

J/1

XIX ЕВРОПЕЙСКИЙ КОНГРЕСС РАБОТНИКОВ НИИ МЯСНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ  
ВСЕСОЮЗНЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
МЯСНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ СССР  
НЕКОТОРЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ  
С.А.КАСПАРЬЯНЦ, В.М.ГОРБАТОВ, О.О.БАБЛОЯН, Л.Р.БАЛОД

THE XIXth EUROPEAN MEETING OF MEAT RESEARCH INSTITUTES  
THE ALL-UNION RESEARCH INSTITUTE OF MEAT INDUSTRY USSR  
SOME PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF CONNECTIVE TISSUE PROTEINS  
S.A.KASPARYANTS, V.M.GORBATOV, O.O.BABLOYAN, L.R.BALOD

DER XIX. EUROPÄISCHE KONGRESS DER FLEISCHFORSCHUNGSINSTITUTE  
ALLUNIONS-FORSCHUNGSINSTITUT DER FLEISCHWIRTSCHAFT UdSSR  
EINIGE PHYSIKAL-CHEMISCHE EIGENSCHAFTEN VON BINDEGEWEBSEIWEISSEN  
S.A.KASPARJANZ, W.M.GORBATOW, O.O.BABLOJAN, L.P.BALOD

## А Н Н О Т А Ц И Я

Изменения в соединительной ткани приводят к различным, так называемым, "коллагеновым заболеваниям", в основе которых лежат прогрессирующие процессы дезорганизации коллагеновых структур.

Нами изучены некоторые вопросы, связанные с физико-химическими свойствами белка соединительной ткани — коллагена, выделенного из сухожилий от крупного рогатого скота, а также гомогенность продуктов растворения коллагена, молекулярный вес и электрофоретическая подвижность их фракций. Гомогенность и молекулярный вес продуктов растворения коллагена исследовали на хроматографических колонках с гель-сефадексом  $\mathcal{U}$ -200 и сефарозой 2В. Электрофоретическую подвижность белка изучали методом дискового электрофореза в 4%-ном полиакриламидном геле.

Получение фракций коллагена с различным молекулярным весом зависит от метода фракционирования.

Данные исследований позволили сделать вывод о гетерогенности продуктов растворения коллагена.

## S U M M A R Y

Changes in the connective tissue cause various so-called "collagenous diseases" based on progressing processes of collagen structures disorganization.

Some aspects concerning physico-chemical properties of connective tissue protein - collagen, isolated from beef tendons, as well as the homogeneity of collagen solubilization products, the molecular weight and electrophoretic mobility of their fractions were studied. The homogeneity and the molecular weight of collagen solubilization products were investigated on chromatographic columns with gel-cephadex G-200 and cecharose 2B. Protein electrophoretic mobility was studied by disc electrophoresis in 4% polyacrylamide gel.

The preparation of collagen fractions having different molecular weight depends on fractionation method.

This study allowed to conclude on the heterogeneity of collagen solubilization products.

## Z U S A M M E N F A S S U N G

Die Veränderungen im Bindegewebe verursachen verschiedene sogenannte "Kollagenerkrankungen", denen fortschreitende Vorgänge der Desorganisation von Kollagenstrukturen zugrunde liegen.

Wir haben einige Fragen studiert, die mit physikal-chemischen Eigenschaften von Bindegewebe-eiweiß - Kollagen zusammenhängen, das aus Rinderkörpersehnen gewonnen wird. Es wurden auch die Homogenität von Produkten der Kollagenauflösung, deren Molekulargewicht und elektrophoretische Beweglichkeit deren Fraktionen untersucht. Die Homogenität und das Molekulargewicht von Produkten der Kollagenauflösung wurden auf chromatographischen Kolonnen mit Gel-Cephadex G-200 und Cephrose 2B bestimmt. Die elektrophoretische Beweglichkeit des Eiweißes wurde mit Scheibenelektrophorese in 4%-gem Polyakrylamid-Gel verfolgt.

Die Erhaltung von Kollagenfraktionen mit verschiedenen Molekulargewichten hängt von der Fraktionierungsmethode ab.

Die Versuchsergebnisse ermöglichen die Schlußfolgerung über die Heterogenität von Produkten der Kollagenauflösung.

## НЕКОТОРЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ

Все виды соединительной ткани, а также органы, имеющие в своем составе соединительную ткань, содержат коллаген. В зависимости от выполняемой функции и местонахождения органов количество коллагена резко меняется - от 20-30 в сухожилиях и шкуре, до 0,5-2% - в сердце, печени, мышцах (% к весу органа) /1/.

Соединительная ткань играет важную роль в жизнедеятельности организмов, кроме того, являясь аккумулятором коллагена, она представляет интерес для технического использования этого белка при получении кожи, желатина, клея, кетгута, колбасных оболочек и ряда искусственных коллагеновых материалов.

В последнее время, благодаря широкому изучению коллагена, в различных областях науки: биохимии и технологии, медицине и биологии, биофизике, ветеринарии и других большое внимание уделяется вопросам, связанным с установлением причин возникновения, так называемых, "коллагеновых заболеваний" или "коллагенозов". В нормальной соединительной ткани наблюдается определенное соотношение между волокнистыми структурами, клетками и основным веществом. Изменение этого соотношения вызывает заболевания соединительной ткани /2, 3/. В основе их лежат прогрессирующие процессы дезорганизации коллагеновых структур. Изменения обычно сводятся к превращению соединительной ткани, богатой волокнистыми структурами, в форму с преобладанием клеточных элементов.

При других патологических изменениях соединительной ткани наблюдается обратное явление - уменьшение количества основного вещества, обезвоживание и уплотнение фибриллярных структур, частичная потеря тканями эластичности и растяжимости /3/. Примерно к таким же последствиям приводит и старение организма, сопровождающееся изменениями в соединительной ткани. Процессы, происходящие при вышеуказанных отклонениях от нормы соединительной ткани, видимо, обусловлены мерой стабильности высокоупорядоченной структуры коллагена на молекулярном уровне и зависят от образования и наличия интра- и интермолекулярных связей и их изменения под действием различных факторов.

Ранее были представлены данные об изменениях структуры некоторых видов соединительной ткани в процессе пощучения продуктов растворения коллагена и реконституции из них искусственных материалов /4, 5, 6/.

Исследование некоторых вопросов, связанных с физико-химическими свойствами основного белка соединительной ткани-коллагена в состоянии *in vitro*, в значительной мере облегчает изучение явлений, происходящих с ним в состоянии *in vivo*.

Исследованию физико-химических свойств соединительной ткани в последние годы было посвящено много работ. Изучали содержание проколлагена и оксипролина в шкуре животных при различных физиологических и патологических состояниях, возможность включения радиоактивного глицина в проколлаген и коллаген здоровых и скорбунных животных /3, 7/, определяли молекулярный вес и другие характеристики молекул проколлагена /7, 8/. Значения молекулярного веса коллагеноподобных белков, определенные различными способами, отличаются друг от друга довольно значительно. Молекулярный вес проколлагена, определенный Бреслером и другими в 1950 г., равнялся 70000 /8/. Орехович и Шпикитер, изучая седиментацию и вязкость проколлагена, получили молекулярный вес около 700000 /7/, Пенч и Цао - равный 400000 /9/, а Бедкер и Доти - 350000 /10/.

Наряду с определением молекулярного веса, большой интерес представляют исследования некоторых физико-химических характеристик продуктов растворения коллагена; степень их гомогенности, возможность разделения этих продуктов на фракции, величина молекулярного веса отдельных фракций и их электрофоретическая подвижность. Объектом исследования служили очищенные продукты растворения коллагена (П.Р.К.) сухожилий крупного рогатого скота. П.Р.К. получали в процессе последовательных щелочно-солевых и кислотных обработок сухожилий до получения однородного высоковязкого раствора с концентрацией по белку 0,8-1% /4/.

Исследования молекулярного веса и гомогенности П.Р.К. сухожилий проводили на хроматографических колонках с гель-сефадексом У -200 и сефарозой 2В. Раствор белка для исследований готовили следующим образом: 2 г сухого коллагена (полученного сублимацией из П.Р.К.) помещали в 200 мл раствора 8 М мочевины, приготовленной на трис-буфере рН 12,5. После центрифугирования белок осаждали ацетоном или насыщенным раствором сульфата натрия

с последующим диализом осадка против дистиллированной воды. Диализованный осадок растворяли в 100 мл 0,04 н. КОН рН 12,5. Для элюции использовали 5 М раствор мочевины рН 12,5 на колонке 2,4 x 5,6 с сефадексом  $\Psi$ -200 (superfine).

Раствор белка наносили в количестве 3 мл. Скорость потока равнялась 3 мл в час. Данные хроматографии П.Р.К. показывают, что коллаген сухожилий крупного рогатого скота по своей структуре не гомогенен и содержит около 6 фракций с молекулярным весом от  $3,0 \times 10^5$  (первая фракция) до  $0,8 \times 10^5$  (шестая фракция). Эти фракции имеют следующий молекулярный вес: I фракция -  $3,0 \times 10^5$ ; 2 -  $1,9 \times 10^5$ ; 3 -  $1,7 \times 10^5$ ; 4 -  $1,3 \times 10^5$ ; 5 -  $1,1 \times 10^5$ ; 6 -  $0,8 \times 10^5$ .

По приведенным данным хроматографии можно рассчитать, что в исследуемом продукте находится в основном три крупные фракции со средним молекулярным весом  $(3,0 \pm 0,5) \cdot 10^5$ ;  $(1,8 \pm 0,3) \cdot 10^5$  и  $(1,0 \pm 0,2) \cdot 10^5$ .

Наличие трех фракций в П.Р.К. можно объяснить довольно жесткой обработкой коллагенсодержащего сырья, в результате которой получается смесь продуктов разрыхления коллагена. Такое состояние возможно при процессах, обеспечивающих селективное расщепление поперечных, а в некоторых случаях и продольных связей в структуре коллагена, что отмечается при получении П.Р.К. Эти данные согласуются с трехспиральным строением макромолекулы коллагена и выходом в раствор при определенных условиях  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  компонентов /II/. Далее изучали хроматографическое разделение этого же белка на колонке 2,4 x 5,6 с сефарозой 2В. Элюцию проводили в более мягких условиях (карбонатный буфер с рН 9,6 и скорость потока 15 мл в час). На сефарозе 2В (она способна разогнать белки с молекулярным весом до 20000000) коллаген сухожилий фракционируется на 4 основные фракции с молекулярным весом: I -  $12,0 \times 10^5$ ; 2 -  $1,5 \times 10^5$ ; 3 -  $1,3 \times 10^5$  и 4 -  $0,2 \times 10^5$ . Разницу в количестве фракций и величин молекулярного веса, полученных на колонке с сефадексом  $\Psi$ -200 и сефарозе 2В, можно объяснить использование различных элюирующих растворов с различным значением рН. Увеличенное число фракций со значительно меньшим молекулярным весом каждой из них на сефадексе  $\Psi$ -200, ориентировочно можно объяснить присутствием в элюате мочевины, которая, как известно, способна рвать межмолекулярные

водородные связи в многокомпонентных белках.

Для изучения электрофоретической подвижности белка коллагена использовали метод дискового электрофореза в 4%-ном полиакриламидном геле, приготовленном на 8 М мочеvine, рН верхнего и нижнего буфера с 8 М мочевиной готовили равным 9. Разгонку проводили в течение 2 час. при сопротивлении 5 ма на 2 мл геля. Напряжение 200 вольт.

Оказалось, что белок коллагена по своей электрофоретической подвижности также не гомогенен и делится на 4 фракции с разной подвижностью. Мы проводили электрофоретическую разгонку коллагена и без мочевины. В результате чего выяснилось, что количество форетических фракций не изменяется, т.е. четыре, с той же электрофоретической подвижностью каждой из них.

Полученные данные еще раз подтверждают наши предположения, что П.Р.К. представляют собой полимолекулярные растворы, в которых, видимо, находятся макромолекулы и их агрегаты, а также осколки тонкой структуры коллагена с широким диапазоном молекулярных весов. Гетерогенность П.Р.К. зависит от методов и материалов, применяемых для их получения, или от селективного расщепления межмолекулярных связей в структуре коллагена.

#### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. С h v a r i l M., Н и г у с h I. *Kořařstri*, 12, 293, 1962.
2. В и н о г р а д о в а О.М. Что такое коллагенозы? М., "Знание", 1967.
3. Р а й х Г. Коллаген. М., Изд. "Легкая индустрия", 1969.
4. Б а л о д Л.Р., К а с п а р ь я н ц С.А. Исследование дермы в процессе перевода ее в растворимое состояние. ХУІ Европейский конгресс работников научно-исследовательских институтов мясной промышленности. София, 1970, 914.
5. Г о р б а т о в В.М., К а с п а р ь я н ц С.А., Б а л о д Л.Р. Исследование аминокислотного состава некоторых видов соединительной ткани в процессе растворения и реконструкции. ХУП Европейский конгресс работников научно-исследовательских институтов мясной промышленности, Лондон, 1971.



6. К а с п а р ь я н ц С.А., Б а б л о я н О.О., Ш е с т а -  
к о в а И.С. Современные биохимические и морфологические про-  
блемы соединительной ткани. Изд. "Наука", СО(АН), Новоси-  
бирск, 1971, 61-64.
7. О р е х о в и ч В.Н., Ш п и к и т е р В.О. Биологическое  
значение, свойства и строение растворимых коллагеноподобных  
белков (проколлагенов). Баховские чтения, ХУШ, 1962.
8. Б р е с л е р С.Е., Ф и н о г е н о в П.Р., Ф р е н -  
к е л ь С.Я. ДАН СССР, 72, 1950, 555.
9. P e n g C h i a - M u      a n d      T i e n - C h i n  
T s a o. "Scientia Sinica", 5, 1956, 691.
10. В о e d t k e r H. a n d D o t y P. "J. Amer. Chem.  
Soc.", 78, 1956, 4267.
- II. М и х а й л о в А.Н. Коллаген кожного покрова и основы его  
переработки. М., Изд. "Легкая индустрия", 1971.