

УДК 577.7; 577.112.

СПЕКТРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ДЕФОРМАЦИИ КОЖИ НА СОДЕРЖАНИЕ ШИФФОВЫХ ОСНОВАНИЙ В СИНТЕЗИРУЮЩЕМСЯ КОЛЛАГЕНЕ ТИПА I

Т.В. Костина, Ю.Г. Кот, М.В. Гоэнага, Н.А. Никитина, Е.Э. Перский

Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, пл. Свободы 4, Харьков, 61077, Украина

epersky@list.ru

Поступила в редакцию 12 июня 2009 г.

Принята 26 июня 2009 г.

In vitro с помощью флуориметрии и ИК-спектроскопии исследовано влияние деформации соединительнотканых клеток кожи 3-месячных крыс при её механическом растяжении в диапазоне напряжений (0,075 – 0,18) МН/м² на содержание шиффовых оснований в коллагене типа I, который синтезируется в этих условиях. Для выявления всех шиффовых оснований, которые могут возникнуть в коллагеновых надмолекулярных структурах, при наработке коллагена в инкубационную среду добавляли семикарбазид, аминогруппы которого путём конденсации с альдегидными группами аллизина и гидроксиаллизина образуют шиффовы основания уже в свежесинтезированном коллагене, не содержащим агрегаты молекул. Измерения спектров флуоресценции синтезированного коллагена типа I показало, что интенсивность полосы эмиссии с длиной волны 430 нм, характерной для шиффовых оснований, уменьшается при повышении напряжения в коже. В ИК-спектрах коллагена типа I проанализирована интенсивность полосы поглощения 1640 см⁻¹, представляющая собой характеристическую частоту колебания шиффовых оснований в тройной спирали молекулы коллагена. Обнаружено, что интенсивность этой полосы поглощения в коллагене снижается с ростом напряжения, при котором он синтезируется в коже. Содержание шиффовых оснований в коллагеновых структурах обратнопропорционально величине механического напряжения в ткани и при его увеличении от 0 до 0,15 МН/м² уменьшение их количества составляет 39,2% и 33,0% по данным флуориметрии и ИК-спектроскопии соответственно.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: коллаген типа I, синтез, шиффовы основания, флуориметрия, ИК-спектроскопия.

SPECTROSCOPIC INVESTIGATION OF THE SKIN DEFORMATION INFLUENCE ON THE SHIFF BASE CONTENT IN THE 1ST COLLAGEN TYPE THAT IS SYNTHESIZING

T.V. Kostina, J.G. Kot, M.V. Goenaga, N.A. Nikitina, E.A. Persky

² Department of Biochemistry, V.N. Karazin Kharkiv National University, 4 Svobody square, Kharkiv 61077, Ukraine

epersky@list.ru

The influence of connective tissue cells deformation in the skin of 3-month old rats was investigated *in vitro* after its mechanical stretch of (0,075 – 0,18) MN/m². Experiments were performed with fluorimetry and IR-spectroscopy. The Schiff bases content was determined in the 1st collagen type, that was synthesized at stretch conditions. For determining of all Schiff base molecules which can be created in the collagen supramolecular structures, the semicarbazide was added into incubation medium. Semicarbazide amino-groups were condensed with the aldehyde groups of al-lysine and hydroxyl-al-lysine resulting in the Schiff bases formation already in the new collagen molecules that were deprived of molecular aggregates. Fluorescent spectra of *de novo* synthesized 1st collagen type have been demonstrated the decreased emission intensity at $\lambda = 430$ nm (Schiff bases characteristic wave length) at the increasing of stretch in the skin. Intensity of 1st type collagen absorption band at 1640 cm⁻¹ in the IR spectra was analyzed. It is the characteristic frequency of Schiff bases in the collagen triple helix. This band absorption intensity in the collagen was decreased with the increasing of stress when collagen was synthesized in the skin. Schiff base content the collagen structures is inverse to the mechanical stress in the tissue. At stress grows from 0 to 0,15 MN/m² Schiff base content diminish to 39,2% and 33,0% respectively accordingly to fluorescent and IR-spectroscopic data.

KEY WORDS: 1st type of collagen, synthesis, Schiff bases, fluorimetry, IR-spectroscopy.

СПЕКТРОСКОПІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ДЕФОРМАЦІЇ ШКІРИ НА ВМІСТ ШИФОВИХ ОСНОВ У СИНТЕЗУЮЧОМУСЯ КОЛАГЕНІ ТИПУ I

Т.В. Костіна, Ю.Г. Кот, М.В. Гоенага, Н.А. Нікітіна, Є.Е. Перський

Кафедра біохімії, Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна, площа Свободи 4, Харків, 61077, Україна
epersky@list.ru

In vitro за допомогою флуориметрії і ІЧ-спектрофотометрії досліджено вплив деформації сполучнотканинних клітин шкіри 3-місячних щурів при її механічному розтягуванні в діапазоні напруг (0,075 – 0,18) МН/м² на вміст шифових основ у колагені типу I, який синтезується в цих умовах. Для визначення усіх шифових основ, які можуть виникнути в колагенових надмолекулярних утвореннях, при наробленні колагену в інкубаційне середовище додавали семікарбазид, аміногрупи якого шляхом конденсації з альдегідними групами аллізину і гідроксиаллізину утворюють шифові основи вже у свіжо синтезованому колагені, який не містить агрегатів молекул. Вимірювання спектрів флуоресценції колагену типу I, синтезованого в шкірі, показало, що інтенсивність полоси емісії з довжиною хвилі 420 нм, характерної для шифових основ, зменшується з підвищенням напруження в шкірі. В ІЧ-спектрах колагену типу I проаналізовано інтенсивність полоси поглинання 1640 см⁻¹, яка є характеристичною частотою коливання шифових основ в потрійній спіралі молекули колагену. Виявлено, що інтенсивність цієї полоси поглинання в колагені зменшується з ростом напруги, при якій він синтезується в шкірі. Вміст шифових основ в колагенових структурах зворотнопропорційний величині напруги, при якій він синтезується в тканині і при її зростанні від 0 до 0,15 МН/м² зменшення їх кількості становить 39,2% і 33,0% за даними флуориметрії і ІЧ-спектрофотометрії відповідно.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: колаген типу I, синтез, шифові основи, флуориметрія, ІЧ-спектроскопія

Деформация клеток соединительной ткани при действии на неё механического напряжения приводит к существенному изменению физико-химических свойств синтезирующегося в ней коллагена, в частности, повышению степени растворимости и уменьшению термостабильности его надмолекулярных структур [1,2]. Это свидетельствуют о снижении в них уровня поперечного ковалентного связывания и, в первую очередь, связывания межмолекулярного. Структурной основой большинства межмолекулярных связей в коллагене являются шиффовы основания. Эти соединения, имеющие строение (-C=N-), образуются в результате конденсации ε-NH₂-групп лизила или гидроксизила с альдегидными СОН-группами аллизила или гидроксизила соседних молекул [3].

В работе [2] было показано, что растяжение кожи приводит к снижению содержания СОН-групп в коллагене типа I, который в ней синтезируется. Непосредственным следствием этого должно быть и уменьшение количества шиффовых оснований.

В настоящее время, однако, в литературе отсутствуют работы, посвящённые прямому исследованию влияния механического напряжения в ткани на образование шиффовых оснований в синтезирующемся коллагене. Данная статья и посвящена изучению этого вопроса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проведены на коже 3-месячных крыс - самцов линии Вистар. Образцы кожи (20 × 5) мм с длинной стороной вдоль спины очищали от подкожно-жирового слоя и волосяного покрова и инкубировали для наработки коллагена в растворе Рингера-Кребса на протяжении 6 часов при 36⁰С, растягивая их в продольном направлении при статических напряжениях $\sigma = 0; 0,075; 0,1; 0,18$ МН/м².

Вся масса свеже синтезированного коллагена состоит, практически, только из индивидуальных молекул. В ней очень мало агрегатов молекул и, соответственно, мало

реальных, но много потенциальных шиффовых оснований – свободных пар $\varepsilon\text{-NH}_2$ - и СОН-групп.

Конденсация $\varepsilon\text{-NH}_2$ - и СОН-групп в шиффовы основания происходит, в основном, после выхода молекул коллагена в межклеточное пространство в процессе формирования фибриллярных агрегатов, на этапе их стабилизации межмолекулярными сшивками и продолжается длительное время.

Для того, чтобы оценить общее количество возможных шиффовых оснований ещё в свежесинтезированном коллагене, в инкубационный раствор добавляли семикарбазид - ($\text{H}_2\text{N-NH-CO-NH}_2$) в концентрации 20 Мм.

Каждая из его двух концевых аминогрупп может образовывать шиффовы основания, соединяясь с СОН-группами аллизила и гидроксипролина ещё до начала фибриллообразования [4].

Поэтому количество образовавшихся таким образом шиффовых оснований соответствует тем, которые в принципе могут образоваться в коллагеновых структурах в процессе их созревания.

Проинкубированные образцы кожи растирали в жидком азоте до порошкообразного состояния. Коллаген I типа экстрагировали из порошка 1М NaCl и извлекали из экстракта диализом [2]. Концентрацию коллагена рассчитывали по гидроксипролину [5].

Содержание шиффовых оснований в коллагене измеряли флуориметрически и с помощью ИК-спектроскопии.

Для флуориметрических измерений полученный после диализа коллаген вновь растворяли в 1М NaCl (концентрация белка 0,1% – 0,25%) и определение шиффовых оснований проводили методом [6] на спектрофлуориметре MPF-4 (Япония) при длинах волн возбуждения и эмиссии флуоресценции 360 нм и 430 нм соответственно.

Содержание шиффовых оснований рассчитывали по калибровочной кривой. В качестве стандарта для её построения использовали 1,3-глицилглицерол. Измерения проводили против 1М NaCl.

Образцы для ИК-спектроскопии готовили в виде таблеток, которые прессовали, смешивая порошок KBr с воздушно-сухим порошком коллагена. Каждая таблетка содержала 2 мг коллагена типа I.

Спектры коллагена снимали на инфракрасном спектрофотометре “Спектрум М 80” при ширине щели 1 см в области 800 см^{-1} – 2000 см^{-1} . О содержании шиффовых оснований судили по интегральной интенсивности характеристической полосы поглощения для этих соединений в коллагене, равной 1640 см^{-1} [7].

Следует указать, что колебания ($\text{C} = \text{O}$) – групп главной цепи валентностей в спектрах коллагена также находятся в этой области [8]. Однако в условиях эксперимента количество этих групп остаётся постоянным и поэтому изменение интенсивности полосы поглощения 1640 см^{-1} может свидетельствовать и об изменении числа шиффовых оснований.

Для подсчёта интегральных интенсивностей полос поглощения контуры соответствующих полос в ИК - спектрах коллагена разлагали на отдельные компоненты, форма которых описывалась линейной комбинацией функций Гаусса F_G и Лоренца F_L [9]. Однозначность разложений достигалась использованием числа компонент, наблюдаемых в экспериментальных спектрах.

Кривые, представленные на рисунках, являются типичными для серии повторных измерений (не менее 8 – 9 образцов в каждой серии).

Полученные данные обрабатывали статистически с использованием программы Origin Pro 8.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 1 приведена рассчитанная по результатам флуориметрических измерений зависимость содержания шиффовых оснований в коллагене I типа, который синтезировался в коже, от величины растягивающего напряжения в ней. Как видно, с ростом напряжения содержание шиффовых оснований в коллагене уменьшается.

Табл. 1. Влияние растягивающего напряжения в коже на содержание шиффовых оснований в синтезирующемся коллагене типа I

σ , МН/м ²	0	0,075	0,1	0,15	0,18
(-C=N-), мг/ (г коллагена) $\times 10^{-3}$	6,75	3,54*	3,44***	4,10*	4,01*
	$\pm 0,97$	$\pm 0,42$	$\pm 0,38$	$\pm 0,55$	$\pm 0,55$

Примечания: * - достоверно ($p < 0,05$) относительно контроля ($\sigma = 0$); ** - достоверно ($p < 0,05$) относительно предыдущего значения механического напряжения.

На рис. 1 представлены разложения по составляющим области спектра, соответствующей характеристическому поглощению шиффовых оснований в коллагене типа I, который синтезировался в коже при различных величинах растягивающего напряжения.

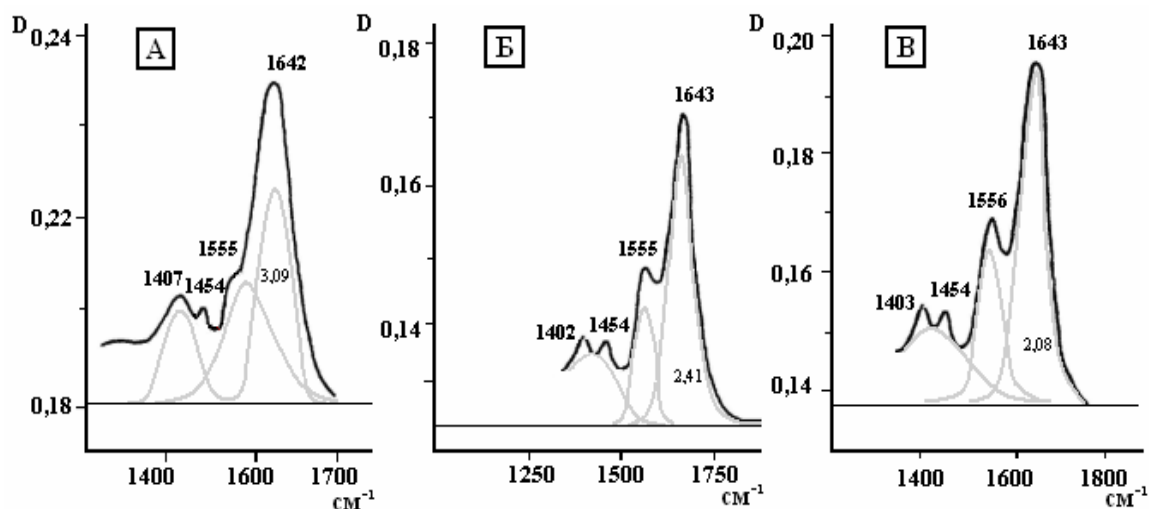


Рис. 1. Разложения на компоненты полосы поглощения 1640 см^{-1} шиффовых оснований в коллагене типа I, который синтезировался в коже при различных величинах растягивающего напряжения. $\sigma =$: А – 0; Б – 0,075; В – 0,15 МН/м². Числа внутри кривых – величины площадей полос поглощения в условных единицах

Табл. 2. Влияние растягивающего напряжения в коже на относительную интегральную интенсивность полосы поглощения 1640 см^{-1} в синтезирующемся коллагене типа I

$I_{\sigma=0}$	$1,00 \pm 0,038$
$I_{\sigma=0,075 \text{ МН/м}^2} / I_{\sigma=0}$	$0,78^* \pm 0,031$
$I_{\sigma=0,15 \text{ МН/м}^2} / I_{\sigma=0}$	$0,67^{***} \pm 0,023$

Примечания: * - достоверно ($p < 0,05$) относительно контроля ($I_{\sigma=0}$); ** - достоверно ($p < 0,05$) относительно предыдущего значения I_{σ}

В соответствии с проведенными расчётами, интенсивность полосы поглощения, определяемой наличием шиффовых оснований в синтезируемом коллагене, уменьшается с увеличением напряжения в коже.

Это уменьшение, оцененное с помощью флуориметрии и ИК-спектроскопии, при увеличении напряжения от 0 до $0,15 \text{ МН/м}^2$ составляет 39,2% и 33% соответственно (табл.1 и 2).

Таким образом, два независимых спектроскопических метода, использующих различные физические свойства шиффовых оснований, с достаточно хорошей степенью совпадения показывают, что их содержание в коллагеновых структурах обратнопропорционально величине механического напряжения в ткани, в которой синтезируется коллаген.

ВЫВОДЫ

1. In vitro, с помощью флуориметрии и ИК-спектрофотометрии изучено влияние механического растяжения кожи 3-месячных крыс на содержание шиффовых оснований в коллагене типа I, который в ней синтезируется.
2. Показано, что содержание шиффовых оснований в коллагеновых структурах обратнопропорционально величине механического напряжения в ткани и при его увеличении от 0 до $0,15 \text{ МН/м}^2$ снижение их количества составляет 39,2% и 33,0% по данным флуориметрии и ИК-спектрофотометрии соответственно.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.12-18.
2. Жукова Т.В., Кот Ю.Г, Буланкина Н.И., Перский Е.Э., Фальченко Е.В. Термостабильность фибрилл, образованных in vitro из коллагена, синтезированного в коже под действием механического напряжения. // Біофізичний вісник.-2009.- Вип.22 (1) - С. 29 – 36 .
3. Eyre D.R., Wu J.-J. Collagen Cross-Links. // In: Topics in Current Chemistry. – 2005. – V. 247. - P. 207-229. - Springer Berlin / Heidelberg.

4. Prockop D.J., Fertala A. Inhibition of the Self-assembly of Collagen I into Fibrils with Synthetic Peptides Demonstration That Assembly Is Driven By Specific Binding Sites On The Monomers // *J. Biol. Chem.* - 1998. - V. 273 (25). - P. 15598-15604.
5. Утевская Л.А., Перский Е.Э. Простой метод определения суммарного и свободного оксипролина // *Вестн. Харьк. ун-та.* - 1982. - № 226. - С. 18 - 20.
6. Rice-Evans CA., Diplock A.T., Symons M.C.R. *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology: techniques in free radical research*, London, 1991. - 346 p.
7. Parker F.S. Infrared Spectra of Vitamins, a Schiff Base, and an Amino Acid Chelate in Water // *Applied Spectroscopy.* - 1961. – V. 15. - Issue 4. – P. 89-117.
8. Doyle B.B., Bendit E.G., Blout E.R. Infrared spectroscopy of collagen and collagen-like polypeptides. // *Biopolymers.* – 1975. – V. 14, Issue 5. - P. 937 – 957.
9. Eraser R.D.B., Suzuki E. Resolution of overlapping bands: functions for simulating band shapes. // *Anal. Chem.* – 1969. – Vol. 1 - P. 37 - 41