

МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ И СТАНДАРТИЗАЦИИ

УДК.577.3.4*24'142
© Рыжакова, Соловьёва

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ТКАНЕВЫХ КОЛЛАГЕНАЗ С ПОМОЩЬЮ КОЛЛАГЕНА МЕЧЕНОГО ФЛУОРЕСЦЕИНИЗОТИОЦИАНАТОМ

О.С. Рыжакова, Н.И. Соловьёва

ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, Москва 119121,
ул. Погодинская 10, эл. почта: Nina.Solovyeva@ibmc.msk.ru

Описан метод измерения коллагенолитической активности, в первую очередь активности тканевых коллагеназ, с использованием в качестве субстрата реконструированных фибрилл коллагена I типа, меченого флуоресцеинизотиоцианатом. Для введения метки использовали коллаген из кожи крыс. Введение метки проводили по модифицированному методу Vaichi et al 1980. Метод определения активности высоко чувствителен, хорошо воспроизводим, удобен для одновременного измерения активности в большом количестве проб.

Ключевые слова: тканевые коллагеназы, интерстициальная коллагеназа, коллаген, флуоресцеинизотиоцианат

ВВЕДЕНИЕ. Тканевые коллагеназы относятся к семейству матриксных металлопротеиназ (ММП), функция которых связана с обменом белков соединительнотканного матрикса. Эти ферменты играют важную роль в таких физиологических процессах как морфогенез, метаморфоз, резорбция и ремоделирование тканей, ангиогенез и др., а также при патологических состояниях (ревматоидный артрит, гломерулонефрит, изъязвление оболочки глаз и др.) Особое место отводится ММП в развитии процессов инвазии и метастазирования опухолей. Активность этих ферментов может служить объективным прогностическим критерием, а иногда и маркером процесса метастазирования [1, 2]. Методы определения активности ММП, в первую очередь интерстициальной коллагеназы (ММП-1), основаны на измерении степени гидролиза коллагена I типа. Природным субстратом для тканевых коллагеназ служат фибриллы коллагена, в которых ММП-1 гидролизует по одной связи в каждой из трех полипептидных цепей, образующих коллагеновые фибриллы. Бактериальные коллагеназы гидролизуют от 150 до 200 связей в каждой полипептидной цепи. Для определения активности бактериальных ферментов известны хорошие синтетические субстратоподобные коммерчески доступные полипептиды. Для определения активности тканевых коллагеназ, в частности ММП-1, используются динитрофенилпроизводные полипептидов. Они являются плохими субстратами, и методы определения ММП-1, основанные на регистрации продуктов гидролиза этих пептидов, обладают очень низкой чувствительностью. В последнее время предложено несколько флуорогенных пептидных субстратов для измерения активности как очищенных ММП, так и ММП в биологических средах [3-7]. Однако в большинстве случаев они имеют недостаточно хорошую растворимость, кроме того, эти субстраты дороги, что создает трудности для проведения

скрининговых исследований. В качестве субстратов для ММП-1 используют чаще всего реконструированные фибриллы ¹⁴C-меченого коллагена I типа [8], а также коллагенов, меченых флуорескаминоном (4-фенилспиро[фуран-2(3H),1'-фталан]-3,3'-дион) [9], флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) [10-12] или 2-метокси-2,4-дифенил-3(2H)-фураноном (MDPF) [13]. В продаже появился флуорогенный коллаген ("Sigma" США 2004-2005), но он пока весьма дорог для проведения скрининговых исследований. В настоящей работе мы подробно описываем достаточно простой и недорогой метод получения коллагена, меченого FITC, и использование полученного флуорогенного коллагена для определения активности тканевых коллагеназ и, в первую очередь, интерстициальной коллагеназы. Введение метки проводили по модифицированному методу Baichi et al. [10].

МЕТОДИКА. Коллаген, который был использован для введения метки, выделяли в лаборатории по модифицированным методам [8,14]. В работе использовали флуоресцеинизотиоцианат (FITC) фирмы "Sigma". В качестве бактериальной коллагеназы использовали препарат коллагеназы *Cl. histolyticum* фирмы "Serva" (Германия), источником тканевой интерстициальной коллагеназы служили лизаты фибробластов, трансформированных геном E7 вируса папилломы человека – HPV-16 (культуры клеток, выращенные нами). Остальные химические реагенты были закуплены в фирмах "ICN"(США) и "ДИАЭМ" (Россия).

Выделение коллагена из кожи крыс.

Кислоторастворимый коллаген, использованный для введения метки, выделяли из кожи крыс, которых забивали после усыпления [8,14]. Кожу молодых крыс (самцов от 15 до 20 штук весом до 120 г) очищали от шерсти и подкожного жира, измельчали (масса кожи 20-30 г) и промывали 30 минут десятикратным объемом охлажденного до 4°C 0,01 М трис-HCl-буфера pH 7,5, содержащего 0,9% NaCl, при перемешивании на магнитной мешалке, затем смесь фильтровали. Ткань еще дважды промывали холодной дистиллированной водой по 20 минут и также фильтровали. Эти процедуры проводили для удаления механических примесей и следов крови. Экстракцию коллагена проводили 15-20-кратным объемом 0,1 М уксусной кислоты (объем/вес) в течение ночи при 4°C при постоянном перемешивании. Нерастворившийся коллаген отделяли центрифугированием при 12000 об/мин (Beckman J-25, ротор - JA-18) в течение 20 мин. при 4°C и подвергали экстракции еще 2-3 раза. К супернатанту добавляли NaCl до конечной концентрации 5%, полученный осадок отделяли центрифугированием при 10000 об/мин (Beckman J-25, ротор - JA-18) и растворяли в 0,1 М уксусной кислоте. Переосаждение повторяли 3 раза. Раствор коллагена делили на аликвоты по 20 мл и хранили при -20°C. Концентрация коллагена была определена по содержанию оксипролина и варьировала от 4,5 до 6 мг/мл.

Определение концентрации коллагена по содержанию оксипролина.

Концентрацию коллагена в растворе рассчитывали по содержанию оксипролина в кислотных гидролизатах этого белка [15]. Гидролиз коллагена проводили в 6 М соляной кислоте в течение 24 часов при 110°C. Гидролизат выпаривали в фарфоровых чашках, несколько раз промывали дистиллированной водой, чтобы избавиться от следов соляной кислоты. Осадок растворяли в определенном объеме дистиллированной воды. Из этого раствора отбирали аликвоты на определение оксипролина. Для определения оксипролина использовали:

раствор А: 1 объем раствора хлорамина-Т (70 мг/мл) и 4 объема ацетат-цитратного буфера pH 6 (0,4 М ацетат натрия, 0,1 М цитрат натрия, 38,5% изопропиловый спирт).

раствор В: 3 объема раствора диметиламинобензальдегида (ДМАБ), представляющего 66% раствор перекристаллизованного ДМАБ в 60% хлорной кислоте, и 13 объемов изопропилового спирта.

Состав экспериментальной пробы: к 0,2 мл исследуемой пробы добавляли 0,4 мл изопропанола, хорошо перемешивали и затем вносили 0,2 мл раствора А, пробы оставляли при комнатной температуре на 4 –5 минут, далее добавляли по

2,6 мл раствора В, хорошо перемешивали, пробирки покрывали парафильмом и прогревали 25 минут на водяной бане при 60°C. Пробы охлаждали в проточной воде 10-15 мин. Спектрофотометрические измерения проводили при длине волны 558 нм. Полученные данные соотносили с калибровочной кривой, построенной по L-оксипролину в диапазоне от 0,2 мкг до 10 мкг. Содержание оксипролина составляет 1/7,46 часть молекулы коллагена I типа из кожи крыс.

Получение меченого флуоресцеинизотиоцианатом коллагена.

Использовали модифицированный метод Vaichi et al. [10]. Для введения метки брали 20 мл коллагена с концентрацией 5,8 мг/мл при pH 3,5. Раствор коллагена доводили до pH 9,5 концентрированным раствором Na₂CO₃, далее по каплям в течение 1 часа вносили 2 мг FITC, растворённого в 1 мл DMSO (молярное соотношение коллаген/FITC = 1:10; 1:15). Процесс проводили на ледяной бане при постоянном перемешивании. Далее раствор коллагена в течение часа оставляли на ледяной бане для более полного прохождения реакции. Затем раствор меченого коллагена центрифугировали 25 минут при 10000 об/мин (Beckman J-25, ротор - JA-18), осадок отбрасывали. Супернатант диализовали в течение ночи против 4 - 5 литров 0,05 М трис-HCl pH 7,6 с добавлением 1 мМ CaCl₂. Осадок, образовавшийся в процессе диализа, отделяли центрифугированием в течение 15 минут при 10000 об/мин (Beckman J-25, ротор - JA-18) и растворяли в 20 мл 0,2 % уксусной кислоты. Переосаждение меченого FITC коллагена проводили 2-3 раза до полной потери окрашивания в супернатанте и низких контролей по флуоресценции при 490 и 520 нм (возбуждение и поглощение соответственно), при последующем получении пленок. Далее раствор меченого коллагена, объем которого составил 25 мл, доводили до pH 4,0 с помощью 1 М NaOH, затем добавляли NaCl до концентрации 0,2 М, раствор делили на аликвоты по 1 мл и хранили при температуре -20°C.

Концентрация меченого коллагена была определена по содержанию оксипролина и составила 3,6 мг/мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Меченый флуоресцеинизотиоцианатом коллаген использовали для определения активности интерстициальной и бактериальной коллагеназ. Раствор меченого коллагена доводили до pH 7,6 концентрированным трис-HCl буфером. После чего 15 мкл коллагена вносили в короткой стеклянные пробирки, пробы инкубировали в течение 2 часов при температуре 35°C до образования реконструированных фибрилл (пленок). Затем в течение 1-2 часов эти пробы инкубировали в 1-2 мл 0,01 М трис-HCl буфера pH 7,6 с добавлением 1 мМ CaCl₂ и 0,2 М NaCl (рабочий буфер) для промывания пленок от слабо связанного флуоресцеина (иногда эту процедуру повторяли дважды). Буфер отбирали, и на поверхность пленок наносили исследуемые пробы. Значение флуоресценции в контрольных пробах не превышало 20-25 единиц флуоресценции. В качестве источника бактериальной коллагеназы служили препараты коллагеназы *Cl. histolyticum* (в пробы вносили от 2 до 15 мкг фермента), источником тканевой интерстициальной коллагеназы служили лизаты фибробластов, трансформированных геном E7 вируса папилломы человека – HPV-16 (в пробы вносили от 3 до 50 мкл супернатанта клеточного лизата, что соответствовало 30–500 тысяч клеток). После внесения соответствующего количества фермента объем пробы доводили до 1 мл 0,01 М трис-HCl буфером pH 7,6 с добавлением 1 мМ CaCl₂ и 0,2 М NaCl. Инкубацию проводили в течение 18-20 часов при 35°C. Контролем служили пробы, инкубированные с буфером, а также пробы с определенным количеством трипсина (от 2 до 10 мкг). После ночной инкубации (20 часов) пробы аккуратно отбирали пипеткой и флуоресценцию измеряли при длинах волн 490 и 520 нм возбуждения и поглощения соответственно. Данные по гидролизу флуорогенного коллагена бактериальной коллагеназой представлены на рисунке 1. Действие бактериальной коллагеназы характеризовалось линейной зависимостью выхода меченого продукта в течение первых двух часов инкубации при концентрации фермента 2

мкг/пробу. Дальнейшая инкубация приводила к полному растворению пленки, что свидетельствовало о 100% гидролизе субстрата. Использование различных количеств коллагена для гидролиза бактериальной коллагеназой позволило построить кривую зависимости изменения флуоресценции от количества прогидролизованного коллагена (при 100% его гидролизе) и использовать эту кривую в качестве калибровочной кривой для расчета активности тканевого фермента в мкг гидролизованного субстрата (рис 2 А, Б; рис 3). Гидролиз пленок трипсином был показателем степени их возможной денатурации при мечении коллагена. В наших экспериментах он не превышал 5-10% (рис 1) В качестве источника тканевой коллагенолитической активности использовали супернатанты лизатов фибробластов, трансформированных геном E7 HPV-16. Данные, представленные на рисунке 3, свидетельствуют о том, что тканевые ферменты эффективно гидролизуют полученный субстрат. Результаты представлены как по выходу меченого продукта, т.е. по изменению флуоресценции, так и рассчитаны в мкг гидролизованного субстрата, исходя из калибровочной кривой, построенной по гидролизу меченого коллагена бактериальной коллагеназой (рис. 2 Б). Из представленных данных следует, что флуорогенный коллаген может быть использован в качестве субстрата для определения коллагенолитической активности, в первую очередь, активности интерстициальной коллагеназы - фермента, специфически гидролизующего коллаген I типа. Этот метод удобен для проведения скрининговых исследований. Метод получения меченого субстрата достаточно прост, хорошо воспроизводим и недорог. Следует отметить, что потребность в субстратах для тканевых коллагеназ (интерстициальной коллагеназы - ММП-1, желатиназ А и В - ММП-2 и ММП-9 соответственно) достаточно велика в связи с их значимостью в развитии целого ряда нормальных и патологических процессов, о чем свидетельствуют многочисленные публикации последние о времени [16,17].

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 04-04-49048а).

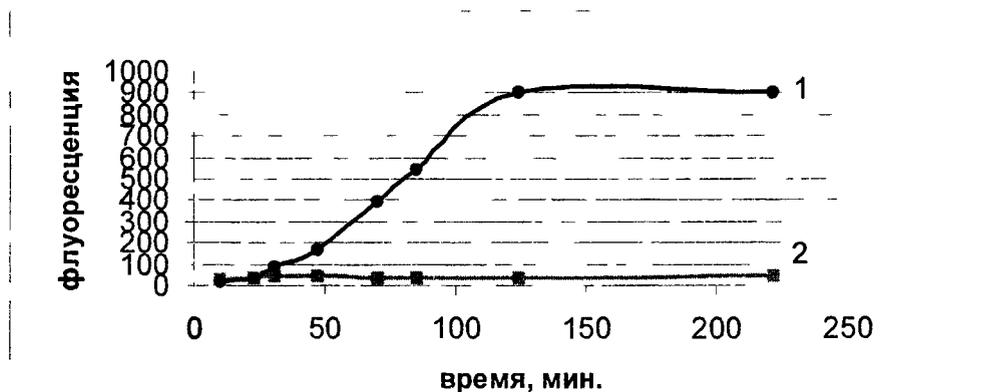


Рисунок 1.

Динамика гидролиза меченого флуоресцеинизотиоцианатом коллагена (15 мкг) бактериальной коллагеназой *Cl histolyticum* (2 мкг) (1), трипсином (2 мкг) (2)

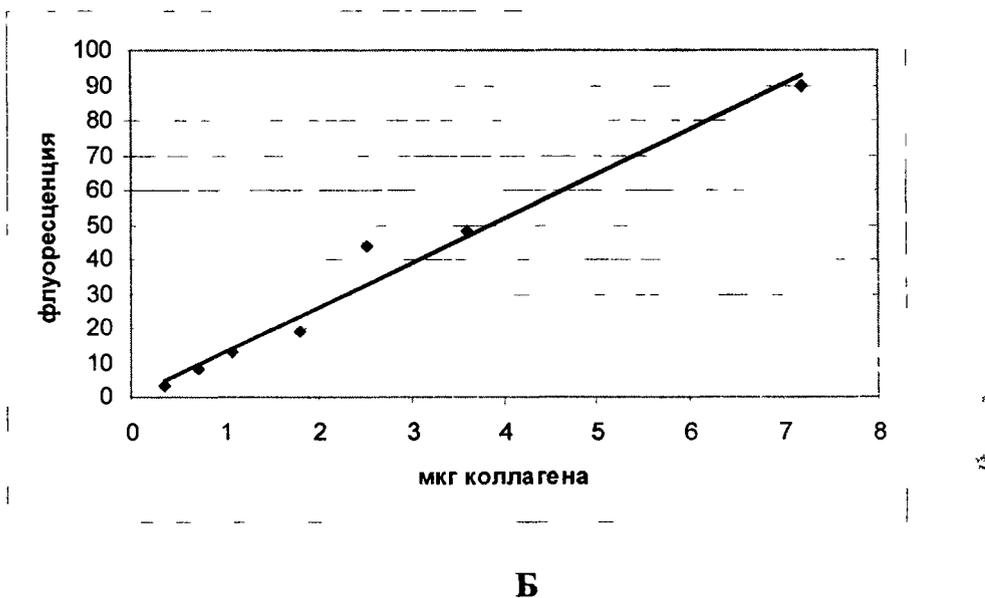
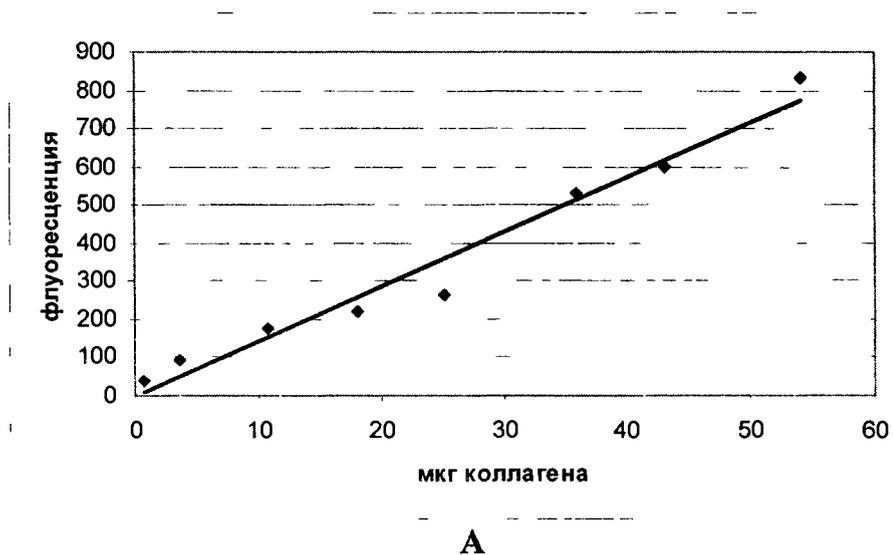


Рисунок 2.

Зависимость изменения флуоресценции (выход флуорогенного продукта) от количества коллагена гидролизованного 2 мкг бактериальной коллагеназы
 А - диапазон количества коллагена от 3,6 до 54 мкг (54 мкг соответствуют 15 мкл коллагена пленки), Б - диапазон количества коллагена от 0,36 до 7,2 мкг (калибровочная кривая, используемая для расчета количества гидролизованного коллагена в опыте)

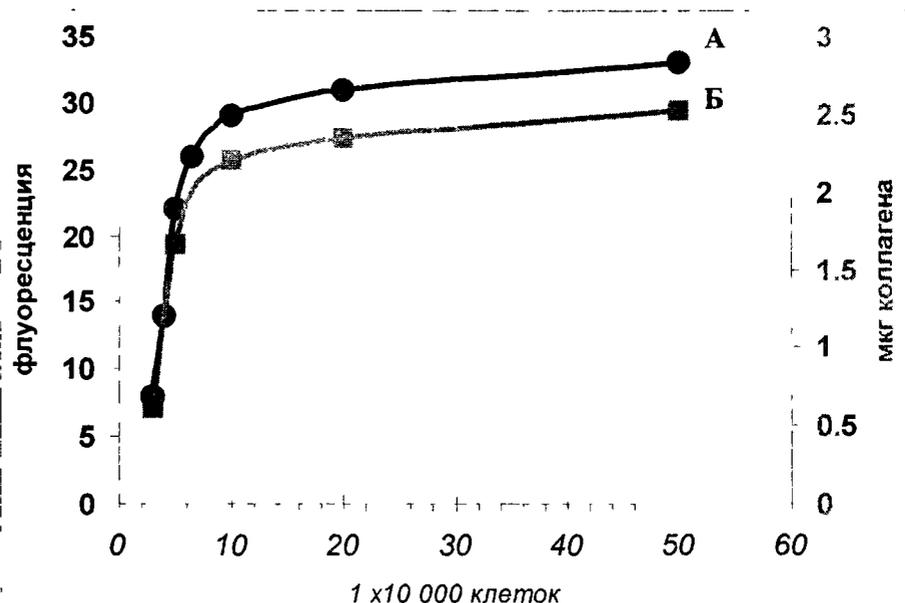


Рисунок 3.

Коллагенолитическая активность лизатов трансформированных фибробластов, определенная по гидролизу меченого флуоресцеинизотиоцианатом коллагена. Данные выражены двумя способами: 1) с помощью изменения флуоресценции (А); 2) в количестве гидролизованного коллагена (Б) в зависимости от количества коллагенолитических ферментов, содержащихся в определенном количестве клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Соловьева Н.И. (1998) *Биоорг. химия*, **50**, 245-255
2. Visse R., Nagase H. (2003) *Circul. Res.*, **92**, 827-839
3. Stack M.S., Gray R.D. (1989) *J.Biol. Chem.*, **264**, 4277-4281
4. Knight C.G., Willenbrock F., Murphy G. (1992) *FEBS Lett.*, **296**, 263-266
5. Nagase H., Fields C.G., Fields G.B. (1994) *J.Biol. Chem.*, **269**, 20952-20957
6. Bicket D.M., Green M.D., Berman J., Dezube M., Howe A.S., Brown P.J., Roth J.T., McGeehan G.M. (1993) *Anal. Biochem.*, **219**, 383-384
7. Beekman B., Drijfhout J.W., Bloemhoff W., Ronday H.K., Tak P.P., Koppelaar J.M. (1996) *FEBS Lett.*, **390**, 221-225
8. Cawston T.E., Murphy G. (1981) *Meth. Enzymol.*, **80**, 711-722
9. Macartney H.W., Tschesc H. (1980) *FEBS Lett.*, **119**, 327-332
10. Baichi A., Cohen G., Fehr K., Boni A. (1980) *Anal. Biochem.*, **108**, 230-232
11. Steven F.S. (1975) *Connect. Tissue Res.*, **4**, 1-6
12. Steven F.S., Torre-Blanco A., Hunter J.A.A. (1975) *Biochim. Biophys. Acta*, **405**, 188-200
13. O'Grady R.L., Nethery A., Hunter N. (1984) *Anal. Biochem.*, **140**, 490-494
14. Соловьева Н.И., Балаевская Т.О., Макеева О.С., Орехович В.Н. (1980) *Вопр. мед. химии*, **26**, 674-677
15. Burleigh M.C., Barrett A.J., Lazarus G.S. (1974) *Biochem. J.*, **137**, 387-398
16. Hamacher S., Matern S., Roeb E. (2004) *Dtch. Med. Wochenschr.*, **129**, 1976-1980
17. Beaudoux J.L., Giral P., Bruckert E., Foglietti M.J., Chapman M.J. (2004) *Clin. Chem. Lab. Med.*, **42**, 121-131

Поступила: 03. 12.2004

**THE ASSAY OF TISSUE COLLAGENASE ACTIVITY USING FLUORESCCEIN
ISOTHIOCYANATE LABELED COLLAGEN.**

O.S. Ryzhakova, N.I. Solovyeva

Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, 10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia;
fax:245-08057; e-mail: Nina.Solovyeva@ibmc.msk.ru

This report describes the assay of collagenolytic activity, particularly activity of tissue collagenases, using the reconstituted fibrillls of fluorescein-labeled collagen type I as substrate. Labeling of soluble rat skin collagen was carried out by the modified method of Baichi et al 1980. This method is very sensitive, reproducible and useful for screening large number of samples.

Key words: collagenolytic activity, tissue collagenase, collagen type I, fluorescein isothiocyanate.