

УДК: 577.12.577.112:577.2

О. М. Пономаренко, аспірантХарківський національний університет імені В. Н. Каразіна,
кафедра біохімії, пл. Свободи, 4, Харків, 61077, Україна,
e-mail: Apon08@mail.ru

ВПЛИВ ДЕФОРМАЦІЇ НА ВМІСТ ТА ЯКІСНИЙ СКЛАД ГЛІКОЗАМІНОГЛІКАНІВ В ПРОТЕОГЛІКАНАХ ШКІРИ ЩУРІВ

Вивчено вплив деформації шкіри при її механічному напруженні у дослідах *in vitro* на концентрацію і питомий вміст глікозаміногліканів, а також пов'язаних з ними нефібрилярних білків в шкірі 3-місячних щурів. Методом іонообмінної хроматографії показано, що механічне навантаження в діапазоні 0—0,24 МН/м² призводить спочатку до підвищення загальної інтенсивності синтезу глікозаміногліканів та до їх сумарного накопичення в шкірі з подальшим зменшенням обох показників. Так само змінюється і вміст нефібрилярних білків, пов'язаних з глікозаміногліканами. Під дією напруження фракційний склад глікозаміногліканів змінюється. При підвищенні напруги питома доля гіалуронової кислоти спочатку росте, після чого постійно зменшується. В той же час питомі долі сульфатованих глікозаміногліканів не змінюються вірогідно з ростом напруження. Це свідчить про те, що при деформації шкіри *in vitro* частина свіжосинтезованих сульфатованих глікозаміногліканів не входить до складу протеогліканових комплексів, що, ймовірно, може привести до структурних, а тим самим і до функціональних змін її властивостей.

Ключові слова: сполучна тканина, протеоглікани, глікозаміноглікани, синтез, корові білки.

В останні роки з'явилися численні свідчення того, що у фізіологічних умовах зміни механічного напруження в сполучній тканині є одним з факторів регуляції її будови і функціональних властивостей на протязі всього онтогенезу. В цьому зв'язку частково досліджені особливості синтезу, структури та властивостей головних конструкційних білкових компонентів — колагену і еластину — в різних видах сполучної тканини при дії механічного напруження [6].

Натомість, особливості механічного впливу на інтенсивність синтезу конструкційних полісахаридів сполучної тканини — глікозаміногліканів (далі ГАГ) та утворення протеогліканів в ній досі ще не вивчалися і є не розкритими.

Тому, метою роботи стало вивчення змін інтенсивності синтезу, вмісту і якісного складу ГАГ в протеогліканах сполучної тканини шкіри *in vitro*, що виникають під впливом деформації за дією механічного напруження.

Матеріал і методи дослідження

Дослідження були проведені *in vitro* на шкірі 3-місячних щурів-самців лінії Wistar. У дослідженнях виконували правила поводження з тваринами у відповідності з міжнародними принципами Європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментів та інших наукових цілей» [2] і норми біомедичної етики у відповідності з Законом України «Про захист від жорстокого поводження».

Щурів присипляли введенням тіопенталу натрію [9], після чого декапітували. Зразки шкіри (20×5) мм з довгою стороною вздовж спини очищали від підшкірно-жирового шару і волосяного покриву. Зразки інкубували у розчині Рінгера—Кребса протягом 6 годин при $t = 36\text{ }^{\circ}\text{C}$, розтягуючи їх у повздовжньому напрямку при статичних напруженнях (0—0,24) МН/м².

Для вивчення інтенсивності синтезу ГАГ в інкубаційний розчин добавляли ¹⁴С-глюкозу (Amersham) до кінцевої радіоактивності 0,5 МБк/г зразка. Проінкубовані зразки обезжирювали спочатку ацетоном (24 години), а потім діетиловим ефіром (24 години). Знежирені і висушені зразки шкіри зважували та розтирали в рідкому азоті до порошкоподібного стану.

Визначення радіоактивності ¹⁴С-глюкози, що увійшла до складу ГАГ, проводили у флаконах Бекмана в 10 мл толуольного сцинтилятора ЖС-8 і рахували на лічильнику Beckman LC-7800.

Для виділення глікозаміногліканів шкіри отримані з ¹⁴С-глюкозою (Amersham) порошки піддавали ферментативному гідролізу в натрій-фосфатному буфері (рН 7,4), який містив 1мМ CaCl₂, 0,33 мМ MgCl₂ і колагеназу (з *Clostridium histolyticum*, тип I, Sigma-Aldrich, 200 од./мл) на протязі 24 годин при 37 °С при постійному перемішуванні [13]. За цих умов колаген, присутній в шкірі, видалявся із зразків. Після закінчення ферментативної обробки, низькомолекулярні пептиди осаджували охолодженою до 4 °С 6 % трихлороцтовою кислотою (далі ТХО). Осад відділяли центрифугуванням (4500 г, 15 хв.) й відкидали, а супернатант використовували для подальшого виділення глікозаміногліканів. ГАГ осаджували додаванням до супернатанта 2 % хлористого цетилпіридинію (1:10) (Merck). Осадок глікозаміногліканів відділяли центрифугуванням (4500 г, 15 хв.) та тричі промивали охолодженим до 4 °С 95 % етанолом, насиченим NaCl. Промитий осад суспендували в 3 мл 10 % розчину ацетату натрію, добре перемішували та суміш фракціонували методом іонообмінної хроматографії на колонці розміром 0,9×50 см, яка була термостатована при температурі 28 °С, заповнена іонообмінною смолою Dowex 1×2 (Cl⁻-форма, 200-400 меш, Sigma) і забуферена 0,2М NaCl [4]. Швидкість потоку складала 1 мл/хв. Елюцію проводили з використанням ступінчастого градієнту концентрацій NaCl [4, 10]. В спеціальних експериментах з використанням стандартних зразків глікозаміногліканів (Sigma—Aldrich) було показано, що в таких умовах елюції вихід глікозаміногліканів з колонки складав 87—100 %.

Вміст гіалуронової кислоти, гепарансульфату та хондроїтинсульфатів визначали за вмістом D-глюкуронової кислоти, яку визначали в аліквотах за карбазоловою реакцією. Вміст дерматансульфату оцінювали за кількістю L-ідурунової кислоти, яку виміряли в аліквотах орциновим методом [5]. Кількість білкової складової протеогліканів, яка відображає наявність корових білків, оцінювали за тирозином [16, 3], який виміряли в зразках сумарних ГАГ. При статистичній обробці результатів використовували критерії вірогідності Стьюдента і Манна—Уїтні. Вірогідними вважали результати з $p < 0,05$.

Результати дослідження

В табл. 1 наведено дані про залежність інтенсивності включення ¹⁴С-глюкози в сумарні ГАГ шкіри 3-місячних щурів від величини механічного напруження в ній, які відображають його вплив на інтенсивність їх синтезу. Вони свідчать, що загальна інтенсивність синтезу ГАГ в шкірі при підвищенні напруги в діапазоні від 0 до 0,05 МН/м² спочатку збільшується, а потім, досягнувши максимуму, починає знижуватися. Аналогічні особливості впливу напруження, що зростає, на синтез колагену та еластину в шкірі було відмічено раніше [1, 6].

Збільшення інтенсивності синтезу ГАГ, як і конструкційних фібрилярних білків, знаходиться вірогідно в області фізіологічних навантажень, де можлива адаптивна клітинна відповідь на зовнішню напругу. Зниження ж цього показника відбувається в області напружень, де починається порушення тканинної будови, в зв'язку з чим синтетичні спроможності клітин в умовах експерименту вичерпуються.

Таблиця 1

Вплив механічного напруження на питому радіоактивність ^{14}C -глюкози в загальних ГАГ, синтезованих в шкірі 3-місячних щурів *in vitro*

| Напруження, МН/м ² | 0 | 0,05 | 0,12 | 0,18 | 0,24 |
|--|-----------------|-------------------|-------------------|------------------|-----------------|
| Радіоактивність, (імп/хв)/мг ГАГ $\times 10^3$ | 7,80 \pm 0,66 | 13,02 \pm 0,94* | 12,68 \pm 0,80* | 6,94 \pm 0,5** | 7,26 \pm 0,60 |

Примітка. В цій і наступній таблицях: * — вірогідно ($p < 0,05$) відносно контролю (напруження = 0); ** — вірогідно ($p < 0,05$) відносно попереднього значення показника; $n = 5-6$.

При дії механічного напруження в діапазоні 0—0,025 МН/м² паралельно інтенсифікації синтезу відбувається збільшення як кількості всіх типів ГАГ, так і їх загальної концентрації в шкірі. В діапазоні напруг, де інтенсивність синтезу знижується, концентрація кожного з окремих типів ГАГ і їх загальний вміст в шкірі теж зменшуються (табл. 2). Це явище може пояснюватися тим, що на початку росту напруження інтенсивність синтезу ГАГ значно перевищує інтенсивність їх фізіологічного розпаду, а після досягнення максимуму розпад починає перевищувати синтез.

Порівнювання даних табл. 2 і 3 показує, що максимуми показників включення радіоактивної мітки та загального вмісту ГАГ не співпадають. Це явище можна пояснити таким чином. Природно, що при дії механічного напруження повинна змінюватися інтенсивність не тільки синтезу ГАГ, а також і їх деградації. Отримані результати можуть свідчити про те, що максимум активності ферментів деградації ГАГ настає пізніше, ніж максимум їх синтезу. Внаслідок цього і спостерігається зниження їх концентрації вже до досягнення максимуму остатнього.

Таблиця 2

Вплив механічного напруження на вміст глікозаміногліканів в шкірі 3-місячних щурів *in vitro*, мг/г сирої тканини

| ТИП ГАГ | Напруження, МН/м ² | | | | |
|---------------------|-------------------------------|-----------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | 0 | 0,025 | 0,05 | 0,18 | 0,24 |
| Гіалуронова кислота | 5,0 \pm 0,37 | 7,7 \pm 0,56* | 3,5 \pm 0,29*** | 1,9 \pm 0,19*** | 1,7 \pm 0,18* |
| Гепарансульфат | 3,7 \pm 0,33 | 5,7 \pm 0,48* | 2,8 \pm 0,34*** | 2,7 \pm 0,30* | 3,12 \pm 0,36 |
| Хондроїтинсульфати | 5,3 \pm 0,55 | 7,2 \pm 0,69* | 5,1 \pm 0,37*** | 3,7 \pm 0,28*** | 3,4 \pm 0,31* |
| Дерматансульфат | 3,5 \pm 0,29 | 5,3 \pm 0,45* | 3,3 \pm 0,36*** | 4,0 \pm 0,43* | 2,4 \pm 0,27*** |
| Кератансульфат | 3,6 \pm 0,24 | 4,4 \pm 0,39* | 4,9 \pm 0,45* | 2,5 \pm 0,32*** | 1,2 \pm 0,15*** |
| Загальний вміст | 21,3 \pm 1,5 | 30,5 \pm 2,8 | 20,0 \pm 1,6 | 15,0 \pm 1,8 | 12,1 \pm 1,4 |

Відносні зміни вмісту окремих типів ГАГ (як їх збільшення, так і зменшення в шкірі) в залежності від величини механічного напруження відрізняють-

ся в усьому діапазоні напруг. Це свідчить про те, що якісний склад протеогліканів, що містять різні ГАГ, змінюється під впливом механічної напруги (див. табл. 2)

Для з'ясування цього питання за даними табл. 2 були розраховані питомі вмісти кожного з досліджуваних типів ГАГ відносно загальної їх кількості в залежності від величини механічного напруження в шкірі.

Отримані результати наведені в табл. 3. Як бачимо, залежність питомого вмісту гіалуронової кислоти в загальній кількості ГАГ від напруження відрізняється від таких залежностей для їх сульфатованих форм.

Таблиця 3

Вплив механічного напруження на концентрацію глікозаміногліканів в шкірі 3-місячних щурів *in vitro*, %

| ГАГ | Напруження, МН/м ² | | | | |
|---------------------|-------------------------------|------------|---------------|---------------|---------------|
| | 0 | 0,025 | 0,05 | 0,18 | 0,24 |
| Гіалуронова кислота | 23,75±2,88 | 25,56±2,97 | 18,34±1,75*** | 13,20±1,56*** | 14,47±1,61* |
| Гепарансульфат | 17,47±1,71 | 18,89±1,83 | 14,86±1,67*** | 18,48±1,81** | 25,73±2,97*** |
| Хондроїтинсульфати | 25,04±2,95 | 23,61±2,87 | 26,76±3,09 | 25,01±2,99 | 28,77±3,68 |
| Дерматансульфат | 16,56±1,68 | 17,47±1,72 | 17,36±1,72 | 26,89±3,00*** | 20,39±2,84*** |
| Кератансульфат | 17,2 ±1,89 | 14,47±1,36 | 25,76±2,80*** | 16,38±1,91** | 10,66±1,23*** |

З ростом напруження її питомий вміст зменшується майже в 2 рази, в той час як питомий вміст сульфатованих ГАГ або зовсім не змінюється (гепарансульфат, хондроїтинсульфати), або коливається відносно середніх значень (дерматансульфат, кератансульфат). Оскільки гіалуронова кислота є «стрижнем», до якого приєднуються в протеогліканах комплекси сульфатованих ГАГ, об'єднаних коровими білками, в зразках, що вміщали загальні ГАГ, була виміряна залежність кількості тирозину (табл. 4), який входить до амінокислотного складу ц и х білків [16].

Таблиця 4

Вплив механічного напруження на концентрацію тирозину в глікозаміноглікан-білкових комплексах шкіри 3-місячних щурів

| Напруження, МН/м ² | 0 | 0,05 | 0,12 | 0,18 | 0,24 |
|-------------------------------|-----------|------------|-------------|-----------|-----------|
| Тирозин, мг/г сирої тканини | 0,86±0,17 | 1,10±0,25* | 0,63±0,11** | 0,65±0,11 | 0,78±0,17 |

Згідно з ними залежність вмісту тирозину і, відповідно, корових білків від напруження якісно подібна такій для гіалуронової кислоти.

Зменшення питомої ваги гіалуронової кислоти та корових білків на фоні майже незмінних показників для сульфатованих ГАГ вказує на накопичення в міжклітинному просторі сполучної тканини вільних ГАГ. При цьому не створюються зрілі молекули протеогліканів.

Оскільки протеоглікани відповідають за створення трьохмірної міжклітинної сполучнотканинної сітки, зменшення кількості зрілих протеогліканових комплексів при накопиченні вільних сульфатованих ГАГ повинно призвести до збільшення внутрішнього діаметру «отворів» в міжклітинній сітці. Таке порушення її будови може бути причиною змін її специфічних властивостей, в першу чергу, рівня гідратації і функціонування як молекулярного сита.

Висновки

1. Загальна інтенсивність синтезу протеогліканів при дії механічного напруження у шкірі 3-місячних шурів у діапазоні 0—0,24 МН/м² спочатку зростає, досягає максимуму при 0,05 МН/м², після чого знижується.
2. Залежність концентрації гіалуронової кислоти, гепарансульфата, хондроїтинсульфатів, дерматансульфата та кератансульфата від механічного напруження мають той же характер, що і залежність загального синтезу ГАГ від напруги. Максимум концентрації для всіх типів ГАГ спостерігається при одній і тій же величині напруження 0,025 МН/м².
3. Питомі долі гіалуронової кислоти і сульфатованих ГАГ по-різному залежать від росту напруження. Питома доля гіалуронової кислоти при дії механічного напруження вірогідно знижується. Питомі долі сульфатованих ГАГ в діапазоні 0—0,05 МН/м² вірогідно не змінюється. Однак в проміжку 0,05—0,24 МН/м² питома доля гепарансульфата та дерматансульфата збільшується. Питома доля хондроїтинсульфатів вірогідно не змінюється.
4. Концентрація тирозину в діапазоні 0—0,24 МН/м² спочатку зростає, досягає максимуму при 0,05 МН/м², після чого знижується.
5. Під впливом механічного напруження питома доля протеогліканових комплексів в шкірі знижується, а питома доля ГАГ, які не входять до складу цих комплексів, збільшується.

Література

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. биол. и мед. — 1997. — № 25. — С. 19—26.
2. *Европейская конвенция «По защите позвоночных животных, которые используются для экспериментов и других научных целей»* [Электронный ресурс] // Совет Европы. — Протокол ETS no. 170. — Страсбург, 1998.
3. *Ермаков А. И., Арасимович В. В., Ярош П. Н.* Методы биохимического исследования растений. — Л.: Агропромиздат, 1987. — 430 с.
4. *Меркурьева З. В., Гусева М. Р.* Сравнительная оценка методов определения гликозаминогликанов // Лаб. дел. — 1974. — № 3. — С. 162—167.
5. *Слуцкий Л. И.* Биохимия нормальной и патологически измененной соединительной ткани. — Л.: Медицина, 1969. — 375 с.
6. *Перский Е. Э., Никитина Н. А., Наглов А. В., Ком 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.
7. *Al Jamal R., Roughley P. J., Ludwig M. S.* Effect of glycosaminoglycan degradation on lung tissue viscoelasticity // Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. — 2001. — Vol. 280. — P. 306—315.
8. *Gillard G. C., Merrilees M. J.* The proteoglycan content and the axial periodicity of collagen in tendon // Biochemistry Journal. — 1977. — V. 163. — P. 145—151.
9. *Greene S. A.* Veterinary anesthesia and pain management secrets // Henlay & Belfuc Inc. — 2002. — P. 99, 266.
10. *Hardingham T.* Chondroitin sulphate and joint disease // Osteoarthritis Cartilage. — 1998. — Vol. 6, suppl. A. — P. 3—5.
11. *Kelly G. S.* The role of glucosamine sulphate and chondroitin sulphate in the treatment of degenerative joint disease // Alt. Med. Rev. — 1998. — Vol. 3. — P. 27—39.
12. *Verziji 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. 39027—39031.

13. Nagai N. A., Yunoki S., Saton Y. et al. Method of cell-sheet preparation using collagenase digestion of salmon atelocollagen fibrillar gel // Journal of Bioscience and Bioengineering. — 2004. — Vol. 98, № 6. — P. 493.
14. Silver F. N., Harvarth I., Foran D. J. Viscoelasticity of the vessel wall: the role of collagen and elastic fibers // Crit. Rev. Biomed. Eng. — 2001. — Vol. 29, № 3. — P. 279—301.
15. Stephen A. G. Effects of drugs commonly used during anesthesia on autonomic nervous system // Veterinary Anesthesia and Pain Management Secrets. — 2002. — Philadelphia: Hanley and Belfus, Inc. — P. 51, 226.
16. Glant T. T., Mikecz K. Age-related changes in protein-related epitopes of human articular-cartilage proteoglycans // Biochem. J. — 1986. — Vol. 236. — P. 71—75.

А. Н. Пономаренко

Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина,
кафедра биохимии, пл. Свободы, 4, Харьков, 61077, Украина,
e-mail: Apon08@mail.ru

ВЛИЯНИЕ ДЕФОРМАЦИИ НА СОДЕРЖАНИЕ И КАЧЕСТВЕННЫЙ СОСТАВ ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВ В ПРОТЕОГЛИКАНАХ КОЖИ КРЫС

Резюме

Изучено влияние деформации кожи при ее механическом напряжении на концентрацию и удельный состав гликозаминогликанов, а также содержание связанных с ними нефибриллярными белками в коже 3-месячных крыс. Методом ионообменной хроматографии показано, что механическое напряжение в диапазоне 0—0,24 МН/м² приводит сначала к повышению общей интенсивности синтеза гликозаминогликанов и к их суммарному накоплению в коже с последующим уменьшением обоих показателей. Таким же образом изменяется и содержание нефибриллярных белков, связанных с гликозаминогликанами. Под действием напряжения фракционный состав гликозаминогликанов изменяется. При повышении напряжения удельная доля гиалуроновой кислоты сначала растет, после чего постоянно снижается. В то же время удельные доли сульфатированных гликозаминогликанов не изменяются достоверно с ростом напряжения. Это свидетельствует о том, что при деформации кожи *in vitro* часть свежесинтезированных сульфатированных гликозаминогликанов не входит в состав протеогликановых комплексов, что, по-видимому, должно вызвать структурные, а таким образом и функциональные изменения ее свойств.

Ключевые слова: соединительная ткань, протеогликаны, гликозаминогликаны, синтез, коровые белки.

A. N. Ponomarenko

Kharkiv National Karazin University,
Svoboda sq., 4, Kharkiv, 61077, Ukraine,
e-mail: apon08@mail.ru

THE EFFECT OF DEFORMATION ON THE CONTENT AND QUALITATIVE GLYCOSAMINOGLYCANS COMPOSITION IN PROTEOGLYCANS OF RAT SKIN

Summary

The effect of skin deformation under the influence of mechanical stress on the concentration and percent content of glycosaminoglycans, as well as non-fibrillar proteins linked with them, was studied in 3-months old rat skin. It was shown, through the method of ion-exchange chromatography, that mechanical stress within the range of 0—0,24 MN/m² first leads to an

increase in the intensity of total glycosaminoglycans synthesis and to their total accumulation in skin with their subsequent decrease in both parameters. In this way, the content of non-fibrillar proteins linked with glycosaminoglycans also changes. Under the effect of mechanical stress the fractional composition of glycosaminoglycan is changed. With increasing of mechanical stress, percent content of hyaluronic acid first rises, and then continuously decreases. At the same time, percent content of sulphated glycosaminoglycans does not change, perhaps with increasing of mechanical stress. This proves that, during deformation of the skin *in vitro*, some parts of freshly synthesized sulphated glycosaminoglycans are not included in the composition of proteoglycan complexes; this perhaps leads to the skin structural and thereby functional changes of it's properties.

Key words: connective tissue, proteoglycans, glycosaminoglycans, synthesis core proteins'.