

УДК 557.12.577.112:24

А. Б. Ель Та'алу, аспірант,
М. В. Гоенага, мол. науковий співробітник,
Є. Е. Перський, д-р біол. наук, проф., зав. кафедрою біохімії
Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна,
кафедра біохімії,
пл. Свободи, 4, м. Харків, 61077, Україна
тел.: +38 (057) 707-55-02, e-mail: epersky@list.ru

ВІКОВІ ОСОБЛИВОСТІ ЗВ'ЯЗКУ МІЖ ОКИСЛЮВАЛЬНИМ ДЕЗАМІНУВАННЯМ І ТЕРМОСТАБІЛЬНІСТЮ КОЛАГЕНУ ШКІРИ

Вивчено зв'язок між віковими змінами окислювального дезамінування ϵ -NH₂-груп лізину та гідроксилізу в колагені шкіри і термостабільністю його надмолекулярних структур у щурів лінії Wistar. Показано, що, підвищуючись до 3-місячного віку, вміст вільних ϵ -NH₂-груп в колагені залишається далі постійним, в той час як вміст вільних СОН-груп, починаючи з одного місяця, неухильно знижується з віком. У відповідності з цим внутрішньомолекулярне поперечне зв'язування колагенових надмолекулярних структур знижується від 1 до 3 місяців, після чого постійно підвищується до 24 місяців. Міжмолекулярне зв'язування не змінюється до 3-місячного віку, після чого теж починає збільшуватися. Це призводить до зниження їх термостабільності у період від 1 до 3 місяців з подальшим її ростом до 24 місяців.

Ключові слова: вік, колаген, окислювальне дезамінування, поперечне зв'язування, термостабільність.

Однією з вікових змін сполучнотканинного матриксу є підвищення його структурної стабільності, що супроводжується порушенням функціональних властивостей сполучної тканини в старому віці [1—3].

Суттєва причина цього явища — віковий розвиток сітки поперечних міжмолекулярних ковалентних зв'язків у надмолекулярних колагенових структурах, які виконують у матриксі арміруючу роль [1, 4, 5].

Начальним етапом цього процесу є посттрансляційне ферментативне окислювальне дезамінування ϵ -NH₂-груп лізину та гідроксилізу в поліпептидних ланцюгах колагену із наступним перетворенням цих залишків у аллізил та гідроксиаллізил, які містять, замість ϵ -NH₂-, альдегідні СОН-групи. В подальшому поперечні ковалентні зв'язки утворюються при взаємодії або двох СОН-груп (внутрішньомолекулярні зшивки — альдоли), або ϵ -NH₂-груп з СОН-групами (міжмолекулярні зшивки — шифові основи) [6—8].

Показано, що залежності інтенсивності як синтезу, так і внутрішньоклітинного процесингу колагену від віку являють собою криві з максимумами [9]. Природно, що це може приводити до особливостей вікових змін структурної стабільності колагенових надмолекулярних утворень. На цей час, однак, це питання ще не вивчено.

Метою цієї роботи було дослідження вікових особливостей зміни структурної стабільності надмолекулярних колагенових структур та їх зв'язок із ступенем окислювального дезамінування ϵ -NH₂-груп лізину і гідроксилізу в сумарному колагені шкіри щурів на різних етапах онтогенезу.

Матеріали і методи дослідження

Досліди проведені на шкірі 1-, 3-, 12- и 24-місячних щурів — самців лінії Вістар.

При проведенні дослідів дотримувались правил виконання медико-біологічних досліджень у відповідності з міжнародними принципами Європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985) і норм біомедичної етики, у відповідності з Законом України «Про захист від жорстокого поводження».

Тварин декапітували під тіопенталовим наркозом.

Для вимірювання ступеня окислювального дезамінування колагену зразки шкіри спини (20×5) мм з довгою стороною вздовж хребта очищували від підшкірно-жирового шару й волосяного покриву і розтирали в рідкому азоті до порошкоподібного стану. Колаген екстрагували з порошку 1M NaCl та вилучали з екстракту діалізом [10]. Концентрацію колагену розраховували за гідроксипроліном [11].

Один зразок колагену отримували з шкіри чотирьох 1-місячних, двох 3-місячних та одної 12- і 24-місячної тварини. В досліді було використано 8—9 зразків колагену щурів кожного віку.

Ступінь окислювального дезамінування лізилу та гідроксилізилу оцінювали за вмістом вільних ϵ -аміно- та альдегідних груп, які вимірювали методами [12] і [13] відповідно.

Структурну стабільність колагенових структур визначали за термостабільністю, для чого вимірювали кінетику їх руйнування в шкірі, яку прогрівали в дистильованій воді при 60 °C (з розрахунку 20 мг тканини на 1 мл H₂O). Руйнування надмолекулярних колагенових структур оцінювали за їх розчинністю, вимірюючи кількість часток молекул колагену та їх агрегатів, що вийшли у розчин. Для цього вимірювали в ньому кількість гідроксипроліну після 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 90 і 120 хвилин прогрівання шкіри. Ступінь розчинності розраховували, як кількість гідроксипроліну, що вийшов у розчин, до його початкової кількості в зразку і виражали в %. За отриманими даними будували залежності ступеня розчинності від часу. Швидкість розчинності розраховували за тангенсом кута нахилу дотичної до відповідних ділянок кінетичних кривих на їх напіввисотах.

Рівень ковалентного поперечного зв'язування колагенових надмолекулярних структур визначали електрофоретично за питомим вмістом часток молекул колагену і їх агрегатів різного ступеня полімеризації, що вийшли у розчин після прогрівання шкіри, і виражали у відсотках від загального вмісту колагену в ній.

Електрофорез α -ланцюгів і їх агрегатів проводили в поліакриламідному гелі за методом [14], в апараті ПЕФА-1 у скляних трубках діаметром 3 мм і довжиною 70 мм в додецилсульфатному буфері. Концентрації верхнього (концентруючого) і нижнього (розділяючого) гелів становили 4,1 % і 6,1 % відповідно. В кожну трубку вносили 0,1 мл зразка, який містив 100—150 мкг білка. Сила струму становила 4 мА на трубку. В цих умовах послідовність виходу часток зруйнованих надмолекулярних структур така: індивідуальні поліпептидні α -ланцюги молекул колагену, β -частки — попарно зв'язані поперечними зшивками α -ланцюги, частки, які складаються з більшої кількості α -ланцюгів, пов'язаних як внутрішньо-, так і міжмолекулярними поперечними зшивками [14].

Після закінчення електрофорезу, забарвлення білка і відмивки гелів, їх денситометрували на мікрофотомері ИФО-451. На отриманих денситограмах вимірювали площини піків, що відповідали α -ланцюгам та їх агрегатам різного ступеня полімеризації і розраховували вміст цих частин в зразку в %.

Криві, що представлені на рисунках, є типовими для серії повторних вимірювань (не менш, як 8—9 зразків в кожній серії).

При статистичній обробці результатів використовували критерії вірогідності Стьюдента і Манна—Уїтні. Вірогідними вважали результати з $p < 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення

На рис. 1 представлені криві кінетики виходу в розчин колагену, при нагріванні шкіри щурів різного віку, а в табл. 1 наведено розраховані за цими кривими показники процесу руйнування надмолекулярних колагенових структур.

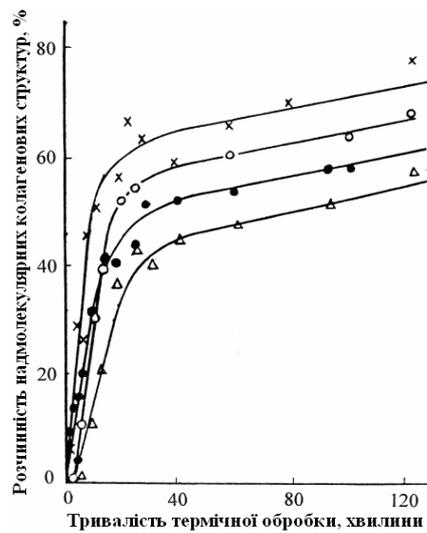


Рис. 1. Часові залежності виходу в розчин зруйнованого колагену після прогрівання шкіри щурів різного віку:

о — 1, × — 3, ● — 12, Δ — 24 міс.

Як видно, в усіх вікових групах кінетичні криві складаються з двох областей, що характеризуються різною крутизою.

Таким чином, весь досліджений процес складається з двох стадій. На першій як швидкість, так і ступінь руйнування колагенових структур в усіх досліджених вікових групах суттєво більші, ніж на другій. При цьому тривалість першої стадії з віком збільшується, а другої — зменшується (табл. 1).

Це пояснюється тим, що в колагенових надмолекулярних структурах *in vivo* молекули знаходяться на різних стадіях як полімеризації поперечними зв'язками, так і фізіологічної деструкції. Тому такі структури займають проміжне положення між незшитим і повністю зшитим полімером. У суті, вони являють собою просторову сітку міцно пов'язаних молекул колагену, з'єднану з слабо пов'язаними з нею молекулами, які були синтезовані недавно.

Очевидно, перша область на кінетичних кривих і, відповідно, перша стадія руйнування відповідають виходу в розчин молекул, слабо пов'язаних в надмолекулярних структурах, а друга — руйнуванню сильно, практично повністю зшитого полімеру. Оскільки, незалежно від віку, структура такого полімеру одна

й та ж, швидкість його руйнування на другій стадії не змінюється в онтогенезі (табл. 1).

Таблиця 1

Вікові зміни кінетичних параметрів процесу руйнування колагенових структур в шкірі щурів

Параметри руйнування	1-а стадія				2-а стадія			
	Вік, міс.							
	1	3	12	24	1	3	12	24
Час, хв.	18,0± 0,5	20,0± 0,5*	23,0± 0,5***	27,0± 0,5***	102,0± 0,75	100,0± 0,75*	97,0± 0,75***	93,0± 0,75***
Ступінь, %	47,3± 2,1	59,0± 4,0*	50,7± 3,2*	39,5± 1,9***	61,2± 3,2	73,5± 3,9*	68,0± 3,8*	56,0± 2,8***
Швидкість, % / хв.	3,5± 0,6	5,3± 1,1*	3,9± 0,9***	2,0± 0,4***	0,119± 0,014	0,112± 0,008	0,115± 0,012	0,123± 0,016

Примітка: В цій і наступній таблицях: * — вірогідно ($p < 0,05$) відносно контролю (1 міс.); ** — вірогідно ($p < 0,05$) відносно попереднього значення показника.

Найбільш цікавим, однак, є те, що як швидкість, так і ступінь руйнування колагенових структур на обох стадіях підвищуються в період від 1 до 3 місяців, після чого починають знижуватися. Таким чином, структурна стабільність колагенових надмолекулярних утворень в шкірі тварин знижується в період від 1 до 3 місяців і лише після цього починає безперервно збільшуватися до 24-місячного віку.

Це явище, очевидно, повинно бути пов'язане з віковою специфікою поперечного ковалентного зв'язування надмолекулярних колагенових структур.

На рис. 2 приведені електрофоретичні профілі колагену, що вийшов у розчин при нагріванні шкіри щурів різного віку, а в табл. 2 — розраховані за цими профілями кількості його поліпептидних ланцюгів з різним ступенем полімеризації.

У відповідності з даними табл. 2, в період між 1 і 3 місяцями питомий вміст індивідуальних α -ланцюгів в зруйнованому колагені, які вийшли в розчин, має явну тенденцію до підвищення, а β -частинок, які являють собою попарно зв'язані внутрішньомолекулярними зв'язками α -ланцюги, — знижується. В той же

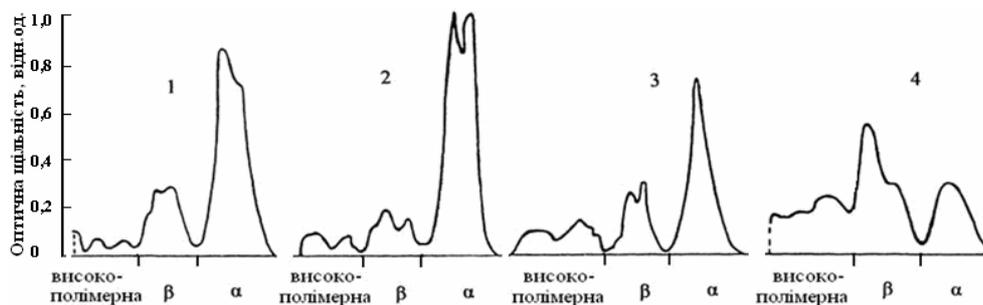


Рис. 2. Електрофоретичні профілі зруйнованого колагену, який вийшов у розчин після прогрівання шкіри щурів різного віку:

1 — 1, 2 — 3, 3 — 12, 4 — 24 міс.

час вміст молекул колагену і окремих α -ланцюгів, пов'язаних у більш високополімерні комплекси міжмолекулярними зв'язками, не змінюється. Лише після 3-місячного віку вміст індивідуальних α -ланцюгів починає безперервно знижуватися, а високополімерних колагенових комплексів — підвищуватися. Підвищується на цьому етапі й питомих вміст β -частинок.

Таблиця 2

Вікові зміни вмісту частинок різного ступеня полімеризації, які вийшли в розчин після теплового руйнування колагенових структур в шкірі щурів, %

Тип частинок	Вік, міс.			
	1	3	12	24
α -ланцюги	65,4 \pm 5,9	75,4 \pm 7,2	49,1 \pm 5,0* ^{**}	23,0 \pm 2,2* ^{**}
β -частинки	26,7 \pm 3,4	13,9 \pm 2,5*	28,7 \pm 3,9* ^{**}	40,5 \pm 5,0* ^{**}
Високополімерні	7,8 \pm 1,7	10,8 \pm 2,6	21,9 \pm 3,3* ^{**}	36,5 \pm 4,8* ^{**}

Виявлене явище може визначати, що у період з 1 до 3 місяців при незмінності кількості міжмолекулярних зшивок, кількість внутримолекулярних зшивок в колагенових структурах знижується. Тільки після 3-місячного віку йде паралельне утворення обох типів зв'язків. При цьому у період з 3 до 24 місяців кількість β -частинок підвищується в 2,9, а високополімерних — у 3,4 рази. Це може свідчити про більш інтенсивне міжмолекулярне, ніж внутрішньомолекулярне зв'язування на цьому етапі онтогенезу.

Такий механізм підтверджується результатами вимірювання вільних ϵ -NH₂- і СОН-груп в колагені тварин різного віку. Як видно з табл. 3, в період від 1 до 3 місяців вміст ϵ -NH₂-груп в колагені підвищується, залишаючись в подальшому практично незмінним. В той же час вміст СОН-груп починає вірогідно знижуватися лише після 3-місячного віку.

Таблиця 3

Вікові зміни вмісту вільних ϵ -NH₂-груп лізиду і гідроксилізу і альдегідних СОН-груп аллізиду і гідроксиаллізиду в колагені шкіри щурів, мг/г колагену

Вільні групи	Вік, міс.			
	1	3	12	24
ϵ -NH ₂ -	11,66 \pm 0,7	24,69 \pm 2,2*	28,13 \pm 2,8*	30,80 \pm 3,5*
СОН-	50,98 \pm 6,8	41,39 \pm 6,3	33,93 \pm 2,1*	28,67 \pm 3,9* ^{**}

Таким чином, виявлене збільшення ступеня руйнування колагенових надмолекулярних структур шкіри в період від 1 до 3 місяців може пояснюватися зниженням в цей час внутрішньомолекулярного поперечного зшивання в молекулах колагену при незмінності кількості в ньому міжмолекулярних зв'язків. Подальше зростання термостабільності до 24 місяців є результатом зростання кількості обох типів зшивок, з переважним утворенням останніх.

Висновки

1. Структурна стабільність надмолекулярних колагенових утворень шкіри щурів знижується в період від 1 до 3 місяців, після чого безперервно підвищується до 24-місячного віку.

2. В основі цього явища лежить зниження в колагені в період від 1 до 3 місяців внутрішньомолекулярних зв'язків, а після 3-місячного віку — паралельне утворення як внутрішньомолекулярних, так і міжмолекулярних зв'язків.

Література

1. Никитин В. Н., Перский Е. Э., Утевская Л. А. Возрастная и эволюционная биохимия коллагеновых структур. — К.: Наукова думка, 1977. — 242 с.
2. Bailey A. Y., Paul R. G. The mechanisms and consequences of the maturation and ageing of collagen // Proc. Indian Acad. Sci. (Chem. Sci.). — 1999. — V. 111, № 1. — P. 57—69.
3. Vogel M. G. Influence of maturation and ageing on mechanical and biochemical properties of connective tissue in rats // Mech. Ageing and Dev. — 1980. — V. 14, № 3—4. — P. 283—292.
4. Yoshinori N. Stabilization mechanism of triple helical structure of collagen molecules // Intern. J. of Peptide Res. and Therapeutics. — 2003. — V. 10, № 5—6. — P. 533—537.
5. Waller J. M., Maibach H. I. Age and skin structure and function, a quantitative approach (II): protein, glycosaminoglycan, water and lipid content and structure // Skin Res. Technolog. — 2006. — Aug. 12 (3). — P. 145—154.
6. Eyre D. R., Wu J. — J. Collagen Cross — Links // Topics in Current Chemistry. — 2005. — V. 247. — P. 207—229.
7. Robins S. P., Bailey A. J. The chemistry of the collagen cross-links. The mechanism of stabilization of the reducible intermediate cross-links // Biochem. J. — 1975. — № 149 (2). — P. 381—385.
8. 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. — V. 445. — P. 95—108.
9. 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.
10. Miller E. J., Rhodes R. K. Preparation characterization of the different types of collagen // Methods in Enzymol. Structural and Contractile Proteins. Part A, Extracellular Matrix. — 1982. — V. 82. — P. 33—64.
11. Утевская Л. А., Перский Е. Э. Простой метод определения суммарного и свободного оксипролина // Вестн. Харьк. ун-та. — 1982. — № 226. — С. 18—20.
12. Бейли Дж. Методы химии белков. — М.: Мир, 1965. — 284 с.
13. Дубинина Е. Е. Окислительная модификация белков плазмы крови больных с психиатрическими расстройствами // Вопр. мед. химии. — 2000. — № 4. — С. 36—47.
14. Kubj K., Takagi T. The $\alpha 1(I)$ and $\alpha 2(I)$ chains of collagen separate in sodium dodecyl sulfate — polyacrilamide gel electrophoresis due to differences in sodium dodecyl sulfate binding capacities // Collagen and Relat. Res. — 1984. — V. 4, № 3. — P. 201—208.

А. Б. Эль Та'алу, М. В. Гоэнага, Е. Э. Перский

Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина,
пл. Свободы, 4, г. Харьков, 61077, Украина,
e-mail: epersky@list.ru

ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ СВЯЗИ МЕЖДУ ОКИСЛИТЕЛЬНЫМ ДЕЗАМИНИРОВАНИЕМ И ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬЮ КОЛЛАГЕНА КОЖИ

Резюме

Изучена связь между возрастными изменениями окислительного дезаминирования ϵ -NH₂-групп лизила и гидроксизизила в коллагене кожи и термостабильностью его над-

молекулярных структур у крыс линии Вистар. Показано, что, повышаясь к 3-месячному возрасту, содержание свободных ϵ -NH₂-групп в коллагене остается в дальнейшем постоянным, в то время как содержание свободных СОН-групп, начиная с первого месяца, неуклонно снижается с возрастом. В соответствии с этим внутримолекулярное поперечное связывание коллагеновых надмолекулярных структур снижается от 1 до 3 месяцев, после чего постоянно повышается до 24 месяцев. Межмолекулярное связывание не изменяется до 3-месячного возраста, после чего также начинает увеличиваться. Это приводит к снижению их термостабильности в период от 1 до 3 месяцев с дальнейшим ее ростом до 24 месяцев.

Ключевые слова: возраст, коллаген, окислительное дезаминирование, поперечные сшивки, термостабильность.

A. B. El-ta'alu, M. V. Goenaga, E. E. Persky
Kharkiv National Karazin University,
Svoboda sq., 4, Kharkiv, 61077, Ukraine,
e-mail: epersky@list.ru

AGE-RELATED PECULIARITIES OF OXIDATIVE DESAMINATION AND THERMOSTABILITY OF SKIN COLLAGEN

Summary

The relationship between age-related changes in oxidative desamination of ϵ -NH₂-group of lysyl and hydroxylysyl in collagen and thermostability of sub-molecular structures in the skin of Wistar rats were studied. It was shown that after an increasing towards the age of 3-months, the content of free ϵ -NH₂- groups in collagen further remains constant, while at the same time, the content of free COH-groups, beginning from the age of 1-month, continuously decreased. Because of this inter-molecular cross-linking of collagenous sub-molecular structures decreased from the age of 1 to 3 months, after that, continuously increased up to the age of 24 months. This leads to decrease in their thermostability, from the age of 1 to 3 months, with further increase up to the age of 24 months.

Key words: age, collagen, oxidative, desamination, intermolecular cross-linking, thermostability.