РЕГУЛЯЦИЯ ФИБРИЛЛЯРНОЙ СТРУКТУРЫ КОЛЛАГЕНА ТЕМПЕРАТУРАМИ, БЛИЗКИМИ К ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ

Николаева Т. И., Кузнецова С. М., Рогачевский В. В.

Учреждение Российской Академии наук Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Учреждение Российской Академии наук Институт биофизики клетки РАН

Коллаген является структурным белком соединительных тканей. Фибриллярные коллагены типов I, II и III, выделенные из различных тканей, давно применяются в биологии и медицине. Использование коллагена как биоматериала определяется его способностью к самосборке в фибриллы и стабильностью фибрилл. Однако сформированные фибриллы имеют низкую плотность упаковки из-за слабой степени связывания молекул коллагена. Для более эффективного применения в медицинской практике крайне важно создавать из коллагена прочные матриксы, управляя процессом фибриллообразования. Целью данной работы является определение факторов, регулирующих плотность упаковки коллагеновых фибрилл in vitro и приводящих к образованию нанофибрилл. Температура играет существенную роль в формировании фибриллярной структуры коллагена. Конструирование фибрилл коллагена под влиянием температуры в условиях, близких к физиологическим, является продолжением проводимых нами исследований [1].

Для электронно-микроскопических исследований кусочки геля фиксировали в растворе, содержащем 2,5% глутарового альдегида и 3% параформальдегида на 0,1 М Na-какодилатном буфере в течение 2 час. Срезы получали на микротоме Leica EM UC6 алмазным ножом с полученных блоков высокой твердости и помещали на укрепленные углеродом пленки-подложки; контрастировали растворами уранилацетата и цитрата свинца и анализировали в микроскопе JEOL 1200EX при увеличении 15K. Измерения диаметра фибрилл проводили в центре их продольного сечения на отсканированных с разрешением 2400 dpi негативах, используя программу IGL Trace 1.26b.

Известно, что температурой регулируется кинетика образования фибрилл и морфология фибрилл [2]. Нами показано, что в области физиологических температур (T=36,5oC и 38,5oC) процесс фибриллогенеза коллагена ускоряется, а время формирования стабильной структуры фибрилл снижается по сравнению с температурой 32,5oC. С повышением температуры от 32,5oC до 38,5oC значения оптической плотности коллагенового геля в фазе плато уменьшаются от 1,34 до 1,14, что может соответствовать изменению размеров фибрилл.

Важной характеристикой плотности упаковки молекул коллагена в фибриллах и механической прочности фибрилл является их диаметр, варьирующий in vivo от 20 до 150 нм. Электронно-микроскопические исследования показывают, что при температуре ниже физиологической (T=32,5oC) диаметр фибрилл в условиях наших экспериментов равен 67 нм. Начиная с T=34–35oC, изменяются физические свойства воды в окружении молекул коллагена, а образованию фибрилл предшествует их дегидратация – происходит удаление свободной и слабосвязанной воды с поверхности молекул [3]. При T=36,5oC конформационное состояние коллагена таково, что облегчаются стерические взаимодействия для тройных спиралей с глобулярными концевыми телопептидами соседних молекул. Диаметр фибрилл уменьшается до 28 нм за счет более плотных контактов между взаимодействующими группами боковых аминокислотных остатков. Однако при T=38,5oC диаметр фибрилл увеличивается до 44 нм, что свидетельствует о снижении плотности упаковки коллагена при этой температуре.

В представленной работе фибриллы коллагена сформированы из молекул высокой степени очистки. Создание гомогенных образцов в условиях, близких к физиологическим, позволило нам получать фибриллы разного диаметра в зависимости от температуры. Наши данные свидетельствуют о том, что коллаген более плотно упакован в фибриллах именно при физиологической температуре (T=36,5oC), по сравнению с фибриллами, сформированными при температуре ниже физиологической (T=32,5oC) и выше нее (T=38,5oC). Сильное межмолекулярное связывание коллагена в фибриллах, сформированных при T=36,5oC обеспечивает фибриллам in vitro механическую прочность, необходимую для применения их в медицинской практике.

Список литературы

1. Николаева Т.И., Кузнецова С.М., Тиктопуло Е.И. Стимулирует ли микроразворачивание коллагена процесс фибриллообразования? Биофизика, 2009. Т. 54(6). С.1015–1018.
2. Veis A., Payne K. Collagen fibrillogenesis. In “Collagen”. Ed. by Nimni M. CRC Press. Boca Raton. 1988. V. 1. P.113–137.
3. Kadler K.E., Prockop D.J. Protein structure and specific heat of water. Nature. 1987. V.325. P.395.