

ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ
СОЕДИНЕНИЯ
1966

Том VIII

№ 1

УДК 678.01.54+547.9

О СТАРЕНИИ КОЛЛАГЕНА

B. A. Пчелин, С. С. Николаева

При длительном хранении нативной и даже дубленой кожи животных происходит изменение ее первоначальных физико-химических и механических свойств. Показано, например, что гигротермическая устойчивость, гигроскопичность и модуль упругости кожи со временем падают [1, 2].

Многие авторы считают, что из всех факторов, способных наиболее сильно менять физико-химические свойства кожи, является температура. Михайловым с сотрудниками [3] показано, что при длительном нагревании мокрой кожи прочность последней падает. Ухудшение механических свойств должно быть связано с изменением молекулярной структуры коллагена [4]. Авторы используют этот фактор для характеристики гигротермической устойчивости кожи.

Рентгеноструктурные исследования Зайдес [5] подтвердили, что в определенных условиях влажности и температуры имеет место изменение структуры коллагена. Показано также, что наблюдаемые изменения структуры при термических воздействиях находятся в полном соответствии с температурой сваривания. Чем ниже температура сваривания, тем при меньшей температуре и упругости пара наблюдается изменение рентгенограммы.

Можно предположить, что под влиянием температуры, света и влаги протекают процессы химического разрушения и различные структурные превращения макромолекул белка, аналогично процессам, имеющим место при старении синтетических высокомолекулярных соединений.

Данная работа посвящена изучению изменений надмолекулярной структуры коллагена под влиянием длительного и одновременного воздействия тепла, УФ-света и влажности окружающей среды.

Методика исследования

В качестве объектов исследования были использованы белковая оболочка «кутизин» (чешская), белковая оболочка, полученная на специальной установке Ленинградского колбасного завода [6], сухожилия крысиных хвостов, желатина, дерма кожи человека и дерма кожи теленка.

Указанные объекты помещали на четыре месяца в специально созданную для этой цели камеру, в которой поддерживали следующие условия: температура — 36°, влажность — 70—80%. Камеру освещали бактерицидными лампами, световой спектр которых содержал УФ-лучи. Камера имела отверстия для притока воздуха (кислорода).

Можно было предполагать, что выбранные нами условия искусственного старения белковых материалов окажутся благоприятными для развития бактериальных и ферментальных процессов, накладывающихся на результаты действия физических факторов. С целью проверки этого предположения был проведен бактериологический контроль. Для этого в образцах желатины, наиболее легко поддающихся

микробиологическим изменениям, было определено количество жизнеспособных клеток до и после старения*. Результаты исследования приведены в табл. 1.

Из приведенных данных видно, что количество жизнеспособных клеток в желатине после старения в папых условиях примерно в 8 раз меньше, чем до старения, что говорит об отсутствии какого-либо бактериального воздействия. Что же касается возможности протекания ферментативных процессов, то, во-первых, желатина и белковая оболочка не содержит ферментов, во-вторых, низкая влажность образцов в условиях искусственного старения (17%) и постоянное облучение УФ-светом являются инактивирующими условиями для ферментов.

Структуру указанных объектов до и после «искусственного» старения исследовали следующими методами.

1. Определение плотности при помощи электромагнитного поплавка. Этот метод, разработанный Метри и Престоном [7] для изучения структуры полимеров, впервые применен нами для белков. Преимущество этого метода заключается в том, что он позволяет не только фиксировать до пятого знака плотность тонкой структуры полимера, но и изучать кинетику изменения ее в разных средах.

При выборе среды, используемой для измерения плотности, мы учитывали, что коллаген не должен взаимодействовать с этой жидкостью и растворимость воды в последней должна быть ничтожно мала. Исходя из этого, в качестве среды был выбран *n*-килол.

Образцы коллагена предварительно вакуумировали при 10^{-6} мм рт. ст.

2. Определение температуры сваривания.

Сваривание дермы кожного покрова животных впервые было описано Поварниным и Агеевым [8]. С тех пор этот метод используют для качественной оценки величины межмолекулярных связей коллагена. Для этой цели нами был создан прибор, названный «термоэластодинамометром».

На рис. 1 представлена схема этого прибора. Исследуемый образец коллагена в виде волокон сухожилий или ремешка дермы кожи 1 закрепляли одним концом к неподвижной стойке, другим концом прикрепляли к железному сердечнику 2, который перемещается в электромагнитной катушке 3 дифференциального трансформатора. Ко второму концу сердечника через свободно посаженный шкив 4 приложена нагрузка 5, уравновешивающая правую сторону прибора или несколько превышающая ее. Незначительные перемещения сердечника (порядка 0,05 мм) создают изменения напряжения во вторичной обмотке катушки, которые передаются на самописец потенциометра ЭПП-09 (A). Испытуемый образец помещали в термостатируемый сосуд 6 с 0,9%-ным раствором NaCl, температуру которого регулировали с точностью до $\pm 0,1^\circ$. Описанный

Таблица 1
Количество жизнеспособных клеток бактерий на 1 г желатины

До старения	После старения
50	0
500	50
643	112
Средние 400	54

прибор позволяет с высокой точностью фиксировать линейные изменения образца при определенной температуре и нагрузке.

3. Рентгеноструктурный анализ указанных объектов производили на рентгеновской установке УРС-55А.

Экспериментальные данные и их обсуждение

В табл. 2 представлены результаты измерения плотности различных белковых объектов до и после «искусственного» старения.

Данные табл. 2 показывают, что плотность объектов после выдерживания в жестких условиях значительно снижается. Такое изменение плот-

* Бактериологический контроль был проведен в Лаборатории биохимии микробов Института биологической и медицинской химии В. В. Еременко, за что авторы приносят ему глубокую благодарность.

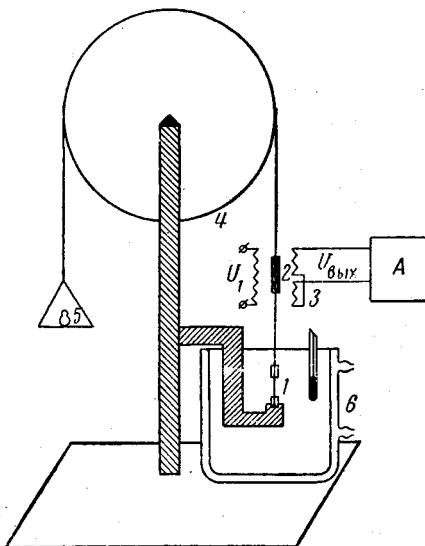


Рис. 1. Схема прибора для определения температуры сваривания

Таблица 2

Влияние «искусственного» старения на плотность белковых объектов

Наименование объекта	Плотность, d		Δd
	до старе-ния	после старения	
Дерма кожи теленка	1,21900	1,13552	0,08348
Дерма кожи человека	1,22933	1,15995	0,06938
Сухожилие крысиных хвостов	1,32102	1,25521	0,06581
Белковая оболочка «кутизин», отечественная (нефиксированная)	1,23424	1,16781	0,06643
То же, чешская (фиксированная)	1,20777	1,20897	0,00120
β -Желатина	1,33439	0,98485	0,34954
α -Желатина	1,32019	0,62195	0,69824

Таблица 3

Влияние «искусственного» старения на межплоскостные расстояния

Наименование объекта	Межплоскостные расстояния, Å									
	до старения				после старения					
	AA'	BB'	CC'	DD'	EE'	AA''	BB'	CC'	DD'	EE'
Сухожилие крысиного хвоста	12,2	8,1	6,0	4,2	3,6	11,3	--	5,9	--	3,74
Белковая оболочка «кутизин»	11,3	7,0	5,5	3,79	2,94	11,7	--	5,5	3,88	2,99
Коллагеновое волокно *	11,3	--	4,6	--	--	11,3	6,2	4,07	3,01	--
Дерма кожи человека	12,4	6,2	4,34	3,2	--	11,5	5,61	4,4	3,1	--
Дерма кожи теленка	11,7	6,2	4,07	3,1	--	11,7	6,05	4,0	3,2	--
β -Желатина	10,9	5,4	3,9	2,98	--	11,7	5,8	3,9	2,94	--
α -Желатина	13,0	4,95	4,1	3,0	--	10,6	5,2	4,07	--	--

* Объект получен на опытной установке белковой оболочки (г. Ленинград).

Таблица 4

Влияние «искусственного» старения на температуру сваривания

Наименование объекта	Температура сваривания, °C	
	до старе-ния	после старения
Дерма кожи человека	63	57
Дерма кожи теленка	68	54
Белковая оболочка (отечественная)	37	25
Сухожилие крысиного хвоста	53	32

ности указывает на то, что совместное воздействие на коллаген тепла, света и влаги приводит к нарушению упорядоченности его структурных элементов. Эти данные согласуются с результатами рентгеноструктурного метода исследования и температурами сваривания. Данные рентгеноструктурного исследования, приведенные в табл. 3, также показывают, что в процессе выдерживания образцов в камере ускоренного старения меняется их молекулярная структура.

Характерным для всех объектов, подвергнутых «искусственному» старению (табл. 3), является уменьшение количества рефлексов и их интенсивности, а в некоторых случаях изменение величины межплоскостного расстояния.

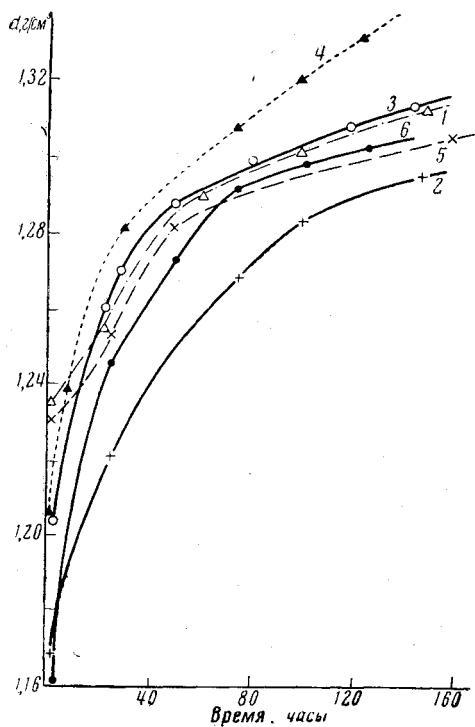


Рис. 2

Рис. 2. Влияние *n*-ксилола на плотность коллагена:

1 — дерма кожи теленка до старения; 2 — то же после старения; 3 — белковая оболочка «кутизин» (чешская) до старения; 4 — то же после старения; 5 — дерма кожи человека до старения; 6 — то же после старения

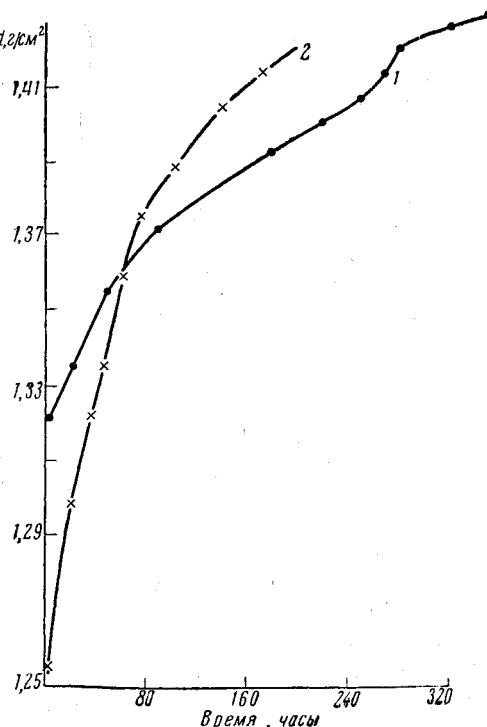


Рис. 3

Рис. 3. 1 — Сухожилие крьсишного хвоста до старения, 2 — то же после старения

Снижение температуры сваривания указанных объектов в результате «старения» свидетельствует об ослаблении межмолекулярных связей (табл. 4).

Полученные результаты показывают, что в результате совместного воздействия тепла, света и влаги происходит нарушение квазикристалличности коллагена и возникновение аморфного состояния, соответствующего беспорядочному клубку.

Известно, что фиксация (дубление) значительно затормаживает процессы изменения структуры коллагена под влиянием температуры и влаги [9]. Так, в случае фиксированной белковой оболочки «кутизин» (чешская) плотность ее практически не изменилась (рис. 2). Следует отметить, что длительное пребывание исследованных образцов в *n*-ксилоле (рис. 2 и 3) в процессе определения плотности приводит к уплотнению их структуры. Такое явление указывает на то, что в процессе «искусственного» старения протекают обратимые конформационные превращения макромолекул коллагена по типу спираль \rightleftharpoons клубок.

Из литературных данных известно, что если среда, в которой определяется плотность, является пластификатором для вторичных структурных элементов полимера, то плотность последнего возрастает [10]. Судя по результатам, *n*-ксилол является таким пластификатором для макромолекул коллагена.

Одним из нас было показано ранее [11], что при погружении в неполярную среду желатина становится гидрофобной. Можно предположить, что в *n*-ксилоле макромолекулы коллагена ведут себя аналогичным образом. Отсюда становится понятным пластифицирующее действие *n*-ксилола по отношению к коллагену.

Из рис. 2 и 3 следует, что исследованные объекты, не подвергавшиеся «искусственному» старению, также способны уплотняться в *n*-ксилоле. Это явление свидетельствует о том, что структура исследованных объектов является неравновесной.

Очевидно, плотность указанных образцов в нативном состоянии значительно выше найденной. Следовательно, начальная величина плотности коллагена, полученного в различных условиях, может характеризовать жесткость той или иной обработки.

Однако скорость изменения плотности исследованных объектов в *n*-ксилоле после старения примерно в 1,5—1,7 раза выше, чем до старения, что свидетельствует о том, что под влиянием тепла, света и влаги во времени происходят обратимые конформационные превращения макромолекул коллагена по типу спираль \rightleftharpoons клубок.

Естественно, что *n*-ксилол легче проникает в разупорядоченную структуру, способствуя переходу макромолекул в наиболее термодинамически выгодное состояние.

Аналогичные результаты были получены при обработке коллагена и миозина ацетоном. По сообщению авторов [12], плотность указанных объектов возросла до 1,8—2 г/см³.

Выводы

1. Измерением плотности, температуры сваривания и рентгеноструктурным анализом показано, что под влиянием тепла, света и влаги происходит разупорядочивание молекулярной упаковки коллагена. Высказано предположение о связи наблюдаемого явления с известными конформационными превращениями белков коллагеновой группы по типу спираль \rightleftharpoons клубок.

2. Показано, что *n*-ксилол способствует уплотнению структуры коллагена, что свидетельствует о его пластифицирующем действии.

Поступила в редакцию
3 III 1965

ЛИТЕРАТУРА

1. Ю. Л. Кавказов, Взаимодействие кожи с влагой, Гизлегпром, 1952, стр. 223.
2. G. Reich, H. Legutke, Z. Chem., 3, 67, 1963.
3. А. Н. Михайлов, С. М. Бреслер, Н. Л. Садовников, Кожебувная промсть СССР, 1939; № 11, 27. 1938, № 6, 18.
4. С. И. Соколов, Сб. работ физико-химич. отд. ЦНИКП, 1937, стр. 5.
5. А. Л. Зайдес, Сб. работ ЦНИКП, 1947, № 15, 129.
6. А. П. Борисов, Ж. мясная индустрия, 1962, № 1, 23.
7. S. M. Matthe, J. M. Preston, Text. Inst., 40, 831, 1949.
8. Г. Г. Поваринин, М. П. Агеев, Вестн. кожсиндиката, 1923, стр. 45.
9. А. Л. Зайдес, Структура коллагена и ее изменения при обработках, Ростехиздат 1960 г., стр. 253.
10. Н. В. Михайлов, Э. З. Файнберг, М. Козлер, Высокомолек. соед., 2, 1031, 1960.
11. В. А. Пчелин, И. И. Короткина, Ж. физ. химии, 12, 50, 1938.
12. E. Heidemann, W. Riess, Z. phys. Chem., 334, 224, 1963.

ABOUT AGING OF COLLAGEN

V. A. Pchelin, S. S. Nikolaeva

Summary

The paper deals with the collagen supermolecular structure changes as the result of «artificial» aging. By means of density and welding temperature measurements and X-ray analysis it was shown that heat, light and moisture action results in distortion of order of collagen molecular packing. The suggestion was put forward that the phenomenon is related to known protein molecules transformation of helix \rightleftharpoons coil type. It was established that *p*-xylene acts as collagen plastisizer so it facilitates its densier packing.