

بعض التغيرات الحاصلة ببروتين الكولاجين عند التقدم بالعمر

سراب داؤد الشماع¹، غزوة خليل الطائي²

^{1,2} قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة الموصل، الموصل، العراق

الملخص

شملت الدراسة الحالية بيان تأثير تقدم العمر على بعض الصفات الكيموحيوية للكولاجين الذي تم عزله من مستخلص رئات الارانب، حيث تم استخدام واحد وعشرون ارنباً نوع Albino تراوحت اعمارهم بين شهر واحد- ثلاث سنوات ونصف، صنفت الى سبع مجاميع بمعدل ثلاث ارناب لكل مجموعة. اظهرت النتائج تغيرات كيموحيوية في محتوى الكولاجين التي ازدادت في مستخلصات رئات الارانب حيث تراوحت بين 0.012- 0.079غم بينما اظهرت نسبة وزن الكولاجين الجاف الكلي / وزن الرئة الجاف زيادة في مجموعة الارانب بعمر سنة ونصف حيث كانت 0.094 مقارنة بها في مجموعة الارانب بعمر شهر واحد 0.062 ثم عادت الى الانخفاض في مجموعة الارانب بعمر ثلاث سنوات ونصف 0.062 مقارنة بمجموعة الارانب بعمر سنة ونصف كما بينت الدراسة ايضاً وجود تغيرات تركيبية للكولاجين الذي تم تنقيته من المستخلصات الرئوية بتقدم العمر، فقد ازدادت نسبة الكربوهيدرات المرتبطة مع الكولاجين وقلت شدة الامتصاصية الفلوريسية والتي تم قياسها باستخدام تقانة قياس الشدة الفلوريسية Fluorescence Spectrometry Technique بتقدم العمر في حين لم نلاحظ اختلافاً واضحاً في المجاميع الفعالة باستخدام تقانة IR Infra-red spectrophotometry بتقدم العمر ولكن هذه التقنية اوضحت بان الكولاجين المستخلص من انسجة رئات الارانب ذا بصمة اصبع مماثلة لبصمة الكولاجين نوع 1 كما اعطتنا فكرة عن مدى نقاوة الكولاجين المستخلص من انسجة رئات الارانب.

المقدمة

الكولاجين مجموعة من البروتينات المتواجدة طبيعياً في الانسجة الرابطة لجسم الانساعات والحيوان. حيث تتواجد في الجلد، العظام، الاوعية الدموية، المعى، قرنية العين، الاربطة والغضاريف، وتؤلف حوالي 25-30% من البروتينات الكلية المتواجدة في الجسم والخلايا المولدة للاليف (الارومة الليفية) هي المسؤولة عن بناء الكولاجين (1)، يتوزع الكولاجين في مناطق عديدة من جسم الانسان والحيوان وحوالي 90% منه يكون من نوع Collagen I حيث ان هناك حوالي 28 نوعاً مختلفاً من الكولاجين تم تشخيصها، ومن اكثر انواع الكولاجين تواجداً Collagen V, Collagen IV, Collagen I, Collagen II, Collagen III، تتجمع ليفيات الكولاجين وتتظم في ارتباطات وتراكيز مختلفة في الأنسجة المختلفة لتجهيز صفات نسيجية مختلفة (2) وجميع أنواع الكولاجين تتكون من وحدات اولية لثلاثة سلاسل ببتيدية حلزونية سلسلتان متماثلتان نوع α -1 اما السلسلة الببتيدية الثالثة فتختلف قليلاً عن السلسلتين السابقتين α -2 وكل سلسلة من هذه السلاسل تحتوي على 1000 حامض اميني، ان الاحماض الامينية الاساسية المكونة لبروتين الكولاجين تكون فريدة من نوعها وتسلسلها فهي اما تكون Glycine-X-hydroxyproline او تكون Glycine-proline-x حيث ان x هي أي حامض اميني غير الكلايسين او البرولين او الهيدروكسي برولين . ويعد الكولاجين المكون الرئيس للحشوة خارج الخلوية للرئة وان ترسبه وعدم انتظامه له علاقة بالتهاب النسيج الخلالي للرئة وامراض السبيل التنفسي (3). اوضح (4) بان التقدم بعمر الرئات يتميز بتحويلات شكلية وتركيبية تتضمن زيادة التليف المؤدي الى تغير وظيفة الرئة وزيادة الكولاجين المحيط بالقصيبات الهوائية في الجرذان المسنة مقارنة بالجرذان الصغيرة العمر في دارستهم على الجرذان الذين تراوحت اعمارهم من 6-19 شهر.

الهدف من البحث

بسبب قلة البحوث حول التغيرات الكيموحيوية الحاصلة ببروتين الكولاجين بتقدم العمر ارتأينا إجراء الدراسة الحالية والتي كان من أهم أهدافها بيان تأثير تقدم العمر على بروتين الكولاجين المكون الاساسي للحشوة خارج الخلوية لنسيج الرئة كمياً وتركيبياً.

المواد وطرائق العمل

الحيوانات قيد الدراسة

استخدم 21 كراً من الارانب البيض نوع Albino ذات صحة جيدة وخالية من الامراض تراوحت اعمارها بين 1- 42 شهر (1,6,12,18,24,36,42) وتراوحت أوزانها بين 0.450 - 2.250 كغم، صنفت هذه الارانب الى 7 أعمار اساسية 1,6,12,18,24,36,42 (أشهر) وبمعدل 3 مكررات لكل عمر. اجريت هذه الدراسة في قسم علوم الحياة/جامعة الموصل للفترة بين 1-10-2010 و 1-10-2011

تحضير المستخلص الرئوي

قطعت عينات الرئة اليمنى (R) واليسرى (L) ولجميع الاعمار الى قطع صغيرة وأجري لها عملية سحن ومجانسة مع محلول الفوسفات المنظم Phosphate Buffer Saline (PBS) و pH 7.4 باستخدام جهاز السحن والمجانسة الكهربائية لمدة 1/2 دقيقة عند سرعة 400 دورة/دقيقة للنسيج، وكانت انبوبة الجهاز مغمورة في الثلج المبروش اثناء عملية المجانسة ثم اجري بعدها تحطيم للجدر الخلوية باستخدام جهاز الترددات فوق الصوتية وعلى ثلاث مراحل لمدة 10 ثانية، ثم أُجري بعدها طرد مركزي بسرعة 3000 دورة /الدقيقة ولمدة 15 دقيقة للعينات الحاوية على المستخلص الرئوي لفصل الراشح عن الراسب.

استخلاص الدهون من الراسب الرئوي

تم استخلاص الدهون من الراسب الرئوي ولجميع الاعمار حسب طريقة (5) باستخدام المذيبات العضوية الآتية : الميثانول : الكلوروفورم (1 حجم / 2 حجم ، ثم تمت متابعة الاستخلاص باستخدام الايثانول 100% (مرتق) و الايثر : الايثانول (حجم / حجم) (مرتق)، واستخدام الايثر 100% (مرتق) .
غُسل الراسب بعدها بالمحلول الملحي الفسلجي وأُحتفظ به لحين استخدامه في استخلاص الكولاجين.

بعد استخلاص الدهون من نسيج الرئة لكل عمر تجفد بقايا النسيج عند درجة حرارة الغرفة لمدة 24 ساعة بعدها نحصل على نسيج جاف خالٍ من الدهون (Dry Fat-Free D.F.F.wt) ، يُخزن لحين استكمال عملية استخلاص الكولاجين.

استخلاص الكولاجين

تم استخلاص بروتين الكولاجين من مسحوق نسيج الرئة الجاف الخالي من الدهون، وحسب طريقة (6) وكالاتي:

- أخذ مسحوق الرئة الجاف الخالي من الدهون لكل عمر وذُوب في 0.15 M NaCl بمعدل 1سم³ / 50 ملغم وضع المعلق جانباً لمدة 24 ساعة عند درجة حرارة 4° .
- البروتينات المذابة فصلت بجهاز الطرد المركزي المبرد بسرعة 12 دورة/دقيقة ولمدة 12 ساعة عند درجة حرارة 4° ، و أُعيد استخلاص الراسب طول الليل بنفس الحجم السابق من 0.15 M NaCl ثم اجري طرد مركزي مبرد، الراشح يهمل لأنه يمثل البروتينات المذابة أما الرواسب المستخلصة أُضيف لها الماء المقطر و وُضعت في جهاز المعقار عند ضغط 80 IPS ودرجة حرارة 120° ولمدة 6 ساعات ، تَركت بعدها لتبرد الى درجة حرارة الغرفة بعدها أُستخدم جهاز الطرد المركزي المبرد لعزل الراشح الذي يمثل الكولاجين.

- تم بعدها اجراء عملية الفرز الغشائي Dialysis للراشح الكولاجيني (7) تجرى هذه العملية من اجل التخلص من الايونات، تمت عملية الفرز الغشائي بوضع المحلول البروتيني (الراشح) الذي تم الحصول عليه من الفقرة السابقة في اكياس السيلوفان المحكمة الربط من الاسفل والاعلى ثم غطست هذه الاكياس في وعاء حجمي يحتوي على الماء المقطر مع التحريك المستمر بالمحرك الكهربائي وبدرجة 4° واستمرت العملية لمدة 24 ساعة مع مراعاة تبديل الماء كل ست ساعات للتخلص من ايونات كلوريد الصوديوم، ثم جفد الراشح البروتيني بجاز التجفيد ووزن البروتين الناتج والذي يمثل بروتين الكولاجين ولجميع الفئات العمرية.

التحول الى الجيلاتين

وضعت عينات الكولاجين المجففة ويحدود 10 ملغم ولجميع الاعمار في حمام مائي مغلي بدرجة حرارة 93° ولمدة 16 ساعة حسب طريقة (8)، مع ملاحظة اختلاف لون الجيلاتين الناتج بتقدم العمر.

قياس الشدة الفلورنسية للكولاجين

قيست الشدة الفلورنسية للجيلاتين بالاعتماد على طريقة (8) حيث ذُوب الجيلاتين المستحصل سابقاً في 1سم³ من الماء المقطر وترك لمدة 20 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة ثم وضع في حمام مائي بدرجة حرارة 40° لمدة 30 دقيقة للحصول على محلول كامل الذوبان من الجيلاتين ولجميع الاعمار ، ثم تم ترشيح العينات بورق الترشيح لفصل المحلول الجيلاتيني عن البقايا الصلبة بعدها تم حساب الاطياف الفلورنسية للكولاجين بعد تحوله الى الجيلاتين عند الطوال الموجية 330 - 450 نانوميتر والتي تمثل الطوال الموجية الخاصة بالاثارة والانبعاث على التوالي ، و استخدم الماء المقطر كمحلول كئى (Blank) .
أُجري كشف مولش على جميع العينات المستخلصة لجميع الاعمار حسب طريقة (9).

قياس الامتصاصية المطيافية ماتحت الحمراء للكولاجين

تقع منطقة ماتحت الحمراء (Infrared region, IR) بين الجزء المرئي والجزء المايكروني للطيف الكهرومغناطيسي ولسعة هذه المنطقة تصنف اشعاعاتها الى منطقة ماتحت الحمراء القريبة والوسطية والبعيدة ، وتعتمد معظم التطبيقات التحليلية العملية على المنطقة الوسطية والمحصورة تردداتها بين 400-4000 cm⁻¹ ، حيث يستخدم التحليل لطيفي في منطقة ماتحت الحمراء لاغراض التحليل النوعي والتحليل الكمي ، ففي التحليل النوعي يمثل طيف امتصاص ماتحت الحمراء لمركب عضوي احد الخواص الفيزيائية المميزة لاحتوائه على قمم متعددة يمكن استخدامها لأغراض المقارنة ومن ثم الافصاح عن البنية الجزيئية للمركب ، تم تهيئة العينات الصلبة على شكل اقراص KBr بروميد البوتاسيوم.

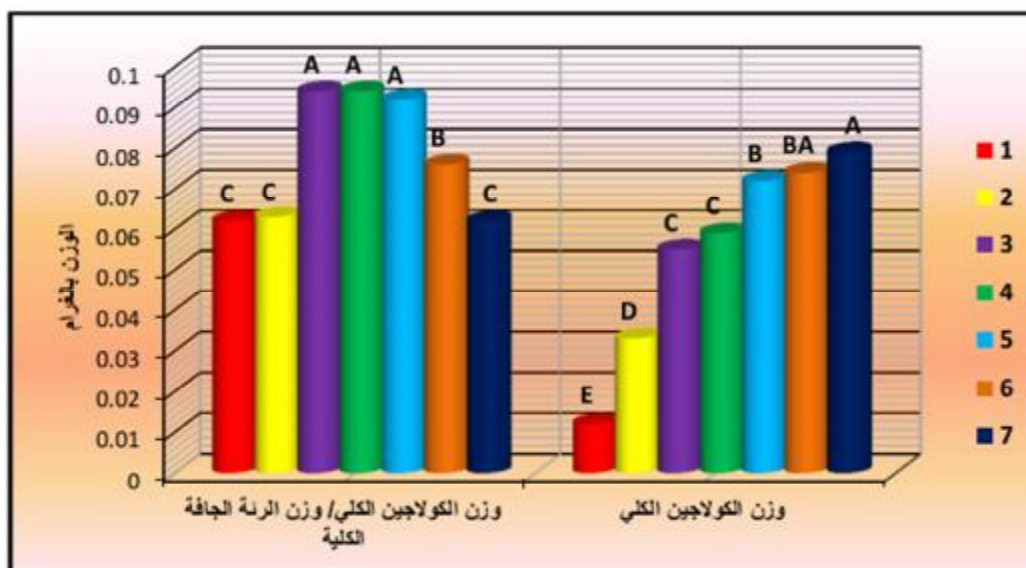
وقد تم استخدام جهاز الـ Infra-red-Spectrophotometry الموجود في قسم الكيمياء /كلية التربية /جامعة الموصل.

النتائج والمناقشة

تأثير تقدم العمر على كميات الكولاجين في رئات الارانب:

بينت نتائج هذه الدراسة زيادة الوزن الكلي للكولاجين زيادة طردية بتقدم العمر حيث بلغت هذه الأوزان (0.079غم) في رئات الأرانب بعمر 3.5 سنة مقارنة بكميتها في رئات الأرانب في عمر شهر (0.012غم)، وأظهر التحليل الإحصائي فرقاً معنوياً بكمية الكولاجين بين هذين العمرين، وان نسبة وزن الكولاجين

الكلي غم/ وزن الرئة الجاف الكلي فقد ازدادت ايضاً في رئات الأرانب من عمر شهر الى سنة ونصف حيث بلغت (0.094 غم) انخفضت بعدها لتصل الى (0.062غم) في رئات الارانب بعمر ثلاث سنوات ونصف، كما هو موضح في الشكل (1)، وأظهرت نتائجنا اتفاقاً مع النتائج التي حصل عليها كل من (10) في دراسة قاموا بها على 20بهر لأشخاص تتراوح أعمارهم بين 14-90 سنة، حيث وجدوا ان تركيز كل من الكولاجين يزداد بصورة ملحوظة بتقدم العمر وأن هذه الزيادة تحدث بعد عمر 45سنة وبين الباحثون (12; 11) بأن التغيرات في نسيج الرئة والمرافقة لتقدم العمر تشمل انخفاضاً تدريجياً للكولاجين



• القيم معبر عنها بالمتوسط الحسابي $\pm$ الانحراف القياسي هو 3 مكررات.

• الاشكال المتبوعة بأحرف مختلفة تدل على وجود فرق معنوي عند مستوى احتمال ($P \leq 0.05$) والعكس صحيح حسب اختبار دنكن.

الشكل (1): تأثير تقدم العمر على وزن الكولاجين الكلي ونسبة وزن الكولاجين الكلي/وزن الرئة الجاف الكلي لرئات الارانب بأعمار مختلفة تتراوح بين (1-شهر، 2-6 شهر، 3-18 شهر، 4-24 شهر، 5-30 شهر، 6-36 شهر، 7-ثلاث سنوات ونصف)

ومطيافية فلوريسية عند الأطوال 385/335nm والتي تعزى إلى حصول تقاطعات من نوع آخر Pentosidin أكثر ثباتاً في الأعمار الكبيرة .

قياس شدة المطيافية الفلوريسية للكولاجين

تم قياس شدة المطيافية الفلوريسية للجيلاتين المستخلص من أنسجة رئات الأرانب بالأعمار (شهر - سنة ونصف - ثلاث سنوات ونصف) والتي تم الحصول عليها عند الأطوال الموجية 350nm للإثارة و 432nm للانبعاث ووجد أنها تقل بتقدم العمر الشكل (3)، وهذا يتفق مع نتائج العديد من الباحثين الذين أكدوا الخاصية الفلوريسية للكولاجين (13:14;15).

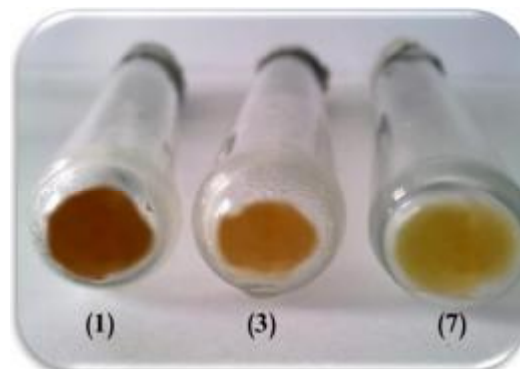
حيث أوضح (14) بأن قياس شدة المطيافية الفلوريسية للكولاجين والترتوفان تعد مؤشرات طبيعية حول الحالة الصحية أو المرضية لأنسجة الجلد كما أنها تعد طريقة سهلة لتمييز أنسجة الجلد المتقدمة بالعمر مقارنة بالأنسجة الفتية .

ومن مقارنة ما توصلنا إليه من نتائج مع نتائج الباحثين السابقين الذين حصلوا على أعلى شدة للمطيافية الفلوريسية للكولاجين المستخلص من أنسجة الجلد بعد معاملته بأنزيم Collagenase عند الطول الموجي 440nm الخاص بالانبعاث وجد انه مقارب لشدة المطيافية الفلوريسية للكولاجين المعامل حرارياً الذي تم عزله من أنسجة الرئة والتي تم الحصول عليها عند الطول الموجي 432nm الخاص بالانبعاث .

إن انخفاض شدة المطيافية الفلوريسية للجيلاتين بتقدم العمر قد يعود إلى حصول تقاطعات غير فلوريسية أو تأصرت مختلفة للكولاجين في أنسجة الرئة بتقدم العمر أو قد يعود إلى صعوبة استخلاص الكولاجين من الأنسجة المتقدمة بالعمر مقارنة بالأنسجة الصغيرة، فضلاً عن أن عملية استخلاص وتنقية الكولاجين من أنسجة رئات الأرانب وباستخدام

التحول للجيلاتين وتأثير تقدم العمر على لونه

الشكل (2) يوضح تباين لون الجيلاتين (النتائج النهائي للكولاجين المعامل حرارياً والمستخلص من أنسجة رئات الأرانب بأعمار مختلفة) الذي أصبح أقل شدةً وأفتح في الأعمار الكبيرة مقارنة بلونه في الأعمار الصغيرة.



الشكل (2): تباين لون الجيلاتين المستخلص من رئات الارانب في الاعمار المختلفة

(1) عمر شهر واحد؛ (3) عمر سنة ونصف؛ (7) عمر ثلاث سنوات ونصف بعد تحول الكولاجين الى الجيلاتين مؤشراً لنفاوة الكولاجين المستخلص لأنه يمثل الناتج النهائي لمعاملة الكولاجين حرارياً وهذا ما أكدته (8) في دراستهما حول استخلاص الكولاجين من أنسجة الجلد المسموط لأبقار وعجول بأعمار مختلفة تراوحت بين 10 و 156 شهر ، حيث أوضحا أن عملية استخلاص الكولاجين تقل عند تقدم الحيوان بالعمر وان معاملة الكولاجين حرارياً يؤدي إلى إنتاج الجيلاتين والذي يظهر مطيافية فلوريسية عند الأطوال الموجية 395nm/295nm للإثارة والانبعاث على التوالي والتي تعزى إلى حصول تقاطعات Pyridinoline بين سلاسل الكولاجين في الأعمار الصغيرة ،

المختزلة Maillared reaction والذي يعتقد بأنه يتداخل مع العديد من التغييرات النسيجية المرتبطة بتقدم العمر (16).

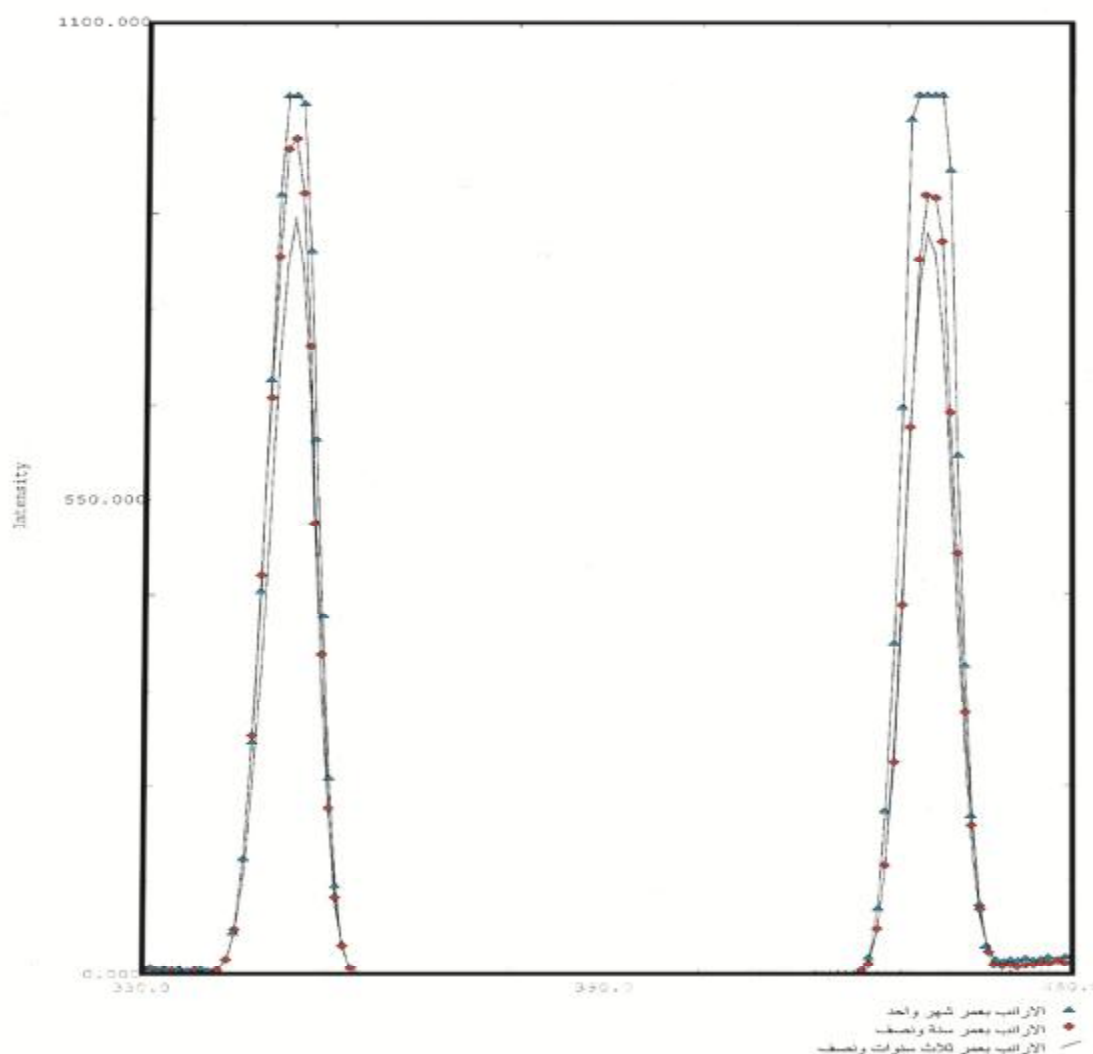
أما الباحثين (17) و (18) فقد أكدوا أن هذه التحويرات التركيبية مثل التآصر مع السكريات المختزلة glycation أو الأكسدة السكرية glycoxidation فضلاً عن حصول التقاطعات المختلفة تحدث في الأنواع الكولاجينية I و III الأكثر تواجداً في الحشوة خارج الخلوية لأنسجة الجسم المختلفة بتقدم العمر ، إن المرحلة النهائية لتآصر البروتين مع الوحدات السكرية يطلق عليها النواتج النهائية للتآصر السكري المتقدم (AGEs) Advanced glycation end products.

إن مستوى هذه النواتج النهائية للتآصر بنوعيتها تزداد في الأنسجة المختلفة من ضمنها نسيج الرئة بتقدم العمر (19) والتي يعزى لها قلة مرونة الأنسجة المتقدمة في العمر (20: 21) .

ظروف قاعدية قد تؤثر على نوعية التقاطعات الحاصلة في الكولاجين بتقدم العمر، قد أكد (15) أن اختلاف نوع التقاطعات الحاصلة بتركيب الكولاجين بتقدم العمر قد يعزى إليه السبب في انخفاض شدة المطيافية الفلورنسية للجيلاتين بتقدم العمر فهذه الشدة تزداد بزيادة لون الجيلاتين الناتج من المعاملة الحرارية للكولاجين ولذا كانت شدته أعلى ما يمكن في الجيلاتين للأعمار الصغيرة .

الكشف عن وجود الكاربوهيدرات في المادة المستخلصة

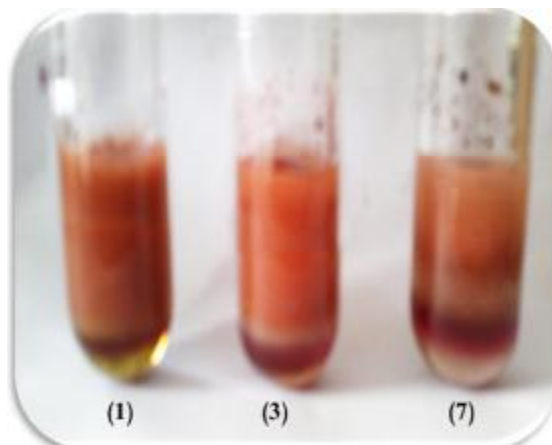
يشير الشكل (4) أن الكولاجين الذي تم استخلاصه وتنقيته في الدراسة الحالية يحتوي على وحدات كاربوهيدراتية أي أنه بروتين سكري glycoprotein وذلك من خلال ملاحظة النتيجة الموجبة لكشف مولش (تكوين حلقة بنفسجية) وهذا مماثل لما استنتجه العديد من الباحثين من أن هناك تحويرات في التركيب البروتيني يصاحب التقدم في العمر يعزى إلى التفاعل الحاصل بين البروتين والسكريات



الشكل (3): تأثير تقدم العمر على شدة المطيافية الفلورنسية للجيلاتين المستخلص من رئات الارانب باعمار مختلفة

التفاعلات ، فيمكن التعرف على المجموعات الوظيفية الفعالة عن طريق قراءة الطاقة الاهتزازية للجزيئات والتي تتطابق مع المنطقة تحت الحمراء للموجات الكهرومغناطيسية والتي يمكن أن تقاس بوساطة طيف IR . حيث أن المجموعات الوظيفية تمتلك ترددات اهتزازية مميزة ولذا تعد هذه التقنية من أبسط وأسرع الطرق المعول عليها لتعيين مركب ما .

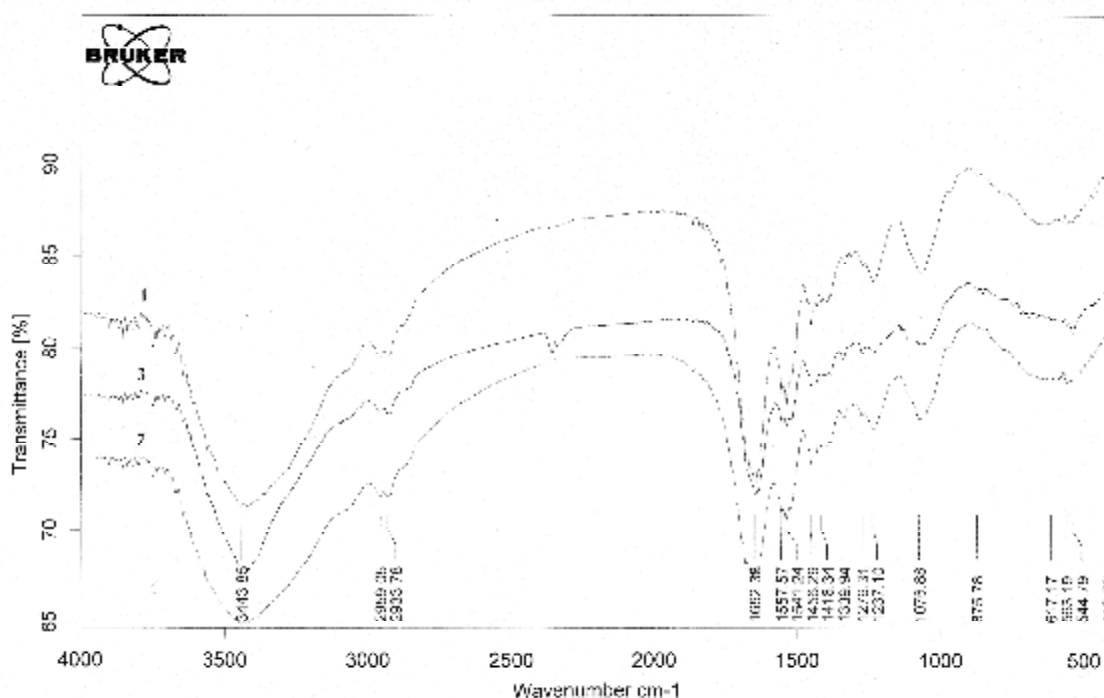
ومن مقارنة بصمة الإصبع Finger print للكولاجين الذي تم عزله وتنقيته من أنسجة رئات الأرانب والذي انحصر بين ترددات الأطوال الموجية $1800-1000 \text{ cm}^{-1}$ ، شكل (5) مع بصمة الأصبع للكولاجين نوع I المعزول من قبل (22) وجد أن لها بصمة إصبع متقاربة من ناحية المجاميع الوظيفية الرئيسية مما يعطي مؤشراً على نقاوة الكولاجين المستخلص من أنسجة رئات الأرانب، وعند ملاحظة التغيرات المرافقة في بصمة الأصبع للكولاجين المستخلص من أنسجة رئات الأرانب بتقدم العمر لم يلاحظ تغيرات واضحة في شدة الترددات الطيفية الرئيسية أي في المجاميع الوظيفية الرئيسة للكولاجين وأنه لا بد من استخدام تقنية أخرى لمتابعة التغيرات التركيبية التي تحصل في بروتين الكولاجين بتقدم العمر شكل (6).



الشكل (4): تأصر الكاربوهيدرات مع الكولاجين بتقدم العمر
(1) عمر شهر واحد ؛ (3) عمر سنة ونصف؛ (7) عمر ثلاث سنوات ونصف

الامتصاصية المطيافية ما تحت الحمراء للكولاجين

وللتأكد على نقاوة الكولاجين المستخلص من أنسجة رئات الأرانب تم استخدام تقنية Infrared Spectrometry-IR حيث أنها تعطي معلومات جيدة عن التركيب الكيميائي للمركبات ويمكن استخدامها لمتابعة التغيرات الحاصلة في شكل وتركيب هذه المركبات أثناء



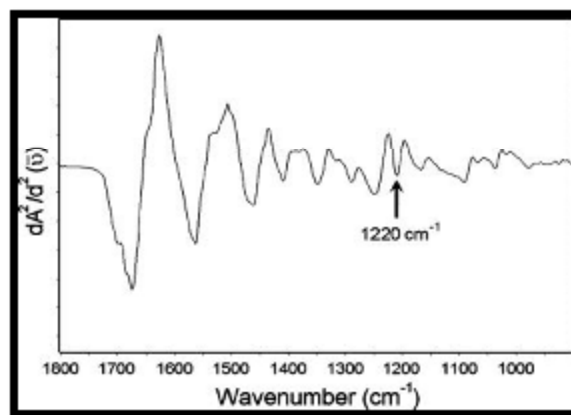
الشكل (5): قيم امتصاص المجموعات الفعالة للكولاجين المستخلص من رئات الارانب باعمار مختلفة باستخدام تقانة الـ IR
(1) عمر شهر واحد؛ (3) عمر سنة ونصف؛ (7) عمر ثلاث سنوات ونصف

البروتين المستخلص لديه نفس تركيب الكولاجين وفيما يأتي جدول (1) لطيف الأشعة تحت الحمراء للكولاجين I والبروتين المستخلص من فئات عمرية مختلفة للارانب.

الجدول (1): قيم امتصاص المجموعات الفعالة للكولاجين نوع I باستخدام تقانة الـ IR وعند الأطوال الموجية من 1000 cm^{-1} -

Finger print بصمة الاصبع 1800

حزم الكولاجين المستخلص من الارانب بعمر شهر واحد	حزم الكولاجين المستخلص من الارانب بعمر سنة ونصف	حزم الكولاجين المستخلص من الارانب بعمر ثلاث سنوات ونصف	حزم الكولاجين نوع I
1220	1238	1237	
1350	1339	1342	
1460	1456	1456	
1560	1557	1558	
1670	1652	1647	



الشكل (6): قيم امتصاص المجموعات الفعالة للكولاجين نوع I باستخدام تقانة الـ IR وعند الأطوال الموجية

من 1800 cm^{-1} - 1000 cm^{-1} بصمة الاصبع 1800-1000 (22) Finger print

تم قياس طيف الأشعة تحت الحمراء IR للبروتين المستخلص من الارانب وعند مقارنتها مع حزم طيف الأشعة تحت الحمراء للكولاجين لاحظنا تقارباً كبيراً بين الحزم تصل لدرجة التماثل مما يدل على ان

المصادر

11. Meyer, K. C. (2005). Aging. *Proc. Am. Thorac. Soc.*, 2(5):433-439.
12. Pride, N.B. (2005). Aging and changes in lung mechanics. *Eur. Respir. J.*, 26(4):563-565.
13. Bartling, B.; Desole, M.; Rohrbach, S.; Silber, R.E. and Simm, A. (2009). Age – associated changes of extracellular matrix collagen impair lung cancer cell migration. *FASEB J.*, 23(5):1510-1520.
14. Kolliase, N.; Gillies, R.; Moran, M.; Kochevay, I.E. and Anderson, R.R. (1998). Endogenous skin fluorescence includes bands that may serve as quantitative markers of aging and phathoaging. *J. Invest. Dermatol.*, 111(5):776-780.
15. Cole, C.G.B. and Roberts, J.J. (1997). Gelatine colour measurement. *Meat Science*. 45(1):23-31..
16. Ulrich, P. and Cerami, A.(2001). Protein glycation diabetes, and aging. *Recent. Prog. Horm. Res.*, 56:1-21.
17. Sell, D.R.; Nelson, J.F. and Monnier, V.M. (2001). Effect of chronic aminoguanidine treatment on age-related glycation, glycoxidation, and collagen cross-linking in the Fischer 344 rat. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, 56(9): 405-411.
18. Canty, E.G. and Kadler, K.E. (2005). Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J. C. Sci.*, 118(7):1341-1353.
19. Bellmunt, M. J.; Portero, M.; Pamplona, R.; Muntaner, M.; and Part, J. (1995). Age – related fluorescence in rat lung collagen. *Lung*, 173(3): 177-185.
20. Avery, N. C. and Bailey, A.J. (2006). The effects of the Maillard reaction on the physical
1. Sikorski, Z.E. (2001). “Chemical and functional properties of food proteins”. Boca. Raton.: CRC Press. P. 242.
2. Werner, M.E.G. (2003). The origin of metazoan complexity: porifera as ingegrated animals. *Int. Com. Biol.*, 43(1): 3-10.
3. Bellini, A. and Mattoli, S. (2007). The role of the fibrocyte, a bone marrow-derived mesenchymal progenitor, in reactive and reparative fibroses. *Lab Invest.*, 87(9):858-870.
4. Calabresi, C.; Arosio, E. and Galimberti, L. (2007). Natural aging, expression of fibrosis-related genes and collagen deposition in rat lung. *Exp. Gerontol.*, 42(10):1003-1011.
5. Daamen, W.F.; Hafmans, T.; Veerkamp, J.H. and Van Kuppevelt, T.H. (2001). Comparison of five procedures for the purification of insoluble elstin. *Biomaterials*, 22(14):1997-2005.
6. Harris, E.D. (1986). Biochemical defect in chick lung resulting from copper deficiency. *J. N.*, 116(2):252-258.
7. Robyt, J.F. and White, B.J. (1987). “Biochemical Techniques Theory and Practice”, 1st ed.,Brooke, Cole, Monterey, California. P:234.
8. Cole, C.G.B. and Roberts, J.J. (1996). Gelatine fluorescence and its relationship to animal age and gelatine colour. *Sa. J. of Food Sci. Nut.*, 8 (4):139-143.
9. Plummer, T.D. (1978). “An introduction to practical biochemistry”, 2nd ed. McGraw-Hill Book Company, U.K., p:362.
10. Cattel, M.A.; Anderson, J.C. and Hasleton, P.S. (1996). Age-related changes in amounts and concentrations of collagen and elastin in normotensive human thoracic aorta. *Clin. Chim. Acta*. 245(1):73-84.

22. Toyran, N.; Lasch, P.; Naumann, D.; Turan, B. and Severcan, F. (2006). Early alterations in myocardia and vessels of the diabetic rat heart: an FTIR microspectroscopic study. *Biochem. J.*, **397**(1):427-436.
- properties and cell interactions of collagen. *Pathol. Biol.*, **54**(7): 387-395.
21. Baynes, J.W. (2001). The role of AGEs in aging: causation or correlation. *Exp. Gerontol.*, **36**(9): 1527-1537.

Changing in Collagen Protein Due to Aging

Ghazwa Khaleel Ali Al-Taee¹, Sarab D. Sulayman Al-Shama²

^{1,2} Department of Biology, College of Science, Mosul University, Mosul, Iraq

Abstract

This study involved the elucidation of aging effects on the some biochemical characters of collagen that has been isolated from rabbit's lungs extract. Twenty-one albino rabbits aged between 1 to 42 months classified into 7 groups with 3 rabbits in each. results showed biochemical changes in collagen content which increased in rabbit's lung extract from 0.012g to 0.079g while the percentage of total collagen dry weight/lung dry weight increased in the group 1.5 years 0.094 compared with 1 month group 0.062 then return to decrease in 3.5 years group 0.062 compared to the 1.5 years group. This study also revealed structural changes of purified collagen from rabbits lung extracts with aging, purified collagen showed an increase of carbohydrates content and a decrease in fluorescent absorbance intensity. After using fluorescent spectrophotometric technique, while Infra-red-technique didn't give us any differences in the important groups of collagen with aging, but it gave us a finger print similar to that of collagen type I and gave us an idea about collagen purity extracted from rabbits lung tissues.