



Wpływ sorbitolu na sieciowanie kolagenu osierdzia wieprzowego w procesie fotooksydacji

Grzegorz Wisowski, Krystyna Olczyk, Ewa M. Koźma,
Agnieszka Jura-Półtorak, Paweł Olczyk, Kornelia Kuźnik-Trocha
Katedra i Zakład Chemii Klinicznej i Diagnostyki Laboratoryjnej,
Śląska Akademia Medyczna, Sosnowiec

The influence of sorbitol on photooxidation-mediated crosslinking of porcine pericardial collagen

Summary

Collagen is one of the most useful biomaterials. The medical application of collagen tissues requires specific fixation procedures. Dye-mediated photooxidation is a method of the new collagen crosslink formation. In this study, the influence of sorbitol on the extent of porcine pericardial collagen crosslinking was investigated. The collagen modification was estimated on the basis of pericardial susceptibility to pepsin digestion. The hydrolysate components were characterized electrophoretically. The significant collagen crosslinking was found in all photooxidized samples, in comparison with the untreated ones. However, the most enhanced collagen modification was observed for pericardium photooxidized with 0,5% and 0,9% sorbitol, as compared to the samples fixed without sorbitol.

Adres do korespondencji

Grzegorz Wisowski,
Katedra i Zakład Chemii
Klinicznej
i Diagnostyki
Laboratoryjnej,
Śląska Akademia
Medyczna,
ul. Jagiellońska 4,
41-200 Sosnowiec;
e-mail:
vis@slam.katowice.pl

Key words:

collagen, photooxidation, sorbitol.

1. Wstęp

Kolageny są najpowszechniej występującymi białkami organizmów zwierzęcych (1). Obecnie znanych jest ponad 20 typów tych białek. Różnią się one budową, właściwościami, rozmieszczeniem w tkankach oraz pełnią w organizmie funkcję (2). Najbardziej rozpowszechnione – kolageny typu I, III i V – to główne

białka strukturalne m. in. skóry, powięzi i osierdzia (3). Białka te należą do grupy kolagenów włókienkowych, wykazujących w swojej budowie obecność domeny trihelikalnej, utworzonej z przeplatających się trzech łańcuchów polipeptydowych, zwanych podjednostkami α . Każdy z łańcuchów α zawiera sekwencje Gly-X-Y, gdzie pozycje X i Y zajmują najczęściej, odpowiednio, prolina i hydroksypolina (2,3). Krótkie, C- i N-końcowe fragmenty łańcuchów α , zwane telopeptydami, tworzą niehelikalne regiony cząsteczki kolagenu (4). Struktura potrójnej helisy utrzymywana jest dzięki międzyłańcuchowym wiązaniom wodorowym. Ponadto, w trakcie dojrzewania kolagenu tworzą się kowalencyjne wiązania poprzeczne, stabilizujące strukturę przestrzenną tego białka (1). Wiązania poprzeczne mają charakter zarówno wewnątrzcząsteczkowy – łącząc łańcuchy polipeptydowe w obrębie jednej cząsteczki kolagenu, jak i międzycząsteczkowy – łącząc podjednostki α sąsiadujących cząsteczek tego białka. W wytwarzaniu wiązań międzycząsteczkowych uczestniczą domeny helikalne i niehelikalne cząsteczek kolagenu (4).

Kolagen wykazuje znacznie mniejsze odrębności międzygatunkowe w porównaniu z innymi białkami zwierzęcymi, cechując się ponadto stosunkowo niewielką immunogennością, stąd też – białko to znalazło szerokie zastosowanie w medycynie (5). Kolagenowe biomateriały, w postaci cienkościennych błon czy gąbek, wykorzystywane są jako opatrunki biologiczne, stosowane w leczeniu rozległych oparzeń czy uzupełnianiu ubytków skóry lub innych tkanek (5,6). Naturalne struktury tkankowe, bogate w kolagen, takie jak fragmenty wieprzowych lub wołowych worków osierdziowych, jelit czy powięzi, wykorzystywane są z kolei w chirurgii rekonstrukcyjno-naprawczej układu sercowo-naczyniowego oraz innych narządów wewnętrznych (7,8). Jednakże, zastosowanie tkanek zwierzęcych w charakterze bioprotez, wymaga odpowiedniego ich przygotowania, prowadzącego do zwiększenia ich trwałości i odporności na enzymatyczną degradację, a jednocześnie – do zmniejszenia immunogenności i podatności na wapnienie (9). Technikami, które prowadzą do tworzenia nowych wiązań sieciujących w strukturze omawianego białka włóknistego są te, których stosowanie nadaje tkankom bogatym w kolagen pożądane parametry biomechaniczne. Wśród metod sieciowania kolagenu wyróżnić można metody chemiczne – z zastosowaniem związków sieciujących kolagen w sposób pośredni lub bezpośredni, oraz – metody fizykochemiczne. Jedną z tych ostatnich jest metoda fotooksydacji, polegająca na wytwarzaniu dodatkowych wiązań poprzecznych w kolagenie przy użyciu światła i fotoaktywnego barwnika, jako katalizatora. Tkanki poddane procedurze fotoutleniania nie wykazują względem tkanek biorcy działania cytotoksycznego, hemolitycznego i mutagennego, są odporne na działanie enzymów proteolitycznych, a jednocześnie – pod względem giętkości i elastyczności – zbliżone do tkanek natywnych (9). Skuteczność procesu fotooksydacji zależy jednakże od wielu czynników, takich jak rodzaj zastosowanego światła czy barwnika, czas naświetlania, a także – obecność dodatkowych substancji chemicznych w środowisku reakcji (10,11). Jedną z substancji, posiadających właściwość modyfikowania *in vivo* procesu sieciowania kolagenu jest sorbitol (12). Nie badano dotąd jednak

wpływu tego związku na skuteczność sieciowania omawianego białka w procesie fotooksydacji. Stąd też, za cel pracy przyjęto ocenę wpływu sorbitolu (w stężeniach 0,1, 0,5 i 0,9%) na efektywność czterogodzinnej fotooksydacji kolagenu wieprzowych worków osierdziowych, w obecności błękitu metylenowego.

2. Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły próbki wieprzowych worków osierdziowych, które po pobraniu podzielono na – liczące po 10 próbek tkankowych każda – następujące grupy: osierdzia nie poddane działaniu światła, błękitu metylenowego ani sorbitolu (grupa A), osierdzia nienaświetlane, poddane działaniu 0,1% błękitu metylenowego (grupa B), osierdzia nienaświetlane, poddane działaniu 0,1% błękitu metylenowego oraz sorbitolu w stężeniach: 0,1, 0,5 lub 0,9% (grupy C, D i E), osierdzia poddane fotoutlenianiu w obecności 0,1% błękitu metylenowego (grupa F), osierdzia poddane fotoutlenianiu w obecności 0,1% błękitu metylenowego oraz sorbitolu w stężeniach: 0,1, 0,5 lub 0,9% (grupy G, H i I). Wszystkie próbki tkankowe wstępnie inkubowano w roztworze 50% sacharozy przez 1 godzinę. Naświetlanie tkanek prowadzono z użyciem światła białego, przez 4 godziny, w temperaturze 7°C, przy stałym napowietrzaniu. Źródłem światła zastosowanego w procesie fotooksydacji była lampa emitująca promieniowanie w zakresie fal o długości 400-760 nm, o natężeniu 8000 lx, umieszczona bezpośrednio nad buforem reakcyjnym, w którym zanurzone były próbki osierdzia. Po zakończeniu naświetlania próbki tkankowe przechowywano w 50% etanolu, w temp. 4°C. Procedurę fotooksydacji tkanek oparto na metodzie opisanej przez Mechanic (13).

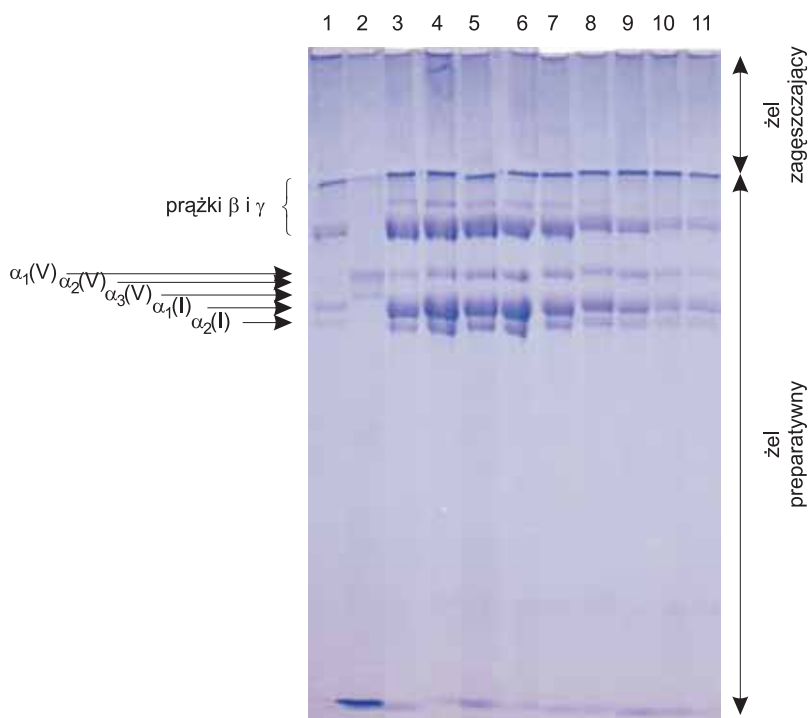
Oceny skuteczności procesu fotoutleniania dokonano poprzez oszacowanie podatności kolagenu utrwalonych tą metodą tkanek, na proteolityczne działanie pepsyny. Enzym ten degraduje niezmodyfikowane fotooksydacją, pozahelikalne regiony cząsteczek kolagenu, podczas gdy domeny trihelikalne, jak również zmodyfikowane regiony pozahelikalne pozostają odporne na działanie pepsyny (14).

Przed przystąpieniem do trawienia, próbki tkankowe płukano w roztworze kwasu octowego, a następnie homogenizowano w acetonie. Zawartość produktów kolagenolizy w hydrolizatach osierdzia szacowano jakościowo i ilościowo, po uprzednim rozdziale tych komponentów metodą elektroforezy w 8% żelu poliakryloamidowym.

Wszystkie etapy badań, obejmujące: płukanie i homogenizację próbek tkankowych, trawienie pepsyną, elektroforezę komponentów kolagenowych w żelu poliakryloamidowym, wybarwienie i analizę densytometryczną żeli oraz analizę statystyczną wyników, zostały szczegółowo opisane we wcześniejszej publikacji (11).

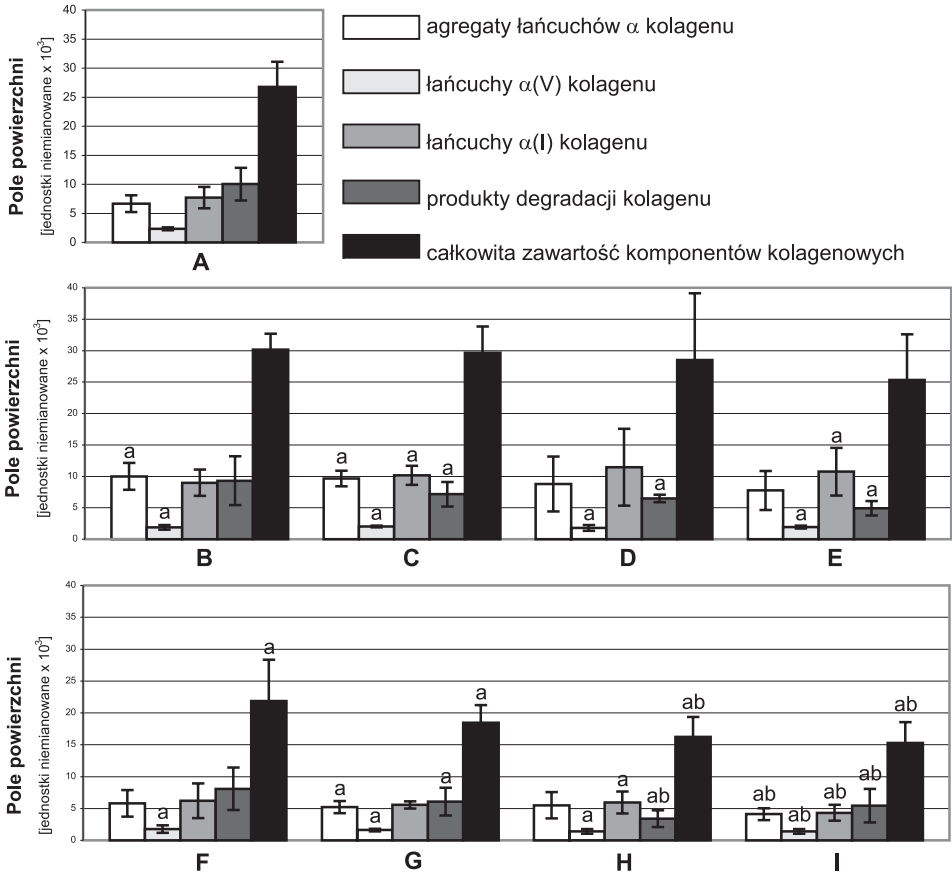
3. Omówienie wyników i dyskusja

Na rysunku 1 przedstawiono typowy rozdział elektroforetyczny komponentów kolagenowych zawartych w hydrolizatach, uzyskanych działaniem pepsyny na próbki wieprzowych worków osierdziowych. Ruchliwość elektroforetyczną poszczególnych komponentów białkowych porównywano z ruchliwością, demonstrowaną przez wzorcowe kolageny typu I i V (rys. 1, ścieżki 1 i 2). Głównymi składnikami hydrolizatów osierdza wszystkich badanych grup były podjednostki α_1 i α_2 kolagenu typu I oraz – α_1 , α_2 i α_3 kolagenu typu V. Ponadto, wszystkie hydrolizaty zawierały



Rys. 1. Typowy rozdział elektroforetyczny komponentów kolagenowych obecnych w hydrolizatach próbek osierdza poddanych działaniu pepsyny. Ścieżka 1 – wzorcowy kolagen typu I; ścieżka 2 – wzorcowy kolagen typu V; ścieżka 3 – osierdzia natywne (grupa A); ścieżka 4 – osierdzia nienaświetlane, poddane działaniu błękitu metylenowego (grupa B); ścieżka 5 – osierdzia nienaświetlane, poddane działaniu błękitu metylenowego i 0,1% sorbitolu (grupa C); ścieżka 6 – osierdzia nienaświetlane, poddane działaniu błękitu metylenowego i 0,5% sorbitolu (grupa D); ścieżka 7 – osierdzia nienaświetlane, poddane działaniu błękitu metylenowego i 0,9% sorbitolu (grupa E); ścieżka 8 – osierdzia poddane fotooksydacji w obecności błękitu metylenowego (grupa F); ścieżka 9 – osierdzia poddane fotooksydacji w obecności błękitu metylenowego i 0,1% sorbitolu (grupa G); ścieżka 10 – osierdzia poddane fotooksydacji w obecności błękitu metylenowego i 0,5% sorbitolu (grupa H); ścieżka 11 – osierdzia poddane fotooksydacji w obecności błękitu metylenowego i 0,9% sorbitolu (grupa I).

komponenty o ruchliwości większej i mniejszej niż podjednostki α . Pierwszymi z wymienionych były produkty degradacji kolagenu, zaś drugimi – agregaty łańcu-



- A** - osierdzia natywne (nie poddane działaniu błękitu metylenowego, sorbitolu i światła)
B - osierdzia nienaświetlane, poddane działaniu błękitu metylenowego
C - osierdzia nienaświetlane, poddane działaniu błękitu metylenowego i 0,1% sorbitolu
D - osierdzia nienaświetlane, poddane działaniu błękitu metylenowego i 0,5% sorbitolu
E - osierdzia nienaświetlane, poddane działaniu błękitu metylenowego i 0,9% sorbitolu
F - osierdzia poddane fotooksydacji w obecności błękitu metylenowego
G - osierdzia poddane fotooksydacji w obecności błękitu metylenowego i 0,1% sorbitolu
H - osierdzia poddane fotooksydacji w obecności błękitu metylenowego i 0,5% sorbitolu
I - osierdzia poddane fotooksydacji w obecności błękitu metylenowego i 0,9% sorbitolu

Rys. 2. Zawartość komponentów kolagenowych w hydrolizatach próbek osierdzy poddanych działaniu pepsyny; a – znamienność statystyczna różnic względem wyników uzyskanych dla osierdzy natywnych ($p < 0,05$); b – znamienność statystyczna różnic względem wyników uzyskanych dla osierdzy fotooksydowanych w obecności błękitu metylenowego ($p < 0,05$); średnia \pm SD.

chów α . Ostatnia grupa komponentów obejmowała te, złożone zarówno z 2 i 3 łańcuchów α (wędrujących w żelu jako prążki β i γ), jak i agregaty wielu podjednostek α , bardzo słabo penetrujące żel.

Zawartość poszczególnych komponentów kolagenowych, obecnych w hydrolizatach, szacowano densytometrycznie. Wielkość pól powierzchni pod pikami densytoqramów była wprost proporcjonalna do zawartości wspomnianych komponentów. Wyniki przeprowadzonej analizy densytometrycznej przedstawiono na rysunku 2.

W celu zbadania wpływu zastosowanego barwnika i sorbitolu na podatność proteolityczną kolagenu osierdzia, porównano skład hydrolizatów tkanek nienaświetlanych, lecz poddanych działaniu błękitu metylenowego oraz – działaniu barwnika i sorbitolu (w stężeniach: 0,1, 0,5 lub 0,9%) wobec osierdzy natywnych (rys. 2 – B, C, D, E vs 2A). Stwierdzono statystycznie istotne zmiany w zawartości poszczególnych komponentów kolagenowych w hydrolizatach tkanek poddanych działaniu barwnika, jak i traktowanych barwnikiem oraz sorbitolem, w porównaniu z zawartością omawianych komponentów w hydrolizatach tkanek natywnych. Zwiększona liczba agregatów łańcuchów α , obserwowana w przypadku tkanek poddanych działaniu błękitu metylenowego, jak i tkanek poddanych działaniu barwnika i 0,1% sorbitolu (rys. 2 – B, C vs 2A), związana jest z interferencją cząsteczek barwnika w oznaczenia densytometryczne, co zgodne jest z naszymi wcześniejszymi obserwacjami (11). Próbkki tkankowe, nie poddane naświetlaniu jak również uzyskane z nich hydrolizaty zachowały niebieską barwę, pomimo intensywnego płukania tkanek w roztworze kwasu octowego. Intensywność zabarwienia tkanek i hydrolizatów była odwrotnie proporcjonalna do użytego stężenia sorbitolu. Zmniejszenie liczby łańcuchów $\alpha(V)$ we wszystkich grupach tkanek nienaświetlanych (rys. 2 – B, C, D, E vs 2A) może mieć związek ze zmianami struktury włókien kolagenowych, wywołanymi odwodnieniem tego białka na skutek wstępnej inkubacji próbek tkankowych w 50% sacharozie. Inkubację tę prowadzi się w celu ułatwienia tkankowej penetracji barwnika stosowanego w procesie fotooksydacji (13). Z uwagi na fakt, że kolagen typu V stanowi rdzeń włókien utworzonych przez kolagen typu I (15), odwodnienie tkanki może prowadzić do wzrostu upakowania tych włókien, co utrudnia penetrację pepsyny w głąb struktury włóknistej osierdzia. Konsekwencją opisanego zjawiska może być zmniejszone uwalnianie łańcuchów $\alpha(V)$ z tkanek, poddanych opisanemu procedurze. Ponadto, obserwowane obniżenie zawartości produktów rozpadu kolagenu, przy jednoczesnym wzroście zawartości łańcuchów $\alpha(I)$ w hydrolizatach tkanek nienaświetlanych, poddanych działaniu sorbitolu, stwierdzone w odniesieniu do tkanek natywnych (rys. 2 – C, D, E vs 2A), związane jest, jak się wydaje, z protekcyjnym działaniem tego związku na kolagen w trakcie przechowywania próbek tkankowych w etanolu. Odwodnienie tkanek bogatych w kolagen powoduje ich usztywnienie i pogorszenie parametrów mechanicznych (16). Jednakże, obecność osmotycznie czynnego związku jakim jest sorbitol, prawdopodobnie sprawia, że zmiana środowiska – z wodnego na alkoholowe – przebiega w sposób łagodniejszy. Tak przeprowadzone odwodnienie kolagenu zwiększa jego wytrzymałość mechaniczną.

Wspomniany efekt ochronny sorbitolu nasila się wraz ze wzrostem stężenia tego związku.

Skuteczność procesu fotoutleniania szacowano poprzez porównanie składu hydrolizatów osierdzy poddanych naświetlaniu w obecności błękitu metylenowego oraz barwnika i sorbitolu (w stężeniach: 0,1, 0,5 lub 0,9%) wobec osierdzy natywnych (rys. 2 – F, G, H, I vs 2A). Stwierdzono statystycznie istotne zmniejszenie całkowitej zawartości komponentów kolagenowych w przypadku wszystkich tkanek poddanych fotoutlenianiu, co stanowiąc wyraz zmniejszenia podatności kolagenu osierdza na działanie pepsyny, świadczyło jednocześnie o spowodowanej fotooksydacją modyfikacji tego białka włóknistego. Jednocześnie, zaobserwowano znamienne zmniejszenie zawartości większości komponentów kolagenowych w hydrolizatach tkanek naświetlanych w obecności błękitu metylenowego i sorbitolu – w każdym zastosowanym stężeniu tego alkoholu (rys. 2 – G, H, I vs 2A). Natomiast, w przypadku tkanek naświetlanych tylko w obecności barwnika stwierdzono istotne zmniejszenie zawartości wyłącznie łańcuchów α kolagenu typu V (rys. 2F vs 2A). Mechanizm czterogodzinnej fotooksydacji kolagenu związany jest z utlenianiem reszt aminokwasowych (głównie histydyny) łańcuchów polipeptydowych tego białka, przez reaktywne formy tlenu, generowane pod wpływem światła, w obecności barwnika. Utlenione reszty aminokwasowe reagując następnie ze sobą, stają się podstawą stabilnych, wewnątrz- i międzycząsteczkowych wiązań sieciujących w omawianym białku (17).

Wpływ sorbitolu na skuteczność procesu fotooksydacji oceniano porównując skład hydrolizatów osierdzy naświetlanych w obecności błękitu metylenowego i sorbitolu (w stężeniach: 0,1, 0,5 lub 0,9%) wobec tkanek naświetlanych tylko w obecności barwnika (rys. 2 – G, H, I vs 2F). Zaobserwowano statystycznie znamienne zmniejszenie zawartości wszystkich komponentów białkowych w hydrolizatach osierdzy naświetlanych w obecności 0,9% sorbitolu (rys. 2 I vs 2F), natomiast w przypadku zastosowania 0,5% sorbitolu – obniżenie zawartości produktów degradacji kolagenu i całkowitej zawartości uwolnionych komponentów białkowych (rys. 2 H vs 2 F). Z przedstawionych danych wynika, że wprowadzenie sorbitolu do środowiska reakcji fotoutleniania spowodowało zwiększenie skuteczności tworzenia nowych wiązań poprzecznych w kolagenie, co znalazło odzwierciedlenie w zmniejszonej podatności na proteolizę tkanek naświetlanych w obecności wspomnianego związku. Znany jest mechanizm sieciującego kolagen działania sorbitolu *in vivo*, w przebiegu cukrzycy. Polega on na wytwarzaniu, drogą reakcji enzymatycznych, produktu utleniania sorbitolu – fruktozy, a następnie 3-deoksyglukozonu, który drogą przemian nieenzymatycznych, wchodząc w reakcje z resztami aminokwasowymi kolagenu, prowadzi do powstawania nowych wiązań poprzecznych w tym białku (12). Pomimo że reakcje utleniania sorbitolu w ustroju wymagają odpowiednio długiego czasu jak i obecności enzymów, nie jest wykluczone, iż pod wpływem generowanych w procesie fotooksydacji reaktywnych form tlenu, mogą powstawać pochodne sorbitolu, będące prekursorami wiązań sieciujących kolagen. Ponadto, nasilenie sieciowania

wspomnianego białka, postępujące wraz ze wzrostem stężenia sorbitolu w środowisku reakcji fotoutleniania związane jest, jak się wydaje, z działaniem osmotycznym tego związku. Zależny od stężenia sorbitolu stopień hydratacji kolagenu może wpływać na dostępność i orientację grup aminokwasowych ulegających utlenieniu i biorących udział w tworzeniu nowych wiązań poprzecznych.

4. Wniosek

Fotooksydacja jest skuteczną metodą sieciowania kolagenu a zastosowanie sorbitolu znacznie poprawia wydajność tego procesu. Uzyskane tą techniką biomateriały mogą być wykorzystywane jako substytuty uszkodzonych tkanek, np. w chirurgii kosmetycznej czy transplantologii.

Podziękowania

Autorzy składają podziękowania dr. Zbigniewowi Nawratowi, z Fundacji Rozwoju Kardiochirurgii w Zabrze, za pomoc w uzyskaniu i przygotowaniu materiału tkankowego do badań.

Literatura

1. Gogiel T., Bańkowski E., (2001), Post. Hig. Med. Dośw., 55, 133-156.
2. Exposito J.-Y., Cluzel C., Garrone R., Lethias C., (2002), Anat. Rec., 268, 302-316.
3. Myllyharju J., Kivirikko K. I., (2001), Ann. Med., 33, 7-21.
4. Tian S.-F., Toda S., Higashino H., Matsumura S., (1996), J. Biochem., 120, 1153-1162.
5. Braczkowski M., Tederko A., Grzybowski J., (1994), Polim. Med., 24, 41-51.
6. Doillon C. J., DeBlois C., Côté M. -F., Fournier N., (1994), Mater. Sci. Eng. C, 2, 43-49.
7. Schmidt C. E., Baier J. M., (2000), Biomaterials, 21, 2215-2231.
8. Abraham G. A., Murray J., Billiar K., Sullivan S. J., (2000), J. Biomed. Mater. Res., 51, 442-452.
9. Moore M. A., (1997), J. Heart Valve Dis., 6, 521-526.
10. Koźma E. M., Glowacki A., Olczyk K., Wisowski G., Olczyk P., Jura-Półtorak A., Nawrat Z., (2003), Biotechnologia, 61, 290-302.
11. Wisowski G., Koźma E. M., Olczyk K., Jura-Półtorak A., Olczyk P., Nawrat Z., (2004), Adv. Clin. Exp. Med., 13, 29-35.
12. Tsukushi S., Katsuzaki T., Aoyama I., Takayama F., Miyazaki T., Shimokata K., Niwa T., (1999), Kidney Int., 55, 1970-1976.
13. Mechanic G. L., (1994), US Patent No. 5 332 475.
14. Peterkofsky B., Haralson M. A., Dimari S. J., Miller E. J., (1995), *Extracellular matrix. A practical approach*, Eds. Haralson M. A., Hasell J. R., 31-71, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo.
15. Aumailley M., Gayraud B., (1998), J. Mol. Med., 76, 253-265.
16. Baer E., Cassidy J. J., Hiltner A., (1988), *Collagen. Biochemistry and Biomechanics*, Ed. Nimni M. E., 2, 177-199, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.
17. Mclroy B. K., Robinson M. D., Chen W. -M., Moore M. A., (1997), J. Heart Valve Dis., 6, 416-423.