

Struktura, funkcja i znaczenie biomedyczne kolagenów

Structure, function and biomedical significance of collagens

Kamila A. Czubak, Halina M. Żbikowska

Received: 29.10.2013
Revised: 14.12.2013
Accepted: 16.12.2013
Published online: 27.08.2014

STRESZCZENIE

Kolageny to rodzina białek fibrylarnych, będąca głównym składnikiem macierzy zewnątrzkomórkowej organizmów zwierzęcych. Białka te występują w większości tkanek i narządów, m.in. w kościach, chrząstkach, skórze, więzadłach, ścięgnach, rogówce. Podstawowym ich zadaniem jest utrzymanie integralności strukturalnej i sprężystości tkanki łącznej oraz jej wytrzymałości na rozciąganie. Kolageny charakteryzują się unikatową strukturą bogatą w aminokwasy, takie jak glicyna i prolina oraz hydroksyprolina. Głównym elementem struktury kolagenów są 3 lewoskrętne polipeptydowe łańcuchy, nawijające się wokół siebie i tworzące prawoskrętną konformację liny superhelisowej, która utrzymywana jest dzięki obecności wiązań wodorowych. Dotychczas udało się wyizolować i opisać 29 typów kolagenów charakteryzujących się odmienną strukturą, funkcją oraz występowaniem w organizmie. Rozwój technik badawczych umożliwił poznanie struktury i właściwości naturalnych białek kolagenowych, co z kolei zaowocowało produkcją syntetycznych włókien kolagenowych, wykorzystywanych w nanotechnologii czy biomedycynie. Materiały kolagenowe zaliczane są do najbardziej użytecznych biomateriałów ze względu na takie właściwości, jak minimalna toksyczność, niska antygenowość, wysoka biogodność oraz biodegradowalność.

Katedra Biochemii Ogólnej Wydziału Biologii
i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego

SŁOWA KLUCZOWE

kolagen, biomateriały, medycyna regeneracyjna, inżynieria tkankowa, atelokolagen

ABSTRACT

Collagens are a family of fibrous proteins which are a major component of the extracellular matrix (ECM) in animal organisms. These proteins are found in most tissues and organs (bones, cartilages, skin, ligaments, tendons, corneas). The main functions of collagens include the maintenance of structural integrity, elasticity and tensile strength of the connective tissue. Macromolecules from the collagen family are characterized by a unique structure rich in e.g. glycine, proline and hydroxyproline. The collagen structure consists of three left-handed polypeptide chains which are coiled around each other forming a right-handed

ADRES DO KORESPONDENCJI:

Dr hab. n. med. prof. nadzw. UŁ
Halina Małgorzata Żbikowska
Katedra Biochemii Ogólnej Wydziału Biologii
i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego
ul. Pomorska 141/143
90-236 Łódź
tel. +48 426354483
e-mail: zbkow@biol.uni.lodz.pl

Ann. Acad. Med. Siles. 2014, 68, 4, 245–254
Copyright © Śląski Uniwersytet Medyczny
w Katowicach
eISSN 1734-025X

rope-like super helix. This structure is stabilized by the presence of interstrand hydrogen bonds. To date, 29 types of collagen have been isolated and described. They differ from each other in structure, functions, and body distribution. Research development has allowed us to understand the structure and properties of native collagens which has resulted in the production of artificial collagen fibrils used in nanotechnology and biomedicine. Collagen materials are considered to be the most useful biomaterials in medicine because of their properties such as non-toxicity, low antigenicity, high biocompatibility and biodegradability.

KEY WORDS

collagen, biomaterials, regenerative medicine, tissue engineering, atelocollagen

WSTĘP

Macierz zewnątrzkomórkowa tkanki łącznej organizmów zwierzęcych zbudowana jest przede wszystkim z białek kolagenowych, które stanowią 1/3 wszystkich białek w organizmach kręgowców. Obecnie opisano 29 genetycznie odmiennych rodzajów kolagenu, tworzących rodzinę białek kolagenowych, która charakteryzuje się tkankowo specyficznym występowaniem i unikalną strukturą [1,2,3,4]. Cechą charakterystyczną struktury wszystkich białek kolagenowych jest tworzenie konformacji tzw. liny, czyli prawoskrętnej, rozciągniętej superhelisy, która powstaje przez nawijanie się 3 pojedynczych, lewoskrętnych łańcuchów polipeptydowych wokół wspólnej osi [1,3,5].

Utworzenie unikalnej struktury przestrzennej związane jest ze specyficznym składem aminokwasowym łańcuchów polipeptydowych [1]. Każdy z łańcuchów składa się z około 1000 aminokwasów i ma co najmniej jeden region zbudowany z powtarzającej się tripeptydowej sekwencji $(-Gly-Xaa-Yaa)_n$, gdzie pod Xaa i Yaa mogą być podstawione dowolne aminokwasy [1,5,6]. Najczęściej mamy do czynienia z podstawieniem iminokwasów: pod Xaa reszt proliny – ok. 28% (Pro), natomiast pod Yaa reszt hydroksyproliny – ok. 38% (Hyp) [1,7].

Naturalne potrójne superhelisy kolagenowe charakteryzują się odpornością na działanie proteaz, takich jak tripsyna, chymotrypsyna czy pepsyna. Jedynymi enzymami degradującymi te makrocząsteczki są kolagenazy (metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej). Cechą charakterystyczną składu aminokwasowego polipeptydów kolagenu jest obecność równomolowych ilości aminokwasów kwaśnych (kwasu glutaminowego – Glu, asparaginowego – Asp) oraz zasadowych (lizyny – Lys, argininy – Arg) [6,8].

Podstawową funkcją pełnioną przez kolageny w organizmach jest utrzymywanie strukturalnej integralności tkanek i narządów. Oprócz roli biomechanicznej, kolagen pełni wiele dodatkowych funkcji, jedną z nich jest interakcja ze specyficznymi receptorami, które wpływają na procesy adhezji, różnicowania, wzrostu oraz przeżywalności komórek. Kolageny odgrywają także podstawową rolę w rozwoju narządów, naprawie tkanek oraz procesie gojenia ran [9]. Jako biologiczny

polimer kolagen jest nieustannie syntetyzowany i degradowany w przestrzeni zewnątrzkomórkowej [4,7].

Różnorodność typów kolagenów i ich rola biologiczna

Proces biosyntezy kolagenu jest wieloetapowy. Rybosomy związane z szorstkim retikulum endoplazmatycznym syntetyzują polipeptydy kolagenu. Zanim jednak zostanie on wydzielony do przestrzeni międzykomórkowej, ulega modyfikacjom potranslacyjnym, które obejmują kolejno: hydroksylację, glikozylację oraz składanie tripletowych cząsteczek. Tak powstały prokolagen ulega sekrecji poza obręb komórki, gdzie przy udziale peptydaz usuwane są telopeptydy, wskutek czego formowane są cząsteczki tropokolagenu. Kolejnymi etapami biosyntezy są wytworzenie wiązań poprzecznych między cząsteczkami tropokolagenu oraz spontaniczna asocjacja w mikrowłókienkę, a następnie we włókienkę i dojrzałe włókno kolagenowe [10,11].

Znaczącą niejednorodność funkcjonalną i strukturalną w obrębie rodziny białek kolagenowych można wyjaśnić obecnością wielu genów kodujących te białka. W ten sposób organizmy zabezpieczają się przed utraceniem tych istotnych makrocząsteczek [2]. Jak dotąd, w tkankach człowieka wykryto obecność 29 odmiennych postaci kolagenu pełniących różnorakie funkcje, mających odrębną strukturę, a także różniących się lokalizacją i zawartością w tkankach [2,6]. Wielopostaciowość kolagenów może być spowodowana wieloma czynnikami. Uważa się, iż wynika ona z różnic w ekspresji genów kodujących enzymy zaangażowane w procesie biosyntezy tych białek. Według innej hipotezy, różnorodność kolagenów związana jest ze zmianami zachodzącymi podczas modyfikacji potranslacyjnych [6].

W celu ułatwienia opisu składu podjednostkowego zastosowano nazewnictwo oparte na numeracji cyframi rzymskimi typów białek kolagenowych (I-XXIX), arabskimi zaś oznacza się łańcuchy polipeptydowe ($\alpha_1-\alpha_6$), z których są zbudowane [4,6]. Dokonując charakterystyki poszczególnych cząsteczek białek kolagenowych przede wszystkim określamy ich przynależność do konkretnej grupy, do której zostały przypisane na podstawie złożoności i różnorodności struktural-

nych, obecności niehelikalnych fragmentów, funkcji oraz zdolności montażu struktur nadcząsteczkowych [9]. Rodzina białek kolagenowych podzielona jest na dwie główne grupy, kolageny fibrylarne i niefibrylarne.

Kolageny fibrylarne

Świat nauki przede wszystkim interesuje się kolagenami typu fibrylarnego [12]. Te klasyczne kolageny, kodowane u ssaków przez 11 genów, zostały odkryte jako pierwsze spośród rodziny białek kolagenowych [6]. W skład tej grupy wchodzi typy: I, II, III, V, XI, XXIV oraz XXVII, co stanowi około 90% wszystkich białek kolagenowych występujących w organizmach zwierzęcych [9,12]. W tabeli I została zaprezentowana grupa kolagenów fibrylarnych wraz z przedstawicielami, składem podjednostkowym i lokalizacją w organizmie (tab. I) [1].

Cechą wspólną kolagenów fibrylarnych jest długi centralny potrójny heliks (ok. 340 tripletów) [6,12]. Region ten otoczony jest przez krótkie, zawierające około 20 reszt, telopeptydy (niehelikalne fragmenty) w regionie amino- i karboksyloterminalnym. Częsteczką kolagenu fibrylarnego ma średnicę 1,5 nm i długość 300 nm [12]. Wskutek agregacji makrocząsteczek powstają włókna kolagenowe charakteryzujące się widocznymi pod mikroskopem elektronowym prążkami poprzecznymi, które występują co 64–67 nm [12,13].

Najlepiej poznanym białkiem kolagenowym w obrębie tej grupy jest kolagen typu I. Występuje on w organizmach najobficiej jako składnik kości, więzadeł, ścięgien, skóry, rogówki [12]. Potrójna superhelisa kolagenu typu I zbudowana jest zazwyczaj z dwóch identycznych łańcuchów α_1 [I] i jednego α_2 [I], tworząc heterotrimer [1,9,14]. Spotykana jest również postać homotrimeryczna zbudowana z trzech łańcuchów α_1 [I] [6,14]. Ten typ kolagenu jest przede wszystkim odpowiedzialny za wytrzymałość na rozciąganie tkanek, w których występuje, oraz za sztywność kości [9].

Na poziomie molekularnym kolageny typów II i III są homotrimerami i składają się z 3 identycznych łańcuchów, odpowiednio α_1 [II]₃ oraz α_1 [III]₃ [13]. Kolagen typu II jest dominującym składnikiem tkanki szklistej (ok. 80%), nabłonka rogówki oraz chrząstki [1,9,14].

W porównaniu z typem I homotrimer ten ma podobne właściwości i rozmiar, ale charakteryzuje się wyższą zawartością hydroksylizyny oraz reszt glukozy i galaktozy [9]. Kolagen typu III jest elementem skóry właściwej, tkanek wątroby, płuc, śledziony oraz naczyń krwionośnych [12]. Agregacja włókien kolagenowych typu III i I nadaje elastyczność tym tkankom. Kolageny rodzaju V i XI to głównie heterotrimery powstające z 3 różnych łańcuchów [9]. Makrocząsteczki te odgrywają główną rolę w inicjacji fibrylogenezy kolagenu [3]. Miejscem występowania typu V są kości, skóra oraz rogówka, natomiast kolagen XI obecny jest w chrząstce i dyskach międzykręgowych [1].

Stosunkowo niedawno odkryte białka kolagenowe typów XXIV i XXVII prawdopodobnie związane są z kolagenem rodzajów I i II, aczkolwiek nie wiadomo jeszcze wystarczająco dużo na ten temat. Podstawową cechą wyróżniającą te kolageny spośród grupy innych fibrylarnych białek kolagenowych jest to, iż fragment powtórzonej sekwencji Gly-Xaa-Yaa jest stosunkowo krótki i stanowi około 329 tripletów, w których obecne są przerwy – jedna (w typie XXIV) bądź dwie (w typie XVII) [12,15]. Kolagen XXVII, w przeciwieństwie do pozostałych członków podrodziny, tworzy nieprążkowane, nitkowate struktury [12,13].

Zdecydowana większość włókien kolagenowych wykazuje heterotypowość, co oznacza, że są one zbudowane z więcej niż jednego typu kolagenu. Zjawisko to potwierdza obecność w kościach i rogówce włókien kolagenowych, złożonych w głównej mierze z kolagenu typu I i V, struktura skóry charakteryzuje się współwystępowaniem przede wszystkim rodzajów I i III, natomiast w chrząstkach obecne są połączenia typów II, XI, IX lub II, III [4]. Ważną rolę odgrywają także stosunki ilościowe kolagenów w tkankach. Przykładem jest wpływ proporcji ilościowych białek kolagenowych typów I, III i V na średnicę powstających włókien podczas fibrylogenezy [2].

Kolageny niefibrylarne

Poznano typy kolagenów niekonwencjonalnych, które nie tworzą typowych fibryli, ich skład podjednostkowy oraz występowanie w organizmie zestawiono w tabeli II. Schematy struktur wybranych klas białek kolagenowych ilustruje rycina 1.

Tabela I. Typy kolagenów fibrylarnych oraz ich występowanie w organizmach kręgowców (wg [1,6,9 i 14])
Table I. Various types of fibril-forming collagens and their tissue distribution in vertebrates (according to [1,6,9 and 14])

Typ kolagenu	Skład podjednostkowy	Lokalizacja
I	α_1 [I] ₂ α_2 [I]; α_1 [I] ₃	skóra, kości, więzadła, ścięgna, rogówka
II	α_1 [II] ₃	chrząstka, ciało szkliste
III	α_1 [III] ₃	skóra, naczynia, macica, jelito
V	α_1 [V] ₃ ; α_1 [V] ₂ α_2 [V]; α_1 [V] α_2 [V] α_3 [V]	kości, skóra, łożysko, rogówka
XI	α_1 [XI] α_2 [XI] α_3 [XI]	chrząstka, dysk międzykręgowy
XXIV	α_1 [XXIV] ₃	kość, rogówka
XXVII	α_1 [XXVII] ₃	chrząstka

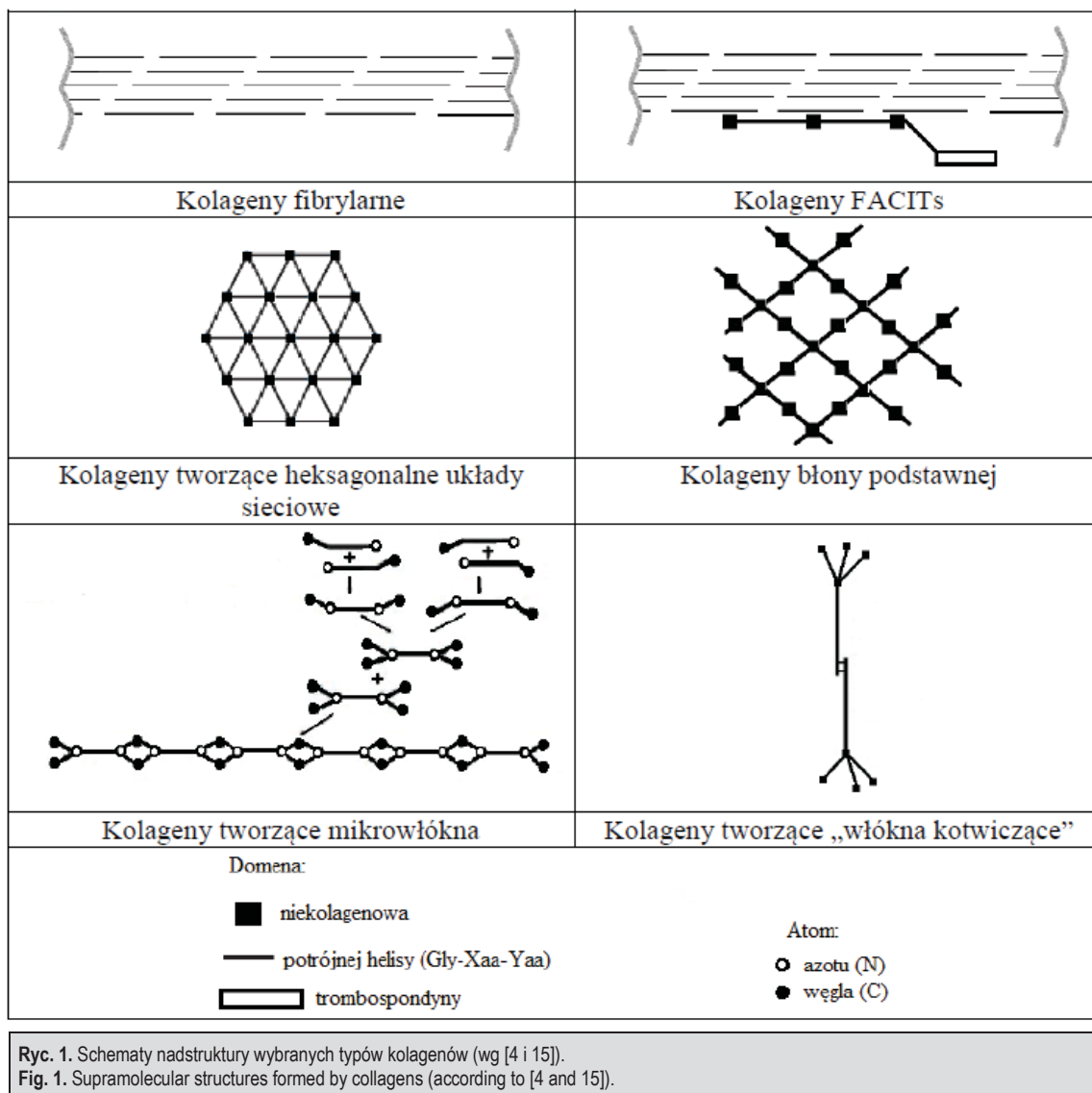
Tabela II. Typy kolagenów niefibrylarnych oraz ich występowanie w organizmach kręgowców (wg [1,6,9 i 14])
Table II. Various types of collagens non-forming typical fibrils and their tissue distribution in vertebrates (according to [1,6,9 and 14])

Typ kolagenu	Skład podjednostkowy	Lokalizacja
Kolageny błony podstawnej		
IV	$\alpha_1[IV]_2\alpha_2[IV]; \alpha_3[IV]\alpha_4[IV]\alpha_5[IV]; \alpha_6[IV]_2\alpha_6[IV]$	błony podstawne, naczynia włosowate
Kolageny tworzące mikrowłókna		
VI	$\alpha_1[VI]\alpha_2[VI]\alpha_3[VI]$	kości, naczynia, skóra, rogówka, chrząstka
XXVIII	$\alpha_1[XXVIII]_3$	komórki systemu nerwowego
XXIX	–	skóra
Kolageny tworzące tzw. włókna kotwiczące		
VII	$\alpha_1[VII]_2\alpha_2[VII]$	śluzówka, skóra, pęcherz, pępowina, owodnia
Kolageny tworzące heksagonalne układy sieciowe		
VIII	$\alpha_1[VIII]_3; \alpha_2[VIII]_3; \alpha_1[VIII]_2\alpha_2[VIII]$	skóra, mózg, serce, nerki, naczynia, kości, chrząstka
X	$\alpha_1[X]_3$	chrząstka
Kolageny FACITs (<i>Fibril-Associated Collagens with Interrupted Triple helices</i>)		
IX	$\alpha_1[IX]\alpha_2[IX]\alpha_3[IX]$	rogówka, ciało szkliste, chrząstka
XII	$\alpha_1[XII]_3$	chrząstka, ścięgna, skóra
XIV	$\alpha_1[XIV]_3$	naczynia, oko, nerwy, ścięgna, kości, skóra, chrząstka
XVI	$\alpha_1[XVI]_3$	serce, mięśnie gładkie, skóra, nerki
XIX	$\alpha_1[XIX]_3$	pas błon podstawowych w mięśniach szkieletowych, skóra, nerki, wątroba, łożysko, śledziona, gruczoł krokowy
XX	$\alpha_1[XX]_3$	nabłonek rogówkowy
XXI	$\alpha_1[XXI]_3$	żołądek, nerki, naczynia, serce, łożysko, mięśnie szkieletowe
XXII	$\alpha_1[XXII]_3$	połączenia tkankowe
XXVI	$\alpha_1[XXVI]_3$	jądra, jajniki
Kolageny zawierające domeny transbłonowe MACITs (<i>Membrane-Associated Collagens with Interrupted Triple helices</i>)		
XIII	$\alpha_1[XIII]_3$	mięśnie szkieletowe, serce, oko, skóra, komórki śródbłonka
XVII	$\alpha_1[XVII]_3$	skóra
XXIII	$\alpha_1[XXIII]_3$	przerzutowe komórki rakotwórcze, serce, siatkówka
XXV	$\alpha_1[XXV]_3$	oko, mózg, serce, jądra
Multipleksy – MULTIPLEXINS (<i>Multiple Triple-Helix Domains and Interruptions</i>)		
XV	$\alpha_1[XV]_3$	naczynia kapilarne, jajniki, serce, jądra, skóra, łożysko, nerki
XVIII	$\alpha_1[XVIII]_3$	nerki, płuca, wątroba

Kolageny błony podstawnej

Głównym składnikiem budującym błonę podstawną jest kolagen typu IV pełniący rolę rusztowania dla innych elementów występujących w tej strukturze [2]. Jest on umiejscowiony w komórkach nerwowych, tkance tłuszczowej, włóknach mięśniowych, nabłonku i śródbłonku [12]. Jest heterotrimerem tworzącym unikalną strukturę powstającą przez łączenie sześciu łańcuchów $\alpha_{1-6}[IV]$ w różnych konfiguracjach. Naj-

częściej występuje kompozycja $\alpha_1[IV]_2\alpha_2[IV]$ [15]. Struktura cząsteczki charakteryzuje się obecnością czterech domen: helikalnej nazywanej kolagenem 7-S w N-końcu, globularnej NC2 w N-końcu i NC1 w C-końcu oraz tzw. superhelisowego segmentu centralnego zawierającego krótkie przerwy. Cząsteczki kolagenów włókiennych są krótsze niż kolagenu IV, którego łańcuchy polipeptydowe formują superhelisę o długości 390 nm i średnicy około 3 nm [9,10].



Ryc. 1. Schematy nadstruktury wybranych typów kolagenów (wg [4 i 15]).
Fig. 1. Supramolecular structures formed by collagens (according to [4 and 15]).

Kolageny tworzące mikrowłókna

Kolagen VI pełni zasadniczą rolę w utrzymaniu integralności tkanek łącznych przez tworzenie specyficznych mikrowłókien [12]. Każda jego makrocząsteczka jest heterotrimerem o długości 100 nm, zbudowanym z 3 domen: superhelisowej oraz 2 rozbudowanych globularnych zakończeń [9,10]. Cechą wyróżniającą ten typ kolagenu spośród całej rodziny białek kolagenowych jest powstawanie struktury wyższego rzędu poprzez wydzielanie tetramerów, które uległy uprzedniej agregacji wewnątrzkomórkowej [10]. W przeciwieństwie do kolagenów włóknkowych, w kolagenach mikrofibrylarnych nie zachodzi enzymatyczna obróbka N- i C-końcowych regionów niekolagenowych, dlatego podczas montażu powstają tzw. włókna koralikowe [12]. Mikrowłókna tworzone przez te kolageny są usieciowane dzięki obecności mostków disiarczkowych [9].

Do grupy kolagenów mikrofibrylarnych klasyfikowane są także kolageny typów XXVIII i XXIX. Zostały one przypisane do tej podrodziny ze względu na podobieństwo strukturalne do kolagenu VI, które przejawia się zawartością domen A o strukturze czynnika von Willebranda (*von Willebrand factor A domain* – VWA). Kolagen XXVIII zlokalizowany jest głównie w komórkach systemu nerwowego. Białko to ma w regionach potrójnej helisy powtarzające się bardzo krótkie przerwy. Zaś typ XXIX występujący w skórze buduje włókna posiadające regiony, które odpowiedzialne są za interakcje białek z różnymi ligandami [6].

Kolageny kotwiczące

Unikalnym rodzajem kolagenu jest typ VII tworzący włókna kotwiczące [2]. Ze wszystkich białek kolagenowych ma on najdłuższą domenę trójhelikalną, osią-

gającą długość 420 nm [12]. Makrocząsteczka ta jest heterotrimerem utworzonym z dwóch łańcuchów α_1 [VII] oraz jednego α_2 [VII] [1]. Na każdy z łańcuchów składa się region trójhelikalny oraz 2 domeny globularne. Domena karboksyloterminalna jest znacznie większa niż występująca w końcu aminoterminalnym. Region występujący w C-końcu tworzy skomplikowaną strukturę trójramienną, zawierającą domeny kuliste oraz 3 pałeczkowate. Białko to jest kluczowym elementem hemidesmosomów, czyli elementów łączących błonę podstawną z blaszką podstawną [2,10].

Kolageny tworzące heksagonalne układy sieciowe

Kolageny VIII i X, zaliczane do podrodziny makrocząsteczek tworzących heksagonalne układy sieciowe zostały nazwane kolagenami krótkołańcuchowymi, ponieważ ich łańcuchy stanowią połowę długości łańcuchów kolagenów włókiennych. Białka te wyróżniają się specyficzną lokalizacją w tkankach, leżąc u podstawy komórek śródbłonka [12]. Kolageny VIII i X charakteryzuje duża homologia strukturalna [9]. Mają one regiony helikalne zawierające wiele przerw w strukturze. Występujące we fragmentach amino- i karboksyloterminalnych regiony niekolagenowe nie ulegają modyfikacjom proteolitycznym, co ułatwia formowanie się sieci heksagonalnych [12]. Kolagen X jest homotrimerem występującym w chrząstkach, natomiast typ VIII obecny jest w skórze, mózgu, sercu czy nerkach w postaci homo- i heterotrimerów [1].

Kolageny typu FACITs

Dużą grupę białek kolagenowych niefibrylarnych zdolnych do wiązania do powierzchni włókien kolagenowych, stanowią kolageny typu FACITs (*Fibril-Associated Collagens with Interrupted Triple helices*) [4,15]. W skład grupy wchodzi kolageny typów: IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI, XXII i XXVI. Współwystępowanie kolagenów FACITs z kolagenami fibrylarnymi ma zasadniczy wpływ na ich interakcje z różnymi białkami macierzy oraz błonowymi komórek [2,6]. Struktura potrójnej helisy kolagenów należących do tej podrodziny nie jest ciągła. Składają się na nią krótkie i długie regiony potrójnej superhelisy, które są połączone fragmentami niehelikalnymi [2]. Charakterystyczny dla tych kolagenów jest brak zdolności samodzielnego montowania włókien (*self-assembly*) [4,12].

Nadal niewiele wiadomo na temat funkcji tych białek, mimo że pierwsze przypisane do tej podrodziny makrocząsteczki odkryto ponad 20 lat temu. Prawdopodobnie cząsteczki te odpowiadają za stabilizację i integrację macierzy zewnątrzkomórkowej [16]. Pierwszym zidentyfikowanym i dokładnie opisanym

białkiem z tej grupy jest kolagen IX kowalencyjnie usieciowany na powierzchni włókien kolagenu II i XI chrząstki [4,12,15].

Cząsteczka kolagenu IX jest heterotrimerem o składzie podjednostkowym α_1 [IX] α_2 [IX] α_3 [IX]. Zbudowana jest z 3 krótkich domen kolagenowych zawierających 4 regiony globularne (niekolagenowe): 2 występujące wewnątrz struktury i po jednym na każdym z końców terminalnych [12].

Kolageny zawierające domeny transbłonowe – MACITs

Do grupy kolagenów transbłonowych należą homotrimery typów: XIII, XVII, XXIII i XXV. Białka wchodzące w skład tej podrodziny charakteryzują się N-końcem zatopionym wewnątrz komórki, przechodzącą przez dwuwarstwę lipidową błony pojedynczą domeną hydrofobową oraz obecnością kilku zewnątrzkomórkowych domen. Ich liczba zależy od rodzaju kolagenu [2,16]. Kolagenowe białka błonowe mogą funkcjonować na powierzchni komórki jako receptory oraz jako rozpuszczalne zewnątrzkomórkowe cząsteczki [16]. W przeciwieństwie do trzech pozostałych białek tej podgrupy kolagen typu XVII jest znacznie większy. Kolageny XIII, XXIII i XXV wykazują duże podobieństwo strukturalne [15].

Kolageny typu MULTIPLEXINs

Kolageny XV i XVIII należące do grupy multiplexinów są homotrimerami charakteryzującymi się wysoką homologią strukturalną w obrębie regionu C-terminalnego, któremu przypisuje się właściwości antygenowe [6,16]. Białka te składają się z kilku domen kolagenowych. Kolagen XV zawiera w swojej cząsteczce 9 domen trójhelikalnych, zaś kolagen XVIII – 10. Makrocząsteczki te zaliczane są do grupy proteoglikanów z powodu ich zdolności do wiązania m.in. glikozaminoglikanów [2,16].

Główną funkcją kolagenu XV jest stabilizacja mięśni szkieletowych i mikronaczyń, natomiast kolagenu typu XVIII – utrzymanie strukturalnej integralności błony podstawnej, rozwój i prawidłowe funkcjonowanie oczu oraz udział w procesie organogenezy [16].

PRZYKŁADY ZASTOSOWANIA KOLAGENÓW W MEDYCYNIE

Poznanie mechanicznych i strukturalnych właściwości naturalnych włókien kolagenowych umożliwiło opracowanie metod otrzymywania syntetycznego i rekombinowanego kolagenu. Produkty powstałe podczas tych zabiegów znajdują zastosowanie w takich dziedzinach nauki, jak nanotechnologia czy biomedycyna [1]. Materiały kolagenowe zaliczane są do najbardziej użytecznych biomateriałów stosowanych w medycy-

nie, ponieważ charakteryzują się minimalną toksycznością, niską antygenowością, wysoką biogodnością oraz zdolnością do biodegradacji. Kolagen w formie atelokolagenu używany jest m.in. do produkcji gąbek stosowanych w leczeniu oparzeń i ran, tabletek i mini-granulek, gdzie pełni funkcje nośnika białek, w tzw. systemach podawania leków (*drug delivery system* – DDS) czy implantów, takich jak substytuty kości, skóry i naczyń krwionośnych [17]. Atelokolagen (pochodna kolagenu typu I pozbawiona telopeptydów) jest jedynym w pełni bezpiecznym biomateriałem wykorzystywanym w kosmetyce i medycynie [18]. Kolagen naturalny jest białkiem łatwo dostępnym, co ułatwia jego zastosowanie jako materiału biomedycznego [1]. Źródłem białek kolagenowych mogą być wszystkie zwierzęta, w tym także organizmy morskie, takie jak gąbki, ryby czy meduzy [19]. Utrata strukturalnej integralności podczas procesu izolacji, heterogeniczność oraz immunogenność białek kolagenowych występujących naturalnie przyczyniły się do opracowania ich form syntetycznych i rekombinowanych [1].

Coraz większe zainteresowanie budzą badania biologicznych i biomedycznych zastosowań syntetycznego kolagenu. Ważnym krokiem w kierunku wykorzystywania syntetycznego kolagenu do celów terapeutycznych było otrzymanie peptydów kolagenopodobnych (*collagen-related peptides* – CRPs), o strukturze potrójnej helisy, mających zdolność przylegania bądź wnikania do wnętrza biologicznego kolagenu. Użytko m.in. peptyd kolagenopodobny (CRP) wiążący się z nanocząsteczkami złota. Nanocząsteczki te miały zdolność uzupełniania luk w strukturze naturalnego kolagenu. Wykazano ponadto, iż pewne CRPs opłaszczane na nanocząsteczkach lateksowych pobudzają agregację płytek krwi, co wspomaga proces gojenia się ran [1].

Należy również podkreślić, że opracowano metody otrzymywania rekombinowanego ludzkiego kolagenu. Produkcja taka odbywa się przy udziale komórek drożdży, które zapewniają wysoką wydajność procesu technologicznego [5]. Zadaniem systemu ekspresyjnego jest uzyskanie tetrameru złożonego z łańcuchów 2 α i 2 β oraz aktywnej hydroksylazy 4-prolinowej, która jest potrzebna do przekształcenia reszt proliny w hydroksyprolinę w pozycji Yaa. Etap ten jest niezbędny, aby kolagen był stabilny w temperaturze ciała. Otrzymywane tą metodą makrocząsteczki są w pełni hydroksylowane, tak jak naturalny kolagen. Rozwój technologii wykorzystujących systemy mikroorganizmów do uzyskiwania rekombinowanych kolagenów umożliwia otrzymywanie powtarzalnych i bezpiecznych produktów charakteryzujących się wysoką czystością mikrobiologiczną. Ze względu na bezpieczeństwo stosowania produkty te są powszechnie akceptowane. Nowoczesne technologie

pozwalają na wyprodukowanie wszystkich 29 typów białek kolagenowych [5].

Szczegółowe poznanie struktury, funkcji i właściwości kolagenu macierzy zewnątrzkomórkowej naturalnych tkanek pozwala na produkcję nowych, innowacyjnych materiałów [5]. Biomateriały kolagenowe mają ogromny wpływ na rozwój medycyny regeneracyjnej oraz inżynierii tkankowej. W ciągu ostatnich 10 lat opracowano różnorodne produkty oparte na zastosowaniu kolagenów [19]. Naturalny atelokolagen, ze względu na całkowite bezpieczeństwo stosowania, jest najczęściej wykorzystywaną formą tego białka podczas produkcji biomateriałów kolagenowych [18].

Schorzenia skóry

Kolageny charakteryzujące się biologiczną funkcjonalnością mogą być stosowane w regeneracji skóry [20]. Żywa allogeniczna zrekonstruowana skóra wykonana jest z hydrożelu kolagenowego typu I, zawierającego warstwę fibroblastów [19]. Substytuty skórno-naskórkowe dojrzewające na skórze z powodzeniem odtwarzają pełnej grubości ubytki skóry w modelu zwierzęcym. Wykazano, że skompresowane żele kolagenowe są dobrymi matrycami umożliwiającymi skuteczną rekonstrukcję skóry *in vitro* i *in vivo*. Co istotne, nie zaobserwowano negatywnych biologicznych skutków opakowania. Trwałość mechaniczna skompresowanych żeli kolagenowych jest znacznie wyższa niż nieskompresowanych, natomiast ich właściwości biologiczne pozostają niezmiennione [20]. Kolagenowe preparaty żelowe w połączeniu z liposomami służą do przedłużonego podawania leków w poddawanych regeneracji tkankach. Biofilmy kolagenowe zawierające na powierzchni liposomy związane z substancją antybakteryjną – kwasem usninowym – znacznie wspomagają proces gojenia oparzeń skóry [21]. W przypadkach ciężkich ran (np. odleżyny, owrzodzenia) i oparzeń korzystne efekty przynosi zastosowanie gąbek kolagenowych w postaci opatrunków [17].

Regeneracja tkanek i kości

W chirurgii stomatologicznej i implantologii obecnie wykorzystywane są już błony zaporowe w celu regeneracji tkanek i kości. Błony te stosowane są m.in. do leczenia kieszonek kostnych, przedimplantacyjnej regeneracji kości, zamykania połączeń ustno-zatokowych po usunięciu zęba [22]. Podstawową zaletą błon kolagenowych, którymi pokrywane są wszczepy, jest uleganie bioresorpcji enzymatycznej pod wpływem kolagenaz i proteaz. Kolageny wykorzystywane do produkcji błon są to białka ksenogeniczne pochodzenia wołowego lub wieprzowego [22,23].

Zabieg polegający na pokryciu recesji korzeniowych naturalną matrycą kolagenową, przeprowadzony przed wszczepieniem implantów w postaci koron licowanych porcelaną, przyczynia się do znacznej poprawy stanu dziąseł (m.in. ustąpienia nadwrażliwości zębów) po 8 miesiącach od jej wprowadzenia [24].

W leczeniu wad tkanki kostno-chrzęstnej opracowane zostały specjalne systemy jej odbudowy. Rusztowania tkanki kostnej opierają się na utwardzeniu biomateriału kolagenowego przez mineralizację przy użyciu fosforanu wapnia i/lub sieciowaniu takimi substancjami jak hydroksyapatyt. Do regeneracji chrząstki stosowane są materiały zbudowane z kolagenu typu II, w przeciwieństwie do większości innych biomateriałów produkowanych z kolagenu typu I [19].

Prowadzone są też badania nad zastosowaniem implantów atelokolagenowych w chirurgii ortopedycznej [19,25]. Poważne nadzieje na przyszłość budzi śródstawowe zastosowanie atelokolagenu pochodzenia zwierzęcego w chirurgii ortopedycznej stawu kolannowego. Wykazano korzystne efekty wprowadzenia do stawu kolannowego świni implantu atelokolagenowego w postaci gąbki czy płytek żelowych w celu przyspieszenia regeneracji więzadła krzyżowego przedniego (*Anterior Cruciate Ligament – ACL*) [25].

Systemy dostarczania leków

Biorąc pod uwagę immunogenność oraz możliwość wprowadzenia do organizmu czynników chorobotwórczych (priony, wirusy) trzeba zauważyć, że białka kolagenowe nie są w pełni bezpieczne. Na podstawie wielu badań określono, iż za immunogenność cząsteczek kolagenu odpowiadają przede wszystkim telopeptydy. Trawiąc pepsyną makrocząsteczki ksenogenicznego kolagenu typu I otrzymujemy pochodną pozbawioną telopeptydów (atelokolagen), która ma unikalne właściwości, w tym przede wszystkim niską immunogenność, całkowitą biodegradowalność oraz silny ładunek dodatni umożliwiający przenoszenie ujemnie naładowanych cząsteczek biofarmaceutyków (kwasów nukleinowych i białek) [18].

Początkowo atelokolagen jako biomateriał stosowany był w inżynierii tkankowej. Ludzkie chondrocyty hodowane na podłożu z żelu atelokolagenowego wykorzystano w badaniach nad regeneracją chrząstek stawowych. Obecnie atelokolagen wykorzystywany jest przede wszystkim w systemach dostarczania leków (DDS) jako nośnik białek i kwasów nukleinowych w leczeniu chorób dziedzicznych (tj. rodzinna polineuropatia amyloidowa – *familial amyloid polyneuropathy – FAP*; badania przeprowadzone na modelu mysim) i nowotworów. Atelokolagen stosowany jest jako nośnik interferonu, leku wykorzystywanego w terapii chorób wirusowych, interleukiny 2 (IL-2), znajdującej zastosowanie w leczeniu niedoborów odporności oraz czynnika wzrostu nerwów (*neural*

growth factor – NGF) i czynnika wzrostu fibroblastów (*basic fibroblast growth factor – bFGF*), stosowanych w leczeniu odpowiednio chorób ośrodkowego układu nerwowego i złamań [18].

Schorzenia układu krwionośnego

Sercowo-naczyniowa chirurgia rekonstrukcyjna wykorzystuje techniki inżynierii tkankowej w leczeniu chorób serca. Przydatność kliniczna ksenogenicznych zastawek serca pozostaje nadal kwestią sporną ze względu na wysoki potencjał immunogenności oraz skłonność do występowania ich zwapnień [19].

Rozwój medycyny spersonalizowanej umożliwił rekonstrukcję żywej tkanki naczyń krwionośnych przy użyciu komórek własnych pacjenta [19].

Najnowsze doniesienia opisują możliwość wykorzystywania kolagenu jako materiału zatorowego w celu zamykania naczyń krwionośnych. Wykorzystywany jest on m.in. w zamykaniu punkcji tętniczych, leczeniu tętniaka rzekomego oraz perforacji tętnic wieńcowych. Atelokolagen wykazuje potencjał dobrego środka zatorowego, ponieważ charakteryzuje się niską antygenowością, możliwością tworzenia zatorów różnej wielkości oraz brakiem wywoływania odpowiedzi zapalnej po wprowadzeniu do organizmu pacjenta [26].

Schorzenia oczu

Zastosowanie połączenia komórek macierzystych i biomateriału kolagenowego może być pomocne w leczeniu uszkodzeń rogówki [19]. Osłony kolagenowe mające zdolność absorbowania oraz powolnego uwalniania różnych leków są powszechnie stosowane po chirurgicznym usunięciu nablónka przedniego rogówki. Przyczyniają się one do wspomagania odtworzenia nablónka rogówkowego i zapewniają profilaktykę antybiotykową, aczkolwiek ich stosowanie nie jest akceptowane przez wszystkich chirurgów ze względu na niecałkowitą przejrzystość optyczną osłony i uleganie szybkiej degradacji (ok. 1–3 dni) [27].

Osłony kolagenowe używane w podawaniu leków na powierzchni oka, pomimo wątpliwości związanych z ich ksenogenicznym pochodzeniem, są dostępne i z powodzeniem używane w leczeniu schorzeń oczu [28].

Schorzenia układu moczowo-płciowego

Biomateriały kolagenowe wykorzystywane są także w leczeniu chorób układu moczowo-płciowego. Rusztowania kolagenowe mogłyby zastąpić stosowane obecnie naturalne tkanki pochodzące z jelit bądź żołądka podczas chirurgicznej plastyki pęcherza. Materiały kolagenowe wykorzystywane są coraz częściej

podczas zwężania cewki moczowej czy leczenia nietrzymania moczu. Przypuszcza się, iż rusztowania wykonane ze złoża kolagenowego wypełnione nabłonkiem z własnego pęcherza moczowego i komórkami mięśni lub arkuszami samoorganizujących się fibroblastów mogą stać się głównym sposobem leczenia schorzeń układu moczowo-płciowego [19].

Schorzenia aparatu mowy

Blizny fałdu głosowego, powstające m.in. w wyniku uszkodzeń śluzówki, przebytych zakażeń, urazów fizyczny czy resekcji chirurgicznej, mogą być powodem pojawienia się dysfonii. Najnowszym osiągnięciem inżynierii tkankowej oraz medycyny regeneracyjnej jest skuteczna regeneracja tkanek fałdów głosowych poprzez wszczepianie ksenogenicznych arkuszy (*sheet*) atelokolagenowych. Dotychczas zabiegi takie wykonano jedynie na modelach zwierzęcych, konieczne jest przeprowadzenie badań klinicznych, których wyniki potwierdzą skuteczność oraz bezpieczeństwo stosowania atelokolagenu w regeneracji fałdu głosowego u ludzi [29].

Schorzenia układu nerwowego

Medycyna regeneracyjna od pewnego czasu zajmuje się badaniami nad regeneracją nerwów obwodowych z wykorzystaniem materiałów kolagenowych. Przeprowadzone dotychczas testy dają pozytywne wyniki i nadzieję na stosowanie tego biomateriału w przyszłości. Opracowane do tej pory trójwymiarowe modele systemu nerwowego wzmagają migrację aksonową i mielinizację neuronów czuciowych oraz ruchowych za pośrednictwem komórek Schwanna [19].

Medycyna estetyczna

W przemyśle kosmetycznym preparaty kolagenowe używane są w formie nutriceutyków (suplementy diety) oraz preparatów do stosowania na skórę (maski, żele bądź kremy). W medycynie estetycznej powszechne jest wykorzystywanie kolagenu jako wypełniacza tkanek. Iniekcja preparatów kolagenowych przeprowadzana jest w celu wyrównania ubytków w tkankach miękkich (zmarszczek), poprawienia wyglądu skóry (redukcja blizn) oraz modelowania kształtu ust i twarzy. W obrębie grupy wypełniaczy naturalnych wyróżniamy następujące trzy podgrupy wypełniaczy kolagenowych: autogeniczne (pozyskiwane z tkanki własnej), ksenogeniczne (uzyskane z tkanki zwierzęcej) oraz allogeniczne (z tkanki ludzkiej zmarłych dawców).

Przyjmowanie suplementów diety zawierających w swym składzie kolagen bądź jego hydrolizaty coraz częściej zalecane jest podczas leczenia schorzeń tkanki chrzęstnej czy w celu poprawienia wyglądu i kondycji skóry [30].

PODSUMOWANIE

Białka kolagenowe są przedmiotem badań naukowych od wielu lat i nic nie wskazuje na to, aby ich zaprzestano, z każdym bowiem eksperymentem odkrywane są nowe oblicza tych białek. Rewolucyjne działanie kolagenu opiera się na jego unikatowych właściwościach, a zdolność do regeneracji organizmu daje ogromne możliwości jego stosowania. Głównie wykorzystywany jest w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym oraz w różnych dziedzinach medycyny (m.in. chirurgii plastycznej, stomatologii, ortopedii, kosmologii).

Pomimo usilnych starań struktura oraz właściwości kolagenów nie zostały do końca poznane. Ponad 40 lat temu poznano jeden rodzaj kolagenu, obecnie dzięki rozwojowi biologii molekularnej oraz nowoczesnych technik laboratoryjnych poznanych jest aż 29 różnych typów białek kolagenowych. Trudno określić, czy są to już wszystkie typy kolagenów występujące w organizmach zwierząt.

Organizm człowieka po 25 roku życia nie jest w stanie zapewnić równowagi między procesem biosyntezy i degradacji kolagenu w tkankach i narządach. Gdy procesy rozkładu makrocząsteczek przeważają nad biosyntezą, powinno się rozpocząć dostarczanie organizmowi tych białek. Ubytek kolagenu ma znaczący wpływ na wygląd skóry i paznokci, funkcjonowanie naczyń krwionośnych i limfatycznych, może być przyczyną poważnych zwyrodnień stawów i kości, związany jest z przedwczesnym starzeniem tkanek miękkich oraz występowaniem wielu innych chorób. Przypuszcza się, iż doustne przyjmowanie hydrolizatów kolagenu jako suplementu diety wpływa na syntezę makrocząsteczek macierzy zewnątrzkomórkowej, w tym białek kolagenowych. Naukowo udowodniono właściwości prozdrowotne oraz aktywność biologiczną hydrolizatów kolagenu przede wszystkim w leczeniu chorób stawów i kości oraz wpływ na poprawę wyglądu i kondycji skóry, paznokci i włosów [31].

Dzięki rozwojowi nauki w najbliższej przyszłości powinniśmy poznać szczegółowe zależności między właściwościami a budową kolagenów. Wiedza ta jest potrzebna do rozwoju inżynierii tkankowej czy medycyny regeneracyjnej, aby można było w pełni wykorzystywać potencjał tych białek w nanotechnologii i medycynie.

PIŚMIENNICTWO

1. Shoulders M.D., Raines R.T. Collagen Structure and Stability. *Annu. Rev. Biochem.* 2009; 78: 929–958.
2. Kuzan A., Chwilikowska A. Różnorodność i funkcje kolagenu w tętnicach. *Pol. Merkuriusz Lek.* 2011; 182: 111–113.
3. Exposito J.Y., Valcourt U., Lethias C.C.C. The Fibrillar Collagen Family. *Int. J. Mol. Sci.* 2010; 11: 407–426.
4. Ricard-Blum S. The Collagen Family. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2010; doi:10.1101/cshperspect.a004978: 1–19.
5. Ramshaw J.A.M., Peng Y.Y., Glattauer V., Werkmeister J.A. Collagens as biomaterials. *J. Mater. Sci: Mater. Med.* 2009; 20: S3–S8.
6. Banaś M., Pietrucha K. Typy i struktura białka kolagenowego. *Zesz. Nauk. PL. Chem. Spoż. Biotechnol.* 2009; 73: 93–103.
7. Salsas-Escat R., Stultz C.M. The Molecular Mechanics of Collagen Degradation: Implications for Human Disease. *Exp. Mech.* 2009; 49: 65–77.
8. Grant C.A., Brockwell D.J., Radford S.E., Thomson N.H. Tuning the Elastic Modulus of Hydrated Collagen Fibrils. *Biophys. J.* 2009; 97: 2985–2992.
9. Gelse K., Pöschl E., Aigner T. Collagens-structure, function, and biosynthesis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2003; 55: 1531–1546.
10. Kłyszajko-Stefanowicz L. *Cytobiochemia. Biochemia niektórych struktur komórkowych. Macierz zewnątrzkomórkowa.* Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2002, s. 169–218.
11. Hames D., Hooper N. *Biochemia. Struktura białka.* Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2010, s. 43–54.
12. Hulmes D.J.S. *Collagen Diversity, Synthesis and Assembly.* W: *Collagen Structure and Mechanics.* Red. P. Fratzl. Springer, New York 2008, p. 15–49.
13. Plumb D.A., Dhir V., Mironov A. et al. Collagen XXVII is developmentally regulated and forms thin fibrillar structures distinct from those of classical vertebrate fibrillar collagens. *J. Biol. Chem.* 2007; 282: 12791–12795.
14. Brinckmann J. Collagens at a Glance. *Top. Curr. Chem.* 2005; 247: 1–6.
15. Gordon M.K., Hahn R.A. Collagens. *Cell Tissue Res.* 2010; 339: 247–257.
16. Richard-Blum S., Ruggiero F. The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane. *Pathol. Biol.* 2005; 53: 430–442.
17. Lee C.H., Singla A., Lee Y. Biomedical applications of collagen. *Int. J. Pharm.* 2001; 221: 1–22.
18. Wysocki T., Sacewicz I., Wiktorska M., Niewiarowska J. Atelokolagen jako potencjalny nośnik terapeutyków. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 2007; 61: 646–654.
19. Parenteau-Bareil R., Gauvin R., Berthod F. Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. *Materials* 2010; 3: 1863–1887.
20. Braziulis E., Diezi M., Biedermann T. et al. Modified Plastic Compression of Collagen Hydrogels Provides an Ideal Matrix for Clinically Applicable Skin Substitutes. *Tissue Eng. Part C, Methods* 2012; 18: 464–474.
21. Nunes P.S., Albuquerque-Júnior R.L.C., Cavalcante D.R.R. et al. Collagen-Based Films Containing Liposome-Loaded Usnic Acid as Dressing for Dermal Burn Healing. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011; 2011: 1–9.
22. Szyszkowska A., Krawczyk K. Błony zaporowe stosowane w implantologii i stomatologicznych zabiegach regeneracyjnych – praca przeglądowa. *Implantoprotetyka* 2009; 1: 8–10.
23. Gernhardt C.R., Bekes K. Kolagenowe i syntetyczne błony zaporowe w sterowanej regeneracji tkanek lub kości. *Implants* 2006; 2: 32–37.
24. Chmielewski K. Zastosowanie matrycy kolagenowej mucoderm – opis przypadku. *Implants* 2012; 1: 10–13.
25. Magarian E.M., Vavken P., Connolly S.A., Mastrangelo A.N., Murray M.M. Safety of Intra-Articular Use of Atelocollagen for Enhanced Tissue Repair. *Open Orthop. J.* 2012; 6: 231–238.
26. Yasutaka B., Sadao H., Shunichiro I., Michiyo H., Masayuki N. Experimental renal and hepatic artery embolization with a new embolic agent, atelocollagen, in a porcine model. *Diagn. Interv. Radiol.* 2013; 19: 141–144.
27. Ciolino J.B., Hoare T.R., Iwata N.G. et al. A Drug-Eluting Contact Lens. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2009; 50(7): 3346–3352.
28. Tint N.L., Rose F.R. Use of Thermoreversible Hydrogels in Corneal Wound Repair. *European Ophthalmic Rev.* 2009; 3(1): 61–63.
29. Kishimoto Y., Welham N.V., Hirano S. Implantation of atelocollagen sheet for vocal fold scar. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2010; 18: 507–511.
30. Żelaszczyk D., Waszkielewicz A., Marona H. Kolagen – struktura oraz zastosowanie w kosmetologii i medycynie estetycznej. *Estetol. Med. Kosmetol.* 2012; 2: 14–20.
31. Dybka K., Walczak P. Collagen hydrolysates as a new diet supplement. *Scientific Bulletin of the Technical University of Lodz: Food Chemistry and Biotechnology* 2009; 73: 83–92.