

УДК 612.67.575.7+616.092

©Коллектив авторов

НЕКОТОРЫЕ ФАКТОРЫ СТАРЕНИЯ КОЛЛАГЕНА *IN VIVO И IN VITRO.*

*Г.А. Реброва, В.В. Бержицкая, В.К. Василевский,
М.В. Тимофеева, Со Сан Хо.*

Научно-исследовательский и учебно-методический центр биомедицинских технологий
123056, Москва, ул. Красина, 2; факс: (095)254-5681

В обзоре проанализированы литературные данные о различных факторах старения основного белка соединительной ткани - коллагена. Обсуждены механизмы реакций, протекающих в процессе как возрастного, так и неферментативного пути старения белка, и возникающие при этом патологические проявления. Рассмотрены пути торможения неферментативного гликирования белка различными соединениями для исключения влияния этого процесса на возрастную патологию.

Ключевые слова: коллаген, старение, неферментативное гликирование, гликоокисление, свободные радикалы, реакция Майяра.

ВВЕДЕНИЕ. Коллаген - важный структурный белковый компонент межклеточного вещества соединительной ткани - играет существенную, а часто и определяющую роль в морфогенезе, развитии и старении большинства органов и тканей человека и животных.

Содержание коллагена во взрослом состоянии составляет около 30% от всех белков организма. Примерно 50% коллагена приходится на костную и сухожильно-мышечную систему, более 40% содержится в коже, в стенках кровеносных сосудов - 5-10%, в паренхиматозных органах - 2-8%, в скелетных мышцах - около 1-2% [1].

Коллаген обладает уникальным строением, отличающим его как от фибриллярных, так и от глобулярных белков. Он имеет чрезвычайно характерный аминокислотный состав (свыше 50% его аминокислотных остатков - это остатки глицина и иминокислот - пролина и оксипролина) и своеобразную первичную структуру: в каждом третьем положении полипептидной цепи находится глицин, а за ним чаще других остатков расположен остаток иминокислоты. Особенности первичной структуры коллагена определяют и характерную конформацию его макромолекул - тройную спираль, имеющую свойства жесткого стержня. Эта конформация, а также специфическое распределение зарядов на поверхности макромолекул обуславливают способность белка к образованию волокнистых (фибриллярных) структур межклеточного вещества соединительной ткани [2].

В настоящее время свойства коллагена изучаются довольно интенсивно и в самых различных направлениях. В частности, исследование этого белка имеет большое значение в связи с изучением таких важных биологических процессов как воспаление, регенерация, старение и т.д. [3,4]. Характерные изменения претерпевает соединительная ткань и входящие в ее состав коллагеновые волокна при патологических состояниях, которые обычно объединяют под общим названием "коллагеновые болезни" [5,6].

ФАКТОРЫ СТАРЕНИЯ КОЛЛАГЕНА

Значительный интерес представляет использование коллагена в восстановительной хирургии, а также для заживления ран различного происхождения [7].

Удобную модель представляет коллаген и для изучения общих и специальных проблем синтеза белков и принципов организации в клетках и тканях надмолекулярных структур. Возможность получения и использования клеток и тканей, активно синтезирующих в основном коллаген (воспалительные гранулемы, эмбриональная соединительная ткань, культуры фибробластов и т.д.), лёгкость идентификации этого белка ставят коллаген в более выгодное положение перед другими белками при решении общих вопросов белкового синтеза в клетке [8]. Наличие в составе этого белка необычных аминокислот (оксипролин и оксилизин), уникальность его аминокислотного состава позволяют решать на модели коллагена вопросы, касающиеся специфики синтеза некоторых индивидуальных белков: реакции гидроксирования пролиновых и лизиновых остатков, образование необычных внутри- и межмолекулярных поперечных связей и т.д. [9,10].

Кроме того, образование коллагенового волокна является результатом специфической укладки молекул коллагена относительно друг друга. Этот процесс не катализируется ферментами и легко может быть воспроизведен в определенных условиях *in vitro*, т.е. при моделировании коллагенеза и биопротезировании [11].

В настоящее время исследования в направлении изучения процесса старения коллагена *in vivo* и *in vitro* занимают значительное место в научных поисках по вопросам выяснения механизма изменения этого белка в тканях с возрастом, при различных заболеваниях (диабет, атеросклероз), при длительном хранении тканей в различных условиях (мумии, консервации), а также в составе лекарственных форм на основе коллагена при их длительном хранении. Кроме того, для медицинской практики является важным и получило широкое распространение изучение процессов фотодеградации и фотоокисления, которые также влияют на процесс старения белков соединительной ткани [12-15].

Возрастные изменения коллагена.

Хорошо известно, что с возрастом у человека и животных значительно изменяются морфо-функциональные свойства коллаген-содержащих тканей организма. В процессе старения заметно изменяются физико-химические свойства и самого коллагена: белок становится менее растворимым, менее эластичным, менее чувствительным к действию специфических и неспецифических протеаз и одновременно более прочным в биомеханическом отношении [16,17]. Считается, что возрастные изменения свойств коллагена связаны с увеличением поперечного связывания между молекулами коллагена, и что в образование стабильных поперечных связей в коллагене вовлечены ферментативные и неферментативные процессы [18].

Ферментативное окислительное дезаминирование ϵ -аминогрупп лизина и оксилизина коллагена вследствие активности фермента лизилоксидазы приводит к образованию альдегидных производных аллизина и оксиаллизина. Последние могут реагировать с лизиновыми или аллизиновыми остатками другой коллагеновой цепи, чтобы образовывать альдимины или альдоли, которые затем могут структурироваться до образования мультивалентного поперечного связывания в трехмерной поперечной сети коллагеновых фибрилл [19].

Предполагается, что межмолекулярные связи в коллагене образуются по следующей схеме: полученный из остатков лизина в результате окислительного дезаминирования δ -полуальдегид α -аминоадипиновой кислоты (аллизин) является промежуточным соединением, а внутримолекулярная поперечная связь возникает в реакции конденсации альдольного типа двух альдегидов соседних α -цепей с последующей их дегидратацией (образование α,δ -насыщенного альдегида). При рассмотрении механизма возникновения поперечных ковалентных связей в коллагене с участием альдегидов необходимо также учитывать реакции, приводящие к образованию шиффовых оснований за счет взаимодействия альдегидной группировки одной α -цепи и ϵ -NH₂-группы остатка лизина другой [20].

Образование поперечно связанных полимеров не наблюдалось, если коллагеновые фибриллярные структуры получали при использовании коллагена с пониженным содержанием ϵ -NH₂-групп лизина и оксилизина (амидирование коллагена) или белка с пониженным содержанием альдегидных групп (обработка тиосемикарбазидом) [21]. О важной роли поперечных связей, содержащих альдиминные группировки, в стабилизации структуры коллагеновых волокон было заявлено после того, как в частичных гидролизатах коллагена были обнаружены поперечно связанные пептиды, содержащие восстановленные боргидридом шиффовы основания (оксилизинонорлейцин, лизинонорлейцин). Причем, было показано, что стабилизация лабильных шиффовых оснований, образующих межмолекулярные поперечные связи как *in vivo*, так и *in vitro* (действие боргидрида), осуществляется путем их восстановления, в результате чего растворимость коллагена снижается и повышается устойчивость коллагенового волокна к химическим и ферментативным воздействиям [22].

Исследования последних лет показали, что возрастное развитие сети поперечных ковалентных связей в коллагене - сложный процесс, состоящий из увеличения общего числа связей, их стабилизации и смены одних типов связей другими. Так, общее количество связей, образующихся на основе лизина и оксилизина, при старении повышается, о чем свидетельствует уменьшение с возрастом числа свободных альдегидных и ϵ -NH₂-групп лизина и оксилизина в коллагене различных тканей [23]. Количество внутримолекулярных бифункциональных связей альдольного типа в коллагене позвоночных непрерывно возрастает при старении. На это указывает увеличение числа внутримолекулярно связанных δ - и γ -частиц в растворах денатурированного коллагена, полученного из разных типов соединительной ткани. Сшивки альдольного типа вообще характерны для внутримолекулярного связывания в коллагене [24,25].

В коллагене найдены также межмолекулярные бифункциональные сшивки (альдимины) типа шиффова основания (такие как дегидрооксилизинонорлейцин, дегидролизинонорлейцин) [26].

Из нерастворимого зрелого коллагена были выделены полифункциональные связи с одной или несколькими точками ветвления, объединяющие более двух α -цепей. Показано, что в образовании полифункциональных связей могут принимать участие альдоли, а также гистидин. Были охарактеризованы такие трифункциональные сшивки как дегидрооксимеродесмозин и тетрафункциональная сшивка - дегидрооксимерогистидин или гистидин-оксимеродесмозин [27].

Характерной чертой возрастных изменений содержания в коллагене межмолекулярных бифункциональных альдиминных сшивок является их уменьшение и практическое отсутствие во многих тканях зрелого организма. Это, казалось бы, находится в противоречии с представлением о возрастании при старении числа поперечных связей в коллагене, которое приводит к наблюдаемому в онтогенезе увеличению резистентности коллагена к внешним разрушающим воздействиям. Однако было показано, что при старении наблюдается возрастная смена одних типов связей другими (так дегидрооксилизинонорлейцин заменяется другими альдимидами, в частности, дегидрооксилизинонорлейцином). Следует отметить, что типы сменяющих связей и этапы онтогенеза, на которых происходит замена одних связей другими, зависит от типа ткани и вида организма [28].

Одним из важных условий возникновения возрастных изменений коллагена различных тканей является качественная и количественная гетерогенность поперечного связывания молекул этого белка. На основании предположения, что тканевые особенности гидроксирования лизина в молекуле коллагена играют важную роль в образовании тех или иных сшивок, было предложено разделить все ткани на три группы, учитывая степень гидроксирования лизина. К группе I отнесена зрелая кожа, в коллагене которой большая часть восстанавливаемых сшивок образуется с аллизином (оксилизиннорлейцин и гистидин-

ФАКТОРЫ СТАРЕНИЯ КОЛЛАГЕНА

оксимеродесмозин); II группа - кость, хрящ, эмбриональная кожа, в коллагене которых основной сшивкой является оксилизиноксинорлейцин; III группа - сухожилие, роговица имеет в коллагене представленные примерно равные количества сшивок обеих групп I и II [29].

Известно, что при старении коллагена меняется его фракционный состав, о чем свидетельствует уменьшение фракции нейтральнорастворимого коллагена, а также кислоторастворимого коллагена, который является несколько более "зрелой" фракцией, и резкое увеличение нерастворимого коллагена даже при жестких химических воздействиях [30]. С возрастом увеличивается и степень связывания коллагена с полисахаридами [31].

Среди факторов, определяющих изменения коллагена при старении, важная роль принадлежит ферментам, модифицирующим коллаген путем его гидроксилирования и гликозилирования: пролил-, лизилгидроксилазам и глюкозил-, галактозилтрансферазам. В частности, наблюдается возрастное снижение активности этих ферментов в различных типах соединительной ткани [32].

При старении коллагена также происходит снижение отношения пролин/оксипролин и уменьшение остатков оксилизина, которое происходит в основном в N-концевых областях $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -цепей и характеризуется тканевой специфичностью [33].

Известно, что на начальных стадиях развития организма дифференцировка тканей связана с качественными изменениями популяций коллагеновых молекул, синтезируемых клетками этих тканей, и сопровождается синтезом изомолекулярных форм коллагена в процессе развития. К настоящему времени из органов и тканей выделено до 18 типов коллагена. Наиболее часто встречающимися в различных тканях являются коллагены: тип I - $[\alpha 1(I)_2 \alpha 2]$; тип II - $[\alpha 1(II)_3]$; тип III - $[\alpha 1(III)_3]$ и тип IV - $[\alpha 1(IV)_3]$. Коллаген типа I встречается в основном в коже, костях, сухожилиях, роговице; типа II - в хрящевой ткани; типа III - в аорте, кишечнике, гладких мышцах; типа IV - в базальной мембране. Причем в процессе возрастных изменений различные ткани могут содержать либо один из этих типов, либо несколько типов коллагена в различных соотношениях [34].

О возрастной динамике синтеза и смене типов коллагена известно еще немного, но обнаружено, например, что в коже в онтогенезе отмечается уменьшение содержания коллагена типа III при одновременном повышении содержания коллагена типа I, а развитие костей сопровождается заменой коллагена типа II на коллаген типа I в окостеневающих участках ткани [35].

Биологическое значение тканевой и возрастной гетерогенности коллагена также не совсем ясно. Вероятно, одними из ее причин являются разные структурно-функциональные требования, предъявляемые организмом в один и тот же возрастной период к разным тканям и органам, и, соответственно, изменение этих требований в процессе старения, а также при периодических структурных перестройках отдельных органов (например, наличие патологии).

Представления о причинах и механизмах возрастных изменений коллагена могут быть сведены к двум точкам зрения. Согласно одной, эти изменения рассматриваются как результат воздействия на коллагеновые структуры внешних и внутренних повреждающих факторов, согласно другой - как генетическое или патологическое проявление возрастного развития коллагеновых структур (диабет, коллагеновые болезни и др.).

Внешними факторами, вызывающими изменения коллагеновых структур, сходными с возрастным старением коллагена, являются:

- временной фактор, т.е. хранение *in vitro* образцов коллагенсодержащих тканей в течение длительного времени при разной температуре и других внешних условиях;

- фактор окислительный, показывающий, что процесс созревания и старения коллагена замедляется при хранении в нейтральных газах или в вакууме и значительно ускоряется при наличии кислорода;

- обработка тканей или коллагена альдегидами *in vitro* сопровождается образованием дополнительных внутри- и межмолекулярных сшивок в молекуле коллагена, стабилизирующих его структуру;

- УФ-облучение кожи человека также увеличивает в коллагене количество поперечных связей;

- свободные радикалы, возникающие *in vivo* в ходе ферментативных и неферментативных реакций, *in vitro* инициируют процесс старения коллагена;

- взаимодействие коллагена с глюкозой *in vivo* и *in vitro* вызывает значительные изменения в структуре коллагена различных типов соединительной ткани, в его физико-химических и структурно-функциональных свойствах.

Неферментативное гликирование коллагена.

Известно, что в тканях *in vivo* существует побочный неферментативный механизм созревания и старения коллагена, названный как "гликирование", включающий реакцию взаимодействия коллагена с глюкозой и последующее окисление образующихся продуктов. Полагают, что это является причиной дисфункции коллагенсодержащих тканей в старческом возрасте или при различных патологиях (например, при диабете) [36].

Понимание на уровне клеточно-матриксного взаимодействия механизма неферментативного гликирования коллагена может быть одним из путей предотвращения эффектов старения организма.

Неферментативные реакции между глюкозой и белками обычно называются реакцией Майяра или реакциями "побурения" (см. схему). Цепочка этих реакций начинается со взаимодействия альдегидной группы (CHO) глюкозы и ϵ -NH₂-группы белка, в результате чего образуются так называемые шиффовы основания, которые в свою очередь вследствие медленно протекающих химических перегруппировок образуют продукты Амадори. Последние соединения, являясь относительно неустойчивыми, через ряд дополнительных превращений и модификаций (дегидратация, конденсация, фрагментация, окислительные и другие реакции, в ряде случаев еще не ясные) могут образовывать дальнейшие производные соединения, содержащие фруктозу. В конечном итоге появляются стабильные сахаро-аминокислотные структуры, которые ряд авторов называют конечными продуктами глубокого гликирования (КПГГ) [37,38].

Большинство образующихся КПГГ - желтовато-коричневого цвета, способны к флуоресценции и обладают специфическими спектральными характеристиками. Важно также, что многие из них могут образовывать сшивки с соседними белками [39].

Точная структура КПГГ и образующихся в них связей до сих пор не известна.

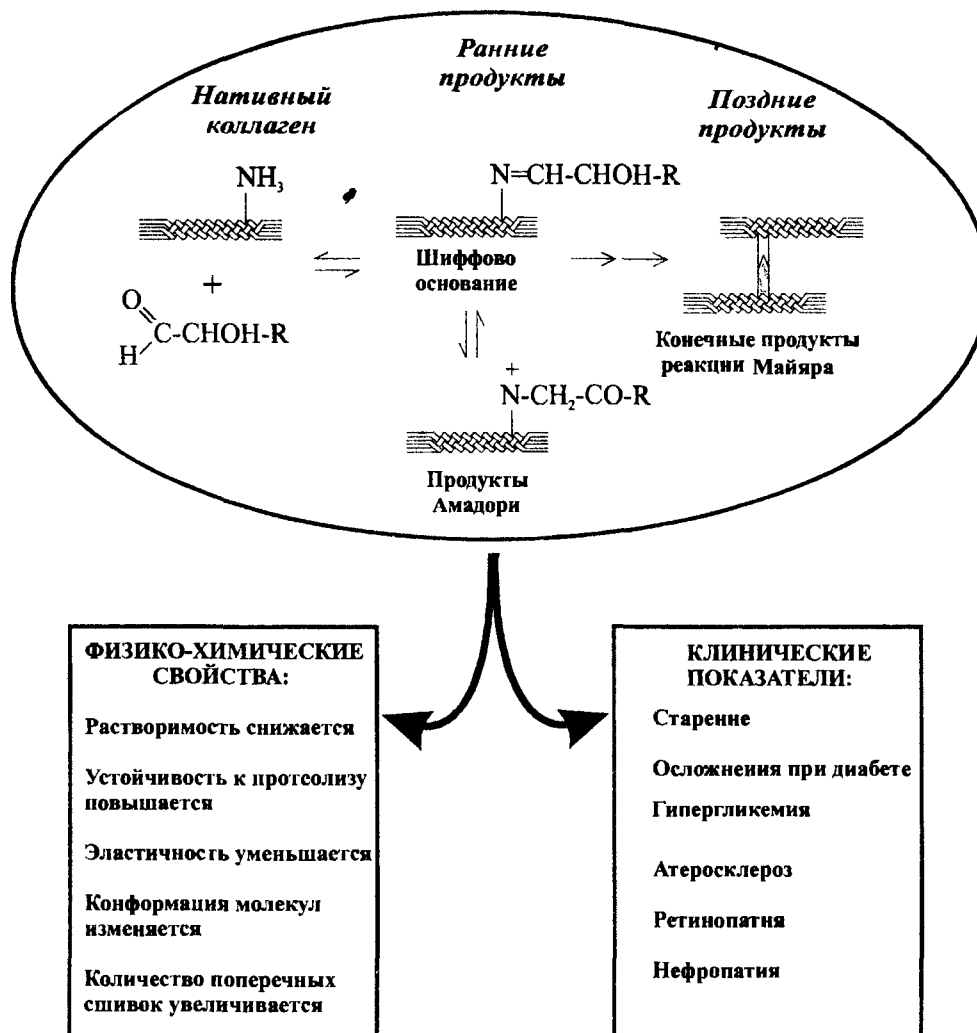
Согласно концепции Zyzak [40], главными соединениями, ответственными за конечную реакцию Майяра, являются продукты Амадори, которые после различных химических превращений образуют высоко реакционноактивные дезоксиглюкозоны - потенциальные предшественники поперечных связей белка. Эта концепция была оспорена Namiki [41], который нашел, что углеводная фрагментация происходит на стадии гликозиламина или шиффова основания, т.е. на стадии, предшествующей химическим превращениям Амадори.

Имеются доказательства, что реакции гликирования происходят в организме человека и животных. Сопутствующие структурные и функциональные изменения коллагена при реакции Майяра вносят свой вклад в развитие патологий, связанных с диабетом и старением, таких как слепота, нейропатия, сосудистые заболевания и почечная недостаточность. Эксперименты показали, что у людей и животных, больных диабетом, через определенное время развития болезни коллаген в тканях становится менее растворимым, меньше переваривается коллагеназой и более гликирован [42,43].

Процессы неферментативного гликирования коллагена можно исследовать и в условиях *in vitro*. Инкубация чистых препаратов коллагена или тканей, содержащих коллаген (кожа, сухожилие, хрящ и др.), в течение нескольких дней или недель в растворе глюкозы приводит к образованию дополнительных новых поперечных

ФАКТОРЫ СТАРЕНИЯ КОЛЛАГЕНА

СХЕМА НЕФЕРМЕНТАТИВНОГО ГЛИКИРОВАНИЯ КОЛЛАГЕНА



сшивок в молекуле коллагена. При этом образуются остатки гликолизина или гликооксилизина, которые и участвуют в образовании дополнительных поперечных связей в коллагене. Авторы показали, что в процессе неферментативного гликирования значительно изменялся такой показатель как растворимость белка в уксусной кислоте: через 12 недель инкубации коллагена сухожилия с глюкозой нерастворимый коллаген составлял 75%, а к 45 неделям инкубации доля нерастворимого коллагена возрастала до 85% от общего коллагена [44].

В другой работе [45] исследования проводили на нерастворимом коллагене сухожилий и кожи и определяли после инкубации с глюкозой другие показатели: степень гликирования (по реакции с тиобарбитуровой кислотой) и резистентность белка к перевариванию ферментом коллагеназой *Cl. hystoliticum*. Оба показателя увеличивались в процессе инкубации коллагена с глюкозой.

Проводили также работы по идентификации окрашенных и флуоресцирующих соединений, образующихся *in vitro* как конечные продукты реакции Майяра. В частности, был идентифицирован флуоресцирующий компонент пентозидин и показано, что при концентрации 1 молекулы пентозидина на 600 коллагеновых молекул количество этого соединения увеличивалось после 24 часов икубации коллагена с глюкозой [46].

Помимо пентозидина был обнаружен также еще один дополнительный флуоресцирующий компонент (компонент К) при исследовании сухожилия крысы, нормальной кожи человека (возраст от 16 до 83 лет) и кожи людей с диабетом (возраст от 10 до 33 лет). Компонент К образуется быстрее и в большем количестве, чем пентозидин, при инкубации коллагена с глюкозой *in vitro* и более медленно при инкубации с рибозой [47].

Анализ этого соединения проводили методом масс-спектро스코пии, электронного парамагнитного резонанса [45]. Кроме того, существенную роль в идентификации пентозидина и компонента К играло определение флуоресценции обоих этих соединений. При инкубации коллагена кожи с глюкозой приходится около 60% общей флуоресценции системы при 335/385 нм (компонент К - 45%, пентозидин - 15%) [48].

Это может свидетельствовать об образовании в процессе неферментативного гликирования белка других, пока не идентифицированных флуоресцирующих соединений. Кроме того, на основании данных биохимического анализа и морфоклинических показателей и их корреляции в настоящее время считается, что пентозидин является маркером накопления КППГ в процессе неферментативного гликирования и старения коллагена [49].

Для более полного понимания механизма процесса неферментативного гликирования и образования различных флуоресцирующих и нефлуоресцирующих соединений, придающих структуре коллагена дополнительную структурную стабильность, в исследованиях были также использованы ингибиторы этого процесса как при изучении диабета *in vivo*, так и в опытах по старению коллагена *in vitro*.

В частности, было показано, что аминокислоты реагируют с продуктами Амадори и, по-видимому, присоединяются к их карбонильным группам, предотвращая, таким образом, дальнейшее превращение продуктов Амадори в конечные продукты гликирования. Аминокислоты · HCl также эффективно ингибируют образование продуктов конечного гликирования как *in vivo*, так и *in vitro*, первоначально реагируя с такими соединениями как 3-дезоксиглюкозон, предотвращая последующее образование КППГ [50].

In vitro было показано, что аспирин оказался эффективным в уменьшении ранних стадий гликирования, уменьшая количество продуктов Амадори, и исследования в клинике продемонстрировали подтверждение протективного действия аспирина при катарактогенезе [51].

В настоящее время становится все более очевидным, что понимание механизма модификации белка при реакции Майяра важно при определении терапевтических подходов для ограничения химических изменений коллагена в процессе старения и диабета и для оценки роли реакции Майяра в патогенезе диабетических осложнений [52].

Гликоокисление коллагена.

Фактор окисления, по-видимому, является одним из ведущих в механизме гликирования и старения коллагена *in vivo* и *in vitro*. Гликоокисление коллагена может протекать следующими путями:

- 1) окисление свободной глюкозы (аутоокисление) с последующей реакцией продуктов окисления с белком;
- 2) окисление белок-связанных продуктов Амадори и промежуточных соединений (карбиноламин, шиффовы основания);
- 3) реакция белков с многочисленными не гликированными карбогидратами, включая аскорбат, альдозы и кетозы [53].

Продукты гликоокисления, например, такие как N^ε-карбоксиметиллизин и пентозидин, образуются в процессе реакции глюкозы с белком *in vitro*. Однако, не было ясно, являются ли они результатом окисления продуктов Амадори или окислению подвергаются более ранние промежуточные соединения. Ряд авторов [54] подтвердили своими исследованиями, что именно продукты Амадори

ФАКТОРЫ СТАРЕНИЯ КОЛЛАГЕНА

являются источником гликоокисления и активных форм кислорода, что может приводить к модификации белка, измеренной по специфическим маркерам белкового гликирования (N^ε-карбоксиметиллизин и пентозидин) и окисления (орто-тирозин-о-тирозин).

Существуют доказательства, что и окисление свободной глюкозы также играет важную роль в модификации белков и образовании продуктов гликоокисления и реактивных форм кислорода во время реакции Майяра. Wolff и Dean ввели термин "аутоокислительное гликирование", чтобы описать модификацию белков реактивными карбонильными соединениями, образующимися во время металл-катализируемой реакции аутоокисления глюкозы. Было отмечено, что окисление глюкозы сопровождается образованием α-дикарбонильных соединений и продуктов гликоокисления. Авторы указанной работы и другие исследователи заключили, что и глюкоза, и гликированные белки являются источником продуктов гликоокисления и активных форм кислорода [55].

При высокой концентрации глюкозы и фосфатного буфера, используемых для изучения реакции Майяра *in vitro*, основной вклад в окисление и гликоокисление коллагена вносит глюкоза или быстро образующиеся карбиноламины и продукты шиффа основания, но не Амадори продукты.

В работе Elgawish с соавторами была изучена *in vitro* скорости гликирования, гликоокисления (по количеству карбоксиметиллизина) и поперечного связывания коллагена (по измерению времени разрыва сухожилия). Авторы продемонстрировали важную роль окислительного стресса в поперечном сшивании коллагена и факт, что продукты Амадори являются источником генерации H₂O₂ *in vitro*. Введение каталазы предотвращало образование поперечных сшивок, образование флуоресцирующих соединений [56].

В исследованиях Hunt [57] было подтверждено, что образование свободных радикалов и перекиси водорода приводит к значительным конформационным изменениям структуры коллагена и развитию флуоресцирующих продуктов ("гликофлуорофоры"). Были приведены доказательства, что образование этих продуктов зависит от металло-катализируемых (ионами Cu²⁺ и Fe³⁺) окислительных процессов, связанных с образованием кетоальдегидов. В частности было показано, что антиоксиданты тормозят структурные изменения, вызванные экспозицией глюкозы с коллагеном.

Образование продуктов гликоокисления в окислительных реакциях, катализируемых переходными металлами, сопровождается продуцированием активных форм кислорода ($\cdot\text{O}_2^-$, $\cdot\text{OH}$, H₂O₂), которые вызывают изменения в белках и липидах. Образование N^ε-карбоксиметиллизина и пентозидина также требует присутствия ионов переходных металлов и кислорода [58]. Исследования показали, что образование α-кетоальдегидов или деоксиглюкозонов является критическим шагом, который ведет к поперечному связыванию белка, генерации $\cdot\text{O}_2^-$ и H₂O₂, которые инициируют также и перекисное окисление липидов, и другие свободнорадикальные процессы [59].

Диэтилентриаминопентауксусная кислота ингибирует образование кетоальдегида и продукцию гликофлуорофоров, подтверждая, что продукты аутоокисления глюкозы, т.е. кетоальдегиды, играют важную роль в образовании флуоресцирующих продуктов гликирования белка [60].

Поглотители свободных радикалов, такие как маннитол, бензоат и каталаза также полностью ингибировали образование продуктов конечного гликирования, предотвращая увеличение степени поперечного связывания и покоричневения коллагена при обработке глюкозой *in vitro* [61].

Таким образом, эти результаты показали, что металл-катализируемое окисление и свободные радикалы играют важную роль в образовании продуктов конечного гликирования. В работах делается предположение, что увеличение окислительного стресса может ускорять образование этих продуктов гликирования и является существенным вкладом в патогенез диабетических осложнений [62].

Результаты проведенных исследований показали, что металл-катализируемые окислительные реакции играют важную роль в поперечном связывании коллагена с глюкозой. Было сделано предположение, что при уменьшении окислительного стресса у диабетиков можно предотвратить и процесс гликирования, и поперечного связывания коллагена [63].

Таким образом, нами рассмотрены литературные данные по важной научно-медицинской проблеме старения коллагена, который является основным компонентом разных типов соединительной ткани человека. Эти данные дают возможность оценить структурные изменения коллагена и понять механизмы, которые лежат в основе старения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Никитин В.Н. и др. (1977) Возрастная и эволюционная биохимия коллагеновых структур, Киев, с. 5-6.
2. Gallop P. et al. (1972) Ann. Rev. Biochem., **41**, 612-672.
3. Kadber K. (1995) Protein Profile, **2**, 491-619.
4. Reisser K. et al. (1995) J. Gerontol. Ser., A. **50A(1)**, B40-47.
5. Edward M. (1993) Mol. Aspects Dermatol., 89-110.
6. Thomas J. (1994) Ann. Reum. Des., **53**, 488-496.
7. Aoki-Y et al. (1992) Diabetologia, **35**, 913-986.
8. Friedraman D.M. et al. (1993) J. Surg. Res., **55**, 214-222.
9. Fijimoro E. et al. (1997) Fragrance J., **25**, 19-24.
10. Brinckman J. (1994) Arch. Dermatol. Res., **286**, 391-395.
11. Pohunkowa L. et al. (1995) Biomaterials, **16**, 67-71.
12. Matsumura S. et al. (1995) Connect. Tissue, **27**, 213-221.
13. Lorraine H. Kligmant et al. (1991) Photochem. Photobiol., **51**, 233-237.
14. Быков В.А. и др. (1996) Биомедиц. технолог., **5**, 69-81.
15. Реброва Г.А. и др. (1996) Биомедиц. технолог., **3**, 51-56.
16. Schider S.L. et al. (1981) J. Clin. Invest., **67**, 1630-1635.
17. Wan K.C. (1999) Ann. Clin. Biochem., **36**, 666-678.
18. Buckingham B. et al. (1990) J. Clin. Invest., **86**, 1046-1054.
19. Quaglini D. et al. (1993) Matrix, **13(6)**, 481-490.
20. Monnier V.M. (1990) J. Gerontology: Biological Sciences, **45**, B105-111.
21. Crabtree D.V. et al. (1980) Biopolymers, **19**, 1081-1091.
22. Wu J.J. et al. (1984) Biochemistry, **23**, 1850-1857.
23. Weast M.D. (1994) Arch. Dermatol. Res., **130(1)**, 87-95.
24. Pier K.A. et al. (1981) Biochim. Biophys. Acta., **802(1)**, 596-598.
25. Tian S.F. et al. (1996) J. Biochem., **120**, 1153-1162.
26. David R. et al. (1980) Biochem. Biophys. Res. Commun., **92**, 403-410.
27. Bernstein P.H. et al. (1980) J. Biol. Chem., **255**, 10414-10422.
28. Millton N. et al. (1995) New Compr. Biochem., **29A**, 589-616.
29. Weckmann A.L. et al. (1996) Res. Invest. Clin., **48(3)**, 207-221.
30. Heikkinen F. et al. (1968) Biochim. Biophys. Acta., **160**, 464-466.
31. Sames K. (1994) EXS, **12**, 243-274.
32. Reiser K. et al. (1992) FASEB J., **6**, 2439-2449.
33. Davison P.F. (1983) Connective Tissue Res., **11**, 135-151.
34. Quaglini D. et al. (1993) Matrix, **13(6)**, 503-515.
35. Halme T. et al. (1986) Biochim. Biophys. Acta., **881**, 222-228.
36. Odetti P.R. et al. (1990) Diabetes, **39**, 796-881.
37. Reiser K.M. (1991) Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **196(1)**, 17-29.
38. Glomb M.A. et al. (1995) J. Biol. Chemistry, **270(17)**, 10017-10026.
39. Slatte D.A. et al. (1999) J. Biol. Chemistry, **274(28)**, 19661-19669.
40. Zyzak D.V. et al. (1995) Arch. Biochem. Biophys., **316**, 547-554.

ФАКТОРЫ СТАРЕНИЯ КОЛЛАГЕНА

41. Namiki M. (1986) in: Amino-Carbonyl Reaction in Food and Biological Systems (eds. Fujimaki M.), pp. 29-38.
42. Paul R. G. et al. (1996). Int. J. Biochem. Cell. Biol., **28**(12), 1297-1310.
43. Sajithlal G. B. et al. (1996) J. Biochem. (Tokyo), **120**, 1153-1162.
44. Brennan M. (1989) J. Biol. Chem., **264**(35), 20947-20952.
45. Avedano G. F. et al. (1999) Diabetes, **48**, 1443-1447.
46. Bellmant M.J. et al. (1995) Biochim. Biophys. Acta., **1272**, 53-60.
47. Hormel S. E. et al. (1991) Biochim. Biophys. Acta, **1078**, 243-250.
48. Bailey A. J. et al. (1995) Biochem. J., **305**, 385-390.
49. Kennedy L. et al. (1998) Gerontology, **44**, 187-191.
50. Edelstein D. et al. (1992) Diabetes, **41**, 26-29.
51. Nageena S. et al. (1994) Biochem. Biophys. Res. Commun., **199**, 683-686.
52. Menzel E. et al. (1996) Ann. Clin. Biochem., **33**(Pt3), 241-248.
53. Wells-Knecht M.C. (1995) Biochemistry, **21**, 15134-15144.
54. Sell D.R. (2000). FASEB J., **14**, 145-156.
55. Wolff S.B., Dean R.T. (1987) Biochem. J., **245**, 43-250.
56. Elgawish Abdelhamide et al. (1996) J. Biol. Chem., **271**(22), 12964-12971.
57. Hunt J. V. et al. (1991). Free Rad. Res. Commun., **12-13**, 115-123.
58. John A. Dunn et al. (1991) Biochemistry, **30**, 1205-1210.
59. Komsa-Penkova R. et al. (2000). Biophys. Chem., **83**, 185-195.
60. Mahtab U. et al. (1986) J. Biol. Chem., **261**(11), 4889-4894.
61. Chace K.V. et al. (1991) Arch. Biochem. Biophys. Acta, **288**, 473-480.
62. Sajithlal G. B. et al. (1998) Free Radic. Biol. Med., **25**, 265-269.
63. Sajithlal G. B. et al. (1999) Mol. Cell. Biochem., **194**(1-2), 257-263.

Поступила 05.07.01

SOME FACTORS OF COLLAGEN AGING *IN VIVO* AND *IN VITRO*.

G.A. Rebrova, V.V. Berzhitskaya, V.K. Vasillevsky,
M.V. Timofeeva, So San Ho

Research Center for Biomedical Technology, 123056 Moscow, Krasin str., 2;
fax (095)254-5681.

The literature data on different factors of collagen aging, the main connective tissue protein, have been analyzed. Mechanisms of reactions that are involved in both old aging and non-enzymatic course of protein aging are discussed. Factors influencing, non-enzymatic protein glycation during-related pathology and some ways for its inactivation by different substances are reviewed.

Key words: collagen, aging, non-enzymatic glycation, glycoxidation, free radicals, Maillard reaction.