

••• БІОХІМІЯ ••• BIOCHEMISTRY •••

УДК: 577.12:577.112:577.114

**Зміни рівня гідратації колагену типу I та глікозаміногліканів, що синтезуються в шкірі щурів за дії механічного напруження
Ю.М.Близнюк², Т.В.Костіна¹, О.М.Пономаренко¹, Є.Е.Перський¹, М.О.Семенов²**

*Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна (Харків, Україна)¹,
Інститут радіофізики і електроніки імені А.Я.Усикова НАН України (Харків, Україна)²
a.n.ponomarenko@mail.ru*

In vitro вивчено вплив розтягуючого механічного напруження в шкірі щурів на ступінь гідратації колагену типу I та глікозаміногліканів, які в ній синтезуються. На основі виміряних ізотерм гідратації виявлено збільшення та зменшення величини сорбції води глікозаміногліканами і колагеном, відповідно. Розраховані кількості молекул води, які припадають, в середньому, на трипептид в колагені і дисахаридну одиницю в глікозаміногліканах у внутрішньому і зовнішньому шарах їх гідратних оболонок.

Ключові слова: *колаген, глікозаміноглікани, гідратація, механічне напруження.*

Изменение уровня гидратации коллагена типа I и гликозаминогликанов, которые синтезируются в коже крыс при действии механического напряжения

Ю.Н.Близнюк, Т.В.Костина, А.Н.Пономаренко, Е.Э.Перский, М.А.Семенов

In vitro изучено влияние растягивающего механического напряжения в коже крыс на степень гидратации коллагена типа I и гликозаминогликанов, которые в ней синтезируются. На основании измеренных изотерм гидратации обнаружено повышение и снижение величины сорбции воды гликозаминогликанами и коллагеном, соответственно. Рассчитаны количества молекул воды, приходящиеся в среднем на трипептид в коллагене и дисахаридную единицу в гликозаминогликанах во внутреннем и внешнем слоях их гидратных оболочек.

Ключевые слова: *коллаген, гликозаминогликаны, гидратация, механическое напряжение.*

Changes in the level of hydration of type I collagen and glycosaminoglycans, which are synthesized in the skin of rats under the influence of mechanical stress

Yu.N.Bliznyuk, T.V.Kostina, A.N.Ponomarenko, Ye.E.Perskiy, M.A.Semenov

The effect of mechanical load in the skin on hydration degree of collagen and glycosaminoglycans has been studied in vitro. The measured hydration isotherms have shown that that mechanical load in the rat skin increases the values of glycosaminoglycans sorption and decreases collagen sorption. The average numbers of water molecules associated with one collagen tripeptide and glycosaminoglycans disaccharide unit have been calculated.

Key words: *collagen, glycosaminoglycans, hydration, mechanical load.*

Вступ

Механічне напруження в сполучній тканині являє собою постійно діючий фактор, перебіг якого викликає перебудову матриксу і зміну структурних властивостей біополімерів, які входять до його складу. Ці структурні зміни розглядають, зазвичай, як адаптацію до зміни механічного напруження, яка виникла в тканині. Важливою особливістю біополімерів є рівень і характер гідратації, який значною мірою визначає їх структурну стабільність (Перський і др., 2006; Жукова і др., 2009; Jin et al., 2001). На цей час, однак, невідомо, чи змінюються за дії механічного навантаження сполучної тканини гідратні

властивості основних конструкційних біополімерів – колагену і глікозаміногліканів (ГАГ), які входять до складу надмолекулярних комплексів міжклітинного матриксу.

У зв'язку зі сказаним, в роботі шляхом вимірювання ізотерм гідратації вивчено вплив розтягування шкіри під дією зовнішнього механічного навантаження на ступінь гідратації і розподіл молекул води в колагені типу I і ГАГ *in vitro*.

Матеріали і методи дослідження

Дослідження проведені на очищеній від вовни і підшкірно-жирового шару шкіри спини 3-місячних щурів-самців лінії Wistar (маса тварин 200–250 г).

Для одержання свіжесинтезованих колагену типу I та ГАГ зразки шкіри масою 700 мг інкубували в розчині Рінгера-Кребса протягом 6 годин на установці, яка описана в (Перський та ін., 2008) у відсутності та при дії статичного розтягуючого напруження $\sigma=0,025; 0,05$ і $0,15$ МН/м².

Проінкубовані зразки знежирювали в ацетоні на протязі 48 годин, висушували та розтирали в рідкому азоті до порошкоподібного стану.

Колаген типу I екстрагували з порошку розчином 1 М NaCl та діалізували проти фосфатного буферу рН=7,0 протягом 48 годин (Жукова и др., 2009).

Сумарні глікозаміноглікани (Σ ГАГ) – суміш гіалуронової кислоти, гепарансульфату, хондроїтин-4- і хондроїтин-6- сульфатів, дерматансульфату, кератансульфату – отримували після ферментативного гідролізу порошку папаїном в ацетатному буфері на протязі 24 годин при $T=65^{\circ}\text{C}$ та осадження їх з гідролізату хлористим цетилпіридинієм з наступним переосадженням в етиловому спирті (Tovar et al., 1998).

Ізотерми гідратації колагену типу I і Σ ГАГ при різних величинах відносної вологості (ВВ) були отримані на п'езографіметричній установці, що описана у (Большух и др., 1987), шляхом визначення залежності змін резонансної частоти кварцового резонатора Δf від маси біополімерів m , що були нанесені на поверхню кварцової пластини (Большух и др., 1987; Falk et al., 1962).

$$\Delta f = \frac{-f_0^2 \cdot \hat{E} \cdot m}{N \cdot q \cdot A} = Gf \cdot m, \quad (1)$$

де f_0 , q , A – резонансна частота, щільність та площа кварцу, відповідно; N , K – постійні кварцу. При невеликих величинах m і при $\Delta f/f_0 \ll 0,01$ формула (1) дає добру лінійну апроксимацію, котру можна використати для визначення m .

Рівномірні за товщиною плівки колагену і Σ ГАГ отримували шляхом випаровування води з розчинів цих біополімерів, нанесених в об'ємі 1 мкл на платинові контакти кварцового кристалу. Висушування зразків проводили в вакуумній камері при 20°C і тиску 10^{-3} Тор.

Зволоження плівок здійснювали шляхом дозованої подачі парів води в камеру із термостатованого балона з двічі дистильованою і дегазованою водою. Термостатування кварцових датчиків здійснювалося з точністю $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Похибка виміру частоти кварцових резонаторів складала не більше ± 1 Гц.

Отримані експериментальні ізотерми гідратації були апроксимовані за допомогою модифікованого у роботах (Semenov et al., 1988; Стариков и др., 1983) рівняння Д'арсі і Ватта (Gascoyne, Pethig, 1977), яке враховує гетерогенність адсорбенту – колагену типу I і суміші п'яти ГАГ з різним хімічним складом і молекулярними масами.

$$V_x = \frac{V_m \cdot a_1 \cdot x}{1 + a_1 \cdot x} + a_H \cdot x + \frac{bx}{1 - bx}, \quad (2)$$

де V_x – відносна вологість (ВВ); 1-ша складова у правій частині формули (2) описує стадію адсорбції молекул води за законом Ленгмюра; 2-га складова – адсорбцію молекул води за законом Генрі; 3-тя складова відповідає мультишаровій абсорбції, при якій повністю формується гідратна оболонка за рахунок слабо зв'язаних молекул води; V_m – ємність моношару; a_1 , a_H і b – активність води, відповідно, на стадіях адсорбції за законами Ленгмюра, Генрі та мультишарової абсорбції, котрі пропорціональні відповідним константам адсорбційної рівноваги (K_A , K_H , K_b).

Кількість молекул води, що відповідають лентинівській, генрієвській та мультишаровій адсорбції, розраховували по відношенню до середніх мас трипептиду Глі-Х-У для колагену і повторюваної дисахаридної одиниці (п.д.о.) для ΣГАГ відповідно.

Параметри рівняння (2) Vm , a_i , a_n і b в загальному випадку невідомі. Для вимірних експериментальних кривих гідратації вони визначалися шляхом підбору з використанням алгоритму оптимізації за методом деформованого багатогранника. Цільовою функцією в ньому служила відсутність зв'язку між експериментальною і розрахованою ізотермою (Борискина, 2007).

При апроксимації ізотерм гідратації використовували програму мінімізації функції багатьох перемінних. Середньоквадратичне відхилення розрахованих ізотерм гідратації від експериментальних складало не більше, ніж 0,05 г води на 1 г біополімерів обох типів.

Експериментальні криві, представлені на рисунках, є типовими для серії повторюваних дослідів (не менше трьох).

Для статистичної обробки результатів використовували критерії вірогідності Стьюдента та Манна-Уїтні. Вірогідними вважали результати з $p < 0,05$.

Результати та обговорення

Усереднені за всіма вимірними зразками ізотерми гідратації ΣГАГ та колагену типу I, що синтезувалися в шкірі щурів при різних механічних напруженнях, наведені на рис. 1. Як видно, і в молекулах колагену, і в молекулах ГАГ, які синтезуються в умовах дії механічної напруги, відбуваються зміни процесу гідратації в порівнянні з обома біополімерами, вилученими із тканини, що не піддавалась механічному напруженню.

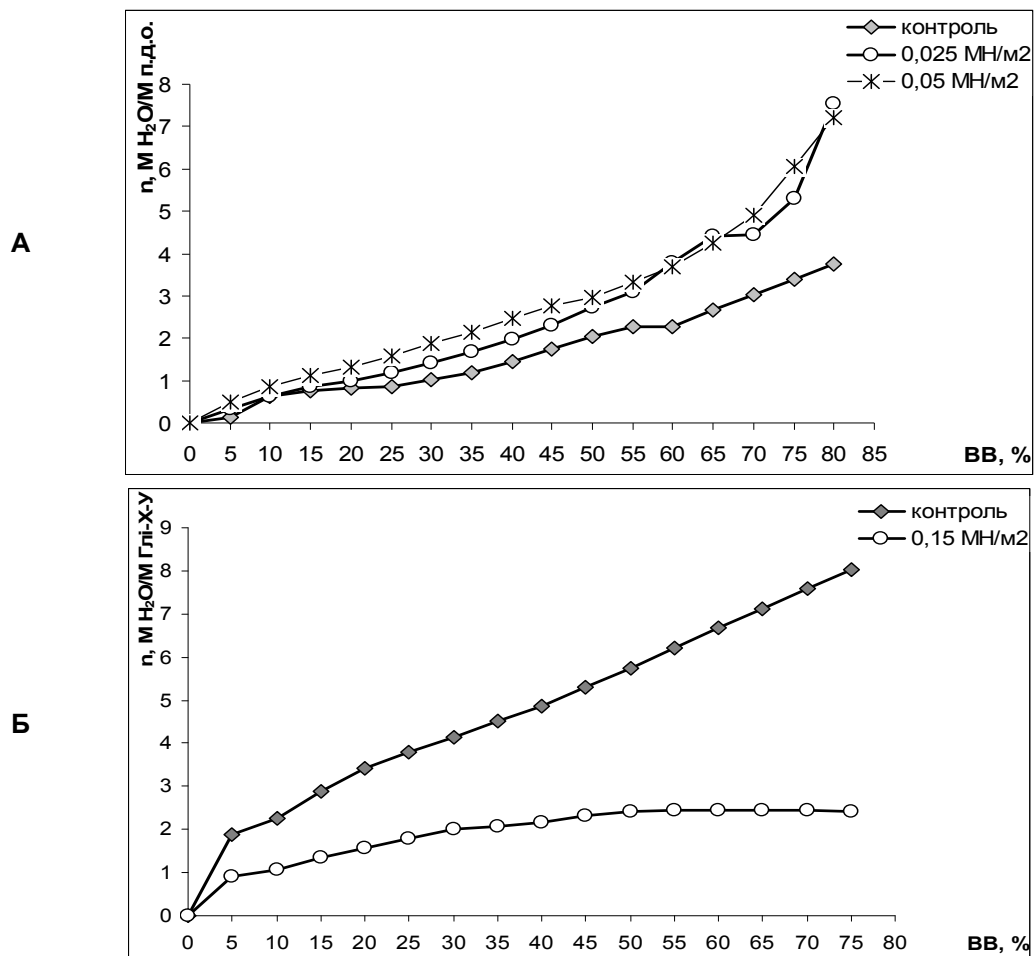


Рис. 1. Ізотерми гідратації ΣГАГ (А) та колагену типу I (Б), що синтезувалися в шкірі щурів при різних механічних напруженнях

Однак ці зміни різноспрямовані. За дії напруження загальний рівень гідратації в Σ ГАГ збільшується, а в колагені – зменшується.

Для обох біополімерів і при наявності, і при відсутності механічної напруги в шкірі, в певному діапазоні ВВ, спостерігається різке збільшення показника сорбції води. Для Σ ГАГ – це 60–80 %, а для колагену типу I – 5–10 %.

Це може свідчити про структурні переходи молекул, що супроводжуються активацією гідратації системи в цілому. На ізотермах гідратації зразків Σ ГАГ, що синтезувались при дії механічного напруження, структурний перехід настає при менших значеннях ВВ і має більший приріст показника в порівнянні зі зразками, що синтезувались без механічного впливу.

Насичення гідратної оболонки колагену, що синтезувався при відсутності механічного напруження, відбувається при 75% ВВ, а при дії напруження ця величина становить 40% ВВ на тлі зменшення адсорбційної ємності в 3,2 рази в порівнянні з контролем.

Для дослідження змін гідратації Σ ГАГ та колагену типу I в різних шарах під дією напруження за отриманими ізотермами гідратації були розраховані параметри рівняння Д'Арсі і Ватта (табл. 1).

З використанням розрахованих параметрів ізотерми гідратації для обох типів біополімерів були розкладені на криві, які відповідають ленгмюрівській, генріївській та мультишаровій адсорбції. Результати розкладання ізотерм для колагену типу I та Σ ГАГ наведені на рис. 2 і рис. 3 відповідно.

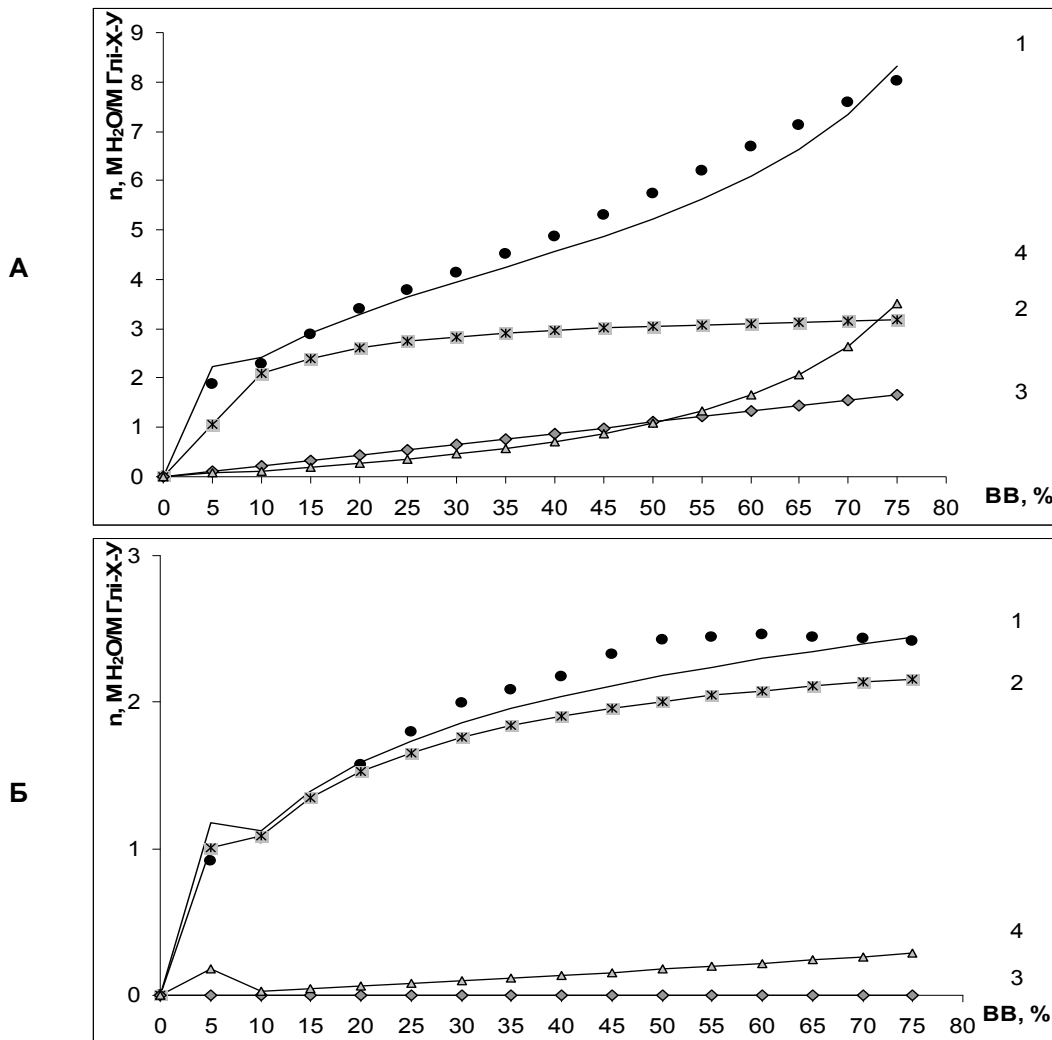


Рис. 2. Ізотерми гідратації (1) та їх розкладення на криві ленгмюрівської (2), генріївської (3) та мультишарової (4) адсорбції для колагену типу I, що синтезувався при механічному напруженні $\sigma=0 \text{ MN/m}^2$ (А), $\sigma=0,15 \text{ MN/m}^2$ (Б)

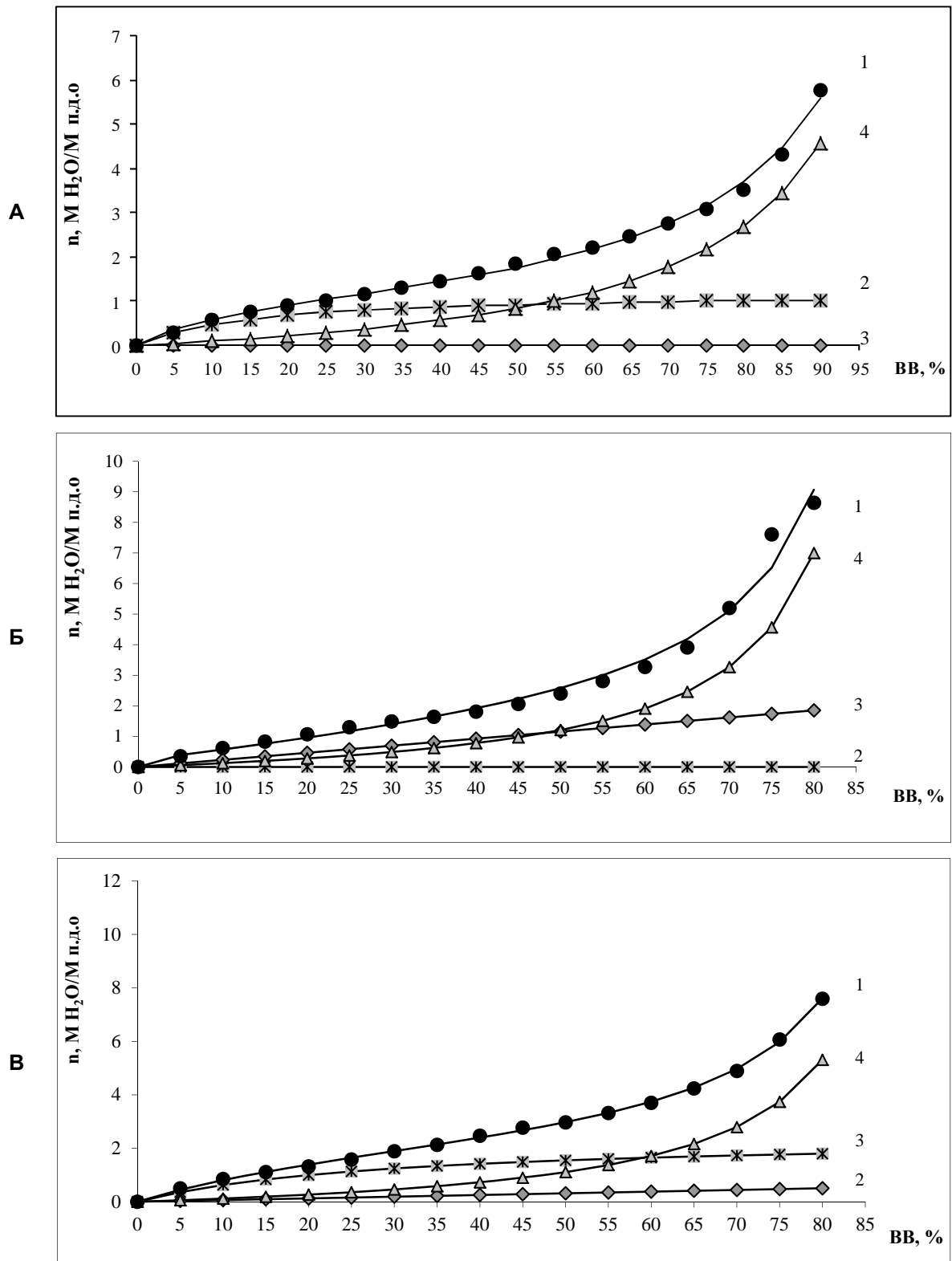


Рис. 3. Ізотерми гідратації (1) та їх розкладення на криві адсорбції за законами Ленгмюра (2), Генрі (3) та мультишарової адсорбції (4) для $\Sigma\text{ГАГ}$, що синтезувалися в шкірі при $\sigma=0 \text{ MN/m}^2$ (А), $\sigma=0,025 \text{ MN/m}^2$ (Б), $\sigma=0,05 \text{ MN/m}^2$ (В)

Таблиця 1.

Параметри рівняння Д'Арсі і Ватта для ΣГАГ та колагену типу I, що синтезувалися в шкірі щурів при наявності або відсутності механічної напруги

Біополімер	σ, МН/м ²	Тип адсорбції			
		ленгмюріївська		генріївська	мультишарова
		<i>V_m</i>	<i>a_l</i>	<i>a_n</i>	<i>b</i>
Σ ГАГ	0	1,33±0,05	5,35±0,07	0	0,90±0,05
	0,025	1,13±0,5	0	2,98±0,05*	1,08±0,05*
	0,05	2,45±0,05*	0	4,85±0,05*	0,94±0,05
Колаген типу I	0	3,45±0,5	15,21±0,1	2,20±0,05	1,04±0,05
	0,15	2,54±0,05*	7,50±0,07*	0,01±0,01*	0,30±0,01*

Примітка: * – вірогідно ($p < 0,05$) відносно контролю.

В табл. 2 наведені розраховані за даними ізотерм гідратації рис. 2 і рис. 3 кількості молекул води у внутрішньому та зовнішньому шарах гідратної оболонки трипептиду Глі-Х-У у колагені типу I і в повторюваній дисахаридній одиниці ΣГАГ відповідно, що синтезувалися в шкірі щурів при наявності або відсутності механічної напруги.

Таблиця 2.

Кількість молекул води у внутрішньому та зовнішньому шарах трипептиду Глі-Х-У у колагені типу I і в повторюваній дисахаридній одиниці ΣГАГ відповідно, що синтезувалися в шкірі щурів при наявності або відсутності механічної напруги

Біополімер	σ, МН/м ²	ВВ, %	Внутрішній шар	Зовнішній шар
ΣГАГ	0	90	1,1±0,10	4,17±0,15
	0,025	80	2,4±0,10*	6,3±0,20*
	0,05	80	4,36±0,15*	5,6±0,15*
Колаген типу I	0	75	4,83±0,15	3,50±0,10
	0,15	75	2,16±0,10*	0,29±0,05*

Примітка: * – вірогідно ($p < 0,05$) відносно контролю.

Як видно, під впливом напруги основний внесок у загальне збільшення адсорбованої води в ГАГ, у порівнянні з контролем, здійснює внутрішній гідратний шар. Можливо, деформація тканини під дією механічного напруження призводить до того, що молекули ГАГ, які синтезуються в цих умовах, мають менш впорядковані і більш розгорнуті конформації. Це і може бути однією з причин проникнення більшого числа молекул води у внутрішню частину молекул.

У випадку ж колагену, на тлі загального зниження гідратації, більший питомий вклад має зменшення кількості води в зовнішньому шарі. Очевидно, це пов'язане, перш за все, зі зниженням ступеня гідроксилування проліну в колагені, який синтезується в напруженій тканині (Gascoigne, Pethig, 1977; Борискина, 2007), оскільки ОН-групи гідроксипроліну, які утворюють з водою водневі зв'язки, розташовані зовні молекул колагену.

Вірогідно, отримані ефекти мають адаптивний характер, бо збільшення гідратації ГАГ в шкірі при дії механічного напруження має призводити до інтенсифікації обмінних процесів в міжклітинному матриксі і нівелювати зменшення гідратації колагену.

Висновки

Під впливом розтягуючого механічного напруження в шкірі щурів загальний ступінь гідратації синтезованих у ній ГАГ збільшується, а колагену типу I – зменшується. Ці ефекти в ГАГ відбуваються, в основному, за рахунок внутрішнього, а в колагені – зовнішнього шару адсорбованої води. Ці різноспрямовані зміни гідратації ГАГ і колагену певною мірою компенсують одна одну і є важливими для збереження постійних фізико-хімічних властивостей матриксу в умовах зміни перебігу механічних напружень в тканині.

Список літератури

- Большух Т.В., Семенов М.А., Малеев В.Я., Сечкин В.В. Использование метода кварцевого резонатора для получения изотерм гидратации полинуклеотидов // Препр. АН УССР. ИРЭ. – X., 1987. – 228. – 20с. /Bol'bukh T.V., Semenov M.A., Maleyev V.Ya., Sechkin V.V. Ispol'zovaniye metoda kvartsevogo rezonatora dlya polucheniya izoterm gidratatsii polinukleotidov // Prepr. AN USSR. IRE. – Kh., 1987. – 228. – 20s./
- Борискина Е.П. Энергии водородных связей, стабилизирующие конформацию гидратированных коллагеновых структур. Дисс. ... канд. физ.-мат. наук. – Харьков, 2007. – 146с. /Boriskina Ye.P. Energii vodorodnykh svyazey, stabiliziruyushchiye konformatsiyu gidratirovannykh kollagenovykh struktur. Diss. ... kand. fiz.-mat. nauk. – Khar'kov, 2007. – 146s./
- Жукова Т.В., Перский Е.Э., Большух Т.В., Семёнов М.А. Влияние деформации кожи на гидроксילирование пролина в синтезируемом коллагене типа I и его гидратацию // Доповіді НАН України. – 2009. – №5. – С. 191–194. /Zhukova T.V., Perskiy Ye.E., Bol'bukh T.V., Semenov M.A. Vliyanie deformatsii kozhi na gidroksilirovaniye prolina v sinteziruyemom kollagene tipa I i yego gidratatsiyu // Dopovidi NAN Ukrainy. – 2009. – №5. – S. 191–194./
- 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. /Perskiy Ye.E., Nikitina N.A., Naglov A.V., Kot Yu.G. Vozrastnyye osobennosti induktsii sinteza i intensivnosti nekotorykh stadiy protsessinga kollagena v soyedinitel'noy tkani pod deystviyem mekhanicheskoy nagruzki // Biologicheskii vestnik. – 2006. – T.10, №2. – S. 126–129./
- Перський Є.Є., Буланкіна Н.І., Гоєнага М.В. та ін. Розробка методу управління синтезом структурних біополімерів сполучної тканини для використання в хірургії і ортопедії. Звіт Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна про НДР. №12–08. – 2008. – 29с. /Pers'kiy Ye.E., Bulankina N.I., Goyenaga M.V. ta in. Rozrobka metodu upravlinnya syntezom strukturykh biopolimeriv spoluchnoi tkanyny dlya vykorystannya v khirurgii i ortopedii // Zvit Kharkivs'kogo natsional'nogo universytetu imeni V.N.Karazina pro NDR. № 12–08. – 2008. – 29s./
- Стариков Е.Б., Большух Т.В., Семёнов М.В. Изучение изотерм гидратации нуклеиновых кислот // Препр. АН УССР. ИРЭ. – X., 1983. – 359. – 20с. /Starikov Ye.B., Bol'bukh T.V., Semenov M.V. Izucheniye izoterm gidratatsii nukleinovykh kislot // Prepr. AN USSR. IRE. – Kh., 1983. – 359. – 20s./
- D'Arcy R.I., Watt J.C. Analysis of sorption isotherms of nonhomogeneous sorbents // Trans. Faraday Soc. – 1970. – Vol.66. – P. 1236–1245.
- Falk M., Hartman K.A., Lord R.C. Hydration of DNA: gravimetric study // J. Amer. Chem. Soc. – 1962. – Vol.4, №20. – P. 3843–3846.
- Gascoyne P.R.C., Pethig R. Experimental and theoretical aspects of hydration isotherms for biomolecules // J. Chem. Soc. Faraday Trans. – 1977. – Vol.1. – P. 171–180.
- Jin M., Frank E.H., Quinn T.M. et al. Tissue shear deformation stimulates proteoglycan and protein biosynthesis in bovine cartilage explants // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 2001. – Vol.395, №1. – P. 41–48.
- Semenov M.A., Starikov E.B., Bolbukh T.V. Hydration isotherms and structural state of nucleotides and polynucleotides // Studia biophysica. – 1988. – Vol.123. – P. 217–224.
- Tovar A.M.F., Cesar D.C.F., Leta G.C., Mourao P.A.S. Age-related changes in populations of aortic glycosaminoglycans: species with low affinity for plasma low-density lipoproteins, and not species with high affinity, are preferentially affected // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 1998. – Vol.18. – P. 604–614.

Представлено: О.П.Бєлзоров / Presented by: O.P.Belozorov

Рецензент: Н.І.Буланкіна / Reviewer: N.I.Bulankina

Подано до редакції / Received: 11.04.2012