

ХАРЬКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

на правах рукописи

НИКИТИНА НАТАЛЬЯ АСКОЛЬДОВНА

Никитина

ЭВОЛЮЦИОННЫЕ И ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ
РАЗВИТИЯ КОЛЛАГЕНОВЫХ СТРУКТУР

03.00.13 - физиология человека и животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Харьков - 1992



00820044 (1)

Работа выполнена в отделе
онтогенеза НИИ биологии

- Научный руководитель: академик АН Украины, доктор биологических наук, профессор
Никитин Владимир Николаевич
- Научный консультант: кандидат биологических наук
Перский Евгений Эфроимович
- Официальные оппоненты: член-корреспондент АН Украины, доктор медицинских наук, профессор
Белоус Аполлон Максимович
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
Френкель Людмила Абрамовна
- Ведущая организация: НИИ геронтологии МОЗ Украины, г. Киев

Защита состоится "15" января 1993 г. на заседании специализированного совета К 058.06.07 Харьковского государственного университета /310077, г. Харьков, пл. Свободы, 4, аудитория 3-15/ в "15" час. "15" мин.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке Харьковского государственного университета.

Автореферат разослан "15" декабря 1992 г.

Ученый секретарь
специализированного совета

Колма

А.В.Некрасова

ЛНБ ім. В. Стефаніка
АН УРСР

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы. Система соединительной ткани играет важную роль в развитии и старении животного организма, его ответе на стрессорные воздействия, адаптации к условиям внешней среды. Существенное, а часто и определяющее значение в осуществлении этих функций соединительной ткани имеет коллаген — один из ее основных структурных компонентов. В настоящее время некоторые механизмы участия коллагена в возрастном развитии соединительной ткани исследованы лишь у высших позвоночных. Наиболее подробно изучены три таких механизма, повышающих структурную стабильность соединительной ткани и являющихся конечными этапами различных возрастных изменений обмена коллагена. Это — нарастание массы коллагена в органах в период их роста, возрастное повышение количества поперечных ковалентных сшивок в коллагене и изменение в онтогенезе его изомолекулярного состава в органах. Однако биологическая роль этих процессов, в первую очередь, смены изоформ коллагена в развивающемся организме не совсем ясна /Слуцкий Л.И., 1984; Сибарил М. 1985; Перский В.Э., Утевская Л.А., 1977, 1986/.

Что же касается механизмов участия коллагена в процессах адаптации организма к условиям внешней среды, то они практически неизвестны. К установленным фактам относится хорошая корреляция между температурой денатурации коллагена, являющейся характеристикой его структурной стабильности, и температурой тела у гомойотермных или температурой среды обитания у пойкилотермных животных. В основе этого явления лежит линейная корреляция между температурой денатурации коллагена и удельным содержанием в нем иминокислот. При этом основной вклад в эту корреляцию вносит 4-окси-пролин /Rigby B. J., 1977; Привалов П.Л., 1985; Есипова Н.Г. с соавт., 1981, 1992; Бурдладнадзе Т.В., 1990, 1991/. Приведенные факты, однако, относятся лишь к животным различных систематических групп, у которых описанная адаптация возникла в течение длительного времени в процессе эволюции. В то же время механизмы быстрого ответа коллагеновых образований на изменения температуры внешней среды остаются неисследованными. Неизвестно, существуют ли общие механизмы перестройки коллагеновых структур, лежащие в основе как их возрастных изменений, так и адаптации к внешним условиям. До последнего времени не были исследованы возрастные особенности такой адаптации, неизвестны эволюционные аспекты возникновения адаптивных перестроек коллагеновых образований.

Ответы на эти вопросы необходимы как для понимания важнейших сторон развития и старения животного организма, так и для понимания основ его адаптации к различным условиям среды обитания, а их решение невозможно без выяснения молекулярных механизмов изменений структуры и свойств коллагена в процессе адаптации соединительной ткани к этим условиям на разных этапах онтогенеза. Практическое выяснение этих вопросов возможно при исследовании возрастных особенностей структуры и свойств коллагена в процессе адаптации к различным условиям среды обитания у животных различных систематических групп.

Цели и задачи исследования. Целями настоящей работы были: проведение сравнительного изучения механизмов возрастных изменений коллагеновых структур у животных различных систематических групп, выявление механизмов структурной адаптации коллагеновых образований к действию экологических факторов — образа жизни /водного и наземного/ и температуры среды обитания, а также выяснение закономерностей становления механизмов возрастного развития коллагена и его адаптации к различным условиям существования в процессе эволюции.

При этом решались следующие задачи:

1. Изучить изменения структуры коллагена на молекулярном и надмолекулярном уровнях у животных различных систематических групп /представителей типов: Губки, Членистоногие, Моллюски, Иглокожие, Хордовые/ разного возраста, исследуя концентрацию коллагена в органах, его термостабильность и степень поперечного ковалентного связывания.

2. Выяснить биологический смысл смены изоформы коллагена в процессе возрастного развития высших позвоночных, оценив структурные характеристики коллагенов типа I и III из кожи крыс на основе калориметрических измерений термодинамических параметров денатурации этих коллагенов.

3. Изучить влияние водного и наземного образа жизни на структуру коллагена, исследуя его концентрацию и термостабильность в коже плотвы обыкновенной, окуня речного, лягушки озерной, дабы зеленой, чесночницы обыкновенной, ящерицы прыткой.

4. Изучить влияние температуры среды обитания на обмен и структуру коллагена на молекулярном и надмолекулярном уровнях в коже, позвоночнике и хвостовой плавнике у гамбузии обыкновенной.

разного возраста, исследуя уровень включения радиоактивного пролина в коллаген, интенсивность гидроксирования пролина в нем, общую концентрацию коллагена и субъединичный состав продуктов его тепловой денатурации.

Научная новизна. Впервые получены данные о возрастном повышении концентрации коллагена и степени его поперечного связывания в органах представителей четырех типов беспозвоночных и трех классов низших позвоночных. Показано, что у свободно живущих личинок низших позвоночных /головастики чесночницы обыкновенной/ концентрация коллагена в постоянных органах /кишечник/ растет на протяжении всего периода личиночного развития, а во временных органах /мышцы и хорда хвоста/, нарастая на начальных стадиях развития, снижается на стадиях резорбции.

Установлено, что у низших позвоночных, ведущих наземный образ жизни, степень поперечного связывания коллагена кожи выше, чем у тех, которые обитают в водной среде. Концентрация коллагена в коже у них не зависит от среды обитания.

На примере гамбузии продемонстрировано, что повышение температуры среды обитания приводит к активации синтеза коллагена, повышению интенсивности гидроксирования пролина в нем, увеличению концентрации и степени его поперечного связывания во всех исследованных органах. Степень всех изменений обмена и структуры коллагена, возникающих под воздействием повышенной температуры, с возрастом уменьшается.

Впервые показано, что важной причиной смены коллагена типа III коллагеном типа I в коже млекопитающих в процессе возрастного развития является различная структурная стабильность этих изоформ.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты работы важны как для понимания особенностей возрастных изменений структуры и свойств коллагена и соединительной ткани в целом у животных различных систематических групп, так и для выявления общих для всех животных пусковых механизмов этих процессов. Они необходимы также для выяснения молекулярных основ процессов адаптации соединительной ткани и всего животного организма к изменяющимся условиям среды обитания. Полученные данные важны для разработки современных представлений об эволюционном возникновении и становлении молекулярных механизмов возрастного развития животных с

различными типами онтогенеза.

Результаты работы, таким образом, могут найти практическое применение в геронтологии, гериатрии и экологии.

Основные положения, которые выносятся на защиту.

1. Механизмы возрастного увеличения концентрации коллагена и его поперечного связывания в органах, обнаруженные у млекопитающих и птиц, имеются у беспозвоночных и низших позвоночных.

2. У наземных низших позвоночных степень поперечного связывания коллагена выше, чем у водных. Концентрация коллагена в органах не зависит от образа жизни.

3. Адаптация коллагеновых структур к повышению температуры у рыб происходит путем интенсификации синтеза и посттрансляционных и постсинтетических модификаций коллагена, что приводит к повышению его структурной стабильности на молекулярном и надмолекулярном уровнях. Выраженность этих эффектов снижается с возрастом.

4. Возрастная смена коллагенов типа I и III в коже млекопитающих обусловлена их различной структурной стабильностью на молекулярном уровне.

5. Предложена схема возникновения и становления механизмов возрастного развития коллагена в процессе эволюции.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 9 печатных работ.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы были представлены и доложены на 5 Всесоюзном биохимическом съезде, г. Киев, 1986; 12 съезде Всесоюзного физиологического общества, г. Кишинев, 1987; Всесоюзном симпозиуме "Молекулярные и функциональные аспекты онтогенеза", г. Харьков, 1987; 13 съезде Украинского физиологического общества, г. Харьков, 1990; 4 съезде Украинского зитомологического общества, г. Харьков, 1992.

Структура и объем диссертации. Материалы диссертации изложены на 144 страницах машинописного текста, состоят из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, изложения полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, содержащего 230 наименований. Работа иллюстрирована 17 таблицами и 15 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования. Исследования были проведены на животных - представителях различных систематических групп, начиная от низших беспозвоночных /губки/ и заканчивая млекопитающими /крысы/. Для экспериментов были выбраны животные, имеющие разные типы онтогенеза. В работе были изучены: губка байкальская /тип Губки/, рак узкопалый и таракан американский /тип Членистоногие/, перловица клиновидная /тип Моллюски/, патирия гребешковая /тип Иглокожие/; гамбузия обыкновенная, окунь речной, плотва обыкновенная /класс Костные рыбы/, чесночница обыкновенная, жаба зеленая, лягушка озерная /класс Земноводные/, ящерица прыткая /класс Пресмыкающиеся/, крыса белая линии Вистар /класс Млекопитающие/, относящиеся к типу Хордовые.

Разделение исследованных животных на возрастные группы проводили у губок по массе тела; у членистоногих, перловиц, патирий, рыб и ящериц - по линейным размерам и массе тела; у амфибий - по стадиям развития. Для рыб и перловиц возраст определяли также по числу годовых колец на чешуе и раковине соответственно. У крыс исследовали четыре возрастные группы: 1 - 1 мес., 2 - 3 мес., 3 - 12 мес. и 4 - 24-месячные животные.

В качестве объектов для исследования коллагена использовали органы, различающиеся по происхождению /производные экто-, эндо- и мезодермы/, функциям и величине нагрузки. У губок были исследованы коллагены тела и подошвы, у других беспозвоночных - коллагены внутренних органов: у рака - брюшной отдел нервной цепочки, пищевод с кардиальной частью желудка, сердце; у таракана - брюшной отдел нервной цепочки, пищевод с зобом, сердце; у перловицы - желудок, сердце, нога, передний и задний мускулы-замкатель, жабры, мантия, ротовые лопасти; у патирии - желудок. У низших позвоночных и ящериц - исследовали кожу, а у головастика чесночницы обыкновенной также плавник, хорду и мышцы хвоста, кишечник. У гамбузий - позвоночник и хвостовой плавник. У крыс исследовали коллаген сухожилий длинного сгибателя и длинного разгибателя пальцев, отделов сердца и кожи.

Концентрацию коллагена в образцах определяли по содержанию оксипролина /Утевская Л.А., Перский Е.З., 1982/. О степени поперечного связывания судили по количеству денатурированного кол-

лагена, переходящего в раствор при нагревании в воде при 60°С в течение разного времени, а также по содержанию в растворившемся коллагене индивидуальных L-цепей и их поперечносвязанных агрегатов, которые разделяли в ПААГе в присутствии додецилсульфата натрия *Miller & J. Rhodes R, 1962/*. О синтезе коллагена судили по включению ³H-пролина. Интенсивность гидроксирования пролина в коллагене оценивали по удельной радиоактивности пролина и оксипролина по методу Замираевой /Замираева Т.В., 1977/. Счет производили на счетчике БЭТА-1.

Термодинамические параметры денатурации коллагенов I и II типов измеряли на оконотруированном в Институте радиофизики и электроники АН Украины дифференциальном адиабатическом калориметре с изменяющейся постоянной времени и чувствительностью 10 Вт.

Полученные экспериментальные данные обрабатывали стандартными статистическими методами /Кендалл М.Д., Старт А., 1973/ на ЭВМ ВУИС-001 по программе, составленной в НИЧ ХГУ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Глава I. Возрастные и тканевые особенности содержания коллагена в органах животных различных систематических групп.

Исследования, проведенные на губке байкальской, раке узкопалом, таракане американском, перловике клиновидной, патирии гребешковой, гамбузии обыкновенной, чесночнице обыкновенной и белой крысе линии Вистар показали, что в большинстве изученных органов концентрация коллагена увеличивается с возрастом. Причем у исследованных видов это повышение сильнее выражено на ранних стадиях развития. В таблице I представлены примеры такого увеличения концентрации оксипролина /маркера коллагена/ в некоторых органах изученных видов.

Таблица I.

Возрастные изменения концентрации оксипролина в органах исследованных животных, мкг/100 мг сухой массы.

Вид	: Орган	: Возрастная группа	: Концентрация оксипролина
губка бай-	: подошва	: I	: 2,66±0,18
кальская	: "	: II	: 3,54±0,11*

Вид	Орган	Возрастная группа	Концентрация оксипролина
рак узкопалый	брюшной отдел	I	508,6±32,2
	нервной цепочки	2	703,5±81,6*
таракан американский	брюшной отдел	I	309,1±12,4
		2	357,2±22,5*
		3	433,7±32,5*
перловица клиновидная	желудок	I	218,5±11,4
		2	305,0±15,4*
	нога	I	677,9±24,0
		2	766,3±18,6*
	передний мускул-замыкатель	I	242,5±12,4
		2	482,3±40,4*
	задний мускул-замыкатель	I	252,7±16,4
		2	350,8±32,5*
патирия гребешковая	желудок	I	461,5±25,0
		2	558,2±38,0*
		3	526,2±52,4
гамбузия обыкновенная	кожа	I	1542,3±127,4
		2	2436,1±280,2*
		3	2723,1±246,2
		4	3367,8±301,6*
чесночница обыкновенная	кишечник	I	13,4±0,7
		2	45,7±3,5*
		3	61,9±6,9*
		4	112,3±15,6*
		5	147,2±12,1*
		6	419,6±32,3*

Вид	Орган	Возрастная группа	Концентрация оксипролина
крыса	: сухожилия	: I	: 21,5±1,9
	: длинного сги-	: 2	: 33,9±1,7*
	: бателя паль-	: 3	: 34,6±1,9
	: цев	: 4	: 35,1±1,4
	: сухожилия	: I	: 12,8±1,0
	: длинного раз-	: 2	: 16,4±1,4*
	: гибателя паль-	: 3	: 26,1±1,8*
	: цев	: 4	: 27,8±1,7

П р и м е ч а н и е: во всех случаях, обозначенных /ж/
различия значимы /P < 0,05/

Как видно из таблицы, процесс повышения концентрации коллагена наблюдается в органах представителей всех исследованных систематических групп, обнаруживая при этом выраженные тканевые особенности. Поскольку механизм повышения концентрации коллагена характерен для органов, являющихся производными всех трех зародышевых листков /например, брюшной отдел нервной цепочки рака и таракана - производные эктодермы, желудок и нога перловицы - мезодермы, желудок патирии - энтодермы/, то, по-видимому, он возник еще до разделения животных на ныне существующие таксономические группы. Особенно следует подчеркнуть, что рост концентрации коллагена в онтогенезе обнаруживается уже у наиболее примитивных многоклеточных - губок. По-видимому, механизм повышения концентрации наиболее древний и возник практически одновременно с появлением коллагена, когда рост массы первичных многоклеточных потребовал возникновения специального каркаса, несущего опорную функцию.

Глава 2. Возрастные и тканевые особенности поперечного связывания в коллагене животных разных систематических групп.

Изучение растворимости коллагенов перловицы клиновидной, гамбузии обыкновенной и крысы показало, что она уменьшается с

возрастом у всех исследованных видов животных. Это свидетельствует о возрастном повышении числа и интегральной прочности поперечных сшивок в коллагене этих животных. В таблице 2 приведены данные о выходе в раствор коллагена при нагревании и его субъединичном составе для некоторых органов исследованных животных. Обращает на себя внимание некоторое увеличение растворимости сухожилий крыс во второй возрастной группе /3 мес./, что связано, по-видимому, с увеличением концентрации коллагена в органах и одновременным повышением удельной доли термолабильных сшивок в нем в этот период /Bailey A. J., 1976; Никитин В.Н., Перский Е.З., Утевская Л.А., 1977/.

Как видно из таблицы 2, поперечное связывание коллагена характеризуется значительными возрастными и тканевыми особенностями. Так, в растворимом коллагене перловицы клиновидной, количество которого значительно снижается с возрастом, наблюдается одновременное увеличение количества β -частиц /парно соединенных ковалентными сшивками α -цепей - индивидуальных полипептидных цепей молекулы коллагена/. При этом в коллагене моллюска не обнаруживаются частицы, представляющие собой более высокие степени полимеризации α -цепей. Растворимый коллаген гамбузии представлен только α -цепями, удельное содержание которых снижается с возрастом. В то же время в растворимом коллагене крыс обнаруживаются как α -цепи, так и β - и более высокополимерные частицы. Удельное содержание последних намного выше у старых животных, чем у молодых. Таким образом, на фоне общего возрастного повышения степени поперечного связывания коллагена у всех исследованных видов животных обнаруживаются отчетливые особенности этого процесса, связанные с их систематической принадлежностью. Судя по полученным данным, в коллагене перловицы с возрастом внутримолекулярное связывание развивается незначительно, а в коллагене гамбузии оно практически отсутствует. В обоих случаях идет в основном межмолекулярное связывание, приводящее к появлению нерастворимого коллагена. У крыс наблюдается наибольшее разнообразие различных типов поперечных связей, что приводит к появлению большого количества частиц разной степени полимеризации. Наличие механизма увеличения степени поперечного связывания коллагена с возрастом у моллюсков свидетельствует о его достаточной древности. Возмож-

Таблица 2.

Возрастные изменения выхода в раствор коллагена при нагревании органов исследованных животных и субъединичный состав растворимого коллагена, % к общему коллагену

Вид	Орган	: Возрастная группа	: Растворимый коллаген	: Субъединичный состав растворимого коллагена			
				: пре- α -тицы	: час- α -цепи	: β -частицы	: высокополимерные частицы
Перловица:	нога	: 1	: 26,1 \pm 1,3	: 8,4 \pm 0,6	: 15,4 \pm 1,7	: 2,3 \pm 0,2	: -
	клиновидн.	: 2	: 13,0 \pm 0,9*	: 1,7 \pm 0,2*	: 8,3 \pm 1,1*	: 3,0 \pm 0,3*	: -
Гамбузия:	кожа	: 1	: 66,0 \pm 5,6	: -	: 60,0 \pm 5,6	: -	: -
	обикновен.	: 2	: 53,6 \pm 5,8*	: -	: 53,6 \pm 5,8*	: -	: -
Крыса белая	: сухожилие	: 1	: 12,4 \pm 0,9	: -	: 7,8 \pm 0,8	: 2,8 \pm 0,2	: 1,6 \pm 0,1
	: длинного	: 2	: 15,2 \pm 0,8	: -	: 10,4 \pm 0,9*	: 3,3 \pm 0,2*	: 1,5 \pm 0,1
	: сгибателя	: 3	: 7,6 \pm 0,6*	: -	: 3,5 \pm 0,2*	: 2,3 \pm 0,2*	: 1,7 \pm 0,1
	: пальцев	: 4	: 5,8 \pm 0,5	: -	: 1,9 \pm 0,2*	: 1,8 \pm 0,1*	: 1,9 \pm 0,1*
	: сухожилие:	: 1	: 13,6 \pm 0,9	: -	: 9,0 \pm 0,7	: 2,9 \pm 0,2	: 1,6 \pm 0,1
: длинного	: 2	: 19,2 \pm 1,1*	: -	: 13,7 \pm 1,1*	: 3,5 \pm 0,3*	: 2,0 \pm 0,2*	
: разгибателя	: 3	: 11,0 \pm 0,9*	: -	: 4,7 \pm 0,3*	: 3,5 \pm 0,3	: 2,8 \pm 0,2*	
: пальцев	: 4	: 7,4 \pm 0,7	: -	: 2,7 \pm 0,1*	: 2,5 \pm 0,2*	: 2,2 \pm 0,3*	

но, механизм повышения прочности коллагенового каркаса за счет образования в нем поперечных сшивок возник либо одновременно, либо несколько позже механизма повышения концентрации коллагена в онтогенезе.

Глава 3. Термодинамические параметры денатурации коллагенов типа I и III.

В таблице 3 приведены данные о величинах энтальпии и энтропии перехода порядок-беспорядок в коллагенах типа I и III из кожи крыс.

Таблица 3.
Термодинамические параметры денатурации коллагенов типа I и III.

Тип коллагена :	Стадия процесса :	$\Delta H_m, \text{ Дж/г}$:	$T_m, ^\circ\text{C}$:	$\Delta S, \text{ э.е}$:
I	I	$21,4 \pm 1,05$	34,2	0,017
	2	$40,8 \pm 2,05$	38,5	0,031
	I+2	$62,2 \pm 2,48$		0,046
III	I	$9,5 \pm 0,46$	31,8	0,007
	2	$55,3 \pm 2,72$	37,0	0,043
	I+2	$64,8 \pm 2,93$		0,050

Как видно, полученные данные указывают на наличие двух пиков теплопоглощения для растворов коллагенов обоих типов. По-видимому, первый пик отражает конформационную перестройку некоторых участков молекул, вероятно, связанную с их дегидратацией, необходимой для начала фибриллообразования. Второй пик отвечает разворачиванию тройной спирали, т.е. истинной денатурации /Привалов П.Л., 1979; Бурджанадзе Т.В., 1990/. Температуры, при которых наблюдаются оба пика теплопоглощения, ниже у коллагена типа III, чем у коллагена типа I, что свидетельствует о более высокой термостабильности последнего. Поэтому возможно, что смена коллагена типа III коллагеном типа I является важным фактором структурной стабилизации надмолекулярных образований соединительной ткани в процессе ее возрастного развития. Хотя суммарная для обеих стадий денатурации величина энтальпии для коллагенов типа I и III одна и та же, энтальпия первой стадии существенно выше у коллагена типа I. Это обстоя-

Ятельство должно облегчать начальные стадии фибриллогенеза коллагена типа III по сравнению с коллагеном типа I. Возможно, этим и объясняется то, что на ранних этапах развития, когда в организме активно протекают процессы морфогенеза, неотъемлемой частью которых является образование и распад фибриллярных структур, в тканях, содержащих оба типа коллагена, преобладает тип III. Таким образом, обнаруженные различия термодинамических параметров коллагенов I и III обусловлены особенностями их структуры и необходимы для функционирования соединительной ткани на разных этапах онтогенеза. Следует отметить, что смена изоформ коллагена в развивающихся тканях и органах - по-видимому, эволюционно наиболее молодой механизм возрастного развития коллагеновых структур, возникший, когда у древних многоклеточных началась дифференцировка тканей и соответственно появились гомологичные α -цепи коллагена.

Глава 4. Влияние экологических факторов на структуру и обмен коллагена у животных различных систематических групп. В качестве факторов, влияющих на структуру и обмен коллагена, были выбраны образ жизни /водный, преимущественно наземный и наземный/ и различная температура среды обитания. В первом случае исследовали коллаген кожи представителей рыб, земноводных и пресмыкающихся; во втором - коллаген кожи, позвоночника и хвостового плавника рыб. В таблице 4 приведены данные о концентрации оксипролина в коже и растворимости коллагена в ней у взрослых особей представителей трех классов низших позвоночных.

Таблица 4.

Концентрация оксипролина в коже /мг/100 мг сухой массы/ и растворимость коллагена кожи /%/ у представителей рыб, земноводных и пресмыкающихся.

Показатель	Вид					
	окунь речной	плотва обыкновенная	лягушка озерная	жаба зеленая	черепаха обыкновенная	ящерица прыткая
Концентрация:	2,02	1,99	1,29	0,90	1,34	1,56
ОПР	+0,15	+0,10	+0,03	+0,03	+0,04	+0,09
Растворимость:	86,4	-	71,9	64,4	54,2	5,3
мость	+10,1	-	-5,6	+4,4	+6,2	+0,5

Как видно из таблицы 4, у взрослых животных концентрация коллагена в коже не зависит от уровня организации, а его растворимость закономерно снижается с повышением систематического ранга вида. Это свидетельствует об увеличении структурной стабильности коллагеновых образований за счет увеличения в них степени поперечного сшивания у низших позвоночных в ряду: рыбы, земноводные, пресмыкающиеся и, по-видимому, связано с их существованием в разных средах. На это указывает и то, что растворимость коллагена кожи среди исследованных земноводных наибольшая у лягушки озерной и наименьшая у чесночницы обыкновенной. При этом во взрослом состоянии лягушка ведет преимущественно водный образ жизни, чесночница полностью наземный, а жаба зеленая, растворимость коллагена кожи которой занимает промежуточное положение, ведет преимущественно наземный образ жизни. Известно, что одной из адаптаций, возникших при переходе от водного к наземному образу жизни в процессе эволюции, было повышение прочности соединительнотканых структур кожи (Vaccari A., 1972). Полученные результаты свидетельствуют, что важную роль в возникновении этой адаптации играет интенсификация поперечного сшивания коллагеновых образований.

Влияние температуры воды на структуру и обмен коллагена в органах гамбузии разного возраста приведены в таблице 5.

Таблица 5.

Влияние температуры воды на структурные и обменные характеристики коллагена в органах гамбузии разного возраста.

Показатель	: Орган	: Возрастная:	Температура воды	
			: группа	: I 6°C
	: кожа	: I	: 2097±205	: 2619±251*
		: 2	: 3367±250	: 4206±276*
Концентрация	: позвоночник:	2	: 1284±63	: 1345±56*
ОПРО, мкг/100 мг				
сухой массы	: хвостовой	: I	: 1456±170	: 1642±120*
	: плавник	: 2	: 1592±131	: 1542±146
Растворимость	: кожа	: I	: 74±2	: 68±1*
коллагена, %		: 2	: 53±1	: 39±2*

Показатель	Орган	Возрастная группа	Температура воды	
			16°C	23°C
	³ H-ПРО		14773±891	20143±988*
	³ H-ОПРО	позвоночник	6512±298	9623±666*
	³ H-СПРС			
Удельная радиоактивность, имп/мин/100 мг	³ H-ОПРО+		0,305	0,323
	+ ³ H-ПРО			
	³ H-ПРО		8082±324	8390±253*
коллагена	³ H-ОПРО	хвостовой плавник	3081±193	3858±204*
	³ H-ОПРО			
	³ H-ОПРО+		0,276	0,315
	+ ³ H-ПРО			

Согласно данным таблицы 5, повышение температуры воды приводит к значительному росту интенсивности синтеза коллагена и активации ключевого этапа его посттрансляционных модификаций - гидроксиглирования пролина. Следствием этого является повышение концентрации коллагена и увеличение в нем содержания оксипролина. Судя по значительному снижению растворимости, повышение температуры воды приводит и к интенсификации конечных стадий постсинтетических модификаций коллагена - его поперечного связывания. Таким образом, адаптация коллагеновых образований к повышению температуры среды обитания заключается в их структурной перестройке, приводящей к росту их структурной стабильности как на молекулярном уровне /повышение степени гидроксиглирования пролина в коллагене/, так и на надмолекулярном уровне /увеличение концентрации коллагена и степени его поперечного связывания/. В основе этой перестройки лежат согласованные изменения всех последовательных стадий обмена коллагена. Обращает на себя внимание тот факт, что по ряду показателей степень адаптивных изменений структуры у гамбузий старшей возрастной группы меньше, чем у молодых. Характерно, что

обнаруженные механизмы адаптации к повышенной температуре и механизмы, лежащие в основе возрастных изменений структуры коллагена, в основном одни и те же. Это может свидетельствовать об общности их эволюционного происхождения.

ОСНОВНЫЕ ВЫВОДЫ

1. Исследования концентрации и степень поперечного связывания коллагена в органах представителей 4 типов беспозвоночных /Губки, Членистоногие, Моллюски, Иглокожие/ и 4 классов позвоночных /Костные рыбы, Земноводные, Пресмыкающиеся, Млекопитающие/ животных разного возраста.

2. Показано, что в подошве губки байкальской и в большинстве изученных органов рака узкопалого, таракана американского, перловицы клиновидной, патирии гребешковой концентрация оксипролина с возрастом увеличивается, что свидетельствует о росте концентрации коллагена в этих органах. В теле губки байкальской и ряде органов других беспозвоночных это повышение происходит на ранних этапах развития, после чего происходит снижение концентрации оксипролина с возрастом.

3. Показано, что в коже, позвоночнике гамбузии обыкновенной; плавниках и внутренних органах головастика чесночницы обыкновенной; коже, сухожильях длинного сгибателя и разгибателя пальцев, отделах сердца белой крысы линии Вистар концентрация коллагена с возрастом увеличивается.

4. Показано, что степень поперечного связывания коллагена в органах перловицы клиновидной, гамбузии обыкновенной и белой крысы линии Вистар с возрастом увеличивается.

5. На основании полученных результатов постулировано, что механизмы возрастного изменения концентрации и поперечного связывания коллагена имеют качественно подобный характер в органах всех многоклеточных животных, начиная от наиболее примитивных - губок - и заканчивая млекопитающими.

6. Проведено сравнительное исследование термодинамических параметров денатурации коллагенов типов I и III из кожи новорожденных крыс линии Вистар и показано, что одной из важных причин их смены в процессе развития является более высокая структурная стабильность коллагена типа I.

7. Исследование концентрации коллагена в коже взрослых особей плотвы обыкновенной, окуня речного, лягушки озерной, жабы зеленой, чесночницы обыкновенной, ящерицы прыткой не выявило различий, связанных с повышением систематического ранга.

ИИБ им. В. Стефанкина
АН УРСР

8. Исследование степени поперечного связывания в коже представителей этих классов позвоночных животных выявило закономерное увеличение этого показателя с повышением их систематического ранга, представляющее собой возникшую в процессе эволюции адаптацию, связанную с переходом от водного к наземному образу жизни.

9. Исследование механизмов адаптации коллагеновых структур у гамбузии обикновенной к повышенной температуре показало, что они осуществляются за счет интенсификации синтеза коллагена, повышения степени гидроксирования пролина в нем, увеличения его концентрации в органах, а также повышения плотности поперечного связывания, что приводит к увеличению структурной стабильности коллагеновых образований. Степень проявления этих процессов больше у молодых животных.

10. На основании полученных и литературных данных предложена следующая последовательность возникновения наиболее общих механизмов возрастного развития коллагена в процессе эволюции: повышение концентрации коллагена, развитие в нем сети поперечных ковалентных связей, смена различных изоформ в процессе развития.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Перский Е.Э., Утевская Л.А., Наглов А.В., Никитина Н.А., Барановский А.Э. Эволюционное становление механизмов возрастного развития коллагеновых структур. I. Возрастные изменения концентрации коллагена в органах высокоорганизованных беспозвоночных // Системы биосинтеза белка и механизмы регуляции функций в онтогенезе. - К.: Наук. думка, 1985. - с. 52-56.
2. Перский Е.Э., Утевская Л.А., Наглов А.В., Никитина Н.А. Эволюция онтогенетических механизмов развития коллагеновых структур // 5 Всес. биохим. с. - Тез. докл. - М.: Б.и., 1986. - с. 170-171.
3. Перский Е.Э., Утевская Л.А., Наглов О.В., Никитина Н.А. Развитие коллагеновых структур в онтогенезе тварин різних систематичних груп // 12 з. Україн. фізіолог. тов-ва. - Тези доп. - Львів: Б.в., 1986. - с. 318-319.
4. Перский Е.Э., Утевская Л.А., Васильева Л.В., Никитина Н.А., Наглов А.В., Гамова А.В. Влияние периодического сдерживающего роста питания на возрастные изменения структуры и обмена коллагена в тканях с различной функциональной нагрузкой // 15 с. Всес. физиол. об-ва. - Кишинев, 1987. - Тез. докл., Т.2. - Л.: Наука, 1987. - с. 556.

5. Утевская Л.А., Никитина Н.А., Гамова А.В. Возрастные особенности зависимости вязко-упругих свойств сухожилий от содержания в них коллагена и степени его поперечного сшивания // Всес. симп. "Молекулярные и функциональные механизмы онтогенеза", Тез. докл. - Харьков: Б.И., 1987. - с. 185-186.
6. Перский Е.Э., Наглов А.В., Никитина Н.А. Изменения содержания коллагена в органах головастика *Polobates fuscus* при нормальном и индуцированном экзогенным тироксином метаморфозе // Вест. Харьк. Ун-та. - 1988. - № 313. - с. 18-20.
7. Перский Е.Э., Никитина Н.А., Утевская Л.А., Васильева Л.В. Эволюционное становление механизмов возрастного развития коллагеновых структур. П. Возрастные изменения концентрации коллагена у байкальской губки *Libinia sp.* // Вест. Харьк. ун-та. - 1990. - № 346. - с. 16-18.
8. Перський Є.Є., Гімпелевич Б.Г., Гасан А.А., Нікітіна Н.А., Утевська Л.А. Термостабільність колагенів типів I та III // Доп. АН УРСР, Сер. Б. - 1990. - № 4. - с. 69-72.
9. Перський Є.Є., Нікітіна Н.А., Наглов О.В., Утевська Л.А. Колаген внутрішніх органів *Pezomachus americana* в онтогенезі // 4 з. Укр. ентомол. тов-ва. - Тез. доп. - Харків: Б.В., 1992. - с. 125-126.

Ab 26.637

AB 26.637