

УДК 616.04-085.277.3

© Коллектив авторов

ОЦЕНКА СОХРАННОСТИ И СОСТОЯНИЯ КОЛЛАГЕНОВЫХ СТРУКТУР В ТКАНЯХ МУМИИ

Ю.А.Ромаков, В.А.Быков, Г.А.Реброва, В.К.Василевский, Со Сан Хо, Л.Б.Ребров

Научно-исследовательский и учебно-методический Центр биомедицинских технологий ВИЛАР, 123056, г. Москва, ул. Красина, д.2
тел.: 254-39-77, 254-72-82; факс: (095)254-56-81

Изучено содержание и состояние коллагена в коже, мышечной и костной тканях алтайских мумий возрастом около 2500 лет. Коллаген является преобладающим белком в изученных тканях мумий. Высокая степень устойчивости коллагена тканей к действию протеолитических ферментов (коллагеназа, проназа, пепсин), к кислотному и щелочному гидролизу указывала на значительную химическую модификацию тканевых коллагеновых структур мумий. Обсуждаются возможности увеличения степени поперечного сшивания молекул коллагена в тканях мумий при длительном хранении и протекания при этом реакции неферментативного гликозилирования коллагена с образованием циклических продуктов Амадори и других модифицированных структур.

Ключевые слова: коллаген, старение, мумия.

ВВЕДЕНИЕ. Известно, что коллаген в силу своей уникальной молекулярной структуры считается одним из устойчивых и стабильных биополимеров в органах и тканях организма, обеспечивая в значительной степени их эластичность, упругость, стабильную макроструктуру и характерные биомеханические свойства [1, 2]. Известно, например, что посмертный аутолиз в соединительной, хрящевой и костной тканях выражен очень слабо, причём в наименьшей степени подвергаются аутолитическим воздействиям именно коллагеновые структуры тканей [3]. Имеется также обширная литература, показывающая значительные изменения физико-химических свойств и цвето-оптических характеристик коллагена при различных патологиях и при старении [4-6].

Целью настоящего исследования была биохимическая оценка сохранности и состояния коллагена в тканях мумий человека из скифского захоронения на юге Алтая, пролежавших в условиях вечной мерзлоты в течение 2500 лет.

МЕТОДИКА. В работе использовали микрообразцы (0,1-0,3 г.) кожи, мышечной и костной ткани двух мумий (мумия-1 ["Принцесса"] и мумия-2 ["Воин"]), находившихся в НИЦ БМТ для консервации и реставрации в 1993-1995 г. Содержание коллагена в тканях определяли по количеству оксипролина [7]. Определение общего азота в тканях и растворах проводили по классическому методу Кьельдаля с использованием автоматического анализатора "Кьельтек ауто систем". Оценку состояния и модифицированности тканевых белков мумий проводили по определению устойчивости белков к действию протеолитических ферментов (проназа, пепсин, коллагеназа) [8,9] и по степени экстрагируемости белков тканей растворами кислот и щелочей [10,11]. Данные обрабатывали, используя распределение Стьюдента для малых выборок [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Результаты анализа изученных микрообразцов кожи мумий и нативной кожи человека на содержание коллагена представлены в табл. 1.

Таблица 1. Содержание коллагена в коже мумий (г/100 г сухой ткани).

Образцы кожи	Общее количество белка по содержанию общего азота	Количество коллагена
Нативная кожа	$90,2 \pm 4,2$	$84,5 \pm 2,9$
Кожа мумии-1	$14,4 \pm 1,5$	$12,4 \pm 0,8$
Кожа мумии-2	$35,0 \pm 2,8$	$27,0 \pm 1,1$

Как видно из таблицы, общее количество сохранившихся в коже мумий белков составляет 15-35%, и в основном белки представлены коллагеном. Как известно, в нативной коже человека общее содержание белков в расчёте на вес сухой ткани составляет более 90%, а содержание коллагена - около 65-70% [13]. Проведённые исследования показали, что большая часть сохранившихся белков кожи мумий (т. е. коллагеновых белков) были практически нерастворимы в водных растворах и проявляли высокую степень стабильности и устойчивости к различным химическим воздействиям (обработка 1 NaOH и 0,5 М уксусной кислотой) и к действию различных протеолитических ферментов (табл. 2).

Таблица 2. Резистентность коллагена кожи мумии к ферментативному и неферментативному протеолизу.

Образцы кожи	Величина протеолиза коллагена, %					
	Коллагеназа	Проназа	Пепсин	Уксусная кислота 0,5 М 48 час, 37°C	1N NaOH 48 час, 37°C	1N NaOH 10 мин, 100°C
Нативная кожа	$78,2 \pm 28$	$32,9 \pm 1,4$	$69,1 \pm 2,6$	$7,9 \pm 0,1$	$65,2 \pm 1,1$	$98,9 \pm 1,5$
Кожа мумии-1	$12,4 \pm 0,42$	$12,2 \pm 0,3$	$7,2 \pm 0,51$	$0,9 \pm 0,07$	$26,0 \pm 1,2$	$49,8 \pm 0,3$
Кожа мумии-2	$12,9 \pm 0,35$	$11,2 \pm 0,2$	$1,9 \pm 0,2$	$0,8 \pm 0,05$	—	$36,7 \pm 0,2$

Примечания: Здесь и в следующей таблице величину протеолиза выражали в количестве оксипролина, перешедшего в раствор (в %). За 100% принималось количество оксипролина, содержащегося в образце ткани.

Данные, представленные в табл. 2, указывают на очень высокую и практически одинаковую стабильность коллагена кожи мумий к действию различных протеолитических ферментов, обладающих различной специфичностью, различным механизмом действия на белок и различной протеолитической активностью в отношении самого коллагена. Полученные данные указывали на высокую структурную стабильность молекул коллагена кожи мумий по сравнению с нативной кожей.

В процессе проведения исследования не удалось повысить величину протеолиза коллагена кожи мумий при комбинированном применении воздействия на ткань протеолитических ферментов: сначала обработка проназой, затем добавление коллагеназы и пепсина, и, наконец, обработка коллагеназой. Во всех случаях величина протеолиза находилась в диапазоне 10-12%. При этом коллаген нативной кожи гидролизировался на 80-90%. Полученные результаты указывали на высокую степень химической модификации коллагена в коже мумии, приводящей к "фиксированности" структуры этого белка кожи в процессе длительного сохранения мумии и обеспечивающей её стабильность к протеолизу.

Известно, что степень поперечного сшивания молекулярных цепей коллагена или различные конформационные изменения этого белка определяют также и характеристику другого биохимического показателя структурной стабильности коллагена - степень растворимости (или экстрагируемости) белка под действием солевых, кислых и щелочных растворов [13].

КОЛЛАГЕНОВЫЕ СТРУКТУРЫ В ТКАНЯХ МУМИИ

Данные, представленные в табл. 2, показывают, что по сравнению с нативной кожей растворимость коллагена кожи изученных мумий в кислоте и щёлочи снижена в 3-10 раз. Применяя комбинированное химическое и ферментативное воздействие на кожу мумии (сначала проводилась обработка микрообразца 1 NaOH при 22°C в течение 24 час, а затем - обработка коллагеназой), удавалось перевести в растворимое состояние только 40% коллагена кожи мумий. Для нативной кожи этот показатель обычно составляет 80-95%.

Полученные данные указывают, что мышечная ткань изученных мумий по белковому составу существенно отличается от нативной мышечной ткани человека. Так, например, известно, что у человека в нативной мышце отмечается относительно незначительное (около 1%) содержание коллагена [14]. У изученных мумий количество общего белка в мышцах, рассчитанное по содержанию общего азота, составляет всего 13-18% от веса сухой ткани и почти половину сохранившихся белков мышечной ткани составляет коллаген. По-видимому, большая часть белков мышечной ткани мумий разрушилась в процессе 2500-летнего хранения в захоронении даже в условиях вечной мерзлоты.

Вместе с тем, проведённые химические и биохимические исследования показали, что костная ткань мумий хорошо сохранилась и обладает чрезвычайно прочной коллагенной структурой. Во-первых, было обнаружено (табл. 3), что в исследованных образцах костной ткани (ребро) мумий содержание коллагена составляло 18,2% (для нативной костной ткани этот показатель составляет в среднем 22,3% от сухого веса ткани). То есть содержание в костных образцах мумии коллагена, на долю которого приходится 90% органического вещества кости [15,16], незначительно отличается от данных литературы. Во-вторых, наглядно продемонстрированы высокая степень резистентности коллагена костной ткани мумий к действию различных протеолитических ферментов и низкая величина экстрагируемости этого биополимера из ткани при обработке кости 1M NaOH и 0,5 M уксусной кислотой (табл. 3). Следует отметить, что коллаген в составе костной ткани мумии обладал и обладает весьма высокой устойчивостью к действию различных ферментативных и неферментативных повреждающих факторов при длительном хранении мумифицированного биоматериала.

Таблица 3. Оценка состояния коллагеновых структур мышечной и костной ткани мумий при различных обработках.

Образцы тканей мумий	Содержание коллагена %	Величина протеолиза коллагена, %				
		Коллагеназа	Проназа	Пепсин	1M NaOH 48 час, 37°C	0,5 M Уксусная кислота 48 час, 22°C
Мышца мумия-1	5,2	6,4 ± 0,5	10,2 ± 0,7	3,2 ± 0,1	22,4 ± 1,2	1,8 ± 0,1
мумия-2	9,1	—	—	—	—	—
Кость (ребро) мумия-1	18,2	6,5 ± 0,4	—	2,1 ± 0,08	48,9 ± 0,4	0,64 ± 0,5

Примечания: Определение содержания коллагена проводили по количеству оксипролина. Образцы кости декальцинировали обработкой ЭДТА и затем в них определяли содержание коллагена.

На основании полученных данных можно также констатировать, что в процессе длительного хранения мумий в захоронении в условиях вечной мерзлоты структура хорошо сохранившегося в коже, в костях и в мышцах коллагена претерпела существенные изменения. Можно предполагать, что, с одной стороны, произошло увеличение числа поперечных меж- и внутримолекулярных сшивок в коллагене. С другой стороны, можно также предположить и наличие химической модификации всех коллагеновых структур тканей мумии по типу реакции

Майлларда и, в частности, по типу неферментативного гликозилирования коллагена с образованием циклических продуктов Амадори [17-19] - процесса, активно протекающего в тканях человека при старении. В результате этого могут образовываться и дальше перестраиваться в ходе множественных химических превращений стабильные коллаген-содержащие структуры, которые имеют обычно желтовато-коричневый цвет. Они способны к флуоресценции, обладают специфическими спектральными характеристиками, могут образовывать сшивки с соседними тканевыми белками и обладают значительно большей устойчивостью и резистентностью к внешним воздействиям по сравнению с нативным коллагеном. По-видимому, именно такие модифицированные коллагеновые структуры имеются в тканях исследованных мумий в настоящее время и их характеристики чётко коррелируют и с внешним видом (цветом) мумифицированных тканей, и с физико-химическими свойствами сохранившегося в них коллагена.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Darwin P. (1994) Ann. Rev. Biochem., **64**, 403-434.
2. Страйер Л. (1984) Биохимия, "Мир", М., т.1, с.179-198.
3. Лушников Е.Ф., Шатило Н.А. (1974) Аутолиз, "Медицина", М., с.125-130.
4. Rittie L., Berton A. (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun., **264**, 488-492.
5. Sady C. (1995) Biochem. Biophys. Res. Commun., **214**, 793-797.
6. Cao G., Cutler R. (1995) Biochem. Biophys. Res. Commun., **214**, 930-935.
7. Stegemann H., Sadler K. (1967) Clin. Chim. Acta, **18**, 267-273.
8. Реброва Г.А., Денисов-Никольский Ю.И. (1981) Вопр. мед. химии, №5, 694-698.
9. Реброва Г.А., Денисов-Никольский Ю.И., Романов Ю.А. (1984) Вопр. мед. химии, №6, 102-106.
10. Brownlee M., Vlakara H. (1986) Science, **232**, 43-46.
11. Stever F.S. (1966) Biochim. Biophys. Acta, **130**, 196-201.
12. Лакин Г.Ф. (1980) Биометрия, "Высш. школа", М., с.96-110.
13. Слуцкий Л.И. (1969) Биохимия нормальной и патологически изменённой соединительной ткани, "Медицина", М., с.216-221.
14. Lawrie R.A. (1979) Meat Science, Oxford, New York, 75-131.
15. Jowsey J. (1968) Cornell. Vet., **58**, 74-94.
16. Zambolt V., Bolognani L. (1967) Chemical Composition and Metabolism of Cartilage and Bone. - Callus Formation, pp. 5-34.
17. Hangaishi M. (1998) Biochem. Biophys. Res. Commun., **248**, 285-292.
18. Zyzak D.V. (1995) Archiv. Biochem. Biophys., **316**, 547-554.
19. Bellmunt H.J. (1995) Biochim. Biophys. Acta, **1272**, 53-60.

Поступила 14.12.01.

EVALUATION OF THE PRESERVATION AND STATE OF COLLAGEN STRUCTURES IN TISSUES OF MUMMY.

Y.A.Romakov, V.A.Bykov, G.A.Rebrova, V.K.Vasilevsky, So San Ho, L.B.Rebrov.

Scientific Research and Edicontrol Center of Biomedical Technologies 123056, Moscow, Krasina str. 2 tel. 254-39-77, 254-72-82 fax. (095) 254-56-81

The content and state of collagen in skin, muscle and bone of 2500-year-old Altai mummies were studied. Collagen is the predominant protein in studied tissues of the mummies. High degree of the resistance of collagen to the effect of various proteases (collagenase, pronase, pepsin) and to alkaline and acidic hydrolysis suggests on the considerable chemical modification of tissue collagen structures of the mummy. The possibility of increased collagen cross-linkages in tissues of the mummies during long-term storage and of nonenzymatic glycosylation of collagen leading to the formation of Amadori products and other modified structures are discussed.

Key words: collagen, aging, mummy.