ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ОБРАЗОВАНИЮ

ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ им В.Г. БЕЛИНСКОГО

КАФЕДРА БИОХИМИИ

КУРСОВАЯ РАБОТА:

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА БЕЛКОВ СУХОЖИЛИЙ, ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ

Выполнил: студент группы БХ – 31

Бегутов М.М.

Проверил: проф. Генгин М.Т.

ПЕНЗА

2009

**Содержание**

Введение

1. Сухожилия, соединительная ткань и коллагеновые волокна

* 1. Молекулярная структура и типы коллагена
  2. Растворимые фракции и агрегация коллагена в фибриллы
  3. Данные ЯМР о структуре связанной воды в коллагене с помощью сканирующей калориметрии

2. Способы иммобилизации коллагена из различных органов и тканей. Возможность применения в иммобилизации коллагенов сухожилий.

Заключение

Список литературы

**Введение**

Медицинская хирургия всегда требует новые материалы. В пятидесятых годах прошлого столетья такие материалы появились благодаря интенсивному развитию химии полимеров. Некоторые синтетические материалы, например, нейлон, капрон, лавсан, дакрон, тефлон и другие, начали внедрять в медицинскую практику по причине их кажущихся на первый взгляд положительных качеств, прежде всего доступности, легкости изготовления, прочности, простоты стерилизации, относительной биологической инертности.

Классическое понятие «биологическое лучше искусственного» подвергли сомнению из-за чрезмерного увлечения полимерными материалами.

С накоплением опыта применения синтетических материалов появился обоснованный скептицизм. Более того, сложные проблемы восстановительной хирургии не решались окончательно.

Инертные полимеры в живом организме оставались, к большому сожалению, инородным телом, они меняли свои физические свойства, поддерживали хроническую воспалительную реакцию; длительность функционирования протезов из полимеров приносила вред живому организму, в научной медицинской литературе появились сведения о канцерогенной опасности полимеров. Поэтому стали уделять больше внимания рассасывающимся материалам, которые в процессе регенерации постепенно замещались собственными тканями живого организма.

**1. Сухожилия, соединительная ткань и коллагеновые волокна**

*Сухожилие* – образование из соединительной ткани, концевая структура поперечнополосатых мышц, с помощью которой они прикрепляются к костям скелета.

Сухожилие состоит из компактных параллельных пучков коллагеновых волокон, между которыми расположены ряды фиброцитов (тендоцитов). Чаще в формировании сухожилий участвует коллаген типа I, также встречаются волокна коллагена типов III и V. Пучки коллагена удерживаются вместе протеогликанами. Параллельно ходу коллагеновых волокон расположены кровеносные сосуды, имеющие поперечные анастомозы. Благодаря своей структуре сухожилия имеют высокую прочность и низкую растяжимость.

Форма сухожилий различна – от цилиндрической (чаще у длинных мышц) до плоской, пластинчатой (апоневрозы широких мышц).

В *соединительной ткани* различают: МЕЖКЛЕТОЧНОЕ (ОСНОВНОЕ) ВЕЩЕСТВО, КЛЕТОЧНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ, ВОЛОКНИСТЫЕ СТРУКТУРЫ (коллагеновые волокна). Особенность: межклеточного вещества гораздо больше, чем клеточных элементов.

Фибриллярный белок коллаген составляет примерно треть всех полипептидов в организме животных и человека [M.E. Nimni., 1988]. В сухожилиях содержание коллагена достигает 94, в коже – до 75, в костной ткани – около 50%. Коллаген характеризуется высокой степенью молекулярной упорядоченности и кристалличности.

В тканях подавляющая часть коллагена находится в составе коллагеновых волокон. В образовании их из фибрилл принимают участие протеогликаны и структурные гликопротеины, играющие роль интерфибриллярного цементирующего вещества, поэтому необходимо дифференцировать коллаген как биохимическое понятие (молекулы, полимеризирующиеся в фибриллы) и гетерогенное с химической точки зрения коллагеновое волокно как морфологическое понятие. В биохимической и морфологической литературе о коллагене в одни и те же термины нередко вкладывают различное содержание.

**1.1 Молекулярная структура и типы коллагена**

Основной структурной единицей коллагена являются стержнеобразные молекулы тропоколлагена, состоящие из трех спирализованных полипептидиых цепей, называемых α-цепями, которые скручены между собой в одну общую спираль и стабилизированы водородными связями. Молекула коллагена имеет относительную молекулярную массу 300 000 дальтон, длину 280 нм и толщину 1,4 нм. Каждая α-цепь содержит в среднем около 1040 аминокислотных остатков. Отличительной особенностью коллагена является присутствие оксипролина и оксилизина (химических маркеров коллагена), отсутствие триптофана, низкое содержание тирозина и метионина, высокое содержание глицина (около трети аминокислот), а также пролина и оксипролина (четверть). Концевые участки а-цепей на N- и С-концах молекулы (телопептиды) имеют отличный от основной части аминокислотный состав. Они не содержат пролина и оксипролина и не имеют глицина в каждой третьей позиции и поэтому не образуют тройной спирали. Было показано [Wess T.J., Hammersley A.P., Wess L., Miller A., 1995], что структура коллагена формируется путем параллельной укладки трипептидных молекул тропоколлагена с продольным сдвигом на ~1/4 их длины. В продольном направлении (ось c структуры коллагена) концевые С- и N‑группировки соседних трехспиральных молекул не соприкасаются, а величина промежутков, или ″щелей″, составляет около 340 Å в длину. Распределение подобных ″вакансий″ поперечным сечением около 15 Å в супрамолекулярной структуре коллагена является строго упорядоченным, что проявляется в форме характерной поперечной исчерченности коллагена с периодом с0 = 640 Å, видимой на электронно-микроскопических снимках [2–4]. При окрашивании ″плотные″ участки остаются светлыми, тогда как вакансионные, или ″рыхлые″, участки окрашиваются в темный цвет. Таким образом, в направлении оси с в коллагене наблюдается регулярное чередование светлых, или упорядоченных, участков размером 300 Å и темных, или разупорядоченных, (рыхлых) участков размером 340 Å, включающих указанные выше молекулярные вакансии, или ″щели″.

Иммунологические исследования показали наличие в молекуле коллагена трех различных групп антигенных детерминант: 1) терминальных, находящихся в телопептидах, 2) спиральных, локализующихся на поверхности молекул, и 3) центральных, находящихся в а-цепях и освобождающихся при частичной или полной денатурации коллагена, т.е. при распаде трехспиральной спирали на отдельные цепи [Timpl R., 1976].

Важнейшим достижением последних лет является открытие гетерогенности коллагена. Из разных тканей выделены четыре генетически различных типа коллагена. Они различаются комбинацией в трехцепочечной молекуле пяти α-цепей [«1 (1); α2; αl(II), αl(III) и αl(IV)], которые кодируются различными генами и имеют некоторые особенности первичной структуры [Trelstad R.L., 1974; 1977; Epstein E.H. et al., 1975; Gay S., Miller E.J., 1978]. Распределение типов коллагена в тканях приведено в табл. 5, составленной по данным биохимического анализа. Иммунологические отличия коллагена разных типов позволили в последние годы благодаря иммуноморфологическим методам с использованием типоспецифических антител изучить локализацию разных типов коллагена в соединительнотканных структурах (табл. 6).

Как видно из данных табл. 6, наиболее распространенной изоформой является коллаген I типа, состоящий из двух<х1 (I) цепей и одной а2 цепи. Коллаген II типа [три αl (II) цепи] выделен первоначально из хрящевой ткани, но затем обнаружен в стекловидном теле и других тканях глаза. P. Smith и соавт. (1976) показали, что он синтезируется эпителием сетчатки. Тип III [три >al (III) цепи] первоначально был обнаружен в коже эмбрионов и аорте, но затем выяснилось, что он содержится в тех же тканях, что и тип I в различных пропорциях с последним. Больше всего его в аорте и кишечнике, по-видимому, в связи с наличием там гладких мышц, которыми он синтезируется наряду с коллагеном типа I [Layman D.L. et al., 1977], а также в строме внутренних органов, что объясняется наличием ретикулиновых волокон, состоящих из коллагена III типа [Wick G. et al., 1978]. Коллаген IV типа, состоящий из трех al (IV) – цепей, выделен из базальных мембран и капсулы хрусталика [Kefalides N. А., 1975].

В настоящее время обнаружены определенные особенности коллагенов разного типа [Miller A., 1976; Trelstad R.L., 1977; Fessler J.H., Fessler L.J., 1978]. Коллагены III и IV типов отличаются более высокой степенью гидроксилирования пролина, а также содержат цистин, благодаря чему способны образовывать дополнительные дисульфидные связи. Тип II и особенно IV тип содержат значительно больше оксилизина и углеводных остатков, что, возможно, стабилизирует комплекс коллагенов с протогликанами. В коллагене IV типа молекулярная масса а-цепей выше, чем в других типах (120 000–180 000 дальтон), что расценивается как отсутствие отщепления концевых пептидов проколлагена, препятствующее образованию в базальных мембранах фибрилл с типичной периодичностью [Minor R.R. et al., 1975].

Следует указать также, что, помимо макрогетерогенности, существует и микрогетерогенность коллагена, т.е. менее существенные отличия внутри типов в степени гидроксилирования пролина и лизина, содержании различных аминокислот и углеводных остатков [Prockop D. et al., 1976]. Это связано с тканевой специфичностью коллагена. Например, существуют подвиды II типа для гиалинового и фиброзного хряща, I типа для кожи, сухожилия, роговицы, две разновидности IV типа [Bailey А. et al., 1979].

По-видимому, макро- и микрогетерогенность первичной структуры коллагена играет важную биологическую роль, определяя особенности коллагеновых волокон на более высоких структурных уровнях и характер взаимодействия их с другими компонентами соединительной ткани и с клеточными' элементами, что в совокупности определяет функциональные особенности разновидностей соединительной ткани.

**1.2 Растворимые фракции и агрегация коллагена в фибриллы**

После секреции в межклеточное пространство и отщепления, пропептидов молекулы коллагена агрегируют в фибриллы, являющиеся первичной формой надмолекулярной структуры коллагена. Поскольку молекулярный механизм фибриллообразования в Организме мало доступен для изучения, основные гипотезы получены на основании исследования агрегации молекул при осаждении их из растворов коллагена.

Типы растворимого коллагена можно разделить на две основные категории. К первой категории (нативные растворы) относятся растворимые фракции, получаемые прямой экстракцией из соединительной ткани молодых животных, у которых коллаген еще недостаточно скреплен межмолекулярными связями. Различаются кислоторастворимый и нейтральносолерастворимый коллаген, экстрагируемые соответственно кислыми буферами и нейтральными солевыми растворами. Ко второй категории относятся растворы зрелого, нерастворимого коллагена, полученные после предварительной ферментативной, химической или механической обработки ткани (солюбилизированный коллаген). Эта категория растворов была использована нами для создания лечебных препаратов из коллагена.

В зависимости от условий осаждения (рН, ионная сила, температура и др.) из раствора коллагена можно получить различные типы фибриллярных структур:

1) фибриллы с неупорядоченной структурой без периодичности;

2) кристаллы длиной 280 нм (SLS‑сегменты), представляющие собой параллельную агрегацию молекул бок в бок. В SLS определили 117 поперечных асимметричных полос, которые, подобно «отпечатку пальцев», характеризуют распределение полярных и неполярных аминокислотных остатков;

3) фибриллы FLS с периодом 280 нм, в которых молекулы также агрегируют параллельно, но ориентированы в соседних слоях в разные стороны (опозиционно), так что N‑концы соединены с С-концами; Рис. 27. Возможные пути внутриклеточного транспорта и секреции коллагена.

4) фибриллы нативного типа (т.е. соответствующие тканевым) с периодичностью 64–67 нм. Основной период в этих фибриллах состоит из светлой А-зоны и темной В-зоны, особенно отчетливо видимыми при негативной окраске фосфорно-вольфрамовой кислотой. После позитивного контрастирования в периоде обнаруживается 12 темных и 12 светлых дополнительных полос, отражающих первичную структуру молекулы [Kuhn К., 1974].

Для изучения фибриллогенеза в организме наибольшее значение имеет механизм агрегации молекул в фибриллы нативного типа, объясняющий наличие периодичности. Начиная с 50‑х годов был выдвинут ряд различных гипотез, из которых наибольшее значение имела модель сдвига соседних молекул на четверть своей длины [Schmitt F. О., Gross J., 1955], и модель R.A. Grant и соавт. (1967), по которой периодичность объясняется существованием на молекулах «полос связывания» длиной 26,5 нм, содержащими полярные группы, и полос, содержащих неполярные группы 37,5 нм.

Позже было установлено, что длина молекулы кратна не 4, а 4,4D (D – длина периода 64 нм). Молекулы, упакованные в фибриллу, в линейной проекции разделены промежутком 0,6 D (зона «пустоты»), а соседние параллельные ряды молекул сдвинуты относительно друг друга на величину периода D, причем они перекрывают концы параллельных им молекул на 0,4 D (зона «перекрытий»).

Таким образом, вдоль фибриллы чередуются зоны «пустот» и «перекрытий», которые на негативно окрашенных электронограммах отражаются соответственно в темных и светлых полосах периода [Ktihn К., 1969; BrunsR. R., Gross J., 1974; Miller A., 1976]. Вся структура стабилизована за счет поперечных связей между молекулами.

Описанная картина укладывается в двухмерную модель упаковки молекул коллагена, изучение же трехмерной структуры сопряжено со значительными трудностями. Одной из наиболее признанных является модель J.W. Smith (1968), по которой пять молекул, сдвинутых между собой на ID, соприкасаясь боковыми поверхностями, уложены в цилиндрический филамент, причем пятая молекула сдвинута по отношению к первой на 4D. Такой филамент растет в длину за счет присоединения новых молекул, а в ширину фибрилла растет только путем соединения филаментов между собой. Внутри филамента молекулы свернуты в спираль [Piez К.А., 1975]. Близка к этому и модель A. Veis н соавт. (1967), в которой предусматривается, что филаменты состоят из четырех молекул коллагена. Следует отметить, что диаметр филаментов по этим моделям (3,5 нм в сухом и 5 нм во влажном состоянии) совпадает с размерами минимальных филаментов (прото- или микрофибрилл), обнаруженных внутри тканевых коллагеновых фибрилл [Olsen В. R., 1963; Doyle В.В. et al., 1974; Brims R.R., 1976], а также в поперечно исчерченных филдментарных агрегатах (см. раздел 2.2.6).

По данным М. Bouteille, D. С. Pease (1971), J.H. Lillie и соавт. (1977), при «инертной» дегидратации, воздействии мочевины или гуанидинхлорида происходит диссоциация фибрилл на филаменты толщиной 3,5–4 нм, причем выявляется спиралевидное скручивание этих филаментов. Спиральная структура коллагеновых фибрилл обнаруживается также при применении метода замораживания – раскалывания [Rayns R. et al., 1974; Belton J. С. et al., 1975], вероятно, в результате использования агентов, разрушающих водородные связи. В некоторых случаях спиралевидная структура фибрилл отмечается и при обычной заливке, например в опухолях [Manabe Т., Kajikkawa V., 1976]. Подобные изменения были обнаружены в склере при резко выраженной близорукости.

В заключение следует отметить, что пока не существует общепризнанной модели трехмерной структуры фибриллы, которая полностью отвечала бы рентгеноструктурным и электронно-микроскопическим данным. Обсуждаются возможности тетрагональной и гексогональной решетки, цилиндрической (в форме вставленных друг в друга цилиндров из слоев молекул) и спиральной (закрученной в рулон) упаковки молекул в фибриллу [Miller A., 1976].

**1.3 Данные ЯМР о структуре связанной воды в коллагене с помощью сканирующей калориметрии**

В состав нативного (неповрежденного) коллагена входит связанная вода, составляющая около 2/3 (или ∼66%) от полной массы сухожилия. Установлено, что вода играет существенную роль в механизме самосборки молекул коллагена и образования фибрилл в цитоплазме коллагеноцитов, а также в механизмах биохимической активности и функционировании коллагена во внеклеточном пространстве живого организма [1]. Однако до настоящего времени принципиальный характер гидратной структуры коллагена остается невыясненным. По данным 2Н ЯМР спектроскопии сухожилий хвоста крысы, обогащенной тяжеловодородной водой 2H2O, было установлено, что в ″плотных″ участках структуры коллагена молекулы связанной воды (2Н2О) характеризуются константами квадрупольного взаимодействия (ККВ) ядер 2Н ~3 кГц (в интервале от +20° до ∼+5 °C).

При отрицательных температурах ККВ возрастают, достигая значений ~8 кГц при –10 °C, и тенденция к увеличению ККВ сохраняется при дальнейшем понижении температуры. Относительно малая величина ККВ и ее плавные изменения типичны для процессов диффузионной подвижности молекул воды в нанопористых системах цеолитового типа. Фазовые переходы в подобных системах, как правило, являются переходами типа порядок–беспорядок (близкими к фазовым переходам второго рода) и не сопровождаются резкими тепловыми эффектами.

В то же время по данным 2Н ЯМР водная подсистема коллагена в областях ″щелей″ характеризуется очень малыми значениями ККВ (близкими к нулевым), что указывает на сильную раз-упорядоченность подсистемы связанной воды в ″рыхлых″ участках структуры коллагена. Обнаружено также, что в окрестности температуры замерзания воды (∼273 K) скачкообразным образом изменяется спектр 2Н ЯМР сухожилия. Интенсивная центральная линия, относимая нами к рыхлым участкам структуры коллагена, становится ненаблюдаемой, что может указывать на фазовый переход первого рода. Данный факт косвенно свидетельствует в пользу модели, в соответствии с которой ″рыхлые″ участки структуры коллагена представляют собой тектогидрат, или структуру, включающую непрерывный трехмерный каркас из молекул воды с тетраэдрической координацией, характерной для льда и клатратных гидратов. В этом случае значение ККВ и ширина спектра 2Н ЯМР должны возрастать на два порядка по сравнению с комнатной температурой, соответственно амплитуда сигнала должна упасть на два порядка, что согласуется с экспериментом. Однако для прямого подтверждения подобной модели расположения молекул воды необходимо получить термодинамические характеристики данного фазового перехода.

В данной работе был проведен анализ величины скрытой теплоты фазового перехода в сухожилиях хвоста крысы с использованием метода сканирующей калориметрии. Для исследований были взяты образцы сухожилия RTT экспериментальных животных линии ″Вистар″, содержавшихся на стандартном питании. Возраст крыс составлял 6 месяцев, численность в группе – 3 животных. Образцы волокон сухожилий весом 100–150 мг изымали непосредственно перед исследованием. Измерения проводили в интервале от комнатной температуры (+20 °С) до –30 °С, скорость изменения температуры 3 град./мин. при использовании автоматического калориметра ДСК‑204 фирмы Netzsch (Германия). Результаты измерений представлены в таблице.

Полученные данные можно сравнить со справочными параметрами для скрытой теплоты плавления чистого льда: Qпл(лед) = 333,5 Дж/г [6]. При сравнении следует учитывать, что в сухожилиях содержание коллагена достигает 94%, а содержание воды в нативном коллагене составляет ∼66%. Распределение связанной воды между плотными и рыхлыми участками достоверно не установлено, но по данным ЯМР 2Н [5] в ″рыхлых″ участках коллагена содержится примерно половина общего содержания воды в сухожилии. Таким образом, если структура подсистемы молекул воды в вакансионных участках нативного коллагена при отрицательных температурах соответствует структуре тектогидрата (клатратоподобного или льдоподобного типа), то ожидаемая скрытая теплота фазового перехода в данной подсистеме должна составить

Qпер = ~(0,66⋅0,5⋅0,94)⋅Qпл(лед) = ∼94 Дж/г,

что находится в хорошем согласии с измеренными значениями для трех образцов.

На кривых охлаждения наблюдаются пониженные значения Qпер, что является следствием значительного переохлаждения образцов при понижении температуры. Данный эффект позволяет получить оценочное значение теплоемкости cp высокотемпературной фазы подсистемы молекул воды, испытывающей фазовый переход. В рамках обсуждаемой модели среднее значение величины изменения теплоты фазового перехода ΔQпep = 16,55 ± 3,9 Дж/г должно быть связано со средней величиной температуры переохлаждения ΔТ = (11,5 ± 0,7)° соотношением

ΔQпep = ~(0,6⋅0,5⋅0,94)⋅ΔсрΔT,

где Δср – разность между теплоемкостью воды и льда. Если свойства водной подсистемы, испытывающей фазовый переход в коллагене, соответствуют свойствам свободной воды и льда, то Δср = 2,062 Дж/г (вблизи 0 °С [6]). Отсюда рассчитанная величина ΔQпер = ∼6,69 Дж/моль; пониженное по сравнению с экспериментом значение расчетной величины ΔQпер может указывать на существование вклада в Δср, связанного с взаимодействием молекул воды и функциональных группировок в белковой структуре. Таким образом, на качественном уровне величина скрытой теплоты фазового перехода находится в согласии с моделью, согласно которой свойства примерно половины связанной воды в структуре коллагена близки к свойствам свободной (или объемной) воды. Повышенные температура плавления льда связанной воды в коллагене и разница значений теплоемкости Δср могут указывать на некоторую взаимосогласованность структур воды и фибриллярного белка, возможно, клатратного типа.

**2. Способы иммобилизации коллагена из различных органов и тканей. Возможность применения в иммобилизации коллагенов сухожилий**

Для растворения коллагена используются различные методики, но большинство из них основано на растворении в уксусной кислоте.

Энуклеированные замороженные глазные яблоки свиньи (–20°) размораживают при комнатной температуре, склера отделяется от остатков мышц, связок и пигмента и промыта холодной водой. Полученная ткань может храниться в замороженном виде в течение 3–4 недель. Выделение коллагена. 100 г. очищенной склеры заливается 5 л щелочного раствора (66 г. NaOH + 100 г. Na2SO4 на 1 л раствора) и при периодическом перемешивании выдерживается при 20° в течение 36 ч. При этом полисахариды и протеогликаны, составляющие значительную часть склеры, переходят в раствор. Затем склеру отделяют от раствора на воронке Бюхнера и промывали 10 л дистиллированной воды. Для нейтрализации щелочи ткань обрабатывают 2%-м H3BO3 в течение 40 мин при перемешивании на магнитной мешалке. Обработку склеры раствором борной кислоты повторяют 4 раза до установления pH раствора 6.0. После нейтрализации щелочи склеру 4 раза отмывают от H3BO3 и Na2SO4 дистиллированной водой (5 л), каждый раз в течение 40 мин при 20° при постоянном перемешивании на магнитной мешалке. Степень отмывки определяют по полному удалению (SO4) – (реакция с BaCl2). Получение раствора коллагена. К отмытой склере добавляют равное по объему количество 0.3 M CH3COOH и выдерживают полученную гелеобразную полупрозрачную массу в течение 7–8 сут при 4° и слабом перемешивании. В этих условиях коллаген переходит в раствор, и склера растворяется практически без остатка. Полученный раствор гомогенизируют и фильтруют через стеклянный фильтр с размером пор 160 мкм, используя водоструйный насос. Концентрация коллагена в полученном растворе (по сухому остатку) составляет 2% по массе. Часть полученного раствора разбавляли 0.2 М Na‑ацетатным буфером с pH 3.44 до концентрации 8.6⋅10–6 и 8.6⋅10–7 М.

*Определение концентрации.* Содержание коллагена в пробах определяют модифицированным методом Лоури [18] при помощи реактива Фолина–Чиокалто. В качестве стандарта используют раствор желатины известной концентрации. Регистрацию проводят спектрофотометрически при λ = 750 нм. Реакционная смесь состоит из 0.04 М CuSO4, 0.11 М Na2C4H4O6, 0.05М Na2CO3, 0.4 М NaOH, реактива Фолина–Чиокалто и коллагенового раствора. Метод основан на регистрации окрашенного соединения, образующегося при взаимодействии белка с реактивом Фолина [19].

Известен способ получения коллагена по патенту США 5106949, МПК A 61 K 35/32, опубл. 21.04.1992 г. Согласно патенту коллаген получают из сухожилий (предпочтительно сухожилий сгибателя копыта телят). Далее производят следующие операции:

– удаляют оболочки сухожилий;

– измельчают материал;

– промывают измельченный материал физиологическим фосфатным буфером (PBS) (2 г хлористого калия КС1, 2 г однозамещенного фосфорнокислого калия KH2РО4, 80 г. хлористого натрия и 79,3 г двузамещенного фосфата натрия на 1 л раствора), рН 6,5–8,5, разбавленным 1:3–1:1; наиболее эффективен разбавленный 1: 3 PBS с ионной силой 0,05 М (0,05 молярного) NaCl и 0,0022 М Na2HPO4 (6‑кратная промывка по 2 ч);

– экстрагируют коллаген слабой кислотой (0,5–2 М уксусная кислота); предпочтительно 0,5 М уксусная кислота с добавкой 4 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА);

– осаждают коллаген с помощью NaCl (0,6–1,8 М);

– выделяют осадок и растворяют его в уксусной кислоте;

– переводят раствор диализом в 0,01 М уксусную кислоту.

Данные методики не противоречат целям исследования ввиду того, что и склера и сухожилия построения одним и тем же типом коллагена, т.е. все указанные типы взаимодействия белка с реактивами применимы в обоих случаях иммобилизации.

**Заключение**

Важной особенностью коллагена и других биологических полимеров является их способность образовывать комплексы с различными лекарственными веществами для направленного действия: усиливающих свертывание крови, стимулирующих восстановление соединительной ткани, противобактериальных и др. Таким образом, открываются широкие перспективы для лечебных препаратов пролонгированного влияния, причем коллаген или другие биополимеры играют для лекарственного средства роль депо. Так, введение коллагеновых препаратов, содержащих линкомицин, показало, что антибиотик сохраняется в окружающих тканях 23-25 суток. На этом принципе сейчас основаны лекарства с увеличенными сроками бактериального воздействия на микробную флору, применяющиеся при лечении остеомиелита, лейшманиозных язв, бронхиальных свищей, при пластике кровеносных сосудов в условиях инфекции.

Способность коллагена образовывать комплексы с гепарином – веществом, препятствующим свертыванию крови и возникновению тромбов, закупоривающих просвет сосуда, послужила основанием для создания сосудистого протеза с антикоагулянтными – противосвертывающими – свойствами. Такой комбинированный сосудистый протез представляет собою тканую или вязаную синтетическую трубку, поры которой заполнены коллагенгепариновой пленкой. Подобные имплантаты можно использовать для замещения не только пораженных артерий, но и пораженных вен, поскольку коллагенгепариновый комплекс длительно обеспечивает противосвертывающий эффект и препятствует образованию пристеночных тромбов.

Явным достоинством коллагена и полученных на его основе коллагеновых материалов для медицины является отсутствие токсических и канцерогенных свойств, слабая антигенность, высокая механическая прочность и устойчивость к тканевым ферментам, регулируемая скорость лизиса в организме, способность образовывать комплексы с биологически активными веществами, стимуляция регенерации собственных тканей организма.

**Список литературы**

1. В.В. Серов, А.Б. Шехтер – Соединительная ткань (функциональная морфология и общая патология) – М, 1981
2. Журнал структурной химии – С.П. Габуда, АА Гайдаш, В.А. Дребущак, С.Г. Козлова – Данные ЯМР о структуре связанной воды в коллагене с помощью сканирующей калориметрии – том 46, №6, 2005
3. ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ – Л.В. Кухарева, Б.А. Парамонов, И.И. Шамолина, Е.Г. Семенова – Способ получения коллагена для лечения патологий тканей организма – СПб, 2003
4. Патент США 5106949, МПК A 61 K 35/32 – 1992 г.
5. Елисеев В.Г. Соединительная ткань. – М.: Медгиз, 1961.
6. Мазуров В.И. Биохимия коллагеновых белков. – М.: Медицина, 1974.
7. Никитин В.Н., Перский Е. Э» Утевская Л.А. Возрастная и эволюционная биохимия коллагеновых структур. – Киев.: Наукова думка, 1977.
8. Хилькин А.М., Шехтер А.Б., Истранов Л.П. Коллаген и его применение в медицине.‑М.: Медицина, 1976.
9. Bazin S., Lelous M., Delannay A. Collagen in granulation tissue. – Agent and Act., 1976, v. 6, p. 272–275
10. Bruns R. Supramolekular structure of polymorphic collagen fibrills. – J. Cell Biol., 1976, v. 68, p. 521–538
11. Gay S., Muller P., Meigel W., Kuhn K. Polymorphic des Kollagens: Neue Aspekte fur die Structur und Funktion des Bindegewebe.–Hautarzt, 1976, v. 27, p. 196–205
12. Gross J. Collagen biology: structure, degradation, and disease. – Harvey Lectures, 1974, v. 68, p. 351–432
13. Gross J. Aspects of the animal collagenases. – In: Biochemistry of collagen. New York, 1976, p. 275–317
14. Kefalldes N. Basement membranes: structural and biosynthetic considerations. – J. invest. Derm., 1975, v. 65, p. 85–92
15. Miller A. Molecular packing in collagen fibrils. – In: Biochemistry of collagen. New York, 1976, p. 85–136
16. Minor R., Clark C, Kefalides N. Synthesis and deposition of basement membrane procollagen. – J. Cell. Biol., 1975, p. 67, part 2, p. 287–899.
17. Piez K – The regulation of collagen fibril formation. – In: Extracellular matrix influences on gene expression. New York, 1975, v. 231–237.
18. Ratnachandran G., Ratnakrishnan C. Molecular structure of collagen. – In: Biochemistry of Collagen. New York, 1976, p. 45–84.
19. Reddi A. Collagen and cell differentiation. – In: Biochemistry of collagen. New York, 1976, p. 449–478
20. Trelstad R. Basement membrane collagens: isolation by heat gelation fractionation. – Upsala J. Med. Sci., 1977, v. 82, p. 157–162.
21. Weiss J. Enzymic degradation of collagen. – Intern. Rev. Connect. Tissue Res., 1976, v. 7, p. 101–157.