

УДК 612.67.575.7+616.092
©Коллектив авторов

МОДИФИКАЦИЯ КОЛЛАГЕНА ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ СВЕТА

Г.А. Реброва*, В.А. Быков, Л.А. Осипова, Л.Б. Ребров, В.К. Василевский

Всесоюзный научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений РАСХН, ул. Красина, 2, 123056 Москва; тел.: 254-11-93;
факс: (495) 254-56-81; эл. почта: galinarebrova@mtu-net.ru

Изучена химическая модификация коллагена под воздействием видимого спектра солнечного света. Эти изменения свидетельствуют о наличии процессов фотодеградации и фотоокисления в структуре белка.

Ключевые слова: коллаген, видимый спектр солнечного света, фотомодификация.

ВВЕДЕНИЕ. Проблема фотостарения кожи в процессе жизни человека, является важной как в медицинской практике, так и в косметологии.

Поверхность кожи человека подвергается воздействию многочисленных факторов окружающей среды, включающих температуру и солнечный свет, который состоит из УФ излучения, а именно спектров УФ-А (320-390 нм), УФ-В (290-320 нм) и видимого света (400-700 нм). Согласно литературным данным, наибольший вклад в процесс фотостарения кожи вносит облучение светом, содержащим ближний УФ-А (диапазон 320-390 нм), так как он наиболее активно проникает в кожу, модифицируя её белки, вызывая эритему, канцерогенез и другие морфобиохимические изменения [1, 2]. Известно, что УФ-А воздействие генерирует активные формы кислорода, такие как супероксидные анионы (O_2^-), перекись водорода (H_2O_2), гидроксильные радикалы (ОН) [3].

В тоже время нельзя исключить и влияние видимого спектра солнечного света при его действии на кожу человека.

Основным белком кожи является высокомолекулярный фибриллярный белок коллаген (80-85% от сухого веса). Отсюда важным является изучение влияния различных факторов и в частности светового облучения именно на коллагеновые структуры ее поверхности.

Ранее нами было изучено влияние дальнего (УФ-С) и среднего (УФ-В) света на биохимические и спектрофото - и флуориметрические свойства коллагеновых пленок. При этом фотохимические процессы, протекающие под влиянием

* - адресат для переписки

МОДИФИКАЦИЯ КОЛЛАГЕНА ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ СВЕТА

этого спектра светового воздействия, включают реакции фотоокисления, фотодеградации и фотоконформационные изменения, а также образование новых хромофорсодержащих соединений и дополнительных поперечных связей в коллагеновых молекулах [4].

Целью настоящего исследования является изучение механизма влияния видимого света на биохимические и физико-химические свойства коллагена – основного белка кожи человека.

МЕТОДИКА. Объектом исследования служили коллагеновые пленки, полученные из коммерческого чистого препарата коллаген типа I фирмы "Serva".

Образцы облучали видимым спектром солнечного света, используя лампу КГМ 24-250 (400-700 нм) 3000 люксов. Время воздействия 110 и 312 часов.

Контролем служила коллагеновая пленка, хранившаяся указанное выше время в темноте.

В работе использовали методы исследования:

1) Последовательная обработка коллагеновой пленки водой 24 часа при комнатной температуре, и затем, пепсином (отношение фермент/субстрат 1/10) при комнатной температуре 24 часа и пепсином (фермент/субстрат 1/10) при $t = 37^{\circ}\text{C}$ 22 часа. После каждой обработки смесь центрифугировали и в супернатанте определяли содержание оксипролина [5].

2) Протеолиз коллагеновой пленки ферментными препаратами коллагеназой и пепсином до и после облучения проводили при $t = 37^{\circ}\text{C}$ в течение 22 часов соотношением фермент/субстрат 1/20 и 1/100. В гидролизате определяли оксипролин после его предварительного полного кислотного гидролиза.

3) Оценка содержания карбониллов в исследуемых образцах по реакции с 2,4-динитрофенилгидрозином [6].

4) Определение интенсивности флуоресценции щелочных гидролизатов коллагеновой пленки при заданном возбуждении и эмиссии $ex370/em440$ нм, $ex320/em395$ нм, $ex300nm/em360$ нм, а также при заданной эмиссии 450 нм определяли величину возбуждения при длине волны от 250–420 нм. Анализ проводили с использованием спектрофлуориметра "Shimadzu RF 540".

5) Молекулярную массу продуктов щелочного гидролиза коллагена (3 мин. при $t=100^{\circ}\text{C}$ в 1 М NaOH) и протеолиза белка пепсином (фермент/субстрат 1/10 $t=37^{\circ}\text{C}$, продолжительность 22 часа) до и после светового воздействия оценивали методом гель-хроматографии на колонке с "Toyopearl HW-55 F". При этом, на выходе с колонки собирали фракции по 5 мл и в каждой определяли оксипролин.

6) Спектрофотометрическую характеристику щелочных гидролизатов коллагеновой пленки после всех исследуемых световых воздействий проводили в области от 200 до 450 нм на спектрофотометре Shimadzu – HPS 2000.

Приведены средние величины из трех независимых экспериментов (\pm стандартные отклонения). Расчитана достоверность полученных данных (p). Данные обрабатывали статистически, используя t-критерий распределения Стьюдента для малых выборок [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Характер возможных структурных фотохимических изменений под воздействием видимого света оценивали по величине протеолиза *in vitro* коллагена образцов пленок протеолитическими ферментными препаратами – коллагеназой и пепсином. Эти протеазы выбраны нами с учетом разного по специфичности действия их на структуру коллагеновых молекул *in vitro* [8].

С целью более точной оценки гидролиза белка под воздействием указанных ферментных препаратов нами были проведены исследования при различных отношениях фермент/субстрат 1/20 и 1/100.

Из представленных в таблице 1 данных видно, что в процессе светового облучения коллагеновые структуры характеризуются различными величинами протеолиза под действием пепсина и коллагеназы (достоверные отличия $p < 0,01$).

Таблица 1. Величина протеолиза коллагеновой пленки ферментными препаратами до и после облучения видимым светом.

Образцы коллагеновой пленки	Количество оксипролина в инкубационной смеси после протеолиза (%)		
	соотношение фермент/ субстрат	коллагеназой	пепсином
до облучения	1:20	76,5±2,3	40,1±1,7
	1:100	58,2±1,6	23,7±1,3
после облучения 110 ч	1:20	81,2±2,7	61,2±1,9
	1:100	—	—
после облучения 312 ч	1:20	89,0±2,6	74,1±2,1
	1:100	73,7±2,5	59,8±1,8

Так, после воздействия видимым светом на коллагеновую пленку в течение 110 и 312 часов структура белка становится несколько менее устойчивой к действию протеаз. При этом, величина протеолиза коллагеназой повышается с 76,5% (контроль) до 89,0% после светового воздействия. Степень гидролиза коллагена пепсином возрастает более значительно с 40,1% (контроль) до 74,1%.

Однако следует отметить, что белок в результате облучения видимым светом приобретает меньшую стабильность к действию пепсина, который разрушает связи в концевых неспирализованных участках молекулы коллагена. При этом величина гидролиза белка коллагеназой, которая гидролизует связи в спирализованной части коллагеновых молекул, после светового воздействия возрастает, но не так значительно [9].

На основании данных по величине протеолиза *in vitro* коллагеназой и пепсином на коллаген при соотношении фермент/субстрат 1/100, также можно говорить о несколько большей модификации в результате облучения молекулы коллагена в её неспирализованной части. Так, если величина гидролиза (фермент/субстрат 1/100) белка коллагеназой увеличивается с 58,2% до 73,7%, то пепсином в 2,5 раза с 23,7% до 59,8%.

На рисунке 1 представлены результаты по последовательной обработке коллагеновой пленки водой, пепсином (фермент/субстрат 1/10) при комнатной температуре и пепсином при температуре 37°C (разница достоверна $p < 0,05$). Полученные данные свидетельствуют об изменении растворимости коллагена, под влиянием различных химических воздействий после облучения видимым светом. Так, экстракция коллагена водой из пленки после светового воздействия в течение 312 часов увеличивалась незначительно по сравнению с контрольными образцами с 3,4% до 6,2%. Протеолиз пепсином при температуре 37°C в течение 22 часов свидетельствует о несколько большем разрушении некоторых поперечных шивков в молекуле коллагена в процессе облучения его видимым светом. Так, при комнатных условиях гидролизует пепсином *in vitro* нативный белок на 18,0% и на 21,3% - опытный образец. С повышением температуры величина гидролиза также увеличивается с 38,9% (контроль) до 51,7% после 312 часов светового воздействия.

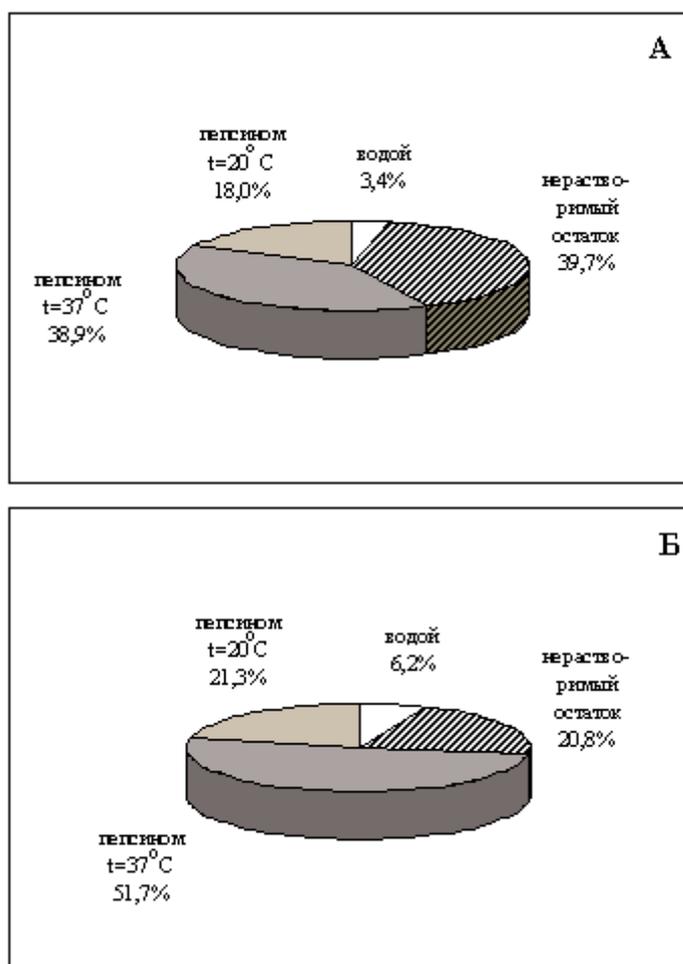


Рисунок 1.

Величина гидролиза коллагеновой пленки при последовательной обработке водой, пепсином при $t=20^{\circ}\text{C}$, пепсином при $t=37^{\circ}\text{C}$, нерастворимый остаток:

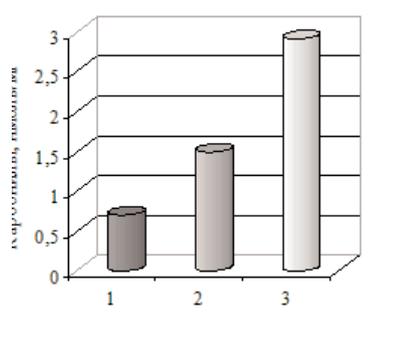
А - до облучения, Б - после облучения видимым светом 312 часов.

В следующей серии эксперимента была изучена возможность усиления окислительных процессов в структуре коллагена под влиянием видимого спектра светового облучения.

С этой целью исследовали содержание карбонилсодержащих соединений в молекуле белка до, и после облучения, присутствие которых, как известно, является показателем интенсивности окисления коллагена [10].

Из представленных на рисунке 2 данных видно, что в процессе облучения идет процесс накопления карбонильных групп ($p < 0,01$). Так, после воздействия видимым светом в течение 110 часов содержание их увеличивается в молекуле коллагена в 2 раза, а через 312 часов в 4 раза и составляет 1,49 и 2,91 нмоль/мг коллагена, соответственно. Содержание этих соединений в нативном коллагене - 0,7 нмоль/мг коллагена.

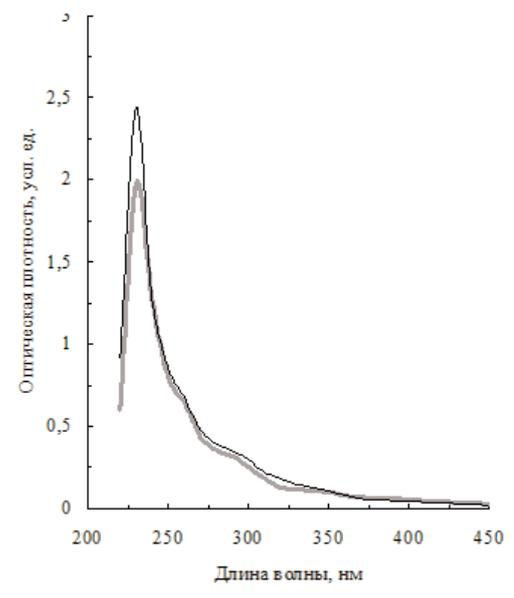
При световом воздействии имеют место довольно интенсивные окислительные процессы белка. Причем, это может быть связано и с окислением NH_2 -групп коллагена и с образованием в его структуре продуктов, содержащих кетонные и альдегидные группы [11].

**Рисунок 2.**

Количество карбонилсодержащих соединений в коллагеновых плёнках до и после облучения видимым светом: 1 - до облучения; 2 - 110 часов облучения; 3 - 312 часов облучения.

По визуальной оценке, при данном облучении коллагеновые пленки не приобретали дополнительную окраску, оставаясь светлыми как контрольные образцы. Об этом же свидетельствует проведенный нами спектрофотометрический анализ щелочных гидролизатов коллагена до, и после облучения в течение 110 и 312 часов в области спектра от 200 до 450 нм.

Данные, представленные на рисунке 3, свидетельствуют об отсутствии значительных изменений показателей абсорбции по всему исследуемому спектру. Некоторое увеличение в области около 300 нм, может свидетельствовать об образовании карбониллов, а также в УФ (230-250 нм) области за счёт возможной модификации остатков ароматических аминокислот

**Рисунок 3.**

Спектры поглощения щелочных гидролизатов коллагеновых плёнок до (—) и после (---) облучения видимым светом 312 часов.

МОДИФИКАЦИЯ КОЛЛАГЕНА ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ СВЕТА

Биохимические изменения в структуре коллагена под действием видимого света изучали также по характеру распределения продуктов щелочного гидролиза коллагеновой плёнки по молекулярной массе с помощью метода гель-хроматографии.

Из представленных на рисунке 4 данных видно, что после облучения в течение 312 часов характер продуктов щелочного гидролиза изменяется незначительно в сторону уменьшения содержания высокомолекулярной фракции (2000 кДа) и некоторым увеличением низкомолекулярных соединений от 60 до 25 кДа и ниже. Различие в распределении продуктов протеолиза пепсином до и после воздействия видимым светом отличается, более чётко выражено. После облучения коллагеновой пленки в течение 312 часов, в гидролизате уменьшается содержание высокомолекулярных полипептидов и резко возрастает количество соединений с более низкой молекулярной массой (от 89 до 25 кДт и ниже) (сдвиги достоверны $p < 0,05$).

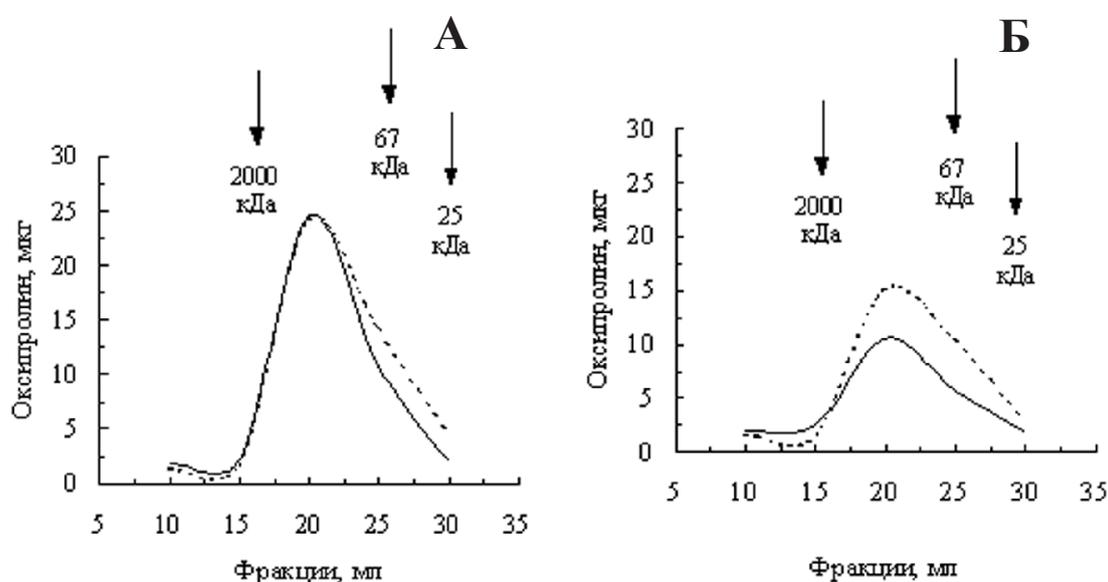


Рисунок 4.

Распределение по молекулярной массе продуктов щелочного гидролиза (А) и гидролиза пепсином (Б) коллагеновой пленки до и после облучения видимым светом 312 часов: — до облучения; - - - после облучения.

Эти результаты также подтверждают наши предположения о наличии процессов фотодеструкции в структуре коллагена при облучении видимым светом (400-700 нм) исследуемых пленок в течение 312 часов.

Модификация структуры коллагена в процессе светового облучения, как известно, может быть связана с образованием продуктов, обладающих способностью к флуоресценции [12]. Так, из представленных в таблице 2 данных видно, что в процессе облучения коллагеновой пленки видимым светом интенсивность флуоресценции при 440 нм незначительно увеличивается только после облучения в течение 312 часов. Увеличение интенсивности флуоресценции при $\lambda_{ex} 320/\lambda_{em} 395$ нм свидетельствует о фотомодификации коллагена, связанной с реакциями фотоокисления коллагена при облучении видимым светом 312 часов. Это также подтверждается данными по определению карбонильных групп в структуре белка в процессе воздействия на него видимого света.

Таблица 2. Интенсивность флуоресценции продуктов щелочного гидролиза коллагеновых плёнок до и после облучения видимым светом.

Образцы	Длина волны возб./эм., нм	Интенсивность флуоресценции, усл. ед.		
		ex300/em360	ex320/em395	ex370/em440
до облучения		7,0±0,9	13,8±1,1	3,3±0,4
облучение 110 час.		8,2±0,4	16,5±1,3	3,5±0,2
облучение 312 час.		10,0±0,9	21,9±1,1	4,4±0,1

Кроме того, нами отмечено некоторое увеличение показателя интенсивности флуоресценции при ex300/em360 нм, которую обычно связывают с фотохимическими изменениями таких аминокислот, как тирозин и фенилаланин.

Полученные данные свидетельствуют о том, что длительное (312 часов) облучение видимым светом коллагеновой пленки сопровождается фотоокислением коллагена, которое вовлекает окисление остатков ароматических аминокислот и образование новых флуоресцирующих фотопродуктов, содержащих карбонильные группы.

На рисунке 5 представлены спектры возбуждения флуоресценции с длиной волны 450 нм щелочных гидролизатов коллагена до и после облучения видимым светом.

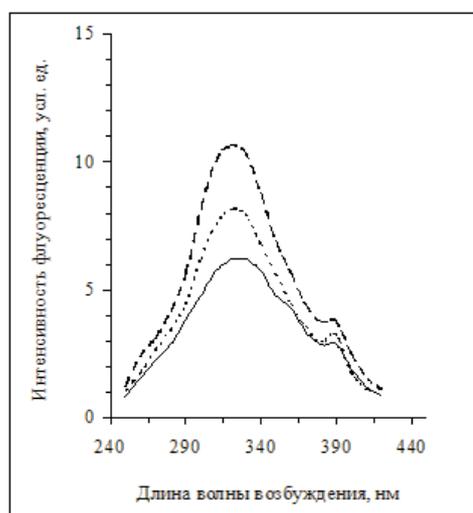


Рисунок 5.

Спектры возбуждения флуоресценции с длиной волны 450 нм щелочных гидролизатов коллагеновых пленок до и после облучения:
 — до облучения, - - - - - после облучения 110 часов, — — — — — после облучения 312 часов.

МОДИФИКАЦИЯ КОЛЛАГЕНА ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ СВЕТА

При этом можно отметить, что флуоресценция возрастает в диапазоне длин волн возбуждения от 290 до 390 нм, четко регистрируются два максимума 320 нм и 390 нм после светового воздействия 110 и 312 часов. Причем, после облучения в течение 312 часов эти различия более четкие. В результате воздействия видимым светом на коллагеновую пленку в структуре коллагена во времени увеличивается флуоресценция в диапазоне волн возбуждения 280 нм и 400 нм. Однако, по-видимому, образование этих флуоресцирующих соединений связано с протекающим процессом фотоокисления и фотомодификации структуры белка.

Таким образом, в процессе облучения коллагеновой пленки (110 и 312 часов) видимым светом имеет место структурная модификация коллагена, характеризующаяся изменением резистентности белка к протеазам, появлением новых карбонильных групп и незначительном увеличении содержания флуоресцирующих соединений.

При этом изменяются и другие биохимические свойства, а именно, растворимость белка под воздействием различных химических соединений. В процессе фотодеструкции коллагена под влиянием видимого света (400-700 нм) увеличивается доля растворимой фракции (в воде и под действием пепсина) и уменьшается нерастворимая часть. По-видимому, воздействие этого света (400-700 нм) в течение 312 часов в коллагеновой пленке имеет место разрыв нековалентных связей, а также внутри – и межмолекулярных сшивок в концевых телопептидах и незначительно в спирализованных участках молекулы белка.

Проведенный спектрофотометрический анализ щелочных гидролизатов коллагеновой пленки до и после облучения показал, практически отсутствие процесса фотомодификации в коллагене за счёт образования хромофорсодержащих соединений, поглощающих в области видимой части спектра 390-450 нм. Некоторое изменение в сторону увеличения абсорбции отмечено в области $\approx 300-320$ нм, что связано с образованием карбониллов, т.е. с процессом фотоокисления коллагена при облучении видимым светом в течение длительного воздействия (312 часов).

О наличии процессов деструкции коллагена свидетельствуют и результаты проведенной гель-хроматографии ферментного (после пепсина) и щелочного гидролизатов белка. Продукты протеолиза коллагена пепсином после облучения, по сравнению с нативным белком, характеризуются только незначительным снижением выхода высокомолекулярной фракции с молекулярной массой 2000 кДа, и более высоким низкомолекулярных соединений.

Спектрофлуориметрические исследования щелочного гидролизата, изучаемых коллагеновых пленок показали, что, по-видимому, образующиеся новые флуоресцирующие соединения не участвуют в стабилизации структуры коллагена, а их присутствием обусловлены процессы фотоокисления.

Таким образом, комплекс биохимических, спектрофотометрических и спектрофлуориметрических исследований коллагеновых пленок до и после облучения видимым светом показал наличие в структуре коллагена процессов фотодеструкции и фотоокисления. При этом отсутствуют процессы образования хромофорсодержащих соединений в видимой части спектра и флуоресцирующих соединений, которые могут влиять на колориметрическую характеристику коллагеновой пленки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Под влиянием видимого спектра солнечного света имеет место структурная модификация коллагена, характеризующаяся изменением резистентности белка к протеазам, появлением новых карбонильных групп и незначительным увеличением содержания флуоресцирующих соединений. Процесс фотодеструкции коллагена под влиянием видимого света в основном обусловлен реакциями фотоокисления и процессом разрушения межмолекулярных сшивок в молекуле белка. Причем в большей степени процесс фотодеструкции имеет место в концевых районах коллагеновой молекулы телопептидах и в меньшей

степени в её спирализованной части. Под воздействием видимой части спектра солнечного света не происходит образования хромофорсодержащих и флуоресцирующих соединений, которые могут влиять на колориметрическую характеристику коллагеновой пленки.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Wlaschek M., Tantscheva-Poor I., Naderi L.* (2001) *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, **63**, 41-51.
2. *Rittie L., Fisher G.J.* (2002) *Ageing Research Reviews*, **1**, 705-720.
3. *Podda M., Traber M.G.* (1998) *J. Free Radical Biol. Med.*, **24**, 5-65.
4. *Rebrova G.A., Vasilevsky V.K., Rebrov L.B. et al.* (2007) *Biochemistry (Moscow) Suppl. Series B: Biomedical chemistry*, **1**, 1-6.
5. *Stegemann H., Staider K.* (1967) *Clin. Chim. Acta*, **18**, 267-273.
6. *Cao G., Culter R.G.* (1995) *Arch. J. Biochem. Biophys.*, **320**, 106-114.
7. *Лакин Г.Ф.* (1980) Биометрия Из-во "Высшая школа", Москва, 96-110.
8. *Бержицкая В.В., Тимофеева М.В., Реброва Г.А., Василевский В.К., Со Сан Хо, Ребров Л.Б., Быков В.А.* (2002) *Бюлл. exper. биол. мед.*, **133**, 514-518.
9. *Tian S-F., Toda S., Higaahino H., Matsumura S.* (1996) *J. Biochem.*, **120**, 1153-1162.
10. *Miles C.A., Sionkowska A., Hulin S.L. et al.* (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**(42), 33014-33020.
11. *Ребров Л.Б., Реброва Г.А., Василевский В.К. и др.* (2008) *Биомед. радиоэлектроника*, **8-9**, 20-27.
12. *Obayashi H., Nakano K. et al.* (1996) *J. Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **226**(4), 37-41.

Поступила: 09. 12. 2008.

MODIFICATION OF COLLAGEN DURING ACTION LIGHT

G.A. Rebrova, V.A. Bykov, L.A. Osipova, L.B. Rebrov, V.K. Vasilevsky

State Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants, ul. Krasina, 2, Moscow, 123056 Russia;
tel.: (495) 254-11-93; e-mail: galinarebrova@mtu-net.ru

In work chemical modification of collagen during action visible spectrum sunlight. These changes of collagen were found to indicate a photodegradation and photooxidation processes in collagen.

Key words: collagen, visible spectrum sunlight, photomodification.