

А. Л. ЗАЙДЕС и С. Л. ПУПКО

## ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КОЛЛАГЕНА МЕТОДОМ РЕПЛИК

(Представлено академиком А. И. Опариным 25 IV 1950)

Основное преимущество метода реплик для исследования Коллагена <sup>(1)</sup> заключается в том, что объект не подвергается никаким посторонним воздействиям (например, диспергирование звуковыми колебаниями) и можно получить отпечаток с блока, по которому можно судить об архитектуре ткани. Имеющееся в литературе исследование коллагена методом коллодиевых реплик <sup>(2)</sup> относится к образцам коллагена, предварительно диспергированным различным образом (звуковыми колебаниями, в коллоидной мельнице, механическое расщепление иглками). Таким образом, получались отпечатки только с отдельных волокон, так как при таких воздействиях гистологическая структура коллагена нарушается.

Наряду с исследованием сухих объектов путем применения полистирол-кварцевых реплик нами был разработан метод получения реплик с мокрых объектов. Для этой цели фракция мономера метилметакрилата нагревается с обратным холодильником в присутствии катализатора полимеризации, пока жидкость не станет слегка вязкой. Затем с мокрого куска коллагена срезается на замораживающем микротоме верхний слой и оставшийся кусок погружается в воду.

После извлечения блока из воды, свежая поверхность, предназначенная для исследования, освобождается от избытка воды с помощью фильтровальной бумаги (эта операция должна производиться быстро). На препарированную таким образом поверхность наливается свежее приготовленный и слабо полимеризованный метилметакрилат. Для предохранения от высыхания образец заливается им со всех сторон. Дальнейший процесс полимеризации происходит на самом объекте. Первоначально образовавшуюся на нем тонкую пленку утолщают повторным нанесением полимера до толщины, удобной для снятия (около 0,1 мм). На снятую реплику метилметакрилата напыляется в вакууме тонкий слой кварца (порядка 100—300 Å) со стороны, обращенной к коллагену. Кварцевая пленка освобождается от метилметакрилата растворением последнего в дихлорэтане.

Методом реплик были исследованы образцы коллагена в необработанном виде, а также различным образом обработанных: известковым молоком, ферментом (панкреатином), солями тяжелых металлов (фосфорно-вольфрамовой кислотой, фосфорно-молибденовой кислотой, уранилацетатом), выдубленных формальдегидом, основной сернокислой солью хрома и экстрактом древесины дуба. Во всех случаях было обнаружено наличие периодической повторяемости полос разной плотности, перпендикулярных оси волокна (см. рис. 1, а, б, 2, а, б, 3, а, б).

На репликах с мокрых объектов нам удалось обнаружить большую дифференциацию, чем на соответствующих репликах с сухих объектов. Так, в случае хромового дубления был обнаружен наряду с периодом

в 634 Å еще подпериод в 297 Å. Приблизительно такой же подпериод (282 Å) для данной обработки был выявлен на фибриллах, исследованных непосредственно в электронном микроскопе.

Некоторые реплики, полученные с образцов, выдубленных экстрактом древесины дуба, позволили выявить сферические частицы,

лежащие на фибриллах (см. рис. 4). По всей вероятности, эти частицы представляют собой таниды, не связанные с коллагеном и адсорбированные на его поверхности.

Расчеты показали, что постоянство периодов повторяемости сохраняется с точностью приблизительно до  $\pm 15$  Å. Такое постоянство наблюдается в пределах каждого типа обработки (табл. 1). По значениям периодов повторяемости исследованные нами объекты могут быть разделены на три группы: 1 — периоды повторяемости для мокрых объектов имеют величину 640 Å; 2 — периоды повторяемости для сухих недубленных объектов (сюда же относятся объекты, обработанные фосфорновольфрамовой кислотой и формалином) составляют величину 540 — 560 Å; 3 — периоды повторяемости для сухих объектов различного вида дубления дают величину ~430 Å.

Реплики позволили обнаружить не только постоянство периодов повторяемости, но и относительное постоянство ширины фибриллы.

Для разных видов обработки коллагена в сухом состоянии значения ширины составляют около 0,1  $\mu$ . В мокром состоянии для фибрилл, выдубленных основной сернокислой солью хрома и формальдегидом, расчеты показывают увеличение ширины на 10 — 20%.

Реплики всех исследованных образцов коллагена показали определенную ориентацию поперечных полос разных фибрилл: темные полосы, как и светлые, находятся друг против друга. Этот факт, а также постоянство периодов повторяемости характеризуют внутреннюю структуру коллагена и указывают на определенное и пространственное расположение молекулярных групп.

В заключение считаем нужным выразить благодарность А. Н. Михайлову и А. И. Примеру за интерес к работе.

Центральный научно-исследовательский институт кожевенно-обувной промышленности СССР

Поступило  
14 VI 1950

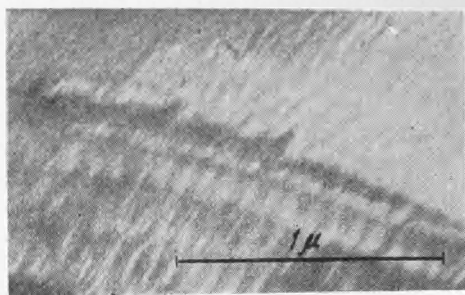
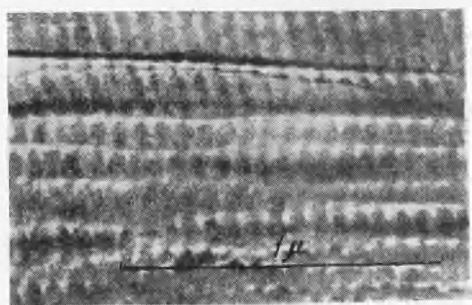
#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

<sup>1</sup> А. Л. Зайдес и С. Л. Пупко, ДАН, 65, № 2 (1949). <sup>2</sup> J. Gross and F. O. Schmitt, Journ. Exp. Med., 88, No. 5, 555 (1948).

Таблица 1

Период повторяемости фибрилл

Вид обработки коллагена	Период повторяемости в Å	Ширина фибриллы в Å
По полистирол-кварцевым репликам для сухих объектов		
Не обработан . . . . .	535	650
Обработан:		
известковым молоком 3 дня	575	980
известковым молоком 1 мес.	546	—
панкреатином 3 часа . . . .	546	820
панкреатином 12 час. . . .	540	1140
фосфорно-вольфрамовой кислотой . . . . .	556	910
формальдегидом . . . . .	586	990
фосфорно-молибденовой кислотой . . . . .	466	800
уранилацетатом . . . . .	426	705
основным сульфатом хрома .	409	800
По метилметакрилаткварцевым репликам для мокрых объектов		
Известковым молоком 3 дня .	640	—
Панкреатином 8 час. . . . .	640	—
Панкреатином 12 час. . . . .	625	—
Основным сульфатом хрома .	634	1200
Экстрактом древесины дуба .	651	—
Формальдегидом . . . . .	609	1100



*a*

*б*

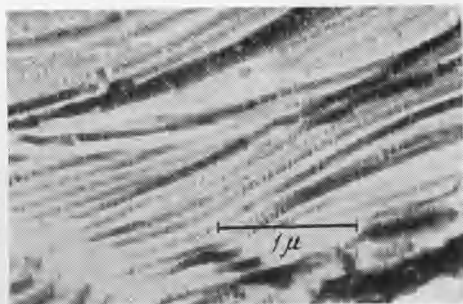
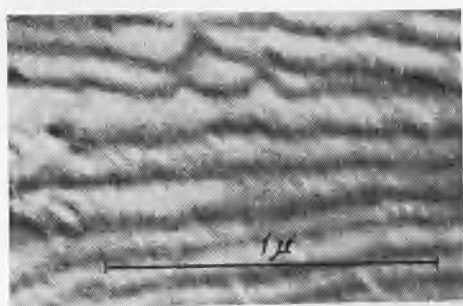
Рис. 1. Реплики: с сухого (*a*) и мокрого (*б*) необработанного коллагена



*a*

*б*

Рис. 2. Реплики: *a* — с сухого коллагена, обработанного уранилацетатом; *б* — с мокрого коллагена, выдубленного формалином



*a*

*б*

Рис. 3. Реплики: с сухого (*a*) и мокрого (*б*) коллагена, выдубленного хромовой солью

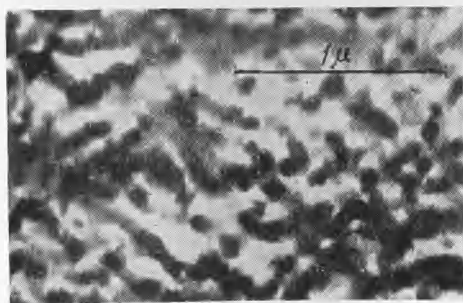


Рис. 4. Реплика с мокрого коллагена, выдубленного экстрактом древесины дуба