

УДК: 577.12.577.112:577.2

Изменения полисахаридного состава кожи крыс под действием механического напряжения
Ю.Г.Кот

Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)

Исследовано влияние механического напряжения, приложенного к образцам кожи крыс, на общее содержание гликозаминогликанов и их количество, связанное с коллагеном I типа. Разделение гликозаминогликанов проведено методом ионообменной хроматографии. Показано, что при нагрузках, сопоставимых с физиологическими, наблюдается накопление суммы гликозаминогликанов, коррелирующее с ростом нагрузки. При этом вклады отдельных гликозаминогликанов в суммарное их содержание перераспределяются: доля сульфатированных полисахаридов снижается, в то время как доля гиалуроновой кислоты возрастает. Количество гликозаминогликанов, связанных с коллагеном, падает с ростом приложенного напряжения. Таким образом, механическое напряжение вызывает не только количественные, но и качественные изменения в составе углеводных и белково-полисахаридных компонентов соединительнотканного матрикса.

Ключевые слова: *соединительная ткань, механическое напряжение, гликозаминогликаны, гиалуроновая кислота, хондроитин-4-сульфат, хондроитин-6-сульфат, дерматан-сульфат.*

Введение

Важным фактором в формировании и развитии тканевых структур является непрерывное взаимодействие коллагена с гликозаминогликанами и их протеогликанами, которые влияют на тип и свойства формирующихся надмолекулярных коллагеновых структур, образуют с ними комплексы и, таким образом, во многом определяют физико-химические свойства коллагенсодержащих тканей. В последние годы обнаружено, что деформация фибробластов (как в ткани, так и в культуре) под действием механического напряжения вызывает индукцию синтеза коллагена и неколлагеновых белков, в частности эластина (Sundberg, Rubin, 1996; Гарбузенко и др., 1997; Перский и др., 2006). Естественно, что, являясь важнейшими структурными и функциональными компонентами межклеточного матрикса, гликозаминогликаны должны участвовать в ответной реакции соединительнотканых структур на действие механической нагрузки. В настоящее время нет данных, отражающих характер изменений этих компонентов матрикса соединительной ткани в ответ на ее механическую деформацию.

В представленной работе *in vitro* изучено изменение как общего содержания основных гликозаминогликанов кожи – гиалуроновой кислоты, хондроитин-4-сульфата и хондроитин-6-сульфата, а также дерматан-сульфата, так и их количества, связанного с ее надмолекулярными коллагеновыми образованиями.

Материалы и методы

Исследования были проведены на беспородных крысах-самцах массой 200–230 грамм. Крыс усыпляли введением тиопентала натрия (Greene, 2002), после чего декапитировали.

Из кожи спины, предварительно очищенной от шерсти и подкожно-жирового слоя, вырезали с помощью штампа образцы размером 50×20 мм и массой около 800 мг 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 (1,0; 1,2; 1,5)×10⁵ Н/м². После инкубации образцы промывали раствором Рингера-Кребса, не содержащим глюкозы, и последовательно обезжиривали сначала ацетоном (24 часа), а затем диэтиловым эфиром (24 часа). Обезжиренные и высушенные образцы кожи взвешивали и далее измельчали в жидком азоте до порошкообразного состояния.

Для выделения общих гликозаминогликанов кожи часть измельченных образцов подвергали ферментативному гидролизу. Высушенный порошок кожи инкубировали с папаином (из *Carica papaya*, Merck) в натрий-ацетатном буфере (pH 6,5), содержащем 2 мМ L-цистеина и 2 мМ ЭДТА, в течение 24 часов при 65°C (Косягин, Карякина, 1991; Kvist et al., 2006). Затем пробы охлаждали при комнатной температуре до 40°C, добавляли равный объем натрий-фосфатного

буфера (рН 7,4), що містить 1 мМ CaCl_2 , 0,33 мМ MgCl_2 , і доводили рН інкубаційної середою до 7,4 (Nagai et al., 2004). Далі в кожну пробу вносили колагеназу (з *Clostridium histolyticum*, тип I, Sigma-Aldrich) і проводили інкубацію в течение 24 годин при 40°C. Інкубацію з папаїном і колагеназою проводили при постійному перемішуванні.

Для визначення вмісту колагензв'язаних глікозаміногліканів колаген I типу екстрагували з отриманого порошку шкіри 1М NaCl (Гарбузенко і др., 1997; Verzijl et al., 2000) при постійному перемішуванні в течение 72 годин при 4°C. О кількості колагену в екстрактах судили по вмісту в них оксипроліну, який визначали методом (Утевська, Перський, 1982). По закінченні екстракції вихідний в розчин колаген осаджали ацетоном, охолодженим до 4°C, відділяли центрифугуванням (4500g) і піддавали ферментативному гідролізу, як описано вище.

Після закінчення ферментативної обробки низкомолекулярні пептиди осаджали охолодженою до 4°C 6%-ою ТХУ. Осадок відділяли центрифугуванням (4500g) і відкидали, а надосадочну рідину використовували для подальшого виділення глікозаміногліканів.

Глікозаміноглікани осаджали додаванням до супернатанту (1:10) 2%-ою хлористого цетилпіридинію (Merck). Осадок глікозаміногліканів відділяли центрифугуванням (4500g) і тричі промивали охолодженим до 4°C 95%-м етанолом, насиченим NaCl . Промитий осадок суспендували в 3 мл 10%-ою розчину ацетату натрію, доводили рН до 5,0 і додавали 5 мл 95%-ою етанолу і зберігали 24 години при 4°C, після чого центрифугували (4500g). К висушеному при кімнатній температурі осадку глікозаміногліканів додавали 2 мл дистилльованою водою, ретельно перемішували, і суміш фракціонували (Меркур'єва, Гусева, 1974; Masson et al., 1995).

Фракціонування виділених глікозаміногліканів проводили методом іонообмінної хроматографії на термостатизованій колонці розміром 0,9×50 см, заповненій іонообмінною смолою Dowex 1×2 (Cl⁻-форма, 200–400 мш, Sigma), урівноваженою 0,2 М NaCl (Gillard et al., 1977; Меркур'єва, Гусева, 1974) при температурі 28°C. Швидкість потоку становила 1мл/хв. Елюцію проводили з використанням ступінчастого градієнту концентрації NaCl . Гіалуронову кислоту елюювали 0,5 М NaCl , хондроїтин-4-сульфат і хондроїтин-6-сульфат – 1,5 М NaCl , дерматан-сульфат – 2,0 М NaCl . Кожну фракцію глікозаміногліканів елюювали 10 мл розчину NaCl відповідної концентрації. Елюат збирали порціями по 2 мл в кожній пробі. В попередніх експериментах з використанням стандартних зразків глікозаміногліканів (Sigma-Aldrich) було показано, що в таких умовах елюції вихід глікозаміногліканів з колонки становив 87–100 %.

О вмісті гіалуронової кислоти і хондроїтинсульфатів судили по вмісту D-глюкуронової кислоти, визначеною в аліквотах з допомогою карбазолової реакції. О вмісті дерматансульфату судили по вмісту L-ідурунової кислоти, визначеною в аліквотах з допомогою орцинового методу (Слуцкий, 1969).

Результати і обговорення

Проведені дослідження показали, що розтягнення шкіри призводить до збільшенню вмісту в ній всіх трьох основних глікозаміногліканів. Як видно з рис. 1, максимум прироста загальної концентрації дерматан-сульфату і суммарної фракції хондроїтин-4- і хондроїтин-6-сульфатів в шкірі (по порівнянню з контрольною групою) спостерігається при механічному напруженні $1,0 \times 10^5$ Н/м² і становить 253,7% і 69,8% відповідно. Максимальний приріст загального вмісту гіалуронової кислоти в досліджуваній тканині виявлено при напруженні $1,2 \times 10^5$ Н/м² і становить 272,8%. При діянні навантажень більше $1,2 \times 10^5$ Н/м² загальний вміст всіх досліджуваних глікозаміногліканів різко зменшується.

При цьому, при напруженні $1,5 \times 10^5$ Н/м², вміст сульфатованих глікозаміногліканів незначительно зростає (по порівнянню з механічною навантаженням $1,2 \times 10^5$ Н/м²), в той час як вміст гіалуронової кислоти продовжує зменшуватися.

Як видно, характер змін вмісту окремих фракцій глікозаміногліканів при діянні механічного напруження різний. Так, для гіалуронової кислоти максимум її вмісту в шкірі зміщений в область більш високих напружень, при яких спостерігається мінімальна концентрація сульфатованих полісахаридів. Відомо, що сульфатовані глікозаміноглікани беруть участь в стабілізації надмолекулярних утворень колагену (Nimni, 1983). Значительне зменшення їх вмісту призводить до зниженню структурної стабільності цих утворень і робить їх більш доступними для протеолітичних ферментів з'єднувального матриксу. В зв'язі з цим, виявлене збільшення вмісту гіалуронової кислоти на фоні різкого зменшення вмісту серосодержачих глікозаміногліканів є, можливо, компенсаторним механізмом, в

котором гиалуроновая кислота выполняет экранирующую функцию, препятствуя ферментативному расщеплению коллагеновых фибрилл. Сходная картина различных изменений в ответ на механическое напряжение была обнаружена и для белковых компонентов межклеточного матрикса – коллагена и эластина (Жукова и др., 2006). По-видимому, это явление свидетельствует о том, что в ответ на механическое напряжение кожи системы синтеза различных компонентов соединительнотканного матрикса отвечают с разной интенсивностью.

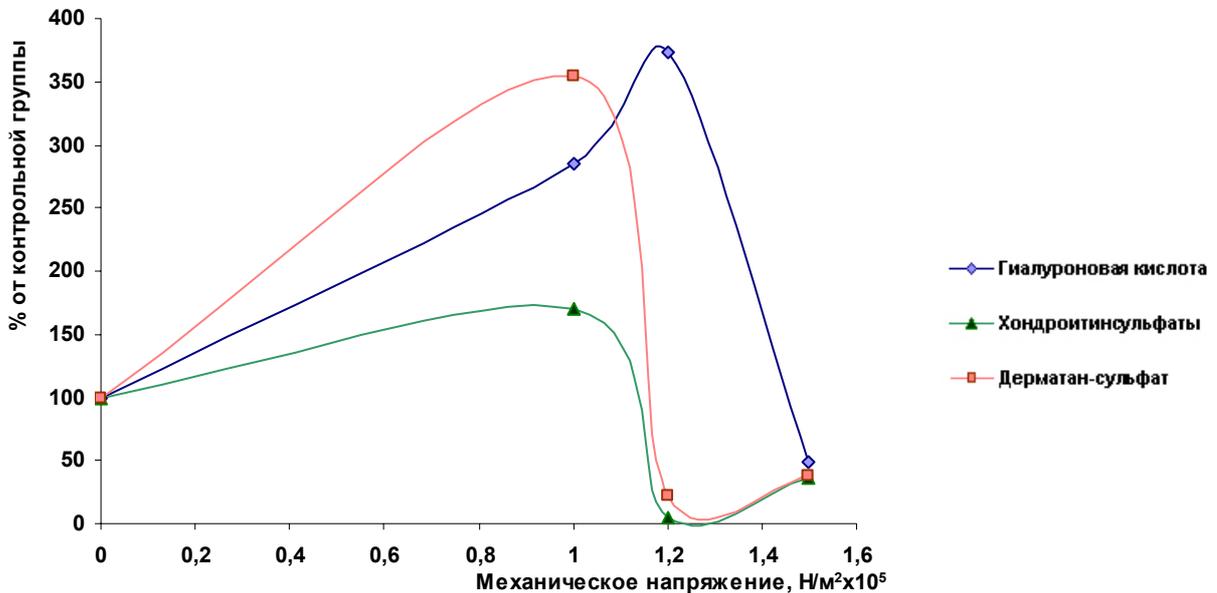


Рис. 1. Изменение суммарного содержания гиалуроновой кислоты, хондроитинсульфатов и дерматан-сульфата в коже 3-месячных крыс под действием механического напряжения

Полученные результаты определенно указывают на то, что под действием механического напряжения в коже происходит изменение содержания сульфатированных гликозаминогликанов, причем эти изменения носят как количественный, так и качественный характер.

Расчет изменения удельного содержания изученных гликанов показал (рис. 2), что под действием механического напряжения происходит изменение соотношения содержания гиалуроновой кислоты, хондроитинсульфатов и дерматан-сульфата. Это указывает на определенные перестройки в составе соединительнотканного матрикса, направленные, по-видимому, на адаптацию соединительной ткани к действию механического напряжения.

Рис. 3 иллюстрирует влияние механического напряжения на содержание фракций гликозаминогликанов, связанных с надмолекулярными коллагеновыми образованиями кожи.

Видно, что под действием напряжения происходит резкое снижение содержания всех фракций коллагенсвязанных гликозаминогликанов, причем в области нагрузок, соответствующих максимальному снижению их содержания ($1,2 \times 10^5$ Н/м²), дерматан-сульфат отсутствует полностью. Наблюдается тенденция к увеличению количества сульфатированных полисахаридов при механическом напряжении $1,5 \times 10^5$ Н/м².

Такая картина коррелирует с обнаруженным Т.В.Жуковой (Жукова, 2005) изменением содержания гексоз, связанных О- и N-гликозидными связями с гидроксильными группами оксипролина и аминокетонами лизина молекул коллагена соответственно. Представленные данные свидетельствуют, по-видимому, о том, что надмолекулярные коллагеновые образования матрикса, образующиеся в коже при действии механической нагрузки, являются незрелыми.

Такая незрелость может быть следствием по крайней мере двух причин. Прежде всего, возможно, механическая нагрузка, деформируя фибробласты (их плазматические мембраны, экзо- и эндоскелет), снижает количество или активность ферментов модификации коллагена. С другой стороны, не исключено, что активный синтез самого субстрата данных ферментов – коллагена (Перский и др., 2006) опережает рост активности его модификаций. В результате быстро синтезирующийся коллаген оказывается недостаточно зрелым.

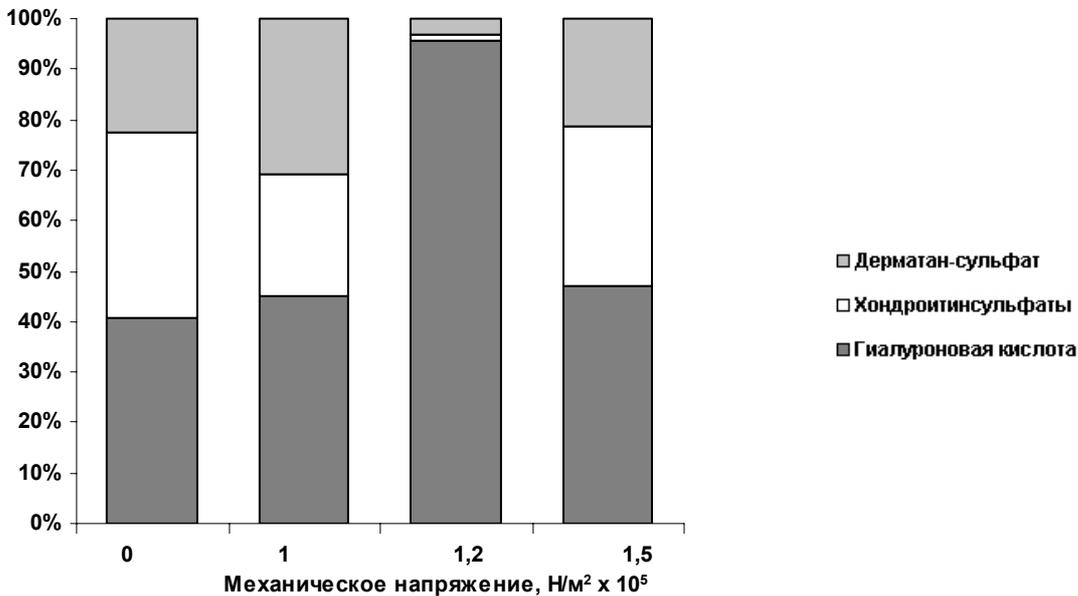


Рис. 2. Изменение удельного суммарного содержания гиалуроновой кислоты, хондроитинсульфатов и дерматан-сульфата в коже 3-месячных крыс под действием механического напряжения

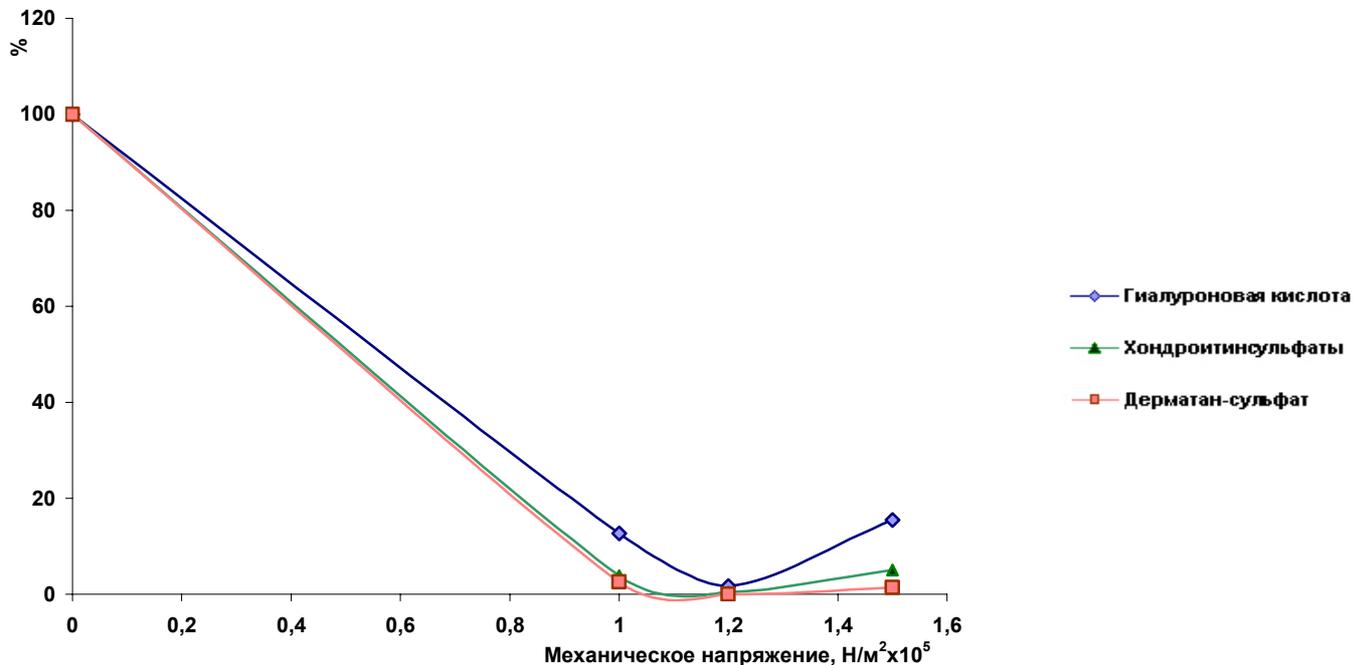


Рис. 3. Изменение суммарного содержания гиалуроновой кислоты, хондроитинсульфатов и дерматан-сульфата, связанных с коллагеном, в коже 3-месячных крыс под действием механического напряжения

Результаты данного и предшествовавших исследований позволяют предположить, что в ответ на сигнал о механическом напряжении системы синтеза отдельных компонентов

межклеточного матрикса, в том числе и гликозаминогликанов, отвечают по-разному. Полученные данные свидетельствуют о том, что деформация коллагенсинтезирующих клеток, возникающая при действии на кожу механического напряжения, вызывает снижение количества гликозаминогликанов, связанных с ее надмолекулярными коллагеновыми образованиями.

Список литературы

- 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.
- Жукова Т.В. Действие механического напряжения на некоторые структурные параметры молекулы коллагена // Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія: біологія. – 2005. – Вип. 1–2, №709. – С. 39–43.
- Жукова Т.В., Кот Ю.Г., Перский Е.Э. Возможный механизм участия механического напряжения стенок сосудов в возрастном развитии склероза // Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія: біологія. – 2006. – Вип.3, №729. – С. 21–24.
- Косьян Д.В., Карякина Е.В. Гликозаминогликаны тканей, формирующих элементы сустава // Украинский биохимический журнал. – 1991. – Т.63, №3. – С. 82–85.
- Меркурьева Р.В., Гусева М.Р. Сравнительная оценка методов определения гликозаминогликанов мочи // Лабораторное дело. – 1974. – №3. – С. 162–167.
- 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. – Т.10, №2. – С. 126–129.
- Слущкий Л.И. Биохимия нормальной и патологически измененной соединительной ткани. – Медицина, 1969. – С. 120–121.
- Утевская Л.А., Перский Е.Э. Простой метод определения суммарного и свободного оксипролина // Вестн. Харьк. ун-та. – 1982. – №226. – С. 18–20.
- Gillard G.C., Merrilees M.J., Bell-Booth P.G. et al. The proteoglycan content and the axial periodicity of collagen in tendon // Biochemistry Journal. – 1977. – Vol.163. – P. 145–151.
- Greene S.A. Veterinary anesthesia and pain management secrets. – Henlay&Belfus inc., 2002. – 266p.
- Kvist A.J., Johnson A.E., Matthias M. et al. Chondroitin sulfate perlecan enhances collagen fibril formation // The Journal of biological chemistry. – 2006. – Vol.281, №44. – P.33127.
- Masson P.J., Coup D., Millet J., Brown N.L. The effect of the –D-Xyloside naroparcil on circulating plasma glycosaminoglycans // The Journal of biological chemistry. – 1995. – Vol.270, №6. – P.2662.
- Nagai Nobuhiro, Yunoki Shunji, Saton Yasuharu et al. A method of cell-sheet preparation using collagenase digestion of salmon atelocollagen fibrillar gel // Journal of Bioscience and Bioengineering. – 2004. – Vol.98, №6. – P.493.
- Nimni M.E. Collagen: structure, function and metabolism in normal and fibrotic tissues // Seminars in Arthritis and Rheumatism. – 1983. – Vol.XIII, №1. – P. 48–51.
- Sundberg G., Rubin K. Stimulation of beta 1 integrins on fibroblasts induced PDGF independent tyrosine phosphorylation of PDGF beta receptors // J. Cell. Biol. – 1996. – Vol.12. – P. 1681–1692.
- Verzijl N., DeGroot J., Thorpe S.R. et al. Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products // The Journal of biological chemistry. – 2000. – Vol.275, №50. – P.39028.

Зміни полісахаридного складу шкіри щурів під дією механічного напруження Ю.Г.Кот

Методом іонообмінної хроматографії *in vitro* досліджено вплив механічного напруження на вміст глікозаминогликанів шкіри щурів. Досліджені зміни як загального вмісту глікозаминогликанів, так і їх кількості, яка зв'язана з надмолекулярними утвореннями колагену, під дією механічного напруження. Показано, що в області фізіологічних напруг спостерігається позитивна кореляція між загальним накопиченням глікозаминогликанів та величиною доданого напруження. На фоні цього відбувається перерозподіл питомого вмісту окремих глікозаминогликанів: доля гіалуронової кислоти постійно зростає, а сульфатованих полісахаридів – знижується. При цьому кількість усіх глікозаминогликанів, зв'язаних з колагеном, зменшується зі збільшенням напруження. Таким чином, виявлено, що у відповідь на механічний вплив відбуваються якісні зміни як будови білково-полісахаридних комплексів матриксу, так і складу основної речовини сполучної тканини.

Ключові слова: *сполучна тканина, механічне напруження, глікозаминогликани, гіалуронова кислота, хондроїтин-4-сульфат, хондроїтин-6-сульфат, дерматан-сульфат.*

**Changes in polysaccharide composition in rat's skin due to the action of mechanical strain
Yu.G.Kot**

In vitro by ion-exchange chromatography the effect of mechanical strain on the content of glycosaminoglycans in rats' skin was studied. Changes in both total concentration and content bound with sub-molecular collagen structures were studied. It was found out that positive correlation between total accumulation of glycosaminoglycans and degree of applied load existed in the region of physical strain. Due to this there was redistribution of specific concentrations of individual glycosaminoglycans: concentration of hyaluronic acid continuously rose, and that of sulphated polysaccharides decreased. At this time concentration of all collagen bound glycosaminoglycans decreased with rise in the level of straining. It was therefore found that quantitative changes in the structure of both matrix protein-polysaccharide complexes and composition of ground substance of the connective tissue took place in response to the action of mechanical strain.

Key words: *connective tissue, mechanical strain, glycosaminoglycans, hyaluronic acid, chondroitin-4-sulphate, chondroitin-6-sulfate, dermatan sulphate.*

**Представлено О.П.Білозоровим
Рекомендовано до друку Н.І.Буланкіною**