

Т. В. Жукова, Е. Э. Перский, Т. В. Больбух, М. А. Семенов

Влияние деформации кожи на гидроксिलирование пролина в синтезируемом коллагене типа I и его гидратацию

(Представлено членом-корреспондентом НАН Украины С. О. Костериньым)

In vitro вивчено ступінь гідроксильовання проліну і гідратацію в колагені типу I, який синтезується в шкірі при її розтягненні. Виявлене зниження величини обох структурних компонентів свідчить про те, що деформація клітини може впливати на структурні характеристики білка, що синтезується в першу чергу за рахунок зміни рівня його процесингу.

Известно, что деформация клеток соединительной ткани приводит к индукции ими синтеза биополимеров соединительнотканного матрикса [1–3]. В то же время сведения о возможном влиянии деформации на процессинг, а следовательно, и структуру синтезирующихся биополимеров, в частности белков, в настоящее время отсутствуют.

Нами в условиях *in vitro* изучено влияние деформации соединительнотканых клеток, происходящей при растяжении кожи, на степень гидроксילирования пролина (Pro) в синтезируемом коллагене типа I и его гидратацию.

Материалы и методы исследования. Исследования проведены на очищенной от шерсти и подкожно-жирового слоя коже спины белых крыс-самцов массой 200–230 г. Свежесинтезированный коллаген типа I экстрагировали 1 М NaCl из кожи, которую инкубировали в среде Рингера-Кребса, в присутствии $^3\text{H-Pro}$ (“Amersham”) с радиоактивностью 0,4 МБк/мл в течение 6 ч при 37 °С в отсутствие напряжения и под действием статического напряжения 0,18 МН/м² и относительном растяжении 12 % [1]. О степени гидроксילирования Pro в коллагене судили по отношению величин радиоактивностей [$^3\text{H-Hypro}/(^3\text{H-Pro} + ^3\text{H-Hypro})$] · 100%, которые измеряли на счетчике Beckman LC 7800. Погрешность определения составляла ±5%.

Уровень сорбции воды коллагеном определяли по изотермам гидратации пленок, которые готовили из полученных растворов коллагена. Изотермы гидратации получали методом пьезографиметрического микровзвешивания [4] в диапазоне относительной влажности 0–95 % при 20 °С. Результаты выражали в моль H₂O/моль Gly-Pro-Hypro. Погрешность определения составляла ±0,1 моль H₂O/моль коллагена.

Степень гидроксילирования Pro и связывания воды с OH-группами Hypro контролировали также с помощью Раман-спектроскопии. Для отнесения конкретных полос рассеяния к этим группам проводили сравнение спектров Pro и Hypro в области 3403–3416 см⁻¹. О гидратации чистого Hypro и Hypro в составе коллагена судили по низкочастотному сдвигу валентных колебаний его OH-групп.

Спектры рассеяния растворов коллагена (концентрация 0,1–0,23%) и кристаллических Pro и Hypro получали на Раман-спектрографе DILOR Z-16. Источником света был аргонный лазер Innova-70 с $\lambda = 488$ нм. Для предотвращения разрушения образцов использовали

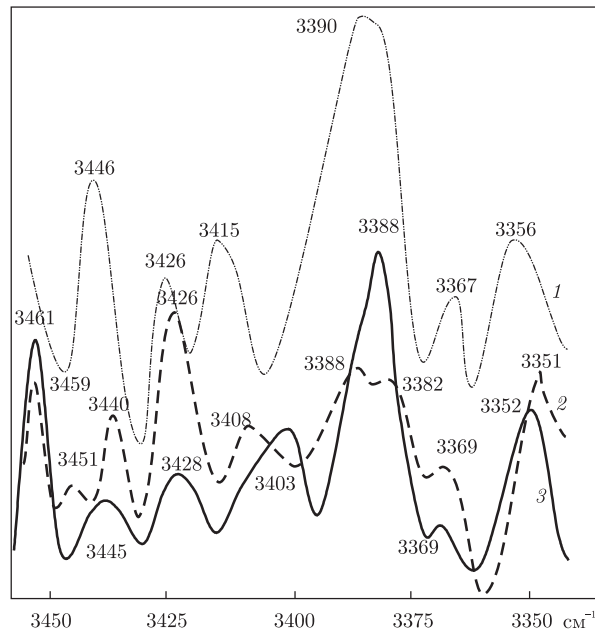


Рис. 1. Раман-спектры кристаллических сухого Pro (1), сухого Нурго (2) и увлажненного Нурго (3)

малую мощность лазера — до 30 мВт. Погрешность записи спектров по частоте составляла $\pm 2 \text{ см}^{-1}$.

Для подсчета интегральных интенсивностей полос рассеяния контуры соответствующих полос в Раман-спектрах коллагена разлагали на отдельные компоненты, форма которых описывалась линейной комбинацией функций Гаусса F_G и Лоренца F_L [5]. 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 исследования и их обсуждение. Для интерпретации в области колебаний ОН-групп Раман-спектров коллагена, синтезируемого в коже в отсутствие и при наличии напряжения, вначале были получены спектры кристаллических Pro и Нурго (содержание H_2O 6,3%), а также увлажненного Нурго, в котором содержание H_2O доведено до 17,1% (рис. 1). Как видно из рис. 1, полоса рассеяния 3415 см^{-1} , характерная для Pro, в случае Нурго испытывает низкочастотный сдвиг с появлением частоты колебания 3408 см^{-1} . При увлажнении Нурго происходит дальнейшее смещение этой полосы в низкочастотную область и возникает новая частота рассеяния 3403 см^{-1} . Поскольку Нурго отличается от Pro лишь наличием ОН-группы в последнем, а эта группа является важным центром связывания структурной воды [6], частоты 3408 и 3403 см^{-1} возникают, очевидно, в результате рассеяния негидратированными и гидратированными гидроксильными группами соответственно в пирролидиновом кольце Нурго.

Раман-спектры коллагена типа I, синтезированного в коже в отсутствие напряжения и при напряжении $0,18 \text{ МН/м}^2$, приведены на рис. 2. Как видно, в спектрах присутствуют все полосы рассеяния, характерные для Pro, Нурго и увлажненного Нурго (3415 , 3408 , 3403 см^{-1} соответственно). Небольшой сдвиг этих полос в низкочастотную область (до 3412 ,

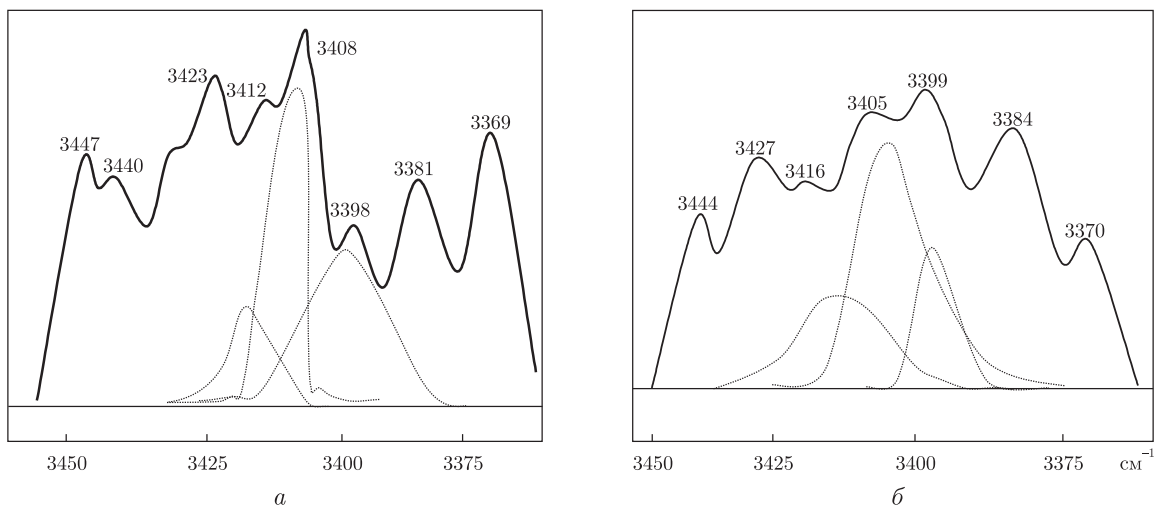


Рис. 2. Раман-спектры и их разложения для коллагена типа I, синтезированного в коже в отсутствие напряжения (а) и при напряжении 0,18 МН/м² (б)

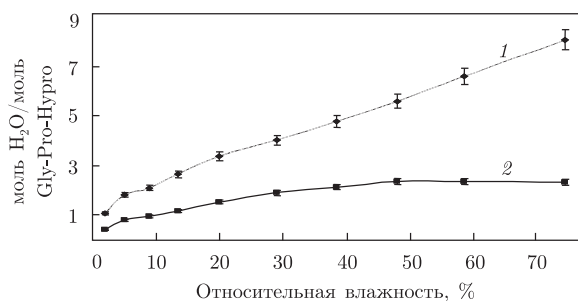


Рис. 3. Изотермы гидратации коллагена типа I, синтезированного в коже в отсутствие напряжения (1) и при напряжении 0,18 МН/м² (2) ($M \pm m$; $n = 8$)

3405, 3398–3399 см⁻¹) по сравнению со свободными иминокислотами определяется тем, что в трехцепочечных молекулах коллагена они связаны пептидными и межцепочечными связями, а также с молекулами воды.

Для относительной оценки удельного содержания гидратированных ОН-групп в Нурго коллагена, синтезирующегося в коже при напряжениях 0 и 0,18 МН/м², были рассчитаны отношения интегральных интенсивностей полос $[I_{3398 \text{ см}^{-1}} / I_{(3398+3407+3412) \text{ см}^{-1}}] \cdot 100\%$ и $[I_{3399 \text{ см}^{-1}} / I_{(3399+3405+3416) \text{ см}^{-1}}] \cdot 100\%$. Результаты расчетов, полученные на основании разложения этих полос на отдельные компоненты (см. рис. 2), а также данные измерений степени гидроксирования Pro радиоизотопным методом приведены в табл. 1.

Таблица 1. Степень гидроксирования Pro и относительная интенсивность полосы рассеяния гидратированной ОН-группы Нурго в коллагене, синтезируемом в коже в отсутствие напряжения и при напряжении 0, 18 МН/м² ($M \pm m$; $n = 8$)

Показатель	Напряжение, МН/м ²	
	0	0,18
Степень гидроксирования Pro, %	54,1 ± 2,2	45,7 ± 1,7
Относительная интегральная интенсивность полосы поглощения ОН-группы Нурго, %	42,7 ± 9,8	15,3 ± 5,6

Как известно, изменение интенсивности колебательных спектров ОН-групп в коллагене пропорционально количеству сорбированной воды [7]. Данные табл. 1 свидетельствуют о том, что механическое напряжение в ткани приводит к снижению как степени гидроксирования Pro, так и гидратации ОН-групп Нурго в синтезируемом коллагене. Этот эффект вносит вклад в общее снижение гидратации в коллагене, который синтезировался в коже под действием напряжения (рис. 3).

Таким образом, деформация клеток, возникающая при растяжении кожи, приводит к рассогласованию процессов собственно синтеза полипептидных цепей и одной из стадий их посттрансляционной модификации — гидроксирования Pro и, как результат, к изменению гидратации молекул коллагена.

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. биологии и медицины. – 1997. – № 25. – С. 13–18.
2. *Jin M., Frank E. H., Quinn T. M. et al.* Tissue Shear Deformation Stimulates Proteoglycan and Protein Biosynthesis in Bovine Cartilage Explants // Arch. Biochem. and Biophys. – 2001. – **395**, No 1. – P. 41–48.
3. *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. – **27**, No 8. – P. 1444–1451.
4. *Болбух Т. В., Семенов М. А., Малеев В. Я., Сечкин В. В.* Использование метода кварцевого резонатора для получения изотерм гидратации полинуклеотидов. – Харьков, 1983. – 20 с. – (Препр. / АН УССР. Институт радиофизики и электроники им. А. Я. Усикова; № 228).
5. *Eraser R. D. B., Suzuki E.* Resolution of overlapping bands: functions for simulating band shapes // Anal. Chem. – 1969. – **1**. – P. 37–39.
6. *Berisio R., Vitagliano L., Mazzarella L., Zagari A.* Crystal structure of a collagen-like polypeptide with repeating sequence Pro-Hyp-Gly at 1, 4 Å resolution: implications for collagen hydration // Biopolymers. – 2000/2001. – **56**, No 1. – P. 8–13.
7. *Leikin S., Parsegian V. A., Yang W.-H., Walrafen G. E.* Raman spectral evidence for hydration forces between collagen triple helices // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1997. – **9**. – P. 205–210.

Харьковский национальный университет
и.м. В. Н. Каразина
Институт радиофизики и электроники
и.м. А. Я. Усикова НАН Украины, Харьков

Поступило в редакцию 09.10.2008

T. V. Zhukova, Y. E. Persky, T. V. Bolbuch, M. A. Semenov

The influence of a skin deformation on type I synthesized collagen hydroxylation of praline and its hydration.

We studied in vitro the influence of a mechanical load in skin on the degree of hydroxylation of proline and hydration of hydroxyproline of the type I collagen synthesized on its tension. It is shown that a mechanical load in skin decreases the values of both structure components of collagen. This proves that a cell deformation may influence the protein structure by a change of the processing level.