

С. М. БЫЧКОВ

## О КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИИ ГИАЛУРОНОВОЙ И ХОНДРОИТИН-СЕРНОЙ КИСЛОТ С ПРОКОЛЛАГЕНОМ

*(Представлено академиком А. И. Опариным 5 IX 1950)*

Вопрос о белковых комплексах полисахаридных кислот, несмотря на его важное теоретическое и практическое значение, до сих пор еще очень мало разработан.

Исследования в этой области проводятся как путем изучения состава и строения естественных комплексов, содержащихся в тканях животного организма, так и посредством искусственного синтеза комплексов из полисахаридных кислот и протеинов, изолированных из различных источников. Ряду исследователей удалось приготовить синтетические протеиновые комплексы гиалуроновой и хондроитин-серной кислот, а также гепарина, причем в качестве белкового компонента применялись: желатина, сывороточные и различные растительные белки, вирусы и в редких случаях тканевые протеины. Следует при этом отметить, что в большинстве работ применяемые препараты белков не подвергались достаточной проверке в отношении их гомогенности (см. наши обзоры <sup>(1-3)</sup>).

Тканевые белки представляют наибольший интерес в отношении их способности к комплексообразованию с различными кислыми мукополисахаридами и, в частности, с гиалуроновой и хондроитин-серной кислотами. Последние два вещества, входя в состав межклеточной субстанции соединительной ткани, вместе с белками образуют очень сложную в физико-химическом отношении систему, функционирующую как «цементирующее вещество». Однако имеющиеся в настоящее время экспериментальные данные еще не дают определенных сведений о взаимоотношении между белками и указанными полисахаридными кислотами в межклеточной субстанции.

Недавно В. Н. Ореховичем и А. А. Тустановским <sup>(4-10)</sup> был изолирован из кожи и некоторых других видов соединительной ткани, т. е. тканей, особенно богатых кислыми мукополисахаридами, в кристаллическом виде белок, названный ими проколлагеном. По изложенным здесь соображениям представляет большой интерес изучение вопроса о комплексообразовании этого белка с гиалуроновой и хондроитин-серной кислотами.

Гиалуроновая кислота выделялась из пупочных канатиков человека по видоизмененным нами прописям Мейера и Пальмера <sup>(11)</sup> и Мак-Клина <sup>(12)</sup>. Хондроитин-серная кислота изолировалась из хрящевых колец трахеи быка по прописи Мейера и Смита <sup>(13)</sup>, также с некоторыми нашими изменениями.

Ниже приводятся данные анализов полученных препаратов гиалуроновой и хондроитин-серной кислот.

К и с л о т а	С о с т а в в %			
	азот	гексозамин	ацетильная группа	гексуроновая кислота
Гиалуроновая . . . . .	3,16	35,3	10,2	40,1
Хондроитин-серная . . . . .	3,00	29,1	9,3	34,3

Проколлаген изолировался по прописи А. А. Тустановского <sup>(5)</sup> из кожи крыс. Для получения комплексов проколлагена с полисахаридными кислотами кристаллы этого белка растворялись в цитратном буфере рН 4,1. Из основного раствора готовился ряд необходимых раз-

ведений в таком же буферном растворе. К полученным растворам проколлагена различной концентрации прибавлялся равный объем раствора гиалуроновой или хондроитин-серной кислоты.

При смешивании растворов проколлагена и гиалуроновой кислоты наблюдалось немедленное образование тонких очень длинных нитей, которые при перемешивании стеклянной палочкой содер-

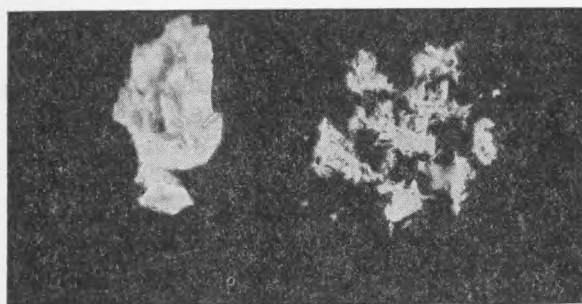


Рис. 1. Форма сухих препаратов комплексов проколлагена с гиалуроновой (а) и хондроитин-серной (б) кислотами

жимого пробирки накручивались на нее подобно пряже.

Смешивание растворов проколлагена и хондроитин-серной кислоты также вызывало немедленное появление нитей, но значительно более коротких, чем в случаях гиалуроновой кислоты. При перемешивании образовавшиеся нити быстро свертывались в отдельные небольшие клубки.

К смесям проколлагена с указанными полисахаридными кислотами прибавлялась уксусная кислота до конечной концентрации 2%. Через сутки стояния в холодильнике осадки отделялись центрифугированием и трижды промывались 2% уксусной кислотой, затем столько же раз спиртом и под конец эфиром. Окончательная подсушка полученных комплексов производилась в вакууме над хлористым кальцием и парафином.

В сухом состоянии препараты комплекса проколлаген — гиалуроновая кислота имеют форму крупных пластов, состоящих из переплетенных между собой тонких волокон, обладающих относительно высоким сопротивлением разрыву (рис. 1, а). Комплексы проколлаген — хондроитин-серная кислота в таком же состоянии имеют форму небольших клубков, состоящих из переплетенных между собой нитей (рис. 1, б).

В полученных описанным способом комплексах производилось определение гексозамина по Элсону и Моргану <sup>(14)</sup> после гидролиза их с 2,5 N соляной кислотой в течение 12 час. на кипящей водяной бане. Общий азот определялся по Кьельдалю.

Из данных табл. 2 видно, что состав комплексов проколлаген — гиалуроновая кислота и проколлаген — хондроитин-серная кислота является постоянным и не зависит от исходного соотношения реакци-

Таблица 2

Состав комплексов проколлагена с гиалуроновой и хондроитин-серной кислотами

Исходн. концентрации в %		Выход в мг	Состав в %		N гексозамина N общий
проколлаген	полисахаридные к-ты		общий азот	гексозамин	

Проколлаген — гиалуроновая кислота

1,0	1,0	29,5	10,95	16,0	0,11
1,0	0,5	23,3	11,45	15,3	0,10
1,0	0,25	19,5	11,31	15,0	0,10
0,5	1,0	16,4	10,95	16,35	0,11

Проколлаген — хондроитин-серная кислота

1,0	1,0	40,9	12,58	9,46	0,06
1,0	0,5	39,3	12,34	9,18	0,06
1,0	0,25	35,5	12,67	10,14	0,06
0,5	1,0	19,9	12,35	9,77	0,06

рующих компонентов. Следовательно, образование таких комплексов происходит в стехиометрическом соотношении. Обращает на себя внимание тот факт, что проколлаген способен присоединять очень большое количество гиалуроновой кислоты. Сравнительно меньшее количество этот белок присоединяет хондроитин-серной кислоты, хотя процент гексозамина и в комплексе проколлагена с названной кислотой тоже достаточно высок.

Комплексы проколлагена с гиалуроновой и хондроитин-серной кислотами нерастворимы в воде, 2% уксусной и 2 N соляной кислотах. В 1 N NaOH оба комплекса быстро растворяются. Комплекс проколлаген — хондроитин-серная кислота растворяется в молярном растворе хлористого кальция.

Более детальное изучение свойств комплексов проколлагена с полисахаридными кислотами проводится нами в настоящее время.

Вопрос о наличии в тканях и, в частности, в коже комплексов проколлагена с гиалуроновой и хондроитин-серной кислотами требует специальных исследований. В этой связи в первую очередь нужно было произвести определение суммарного содержания гексозаминов отдельно в коже и дерме. Необходимость отдельного изучения кожи и дермы диктуется данными С. Р. Мардашева<sup>(15)</sup>, согласно которым аминокислотный состав тотальных белков эпидермиса резко отличается от таковых дермы.

Кожа тщательно освобождалась от шерсти, жира и подкожной клетчатки, измельчалась в мясорубке и трижды обрабатывалась 5-кратным по весу количеством охлажденного ацетона, содержащего немного ацетата натрия. Для отделения эпидермиса от дермы куски кожи заливались 0,1 N уксусной кислотой и ставились в рефрижератор на 24 часа или обрабатывались 2% раствором аммиака в течение 2—3 час. при комнатной температуре. В том и другом случае эпидермис полностью отделялся от дермы<sup>(15)</sup>. Далее полученная дерма обрабатывалась так же, как и кожа.

Из результатов анализов (табл. 3) следует, что в коже и дерме крыс отношение азота гексозаминов к общему азоту колеблется в узких, одинаковых в том и другом случае пределах. Удаление

Таблица 3

Содержание общего азота и гексозаминов в коже и дерме крыс в процентах от сухого веса

№ образцов	Наименование ткани	Общ. азот	Гексозамины	N гексозаминов N общий
1	Кожа	14,19	0,68	0,0035
2	"	14,19	0,62	0,0028
3	"	14,08	0,58	0,0028
4	Дерма	14,71	0,69	0,0034
5	"	14,38	0,51	0,0028
6	"	14,34	0,70	0,0035

эпидермиса с кожи не отражается на данных анализов, что, вероятно, объясняется относительно небольшой массой слоя эпидермиса в коже крыс.

Высокий процент гексозаминсодержащих веществ в коже дает право предполагать наличие в этой ткани протеиновых комплексов полисахаридных кислот, и возможно, что среди них имеются аналогичные описанным в данной работе.

Первый Московский медицинский институт

Поступило  
28 IV 1950

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> С. М. Бычков, Усп. совр. биол., **25**, 1 (1948). <sup>2</sup> С. М. Бычков, там же, **27**, 257 (1949). <sup>3</sup> С. М. Бычков, там же, **27**, 479 (1949). <sup>4</sup> В. Н. Орехович и А. А. Тустановский, Бюлл. эксп. биол. и мед., **23**, 197 (1947). <sup>5</sup> А. А. Тустановский, Биохимия, **12**, 285 (1947). <sup>6</sup> В. Н. Орехович, Усп. хим., **16**, 690 (1947). <sup>7</sup> В. Н. Орехович, Проблемы советской физиологии, биохимии, фармакологии, кн. 2, 1949, стр. 743. <sup>8</sup> В. Н. Орехович, Доклад на 2-й сесс. отд. мед.-биол. наук АМН СССР, 1949. <sup>9</sup> В. Н. Орехович, А. А. Тустановский и М. П. Черников, Бюлл. эксп. биол. и мед., **28**, 372 (1949). <sup>10</sup> К. Д. Орехович, ДАН, **71**, 521 (1950). <sup>11</sup> K. Meyer and J. Palmer, Journ. Biol. Chem., **114**, 689 (1936). <sup>12</sup> D. McClean, Biochem. Journ., **37**, 169 (1943). <sup>13</sup> K. Meyer and E. Smyth, Journ. Biol. Chem., **119**, 507 (1937). <sup>14</sup> L. Elson and W. Morgan, Biochem. Journ., **27**, 1824 (1933). <sup>15</sup> С. Р. Мардашев, Биохимия, **12**, 444 (1947).