

Aleksandra KEZWON, Kamil WOJCIECHOWSKI

e-mail: akezwon@ch.pw.edu.pl

Zakład Mikrobiologii, Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska, Warszawa

Modyfikacja struktury kolagenu jako potencjalne źródło nowych związków o charakterze amfifilowym

Wstęp

Powszechne występowanie aminokwasów, peptydów i białek w świecie przyrody sprawia, iż przybliżenie ich charakterystyki może potencjalnie wpłynąć na rozwój wielu dziedzin życia, zarówno w aspekcie medycznym jak i przemysłowym.

W przypadku zastosowań inżynierskich jedną z bardzo ciekawych grup białek są białka fibrylarne, a wśród nich białka kolagenowe. Aktualnie najczęściej wyróżnia się 29 typów kolagenów różniących się miejscem występowania, funkcją i budową. Kolagen głównie występuje w skórze, ścięgnach, chrząstkach, kościach, ścianach naczyń krwionośnych, błonach wewnątrzustrojowych, zębach czy błonach pęcherzy pławnych ryb [Lasek, 1978].

Kolagen typu I, będący najpowszechniejszą formą kolagenową w świecie ssaków, jest obiektem badań prezentowanych w niniejszej pracy. W środowisku naturalnym najczęściej można go spotkać w postaci fibryli i włókien [Fang i in., 2013], którym nadaje dużą sztywność oraz wytrzymałość [Nikolaeva i in., 2012]. Kolagen typu I buduje głównie skórę, tkanki płuc oraz serca. Występuje również w innych miejscach w postaci kompleksów z kolagenami innych typów [Nikolaeva i in., 2012]. Kolagen wytypowany do przedstawionych badań stanowi bogate źródło nowych biomateriałów. Do korzystnych cech kolagenu, w kontekście nowych biotworzyw, należą m.in. biokompatybilność, biodegradowalność, niska toksyczność oraz wysoka wytrzymałość mechaniczna [Yadavalli i in., 2009].

Celem badań prezentowanych w niniejszej pracy było określenie metodą analizy kształtu kropli aktywności powierzchniowej oraz właściwości reologicznych warstw adsorpcyjnych tworzonych przez kolagen typu I pozyskany ze skóry cielęcej. W pierwszym etapie badań określono aktywność powierzchniową oraz parametry reologiczne dla kolejnych roztworów kolagenu z zachowaną strukturą potrójnej helisy. Następnie badano wpływ procesu denaturacji na aktywność powierzchniową oraz reologię powierzchniową wybranych roztworów kolagenu.

Badania doświadczalne

Materiał

Materiałem badanym był kolagen typu I, ze skóry cielęcej (*Biochrom AG*). Odczynnik pozyskano w postaci roztworu o stężeniu 4 g/l w 0,015M HCl. Kolejne sporządzane roztwory do badań przygotowywano przez rozcieńczenie roztworu wyjściowego 0,015M kwasem chlorowodorowym (*Sigma Aldrich*).

Metody badawcze

Proces denaturacji inicjowano ogrzewaniem w temperaturze: 38,5; 50; 70 i 90°C przez okres jednej godziny. Po zakończeniu inkubacji w zadanej temperaturze, roztwór schładzano do temperatury pokojowej i podawano do celki pomiarowej termostatowanej do 21°C.

Pomiary dynamicznego napięcia powierzchniowego metodą analizy kształtu kropli prowadzono dwuetapowo przy wykorzystaniu tensjometru *PAT 1* (*SINTERFACE*, Niemcy). W pierwszym etapie pomiaru: 1÷3600 s objętość kropli utrzymywano na stałym poziomie (23 µl). W drugim etapie: 3600÷5000 s stosowano sinusoidalne zmiany objętości kropli z określoną częstotliwością: 0,005; 0,010; 0,020; 0,050; 0,100 Hz oraz amplitudą 1 µl (~4%). Zastosowane modyfikacje objętości kropli prowadziły do sinusoidalnej zmiany napięcia powierzchniowego, co

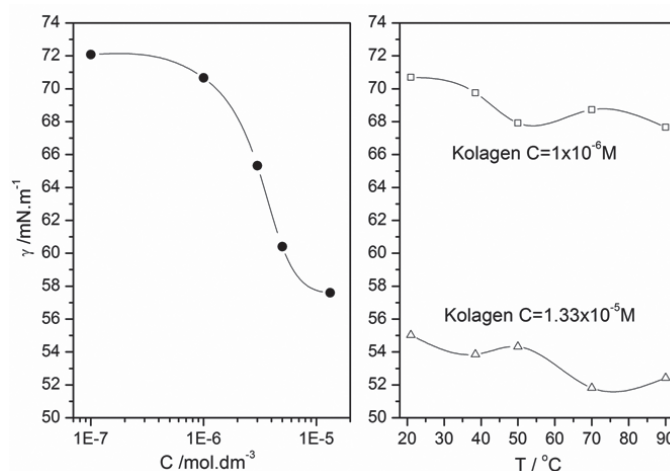
stanowiło odpowiedź układu (miara naprężenia) na zadane oscylacje (odkształcenie).

Izoterma napięcia powierzchniowego $\gamma = f(\log C)$ została wyznaczona na podstawie wyników uzyskanych w pierwszym etapie pomiaru. Na podstawie wyników uzyskanych w różnych temperaturach inkubacji otrzymano zależność równowagowego napięcia powierzchniowego w funkcji stosowanych temperatur inkubacji, $\gamma = f(T_{\text{inkubacji}})$ przy dwóch ustalonych stężeniach kolagenu: $1 \cdot 10^{-6}$ M i $1,33 \cdot 10^{-5}$ M

Wartości parametrów reologicznych: modułu elastyczności powierzchniowej E' oraz modułu lepkości powierzchniowej E'' w funkcji zadanych częstotliwości, stężenia oraz temperatury inkubacji. Wyznaczono z drugiego etapu pomiaru, czyli sinusoidalnej zmiany napięcia powierzchniowego w wyniku zadanych modulacji objętości.

Wyniki i dyskusja

Na rys. 1 przedstawiono uzyskane wartości równowagowego napięcia powierzchniowego w funkcji stężenia kolagenu oraz w funkcji temperatury inkubacji dla dwóch wybranych reprezentatywnych stężeń białka: $1 \cdot 10^{-6}$ M oraz $1,33 \cdot 10^{-5}$ M.



Rys. 1. Równowagowe napięcia powierzchniowe w funkcji stężenia kolagenu oraz temperatury inkubacji dla kolagenu o stężeniu $1 \cdot 10^{-6}$ M (\square) oraz $1,33 \cdot 10^{-5}$ M (Δ)

Dla niemodyfikowanego kolagenu typu I zaobserwowano niewielką zdolność do obniżania napięcia powierzchniowego. W obszarze stężeń poniżej 10^{-6} M liczba zaadsorbowanych cząsteczek jest nieznaczną, a wartości równowagowego napięcia powierzchniowego utrzymują się na poziomie napięcia powierzchniowego dla wody. W zakresie stężeń 10^{-6} ÷ $1,33 \cdot 10^{-5}$ M napięcie powierzchniowe maleje osiągając wartość minimalną około 58 mN/m.

Budowa oraz sekwencja aminokwasowa kolagenu są głównymi przyczynami jego niewielkiej zdolności do obniżania napięcia powierzchniowego. Przeważającą liczbę aminokwasów w sekwencji kolagenu stanowią aminokwasy niepolarne: glicyna, prolina oraz hydroksyprolina [Banaś i Pietrucha, 2009], jednakże w natywnym białku są one w znacznej części ukryte wewnątrz potrójnej helisy. Z kolei aminokwasy polarne (np. kwas asparaginowy i glutaminowy oraz arginina i lizyna [Persikov i in., 2005; Punitha i in., 2009]) obecne są głównie na powierzchni helisy, nadając cząsteczce kolagenu hydrofilowy charak-

ter. Mimo obecności zarówno grup polarnych i niepolarnych, natywny kolagen ma słaby charakter amfifilowy, stąd niewielki spadek napięcia powierzchniowego.

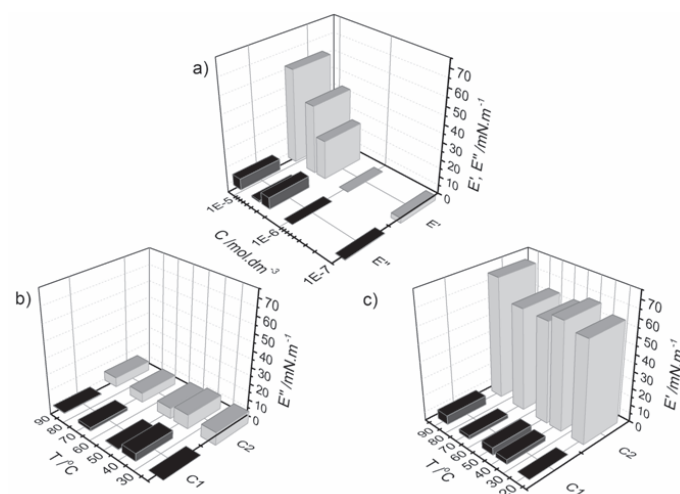
Częściowa denaturacja (np. temperaturowa) kolagenu może sprzyjać odsłanianiu fragmentów hydrofobowych i tym samym może zwiększać jego charakter amfifilowy. Wpływ inkubacji w podwyższonej temperaturze wybranych roztworów kolagenu został przedstawiony na rys. 1 jako zmiana wartości równowagowego napięcia powierzchniowego w funkcji stosowanych temperatur inkubacji. Dla obu badanych stężeń wraz ze wzrostem temperatury inkubacji można zaobserwować zbliżone tendencje do zmiany zdolności obniżania napięcia powierzchniowego. Ponadto dla obu badanych stężeń zaobserwowano stabilizację równowagowego napięcia powierzchniowego w zakresie temperatur 70–90°C.

Najbardziej prawdopodobną przyczyną takiego przebiegu zmian napięcia powierzchniowego w funkcji temperatury inkubacji jest nieodwracalna, bądź powoli odwracalna denaturacja struktury białkowej zapoczątkowana ogrzewaniem w podwyższonej temperaturze, a następnie jej zatrzymanie spowodowane schłodzeniem próbki i prowadzeniem pomiaru w stałej temperaturze 21°C.

Czas inkubacji w podwyższonej temperaturze w każdym przypadku był stały i wynosił 60 minut. Ogrzewanie roztworów kolagenu o niskim *pH* może być przyczyną hydrolytycznego rozpadu białka co może skutkować powstaniem żelatyny [Bozec i Odlyha, 2011]. Jednakże zastosowany czas inkubacji był zbyt krótki, by można było otrzymać żelatynę, w związku z tym zaobserwowane zmiany napięcia powierzchniowego są wynikiem rozkładowania trzeciorzędowej struktury kolagenu, a nie powstaniem żelatyny [Guo i in., 2003].

W ramach przeprowadzonych badań otrzymano również wartości parametrów reologicznych: modułu elastyczności E' oraz modułu lepkości E'' w zakresie stężeń od $1 \cdot 10^{-7}$ M do $1,33 \cdot 10^{-5}$ M oraz dla dwóch wybranych stężeń białka poddanych inkubacji w zakresie temperatur od 21 do 90°C.

Na rys. 2 zostały przedstawione wartości parametrów reologicznych (E' oraz E'') w funkcji stężenia kolagenu (a) oraz temperatur inkubacji (b, c) dla kolagenu o stężeniu $1 \cdot 10^{-6}$ M oraz $1,33 \cdot 10^{-5}$ M dla najwyższej badanej częstotliwości równej 0,1 Hz.



Rys. 2. a) Parametry reologiczne E' i E'' w funkcji stężenia badanych roztworów kolagenu typu I dla częstotliwości 0,1 Hz. b) Moduł lepkości w funkcji temperatur inkubacji dla dwóch wybranych stężeń kolagenu: C1 – $1 \cdot 10^{-6}$ M oraz C2 – $1,33 \cdot 10^{-5}$ M dla częstotliwości 0,1 Hz. c) Moduł elastyczności w funkcji temperatur inkubacji dla dwóch wybranych stężeń kolagenu dla częstotliwości 0,1 Hz

Wraz ze wzrostem stężenia kolagenu zaobserwowano stopniowe zwiększanie się wartości modułu elastyczności, który zwiększa się również wraz ze wzrostem częstotliwości zastosowanych oscylacji. Jest to szczególnie widoczne dla wyższych stężeń: $5 \cdot 10^{-6}$ M oraz $1,33 \cdot 10^{-5}$ M,

dla których wartości E' osiągają odpowiednio 40 oraz 55 $\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$. Wartości modułu lepkości niezależnie od stężenia utrzymują się na stałym, niskim poziomie. Zaadsorbowane warstwy kolagenu posiadają dobre właściwości elastyczne, co wskazuje na wysoki potencjał kolagenu oraz jego modyfikowanych form do zastosowań jako środki emulgujące oraz pianotwórcze.

Z rys. 2 wynika również, że inkubacja w podwyższonej temperaturze ma niewielki wpływ na właściwości mechaniczne zaadsorbowanych warstw kolagenu. Przebieg zmian wartości parametrów reologicznych wraz ze wzrostem temperatury inkubacji nie jest jednoznaczny. Niejasne zmiany wartości parametrów mają związek z charakterem denaturacji – nieodwracalnej, częściowo nieodwracalnej. Uzyskane wyniki nie są wystarczające, aby jednoznacznie określić charakter procesu denaturacji.

Jednakże dla roztworów inkubowanych w 90°C można zaobserwować pewien wzrost wartości E' oraz spadek modułu lepkości E'' . Wskazuje to na wzrastającą zdolność do tworzenia elastycznych warstw powierzchniowych przez cząsteczki kolagenu poddane działaniu wysokiej temperatury.

Wnioski

Wyniki pomiarów napięcia powierzchniowego uzyskane dla natywnych form kolagenu I wskazują na słabą zdolność tego białka do adsorbowania się na granicy faz. Uzyskane wartości parametrów reologicznych wskazują na to, iż warstwy utworzone przez cząsteczki badanych białek mają w przeważającym stopniu właściwości elastyczne, a w znacznie mniejszym lepkie.

Inkubacja w podwyższonej temperaturze wybranych roztworów kolagenu wpływa zarówno na zdolność do obniżania napięcia powierzchniowego, jak i na właściwości mechaniczne zaadsorbowanej warstwy, przy czym zaobserwowane zmiany nie wykazują charakteru liniowego.

Przeprowadzone badania wskazują, że białko w postaci natywnej nie stanowi dobrego materiału na emulsyfikator, ale już niewielkie modyfikacje np. spowodowane podwyższeniem temperatury mają znaczący wpływ na zdolność do obniżania napięcia powierzchniowego i na właściwości lepkosprężyste warstw zaadsorbowanych na granicy faz ciecz/gaz.

LITERATURA

- Banaś M., Pietrucha K., 2009. Typy i struktura białka kolagenowego. *Zesz. Nauk. Pol. Łódzkiej*, **23**, nr 1058
- Bozec L., Odlyha M., 2011. Thermal denaturation studies of collagen by microthermal analysis and atomic force microscopy. *Biophys. J.*, **101**, 228–236. DOI: 10.1016/j.bpj.2011.04.033
- Fang M., Goldstein E.L., Matich E.K., Orr B.G., Banaszak Holl M.M., 2013. Type I Collagen self-assembly: The roles of substrate and concentration. *Langmuir*, **29**, 2330–2338. DOI: 10.1021/la3048104
- Guo L., Colby R.H., Lusignan C.P., Whitesides T.H., 2003. Kinetics of triple helix formation in semidilute gelatin solutions. *Macromolecules*, **36**, 9999–10008. DOI: 10.1021/ma034264s
- Lasek W., 1978. *Kolagen – chemia i wykorzystanie*. WNT, Warszawa
- Nikolaeva T.I., Kuznetsova S.M., Rogachevsky V.V., 2012. Collagen fibril in vitro at nearly physiological temperature. *Biophysics*, **57**, 757–763. DOI: 0.1134/S0006350912060139
- Persikov A.V., Ramshaw J.A.M., Brodsky B., 2005. Prediction of collagen stability from amino acid sequence. *J. Biol. Chem.*, **280**, 19343–19349. DOI: 10.1074/jbc.M501657200
- Punitha V., Raman S.S., Parthasarathi R., Subramanian V., Rao J.R., Nair B.U., 2009. Molecular dynamics investigations on the effect of D amino acid substitution in a triple-helix structure and the stability of collagen. *J Phys. Chem. B*, **113**, 8983–8992. DOI: 10.1021/jp808690m
- Yadavalli V.K., Svintradze D.V., Pidaparti R.M., 2010. Nanoscale measurements of the assembly of collagen to fibrils. *Int. J Biol. Macromolecules*, **46**, 458–464. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2010.02.012