

ЭЛЕКТРОННОМИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ИЗМЕНЕНИЙ СТРУКТУРЫ КОЛЛАГЕНА В ПРОЦЕССЕ РАСТВОРЕНИЯ И РЕКОНСТРУКЦИИ

С.А.Каспарьянц , Л.П.Балод

В настоящее время в химии высокомолекулярных соединений принято деление структуры исследуемых материалов на тонкую или микро-и макроструктуру. Развитие науки, использование новых методов, а также совместные исследования целого ряда ученых разных специальностей показали, что коллаген представляет собой очень высокую организацию материи на всех степенях своей микро-и макроструктуры - от объединения аминокислот в полипептидные цепи до разнообразного характера переплетений коллагеновых волокон (рис. I), которое мы наблюдаем в различных тканях.

Классическим примером сочетания тонкой и макроструктуры является кожа, состоящая в основном из коллагена.

Вследствие большой сложности структуру коллагена, являющегося типичным представителем фибриллярных белков, подразделяют на первичную, вторичную, третичную, четвертичную и т.д. (рис. I).

Рентгенографические исследования коллагена /1,2/ под малыми углами, а также данные электронномикроскопических на-

блюдений /3,4/ показали, что фибриллы коллагена имеют специфическую, правильно повторяющуюся вдоль оси волокна структуру - поперечную полосатость, основной период повторности которой равен 620-660 Å (рис. 2).

Обработка образцов фосфорно-вольфрамовой кислотой или соединениями тяжелых металлов способствует лучшему выявлению некоторых внутренних деталей структуры, хотя также возможно несколько изменяет структуру объекта. При применении для электронного "окрашивания" фосфорно-вольфрамовой кислоты, уранилацетата и солей хрома обнаруживаются (рис. 3) внутренние периоды. Было показано, что типичные периоды 640-700 Å подразделяются в среднем на 10-13 более тонких поперечных полос, из которых наиболее узкие имеют ширину около 15-20 Å. Предполагается (на основании химических и электронномикроскопических исследований /5/), что поперечные полосы, интенсивно проявляющиеся после обработки фосфорно-вольфрамовой кислотой, содержат преимущественно основные аминокислоты, в то время как особенно контрастные полосы, возникающие в результате обработки уранил-ацетатом, состоят преимущественно из кислых аминокислот.

Изучение структуры натуральных коллагеновых волокон, волокон после обработки щелочно-солевой смесью, продуктов растворения коллагена, искусственных коллагеновых структур, полученных в результате реконституции, проводились на электронном микроскопе марки EM-6 при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Препараты для электронномикроскопического исследования готовились из дермы крупного рогатого скота по следующей методике:

Волокна дермы наносили путем механического контакта на

электролитическую сетку с парлодиевой подложкой. Для увеличения четкости электронномикроскопического изображения использовали метод "негативного" контрастирования калиевой солью фосфорно-вольфрамовой кислоты с pH 7,0. После отмывания от избытка "красителя" и сушки, сетки с объектом рассматривали в электронном микроскопе.

Интерес представляет рассматривание микрофотографии, в которой проявляется продольное разделение фибрилл на более тонкие структурные элементы (рис. 4). Неоднородность продольного расщепления, видимо, можно объяснить тем, что в одних зонах (полярных) филаменты (субфибриллы) находятся в состоянии более плотной упаковки, благодаря наличию в этих зонах цементирующих веществ (углеводных комплексов) и более прочных поперечных связей.

Волокна, извлеченные из образцов после щелочно-солевой обработки, нейтрализации, промывки при рассмотрении на электронном микроскопе показывают очень слабо видимую поперечную полосатость, которая представлена в расплывчатом виде (рис. 5). Обработка щелочно-солевым раствором (10% NaOH в 1 м растворе Na_2SO_4) оказывает постепенное разрушающее действие на структуру коллагена. Видимое изменение можно объяснить значительным разрыхлением структуры коллагена, обусловленным разрушением различных видов межмолекулярных связей, что приводит к дезагрегации (деполимеризации) структурных элементов. Степень дезагрегации, видимо, зависит от интенсивности щелочно-солевой обработки.

Дальнейшая обработка указанных образцов растворами органических кислот приводит к переходу в раствор отдельных

структурных элементов коллагена или их агрегатов.

Перешедшие в раствор ассиметричные палочкообразные частицы коллагена в процессе тепловой денатурации при температуре 38-40°С переходят в глобулярную форму. Этот переход "спираль-клубок" отчетливо виден на микрофотографии 6. При более детальном изучении отдельных глобул четко видна их спиральная конформация (рис. 7).

Реконституция продуктов растворения коллагена различными методами позволяет получить искусственные коллагеновые материалы, обладающие целым рядом ценных свойств.

При электронномикроскопическом исследовании искусственных коллагеновых волокнистых образований, полученных осаждением в обезвоживающей соли, наблюдается поперечная исчерченность (рис. 8). Наиболее четко период повторяемости выявляется на фибриллах, реконституированных в насыщенном растворе Na_2SO_4 .

Наличие поперечной исчерченности, обнаруженной почти по всей длине фибрилл, подтверждает возможность получения из продуктов растворения коллагенсодержащего сырья упорядоченных волоконистых структур. Аналогичные результаты были при рентгеноструктурных исследованиях искусственных коллагеновых волокон, полученных после указанных обработок (рис. 9). На рентгенограмме волокон, (рис. 9) филиерного осаждения, можно констатировать наличие рефлексов, характерных для нативного коллагена (2,9; 4,5-5,0 и II-12 Å).

На основании вышеуказанного можно утверждать, что в продуктах растворения коллагенсодержащего сырья и реконституированных из них искусственных коллагеновых материалах сохранены основные черты нативной структуры коллагена.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Шестакова Н.С., Чернов Н.В., Головтеева А.А. "Тр. МИИЛ", 16, 3, М., 1960.
2. Bear R., Volcrnan O., Acta Crystallogr., 1951, 230-236.
3. Kühn K., Das Leder, Z. anorg. Chem., 1960, 110, 110.
4. Randall R., "Nature", 1960, 169, 1029.
5. Gelhardt E., Kühn K., Z. anorg. Chem., 1963, 320, 1-4, 71-77.