

УДК 547.962.9; 536.628.3

ИЗМЕНЕНИЕ ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ДЕНАТУРАЦИИ КОЛЛАГЕНА ТКАНЕЙ ГЛАЗА В РЕЗУЛЬТАТЕ НЕФЕРМЕНТАТИВНОЙ ГЛИКАЦИИ

Н.Ю. Игнатъева, Н.А. Данилов, В.В. Лунин, М.В. Обрезкова, С.В. Аверкиев, Т.И. Чайковский

(кафедра физической химии; e-mail: nyu@kge.msu.ru)

Проведено исследование тканей роговицы и склеры, подвергшейся обработке рибозой, трезой и глицеральдегидом. Термическая стабильность сшитых коллагеновых волокон изучена методом дифференциальной сканирующей калориметрии, определена устойчивость образцов ткани к действию трипсина. Показано, что температура денатурации образцов роговицы и склеры, обработанных сшивающими агентами, возрастает, а тепловой эффект денатурации уменьшается. Предполагается, что образование поперечных связей в коллагеновой матрице роговицы и склеры препятствует полной термической денатурации коллагена при температурах до 110°C.

Введение

Установлено, что при близорукости высокой степени имеют место патологические изменения в структуре коллагенового волокна, связанные со снижением количества поперечных сшивок в склере. Это и обуславливает нарушение ее биомеханических свойств и необратимое прогрессирование патологического процесса [1, 2].

В настоящее время разрабатывают разные методы профилактики и лечения прогрессирующей близорукости на основе склеропластических операций или обработки тканей склеры или роговицы сшивающими агентами (гликация) [1]. Однако внедрение новых методов в медицинскую практику возможно лишь после тщательных исследований *in vitro* и *in vivo*.

Основой каркаса внеклеточного матрикса роговицы и склеры является коллаген. Общее содержание коллагена в склере и роговице составляет соответственно ~80 и 90% от сухой массы данных тканей. Фибриллы коллагена в роговице образуют уникальную структуру: они уложены в слои (ламеллы), расположенные строго параллельно, чем и обусловлена исключительная прозрачность этой ткани. Заметим, что упорядоченного расположения склеральных фибрилл не существует; поэтому склера непрозрачна, и изменение ее структуры не вызывает изменения оптических свойств глазного яблока [3].

Как и в других коллагенсодержащих тканях, в склере возможны процессы сшивки макромолекул

коллагена под действием моносахаридов, продуктов их метаболизма и других веществ, содержащих альдегидные и функциональные спиртовые группы. Сшивание может происходить в естественных условиях в ходе старения организма, при заболевании сахарным диабетом, а также под действием вводимых в ткань реагентов. Этот сложный многостадийный процесс начинается реакцией аминокарбонилирования с образованием шиффовых оснований – альдиминов, претерпевающих внутримолекулярную перегруппировку в 1-амино-1-дезоксикетозы (соединения Амадори). Последующие реакции дегидратации, конденсации, спонтанного распада соединений Амадори до более активных сахаров (тетроз, пентоз, деоксиглюкозонов), фрагментации, окисления и циклизации приводят к появлению разнообразных азот- и кислородсодержащих гетероциклических соединений [4, 5].

В результате этого процесса образуются так называемые конечные продукты гликации, имеющие интенсивную желто-коричневую окраску [6]. Увеличение концентрации поперечных связей в коллагеновом волокне вызывает возрастание модуля Юнга [7], увеличение термостабильности и устойчивости к действию протеолитических ферментов [7–9]. Улучшение термостабильности проявляется в виде возрастания температуры денатурации* (T_d). Таким образом, T_d является важным критерием, позволяющим судить о степени сшивания коллагенового волокна.

* Температура денатурации – это такая температура, при которой происходит разрушение упорядоченной структуры тройной спирали коллагена с образованием случайного клубка.

Т а б л и ц а 1

Результаты определения содержания воды и коллагена в интактных образцах ($P = 0,95$, $n = 3$)

Ткань	Содержание воды (мас.%) по данным ТГА	Содержание коллагена (мас.%) в интактных образцах
Склера	19,3±2,5	64,56±2,0
Роговица	15,2±3,0	76,32±2,7

Настоящая работа посвящена изучению термостабильности склеры и роговицы, изменению T_d коллагена и устойчивости к действию трипсина после обработки тканей склеры и роговицы сшивающими реагентами.

Материалы и методы

Приготовление образцов тканей

Образцы склеры и роговицы кролика получали не позже, чем через 6 ч *post mortem*. Склеру и роговицу промывали водой и высушивали на воздухе в течение суток и разрезали на образцы массой 3–4 мг в пересчете на сухой вес.

Обработка тканей сшивающими агентами

В данной работе проводили обработку образцов тканей массой 5–10 мг 1 М растворами моносахаридов (“Sigma”, США) в инкубационном буфере (0,15М NaCl, 25 мМ EDTA (“Quality Biol. Inc.”, США), 5000 единиц пенициллина и 5 мг стрептомицина (“ПанЭко”, Россия) на 1000 мл буфера с pH 7,4.

Для каждого эксперимента использовали по 3 образца склеры и роговицы соответственно. Сшивание проводили: 1) рибозой в течение 1 и 5 сут при температуре 37°C; 2) треозой в течение 5 сут при температуре 37°C; 3) глицеральдегидом в течение 12 ч при температуре 25°C.

Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК)

Образцы тканей массой 1–5 мг (в пересчете на сухой вес) герметично закрывали в алюминиевой чашке. В качестве образца сравнения использовали пустую чашку. Термический анализ методом ДСК проводили на приборе “DSC822[®]” (“Mettler Toledo”, Швейцария) в интервале температур от 25 до 110°C. Скорость изменения температуры составляла 10 град/мин.

Термогравиметрический анализ (ТГА)

Для определения остаточного содержания воды высушенные на воздухе образцы тканей массой 1–5 мг нагревали в ячейке термогравиметрического анализатора “TGA 851[®]” (“Mettler Toledo”, Швейцария) со скоростью 10 град/мин в интервале температур 40–160°C, далее образцы выдерживали 15 мин при 160°C. Остаточную массу использовали для нормирования площадей пиков на ДСК-термограммах.

Ферментативная обработка денатурированных тканей

После снятия ДСК-термограмм прогретые в печи калориметра образцы склеры и роговицы кролика обрабатывали 1%-м водным раствором трипсина при комнатной температуре в течение 24 ч для оценки глубины протекания денатурации коллагена в процессе нагрева. Известно, что трипсин расщепляет (с переводом в раствор) лишь полностью денатурировавшие коллагеновые фибриллы тройной спирали и не воздействует на коллаген, сохранивший третичную структуру [10, 11].

Результаты и их обсуждение

В табл. 1 представлены данные термогравиметрического анализа по количеству остаточной воды в высушенных образцах интактных тканей, а также процентное содержание коллагена в сухих тканях, вычисленное с использованием данных [3].

В табл. 2 представлены сводные данные по найденным значениям температуры и тепловых эффектов денатурации склеры и роговицы, а также растворимости прогретых в печи калориметра образцов в трипсине. Для сшитых образцов значения тепловых эффектов были рассчитаны с использованием допущения, что содержание коллагена в сухих сшитых образцах существенно не отличается от содержания коллагена в хорошо высушенных интактных тканях.

Интактные образцы склеры и роговицы

Примеры ДСК-термограмм интактной склеры и роговицы приведены на рисунке (кривая 1). На термограммах отчетливо видны пики, соответствующие эндотермическому эффекту (экстремум этих пиков приходится на 66–67°C). Параметры (температура и тепловой эффект) перехода приведены в табл. 2. Тепловой эффект в пересчете на чистый коллаген составляет 54,2±2,4 Дж/г для склеры и 49,8±3,1 Дж/г – для роговицы, что соответствует денатурации этого белка ($\Delta H_{\text{пл}}$ для коллагена, содержаще-

Т а б л и ц а 2

Температуры и тепловые эффекты денатурации склеры и роговицы до и после обработки сшивающими реагентами (P = 0,95, n = 3)

Образец	Сшивающий агент	T_d , °C (пик)	ΔT_d , °C (интервал)	$\Delta H_{денат}$, Дж/г ткани	$\Delta H_{денат}$, Дж/г коллагена	Растворение в трипсине
Склера	нет (бланк)	66,0±0,5	62-74	35±0,5	54,2±2,4	полное
	Rib (1 сут)	66,7±0,5	63-73	34±0,5	52,7±2,5	полное
	Rib (5 сут)	68,0±0,4	67-75	30±0,6	46,5±2,3	имеется остаток
	Thr (5 сут)	76,0±2,1	74-84	27±0,4	41,8±1,8	плохое
	Gly (12 ч)	83,0±3,1	80-92	25±0,7	38,7±2,2	не растворяется
Роговица	нет (бланк)	67,0±0,5	56-75	38±0,9	49,8±3,1	полное
	Rib (1 сут)	68,0±0,6	59-75	37±0,6	48,5±2,6	полное
	Rib (5 сут)	69,8±0,7	68-76	33±0,4	43,2±2,2	имеется остаток
	Thr (5 сут)	72,0±2,3	70-90	28±0,5	36,7±1,9	плохое
	Gly (12 ч)	78,0±2,9	74-88	19±2,1	24,9±3,5	не растворяется

го некоторую долю воды, колеблется от 45 до 65 Дж/г [12]). Прогретые образцы растворяются в трипсине, что указывает на полную денатурацию содержащегося в них коллагена.

Образцы склеры и роговицы после обработки рибозой

Выдерживание образцов в растворе рибозы в течение суток с последующим анализом ДСК и обработкой трипсином показали, что температура и теплота денатурации существенно не меняются, а образцы растворяются в трипсине. После выдерживания их в растворе рибозы в течение 5 сут наблюдали некоторое повышение температуры экстремума пика и уменьшение теплового эффекта денатурации коллагена (рисунок (кривая 2), табл. 2). Прогретые образцы растворяются в трипсине не до конца.

Образцы склеры и роговицы после обработки треозой

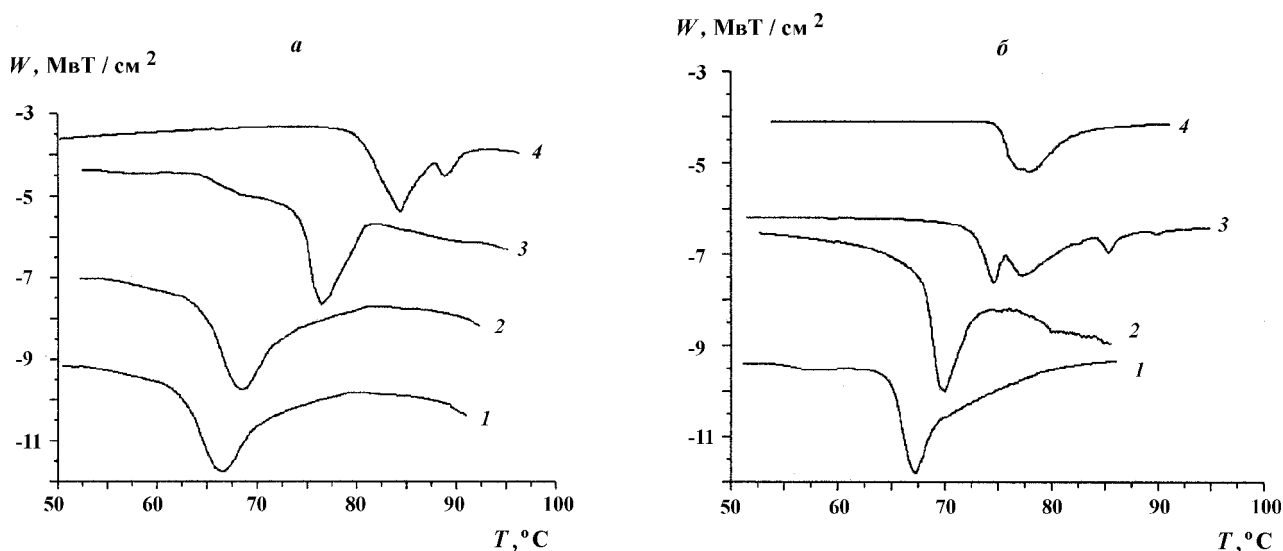
После выдерживания образцов в растворе треозы в течение 5 сут происходит их окрашивание в ин-

тенсивный желтый цвет, что свидетельствует об образовании конечных продуктов гликации [6]. Примеры ДСК-термограмм приведены на рисунке (кривая 3). Температурный интервал денатурации коллагена заметно расширяется и сдвигается в область высоких температур, а тепловой эффект процесса денатурации уменьшается (табл. 2). Для контроля полноты денатурации коллагеновых фибрилл образцы были обработаны трипсином, в результате ткани переходили в диспергированное состояние, однако полного их растворения не наблюдали.

Образцы склеры и роговицы после обработки глицеральдегидом

Образцы, выдержанные в растворе глицеральдегида в течении 12 ч, приобретали интенсивную коричневую окраску. Примеры ДСК-термограмм для таких образцов склеры и роговицы представлены на рисунке (кривая 4). Видно, что денатурация коллагена в этих образцах протекает в широком температурном интервале.

Температура пиков повышается еще больше, и, как и следовало ожидать, суммарный тепловой эф-



ДСК-термограммы образцов склеры (а) и роговицы (б): 1 – контрольные (интактные) образцы, не подвергавшиеся сшиванию; 2 – образцы, подвергавшиеся сшиванию рибозой в течение 5 сут; 3 – образцы, подвергавшиеся сшиванию трезозой в течение 5 сут; 4 – образцы, подвергавшиеся сшиванию глицеральдегидом в течение 12 ч

фект этих процессов оказался меньшим, чем для других образцов (табл. 2). При выдерживании в растворе трипсина обработанные глицеральдегидом и затем прогретые в печи калориметра образцы тканей глаза не растворяются и не теряют целостности.

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что под действием глицеральдегида сшивки в коллагеновых фибриллах в склере и в роговице образуются в наибольшем количестве и с наибольшей скоростью по сравнению с другими использованными реагентами.

Причина, по которой на термограммах склеры, обработанной глицеральдегидом, и роговицы, обработанной трезозой, наблюдали несколько пиков, не вполне ясна. Однако можно предположить, что это является следствием неравномерного распределения сшивок в ткани. На возникновение такой неравномерности могут влиять как химические, так и диффузионные факторы.

Полученные результаты позволяют сделать выводы о характере взаимодействия использованных агентов с интактной структурой коллагена. Соотношение изменения энтальпии и энтропии в ходе плавления определяет температуру плавления коллагена T_d [13]. В случае эндотермического процесса уменьшение теплового эффекта способствует понижению температуры фазового перехода. Однако в рассматриваемом случае уменьшение теплового эффекта фазового перехода сопровождается увеличением его температуры. Это говорит о том, что определяющим фактором, оказывающим влияние

на значение температуры денатурации коллагена, является величина изменения энтропии при денатурации. Уменьшение ΔS данного перехода для образцов, подвергнутых обработке, по сравнению с интактными тканями вызвано тем, что образующиеся химические связи ограничивают число возможных конформаций коллагеновых цепей в аморфной фазе выше температуры денатурации [13]. Таким образом, применение термина “сшивка” по отношению к данным связям выглядит вполне оправданно. Интересно отметить также систематическое уменьшение теплового эффекта денатурации после сшивания, изменяющегося антибатно температуре денатурации. По всей видимости, это означает, что образующиеся сшивки не только изменяют состояние коллагена в аморфной фазе, но и препятствуют полноте денатурации. Подтверждением этого является очень плохая растворимость прогретых в печи калориметра образцов, сшитых глицеральдегидом, в растворе трипсина. Сходная ситуация описана в [10, 11]. Авторы этих работ, используя электронную микроскопию, отмечали сохранение элементов упорядоченной фибриллярной структуры на прогретых до 120°C образцах кожи коров и овец, в которых имелась очень высокая степень поперечного сшивания (ткани были получены либо от очень старых особей, либо их предварительно подвергали восстановлению тетрагидроборатом натрия).

В данной работе предположение о возможности неполной денатурации коллагена в сшитых тканях

было доказано двумя независимыми и значительно более простыми в использовании методами – дифференциальной сканирующей калориметрии и ферментативной обработки.

Авторы благодарят РФФИ (гранты 02-04-16743, 02-05-16902а) и CRDF (грант RUP2-2660-МО-05) за поддержку данной работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Wollensak G., Spoerl E.*//J. Cataract. Refract. Surg. 2004. **30**. P. 689.
2. *Иомдина Е.Н.* // Автореф. дис. ... докт. биол. наук. М., 2002.
3. *Bailey A.J.* // Eye. 1987. **1**. P. 177.
4. *Налетов В.И., Буравлева Е.В., Войейков Д.С.*// Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2001. **42**. P. 291
5. *Bailey A.J.*//Mech. Ag. Dev. 2001. **122**. P. 735.
6. *Dyer D.G., Blackledge J.A., Thorpe S.R.* // J. Biol. Chem. 1991. **266**. P. 11654.
7. *Melling M., Pfeiler W., Sobal G.* // Anat. Rec. 2000. **259**. P. 32.
8. *Reisher R., Pfeiler W.* //Gerontology. 1998. **44**. P. 85.
9. *Melling M., Pfeiler W., Menzen E.J.* // Anat. Rec. 1999. **255**. P. 401.
10. *Kronick P., Maleeff B., Carroll R.* // Connect. Tissue Res. 1988. **18**. P. 123.
11. *Nagy Z., Verzar F., Toth V.* //Connect. Tissue Res. 1974. **2**. P. 265.
12. *Flandin F., Buffevant C., Herbage D.*//Biochim. Biophys. Acta. 1984. **791**. P. 205.
13. *Манделькери Л.* Кристаллизация полимеров. М., 1966.

Поступила в редакцию 01.06.06

THE ALTERATION OF THERMODYNAMIC CHARACTERISTICS OF CORNEAL TISSUE COLLAGEN DENATURATION AS THE RESULT OF THE NON-ENZYMATIC GLYCATION

N.Yu. Ignatieva, N.A. Danilov, V.V. Lunin, M.V. Obrezkova, S.V. Averkiev, T.I. Chaikovskii

(Division of Physical Chemistry)

The study was intended to investigate the thermal stability of scleral and corneal tissues subjected to treatment by ribose, threose and glyceraldehyde in vitro. The thermal transition temperature and enthalpy of cross-linking collagen fibres were obtained by differential scanning calorimetry (DSC). The resistance of tissues by trypsin treatment was defined too after heating in the furnace of the DSC-device. It was shown that the denaturation temperature of scleral and corneal samples subjected to treatment by cross-linking agents increased, but the enthalpy decreased. It is suggested that cross-linking formation in collagen matrix of cornea and sclera prevents complete collagen denaturation if the temperature doesn't go up to 110°C.