Доклады Академии наук СССР
1955. Том 104, № 4

ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

А. Л. ЗАЙДЕС, А. А. ТУСТАНОВСКИЙ и Г. В. ОРЛОВСКАЯ

РОЛЬ НЕБЕЛКОВЫХ ИНГРЕДИЕНТОВ В ВОЗНИКНОВЕНИИ СТРУКТУРЫ ПРОКОЛЛАГЕНА

(Представлено академиком А. И. Опариным 31 V 1955)

По нашим данным ([1]) коллаген представляет собой многофазную систему, основными составляющими которой являются колластромин и проколлаген. Рассмотрение каждой из этих фаз указывает, что они обладают сложной и многокомпонентной структурой. Колластромин имеет в своем составе полисахариды и аргирофильный белок. О полном составе колластромина окончательных данных еще не получено; работа в этом направлении ведется.

В состав проколлагена также входят полисахариды. Участию последних в формировании структуры коллагена многие авторы придают большое значение. Были сделаны попытки воспроизведения коллагенового волокна путем прибавления к раствору проколлагена веществ, содержащих полисахариды ([2]). При этом, однако, не учитывались полисахариды, уже связанные с белком. Прибавление дополнительных количеств полисахаридов может привести к изменению условий кристаллизации, что практически и имеет место. В зависимости от количества и характера добавляемых веществ получаются: неполосатые фибриллы, фибриллы с большими периодами повторяемости и сегментированные фибриллы с большими периодами. Если количество прибавленного полисахарида мало, то оно не влияет на условия кристаллизации, и выпадает проколлаген с характерным периодом повторяемости порядка 640 Å.

С. М. Бычков ([3]) показал, что при прибавлении полисахаридов к раствору проколлагена выпадает осадок, в котором отношение полисахарида к белку является величиной постоянной, зависящей от характера прибавленного полисахарида.

Метод рентгеновского структурного анализа под малыми углами применялся только при исследовании всего коллагенового комплекса. Так как проколлаген повторяет ряд свойств коллагена и обладает той же электронно-микроскопической структурой, то авторы ([4]) переносят результаты своих исследований структуры коллагенового комплекса на проколлаген. Результаты рентгеновского исследования коллагена под малыми углами полностью согласуются с электронно-микроскопическими данными. Получается строгая периодичность структуры по оси волокна, причем период повторяемости того же порядка, что и при электронно-микроскопических исследованиях.

Возникает вопрос, чем вызвано такое строгое упорядочение структуры коллагена? В литературе имеется ряд предположений, не подкрепленных, однако, экспериментальными доказательствами. Часть авторов связывает существование полосатости в коллагене со структурой самих полипептидных цепей, неравномерным распределением аминокислотных остатков, складчатым или спиральным расположением цепей, существованием ориентированных и неориентированных областей в структуре коллагена ([5]). Другая часть принимает существование полипептидных цепей длиной

порядка 640 Å; эти цепи связываются между собой веществом с малой пространственной протяженностью силами главных валентностей. В качестве такого связующего вещества может служить углеводная составная часть коллагена ([6]).

Настоящая работа посвящена роли небелковых компонентов, входящих в состав естественного проколлаген-комплекса, в образовании его структурных особенностей. В качестве веществ, участвующих в образовании проколлагенового комплекса, предполагаются липоиды ([7]) и полисахариды. Эти два предположения проверялись нами экспериментально.

Для исследования влияния липоидов проколлагеновый комплекс обрабатывался различным образом.

1) Белок обрабатывался в течение месяца большим избытком петролейного эфира; за это время растворитель менялся 6 раз. Для освобождения от петролейного эфира белок отмывался несколькими сменами этилового эфира. После этого он растворялся в цитратном буфере при pH 4 и диализовался по отношению к водопроводной воде.

2) Проколлагеновый комплекс обрабатывался в течение 2 мес. метилалем, затем промывался эфиром. После этого белок растворялся в цитратном буфере и проколлаген осаждался солью.

3) Проколлагеновый комплекс обрабатывался смесью спирта с эфиром в течение 2 мес. Затем проводилась промывка петролейным эфиром. В последнем белок находился в течение 2 мес. Перед исследованием белку давали набухать в воде, растворяли в цитратном буфере и проколлаген осаждался солью. Эти обработки не привели к снятию характерной полосатости фибрилл проколлагена (рис. 1).

Для выделения полисахаридов из проколлагенового комплекса мы воспользовались методом Севаг ([8]). Метод состоит в эмульгировании раствора проколлагена в цитратном буфере хлороформом и расслаивании этой эмульсии центрифугированием; при этом белок отделяется на поверхности раздела хлороформ — вода в виде осадка, а полисахарид остается в растворе. Для полного разделения проколлагенового комплекса операция производилась несколько раз с новыми порциями хлороформа. Для удаления хлороформа отделившийся белок промывался несколько раз метиловым или этиловым спиртом, затем растворялся в цитратном буфере и цикл повторялся. Освобожденный от полисахарида белок растворялся в цитратном буфере и вновь осаждался хлористым натрием или диализом по отношению к водопроводной воде.

Общее количество отделенного восстанавливающего сахара, определенное карбозольным методом после гидролиза 6 *н* соляной кислотой, было для препаратов с общим содержанием азота 17,5 и 18% (к сухому весу), соответственно, 2,4 и 1,9%, что составляло в среднем 75% углеводов, содержащихся в исходном препарате, определенных тем же методом. Проверка на содержание восстанавливающего сахара в исходном препарате без гидролиза дала отрицательный результат. Таким образом, полного сбалансированного отделения полисахарида нам не удалось достигнуть. Повидимому, последние количества полисахарида очень прочно удерживаются белком. Не исключена возможность, что они представляют собой олигосахариды, входящие в состав цепи.

Белок, перекристаллизованный после отделения полисахаридов по Севаг, уже не образует полосатых структур. В электронном микроскопе видны отдельные нити (рис. 2 *а*) или нити, скрученные между собой с образованием более широких фибриллярных структур (рис. 2 *б*), но полосатости, характерной для проколлагенового комплекса, не обнаруживалось. Необходимо заметить, что проколлагеновый комплекс перед обработкой по методу Севаг всегда предварительно проверялся в электронном микроскопе на присутствие полосатых фибрилл.

Экстракты полисахаридов разделялись по методу Мейера и Чеффи ([9]). Из первого и второго экстрактов, соединенных вместе, удалось выделить

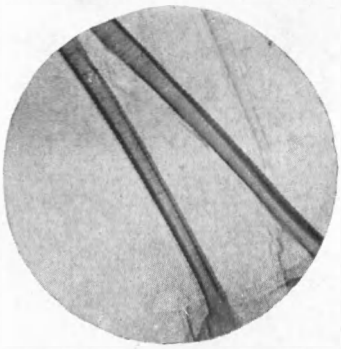


Рис. 1. Проколлаген после обработки растворителями липоидов, × 11000

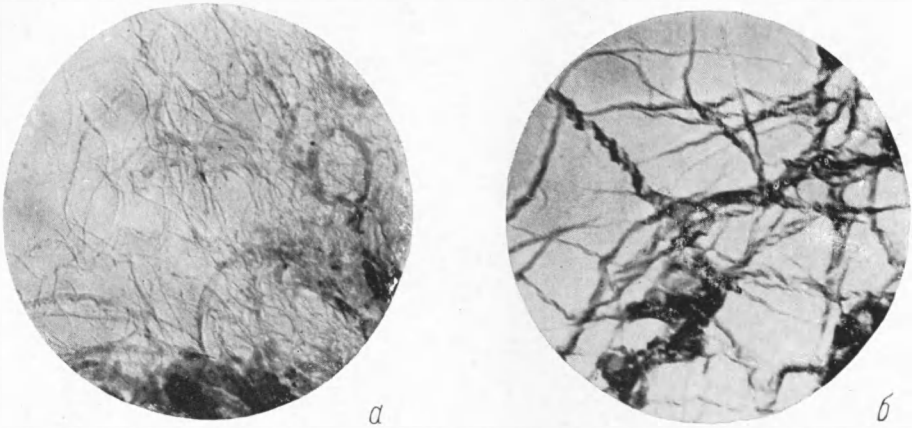


Рис. 2. Проколлаген после отделения полисахаридов. *а* — нитевидная структура, × 11000; *б* — скрученные нити с образованием фибриллярных структур, × 11000



Рис. 3. Воссоединенный проколлагеновый комплекс, × 11000

полисахариды, которые могут быть отнесены в соответствии с примененным методом к типу хондроитинсерной и гиалуроновой кислот. Из третьего и четвертого экстрактов, также объединенных вместе, выделен только один полисахарид, отвечающий типу хондроитинсерной кислоты; гиалуроновой кислоты оказались следы. Этот опыт указывает на то, что при обработке проколлагенового комплекса по методу Севаг в раствор переходит в первую очередь гиалуроновая кислота, а затем уже начинает отделяться более прочно связанная хондроитинсерная кислота.

На рентгенограмме (под большими углами) проколлагена после отделения полисахаридов сохраняются интерференционные максимумы, характерные для проколлагенового комплекса, а именно, межплоскостные расстояния в 2,9; 4,6 и 11—12 Å. Рентгенограмма отделенных по Севаг полисахаридов резко отлична от рентгенограммы белка. Мы получили для хондроитинсерной кислоты, выделенной из проколлагена, аморфную рентгенограмму с одним широким кольцом: внутренний край этого кольца резко очерчен, наружный диффузный. Если рассчитать межплоскостное расстояние по внутреннему краю, то оно соответствует 10,0 Å.

Итак, отделение полисахарида от проколлагена не приводит к изменению рентгенограммы белка под большими углами, но полосатость при этом исчезает. Возникает естественный вопрос, может ли появиться вновь характерная для проколлагена полосатость, если воссоединить отделенный полисахарид с освобожденным белком. Опыты в этом направлении дали положительный результат и показали, что при определенных значениях pH такое воссоединение приводит к образованию полосатых фибрилл с периодом порядка 640 Å. Для воссоединения освобожденный по Севаг проколлаген растворялся в цитратном буфере при значениях pH 3,5; 4,0; 4,4 и 7,1. К этому раствору прибавлялся отделенный полисахарид, предварительно сгущенный в вакууме. Выделение проколлагена производилось диализом по отношению к водопроводной воде или поваренной солью. Опыты показали, что при pH 3,5—4,0 (рис. 3) происходит восстановление полосатой структуры. При повышении pH цитратного буфера в основном образуются неполосатые нити или фибриллы; при pH 4,4 кое-где еще встречаются полосатые фибриллы, а при pH 7,1 они совершенно отсутствуют. Если соотношение между отделенным полисахаридом и белком изменить таким образом, чтобы полисахариды оказались в значительном избытке, то в этом случае также не получается типичных фибрилл; наблюдаются в основном бесструктурные волокнистые образования. Небольшой избыток полисахаридов в наших опытах не влияет на электронно-микроскопическую структуру проколлагена, что находится в хорошем согласии с результатами других авторов (2).

Таким образом, полученные результаты приводят нас к выводу, что периодичность, обнаруживаемая электронным микроскопом и методом рентгеновского структурного анализа под малыми углами, связана не с характером переплетения или расположения полипептидных цепей, а со специфическим взаимодействием белка с полисахаридами. Относительно легкая отделяемость основной массы полисахаридов от белка (эмульгирование и расслаивание полученной эмульсии) указывает на то, что их присоединение к белку происходит не силами ковалентных связей, а более слабыми силами — возможно, водородными и электрохимическими.

Не исключена возможность, что часть полисахаридов поступает из основного вещества в процессе препаративного выделения проколлаген-комплекса. Качественная и количественная сторона этой возможности нами изучаются.

Липоиды не играют роли в образовании электронно-микроскопической структуры проколлагена.

Тот факт, что рентгенограмма под большими углами освобожденного от полисахаридов проколлагена не меняется после их отделения, но поло-

сатость исчезает, указывает также на то, что рентгенограмма под большими углами относится собственно к белку, рентгенограмма под малыми углами, а также электронно-микроскопические данные относятся к комплексу, образованному соединением проколлагена с полисахаридами. Поэтому правильно указывает А. И. Китайгородский ([10]), что нет смысла искать непосредственную связь между диффракционной картиной при обычных углах и большим периодом, описывающим своеобразный дальний порядок в волокнах.

Центральный научно-исследовательский институт
кожобувной промышленности,
Институт патологии и терапии рака
Академии медицинских наук СССР и
Персональная группа чл.-корр. АМН СССР А. И. Струкова
Академии медицинских наук СССР

Поступило
30 V 1955

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Тустановский, А. Л. Зайдес, Г. В. Орловская, А. Н. Михайлов, ДАН, **97**, 121 (1954). [2] J. Highberger, J. Gross, F. Schmitt, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **37**, 286 (1951); J. Gross, J. Highberger, F. Schmitt, Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., **80**, 462 (1952); F. Schmitt, J. Gross, J. Highberger, Proc. Nat. Acad. Sci., **39**, 459 (1953); T. Marrione, J. Exp. Med., **96**, 107 (1952); работы J. Randall и др., приведенные у Randall, Nature and Structure of collagen, 1953. [3] С. М. Бычков, ДАН, **75**, 83 (1950); С. М. Бычков, В. А. Фомина, Вопр. мед. хим., **1**, 33 (1955). [4] R. Bear, Advances in protein Chemistry, **7** (1952). [5] R. Bear, O. Balduan, T. Salo, J. Am. Leather Chem. Ass., **46**, 107 (1951); F. Schmitt, C. Hall, M. Jacus, Biolog. Symposia, **10**, 261 (1943); C. Wolpers, Macromol. Chem., **2**, 37 (1948). [6] E. Schneider, Koll Z., **111**, 136 (1948); J. Randall, Nature and Structure of collagen, 1953, p. 232. [7] Д. Л. Рубинштейн, Усп. совр. биохим., **1**, 9 (1947). [8] Sevag, Biochem. J., **273**, 419 (1934). [9] K. Meyer, Chaffee, J. Biol. Chem., **138**, 49 (1941). [10] А. И. Китайгородский, Рентгеноструктурный анализ мелкокристаллических и аморфных тел, М., 1952, стр. 273.