

БИОХИМИЯ

А. А. ТУСТАНОВСКИЙ, А. Л. ЗАПДЕС, Г. В. ОРЛОВСКАЯ и А. Н. МИХАЙЛОВ

НОВЫЕ ДАННЫЕ О СТРОЕНИИ КОЛЛАГЕНА

(Представлено академиком П. А. Ребимдером 26 I 1954)

Все исследователи коллагена рассматривают его как индивидуальный белок. В литературе приводится ряд моделей строения коллагена (¹), однако экспериментальные данные полностью не укладываются ни в одну из предложенных схем. Это объясняется тем, что во всех случаях коллаген оценивается как однокомпонентная система. Существование на рентгенограмме коллагена интерференционных колец различной ширины, обнаружение электронографическим методом интерференционных рефлексов, характерных для монокристаллов (²), а также выделение из коллагена нового индивидуального белка — проколлагена (³) привело нас к мысли о многокомпонентности и многофазности коллагена.

С целью проверки этого предположения нами было предпринято разделение коллагена на две фракции: проколлаген и остаток после его удаления. Проколлаген исследовался неоднократно (⁴). Что же касается остатка, то систематически он исследуется впервые.

Объектом исследования служила кожа крысы, освобожденная от волос, эпидермиса и подкожного слоя. Материал измельчался ножницами на кусочки размером в 1—2 мм и многократно извлекался цитратным буфером с рН 4,0 до возможно полного отделения проколлагена. Для выплавления оставшегося неизвлеченного проколлагена остаток ткани нагревался в воде при 50° в течение 1,5 час. Из цитратных растворов осаждался проколлаген в виде игольчатых кристаллов и волокон (⁵). Полученные фракции изучались тремя методами: гистохимическим, электронно-микроскопическим и методом рентгеновского структурного анализа.

Специфической пробой на присутствие коллагена служила окраска пикрофуксином. Кроме того, материал окрашивался серебром по Футу, юлуидиновой синей для выявления метакромазирующих веществ и периодат-фуксином для выявления полисахаридов, содержащих два соседних свободных гидроксильных в дис-положении (⁷). Электронно-микроскопическое исследование производилось на электронном микроскопе ЭМ-100. Образцы перед исследованием диспергировались ультразвуком, в гомогенизаторе или расщипывались иглами. Для увеличения контрастности изображения на объекты напылялся хром. Рентгеновские снимки были получены на (Дик-излучении в камере типа Лауз; расстояние объектов от пленки 50 мм.

Результаты, полученные всеми тремя методами, согласуются между собой. Исследование проколлагена показало, что он обладает структурой и свойствами, близкими коллагену (см. табл. 1). Гистохимически он повторяет окраску коллагена. Межпоскожные расстояния, рассчитанные по рентгенограммам, у проколлагена и коллагена одинаковы (см. табл. 2). Исследование проколлагена при помощи электронного микроскопа показало, что он обладает той же полосатой структурой, что и нативный коллаген. Диаметр фибрилл отличен и зависит от метода выде-

ления проколлагена из раствора. Игольчатый проколлаген обладает неодинаковым диаметром по длиннику, концы заострены (см. рис. 1 а); нитевидный проколлаген более однороден по толщине (рис. 1 б).

Таблица 1

Гистохимия коллагена кожи крысы после фракционирования

Окраска	Коллаген	Проколлаген	Остаток	
			негретый	гретый
Пикрофуксин	Яркокрасный	Яркокрасный	Розовый	Розовато-желтый
Серебро по Футу	Лиловый	Лиловый	Серый	Аргирофильные глыбки и нечетко контурированные аргирофильные волокна
Толуидиновая синяя	Слабо голубой	Слабо голубой	Отдельные метакроматические зерна	Обильные метакроматические зерна на месте коллагеновых волокон
Периодат-фуксин	Слабо розовый	Слабо розовый	Неравномерное усиление розовой окраски	Пятна интенсивного малинового цвета

Остаток ткани после отделения проколлагена по своей структуре и свойствам резко отличен от проколлагена, а следовательно, и коллагена.

Таблица 2

Межплоскостные расстояния d , рассчитанные по рентгенограммам различных фракций коллагеновой ткани (в Å)

Коллаген	Проколлаген	Остаток	
		негретый	гретый
11,3	11,4	9,8*	10,5*
7,5	7,5	—	—
5,7	5,8	—	—
4,8	4,7	4,5*	4,6*
4,0	3,9	—	—
2,9	2,9	—	—

* Диффузные кольца.

указывает на присутствие кислых сульфатированных полисахаридов (табл. 1).

Структура остатка, определяемая рентгенографическим методом, также резко отлична от структуры коллагена. Интерференционные максимумы, характерные для коллагена (2,9 Å и ~ 11 Å), исчезают. Появляется два диффузных кольца (табл. 2).

Электронно-микроскопическое исследование показывает, что остаток состоит из тонких нитей, не обладающих поперечной полосатостью. При относительно слабом расщеплении негретого остатка (раздвигание иглами) видно, что эти нити имеют продольное направление и собра-

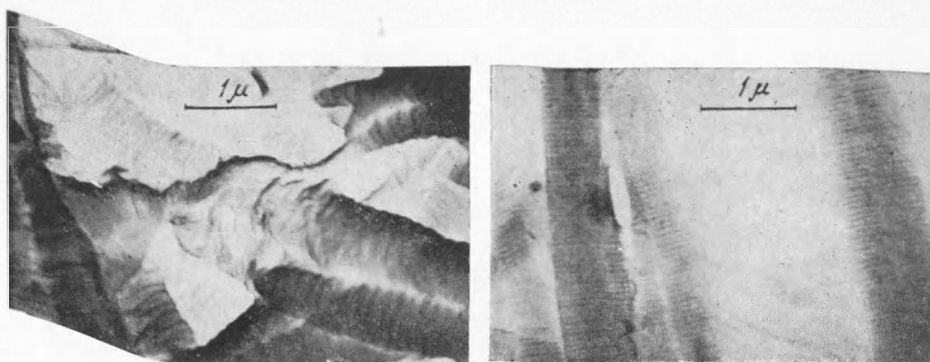


Рис. 1. *а* — иглообразный проколлаген, *б* — нитевидный проколлаген

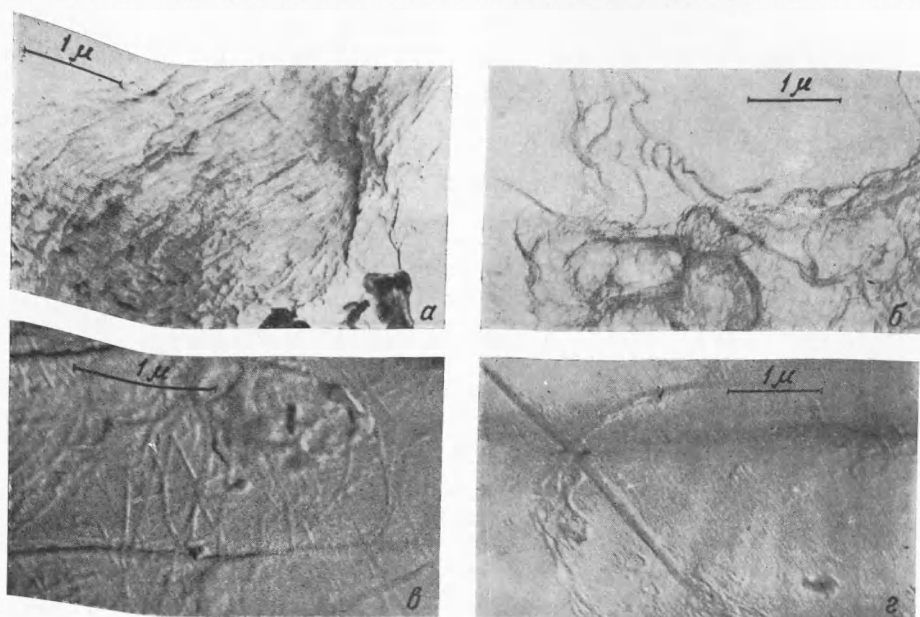


Рис. 2. Колластромины: *а* — нити собраны в пучки, *б* — случайное расположение нитей, *в* — неполное расщепление коллагена, *г* — неполное расщепление коллагена

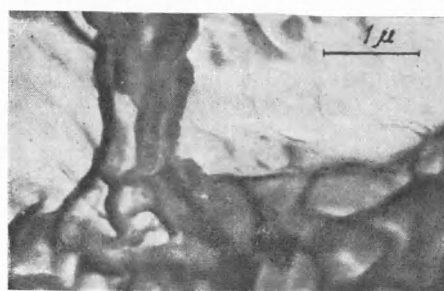


Рис. 3. Колластромины гнетый

ны в пучки (см. рис. 2 а). При более полном расщеплении (ультразвуком или в гомогенизаторе) нити приобретают случайное расположение (рис. 2 б). В тех случаях, когда проколлаген полностью не отделился, на электронной микрофотографии видны наряду с отдельными нитями и полосатые фибриллы (рис. 2 в). В некоторых случаях удавалось видеть расщепление полосатой фибриллы на тонкие нити (рис. 2 г). Нагревание остатка до 50° действительно удаляет проколлаген более полно, но в то же время меняет состояние остатка. В электронном микроскопе вместо нитей видны бесструктурные образования (рис. 3).

Результаты, полученные при фракционировании коллагена, приводят нас к убеждению, что современные представления о коллагене в классическом термодинамическом смысле должны быть пересмотрены. В соответствии с полученными данными коллаген представляет собой по меньшей мере двухфазную систему: проколлаген и остаток, который мы называли «колластромином» — основой коллагенового волокна.

Количество выделенного проколлагена относительно невелико (10—15%). Однако изученные нами свойства и структура всего белкового образования — коллагена — определяются присутствующим в нем проколлагеном. Это возможно лишь в том случае, если колластромин является основой, на которой ориентированно осаждается проколлаген, создавая систему, называемую до сих пор коллагеном. Проколлаген, покрывая поверхность колластромина, определяет гистохимические и электронно-микроскопические особенности коллагенового волокна. Что касается рентгенограммы коллагена, то она, повидимому, является результатом сложения рентгенограмм проколлагена и колластромина. (Это относится к положению межплоскостных расстояний, но не к интенсивности колец, по которым определяются эти расстояния.)

Проколлаген способен к образованию различных форм: игольчатые кристаллы, волокна, гель А, гель В, монодисперсный раствор⁽⁵⁾. Фибриллярные образования проколлагена легко ориентируются по отношению друг к другу: на электронных микрофотографиях наблюдается подстройка полос различной плотности (рис. 1 а и б). При сближении концов игольчатых кристаллов наблюдается тенденция к соединению встык без нарушения порядка полосатости (рис. 1 а). Даже в монодисперсных растворах легко подобрать условия (близкие к физиологическим), при которых молекулы проколлагена взаимно ориентируются, образуя молекулы-двойники⁽⁹⁾. Обладая способностью к самоориентации (кристаллы плавательного пузыря рыбы), проколлаген вместе с тем может ориентироваться на поверхностях, обладающих свободными зарядами⁽¹⁰⁾. Способность проколлагена к образованию различных форм, к самоориентации и ориентированной сорбции объясняет в известной мере наши предположения об особенностях явления сочетания проколлагена и колластромина.

Колластромин состоит из тонких нитей диаметром порядка 50—70 Å и представляет собой, повидимому, сочетание аргирофильного белка с полисахаридами. Среди них имеется мукополисахарид (резкая метахромазия и положительная реакция с периодатом). Последний обладает отчетливо выраженными электрохимическими функциями, т. е. представляет собой фибриллярный полиэлектролит. Такой полиэлектролит должен обладать резко выраженной адсорбционной и ориентирующей способностью.

Наименьшей структурной единицей сложного белка — коллагена является поперечно-полосатая фибрилла, диаметр которой по электронно-микроскопическим данным порядка 0,1 μ ⁽¹¹⁾. Более мелкие структурные единицы, не имеющие полосатости, представляют собой результат отделения проколлагена и освобождения нитей колластромина. Они наблюдались рядом авторов при исследовании в электронном микроскопе коллагена, подвергнувшегося различным обработкам⁽¹²⁾.

Таким образом, по нашим данным коллаген следует определить как многофазную систему, основными составляющими которой являются колластромин и проколлаген. Колластромин, со своей стороны, имеет в своем составе белково-мукополисахаридный комплекс и аргирофильный фибриллярный белок.

Центральный научно-исследовательский
институт кожаной промышленности и
Институт экспериментальной патологии
и терапии рака
Академии медицинских наук СССР

Поступило
26 I 1954

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ W. Astbury, L. Pauling, et al., Proc. Roy. Soc., **13**, 141 (1953).
² А. Л. Зайдес, Конференция по белку, Изд. АН СССР, 1952, стр. 130.
³ А. А. Тустановский, Биохимия, **12**, 285 (1947). ⁴ В. Н. Орехович, Проколлагены, их химич. состав, свойства и биол. роль, М., 1952. ⁵ А. А. Тустановский, Вопросы мед. химии, **1—2**, 160 (1949). ⁶ А. А. Тустановский, В. О. Шпикитер, там же, **4**, 70 (1952). ⁷ Адамс и др., Органические реакции, сборн. 2, 362, 1950. ⁸ А. А. Тустановский, Г. Б. Орловская, Арх. патологии, **3**, 32 (1953). ⁹ С. Е. Бреслер, П. А. Финогенов, С. Я. Френкель, ДАН, **72**, 555 (1950). ¹⁰ Th. Huzella, Zs. Krist., **83**, 89 (1932).
¹¹ А. Л. Зайдес, ДАН, **73**, 379 (1950). ¹² А. Л. Зайдес, С. Л. Пупко, ДАН, **73**, 991 (1950); **80**, 647 (1951).