

УДК 547.962.9; 536.628.3

## ТЕРМИЧЕСКАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ КОЛЛАГЕНА В ТКАНЯХ МЕЖПОЗВОНКОВОГО ДИСКА

И.В. Андреева, Н.Ю. Игнатьева, С.В. Аверкиев, В.В. Лунин, О.Л. Захаркина,  
М.В. Обрезкова

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

Методом дифференциальной сканирующей калориметрии проведены исследования термической стабильности коллагена в тканях межпозвонкового диска. Обнаружено, что при нарушении целостности структуры фиброзного кольца и пульпозного ядра плавление коллагена в нативной ткани полностью протекает при температуре 62–75°C ( $\Delta H = 62,4$  Дж/г). При нагревании целостной структуры вплоть до 80° денатурация коллагена не происходит. Показано, что разрушение протеогликановой компоненты в исследуемых тканях не влияет на термостабильность коллагена.

В последнее время в медицине активно используют новые технологии лечения заболеваний позвоночника, например термопластику межпозвонкового диска [1]. Для успешного применения данной методики очень важно изучить процессы, протекающие в соединительных тканях межпозвонкового диска при лазерном нагреве. Межпозвонковый диск состоит из фиброзного кольца (AF) и пульпозного ядра (NP). Их основным структурным компонентом является фибриллярный белок коллаген, погруженный в гель протеогликанов [2].

Проблема термостабильности коллагена исследуется давно. В работах [3–4] рассматривались системы коллаген–вода с разным содержанием обеих составляющих, а также интактный коллаген. Было отмечено, что для системы тропоколлаген–вода (10–98%) и для интактного коллагена различной степени влажности температура денатурации увеличивается с уменьшением процентного содержания воды, а для интактного коллагена теплота денатурации не зависит от скорости нагрева. В работе [5] приведены количественные характеристики перехода, там же приведены данные, показывающие взаимосвязь между энтальпией денатурации коллагена  $\Delta H_m$ , температурой денатурации  $T_m$  и степенью его гидратированности. При увеличении содержания воды тепловой эффект денатурации возрастает. Так, при содержании воды от 0,07 до 1 моль энтальпия денатурации коллагена составляет 11,6 Дж/г сухого образца, а при содержании воды от 30 до 460 моль эта величина возрастает до 58,55 Дж/г сухого образца.

Денатурация коллагена представляет собой фазовый переход первого рода [6]. Для коллагена харак-

терно наличие двух фаз (кристаллической и аморфной), что подтверждено рентгеноструктурным анализом. В процессе денатурации в равновесных условиях сохраняются постоянными объем и температура системы, что является отличительной особенностью фазовых переходов первого рода. Для коллагена это условие выполняется в случае очень медленной кристаллизации или очень медленного плавления белка, а также при совокупности этих условий. Последние следы кристалличности всегда исчезают при строго определенной температуре, поскольку плавление полимеров происходит в небольшом интервале температур. В работе [6] отмечено, что фибриллярное натяжение влияет на стабилизацию структуры коллагеновых волокон и повышает температуру денатурации коллагена, т.е. улучшает его термостабильность.

Авторами [7] были проведены исследования поведения при термической обработке как целостной системы, включающей в себя части позвонков и межпозвонковый диск, так и вырезанных фрагментов тканей фиброзного кольца. Было установлено, что при нагревании в водной среде обоих объектов до 85°C денатурации коллагена в системе позвонки–межпозвонковый диск не происходит, а коллаген в вырезанном образце ткани фиброзного кольца подвергается полной денатурации. Таким образом, целостность системы позвоночника влияет на термостабильность коллагена. Натяжение фибрилл, имеющее место в целостной системе позвонки–межпозвонковый диск и полностью отсутствующее в вырезанном фрагменте ткани фиброзного кольца, вызывает увеличение температуры денатурации. Возможно и другое объяснение – влияние протеогликанов, стабилизирующих матрикс. Однако термичес-

кое поведение протеогликановой компоненты тканей не вполне изучено.

Данная работа посвящена изучению влияния гликозаминогликанов (ГАГ) и протеогликанов на термическую стабильность коллагена в тканях фиброзного кольца и пульпозного ядра межпозвонкового диска.

### Материалы и методы

#### Приготовление образцов

Межпозвонковые диски и образцы тканей фиброзного кольца и пульпозного ядра межпозвонкового диска вырезали (не позже 5 ч *post mortem*) из хвостов телят возраста не старше 12 мес. Сегменты (высота 1 см, диаметр 1–2 см) позвоночника, содержащие межпозвонковый диск, механически отделяли от связок и мышечной ткани. Образцы тканей фиброзного кольца и пульпозного ядра извлекали также механическим способом. Внешне структура тканей выглядела однородной и не носила повреждений. Исследование целых межпозвонковых дисков проводили сразу после их изъятия. Часть образцов тканей фиброзного кольца и пульпозного ядра после извлечения высушивали при комнатной температуре и хранили при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ . Подобные условия хранения не вызывают изменения структуры и не оказывают воздействия на термические свойства тканей [8]. Для изучения изолированной ткани фиброзного кольца и пульпозного ядра межпозвонкового диска использовали фрагменты тканей размером  $3 \times 3 \times 1$  мм. Перед исследованием методом дифференциальной сканирующей калориметрии все образцы для набухания выдерживали в 0,15 М NaCl.

#### Определение содержания коллагена

Для проведения анализа на коллаген образцы гидролизуют в течение 1 ч смесью концентрированной соляной (12 М) и фторуксусной кислоты (99 вес.%) в объемном соотношении 2:1, раствор упаривали в концентрате "LABCONCO". Для определения аминокислотного состава гидролизата использовали аминокислотный анализатор ("Hitachi-835", Japan), при этом предварительно проводили катионообменное разделение и спектрофотометрическую реакцию с нингидрином в соответствии со стандартной методикой [9]. Содержание коллагена определяли по количеству коллагенспецифичной аминокислоты гидроксипролин (Нур), составляющей 13,3% от массы молекулы коллагена [10].

Для определения содержания гидроксипролина в тканях пульпозного ядра после ферментативной обработки использовали спектрофотометрическую реакцию с *n*-диметиламинобензальдегидом после предва-

рительного селективного окисления гидроксипролина хлорамином в упаренном гидролизате [11].

#### Определение содержания гликозаминогликанов в образцах

Содержание ГАГ определяли по спектрофотометрической реакции с диметилметиленовым синим по методике [12]. Сухие образцы массой от 3 до 10 мг переводили в раствор с помощью папаина (2,9 МЕ/мг, 2,4 мг/мл) в инкубационном буфере (25 мМ/л ЭДТА, 200 мкг/мл стрептомицина, 200 ед/мл пенициллина, 0,15 М NaCl на 1 л раствора) в течение 4 ч при  $60^{\circ}\text{C}$ . В измерительную спектрофотометрическую кювету помещали аликвоту (50–100 мкл) изучаемого раствора и 2,5 мл раствора диметилметиленового синего с концентрацией 16 мг/л ("Basic Blue 24", "Sigma", Германия). Оптическую плотность растворов измеряли на спектрофотометре "Varian Cary 3E" при длине волны 540 нм по сравнению с раствором диметилметиленового синего. Калибровку проводили по растворам хондроитинсульфата А ("Sigma", США) с концентрацией от 500 до 125 мкг/мл.

#### Ферментативная обработка тканей

Образцы тканей фиброзного кольца и пульпозного ядра обрабатывали 1,5 мл раствора фермента в течение суток при  $37^{\circ}\text{C}$ . Использовали растворы ферментов трипсина ("Sigma", США) с концентрацией 1 мг/мл и АВС хондроитиназы ("Sigma", США) с концентрацией 0,2 МЕ/мл в инкубационном буфере.

#### Термическая обработка

Сегменты позвоночника, содержащие межпозвонковый диск, помещали в предварительно нагретый до  $80^{\circ}\text{C}$  0,15 М раствор NaCl, где их выдерживали в течение 15 мин. По окончании термического воздействия из межпозвонковых дисков механически извлекали образцы тканей фиброзного кольца и пульпозного ядра.

#### Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК)

Термическое поведение образцов исследовали на дифференциальном сканирующем калориметре ("DSC 822<sup>e</sup>, Mettler toledo", Швейцария). Образцы массой 5–10 мг герметично закрывали в стандартных алюминиевых чашках (40 мл). В качестве образца сравнения использовали аналогичную пустую чашку. Нагрев проводили от 25 до  $100^{\circ}\text{C}$ . Скорость нагрева составляла 10 град/мин. Тепловой эффект пересчитывали на содержание коллагена.

Т а б л и ц а 1

**Биохимический состав интактных и подвергнутых ферментативной обработке тканей  
фиброзного кольца и пульпозного ядра межпозвонкового диска**

Ткань	Вид обработки	Количество Нур на сухой остаток (мг/100мг)	Отношение Нур/Нул	Содержание хондротинсульфата относительно массы сухого образца (%)
Фиброзное кольцо (AF)	интактный образец	9,6±0,5	8,7±1	10,28±1,46
	хондротин АВС лиаза	8,5	9,6±1	5,19±0,66
	трипсин	9,0±0,5	6,6±1	5,81±4,70
Пульпозное ядро (NP)	интактный образец	4,5±0,5	5,8±0,5	39,97±1,17
	хондротин АВС лиаза	9,0±0,5	–	8,24±0,34
	трипсин	7,1±0,5	–	8,16±0,59

**Результаты и обсуждение  
Биохимический анализ**

Данные по содержанию коллагена и гликозаминогликанов, полученные для интактных образцов, а также образцов, подвергнутых ферментативной обработке, представлены в табл. 1.

Данные по содержанию основных компонентов в тканях межпозвонкового диска, полученные для интактных образцов, хорошо согласуются с литературными [2]. Отношение Нур/Нул позволяет выявить тип коллагена ткани. Для коллагена I эта величина составляет от 14 до 22, а для коллагена II – от 4,2 до 6. Полученные результаты позволяют утверждать, что ткани пульпозного ядра содержат преимущественно коллаген типа II, а ткани фиброзного кольца – коллаген типов I и II [13]. Это согласуется с результатами иммунохимического анализа [14].

Трипсин является эндогенным протеолитическим ферментом, катализирующим гидролиз пептидных связей, содержащих остатки лизина и аргинина. Ферментативная обработка трипсином вызывает дефрагментацию протеогликанов путем разрушения их стержневого белка и способствует переводению в раствор отдельных олигопептидов с прикрепленными к ним гликозаминогликанами [15].

АВС хондроитиназа является специфическим ферментом, расщепляющим 4- и 6-хондроитинсульфат, а также дерматансульфат. Именно таким действием ферментов объясняется резкое уменьшение содержания хондроитинсульфата в тканях фиброзного кольца и пульпозного ядра межпозвонкового диска после обработки их трипсином и АВС хондроитиназой.

**Термическое поведение тканей AF и NP**

На рис. 1, 2 приведены термограммы, для интактных, а также подвергнутых ферментативной обработке образцов фиброзного кольца и пульпозного ядра межпозвонкового диска. Тепловые эффекты и характерные значения температуры приведены в табл. 2.

Тепловой эффект ( $\Delta H$ ) близок к энтальпии  $\Delta H_m$  плавления коллагена. При повторном нагреве на термограммах отсутствуют какие-либо эффекты. Для примера приведена термограмма повторного нагрева для образца нативной ткани пульпозного ядра (рис. 1, кривая 4). После прогрева в ячейке калориметра все образцы полностью растворяются в трипсине, не затрагивающем неповрежденные коллагеновые фибриллы, а действующем только на дефрагментированные полипептидные цепи коллагена [8]. Все перечисленные факты подтверждают, что при тепловом воздействии на фрагменты тканей межпозвонкового диска происходит полная денатурация коллагена.

Т а б л и ц а 2

**Характеристики перехода в интактных и подвергнутых ферментативной обработке тканях фиброзного кольца и пульпозного ядра**

Образец	Температура пика $T_p$ , °C	Тепловой эффект денатурации коллагена $\Delta H_m$ , Дж/г
1(NP) интактный	68,44	62,4
2(NP) ABC хондроитиназа	67,27	61,5
3(NP) Трипсин	65,09	53,6
4(AF) интактный	68,7	57,5
5(AF) ABC хондроитиназа	65,5	55,2
6(AF) Трипсин	65,7	32,1

Различие в тепловых эффектах денатурации коллагена для фиброзного кольца и пульпозного ядра, возможно, связано с разной стабильностью коллагена в этих тканях. Стабильность коллагена в свою очередь определяется разной степенью организованности матрикса [16]. В пульпозном ядре степень агрегации протеогликанов мала, поэтому коллагеновая и протеогликановая компоненты взаимосвязаны слабо. В фиброзном кольце протеогликаны образуют агрегаты с гиалауроновой кислотой, и степень взаимодействия двух подсистем оказывается гораздо сильнее [2]. Подтверждением этого факта служит меньшая чувствительность характеристик плавления коллагена ( $T_p$  и  $\Delta H_m$ ) в пульпозном ядре к обработке ABC хондроитиназой, разрушающей гликозаминогликаны протеогликановой компоненты.

Трипсин также способствует удалению из тканей стабилизирующей протеогликановой компоненты. Однако при этом ДСК показывает значительное уменьшение теплового эффекта денатурации коллагена. По-видимому, трипсин модифицирует коллагеновую сеть, что и вызывает столь существенное изменение теплового эффекта по сравнению с нативными образцами тканей фиброзного кольца и пульпозного ядра межпозвонкового диска. Особенно сильно тепловой эффект снижается для тканей фиброзного кольца межпозвонкового диска. Возможно, в этом случае

фибрилярная сеть коллагена имеет очень высокую организацию [2], и ферментативная обработка трипсином приводит к значительному ее изменению.

Общим для всех образцов тканей фиброзного кольца и пульпозного ядра межпозвонкового диска (как интактных, так и подвергнутых ферментативной обработке) является то, что при тепловом воздействии на изолированные фрагменты этих тканей происходит полная денатурация содержащегося в них коллагена.

**Исследование влияние термообработки на целые межпозвонковые диски**

При обработке трипсином тканей фиброзного кольца и пульпозного ядра после термообработки целого межпозвонкового диска наблюдалось их диспергирование в растворе фермента. Однако данные термического анализа показывают, что макромолекулы коллагена сохраняют структуру тройной спира-

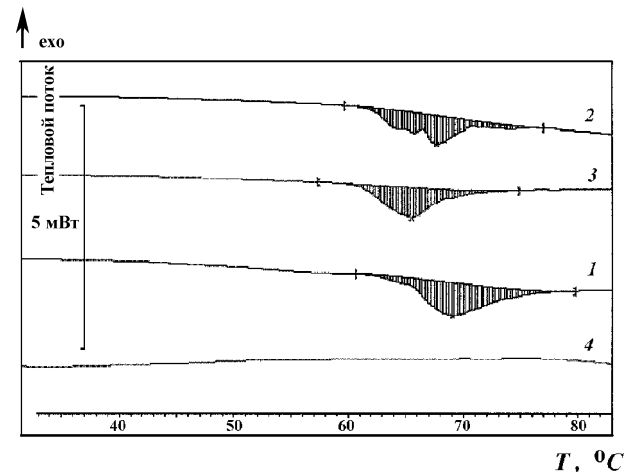


Рис. 1. Типичные термограммы тканей пульпозного ядра: 1 – интактный образец, 2 – обработка ABC хондроитиназой, 3 – обработка трипсином, 4 – термограмма повторного нагрева интактного образца

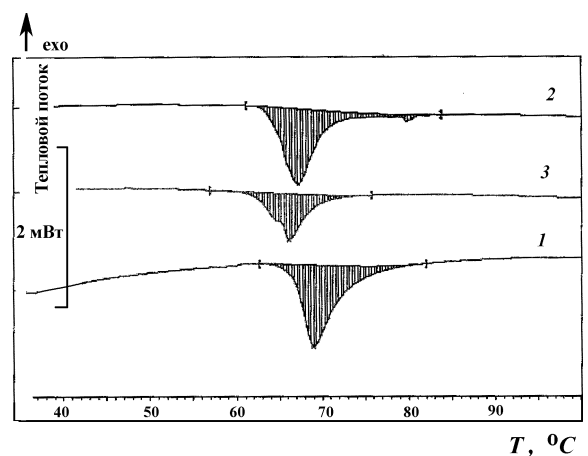


Рис. 2. Типичные термограммы тканей фиброзного кольца: 1 – интактный образец, 2 – интактный, 3 – образцы, подвергнутые ферментативной обработке

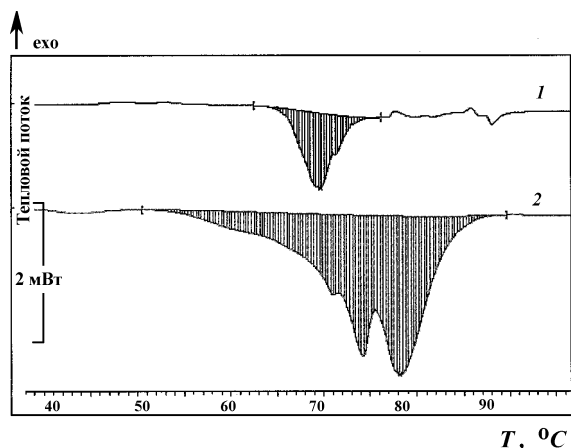


Рис. 3. Термограммы фиброзного кольца: 1 – подвергнутого термообработке, 2 – в виде дисперсии

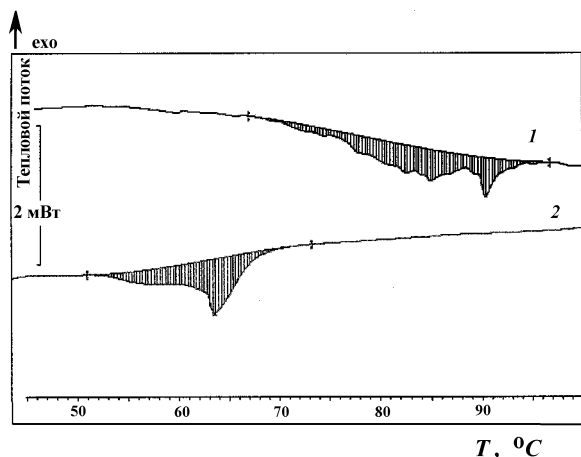


Рис. 4. Термограммы пульпозного ядра: 1 – подвергнутого термообработке, 2 – в виде дисперсии

ли. На рис. 3 приведены термограммы образцов фиброзного кольца после термообработки и термограммы дисперсий этих тканей, полученных после ферментативной обработки трипсином. Тепловые эффекты и значения температуры пиков для них практически полностью совпадают с теми же показателями образцов нативных тканей фиброзного кольца. Так, тепловой эффект денатурации коллагена фиброзного кольца после термообработки составляет 20,92 Дж/г. Для дисперсии тепловой эффект денатурации коллагена равен 16,21 Дж/г, но эти данные получены для сырого образца. Отметим ту же тенденцию уменьшения теплового эффекта денатурации коллагена после обработки трипсином, что и была ранее обнаружена для фрагментов тканей фиброзного кольца, обработанных тем же ферментом.

Однако для коллагена пульпозного ядра тепловые эффекты существенно меньше, чем для интактных

образцов. Тепловой эффект денатурации для коллагена пульпозного ядра, подвергнутого термообработке, составляет 19,62 Дж/г, а для дисперсии значение теплового эффекта денатурации коллагена равно 2,8 Дж/г. Данные по дисперсии ткани пульпозного ядра приведены также для сырого образца. Термограммы для тканей пульпозного ядра представлены на рис. 4.

Такое значительное отличие в термическом поведении между тканями целостной системы межпозвонкового диска и изолированными частями фиброзного кольца и пульпозного ядра может быть объяснено тем, что в целом межпозвонковом диске сохраняется натяжение фибриллярной коллагеновой сети, поэтому даже при нагреве тканей до 80°C и выдерживании их при этой температуре достаточно длительное время денатурации коллагена не происходит. Действительно, приложение силы натяжения в направлении главной оси коллагенового волокна с увеличением нагрузки вызывает рост температуры плавления коллагена. Например, при силе натяжения ( $p$ ), соответствующей 2 атм, плавление происходит при 65°C, а при  $p = 8,8$  атм температура плавления ( $T_{пл}$ ) возрастает до 80°C [6]. Аналогичный результат представлен в работе [17], где показано, что при постоянной температуре возможность денатурации зависит от величины нагрузки, приложенной к изучаемому образцу. Так, при 67°C в образцах тканей связок при  $p \geq 6$  атм денатурации не происходит, тогда как при  $p \leq 1,92$  атм коллаген полностью денатурирует. В пульпозном ядре фибриллярная коллагеновая сеть значительно менее ярко выражена, отсутствует жесткая структура ткани, часть коллагена при нагревании денатурирует, что и объясняет уменьшение теплового эффекта денатурации при последующем нагревании в ячейке ДСК-калориметра.

В целом проведенные исследования показывают, что гликозаминогликаны мало влияют на термостабильность коллагена, поскольку тепловой эффект денатурации образцов, обработанных АВС хондроитиназой, незначительно отличается от теплового эффекта интактных образцов. При этом ферментативная обработка трипсином, по-видимому, вызывает модификацию самой коллагеновой сети, поскольку тепловой эффект для таких образцов значительно ниже, чем для нативных тканей.

Из проведенного анализа видно, что на тепловой эффект денатурации коллагена в фиброзном кольце и пульпозном ядре межпозвонкового диска значительное влияние оказывает целостность фибриллярной структуры коллагеновых сетей. При термическом

воздействии коллаген таких тканей, где сохраняется фибриллярная сеть, денатурации не подвергается, тогда как коллаген фрагментов тканей фиброзного кольца и пульпозного ядра свободно денатурирует при нагревании. Коллагеновые фибриллы концентрически распространены по всему диску, что вызывает большую устойчивость всей системы в целом ко

внешнему тепловому воздействию. Однако проведенные исследования показывают, что при термообработке целого межпозвоночного диска происходит разрушение компонентов, связывающих коллагеновую сеть, что подтверждается диспергированием тканей, подвергнутых термообработке, при воздействии на них трипсина.

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kleinstueck F.S., Diederich C.J., Nau W.H., Puttlitz C.M., Smith J.A., Bradford D.S., Lotz J.C. // *Spine*. 2003. **28**. P. 1700.
2. Ghosh P. The biology of intervertebral disc. V. 1. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida, 2000.
3. Церетели Г.И. // *Биофизика*. 1982. **27**. № 5. С. 780.
4. Церетели Г.И., Белопольская Т.В., Мельник Т.М. // *Биофизика*. 1997. **42**. № 1. С. 68.
5. Miles C.A., Ghelashvili M. // *Biophys. J.* 1999. **76**. P. 324.
6. Манделькern Л. Кристаллизация полимеров. Химия. М.;Л., 1966.
7. Bass E.C., Wistrom E.V., Diederich C.J., Nau W.H., Pellegrino R., Ruberti J., Lotz J.C. // *J. Biomech.* 2004. **37**. N 2. P. 233.
8. Bank R.A., Krikken M., Beekman B., Stoop R., Maroudas A., Lafeber F., TeKoppele J.M. // *Matrix Biol.* 1997. **16**. P. 233.
9. Tsugita A., Scheffler J. // *Eur. J. Biochem.* 1982. **124**. P. 585.
10. Gasteiger E., Gattiker A., Hoogland C., Ivanyi I., Appel R.D., Bairoch A. // *Nucleic Acids Res.* 2003. **31**. P. 3784.
11. Woessner J.F. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1961. **93**. P. 440.
12. Farhdale R.W., Buttle D.J. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1986. **883**. P. 173.
13. Blumenkrantz N., Sylvest J., Asboe-Hansen G. // *Biochem. Med.* 1977. **18**. N 3. P. 283.
14. Hollander A.P., Heathfield T.F., Liu J.J., Pidoux I., Roughley P.J., Mort J.S., Poole A.R. // *J. Orthop. Res.* 1996. **14**. P. 61.
15. Игнатъева Н.Ю., Соболев Э.Н., Аверкиев С.В., Лунин В. В., Гороховская Т.Е., Баграташвили В.Н., Янцен Е.С. // *ДАН*. 2004. **395**. С. 696.
16. Игнатъева Н. Ю., Аверкиев С. В., Соболев Э. Н., Лунин В. В. // *ЖФХ*. 2005. **79**. С. 1505.
17. Aksan A., McGrath J. J. // *Trans. ASME*. 2003. **125**. P. 700.

Поступила в редакцию 28.11.05

## THE THERMAL STABILITY OF COLLAGEN IN TISSUES OF INTERVERTEBRAL DISK

I.V. Andreyeva, N.Yu. Ignat'eva, S.V. Averkiev, V.V. Lunin, O.L. Zakharkina, M.V. Obrezkova

(Division of Physical Chemistry)

The thermal collagen stability of intervertebral disc was investigated by differential scanning calorimetry (DSC). It was found that the melting of collagen occurred completely at 62–75°C ( $\Delta H \sim 60 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$ ) under heating excised samples of annulus fibrosus and nucleus pulposus. After heating intact intervertebral disc until 80°C denaturation of collagen was not observed. It was shown that the destruction of proteoglycans in examined tissues has not affect on the collagen stability.