

УДК 557.12.577.112:24.

ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ ФИБРИЛЛ, ОБРАЗОВАННЫХ IN VITRO ИЗ КОЛЛАГЕНА, СИНТЕЗИРОВАННОГО В КОЖЕ ПОД ДЕЙСТВИЕМ МЕХАНИЧЕСКОГО НАПРЯЖЕНИЯ

Т.В. Жукова, Ю.Г. Кот, Н.И. Буланкина, Е.Э. Перский, Е.В. Фальченко

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

Поступила в редакцию 29 апреля 2009 г.

Принята 11 мая 2009 г.

In vitro изучено влияние механического напряжения в коже крыс на окислительное дезаминирование ϵ -NH₂-групп лизила и гидроксизила и функциональные свойства синтезирующегося в ней коллагена типа I. Показано, что в коллагене, который синтезируется под влиянием напряжения, содержание свободных ϵ -NH₂-групп выше, а уровень поперечного межмолекулярного связывания ниже, чем в коллагене, синтезирующемся в отсутствие напряжения в коже. В результате этого образующиеся путём самосборки фибриллы первого имеют меньшие длину и термостабильность, чем фибриллы второго.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: соединительная ткань, механическое напряжение, коллаген, окислительное дезаминирование, поперечные сшивки, термостабильность.

В последние годы было обнаружено, что деформация клеток соединительной ткани, происходящая под действием механического напряжения, приводит к интенсификации синтеза в ней структурных биополимеров, в том числе и коллагена [1 - 4]. При этом происходит рассогласование между интенсивностью сборки его полипептидных цепей на рибосомах и уровнем их посттрансляционной модификации, которая осуществляется рядом ферментов процессинга [5,6]. Этот эффект должен приводить к изменению конечной структуры, а значит, и свойств его молекул. В предыдущей работе было показано, что степень гидроксирования пролила и, соответственно, термостабильность молекул коллагена типа I, синтезированного в коже при её растяжении, ниже, чем у коллагена, синтезированного в отсутствие растяжения [7].

Важнейшим этапом посттрансляционной модификации коллагена является происходящее под действием лизилоксидазы окислительное дезаминирование ϵ -NH₂-групп лизила и гидроксизила с превращением последних в аллизил и гидроксиаллизил, которые содержат, вместо ϵ -NH₂-, альдегидные СОН-группы. Эта модификация необходима для образования в надмолекулярных коллагеновых структурах поперечных ковалентных связей. Они образуются при взаимодействии либо двух СОН- групп (альдоли), либо ϵ -NH₂-групп с СОН-группами (шиффовы основания) соседних молекул [8, 9]. В настоящем сообщении рассматривается связь между степенью окислительного дезаминирования ϵ -NH₂-групп лизила и гидроксизила в коллагене типа I, который синтезируется в коже при растяжении, морфологией и термостабильностью образующихся из него надмолекулярных структур in vitro.

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 в растворе Рингера-Кребса

на протяжении 6 часов при 36⁰ С, растягивая их в продольном направлении при статических напряжениях $\sigma = 0; 0,075; 0,1; 0,12; 0,18; 0,24$ МН/м².

Проинкубированные образцы 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 [10].

Степень окислительного дезаминирования лизила и гидроксизила оценивали по содержанию свободных ϵ -амино- и альдегидных групп, которые измеряли методами [11] и [12], соответственно. Уровень ковалентного поперечного связывания коллагена в образцах кожи оценивали по его растворимости в 1 М NaCl и выражали в процентах от общего содержания коллагена в ткани.

Фибриллы получали путём их самосборки [12, 13] в растворах коллагена типа I с концентрацией 0,2 – 0,3 %, инкубировали 10 суток при 20⁰ С и измеряли температуру и энтальпию их денатурации на дифференциальном адиабатическом сканирующем микрокалориметре DASM-4 при концентрации белка в кюветах 10 – 13 мкг. Скорость нагрева образцов составляла 1 град/мин.

Образование фибрилл контролировали микрофотографически цифровой камерой Canon A410 на поляризационном микроскопе МП-2 при 510 - кратном увеличении.

При статистической обработке результатов использовали критерии достоверности Стьюдента и Манна-Уитни. Достоверными считали результаты с $p < 0,05$. Данные, представленные на графиках, типичные для серии повторных измерений (не менее трёх в каждой серии). Контуры соответствующих распределений фибрилл коллагена по их длинам и диаметрам разлагали на пики максимумов значений, форма которых описывалась линейной комбинацией функций Гаусса F_G и Лоренца F_L при помощи пакета программ Origin Pro 7.5. [17].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как видно из табл. 1, с ростом растягивающего напряжения в коже число свободных ϵ -NH₂ групп лизила и гидроксизила в коллагене увеличивается, а число свободных альдегидных СОН-групп, образующихся из ϵ -NH₂ – групп в аллизиле и гидроксиаллизиле, уменьшается.

Таблица 1

Влияние растягивающего механического напряжения в коже на содержание свободных ϵ -NH₂– групп лизила и гидроксизила и альдегидных СОН-групп аллизила и гидроксиаллизила в коллагене типа I, мг/г коллагена

Свободные группы	σ , МН/м ²			
	0	0,075	0,12	0,24
ϵ -NH ₂ .	5,0±1,8	32,0±2,0*	34,0±1,5*	28,0±3,2***
СОН -	52,0±3,1	28,1±4,4*	26,0±2,9*	34,1±1,7***

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

Обнаруженный эффект является результатом снижения активности лизилоксидазы. Механизм этого явления может заключаться, например, в постоянстве концентрации этого фермента при резком увеличении концентрации молекул коллагена в результате интенсификации его синтеза, что и приводит к снижению степени модификации. Свободные альдегидные группы – это промежуточный продукт образования

поперечных ковалентных связей [8]. Обнаруженное уменьшение количества этих групп в коллагене, действительно, приводит к уменьшению степени поперечного ковалентного связывания, что подтверждается снижением его растворимости в коже при действии на неё растягивающего механического напряжения (табл. 2).

Таблица 2.

Влияние растягивающего механического напряжения в коже на растворимость коллагена типа I, %.

σ , МН/м ²	0	0,1	0,18	0,24
Растворимость, %	1,50 ± 0,18	2,30 ± 0,10*	2,60 ± 0,20*	2,50 ± 0,10*

Примечание: * - достоверно ($p < 0,05$) относительно контроля ($\sigma = 0$)

Кривые зависимости теплопоглощения от температуры для фибрилл, которые были образованы из коллагена типа I, синтезированного в коже в отсутствие растягивающего напряжения и при напряжении 0,18 МН/м² и инкубированных в течение 10 суток при температуре 18⁰С, представлены на рис. 1.

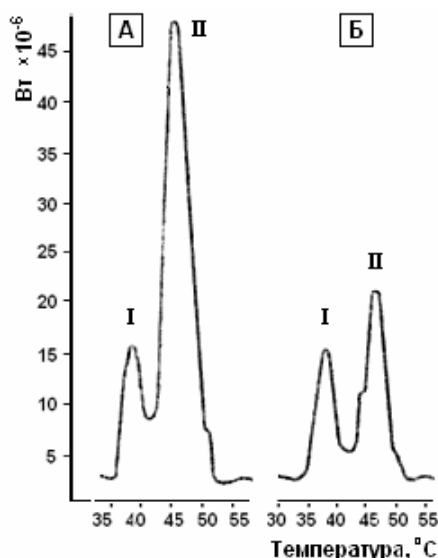


Рис. 1. Теплопоглощение фибрилл, образованных из коллагена типа I, синтезированного в коже в отсутствие растягивающего механического напряжения (А, 10,8 мкг коллагена в кювете) и при напряжении 0,18 МН/м² (Б, 12,4 мкг коллагена в кювете) после 10 суток инкубации.

Как видно, в обоих случаях эти зависимости характеризуются двумя пиками, причём высоты и площади пиков на каждой из кривых различны. Это свидетельствует, во-первых, о гетерогенности всех исследуемых образцов, которые состоят, по меньшей мере, из двух фракций. Во-вторых, о том, что удельные доли этих фракций в образцах фибрилл, образованных из коллагена, синтезированного в коже в отсутствие и при наличии растягивающего напряжения, различны. И, в-третьих, о том, что энергия, необходимая для разрушения фибрилл, относящихся к пикам I и II, различна.

Соответствующие значения энтропии и энтальпии плавления фибрилл приведены в Табл. 3.

Полученные результаты можно объяснить следующим образом. Молекула коллагена типа I представляет собой жёсткую палочкообразную тройную спираль из полипептидных цепей с диаметром и длиной около 0,15 и 300 нм соответственно. В

соответствии со специфической первичной структурой полипептидных цепей, вдоль поверхности молекулы чередуются области, состоящие из гидрофобных и полярных аминокислотных остатков. Такое распределение радикалов аминокислотных остатков вдоль поверхности молекулы лежит в основе ярко выраженной способности коллагена типа I к самосборке в надмолекулярные структуры – фибриллы [13, 14].

Таблица 3.

Температура (T_D), энтальпия (ΔH) и энтропия (ΔS) денатурации фибрилл, образованных из коллагена типа I, синтезированного в коже в отсутствии растягивающего механического напряжения и при напряжении $0,18 \text{ МН/м}^2$ после 10 суток инкубации.

Показатель	$\sigma = 0$		$\sigma = 0,18 \text{ МН/м}^2$	
	Пик I	Пик II	Пик I	Пик II
$T_D, ^\circ\text{C}$	$38,6 \pm 0,4$	$46,0 \pm 0,3$	$38,0 \pm 0,2$	$45,3 \pm 0,4$
$\Delta H, \text{ Дж/г}$	$78,8 \pm 2,6$	$133,0 \pm 5,9$	$78,8 \pm 1,6$	$90,9 \pm 3,1^*$
$\Delta S, \text{ Дж/г} \times \text{град}$	$0,25 \pm 0,03$	$0,42 \pm 0,03$	$0,25 \pm 0,04$	$0,28 \pm 0,06^*$

Примечание. * - достоверно ($p < 0,05$) относительно контроля ($\sigma = 0$)

В латеральном направлении агрегация происходит за счёт взаимодействия гидрофобных и полярных областей, причём соседние молекулы, расположенные параллельно, сдвинуты относительно друг друга на четверть их длины.

В продольном направлении фибриллы растут за счёт образования межмолекулярных связей между $\epsilon\text{-NH}_2$ -группами лизила и гидроксизила и СОН-группами аллизила и гидроксизила в N- и С- концевых участках молекул коллагена, расположенных последовательно и лежащих в соседних рядах.

Схема строения фибрилл и влияние на неё степени поперечного межмолекулярного связывания представлены на Рис. 2.

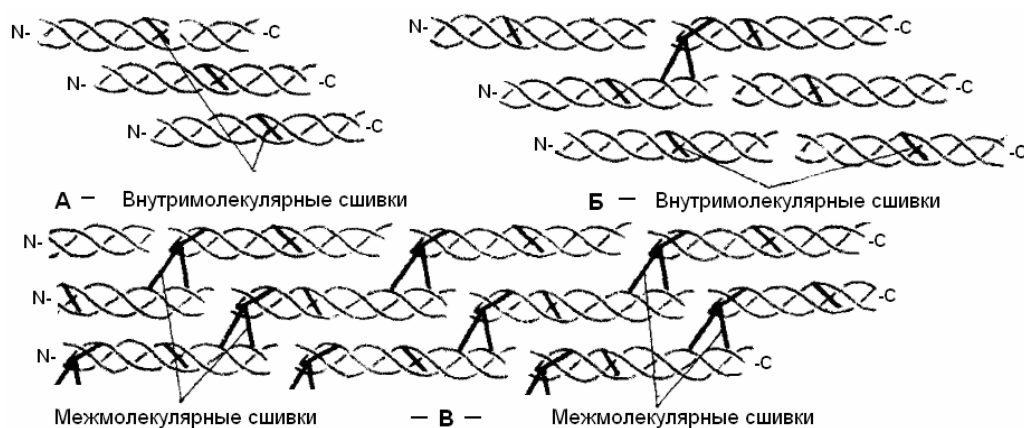


Рис. 2. Схема строения фибрилл коллагена типа I в зависимости от степени поперечного межмолекулярного сшивания. А – короткая фибрилла, в которой молекулы в соседних рядах связаны только электростатическими и гидрофобными взаимодействиями. Б – фибрилла средних размеров, с малым количеством межмолекулярных сшивков. В – длинная фибрилла, в которой молекулы в соседних рядах связаны, кроме электростатических и гидрофобных взаимодействий, межмолекулярными сшивками. Внутримолекулярные сшивки не влияют на длину фибрилл.

В большом числе калориметрических исследований было показано, что кривые денатурации свежевыделенных из тканей молекул коллагена в растворе имеют один пик теплопоглощения [15,16]. Свежевыделенный из кожи коллаген типа I,

синтезированный в ней в отсутствие и при наличии растягивающего напряжения, также характеризуется одним пиком теплопоглощения [7].

Поэтому обнаруженный двухступенчатый характер денатурации фибрилл свидетельствует о следующем. Показано [15], что образование фибрилл в растворе в области температуры и рН, близких физиологическим, не сопровождается тепловым эффектом. При этом теплота плавления фибрилл, образованных в этих условиях, составляет около 80 Дж/г белка. Эта величина совпадает с теплотой денатурации индивидуальных молекул коллагена типа I из кожи крысы и близка значениям для пика 1 коллагена, синтезированного как в отсутствие, так и при наличии напряжения в коже (Табл. 3).

Такое совпадение свидетельствует о том, что первые этапы образования фибрилл определяются, в основном, слабыми гидрофобными и электростатическими взаимодействиями комплементарных участков, расположенных в полярных и неполярных областях молекул коллагена. Эти взаимодействия, по-видимому, не вносят существенного вклада в общую структурную энергию образованных агрегатов.

Таким образом, пик 1 соответствует, по-видимому, теплопоглощению смеси агрегатов, не содержащих или содержащих малое количество межмолекулярных сшивок.

Возникновение сильных высокоэнергетичных ковалентных связей между молекулами коллагена в фибриллах в результате альдольной конденсации и образования шиффовых оснований происходят лишь через некоторое время после образования первичных агрегатов. В соответствии с полученными данными, за 10 суток в части фибрилл образовалось достаточное количество таких связей, чтобы энергия их разрушения значительно превысила энергию денатурации фибрилл, связанных только электростатическими и гидрофобными взаимодействиями.

Таким образом, пик 2 представляет собой теплопоглощение фибрилл, содержащих большое количество межмолекулярных сшивок.

Однако значительно меньшая величина энтальпии денатурации фибрилл, относящихся к этому пику и образованных из коллагена, который синтезировался при напряжении в коже (Табл.3, пик 2), свидетельствует о том, что они содержат меньшее число межмолекулярных сшивок по сравнению с коллагеном, синтезированными в отсутствие напряжения.

Это является прямым следствием снижения уровня окислительного дезаминирования ϵ -NH₂-групп лизила и гидроксизила в коллагене типа I, который синтезируется в коже при растяжении (Табл. 1).

Различное количество межмолекулярных сшивок в фибриллах должно привести и к различиям в их строении. На Рис. 3 приведены микрофотографии фибрилл, образованных из коллагена типа I, синтезированного в коже в отсутствие растягивающего напряжения и при напряжении 0,18 МН/м², и инкубированных в течение 10 суток при температуре 20 °С, а на Рис. 4 и 5 представлены распределения обоих типов фибрилл по длинам и диаметрам.

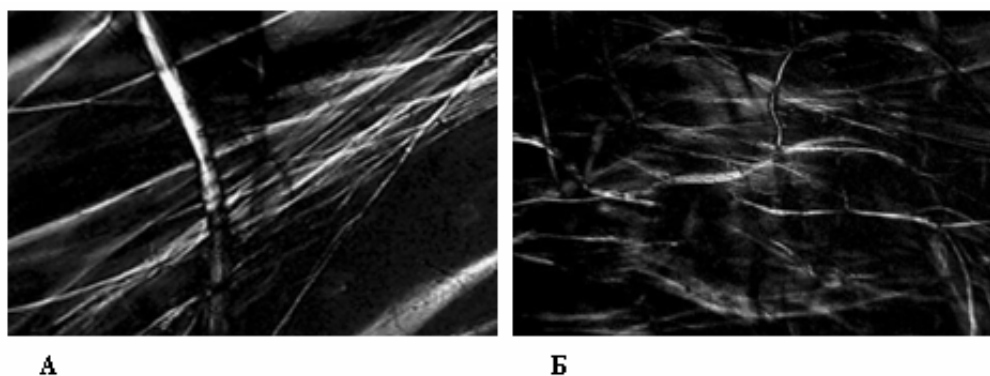


Рис. 3. Микрофотографии фибрилл, образованных из коллагена типа I, синтезированного в коже в отсутствие растягивающего механического напряжения (А) и при напряжении $0,18 \text{ MN/m}^2$ (Б) после 10 суток инкубации.

Как видно, морфология фибрилл, образованных из коллагена, синтезированного в отсутствие и при наличии напряжения в коже, различна.

Длины первых лежат в широком диапазоне от 200 до 3200 нм с максимумом 600 – 700 нм, соответствующим удвоенной длине молекулы коллагена типа I.

Длины вторых не превышают 1700 нм, при этом максимальное количество фибрилл имеет длину 300 – 400 нм, т.е. длину одной молекулы.

Характерно, что максимальное количество этих фибрилл на 13% превышает максимальное количество фибрилл первого типа.

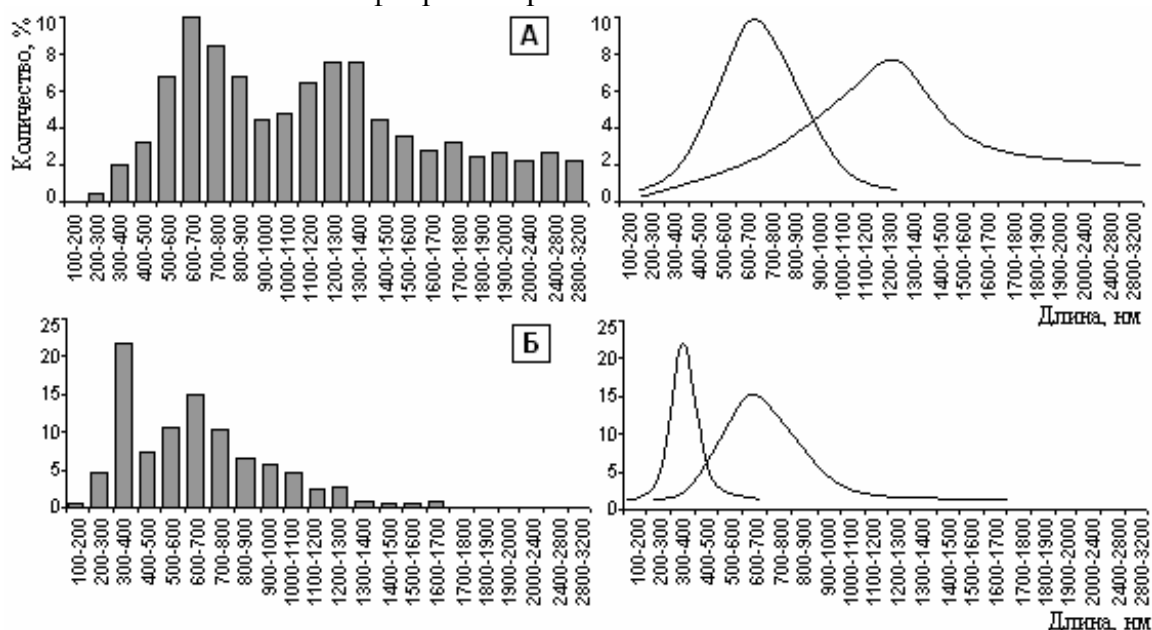


Рис. 4. Распределение по длинам фибрилл, образованных из коллагена типа I, синтезированного в коже в отсутствие растягивающего механического напряжения (А) и при напряжении $0,18 \text{ MN/m}^2$ (Б), после 10 суток инкубации.

Таким образом, в процессе временного развития фибриллы, образующиеся из коллагена типа I, синтезированного в коже в отсутствие механического напряжения, становятся, в среднем, более длинными, чем те, которые образуются из коллагена, синтезированного под действием напряжения. Диаметры фибрилл в обоих случаях лежат в пределах от 5 до 55 нм (Рис. 5).

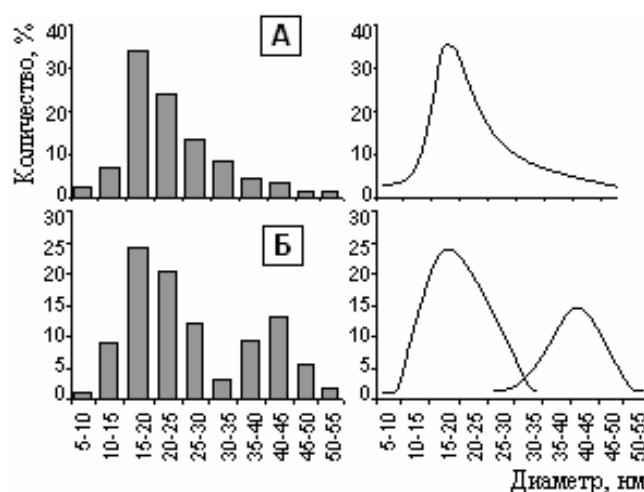


Рис. 5. Распределение по диаметрам фибрилл, образованных из коллагена типа I, синтезированного в коже в отсутствии растягивающего механического напряжения (А) и при напряжении $0,18 \text{ MN/m}^2$ (Б), после 10 суток инкубации.

При этом фибриллы образующиеся из коллагена, синтезированного под действием напряжения имеют два максимума величин диаметров – 15-25 нм и 35-45 нм, в то время как фибриллы, образующиеся из коллагена, синтезированного в коже в отсутствии механического напряжения, только один – при 15-20 нм.

Таким образом, можно считать, что обнаруженное уменьшение степени окислительного дезаминирования $\epsilon\text{-NH}_2$ -групп лизила и гидроксизила в коллагене типа I, который синтезируется в коже под действием механического напряжения, приводит к нарушению образования протяжённых фибриллярных коллагеновых структур и является существенной причиной сниженной термостабильности образованных из него фибрилл.

Самосборка молекул фибриллярных коллагенов в надмолекулярные агрегаты – фибриллы – один из важных начальных этапов морфогенеза соединительной ткани, протекающего в самых разных процессах – эмбриональном развитии, росте, периодических физиологических перестройках органов, заживлении ран, физических тренировках.

Естественно, что все эти процессы сопровождаются локальными изменениями во времени механического напряжения в областях, где идёт морфогенез.

Возможно, низкая структурная стабильность надмолекулярных образований матрикса соединительной ткани на начальных этапах каждого морфогенетического процесса необходима для тонкой подстройки окончательных функциональных свойств органов к действию изменившейся нагрузки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Buschmann, M. D., Gluzband Y. A., Grodzinsky, A. J., Hunziker E. B. Mechanical compression modulates matrix biosynthesis in chondrocyte/agarose culture. // *J. Cell Sci.* - 1995. – 108. – P. 1497-1508.
2. 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.
3. Jin M., Frank E.H., Quinn T.M., Hunziker E.B., Grodzinsky A.J. Tissue Shear Deformation Stimulates Proteoglycan and Protein Biosynthesis in Bovine Cartilage Explants // *Archives of Biochemistry and Biophysics.* – 2001. – V. 395. - Issue 1. – P. 41 – 48.
4. Hyun J., Chen J., Setton L., Chilkoti A. Patterning cells in highly deformable microstructures: Effect of plastic deformation of substrate on cellular phenotype and gene expression // *Biomaterials.* – 2006. – V. 27. - Issue 8. – P. 1444-1451.

5. Кот Ю.Г., Жукова Т.В., Денг Бо, Перский Е.Э. Гидроксилирование пролина в коллагене кожи и аорты при действии на них механического напряжения *in vitro*. // Актуальн. пробл. мед. и биол.- 2004.- №1.- с.269-272.
6. Перский Е. Э., Никитина Н.А., Наглов А.В., Кот Ю.Г. Возрастные особенности индукции синтеза и интенсивности некоторых стадий процессинга коллагена в соединительной ткани под действием механической нагрузки. // Биологический вестник.- 2006 .- № 2.- Т.10.- С. 126—129.
7. Жукова Т.В., Кот Ю.Г., Перский Е.Э.. Влияние механического напряжения в коже на термостабильность синтезируемого в ней коллагена. // Біофізичний вісник.-2007.- Вип.18 (1).- С. 65 – 68.
8. Robins S. P., Bailey A. J. The chemistry of the collagen cross-links. The mechanism of stabilization of the reducible intermediate cross-links. // *Biochem J.* – 1975. - № 149(2). – P. 381–385.
9. Eyre D.R., Wu J.-J. Collagen Cross-Links. // In: *Topics in Current Chemistry.* – 2005. – V. 247. - P. 207-229. - Springer Berlin / Heidelberg
10. Утевская Л.А., Перский Е.Э. Простой метод определения суммарного и свободного оксипролина // Вестн. Харьк. ун-та. - 1982. - № 226. - С. 18 - 20.
11. Дубинина Е.Е. Окислительная модификация белков плазмы крови больных с психиатрическими расстройствами.// Вопросы медицинской химии. - 2000.- №4.-с.36-47.
12. Дж.Бейли. Методы химии белков – М., 1965. – С. 284.
13. Fessler J. H. Self-assembly of collagen. // *Journal of Supramolecular Structure.* – 2004. – V. 2 – Issue 2 – 4. - P. 99 – 102.
14. Yuan L., Veis A. The self-assembly of collagen molecules. // *Biopolymers.* – 2004. – V. 12. - Issue 6. - P.1437 –1444.
15. Андроникашвили Э.Л., Монаселидзе Д.Р., Бакрадзе Н.Г., Мревлишвили Г.М. Построение диаграмм состояния для растворов проколлагена. // Молекулярная биология. – 1972. – т. 6. - № 6. – с. 915 – 925.
16. Sun Y., Chen W.-L., Lin S.-J., Jee S.-H, Chen Y.-F, Lin L.-C., So P.T.C., Dong C.-Y. Investigating Mechanisms of Collagen Thermal Denaturation by High Resolution Second-Harmonic Generation Imaging. // *Biophysical Journal* – 2006. – V. 91. - Issue 7. – P. 2620-2625.
17. Eraser R.D.B., Suzuki E. Resolution of overlapping bands: functions for simulating band shapes. // *Anal. Chem.* – 1969. – Vol. 1., P 37—39.