

УДК: 577.12.577.112:577.24

О НЕКОТОРЫХ ИЗМЕНЕНИЯХ СТРУКТУРЫ КОЛЛАГЕНА ДЕЙСТВИЕМ МЕХАНИЧЕСКОГО НАПРЯЖЕНИЯ

Т.В.Жукова

Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)
zhoo-zhoo@ukr.net

Деформация клеток действием механического напряжения вызывает индукцию синтеза коллагена. Образцы кожи спины инкубировали в растворе содержащим ³H-пролин в диапазоне напряжений 0 - 2,5·10⁵Н/м². Определяли интенсивность синтеза коллагена, гидроксипирование пролина, степень гликозилирования коллагена, степень поперечного связывания в молекуле коллагена. Удельная доля суммарной радиоактивности пролина и оксипролина в общем коллагене снижается. Степень гидроксипирования коллагена при воздействии механического напряжения снижена по сравнению с нормой. Действием механического напряжения степень поперечного связывания и неферментативного гликозилирования снижается. Механическое напряжение приводит к нарушению согласованности между интенсивностями синтеза коллагена и ферментативными модификациями его структуры, структурная стабильность которой претерпевает определенные изменения.

Ключевые слова: коллаген, механическое напряжение, синтез, ковалентные модификации, гидроксипирование, гликозилирование, степень поперечного связывания.

Введение

Известно, что деформация клеток под действием механического напряжения вызывает индукцию синтеза белков – как специфических, так и неспецифических для каждого типа клеток (Bishop, 1993; Kolpakov, 1995; Yasuda, 1996; Yutanl, 2000). Один из этапов синтеза белка – процессинг, характер и объем которого определяют окончательную структуру молекулы. Деформация клетки может, в принципе, изменять соотношение между собственно синтезом полипептидной цепи и активностью соответствующих модифицирующих ферментов, что должно приводить, в конечном итоге, и к изменению строения синтезируемых в этих условиях молекул. Характерной особенностью синтеза коллагена является большой объем процессинга, который определяет конечную структуру и функциональные свойства молекул, в частности, их способность образовывать ковалентные поперечные связи в надмолекулярных образованиях. Однако данных, отражающих влияние механического напряжения на соответствующие внутри- и внеклеточные модификации структуры коллагена, недостаточно. Вслед за более ранними работами (Кузьмис, 1999; Martens, 1989; Yasuda, 1996) нами, в работе *in vitro*, исследована степень гидроксипирования и гликозилирования в коллагене I типа, а также степень его поперечного связывания в коже крыс действием механического напряжения. Структурную стабильность молекул коллагена оценивали по содержанию свободных альдегидных групп в свежесинтезированном коллагене.

Материалы и методы

Исследования проводили на 3-месячных крысах линии Вистар. Образцы кожи спины (20 x 5 мм) инкубировали в растворе Рингера-Кребса, содержащем ³H-пролин с радиоактивностью 0,4 МБк/мл в течение 6 часов при 37⁰С и при напряжении 1,5 10⁵ Н/м² вдоль продольной оси (Martens, 1989). После инкубации образцов коллаген I типа экстрагировали из кожи раствором 1М NaCl (Miller, 1982). Концентрацию коллагена в образцах рассчитывали по содержанию в них оксипролина (Stegemann, 1967). Интенсивность синтеза коллагена оценивали по удельной радиоактивности ³H-пролина и ³H-оксипролина в нем. Гидроксипирование пролина определяли по соотношению ³H-Опро/(³H-Про + ³H-Опро) после разделения радиоактивных пролина и оксипролина (Замараева, 1977).

Уровень гликозилирования определяли по разнице между содержанием общих и свободных гексоз (Dubous, 1986). О величине поперечного связывания судили по степени растворимости свежесинтезированного коллагена в экстракционном растворе. Определение содержания свободных альдегидных групп проводили по методу (Дубинина, 2000).

Статистическую обработку экспериментальных результатов и оценку значимости между группами полученных данных проводили с использованием стандартных статистических методов (Иванов, 1990).

Результаты и обсуждение

Результаты проведенного исследования представлены на рисунках 1-4. Как видно из рис. 1 ($3\text{-}^3\text{H-Опро}/(3\text{-}^3\text{H-Про} + 3\text{-}^3\text{H-Опро})$), удельная доля суммарной радиоактивности пролина и оксипролина в общем коллагене, экстрагированном из кожи, отражающая интенсивность его синтеза, растет под действием напряжения, а затем, достигнув максимума, несколько снижается. По-видимому, восходящая часть этой зависимости соответствует области деформации, в которой возможен адекватный клеточный ответ на внешнее напряжение, нисходящая – области, в которой начинается нарушение структуры ткани, и синтетические возможности клеток в условиях эксперимента уменьшаются (Иванов, 1990).

В то же время динамики удельной радиоактивности (рис. 1) пролина (1 - $3\text{-}^3\text{H-Про}$) и оксипролина (2 - $3\text{-}^3\text{H-Опро}$), будучи качественно подобными, заметно отличаются. Как видно, восходящие части кривых для пролина круче, соответствующие максимумы – выше, и при всех дальнейших напряжениях значения удельных радиоактивностей оксипролина ниже, чем пролина. В результате этого степень гидроксирования пролина в коллагене, который синтезируется в тканях под действием напряжения, непрерывно снижается по сравнению с базовым (в отсутствие нагрузки) уровнем. До достижения максимума индукции синтеза это снижение резкое; после максимума – более пологое (рис. 1).

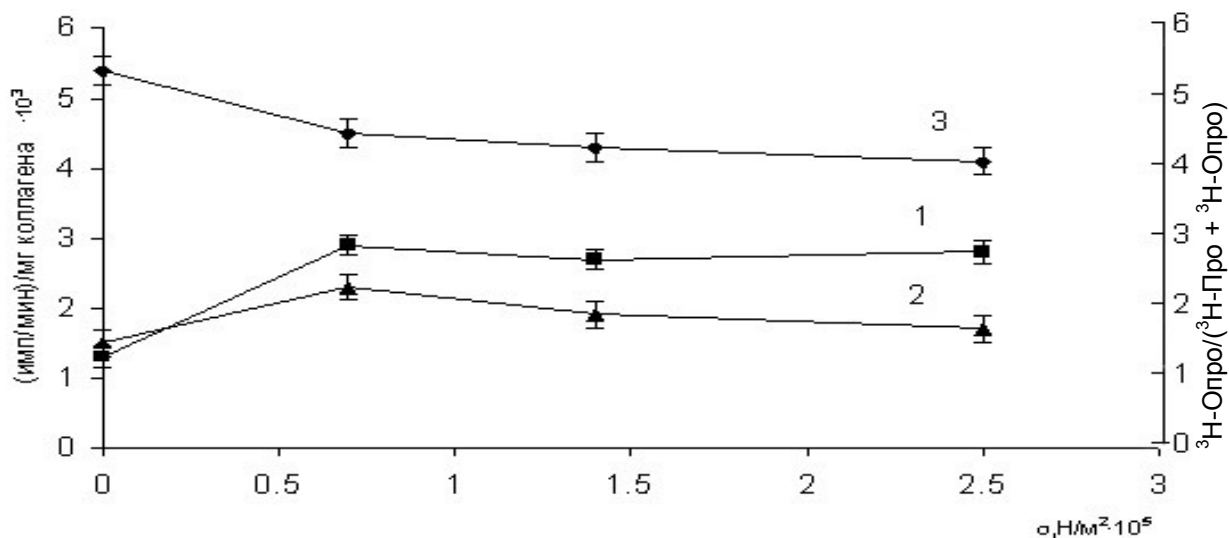


Рис. 1. Влияние механического напряжения на удельные радиоактивности $3\text{-}^3\text{H-Про}$, $3\text{-}^3\text{H-Опро}$ и степень гидроксирования пролина в коллагене кожи крыс 3-месячного возраста после инкубации. 1 - $3\text{-}^3\text{H-Про}$; 2 - $3\text{-}^3\text{H-Опро}$; 3 - $3\text{-}^3\text{H-Опро}/(3\text{-}^3\text{H-Про} + 3\text{-}^3\text{H-Опро})$

Таким образом, степень гидроксирования коллагена, который синтезируется в соединительной ткани под действием механического напряжения, снижена по сравнению с нормой. Этот результат можно объяснить по-разному.

Синтез коллагена происходит на рибосомах шероховатого ретикулума, мембрана которого является частью клеточной мембраны (Zohar, 1995). Поэтому 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 (Cardinale, 1974).

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.

На рисунке 2 показано, что действием механического напряжения (δ - растяжение ($\sigma = 1,8 \text{ H}/\text{m}^2$),) степень неферментативного гликозилирования коллагена снижается.

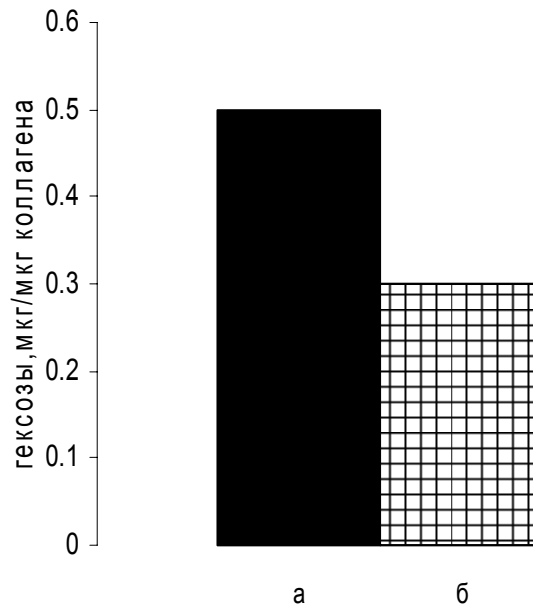


Рис. 2. Влияние механического напряжения на степень гликозилирования коллагена
а – без растяжения,
б - растяжение ($\sigma = 1,8 \text{ Н/м}^2$)

Показанный эффект уменьшения количества коллагенсвязанных гексоз в полной мере согласуется с результатами, полученными при измерении свободных альдегидных групп, количество которых при действии механического напряжения заметно увеличивается (рис.3. б - растяжение ($\sigma = 1,8 \text{ Н/м}^2$)). Количество свободных альдегидных групп в молекуле коллагена отражает степень поперечного связывания. Увеличение свободных альдегидных групп при растяжении определенно свидетельствует о снижении степени поперечного связывания. Как известно, молекула коллагена в процессе синтеза подвергается гликозилированию: в состав молекулы вводятся углеводные группы, образующие О-гликозидную связь.

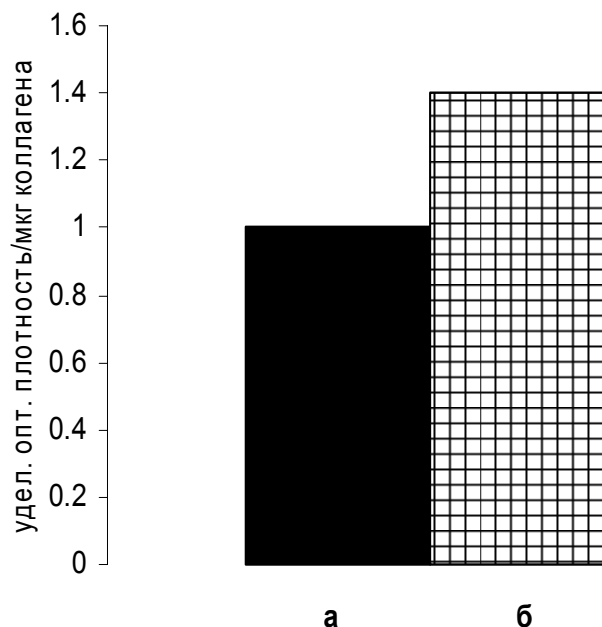


Рис. 3. Влияние механического напряжения на содержание свободных альдегидных групп
а – без растяжения,
б - растяжение ($\sigma = 1,8 \text{ Н/м}^2$)

Снижение степени неферментативного гликозилирования при растяжении можно объяснить тем, что при воздействии напряжения на ткань нарушаются внутримолекулярные связи коллагена, возможно, в том числе гликозидные связи, т.о. снижается количество белоксвязанных углеводных групп.

Что касается степени поперечного связывания (Berg, 1973), то проведенные нами исследования показали, что степень растворимости коллагена кожи крыс увеличивается под действием механической нагрузки (рис.4).

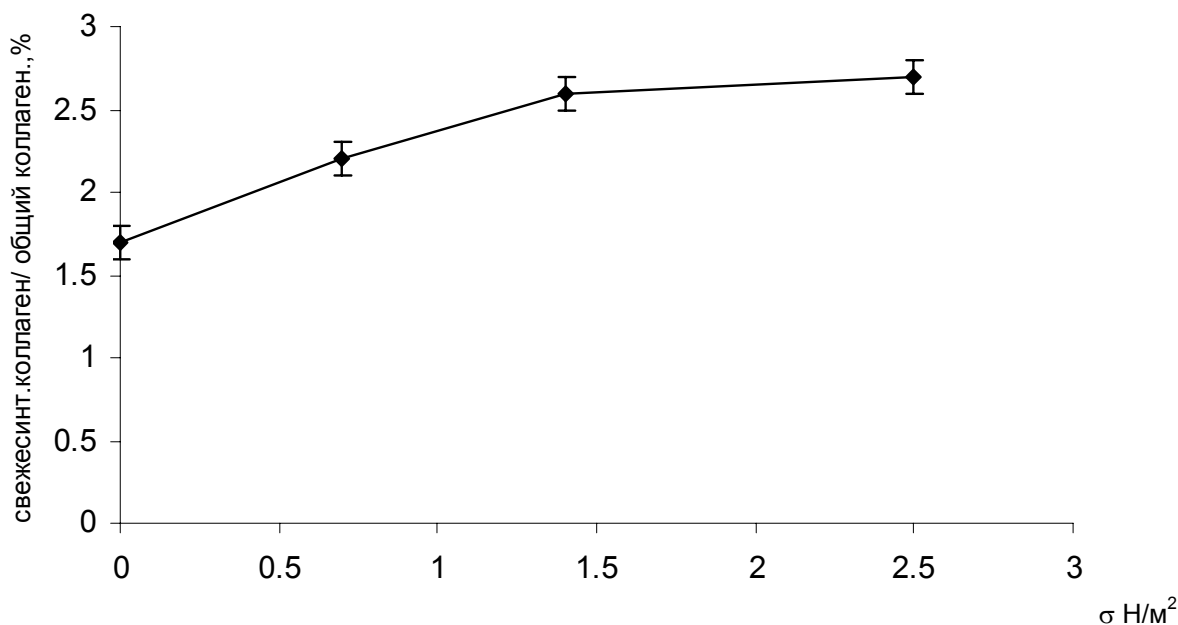


Рис. 4. Влияние механического напряжения на степень растворимости коллагена кожи крыс 3-месячного возраста после инкубации *in vitro*

Увеличение растворимости коллагена определенно указывает на уменьшение степени межмолекулярного поперечного ковалентного связывания.

Выводы

Результаты проведенных исследований позволяют говорить о том, что механическое напряжение приводит к нарушению согласованности между интенсивностями собственно синтеза коллагена и ферментативными модификациями его структуры, структурная стабильность которой также претерпевает определенные изменения. Причина данного явления в настоящее время не известна. Однако мы можем предположить, что при действии механического напряжения на ткань либо синтезируется недостаточное количество ферментов, катализирующих ковалентные модификации в молекуле коллагена, либо данные ферменты синтезируются в необходимом количестве, но они претерпевают какие-либо изменения и не могут полноценно катализировать эти реакции.

Список литературы

- Дубинина Е.Е. Окислительная модификация белков плазмы крови больных с психиатрическими расстройствами // Вопросы медицинской химии. - 2000. - №4. - С. 36-47.
- Замараева Т.В. Определение ¹⁴C-оксипролина как метод для изучения синтеза коллагена в модельных системах // Совр. методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – С. 265-270.
- Иванов Ю.И., Погорелюк О.Н. Статистическая обработка результатов медико-биологических исследований на микрокалькуляторах по программам. – М.: Медицина, 1990. – 224с.
- Кузьмис А.Э., Гарбузенко О.Б., Перский Е.Э. и др. Молекулярные механизмы формирования вязкоупругих свойств соединительной ткани под действием внешнего механического напряжения // Вісн. Харк. ун-ту. - №466. – Сер. Біофізичний вісник. – 1999. – Вип.5. – С. 99-102.
- Berg R.A., Prochop D.J. The thermal transition of a nonhydroxylated form of collagen. Evidence for a role for hydroxyproline in stabilizing the triple helix of collagen // Biochem. Biophys. Res. Com. - 1973. – Vol.52, №1. – P. 115-120.

- Bishop J.E., Butt R.P., Laurent G.J. The effect of mechanical force on arterial fibroblasts function // Mol. Biol. Cell. – 1993. – Vol.4. – P. 21-25.
- Cardinale G.J., Udenfriend S. Prolyl hydroxylase // Adv. Enzymol. – 1974. – Vol.47. – P. 245-300.
- Kolpakov V. Effect of mechanical forces on growth and matrix protein synthesis in vitro pulmonary artery. Analysis of role of individual cell types // Circ. Res. – 1995. – Vol.77. – P. 823-831.
- Martens M., Hendriks T. Collagen synthesis in explants from rat intestine // Biochem. Biophys. Acta., Gen. Subj. – 1989. – Vol.993, № 2-3. – P. 250-252.
- Miller E.I., Rhodes R.K. Preparation and characterization of different types of collagen // Meth. Enzymol. – 1982. – Vol.82. – P. 33-34.
- Stegemann H., Stalder K. Determination of hydroxyproline // Clin. Chem. Acta. – 1967. – Vol.18, №2. – P. 267-273.
- Yasuda T., Kondo., Homma T. et al. Regulation of extracellular matrix by mechanical stress in rat glomerular mesangial cells // J. Clin. Invest. – 1996. – Vol.98. – P. 1991-2000.
- Yutani Y., Ohashi H., Kubo T. et al. Effects of mechanical stress on expression of differentiated phenotypes of chondrocytes // Osaka City Med. J. – 2000. – Vol.46, №1. – P. 23-29.
- Zohen S., Gross J. Biosynthesis and metabolism of collagen and its role in tissue repair processes // Isr. J. Med. Sci. – Vol.27, №5. – P. 537 – 561.

ПРО ДЕЯКІ ЗМІНИ СТРУКТУРИ КОЛАГЕНУ ДІЮ МЕХАНІЧНОЇ НАПРУГИ

Т.В.Жукова

Вивчений вплив розтягуючого механічного напруження на індукцію синтезу, ступінь поперечного зв'язування і ступінь гідроксилювання, глікозування колагену типу I в шкірі 3-місячних щурів лінії Вістар *in vitro*. Показано, що під дією навантаження відношення $^3\text{H-Опро}/(^3\text{H-Про} + ^3\text{H-Опро})$ в колагені зменшується. Збільшується ступінь розчинності колагену і зміст вільних альдегідних груп. Ступінь неферментативного глікозування знижується. Це приводить до зміни структури і властивостей молекул колагену.

Ключові слова: *колаген, механічне напруження, синтез, ковалентні модифікації, гідроксилювання, глікозування, ступінь поперечного зв'язування.*

INFLUENCE OF MECHANICAL STRESS – STRAINE ON SAME STRUCURAL PROPERTIESE OF COLLAGENE'S MOLECULE

T.V.Zhukova

The effect of tensile stress on collagen type I synthesis induction and the levels hydroxylating, cross-linkaging, glycosylating of the skin and collagen in 3-month rats of Vistar line *in vitro* has been investigated. It was shown that tension $^3\text{H-Hpro}/(^3\text{H-Pro} + ^3\text{H-Hpro})$ relation in collagen was decreased. Also the levels hydroxylating and the contents of loose aldehydic groups have been increased. The degree of nonenzyming glycosylation is decreasing. This leads to changes in structure and properties of collagen molecules.

Key words: *collagen, tensile stress, synthesis, covalent modifications, hydroxylation, glycosylation, cross-linking.*

Представлено Ф.С.Леонтієвою
Рекомендовано до друку П.А.Каліманом