

УДК 557.12.577.112:24.

РОЛЬ ПРОЦЕССИНГА В ВОЗРАСТНЫХ ИЗМЕНЕНИЯХ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ КОЛЛАГЕНА

А.Б.Эль Таалу, Е.Э. Перский, Ю.Г. Кот, Н.А. Никитина, М.В. Гоэнага

Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, пл.Свободы 4, Харьков, 61077, Украина, abbassido@mail.ru

Поступила в редакцию июня 2010 г.

Принята июня 2010 г.

In vitro изучена связь между степенью гидроксирования пролина и окислительного дезаминирования ϵ -NH₂-групп лизила и гидроксизила в коллагене и термостабильностью его надмолекулярных структур в коже крыс линии Вистар в постнатальном онтогенезе. Показано, что повышаясь к 3-месячному возрасту, содержание этих свободных ϵ -NH₂-групп в коллагене остаётся в дальнейшем постоянным, в то время как содержание свободных СОН-групп, начиная с 1-месяца, неуклонно уменьшается с возрастом. В соответствии с этим межмолекулярное поперечное связывание в коллагеновых надмолекулярных структурах снижается в период от 1 до 3 месяцев, после чего постоянно повышается до 24 месяцев. Содержание гидроксипролина в коллагене непрерывно снижается в постнатальном онтогенезе. Совместное действие обоих эффектов приводит к снижению термостабильности надмолекулярных коллагеновых структур в коже в период от 1 до 3 месяцев с дальнейшим её ростом до 24 месяцев.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: возраст, коллаген, гидроксирование, окислительное дезаминирование, поперечные шивки, термостабильность, свободная энергия Гиббса.

РОЛЬ ПРОЦЕСІНГУ У ВІКОВИХ ЗМІНАХ ТЕРМОСТАБІЛЬНОСТІ КОЛАГЕНУ

А.Б. Эль Таалу, Є.Є. Перський, В.Г. Кот., Н.А. Нікітіна, М.В. Гоєнага

Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна, пл. Свободи 4, Харків, 61077, Україна, abbassido@mail.ru

In vitro вивчено зв'язок між ступенем гідроксилювання пролілу і окислювального дезамінування ϵ -NH₂-груп лізилу та гідроксизилу в коллагені та термостабільністю його надмолекулярних структур в шкірі шурів лінії Wistar у постнатальному онтогенезі. Показано, що підвищуючись до 3-місячного віку, вміст цих вільних ϵ -NH₂-груп в коллагені залишається далі постійним, в той час, як вміст вільних СОН-груп, починаючи з одного місяця, неухильно знижується з віком. У відповідності з цим міжмолекулярне поперечне зв'язування коллагенових надмолекулярних структур знижується у період від 1 до 3 місяців, після чого постійно підвищується до 24 місяців. Вміст гідроксипроліну в коллагені безперервно знижується у постнатальному онтогенезі. Сумісна дія обох ефектів призводить до зниження їх термостабільності надмолекулярних коллагенових структур в шкірі у період від 1 до 3 місяців з подальшим її ростом до 24 місяців.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: вік, коллаген, гідроксилювання, окислювальне дезамінування, поперечне зв'язування, термостабільність, свободна енергія Гіббса.

THE ROLE OF PROCESSING IN AGE-RELATED CHANGES OF COLLAGEN THERMO-STABILITY

A.B. El-Ta'lu, Ye.E. Persky, V.G. Kot, N.A. Nikitina, M.V. Goenaga

V.N. Karazin Kharkov National University, Svobody Square 4, Kharkov 61077, Ukraine, abbassido@mail.ru

The connection between of the degree of proline hydroxylation, of lysine and hydroxylysine ϵ -NH₂-groups in collagen oxidative desamination and thermo-stability of the collagen sub-molecular structures in the skin of Wistar rats during post-natal ontogenesis, was *in vitro* studied. It was shown that, after an increase in these free ϵ -NH₂-groups in collagen towards the age of 3-months, their content further remained constant while at the same time, the content of COH-groups steadily decreases with age, beginning from 1-month. Due to this, inter-molecular cross-linking in collagenous sub-molecular structures decreases from 1 to 3 months of age and afterwards, continuously rises up to the age of 24 months. The content of hydroxyproline in collagen continuously decreases during post-natal ontogenesis. The joint action of both effects leads to a decrease in the thermo-stability of collagenous sub-molecular structures in the skin from 1 to 3 months of age, with its further increase up to the age of 24 months.

KEY WORDS: age, collagen, hydroxylation, oxidative desamination, cross-links, thermo-stability, Gibbs available energy.

Надмолекулярные коллагеновые образования являются одним из важнейших конструктивных элементов неминерализованных разновидностей соединительной ткани. Уровень структурной стабильности этих образований в значительной степени определяет её функциональные свойства, в первую очередь, механические.

На большей части постнатального онтогенеза структурная стабильность коллагеновых образований повышается, что рассматривается, как один из механизмов адаптации механических свойств соединительной ткани к увеличению массы и мышечной силы организма в процессе его роста и развития.

В начале постнатального онтогенеза существует, однако, небольшой период, когда структурная стабильность этих образований не увеличивается с возрастом, а уменьшается, после чего вновь непрерывно повышается в дальнейшем [1 - 3].

Это явление ещё не получило объяснения.

Естественно, что инверсия направленности возрастного изменения структурной стабильности надмолекулярных образований в начале постнатального онтогенеза должна быть следствием определённых изменений структуры молекул коллагена, которые происходят в этот период.

Одним из лучших тестов, с помощью которого можно оценить интегральную структурную стабильность коллагеновых образований, является уровень их термостабильности. Термостабильность коллагеновых структур определяется рядом факторов: стерическими характеристиками иминокислот и относительным содержанием в них гидроксипролина, гидратацией тройных спиралей молекул, наличием в них водородных, а также внутри- и межмолекулярных поперечных ковалентных связей [4 - 9].

Из всех этих факторов отчётливые возрастные изменения в коллагеновых структурах обнаружены только в степени их поперечного связывания и в содержании гидроксипролина [10, 11].

Оба эти структурных параметра являются результатом посттрансляционной модификации первичной структуры полипептидных цепей коллагена ферментами процессинга - пролилгидроксилазой и лизилоксидазой [1, 12].

Первый фермент гидроксилирует пирролидиновый цикл пролина в 4-м положении. Под действием второго происходит окислительное дезаминирование ϵ -NH₂-групп лизила и гидроксизила с превращением этих остатков в аллизил и гидроксиаллизил, содержащих, вместо ϵ -NH₂-, альдегидные СОН-группы. В дальнейшем поперечные ковалентные связи образуются при взаимодействии либо двух СОН- групп (внутримолекулярные сшивки – альдоли, связь -C=C-), либо ϵ -NH₂-групп с СОН-группами (межмолекулярные сшивки – альдимины, связь -C=N-).

Целью этой работы было выяснение связи между степенью гидроксилирования пролина, а также окислительного дезаминирования ϵ -NH₂-групп лизила и гидроксизила и структурной стабильностью надмолекулярных коллагеновых структур в коже крыс на разных этапах постнатального онтогенеза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на коллагене кожи крыс линии Вистар 1-, 3-, 12- и 24-месячного возраста. Образцы кожи массой около 800 мг брали со спины животных после их декапитации под тиопенталовым наркозом.

Для оценки термостабильности надмолекулярных коллагеновых структур очищенную от подкожно-жирового слоя и волосяного покрова кожу прогревали в дистиллированной воде при 60⁰С (из расчёта 20 мг свежей ткани на 1 мл Н₂О) в термостате УТ- 15.

Разрушение коллагеновых структур оценивали по их растворимости, измеряя количество гидроксипролина, вышедшего в раствор после 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60,

90 и 120 минут прогревания кожи. Степень растворимости рассчитывали, как количество гидроксипролина, вышедшего в раствор, к его начальному содержанию в образце и выражали в %.

По данным измерений строили зависимости степени растворимости коллагеновых структур от времени. Константы скорости определяли по тангенсу угла наклона соответствующих участков кинетических кривых на их полувисотах и рассчитывали свободную энергию Гиббса процесса разрушения коллагеновых структур по модифицированному уравнению Эйринга: $\Delta G = -RT \ln(k'h / kT)$, где: ΔG – свободная энергия Гиббса; R – универсальная газовая постоянная; T – абсолютная температура в градусах Кельвина; k' – константа скорости процесса; h – постоянная Планка; k – постоянная Больцмана [13].

Для определения степени гидроксирования пролина образцы кожи инкубировали в среде Рингера-Кребса, в присутствии $^3\text{H-Pro}$ (Amersham) с радиоактивностью 0,4 Мкк/мл в течение 6 часов при 37°C. Из проинкубированных образцов экстрагировали свежесинтезированный коллаген раствором 1М NaCl. О степени гидроксирования пролина в коллагене судили по отношению радиоактивностей $\{^3\text{H-Hypro} / (^3\text{H-Pro} + ^3\text{H-Hypro})\} \times 100\%$, которые измеряли на счётчике Beckman LC 7800 [14]. Погрешность определения составляла $\pm 5\%$.

Степень окислительного дезаминирования лизила и гидроксизила оценивали по содержанию свободных ϵ -амино- и СОН- групп, которые измеряли в экстрактах коллагена методами [15] и [16], соответственно.

Аналитическое определение гидроксипролина в образцах проводили по методу [17].

Кривые, представленные на рисунке, 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 И ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке приведены кинетические кривые выхода в раствор коллагена, разрушенного при нагревании в воде кожи животных разного возраста, а в таблице 1 – рассчитанные по этим кривым количественные параметры процесса разрушения.

Как видно, во всех возрастах кинетические кривые состоят из двух областей, характеризующихся различной крутизной.

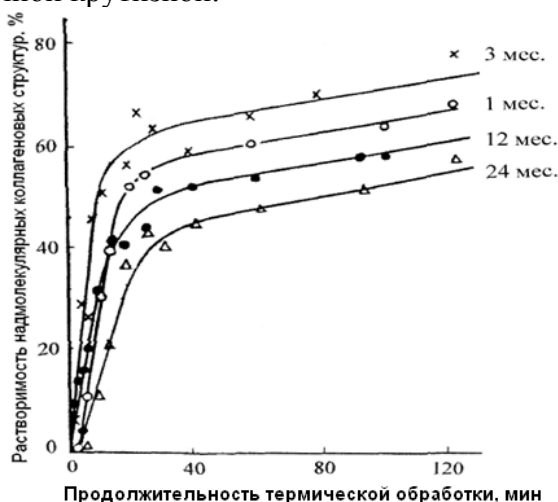


Рис.1. Кинетика выхода в раствор разрушенного коллагена после прогревания кожи крыс разного возраста

Роль процессинга в возрастных изменениях термостабильности коллагена

Для объяснения этого явления отметим, что в надмолекулярных образованиях молекулы коллагена находятся на разных стадиях полимеризации и деструкции. Следовательно, эти образования занимают промежуточное положение между несшитыми и полностью сшитыми молекулами коллагена, входящими в состав надмолекулярных структур. В сущности, они представляют собой «скелет» из полностью сшитых поперечными сшивками молекул, соединённый с молекулами, недавно синтезированными или находящимися на стадии физиологической деструкции и слабо связанными с ним.

По-видимому, две области на кинетических кривых соответствуют процессам разрушения различных участков в надмолекулярных коллагеновых структурах

Первая область, более крутая, отражает денатурацию и выход в раствор денатурированных молекул коллагена, слабее связанных в надмолекулярных образованиях, в том числе, молекул, недавно синтезированных и находящихся на стадии деградации.

Вторая область на кинетических кривых, более пологая, отражает разрушение и выход в раствор частиц, представляющих собой более сильно связанные молекулы, синтезированные намного раньше и входящие в состав «скелета» надмолекулярных образований.

При качественном подобию кинетических кривых, они демонстрируют яркие возрастные особенности обоих процессов.

На первом этапе разрушения скорость денатурации коллагена, пропорциональная крутизне кинетических кривых, повышаясь в период от 1 до 3 месяцев, в дальнейшем непрерывно снижается до 24-месячного возраста животных. Таким же образом изменяется и время протекания первого этапа, измеряемая по точке перегиба кривых. В то же время свободная энергия Гиббса разрушения коллагеновых структур изменяется противоположным образом – она снижается от 1 до месяцев, после чего начинает повышаться и это повышение продолжается до 24-месячного возраста животных.

Таблица 1. Возрастные изменения параметров разрушения надмолекулярных коллагеновых образований при гидротермической обработке кожи крыс

Показатель	1 этап				2 этап			
	Возраст, мес.							
	1	3	12	24	1	3	12	24
Время, мин	20,3 ± 0,5	18,0 ± 0,4*	23,4 ± 0,5***	27,2 ± 0,7***	102,6 ± 0,83	100,0 ± 0,75*	97,1 ± 0,68***	93,6 ± 0,66***
Степень, %	45,5 ± 2,1	59,0 ± 4,0*	53,5 ± 3,2*	39,5 ± 1,9***	61,5 ± 3,2	73,5 ± 3,9*	68,0 ± 3,8*	56,0 ± 2,8***
Константа скорости, с ⁻¹	(5,83 ± 1,17) × 10 ⁻²	(9,89 ± 1,81)* × 10 ⁻²	(3,33 ± 0,9)* × 10 ⁻²	(1,51 ± 0,4)*** × 10 ⁻²	(1,98 ± 0,06) × 10 ⁻³	(1,87 ± 0,08) × 10 ⁻³	(1,92 ± 0,08) × 10 ⁻³	(2,05 ± 0,10) × 10 ⁻²
Свободная энергия Гиббса, кДж/моль	89,7 ± 0,6	88,1 ± 0,5*	91,2 ± 0,8***	93,4 ± 1,0***	98,8 ± 1,6	99,0 ± 1,6	99,0 ± 1,6	98,7 ± 1,6

Примечание. В таблицах 1 - 3: * - достоверно ($p < 0,05$) относительно контроля (1 мес.); ** достоверно - ($p < 0,05$) относительно предыдущего значения показателя.

На втором этапе ни скорость, ни свободная энергия Гиббса разрушения коллагена в коже не зависит от возраста животных. Это связано с тем, что прочность сформированного, полностью сшитого ковалентными химическими связями «скелета» надмолекулярных коллагеновых структур близка у животных независимо от их возраста.

Однако количество денатурированного коллагена, вышедшего в раствор на втором этапе разрушения, зависит от возраста животных, увеличиваясь в период от 1 до 3

месяцев и уменьшаясь затем к 24-месячному возрасту, как и на первом этапе гидротермической обработки кожи.

Это совпадение определяется тем, что при одинаковой скорости разрушения прирост вышедшего денатурированного коллагена постоянен и его суммарное количество зависит от числа разрушенных молекул, вышедших в раствор в конце первого этапа.

Таким образом, судя по полученным данным, структурная стабильность надмолекулярных образований матрикса в коже животных снижается в период от 1 до 3 месяцев, после чего начинает расти. Непрерывное повышение этого процесса продолжается до 24-месячного возраста.

Возрастные изменения степени гидроксирования пролила и окислительного дезаминирования лизила и гидроксизила приведены в таблицах 2 и 3.

Таблица 2. Возрастные изменения удельной радиоактивности $^3\text{H-Pro}$ и $^3\text{H-Hyp}$ (имп/мин/мг коллагена) и степень гидроксирования Pro в свежесинтезированном коллагене из кожи крыс (%).

Показатель	Возраст, мес.			
	1	3	12	24
$^3\text{H-Pro}$	892 ± 64	570 ± 43*	478 ± 41***	392 ± 35***
$^3\text{H-Hyp}$	980 ± 51	601 ± 58*	413 ± 39***	310 ± 33***
$\{^3\text{H-Hyp} / (^3\text{H-Pro} + ^3\text{H-Hyp})\} \times 100\%$	52,4	51,3	46,4	44,2

Таблица 3. Возрастные изменения содержания свободных $\epsilon\text{-NH}_2$ - групп лизила и гидроксизила и СОН-групп аллизила и гидроксиаллизила в свежесинтезированном коллагене из кожи крыс (мг/г коллагена)

Свободные группы	Возраст, мес.			
	1	3	12	24
$\epsilon\text{-NH}_2$ -	11,66±0,7	24,69±2,2*	28,13±2,8*	30,80±3,5*
СОН -	50,98±6,8	41,39±6,3	33,93±2,1*	28,67±3,9***

Как видно из приведенных данных, степень гидроксирования пролила в свежесинтезированном коллагене уменьшается с возрастом животных, что свидетельствует о снижении активности пролилгидроксилазы на всём протяжении их постнатального онтогенеза.

Аналогичным образом снижается с возрастом и активность лизилгидроксилазы. Действительно, в 1-месячном возрасте содержание альдегидных СОН-групп аллизила и гидроксиаллизила в свежесинтезированном коллагене почти в 5 раз превышает содержание в нём $\epsilon\text{-NH}_2$ - групп лизила и гидроксизила. В дальнейшем эта разница уменьшается и в 24 месяца содержание аминных и альдегидных групп становится практически одинаковым.

Свободные $\epsilon\text{-NH}_2$ - и СОН-группы являются потенциальными предшественниками поперечных ковалентных сшивок. При этом вероятность их взаимной попарной конденсации зависит только от концентрации самих групп [9,12]. Поэтому в период от 1 до 3 месяцев поперечное связывание в коллагеновых надмолекулярных структурах должно происходить, в основном, за счёт взаимодействия СОН-групп друг с другом и образования альделей - внутримолекулярных сшивок.

После же 3-месячного возраста, в результате снижения активности лизилоксидазы и увеличения удельного содержания $\epsilon\text{-NH}_2$ - групп лизила и гидроксизила, в коллагеновых надмолекулярных структурах за счёт взаимодействия этих групп с СОН-группами преимущественно начинают образовываться межмолекулярные связи альдиминного типа.

Такая возрастная динамика активности ферментов процессинга коллагена объясняет инверсию изменений термостабильности коллагеновых надмолекулярных структур в коже в период от 1 до 3-месячного возраста.

Так, в период от 1 до 3 месяцев снижение интегральной термостабильности надмолекулярных коллагеновых образований в коже определяется как снижением содержания гидроксипролина в молекулах, так и незначительным образованием межмолекулярных сшивок, связывающих их в единое целое.

После 3-месячного возраста плотность поперечного межмолекулярного связывания молекул коллагена в надмолекулярных образованиях растёт, что и приводит к повышению их термостабильности как целого. Снижение же термостабильности индивидуальных молекул коллагена за счёт дальнейшего уменьшения в них содержания гидроксипролина перекрывается эффектом межмолекулярного связывания на надмолекулярном уровне.

ВЫВОДЫ

1. Структурная стабильность надмолекулярных коллагеновых образований, оцениваемая по скорости их разрушения и величине свободной энергии Гиббса при гидротермической обработке кожи крыс, снижается в период от 1 до 3 месяцев, после чего непрерывно повышается до 24-месячного возраста животных.
2. В основе этого явления лежит совместное действие двух эффектов процессинга: преимущественное образование в коллагене в период от 1 до 3 месяцев внутримолекулярных связей альдольного типа, а после 3-месячного возраста - межмолекулярных связей – альдиминов, при непрерывном снижении в постнатальном онтогенезе содержания гидроксипролина в коллагене.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Никитин В.Н., Перский Е.Э., Утевская Л.А. Возрастная и эволюционная биохимия коллагеновых структур. – К.: Наукова думка.- 1977. – 242 с.
2. Обысов А.С. Надёжность биологических тканей. – М.; Медицина. – 1971. – 103 с.
3. Vogel M. G. Influence of maturation and ageing on mechanical and biochemical properties of connective tissue in rats // *Mech. Ageing and Dev.* – 1980. – Vol. 14, № 3. – 4. – P. 283 – 292.
4. Jenkins C.L., Raines R.T. Insights on the conformational stability of collagen // *Nat. Prod. Rep.* – 2002. – Vol. 19. – P. 49 – 59.
5. 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. – Vol. 56, № 1. – P. 8 – 13.
6. Борискина Е.П. Энергии водородных связей, стабилизирующие конформацию гидратированных коллагеновых структур: Дис. канд. физ.-мат. наук. – Харьков.: - Харьковский национальный университет им. В.Н.Каразина. – 2007. – 147 с.
7. Berg R.A., Prockop D.J. The thermal transition of a non-hydroxylated form of collagen. Evidence for a role for hydroxyproline in stabilizing the triple-helix of collagen // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1973. – Vol. 152, № 1. – P. 115 – 120.
8. Nishi Y., Uchiyama S., Nishiuchi Y., Nakazawa T., Ohkubo T., Kobayashi Y. Different effects of 4- hydroxyproline and 4-fluoroproline in the stability of collagen triple helix // *Biochemistry.* – 2005. – Vol. 44, № 16. – P. 6034 – 6042.
9. Eyre D.R., Wu J. – J. Collagen Cross – Links // *Topics in Current Chemistry.* – 2005. – Vol. 247. – P. 207 – 229.
10. Bailey A.Y., Paul R.G. The mechanisms and consequences of the maturation and ageing of collagen // *Proc. Indian Acad. Sci. (Chem. Sci.).* – 1999. – Vol. 111, № 1. – P. 57 – 69.

11. 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.

12. Yamauchi M., Masashi M. Post-translational Modifications of Proteins: Lysine Hydroxylation and Cross-linking of collagen // Tools for Functional Proteomics. – Series: Methods in Molecular Biology. – 2008. – Vol. 445. P. 95 – 108.

13. И. Клотц. Энергетика биохимических реакций. - М.: Мир.–1970.– 112 с.

14. 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. 12-18.

15. Бейли Дж. Методы химии белков – М.: Мир, 1965. – 284 с.

16. Дубинина Е.Е. Окислительная модификация белков плазмы крови больных с психиатрическими расстройствами // Вопр. мед. химии. – 2000. – №4. – С. 36 – 47.

17. Утевская Л.А., Перский Е.Э. Простой метод определения суммарного и свободного оксипролина // Вестн. Харьк. ун-та. – 1982. – № 226. – С. 18 – 20.