

О Г Л Я Д И

УДК 577.1: 547.962.9

ПРЕОБРАЗОВАНИЕ КОЛЛАГЕНОВ В ОРГАНИЗМЕ: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ

Л. Б. БОНДАРЕНКО

Институт фармакологии и токсикологии АМН Украины, Киев

Колагени, що складають третину всіх білків організму, унікальні як за хімічною структурою, так і біологічною функцією. В огляді розглянуто сучасний стан дослідження процесів біосинтезу та розщеплення даних білків, роль шаперонів, проліл- та лізіл-оксидаз, глікозилтрансфераз, металопротеїназ та інших ферментів у метаболізмі колагенів, а також біологічної активності як самих колагенів, так і їхніх фрагментів.

К л ю ч о в і с л о в а: колаген, метаболізм, шаперони, металопротеїнази.

Коллагены являются уникальными белками не только в силу своей широчайшей распространенности у всех многоклеточных животных, но также и благодаря своей уникальной химической структуре [1]. Будучи преобладающей составляющей в костях, хрящах, коже, сухожилиях и зубах, коллагены, кроме выполнения механической функции, способны также участвовать в процессах регуляции адгезии и жизнедеятельности различных клеток [2]. Все это обуславливает особый интерес исследователей к путям преобразования коллагена в организме и выявлению его биологической роли в полном объеме. Целью настоящего обзора является обобщение накопленной за последнее десятилетие информации, посвященной этой проблеме, для уточнения биологической роли данных белков и особенностей их обмена в организме.

К коллагенам относят в настоящий момент 27 типов белков [1]. Для тех их представителей, которые обнаруживаются повсеместно в тканях организма в значительных количествах (коллагены типа I, II, III, IV и V, формирующие фибриллярные и сетевые структуры), препаративные процедуры хорошо разработаны, тогда как для недавно открытых минорных типов коллагенов (особенно тех, которые включают в свою структуру большие неколлагеновые домены) существуют пока лишь микропрепаративные методы. А для некоторых коллагеновых белков не разработаны даже и они. Доказательства их существования получены лишь иммунохимическими методами в тканевых срезах и подтверждены результатами анализа последовательности нуклеиновых оснований [3–5].

Например, недавно разработан метод полу-

чения коллагена типа XVIII из базальных мембран глаза и охарактеризованы его свойства [6]. Роль этого коллагена была изучена с использованием линии мышей, дефицитных по гену COL18A1(-/-). Результаты исследований продемонстрировали важную роль коллагена этого типа в функционировании базальных мембран глаза. Отсутствие данного белка приводит к серьезным дефектам в радужной оболочке глаза, развитию синдрома пигментной дисперсии и повреждению сетчатки. Этот же белок присутствует в легких и почках. Более того, последние исследования выявили присутствие коллагена типа XVIII в структуре аксонов и синапсов [7], где он выполняет важную роль в организации последних.

Коллаген типа XIX был обнаружен при анализе последовательности кДНК клеток рабдомиосаркомы. Цепь содержит N-терминальный фрагмент (268 аминокислотных остатков), участок характерной для коллагеновых белков структурой (832 аминокислотных остатка) и короткий C-терминальный фрагмент (19 остатков) [5]. С использованием световой микроскопии и иммунохимических методов этот коллаген был обнаружен в сосудах, мезенхиме, эпителиальных базальных мембранах и нервной системе взрослого человека. Удалось также выделить данный белок препаративно с использованием нейтральной солевой экстракции, ионообменной и аффинной хроматографии. С помощью метода трансмиссионной электронной микроскопии было показано, что молекула коллагена типа XIX представляет собой сильно извитую полипептидную цепь с небольшим утолщением на одном конце общей длиной 240 нм. Более половины всех молекул коллагена типа XIX состоит из олигомеров раз-

личного размера и строения, собранных в фибриллу за счет ассоциации N-терминальных доменов.

В 2001 году был обнаружен коллаген типа XX, относящийся к подсемейству коллагенов, включающему фибриллассоциированные белки с прерывистыми тройными спиралями [8]. Анализ кДНК данного белка выявил наличие сходства его первичной структуры с коллагенами типов XII и XIV. Однако молекула коллагена типа XX оказалась еще меньше, чем укороченные формы этих коллагенов.

В 2002 году поступили сообщения об исследованиях гена коллагена типа XXI у человека [9]. Этот белок по своей первичной структуре подобен коллагенам типов IX и XIX. Коллаген типа XXI является компонентом внеклеточного матрикса в стенках кровеносных сосудов и секретируется клетками мышечной ткани. В этом же году были также обнаружены и изучены коллагены типов XXII–XXVII [10–12].

Коллаген типа XXIII оказался трансмембранным белком, выявленным в клетках карциномы простаты крыс. Он состоит из аминоконцевого цитоплазматического домена, трансмембранного участка и трех коллагеновых доменов, разделенных небольшими неколлагеновыми участками [13]. К трансмембранным коллагенам отнесен также и коллаген типа XXV [10, 13].

Коллаген типа XXVI – еще один новый член семейства коллагенов, является белком, специфически экспрессируемым исключительно в семенниках и яичниках [11]. Протяженность его молекулы составляет 438 аминокислотных остатков. Она содержит 2 коллагеновых и 3 неколлагеновых домена.

Недавно обнаруженный коллаген типа XXVII характеризуется отсутствием малого спирального домена, укороченным основным спиральным доменом и наличием короткой связывающей цепь последовательности в NC1-домене [12]. Этот белок обнаружен в хряще, а также эпителии желудка, легких, кожи, гонад, зубов. Филогенетический анализ свидетельствует, что коллаген типа XXVII, вместе с близким к нему коллагеном типа XXIV, формирует третье подсемейство (тип C) семейства коллагеновых белков [12].

Обнаружены также так называемые мини-коллагены [14], наименьшие из которых содержат лишь по 12–16 триплетов Gly-X-Y. Мини-коллаген-1, например, представляет собой центральную тройную коллагеновую спираль длиной 12 нм, снабженную с обеих сторон полипролиновыми последовательностями и цистеинбогатыми доменами.

Помимо обнаружения новых типов коллагенов детальное изучение наиболее распростра-

ненных коллагенов типов I–V выявило широкий полиморфизм их генов. К примеру, было показано, что в норме у человека существует более 4 полиморфных генов проколлагена типа III с частотой обнаружения от 5 до 61%. У этих генов был установлен C-T полиморфизм в экзонах 33 и 880 [15].

Особенности биосинтеза коллагенов

Несмотря на то, что в общих чертах биосинтез коллагенов подобен биосинтезу других экстраклеточных белков, этот процесс тем не менее отличают и существенные особенности: сначала синтезируется белок-предшественник (проколлаген), а процесс биосинтеза предполагает наличие нескольких необычных посттрансляционных модификаций, протекающих после формирования коллагеновой молекулы из трех полипептидных цепей [16].

Специфически направленный процессинг и контроль качества синтезируемых молекул коллагена осуществляется с помощью специальных белков-шаперонов [17]. В частности, такую роль выполняет белок 47 кДа теплового шока (HSP47) по отношению к коллагену типа I. Использование антисмысловой терапии, предотвращающей экспрессию HSP47, ведет к нарушению структуры коллагеновых фибрилл и накоплению коллагена [17]. Коллагенсвязывающий шаперон HSP47 взаимодействует с проколлагеном в эндоплазматическом ретикулуме и играет ключевую роль в биосинтезе коллагена [18]. Он предпочтительно распознает коллагеновые повторы Gly-X-Y в конформации тройной спирали [18], взаимодействует с проколлагеном по триплетам X-Arg-Gly [19] во время его созревания, ассоциации и транспорта из эндоплазматического ретикулума в аппарат Гольджи.

Помимо HSP47, в качестве шаперонов в ходе биосинтеза коллагенов способны выступать и другие белки. Например пролил-4-гидроксилаза, катализирующая гидроксирование пролиновых остатков [20]. При этом для формирования нормальных тройных спиралей коллагена необходимо одновременное наличие как пролил-4-гидроксилазы, так и HSP47. В противном случае процесс сборки спиралей будет нарушен и проколлагеновые молекулы не смогут поступить в аппарат Гольджи, а будут удерживаться в эндоплазматическом ретикулуме.

В хондроцитах дополнительно идентифицировано еще несколько белков шаперонов: BiP (Grp 78), калретикулин (CRT), протеиндисульфидизомераза (PD1), ERp72, Grp94 [21], калнексин [22].

Проколлагены различных типов использу-

ют различные шапероны в эндоплазматическом ретикулуме. Например, проколлагены коллагенов типов I и IV демонстрируют различную специфичность при взаимодействии с белками-шаперонами: α -субъединицей пролил-4-гидроксилазы (P4H- α) и Gp78/BiP (глюкозорегулирующий белок/белок, связывающий тяжелую цепь иммуноглобулина) [23]. Экспрессия шаперонов регулируется рядом факторов, в частности различными цитокинами [24], уровнем биосинтеза самих проколлагенов [25], белками семейства Sp1 и KLF [26].

Проколлаген отличается большая длина молекулы по сравнению с собственно коллагеном и более высокий процент содержания неколлагенных последовательностей [27]. Эти неколлагенные последовательности локализованы в основном на концах полипептидных цепей проколлагена. Ранее полагали, что их задачей является обеспечение лучшей растворимости проколлагена по сравнению с коллагеном и участие в процессах регуляции формирования тройных спиралей коллагена. В настоящий момент установлено, что С-пропептиды про- α -цепей проколлагенов типа I и III играют определяющую роль в распознавании цепей и их сборке в тройные спирали коллагена [28]. Изучение С-пропептидов 30 кДа цепей проколлагенов человека $\alpha 1(I)$, $\alpha 2(I)$, $\alpha 1(III)$, лишенных N-пропептидов, показало, однако, что формирование тройных коллагеновых спиралей зависит не только от взаимодействия С-терминальных участков, но также и от присутствия определенных детерминант в самих α -цепях коллагена [28].

Исследования последних лет свидетельствуют, что этим роль терминальных неколлагенных последовательностей не исчерпывается [29–30]. N- и С-телопептиды сохраняются в коллагене также после его созревания и, вероятно, принимают участие в формировании четко определенной организации надмолекулярных структур. На это указывают серьезные изменения структуры N- и С-телопептидов в ходе развития различных патологий [3, 29]. Например, при синдроме Элерса–Данлоса С-телопептид коллагена типа II хряща содержал гидроксизилпиридинолиновые и лизилпиридинолиновые сшивки в пропорции 2 : 1, тогда как в норме это соотношение составляет 18 : 1 [29].

Кроме этого, N- и С-терминальные пептиды способны регулировать активность коллагеназ и скорость обмена коллагенов в организме [3, 29, 30], участвовать в формировании комплексов коллаген–гликопротеин [31]. При этом возможно формирование не только N-, но и O-гликозидных связей.

Регуляция биосинтеза коллагеновых белков

Взаимосвязь между процессами биосинтеза и деградации коллагеновых структур очень сложна и тесно связана с метаболизмом других компонентов внеклеточного матрикса [32, 33]. Биосинтез коллагена типов II и X непосредственно связан с биосинтезом гликозаминогликанов [32, 33]. Уровень синтеза коллагенов типов I и III сильно зависит от гормонального статуса организма [4], в частности от соотношения прогестерона и эстрогенов, кортикостероидов [4, 34, 35].

Существуют специальные семейства белков-регуляторов [36], ответственных за нормальный ход формирования структур внеклеточного матрикса и коллагенов, в частности. Так, белки семейства E2F (E2F1, E2F2, E2F3) регулируют биосинтез коллагенов типов II и X на различных этапах развития организма и формирования скелета [36]. Не вызывает сомнений и способность профиброзных цитокинов воздействовать на экспрессию ряда коллагенов [37]. Полученные данные позволили выявить прямую зависимость скорости биосинтеза коллагенов типа I и III от уровня цитокинов TGF- β , IL-11, IL-17. Более того, выяснилось, что способность стероидных гормонов подавлять биосинтез коллагенов возможно опосредована их воздействием на экспрессию TGF- β [37]. Согласно результатам других авторов, цитокины TGF- β , TNF- α и IL-1 β также способны регулировать экспрессию генов коллагена человека типа XV [38].

Интересно отметить наличие различных эффектов данных регулирующих факторов на биосинтез коллагена на различных стадиях дифференциации коллагенпродуцирующих клеток. Так, в экспериментах с дифференцированными и дедифференцированными хондроцитами кролика было показано, что SOX9 (ключевой транскрипционный фактор в формировании хряща) способен как усиливать, так и подавлять транскрипцию гена COL2A1 в зависимости от стадии дифференциации клеток и от уровня экспрессии SOX9 кДНК [39].

При развитии патологии регуляция транскрипции коллагеновых генов часто осуществляется путем метилирования стартовых транскрипционных сайтов, что было продемонстрировано на линиях клеток рака желудка (MCF-7, Hs578T), гепатоцеллюлярной карциномы (SNU387, SNU398, SNU449, PLC/PRF/5), фибросаркомы (HT1080), колоректальной карциномы (HCT116, SW480, SW620) [40].

Посттрансляционная модификация коллагенов

В посттрансляционной модификации коллагенов принимает участие целый ряд фермен-

тов. Коллагеновые пролил-4-гидроксилазы (по новой классификации проколлаген-пролин дигидроксигеназа, 1.14.11.2) – ферменты, локализованные в эндоплазматическом ретикулуме, играют центральную роль в биосинтезе коллагена [41]. Коэкспрессия α - и β -субъединиц пролил-4-гидроксилазы обеспечивает стабилизацию тройной спирали коллагена типа X у человека [42]. При нарушении нормального соотношения субъединиц данного фермента снижается уровень гидроксилирования пролина в проколлагеновых молекулах, степень стабильности формируемых ими тройных спиральных комплексов и тормозится процесс преобразования проколлагена в зрелый коллаген. Кроме того, этим ферментам принадлежит также определяющая роль в транскрипции фактора HIF- α . Проліл-4-гидроксилазы коллагена и HIF составляют семейство ферментов, включающее целый ряд изоэнзимов. Например, недавно были клонированы и охарактеризованы две изоформы каталитических α -субъединиц [41]. Оба фермента представляют собой тетрамеры из двух α - и двух β -субъединиц, где в качестве β -субъединицы функционирует протеиндисульфидизомераза. Ферменты сходны по каталитическим свойствам, но разнятся по субстратной специфичности.

Гидроксилирование встроенного в полипептидную цепь пролина осуществляется пролил-гидроксилазами как в клетках высших животных, так и у низших организмов, например *Ascaris*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* [41]. Проліл-гидроксилазы из различных источников сильно различаются между собой как по структуре, так и по уровню ферментативной активности [41, 43].

Семейство лизил-оксидаз также составляют ферменты, ответственные за посттрансляционную модификацию белков внеклеточного матрикса, и, в первую очередь, коллагенов [44]. Однако последние исследования показали, что биологическая активность белков данной группы этим не исчерпывается. Некоторые из них (например LOR-1) способны выступать в качестве промоторов фиброза опухолей и стимуляторов их злокачественности. С другой стороны, получены свидетельства участия лизил-оксидаз в осуществлении процесса подавления опухолевого роста [45]. Лизил-оксидаза *in vitro* с высокой специфичностью связывается с некоторыми гистоновыми белками (H1), которые могут являться ее мишенями в ядре клетки *in vivo* [45]. Тем не менее, основной функцией лизил-оксидаз является участие в процессе формирования сшивок в коллагене и эластине как *in vivo*, так и *in vitro* [46]. Для выяснения конкретной роли лизил-оксидаз в фор-

мировании соединительнотканых структур были проведены эксперименты на мышах, лишенных путем направленного мутагенеза генов, ответственных за экспрессию лизил-оксидаз (LOX(-/-)). У таких животных, погибавших вскоре после рождения от разрушения стенок сосудов, была полностью нарушена архитектура фибриллярных тяжей, обеспечивающих механическую прочность стенок сосудов и легких, значительно снижено количество внутри- и межмолекулярных сшивок и в коллагене, и в эластине. Таким образом, очевидно лизил-оксидазам принадлежит определяющая роль в обеспечении структурной стабильности сосудов, легких и соединительной ткани в ходе эмбриогенеза и последующего развития организма [46].

В процессе формирования сшивок участвуют и другие ферменты. Лизингидроксилаза (по новой классификации проколлаген-лизин 5-дигидроксигеназа, 1.14.11.4), галактозилтрансфераза (по новой классификации проколлаген галакторил-трансфераза, 2.4.1.50), глюкозилтрансфераза (по новой классификации проколлаген глюкозилтрансфераза, 2.4.1.66) также являются ферментами, вовлеченными в посттрансляционное модифицирование коллагена. Они последовательно модифицируют встроенный в полипептидную цепь лизин (стоящий в определенных позициях) до гидроксилизина, галактозилгидроксилизина и глюкозилгалактозилгидроксилизина [47]. Эти структуры являются уникальными для коллагенов и совершенно необходимыми для осуществления их биологических функций.

Лизиновые и гидроксилизиновые остатки в коллагене формируют сшивки. Сшивки, образованные гидроксилизином (обычно в гликозилированной форме), чаще встречаются в минерализованных тканях и в тех участках соединительной ткани, которые несут весовую нагрузку. Однако детально функции гидроксилизиновых и гидроксилизингликозилированных структур до сих пор не ясны. Ранее полагали, что гидроксилизинсвязанные углеводы присущи исключительно коллагенам [43, 48], однако недавно получены свидетельства их присутствия и возможного влияния на функционирование и других белков [47]. У человека имеется целое семейство лизил-гидроксилаз. Их роль в организме была изучена с использованием клеток, мутантных по гену лизилгидроксилазы 1 (PLOD1). Выяснилось, что при выключенном PLOD1 другие гены семейства PLOD отвечают за гидроксилирование лизина, хотя этот процесс идет со значительно меньшей эффективностью [29].

Детальное изучение функций различных изоформ лизингидроксилаз у человека (LH) по-

казало, что LH3 (в отличие от LH1, LH2a, LH2b) обладает помимо лизингидроксилазной, также глюкозилтрансферазной и галактозилтрансферазной активностью [47]. Таким образом, белок, кодируемый одним геном, способен катализировать все три стадии процесса формирования гидроксизинуглеводных структур. Эксперименты *in vitro* по направленному мутагенезу позволили выяснить, что наличие Cys (144) и Asp в позициях 187–191 в лизилгидроксилазе 3(LH3) существенны для проявления галактозилтрансферазной активности.

Внутри- и межмолекулярные сшивки в коллагеновых молекулах и надмолекулярных структурах отличаются чрезвычайным разнообразием [5, 49–52]. Их состав и соотношение сильно варьируют в зависимости от типа коллагена и состояния организма [29, 53, 54]. К примеру, коллагены типов I и II не содержат цистина и соответственно у них не формируются дисульфидные мостики. А у коллагена типа XIX именно этот тип межмолекулярных сшивок играет определяющую роль в стабилизации надмолекулярных агрегатов [5], так же, как и у ряда миниколлагенов [14]. С течением времени в коллагене возрастает число сшивок, тогда как в синтезированном *de novo* белке их значительно меньше [55]. Возраст, функциональная нагрузка и локализация ткани, гормональный статус и уровень витаминов оказывают серьезное влияние на количественный и качественный состав сшивок в коллагеновых структурах [50, 53, 56]. Так, с возрастом снижается количество пиридинолиновых сшивок в межпозвоночных дисках [53]. Гидроксизилпиридинолиновые сшивки присутствуют в большинстве тканей, а лизилпиридинолиновые специфичны для костей и дентина [50]. Соотношение же этих двух типов сшивок в дентине является достаточно точным показателем индивидуального возраста организма [50]. Уровень витамина С в организме способен серьезно воздействовать на содержание пиридинолиновых сшивок на самой ранней стадии их образования путем подавления активности лизилоксидаз [56]. При кардиальной гипертрофии возрастает количество углеводсодержащих сшивок в коллагене [57].

Исследование характера сшитости коллагена, количества и структуры сшивок ведется очень интенсивно. Это обусловлено рядом факторов. Во-первых, количество и качество сшивок коррелирует со структурной организацией и механическими свойствами кости [55]. Во-вторых, соотношение типов сшивок часто служит хорошим маркером для диагностики различных патологий [29, 54, 58]. В частности, соотношение

пиррол/гидроксизилпиридинолин является хорошим показателем для предсказания плотности трабекул, их числа, пространственной удаленности и других параметров структуры костной ткани. Соотношение относительного содержания пиррол- и пиридинолинсодержащих сшивок может служить показателем уровня структурной организации кости. В качестве показателей для предсказания механической прочности костной ткани используется соотношение гидроксизил-норлейцин/лизилпиридинолин (для прочности – $r = 0,40$, $p = 0,001$; для жесткости – $r = 0,47$, $p < 0,001$). Чем выше данное соотношение, тем жестче и прочнее формируется коллагеновая структура [51].

Соотношение различных типов сшивок рассматривается в качестве диагностического маркера при синдроме Элерса–Данлоса [29] и остеоартрите [54].

Несмотря на интенсивное изучение структуры сшивок коллагена в течение значительного промежутка времени [43, 49, 51, 52, 59, 60], до настоящего момента продолжается процесс обнаружения все новых и новых их типов [49]. С использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии недавно обнаружены 4 новые, ранее не описанные, пиридинолиновые сшивки. Из них первый тип, получивший название CL1, строго специфичен для коллагена кости и является более точным маркером катаболизма именно данного белка, чем ранее применявшийся в этом качестве дезоксипиридинолин. Сшивки, содержащие глюкозилгалактозилпиридинолин, как выяснилось, могут рассматриваться в качестве маркеров неминерализованного коллагена. Однако лучшим маркером коллагена, не подлежащего оксификации, все же является другой тип вновь открытых сшивок – CL3. Обнаружение этих сшивок в белке или продуктов их ферментативного расщепления в моче, может рассматриваться как удобный диагностический показатель для выявления патологий скелета и соединительной ткани, а также определения степени их развития.

Внутри клетки различные этапы биосинтеза коллагена локализованы в различных органеллах [17, 41]. Процесс трансляции и формирование первичной структуры коллагеновой полипептидной цепи осуществляется рибосомами, связанными с эндоплазматическим ретикуломом. Сформированные цепи затем поступают в цистерны гладкого эндоплазматического ретикулума, где последовательно претерпевают такие этапы посттрансляционной модификации, как гидрокселирование Pro, гидрокселирование Lys, формирование дисульфидных мостиков, гликозилирование Hyl. Там же происходит и сборка цепей в

трехспиральные конформации, в которой определяющая роль принадлежит N- и C-концевым фрагментам проколлагеновых цепей [28]. Сформированные тройные спирали проколлагена из гладкого эндоплазматического ретикулума транспортируются в аппарат Гольджи, откуда осуществляется их секреция в составе вакуолей во внеклеточное пространство [61].

Поступившие во внеклеточное пространство молекулы проколлагена не могут без дополнительной модификации образовывать фибриллярные агрегаты с нормальными структурными свойствами. Сначала необходимо отщепить дополнительные N- и C-концевые пептиды (пропептиды). Только после этого завершается преобразование проколлагена в коллаген. Ряд протеаз во внеклеточном пространстве способен расщеплять пропептиды [30].

После отщепления пропептидов завершается формирование надмолекулярных коллагеновых структур – сложный процесс, осуществляемый с участием различных белков, пептидов и клеток [62, 63]. Невзирая на многолетнее изучение [17, 43, 62, 64], детально механизм этого процесса остается во многом не ясным. Последние исследования, в частности, выяснили важность присутствия определенных последовательностей (сайтов связывания) в молекулах коллагенов для нормального формирования экстраклеточного матрикса и последующей адгезии различных типов клеток [62]. Для эндотелиальных клеток человека в коллагене типа I такой последовательностью является GFP* GER [62]. Для успешного участия коллагена типа XIX в процессах взаимодействия клетка–матрикс важное значение имеет присутствие высокоаффинного, гепаринсвязывающего участка [5]. Специфические участки в структуре коллагена типа XVIII обеспечивают его участие в экспрессии сигнальных молекул и регуляции эпителиального эпигенеза [65].

В коллагене типа XIV сайты, ответственные за адгезию фибробластов, локализованы в N- и C-терминальных доменах молекулы [66], а ответственные за адгезию гемопоэтических клеток – в N-терминальном глобулярном домене и в тройной спирали [67].

Катаболизм коллагена *in vivo*

Молекулы коллагена имеют неодинаковую судьбу: не все из них, попав в межклеточное пространство, включаются в надмолекулярную структуру, а из тех, которые все же вошли в ее состав, не все существуют столь же долго, как и вся структура [63]. Например, в коже в период интенсивного синтеза коллагена около 35% об-

разующегося растворимого белка не включается в надмолекулярные структуры и выводится из организма. Аналогичный процесс был отмечен и в костной ткани в период роста. При этом распаду подвергаются молекулы коллагена с различным биологическим “возрастом”.

Деградация коллагена *in vivo* представляет собой многоступенчатый процесс расщепления [49, 63]: тройной спирали коллагена, полипептидных фрагментов, низкомолекулярных пептидов, дипептидов Gly-Pro и Pro-Hyp.

В организме существует обширное семейство металлопротеаз (ММР), локализованных внеклеточно, и мембраносвязанных эндопептидаз, совместными усилиями способных расщеплять фактически все компоненты внеклеточного матрикса и базальных мембран [30].

Последние исследования структуры таких ферментов, способных расщеплять тройную спираль коллагена, выявили в их молекулах наличие четырех доменов: металлопротеазного, спейсинг-домена и двух коллагенсвязывающих [68]. При этом коллагенсвязывающий домен и небольшой Ca^{2+} -связывающий локус определяют ориентацию доменов и конформацию молекулы в целом. Следует отметить, что и сами молекулы коллагенов содержат специальные сайты, по которым происходит их расщепление коллагеназами [69]. В частности, для коллагена типа I такой сайт был не только обнаружен (P4-P'9/10), но также синтезирован и встроен в модельные гетротримерные коллагеновые пептиды [70].

Металлопротеиназам матрикса принадлежит ведущая роль в осуществлении процессов расщепления коллагенов как в норме, так и в ходе патологических процессов [71–74]. Выявлен ряд типов металлопротеиназ, отличающихся как по своей локализации, так и по способности расщеплять различные типы коллагена. В частности, для ММР-2 из культуры клеток рака прямой кишки человека природным субстратом является коллаген типа IV [75], для ММР-8 из слезной жидкости – коллаген типа I [76], для ММР-1 из клеток легочного эпителия – коллагены типов I и III [77]. При этом, если фермент из сегментоядерных нейтрофилов периферической крови больных ревматоидным артритом одинаково интенсивно расщепляет коллагены типов I и II [72], то фермент из синовиальной жидкости при ревматоидном артрите наиболее активно расщепляет коллаген типа III, затем I и лишь затем типа II [72, 73, 78]. Физиологическое значение такой специфичности очевидно: в норме суставные поверхности костей выстелены хрящевой тканью, содержащей коллаген типа II. Лишь при развитии патологических изменений и нарушении хря-

шевых покровов оголяются подлежащие участки кости, содержащие коллаген типа I и начинается *de novo* биосинтез коллагена типа III.

Секреция данных протеолитических ферментов регулируется на нескольких уровнях: путем контроля транскрипции генов, путем гликозилирования, действием специфических ингибиторов и за счет процессов активации ферментов [79]. На последнем уровне чаще всего происходит преобразование профермента в активную протеазу. Серия таких активаций ведет к формированию ферментативных каскадов. В качестве примера можно привести металлопротеиназу матрикса MT1-MMP.

Мембраносвязанная металлопротеаза типа I (MT1-MMP) сама по себе не способна расщеплять коллаген типа IV базальных мембран. Однако она связывает и активирует проMMP-2 — один из типов коллагеназ, способных расщеплять коллаген типа IV [74]. Аналогичным образом MT1-MMP активирует и MMP-8 [76]. При этом идет избирательная активация высоко гликозилированных изоформ MMP-8 (75 и 65 кДа), а менее гликозилированные (45 и 55 кДа) изоформы не обнаруживаются. Способна MT1-MMP активировать и проMMP-8.

Механизм индукции активности металлопротеиназ матрикса был изучен на культуре клеток хряща человека [80]. Было показано, что индукция MMP может осуществляться в норме 40 кДа СООН-терминальным гепаринсвязывающим доменом фибронектина (HBFN-f). При этом HBFN-f в комплексе с гликозаминогликанами стимулирует продукцию MMP-1, MMP-2, MMP-9 и MMP-13.

Регуляция активности металлопротеиназ матрикса осуществляется рядом факторов (цитокинами, гормонами, витаминами, продуктами метаболизма, низкомолекулярными биорегуляторами различной природы), обеспечивая синхронизацию коллагенолитической активности во времени и пространстве с синтезом и замещением коллагена в ходе построения и ремоделирования тканевых структур.

Трансформирующий фактор роста $\beta 1$ — (TGF- $\beta 1$), интерлейкин G — (IL-G), а также интерферон — γ (IFN- γ) регулируют экспрессию генов металлопротеиназ (MMP-1, MMP-2) [24].

В качестве ингибиторов этих ферментов могут выступать аминокислоты и их производные (цистеин, ацетилцистеин), хелатирующие соединения, Co^{2+} , Hg^{2+} , сывороточный α_2 -макроглобулин, лизоцим, гистоны, протамины, антрациклиновые антибиотики, гликозаминогликаны [81–85]. Противоположный активирующий эффект оказывают ионы Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , колхи-

цин, гепарин, декстрансульфат и другие сульфатированные полисахариды, бактериальный эндотоксин [68, 81, 86]. Снижение антиоксидантной способности клеток сопровождается стимулирующей экспрессией MMP-1 в фибробластах дермы человека [87]. Это явление может быть обусловлено способностью витамина E (одного из наиболее важных жирорастворимых антиоксидантов) регулировать экспрессию генов коллагеназ посредством токоферолзависимого фактора транскрипции [88]. Присутствует также и гормональный контроль коллагеназной активности в тех биологических системах, в которых гормоны имеют явный эффект на метаболизм коллагена: влияние паратиреоидного гормона на резорбцию кости, участие прогестерона в поддержании прочной структуры матки, особенно на последней стадии беременности, защитные эффекты кортизона и его производных при подавлении изъязвления поврежденной роговицы и т.д. [43, 89–91]. Снижение уровней эстрадиола и прогестерона сразу после родов позволяет достичь в послеродовой матке такого уровня коллагенолитической активности, что 10-кратно увеличенное количество коллагена, которое образовалось в ней за 9 месяцев беременности, полностью расщепляется в течение 72 часов [92, 93].

Паратгормон вызывает увеличение стационарной концентрации коллагеназной мРНК в 4–8 раз путем стимуляции транскрипции гена коллагеназы [89]. Фактор некроза опухолей α сильно стимулирует накопление мРНК коллагеназы и повышает ее активность [90] в культуре хондроцитов, фактор роста эпидермиса стимулирует синтез коллагеназы в фибробластах и хондроцитах [90]. При этом фактор некроза опухолей проявляет свой эффект избирательно. При активации клеток фактором некроза опухолей экспрессия коллагеназы типа IV с молекулярной массой 72 кДа падает на 75%, тогда как активность коллагеназы типа IV с молекулярной массой 92 кДа возрастает в 2,5–4,0 раза [91]. В модельной системе, эквивалентной коже, фактор роста TGF- β ингибировал активность коллагеназ, а фактор PDGF — стимулировал ее [64].

На эффективность ферментативного расщепления коллагена воздействуют также и особенности пространственной структуры самого коллагена [94], в частности степень его сшитости и наличие нарушений третичной структуры.

Продукты расщепления коллагеновых молекул также способны регулировать активность металлопротеиназ матрикса. В частности, фрагмент 20 кДа коллагена типа XVIII подавляет активацию и ферментативную активность MMP-2, MMP-9 и MMP-13. Однако он не оказывает никакого эффекта на MMP-8 [30].

Фрагменты, образуемые в результате расщепления коллагена типа II бактериальной коллагеназой (col2f), ингибируют биосинтез коллагена и индуцируют дальнейшую деградацию матрикса [95].

Биологическая активность фрагментов коллагеновых молекул

Результатом воздействия металлопротеиназ на коллагеновые структуры является деструкция коллагеновых белков и образование значительного количества низкомолекулярных пептидов [96], которые, как свидетельствуют результаты последних исследований, отличаются высокой биологической активностью [96]. В частности, коллагеновые пептиды функционируют как регуляторы процессов воспаления, фиброза, опухолевого роста, воздействуют на функциональное состояние фагоцитов и других клеток организма [31, 96]. Некоторые фрагменты коллагенов (эндостатин) проявляют противоопухолевый эффект как непосредственно, воздействуя на клетки опухолей, так и путем подавления активности ряда опухолезависимых металлопротеиназ матрикса [30, 79].

Таким образом, современное изучение процессов преобразования коллагенов в организме на качественно ином методическом уровне, чем это делалось на начальном этапе их исследования [43], позволило не только расширить наши представления о биологической роли этих белков и продуктов их метаболизма, но и создать прочную теоретическую базу для широкого использования коллагенов в биотехнологии и медицине [30, 97, 98]. В настоящий момент широкое применение в медицинской практике нашли как сами коллагены в виде коллагеновых мембран [99], коллаген-минеральных композитов [99], коллагеновых губок [100], искусственных аналогов кожи [101] или чистых белков, используемых для лечения артрозов [102] и в пластической хирургии [103, 104], так и фрагменты коллагеновых молекул, используемые в качестве маркеров и регуляторов различных патологических процессов [95, 105].

Кроме того, ведется углубленное исследование изменений структуры коллагенов при различных патологиях и поиск путей их коррекции [106–112]. Накопленные нами данные показывают, что регуляция структуры коллагенов осуществляется по сложным механизмам на уровне транскрипции, посттранскрипции, трансляции и посттрансляции. Наличие такой многоуровневой регуляции дает основание говорить о жестко контролируемой экспрессии четко определенных коллагеновых белков. Учитывая важную роль кол-

лагенов в процессах эмбрио- и морфогенеза, роста, развития и жизнедеятельности организма, дальнейшее выяснение путей регуляции структуры этих белков *in vivo* представляется одним из важнейших этапов в разработке стратегии, позволившей бы манипулировать строением коллагеновых комплексов при различных патофизиологических состояниях.

COLLAGEN TRANSFORMATION IN ORGANISM: MODERN STATE OF THE PROBLEM

L. B. Bondarenko

Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Medical Science of Ukraine, Kyiv;

S u m m a r y

Collagens, which compose 1/3 of total proteins in the organism, have unique chemical structure and biological role. Current state of the investigation of these proteins biosynthesis and catabolism, role of shaperones, prolyl- and lysiloxydases, glycosyltransferases, metalloproteinases and other enzymes in collagens metabolism, as well as biological activities of collagens and their fragments have been considered in the review.

К е у w o r d s: collagen, metabolism, shaperones, metalloproteinases.

1. *Deyl Z., Miksi K. I., Eckhardt A.* // J. Chromatogr. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 2003. **790**, N 1–2. P. 245–275.
2. *Лебедев Д. А.* // Усп. совр. биол. 1979. **88**, вып. 1(4). С. 36–49.
3. *Ghohestani R. F., Rotunda S. L., Hudson B. et al.* // Lab. Invest. 2003. **83**, N 5. P. 605–611.
4. *Iwahashi M., Muragaki Y., Ooshima A. et al.* // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2003. **88**, N 5. P. 2231–2235.
5. *Myers J. C., Li D., Amenta P. S., Clark C. C. et al.* // J. Biol. Chem. 2003. **278**, N 34. P. 32047–32057.
6. *Marneros A. G., Olsen B. R.* // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2003. **44**, N 6. P. 2367–2372.
7. *Ackley B. D., Kang S. H., Crew J. R. et al.* // J. Neurosci. 2003. **23**, N 9. P. 3577–3587.
8. *Koch M., Foley J. E., Hahn R., Zhou H. et al.* // J. Biol. Chem. 2001. **276**, N 25. P. 23120–23126.
9. *Chou M. Y., Li H. C.* // Genomics. 2002. **79**, N 3. P. 395–401.
10. *Latvanlehto A., Snellman A., Tu H., Pihlajaniemi T.* // J. Biol. Chem. 2003. **278**, N 39. P. 375590–375599.

11. Sato K., Yomogida K., Wada T. et al. // *Ibid.* 2002. **277**, N 40. P. 37678–37684.
12. Boot-Handford R. P., Tuckwell D. S., Plumb D. A. et al. // *Ibid.* 2003. **278**, N 33. P. 31067–31077.
13. Banyard J., Bao L., Zetter B. R. // *Ibid.* N 23. P. 20989–20994.
14. Ozbek S., Pertz O., Schwager M. et al. // *Ibid.* 2002. **277**, N 51. P. 49200–49204.
15. Lee B., Alessio M., Vissius H. et al. // *Amer J. Hum. Genet.* 1991. **48**, N 3. P. 511–517.
16. Prockop D. J., Dehm P., Olsen B. R. et al. *Biology of Fibroblast* / Eds. by E. Kulonen, J. Pikkariainen. 1973. Acad. Press. London. P. 311–320.
17. Wang Z., Inokuchi T., Nemoto T. K. et al. // *Plast Reconstr Surg.* 2003. **111**, N 6. P. 1980–1987.
18. Koide T., Aso A., Yoriuzzi T. et al. // *J. Biol. Chem.* 2000. **275**, N 36. P. 27957–27963.
19. Koide T., Takahara Y., Asada S. et al. // *Ibid.* 2002. **277**, N 8. P. 6178–82.
20. Winter A. D., Page A. P. // *Mol. Cell. Biol.* 2000. **20**, N 11. P. 4084–4093.
21. Hecht J. T., Hayes E., Snuggs M. et al. // *Matrix. Biol.* 2001. **20**, N 4. P. 251–262.
22. Vranka J., Mokashi A., Keene D. R. et al. // *Ibid.* N 7. P. 439–450.
23. Ko M. K., Kay E. P. // *Mol. Vis.* 2002. **8**. P. 1–9.
24. Martelli-Junior H., Cotrim P., Graner E. et al. // *J. Periodontol.* 2003. **74**, N 3. P. 296–306.
25. Nagata K. // *Nippon Yakurigaku Zasshi.* 2003. **121**, N 1. P. 4–14.
26. Yasuda K., Hirayoshi K., Hirata H. et al. // *J. Biol. Chem.* 2002. **277**, N 47. P. 44613–44622.
27. Miller E. J., Matukas V. J. // *Fed. Proc.* 1974. P. 1197–1210.
28. Pakkanen O., Hamalainen E. R., Kivirikko K. I. et al. // *J. Biol. Chem.* 2003. **278**, N 34. P. 32478–32483.
29. Eyre D., Shao P., Weis M. A. et al. // *Mol. Genet. Metab.* 2002. **76**, N 3. P. 211–216.
30. Nyberg P., Heikkila P., Sorsa T. et al. // *J. Biol. Chem.* 2003. **278**, N 25. P. 22404–11.
31. John H., Preissner K. T., Forssmann W. G. et al. // *Biochemistry.* 1999. **38**, N 32. P. 10217–10224.
32. Squires G. R., Okouneff S., Ionescu M. et al. // *Arthritis Rheum.* 2003. **48**, N 5. P. 1261–1270.
33. Girotto D., Urbani S., Brun P. et al. // *Biomaterials.* 2003. **24**, N 19. P. 3265–3275.
34. Rizk D. E., Mensah-Brown E. P., Chandranath S. I. et al. // *Urol. Res.* 2003. **31**, N 3. P. 147–151.
35. Hayashi M., Tsutamoto T., Wada A. et al. // *Circulation.* 2003. **107**, N 20. P. 2559–2565.
36. Scheijen B., Bronk M., van der Meer T. et al. // *Mol. Cell. Biol.* 2003. **23**, N 10. P. 3656–3668.
37. Chakir J., Shannon J., Molet S. et al. // *J. Allergy. Clin. Immunol.* 2003. **111**, N 6. P. 1293–1298.
38. Kivirikko S., Mauviel A., Pihlajaniemi T. et al. // *Exp. Dermatol.* 1999. **8**, N 5. P. 407–412.
39. Kyriotou M., Fossard-Demoor M., Chadji-christos C. et al. // *DNA Cell. Biol.* 2003. **22**, N 2. P. 119–129.
40. Sengupta P. K., Smith E. M., Kim K. et al. // *Cancer. Res.* 2003. **63**, N 8. P. 1789–1797.
41. Myllyharju J. // *Matrix. Biol.* 2003. **22**, N 1. P. 15–24.
42. Wagner K., Poschl E., Turnay J. et al. // *Biochem. J.* 2000. **352**, Pt 3. P. 907–911.
43. Ramachandran G. N. *Biochemistry of collagen.* New York, London: Plenum Press. 1976. 536 p.
44. Akiri G., Sabo E., Dafni H. et al. // *Cancer. Res.* 2003. **63**, N 7. P. 1657–1666.
45. Giampuzzi M., Oleggini R., Di Donato A. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2003. **1647**, N 1–2. P. 245–251.
46. Hornstra I. K., Birge S., Starcher B. et al. // *J. Biol. Chem.* 2003. **278**, N 16. P. 14387–14393.
47. Wang C., Luosujarvi H., Heikkinen J. et al. // *Matrix. Biol.* 2002. **21**, N 7. P. 559–566.
48. Aguilar J. H., Jacobs H. J., Butler W. T. et al. // *J. Biol. Chem.* 1973. **248**. P. 5106–5110.
49. Roth M., Uebelhart D. // *Clin. Chim. Acta.* 2003. **327**, N 1–2. P. 81–86.
50. Acil Y., Springer I. N., Prasse J. G. et al. // *Int. J. Legal. Med.* 2002. **116**, N 6. P. 340–343.
51. Banse X., Sims T., Bailey A. // *J. Bone. Miner. Res.* 2002. **17**, N 9. P. 1621–1628.
52. Banse X., Devogelaer J. P., Lafosse A. et al. // *Bone.* 2002. **31**, N 1. P. 70–76.
53. Tan C. I., Kent G. N., Randall A. G. et al. // *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 2003. **58**, N 5. P. B387–B393.
54. Huebner J. L., Hanes M. A., Beekman B. et al. // *Osteoarthritis. Cartilage.* 2002. **10**, N 10. P. 758–767.
55. Carmo M., Colombo L., Bruno A. et al. // *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 2002. **23**, N 6. P. 543–549.
56. Kuroyanagi M., Shimamura E., Kim M. et al. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2002. **66**, N 10. P. 2077–2082.
57. Herrmann K. L., McCulloch A. D., Omens J. H. // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2003. **284**, N 4. P. H1277–H1284.
58. Martinez D. A., Guhl D. J., Stanley W. C. et al. // *Diabetes. Res. Clin. Pract.* 2003. **59**, N 1. P. 1–9.
59. Kent C. M., Ligth N. D., Bailey A. J. // *Biochem. J.* 1985. **225**, N 3. P. 745–752.
60. Ligth N. D., Bailey A. J. // *FEBS Lett.* 1985. **182**, N 2. P. 503–508.

61. Olsen B. R., Berg R. A., Kishida J. et al. // J. Cell Biol. 1975. **64**. P. 340–347.
62. Sweeney S. M., DiLullo G., Slater S. J. et al. // J. Biol. Chem. 2003. **278**, N 33. P. 30516–30524.
63. Engelholm L. H., List K., Netzel-Arnett S. et al. // J. Cell. Biol. 2003. **160**, N 7. P. 1009–1015.
64. Hey K., Jutley J. K., Cunliffe W. J. et al. // Biochemistry. 1990. **12**, N 1. P. 41–49.
65. Vainio S., Lin Y., Pihlajaniemi T. // J. Am. Soc. Nephrol. 2003. **14**(Suppl 1). P. S3–S8.
66. Ehnis T., Dieterich W., Bauer M. et al. // Exp. Cell. Res. 1998. **239**, N 2. P. 477–480.
67. Klein G., Kibler C., Schermutzki F. // Matrix. Biol. 1998. **16**, N 6. P. 307–317.
68. Wilson J., Matsushita O., Okabe A. et al. // EMBO J. 2003. **22**, N 8. P. 1743–1752.
69. Fiori S., Sacca B., Moroder L. // J. Mol. Biol. 2002. **319**, N 5. P. 1235–1242.
70. Ottl J., Battistuta R., Pieper M. et al. // FEBS Lett. 1996. **398**, N 1. P. 31–36.
71. Цамен П. Е., Козлов Е. А., Бассалык Л. С. и др. // Вопр. мед. химии. 1993. **39**, № 3. С. 34–36.
72. Konttinen Y. T., Lindy O., Kempainen P. et al. // Matrix. 1991. **11**, N 4. P. 296–301.
73. Blanckaert A., Mazieres B., Eeckhout J. et al. // Clin. Chim. Acta. 1989. **185**, N 1. P. 73–80.
74. Seiki M. // Cancer. Lett. 2003. **194**, N 1. P. 1–11.
75. Mook O. R., Van Overbeek C., Ackema E. G. et al. // J. Histochem. Cytochem. 2003. **51**, N 6. P. 821–829.
76. Holopainen J. M., Moilanen J. A., Sorsa T. et al. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2003. **44**, N 6. P. 2550–2556.
77. Shiomi T., Okada Y., Foronjy R. et al. // Exp. Lung. Res. 2003. **29**, N 1. P. 1–15.
78. Harris E. D., Faulkner C. S., Brown F. E. // Clin. Orthop. Relat. Res. 1975. **110**. P. 303–308.
79. Opdenakker G. // Verh. K. Acad. Geneesk. Belg. 1997. **59**, N 6. P. 489–514.
80. Yasuda T., Poole A.R., Shimizu M. et al. // Arthritis. Rheum. 2003. **48**, N 5. P. 1271–1280.
81. Zhou L., Zhang Z., Shan H. // Chin. Biochem. J. 1991. **7**, N 3. P. 291–296.
82. Blaser J., Knauper V., Osthues A. et al. // Eur. J. Biochem. 1991. **202**, N 3. P. 1223–1230.
83. Karakiulakis J., Missirlis E., Maragoudakis M. E. // Biochim. Biophys. Acta. Jen. Subj. 1990. **1035**, N 2. P. 218–222.
84. Dodge G. R., Jimenez S. A. // Osteoarthritis. Cartilage. 2003. **11**, N 6. P. 424–432.
85. Haffner J. C., Fecteau K. A., Eiler H. // Vet. Ophthalmol. 2003. **6**, N 1. P. 67–72.
86. Никитин В. Н., Перский Е. Э., Утевская. Возрастная и эволюционная биохимия коллагеновых структур. К.: Наук. думка. 1977. 279 с.
87. Yin L., Yamauchi R., Tsuji T. et al. // J. Dermatol. 2003. **30**, N 3. P. 173–180.
88. Rimbach G., Minihane A. M., Majewicz J. et al. // Proc. Nutr. Soc. 2002. **61**, N 4. P. 415–425.
89. Quinn Ch. O., Scoott D. K., Brinckerhoff C. E. et al. // J. Biol. Chem. 1990. **265**, N 36. P. 22342–22347.
90. Mitchell P. J., Cheung H. S. // J. Cell Physiol. 1991. **149**, N 1. P. 132–140.
91. Hitts H. S., Mautlet B. B., Bowik C. C. // J. Cell. Biol. 1990. **111**, N 5, Pt. 2. P. 15–23.
92. Woessner J. F. // Biochem. J. 1962. **83**. P. 304–307.
93. Osmers R., Szeverinyi M., Adelman-Jrill B. C. et al. // 22nd Int. Congr. Pathophysiol. Pregnancy, Budapest, June 21–23, 1990. Budapest. 1990. P. 57.
94. Menter J. M., Cornelison L. M., Cannick L. et al. // Photodermatol. Photoimmunol. Photomed. 2003. **19**, N 1. P. 28–34.
95. Jennings L., Wu L., King K. // Connect. Tissue. Res. 2001. **42**, N 1. P. 71–86.
96. Kozlov I. G., Yemelyanov A. Y., Davidova N. V. et al. // Russ. J. Immunol. 1999. **4**, N 2. P. 113–122.
97. Hu Y., Zhao W., Qian X., Zhang L. // Chin. Med. J. (Engl). 2003. **116**, N 2. P. 284–287.
98. Buma P., Pieper J. S., van Tienen T. et al. // Biomaterials. 2003. **24**, N 19. P. 3255–3263.
99. Zitzmann N. U., Rateitschak-Pluss E., Marinello C. P. // J. Periodontol. 2003. **74**, N 5. P. 687–694.
100. Hanisch O., Sorensen R.G., Kinoshita A. et al. // Ibid. P. 648–657.
101. Augustin C., Collombel C., Damour O. // Photochem. Photobiol. 1997. **66**, N 6. P. 853–859.
102. Ding C. H., Li Q., Xiong Z. Y., Zhou A. W. et al. // Clin. Exp. Immunol. 2003. **132**, N 3. P. 416–423.
103. Liu B., Xu Z., Yu R. // Zhongguo. Yi. Xue. Ke. Xue. Yuan. Xue. Bao. 1994. **16**, N 3. P. 197–200.
104. Kuroyanagi Y. // Nippon. Rinsho. 2003. **61**, N 3. P. 427–431.
105. Wilkinson J., Stockley I., Hamer A. // J. Orthop. Res. 2003. **21**, N 3. P. 529–534.
106. Varani J., Perone P., Fligel S. E. et al. // J. Invest. Dermatol. 2002. **119**, N 1. P. 122–129.
107. Bode M. K., Mosorin M., Satta J. et al. // Eur. J. Endovasc. Surg. 2002. **23**, N 5. P. 413–420.
108. Бондаренко Л. Б., Чумак В. Л. // Укр. біохім. журн. 2002. **74**, № 4а. С. 26.

109. Бондаренко Л. Б., Зінов'єв С. Г. // VII Карш. читання. Полтава. 2000. С. 30–34.
110. Бондаренко Л. Б., Данилюк Т. П. // Ліки. 1998. № 4. С. 71–73.
111. Бондаренко Л. Б., Гайдай Г. Л., Крикунова В. Ю. та ін. // Вісник Полтавської державної аграрної академії. 2003. № 1–2. С. 80–82.
112. Бондаренко Л. Б. // Укр. біохім. журн. 1998. **70**, № 3. С. 12–23.

Получено 20.11.2003