

УДК 543.544.5.068.7, 543.645

Вариации аминокислотного состава костных тканей человека

С. А. ГЕРК^{1,2}, О. А. ГОЛОВАНОВА²

¹Омский государственный университет им. Ф. М. Достоевского,
проспект Мира, 55-А, Омск 644077 (Россия)

E-mail: gerksa_11@mail.ru

²Омский государственный университет путей сообщения,
проспект Маркса, 35, Омск 644046 (Россия)

(Поступила 21.09.12; после доработки 13.03.13)

Аннотация

Методом ВЭЖХ исследован аминокислотный состав костных тканей человека в возрастном интервале 30–79 лет. Установлены половозрастные особенности качественного и количественного содержания аминокислот. Показано, что течение коксартроза не приводит к значительным изменениям аминокислотного состава костных тканей человека.

Ключевые слова: ВЭЖХ, костная ткань, химический состав, коксартроз, кластерный анализ

ВВЕДЕНИЕ

Кости составляют твердую основу организма млекопитающих, в том числе и человека. Костная система человека принимает активное участие в работе опорно-двигательного аппарата и в метаболических процессах, обеспечивающих гомеостаз живого организма [1, 2]. Такое функционирование костной ткани обеспечивается за счет сложной морфологической структуры и многокомпонентного состава, включающего органическую (белок коллаген, неколлагеновые белки, липиды и др.) и неорганическую (фосфаты кальция) компоненты. Фосфаты кальция и коллаген придают костям механическую прочность, твердость, жесткость, высокую сопротивляемость к сжимающим нагрузкам и эластичность. Структурными химическими единицами веществ белковой природы служат аминокислоты, которые нередко участвуют в обменных процессах организмов. Между тем в литературе преимущественно описана структурная организация коллагена, а аминокис-

лотный состав костных тканей человека освещен слабо [3–5].

Известно, что в основе жизнедеятельности кости лежат два взаимосвязанных процесса – костеобразование, заключающееся в минерализации коллагеновой матрицы, и разрушение сформировавшегося костного материала [6]. Эти процессы протекают непрерывно на протяжении всей жизни человека и называются ремоделированием кости [7, 8]. Их нарушение приводит к развитию разного рода костно-суставных патологий.

В настоящее время диагностика и коррекция таких состояний относится к числу социально значимых и не до конца решенных задач. Так, до сих пор нет единого мнения об изменениях органического состава, возникающих с возрастом и при различных костных заболеваниях.

Цель работы – определение качественного и количественного содержания аминокислот костных тканей человека при коксартрозе, а также выявление особенностей их аминокислотного состава в возрастном интервале человека от 30 до 79 лет.



Рис. 1. Головка бедренной кости человека при коксартрозе (а) и ее горизонтальные верхний, средний и нижний срезы (б).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом исследования служила собранная нами коллекция головок бедренных костей в количестве 100 шт. (рис. 1, а), удаленных у больных коксартрозом мужчин и женщин – жителей Омского региона в возрасте от 30 до 80 лет. Для выявления половозрастных изменений костных тканей весь материал распределен по четырем возрастным группам: первая – 30–49, вторая – 50–59, третья – 60–69, четвертая – 70–79 лет. При оценке динамики изменений при коксартрозе из отдельных головок получены три горизонтальных среза толщиной 0,2–0,5 см: верхний, средний и нижний (порядок чередования приведен в направлении хрящ – бедренная кость, см. рис. 1, б); проведено их последующее измельчение. Проанализированы средние высушенные порошковые пробы (ГОСТ 17681–82).

Исследование аминокислотного состава костных тканей выполняли с помощью ионообменной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на аминокислотном анализаторе ААА-39М. В качестве ионообменной смолы использовали сульфированный полистирол.

Методика пробоподготовки основана на получении белковых гидролизатов костных проб путем кислотной деминерализации пептидных связей и их последующем разделении на различные аминокислотные фракции. Кислотный гидролиз средней пробы (1,5 г) раствора 6 М HCl проведен при температуре 105 °С в течение 24 ч [9]. Для последовательного выделения аминокислот из ионообменной колонки анализатора использованы буферные растворы с тремя значениями pH – 3,5, 4,25, 9,45. Для обнаружения и количественного определения аминокислот полученный элюат смешивали с раствором нингидрина (гидрат

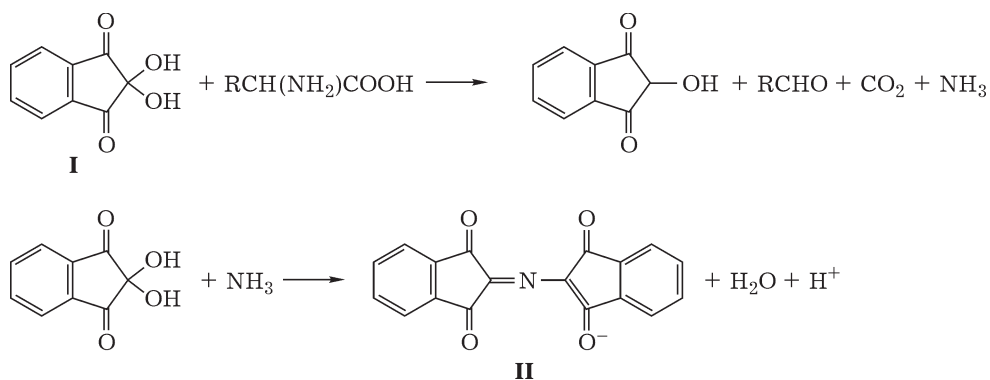


Схема 1.

1,2,3-индантриона $C_9H_6O_4$). Окрашенный продукт **II** определен спектрофотометрическим методом ($\lambda_{эфф} = 570$ нм, для пролина $\lambda_{эфф} = 440$ нм, спектрофотометр СФ-46) (схема 1).

Конечный результат фиксировался в виде площади пика и времени выхода соответствующей аминокислоты. Содержание аминокислот определяли методом градуировочного графика (стандарты – растворы с известным содержанием соответствующих аминокислот). За окончательный результат оптической плотности D принималось среднее арифметическое результатов трех параллельных измерений. Допускаемые расхождения между результатами двух параллельных определений D не превышали

10 %, а между результатами, полученными в разных условиях (доверительная вероятность $P = 0.95$), – 25 %. Предел обнаружения аминокислотного состава равен 10^{-4} мас. %.

Статистическая обработка полученных данных проведена с использованием программного обеспечения StatSoft Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В анализируемых порошковых пробах костных тканей идентифицировано 13 аминокислот (табл. 1). Установлено, что в случае поврежденных образцов качественный и количественный

ТАБЛИЦА 1

Аминокислотный состав костных тканей человека при коксартрозе, мас. % ($n = 3$, $P = 0.95$)

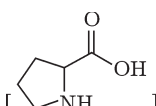
Аминокислоты [Формула]	Сокращенное название	Костные срезы		
		Верхний	Средний	Нижний
Глицин [H_2NCH_2COOH]	Glu	2.33±0.34	2.38±0.36	2.42±0.45
Аланин [$CH_3CH(NH_2)COOH$]	Ala	0.8±0.13	0.72±0.3	0.84±0.18
Валин [$(CH_3)_2CHCH(NH_2)COOH$]	Val	0.29±0.05	0.3±0.05	0.3±0.07
Лейцин [$(CH_3)_2CHCH_2CH(NH_2)COOH$]	Leu	1.11±0.19	1.03±0.26	1.07±0.02
Изолейцин [$CH_3CH_2CH(CH_3)CH(NH_2)COOH$]	Ile	1.41±0.24	1.34±0.33	1.36±0.38
Треонин [$CH_3CH(OH)CH(NH_2)COOH$]	Thr	0.29±0.05	0.31±0.06	0.31±0.07
Серин [$HOCH_2CH(NH_2)COOH$]	Ser	0.29±0.15	0.23±0.04	0.23±0.05
Метионин [$CH_3SCH_2CH_2CH(NH_2)COOH$]	Met	0.13±0.02	0.13±0.03	0.13±0.03
Глутаминовая кислота [$HOOCCH_2CH_2CHNH_2COOH$]	Gly	1.84±0.30	1.88±0.32	1.92±0.42
Лизин [$H_2N(CH_2)_4CH(NH_2)COOH$]	Lys	0.72±0.13	0.74±0.13	0.76±0.18
Аргинин [$HN=C(NH_2)NH(CH_2)_3CH(NH_2)COOH$]	Arg	0.49±0.1	0.49±0.11	0.5±0.13
Фенилаланин [$PhCH_2CH(NH_2)COOH$]	Phe	0.24±0.04	0.25±0.05	0.25±0.06
Пролин 	Pro	0.7±0.17	0.73±0.18	0.74±0.22

ТАБЛИЦА 2

Концентрационные ряды аминокислот органоминеральных агрегатов (ОМА) из организма человека

ОМА	Ряды аминокислот
Костные срезы (поражение)	
Нижние	Glu > Gly > Ile > Leu > Ala > Lys > Pro > Arg > Thr > Val > Phe > Ser > Met
Средние	Glu > Gly > Ile > Leu > Lys > Pro > Ala > Arg > Thr > Val > Phe > Ser > Met
Верхние	Glu > Gly > Ile > Leu > Ala > Lys > Pro > Arg > Thr > Ser > Val > Phe > Met
Патогенные	
Зубные камни	Gly > Ser > Ala > Glu > Asp > Lys > Phe > Val > Leu > Thr > Ile > His > Arg > Tyr > Met [11]
Слюнные камни	Gly > Ser > Phe > Lys > Arg > Asp > Tyr > Leu > Glu > Val > Ala > His > Ile > Thr > Met [11]
Почечные камни (фосфатный тип)	Gly > Lys > Ala > Pro > Thr > Val > Glu > Ser > Phe > Arg > Met > Leu > Ile [12]

ный состав аминокислот во всех костных срезах (верхний, средний, нижний) примерно одинаковый, отмечается лишь уменьшение их суммарного содержания (на 4 мас. %) в верхнем срезе по сравнению со средним и нижним срезами. Это может быть связано с тем, что волокна коллагена верхнего среза, как наиболее

пораженного коксартрозом, уплотнены и для них характерна наименьшая растворимость [10].

Выполнено ранжирование аминокислот по их содержанию в костной ткани. Полученные концентрационные ряды сопоставлены с аминокислотным набором патогенных органоминеральных агрегатов (ОМА) из

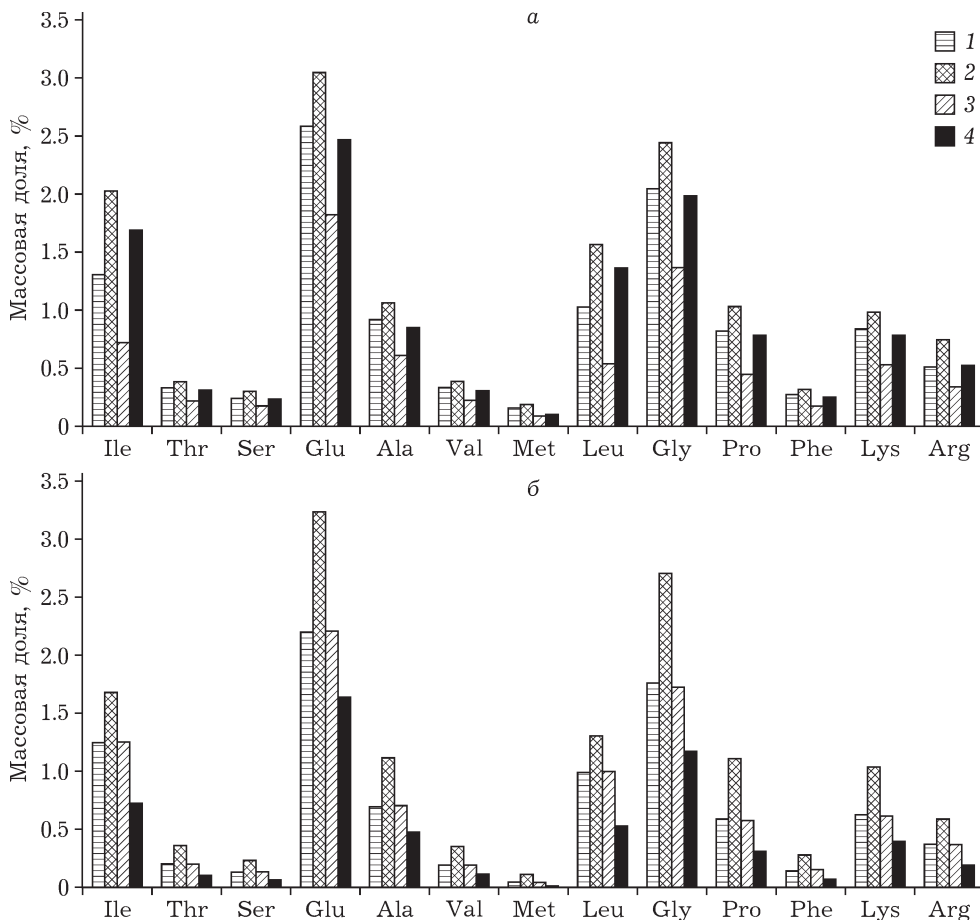


Рис. 2. Содержание аминокислот в костной ткани мужчин (а) и женщин (б) разных возрастных групп, лет: 30-49 (1), 50-59 (2), 60-69 (3), 70-79 (4).

организма человека (зубные, слюнные, почечные камни [11, 12]).

Видно (табл. 2), что в составе всех приведенных биоминералов преобладает глутаминовая кислота, а это указывает на особую ее роль в процессах формирования биоминералов. Известно, что эта аминокислота в организме при физиологических значениях рН (например, рН крови 7.3–7.5) находится в анионной форме, благодаря чему взаимодействует с положительно заряженными участками поверхности костного апатита [12, 13].

Структурообразующую роль в процессах образования физиогенных (кости и зубы) и патогенных биоминералов играет глицин [11, 12, 14]. Однако из данных табл. 2 следует, что данная аминокислота, в отличие от патогенных ОМА, доминирует в костных тканях поскольку является основным компонентом упорядоченной кристаллической полипептидной цепи коллагена ($-Glu-X-Y-$), участки волокон которого служат местом кристаллизации костного апатита [4, 5, 7, 8, 15].

В значительных количествах в физиогенных биоминералах также присутствуют неполярные аминокислоты (изолейцин и лейцин), а в патогенных – полярные (серин, пролин, лизин) и неполярные (аланин, фенилаланин).

Для установления половозрастных особенностей аминокислотного состава костных тканей человека проведена статистическая обработка данных по содержанию аминокислот в нижних костных срезах с использованием t -критерия Стьюдента и кластерного анализа.

Данные расчетов показали, что до 60 лет, как в группе мужчин, так и женщин, наблюдается одинаковая тенденция изменения аминокислотного состава костных проб. После 60 лет выявлены достоверные различия в содержании аминокислот по половому и возрастному признакам. Так, костные ткани мужчин и женщин третьей и четвертой возрастных групп достоверно отличаются по общему содержанию в них аминокислот ($P = 0.95$, $t_{расч} = 2.14 > t_{табл} = 2.06$ и $t_{расч} = 2.50 > t_{табл} = 2.06$ соответственно). Подобных отличий в образцах костных тканей первой и второй возрастных групп не выявлено.

При этом в костных образцах, принадлежащих мужчинам, можно отметить значимое уменьшение суммарного аминокислотного

содержания при переходе от первой и второй возрастных групп к третьей (рис. 2, а). Так, достоверное отличие по t -критерию Стьюдента отмечается между первой и третьей категориями возраста ($t_{расч} = 2.38 > t_{табл} = 2.06$, $P = 0.95$), второй и третьей ($t_{расч} = 2.85 > t_{табл} = 2.06$, $P = 0.95$). Из данных рис. 2 видно, что после 60 лет в костной ткани мужчин в основном понижается количество аминокислот, биологическая роль которых рассматривалась ранее: глутаминовой кислоты и лейцина, лейцина и изолейцина. В костных образцах, отобранных у женщин, достоверное уменьшение концентраций аминокислот отмечается в возрастном интервале 70–79 лет (см. рис. 2, б).

Кластерный анализ также подтверждает полученные результаты. На дендрограмме (рис. 3, а) можно выделить два отличающихся друг от друга по аминокислотному составу кластера: первый кластер включает первую (образец № 1) и вторую (образец № 3)

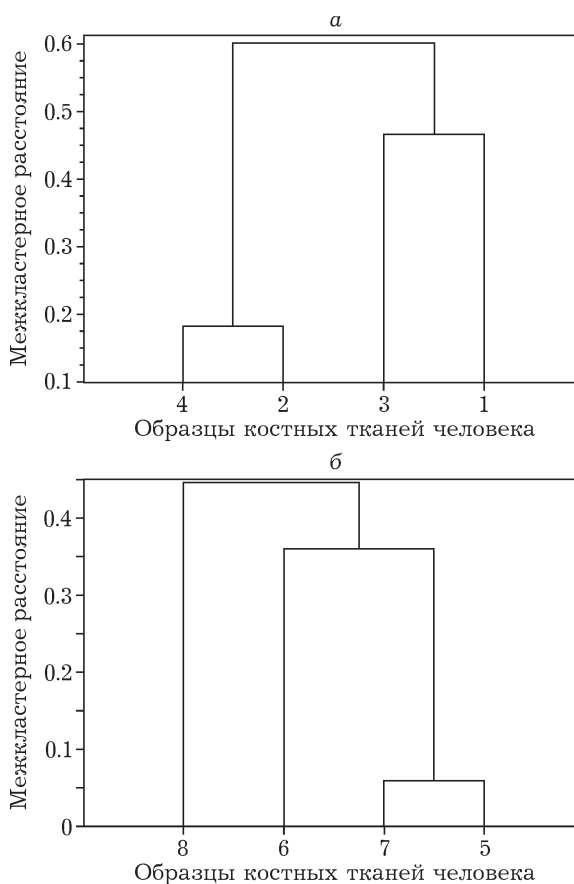


Рис. 3. Дендрограммы костных тканей мужчин (а) и женщин (б) разных возрастных групп (кластерный анализ, лет: 30–49 (1), 50–59 (2), 60–69 (3), 70–79 (4)).

возрастные группы, а второй кластер – третью (образец № 2) и четвертую (образец № 4).

С использованием критерия Стьюдента показано, что четвертая возрастная группа отличается по аминокислотному составу от других возрастных групп (отличие между первой и четвертой, третьей и четвертой группами – $t_{\text{расч}} = 2.19 > t_{\text{табл}} = 2.06$; второй и четвертой группами – $t_{\text{расч}} = 2.93 > t_{\text{табл}} = 2.06$; $P = 0.95$). На дендрограмме костных тканей женщин (см. рис. 3, б) можно выделить два кластера. Первый (образец № 8) относится к четвертой возрастной группе и характеризуется наименьшим суммарным содержанием аминокислот (6.83 мас. %), тогда как для других возрастных групп оно составляет 10.07–14.91 мас. %. Второй кластер (образцы № 5–7) включает остальные категории возраста, наиболее схожие по аминокислотному составу.

Уменьшение средних концентраций аминокислот в костных тканях мужчин третьей возрастной группы и женщин четвертой возрастной группы, возможно, обусловлено снижением содержания коллагена вследствие процессов общего старения организма и наличия сопутствующих заболеваний (например, остеопороза) и т. п. [16].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, установлено, что распределение аминокислот в головках бедренных костей (от гиалинового хряща к бедренной кости) у больных коксартрозом с течением заболевания не изменяется. В костных тканях мужчин и женщин в возрастном интервале 30–79 лет до 60 лет аминокислотный состав не зависит от половой и возрастной принадлежности образцов. После 60 лет отмечаются вариации содержания аминокислот по полу и возрастному признаку: в 60–69 лет

содержание аминокислот в костных тканях мужчин уменьшается, а в костных тканях женщин остается неизменным; в 70–79 лет оно не изменяется в мужских костных тканях и уменьшается в костных тканях женщин.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (проект № 12-03-98011-р_сибирь_а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Баринов С. В. // Усп. химии. 2010. Т. 79, № 1. С. 15–32.
- 2 Лунева С. Н. Биохимические изменения в тканях суставов при дегенеративно-дистрофических заболеваниях и способы биологической коррекции: Дис. ... д-ра биол. наук. Тюмень, 2003.
- 3 Gross K. A., Berndt C. C. // Rev. Mineral. Geochem. 2002. Vol. 48. P. 633–672.
- 4 Литвинов С. Д. // Материалы междунар. конф. “Кристаллогенез и минералогия”. СПб, 2007. С. 190–194.
- 5 Orgel J. P., Miller A., Irving T. C., Fischetti R. F., Hammersley A. P., Wess T. J. // Structure. 2001. Vol. 9. P. 1061–1069.
- 6 Дорожкин С. // Наука и жизнь. 2004. № 5. С. 40–43.
- 7 Weiner S., Dove P. M. // Biomineralization. 2003. Vol. 54. P. 1–29.
- 8 Königsberger E., Königsberger L. Biomineralization – Medical Aspects of Solubility. England: John Wiley & Sons Ltd, 2006.
- 9 Оценка мясной продуктивности крупного рогатого скота. Новосибирск: Сиб. отд-ние СибНИПТИЖ, СибНИИМС, 2001.
- 10 Лемешева С. А., Голованова О. А., Вотяков С. Л. // Минералогическая интервенция в наномир: Материалы Междунар. минералогического семинара. Сыктывкар, 2009. С. 199–122.
- 11 Голованова О. А. Патогенные минералы в организме человека. Омск: изд. ОмГУ, 2007. 399 с.
- 12 Голованова О. А. Биоминералогия мочевых, желчных, зубных и слюнных камней из организма человека: Дис. ... д-ра геол.-минерал. наук. Омск, 2008.
- 13 Zhu P. X., Masuda Y., Koumoto K. // J. Coll. Interface Sci. 2001. Vol. 243. P. 31–36.
- 14 Происхождение биосферы и коэволюция минеральных и биологических миров / Под ред. Н. П. Юшкина, В. И. Ракина, О. В. Ковалева. Сыктывкар: ИГ Коми НЦ УрО РАН, 2007.
- 15 Габуда С. П., Гайдаш А. А., Дребушак В. А., Козлова С. Г. // Письма в ЖТЭФ. 2005. Т. 82, № 9. С. 693–696.
- 16 Дедух Н. В., Бенгус Л. М., Басти А. // Остеопороз и остеопатии. 2003. № 1. С. 18–22.