для аорты и сухожилий крыс разного возраста.

Таблица 2

Параметры	АОРТА			СУХОЖИЛИЯ			
	1 мес.	3 мес.	24 мес.	1 мес.	3 мес.	12 мес.	24 мес.
Модуль Юнга, E, $\text{Н/м}^2 \times 10^7$	4,7±0,85	8,7±1,21	14,1±1,37	27,5± 5,12*	25,0± 3,21*	34,0± 1,91	38,2± 1,72
Неупругая деформация, ε, %	23,5	21,8	18,8	2,1	6,0	5,6	5,4
Концентрация коллагена, % на сырую ткань	11, 5±0,12	14,8 ± 0,10	16,3 ± 0,13	26,5 ± 1,12	32,4 ± 0,84	34,2 ± 0,64*	34,5 ± 0,71*

Как видно (табл.2), стенка аорты в течение всей жизни животного подвергается постоянному пульсирующему напряжению, с возрастом становится более жесткой и менее растяжимой. Аналогичные изменения наблюдаются и для сухожилий. Однако вклад концентрационного эффекта и эффекта остаточной деформации для этих тканей различен – в аорте первый эффект играет, по-видимому, большую роль. Концентрация коллагена в аорте повышается в течении всей жизни животного, а в волокнах сухожилий лишь до 12-месячного возраста (табл.2).

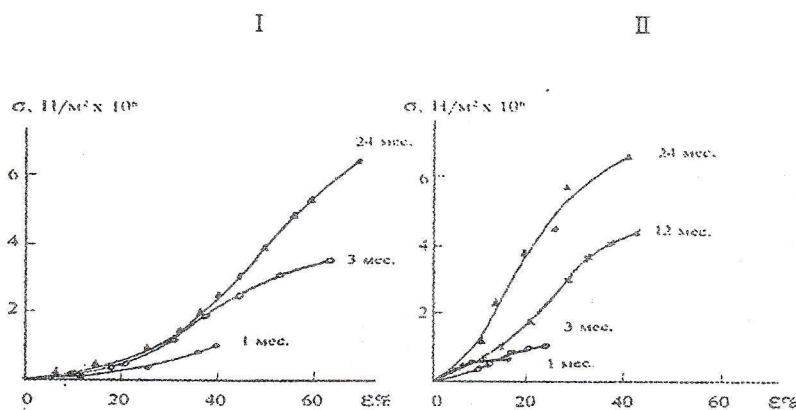


Рис. 4. Кривые напряжение-деформация для аорты (I) и сухожилий (II) крыс разного возраста

Таким образом в формировании вязко-упругих свойств соединительной ткани играет определенную роль положительная обратная связь: механическое напряжение – деформация ткани – деформация клеток – интенсификация синтеза коллагена – изменение вязко-упругих свойств ткани.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Степанова О.В., Бирюкова К.Г., Ширинский В.Н., Ткачук В.А. Влияние периодического растяжения гладкомышечных клеток на экспрессию в них маркерных белков сократительного фенотипа // Физиол. ж. – 1996. – Т. 28, № 8-9. – С. 16-27.
2. Watson P.A. Function follows forms generations of extracellular signals by cell deformation // FASEB J. – 1991. – V. 5. – P. 2013-2019.
3. Александер Р. Биомеханика – М.: Мир. – 1970. – 339 с.
4. Перский Е.Э. Молекулярные механизмы возрастного развития и старения коллагена. Дис.... докт. биол. наук. – Харьков. – 1992. – 369 с.
5. Лебедев Д.А. Методы изучения обмена коллагена в коже человека // Вопр. мед. химии. – 1978. – № 5. – С. 708-712.
6. 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.
7. Замараева Т.В. Определение <sup>14</sup>C-оксипролина как метод для изучения синтеза коллагена в модельных системах // Совр. методы в биохимии. – М.: Медицина. – 1977. – С. 265-270.
8. Stegemann H., Stalder K. Determination of hydroxyproline // Clin. Chim. Acta. – V. 18, № 2. – P. 267-273.
9. Бейли Н. Статистические методы в биологии. – М.: ИЛ. – 1962. – 260 с.
10. Butt R.P., Bishop J.E. Mechanical load enhance the stimulatory effect on serum growth factor on cardiac fibroblasts procolagen synthesis // Mol. Cell Cardiac. – 1997. – V. 29. – P. 1141-1151.
11. Kolpakov V. Effect of mechanical force on growth and matrix proteins synthesis in the in vitro pulmonary artery. Analysis of the role of individual cell types // Circ. Res. – 1995. – V. 77. – P. 823-831.