

М. Ш. МОГИЛЕВСКИЙ и А. Л. ЛАУФЕР

ДЕЙСТВИЕ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОЙ РАДИАЦИИ НА ГИАЛУРОНОВУЮ КИСЛОТУ

(Представлено академиком Л. А. Орбели 13 V 1950)

В работе ⁽¹⁾ нами было показано, что при облучении растворов гиалуроновой кислоты рентгеновскими лучами происходит деполимеризация полисахарида. Это обстоятельство может иметь значение при объяснении механизма, лежащего в основе увеличения проницаемости кожи при воздействии на нее рентгеновскими лучами. В настоящем исследовании изучалось влияние на гиалуроновую кислоту ультрафиолетового облучения.

Гиалуроновые соли выделялись из пупочного канатика по методу Мак-Клина, Роджерса и Виллиамса ⁽²⁾. Гиалуронидаза получалась из бычьих тестикул методом Моргана и Мак-Клина ⁽³⁾. Активность гиалуронидазы определялась муциновым методом по М. Могилевскому и Л. Коган.

Для облучения брались растворы полисахарида с различной удельной вязкостью, от 1,5 до 11,0 ($(\eta_h - \eta_w)/\eta_w$, где η_h — вязкость гиалуроната, а η_w — вязкость воды). Изменение вязкости растворов после облучения ультрафиолетом вычислено в процентах по отношению к исходной удельной вязкости. Вязкость измерялась в вискозиметре Оствальда при стандартных условиях. Источником облучения служила кварцевая лампа с горелкой ПРК-4. Рабочее напряжение тока обычно составляло 60—65 в. Квантиметрия радиации производилась в ультрафиолетовых единицах (у. ф. е.) по Залькиндсону. Облучение растворов гиалуроната велось на расстоянии 20—30 см от лампы. Время освещения вариировалось от 1—2 до 80 мин.

Растворы полисахарида наливались в чашки Петри в объеме 12 мл. Во время облучения чашки с растворами помещались на лед. Контрольные измерения показали, что температура облучаемых растворов варировала от 2 до 8°. При продолжительном облучении наблюдалось незначительное испарение жидкости. В этих случаях растворы гиалуроната после облучения доводились водой до первоначального объема. Контрольная порция гиалуроната помещалась при облучении рядом с опытной, но закрывалась стеклянной пластинкой. После освещения производилось повторное определение вязкости и муцинообразующей способности как облученных, так и контрольных растворов. Всего было проделано свыше 80 опытов. Результаты исследований представлены на рис. 1 и в табл. 1.

Из рис. 1 и из табл. 1 видно, что при облучении у. ф. (50—480 единиц) растворов гиалуроната удельная вязкость их понижалась на 20—80% в зависимости от дозировки радиации. Рис. 1 суммирует результаты облучения разными дозами у. ф. (от 50 до 300 единиц) растворов

гиалуроната с исходной удельной вязкостью, равной 3,2. Из рис. 1 видна прямая зависимость падения вязкости растворов гиалуроната от величины дозы ультрафиолетового облучения.

Одновременно с понижением вязкости под действием ультрафиолетовой радиации в растворах гиалуроната наступают другие изменения, характеризующиеся утратой способности этих растворов давать муцинообразные осадки при добавлении к ним белка и подкислении до pH 4,5. Так, из табл. 1 видно, что растворы гиалуроната натрия с удельной

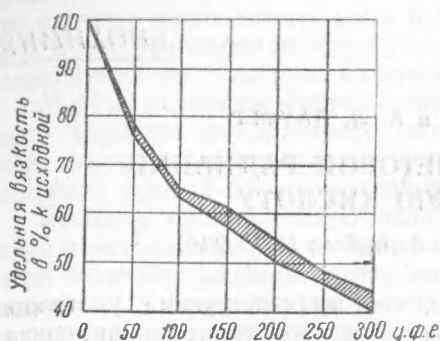


Рис. 1. Влияние у. ф. радиации на вязкость гиалуроната

вязкостью от 1,5 до 3,3 после облучения их у. ф. в дозах 50—100 единиц почти всегда утрачивали муцинообразующую способность. Более вязкие растворы (опыты №№ 12, 13, 14, 15 и 16) утрачивали эту способность при несколько больших дозировках облучения.

Обращает на себя внимание то обстоятельство, что растворы облученных гиалуронатов, не обнаруживавших муцинообразующей способности, были еще достаточно вязкими. Из табл. 1 видно, что в опытах №№ 5, 6, 9, 13 и 16

удельная вязкость облученных растворов, утративших способность к муцинообразованию, была еще значительной и равнялась 2,0—2,66. Исследованиями М. Могилевского и Л. Коган было установлено, что растворы нативного полисахарида с удельной вязкостью, равной 2,0—2,5, обнаруживают еще муцинообразующую способность даже после разбавления их в 7 раз. Интересно отметить, что аналогичные результаты были

Таблица 1

Влияние ультрафиолетовых лучей на вязкость и муцинообразующую способность растворов гиалуроната

№	Дозы у. ф. радиации в у. ф. е. по Залькиндсону	Раствор гиалуроната				
		Удельная вязкость			Муцинообразующая способность	
		до облучения	после облучения	понижение вязкости в %	до облучения	после облучения
1	48	1,50	1,20	20,0	+	—
2	50	1,58	1,19	24,7	+	±
3	100	1,58	1,00	37,0	+	—
4	50	3,20	2,50	22,0	+	+
5	100	3,20	2,40	25,0	+	—
6	50	2,40	2,08	13,4	+	—
7	56	1,72	1,24	28,0	+	—
8	72	1,50	1,00	33,4	+	—
9	84	3,34	2,55	24,0	+	—
10	96	1,6	1,1	31,2	+	—
11	100	2,0	1,6	20,0	+	—
12	200	3,8	1,7	55,0	+	—
13	400	10,5	2,0	81,0	+	—
14	300	7,3	1,3	82,0	+	—
15	480	4,45	0,95	79,0	+	—
16	400	11,0	2,66	76,0	+	—
17	1500	2,5	0,02	99,2	+	—

получены одним из нас совместно с П. Киселевым и Л. Коган (1) при облучении растворов гиалуроната рентгеновскими лучами.

Дегградация гиалуроната под влиянием ультрафиолетовой радиации не доходит до гидролитического распада полисахарида. Мы не обнаружили продуктов расщепления гиалуроната в растворах после облучения их у. ф. Вместе с тем, понижение вязкости растворов гиалуроната и утрата ими муцинообразующей способности под влиянием ультрафиолетовой радиации, несомненно, являются результатом структурных изменений в молекуле полисахарида. С этой точки зрения представлялось интересным исследовать, сохраняется ли у облученных гиалуронатов способность атаковываться гиалуронидазой.

Приводим один из опытов. Раствор гиалуроната с относительной вязкостью 3,5 подвергся облучению у. ф. в дозе 1500 единиц. При этом раствор потерял муцинообразующую способность, а относительная вязкость его понизилась до 1,02, что свидетельствовало о полной деполимеризации полисахарида. Вместе с тем гиалуронат не подвергся при облучении гидролитическому распаду, на что указывало отсутствие ацетилглюкозамина в растворе. К облученному полисахариду была добавлена тестикулярная гиалуронидаза, после чего раствор был помещен в термостат при 37°. Контролем служила смесь нативного гиалуроната (с относительной вязкостью 3,5) с тем же энзимом. Об энзиматическом расщеплении полисахарида в растворах мы судили по накоплению в них ацетилглюкозамина, содержание которого в опыте и контроле после 24 час. инкубации оказалось одинаковым.

Из данных опыта вытекает, что раствор гиалуроната, облученный 1500 у. ф. е. и утративший после облучения наиболее характерные свойства (муцинообразование и вязкость), обнаружил такую же способность атаковываться гиалуронидазой, как и нативный полисахарид.

Литературные данные и наши собственные исследования позволяют характеризовать гиалуроновую кислоту как лабильное соединение. Так, растворы этого полисахарида легко теряют свою вязкость под влиянием различных веществ: электролитов (4), аскорбиновой кислоты (5), восстановителей (5) и после воздействия лучистой энергии. Отмечая влияние ультрафиолетовой радиации на гиалуроновую кислоту, необходимо при объяснении этого факта учитывать возможность заражения препаратов гиалуроновой кислоты следами гиалуронидазы. Так, Хобби, Дэвсон, Мейер и Чаффи (6) выделили из кожи гиалуроновую кислоту и вместе с тем сообщили, что экстракты из этой ткани содержат фактор диффузии. Предположение о загрязнении препаратов гиалуроновой кислоты следами гиалуронидазы оправдано еще и известным фактом медленного падения и вязкости растворов полисахарида при хранении их.

Приведенные данные дали повод ставить под сомнение факт прямого действия лучей у. ф. на гиалуроновую кислоту и высказать предположение, что деполимеризация гиалуроната при облучении может быть обусловлена действием на полисахарид следов гиалуронидазы, активированной ультрафиолетом.

Такое предположение опровергается нашими опытами:

1. Мы подвергли облучению ультрафиолетом раствор гиалуроната, предварительно прогретый при 100° в течение 12 минут (на специальном опыте мы убедились, что при этих условиях следы гиалуронидазы разрушаются). После прогрева раствор полисахарида имел удельную вязкость 10,3. После облучения этого раствора 200 у. ф. е. удельная вязкость полисахарида понизилась до 4,32, т. е. на 58%. Таким образом, прогретые растворы гиалуроната, в которых исключается возможность содержания следов гиалуронидазы, теряли свою вязкость под действием ультрафиолета.

2. К раствору гиалуроната был добавлен раствор иода, известного как парализатор гиалуронидазы. Испытание этого раствора в отдельной

пробе показало, что вязкость его дальше не понижалась при добавлении к нему гиалуронидазы. Следовательно, добавленного иода было вполне достаточно, чтобы предотвратить действие предполагаемых следов энзима в растворе полисахарида. Раствор гиалуроната с примесью иода имел удельную вязкость 1,75. Облучение этого раствора 200 у. ф. е. понизило удельную вязкость полисахарида до 0,35, т. е. на 80 %.

3. Мы подвергли облучению сам энзим, чтобы проверить, активизируется ли он у. ф. Растворы тестикулярной гиалуронидазы были подвергнуты действию различных доз у. ф. Условия облучения растворов гиалуронидазы были аналогичны указанным для опытов по облучению гиалуроната. Рис. 2 суммирует результаты облучения растворов тестикулярной гиалуронидазы у. ф. в дозах от 50 до 300 единиц. Как видно из рис. 2, активность гиалуронидазы значительно понижалась под действием у. ф., составляя 12% исходной после облучения ее 300 у. ф. е.

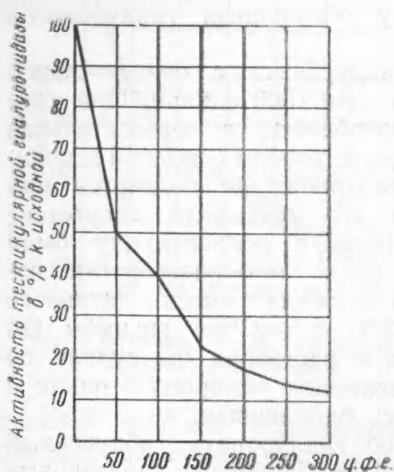


Рис. 2. Влияние у. ф. радиации на активность тестикулярной гиалуронидазы

Таким образом, из приведенных опытов 1, 2 и 3 вытекает, что изменения свойств гиалуроната под влиянием у. ф. являются результатом прямого действия этой радиации на полисахарид.

Выводы. 1. При действии ультрафиолетовой радиации на растворы гиалуроната при определенных условиях изменяются свойства полисахарида: понижается вязкость и утрачивается

муцинообразующая способность гиалуроната.

2. Действие ультрафиолетовой радиации на гиалуронат, характеризующееся изменением свойств полисахарида, не лишает его способности атаковываться гиалуронидазой.

3. Изменение свойств гиалуроната под влиянием у. ф. является результатом непосредственного воздействия у. ф. на полисахарид. При этом исключается возможность деполимеризации гиалуроната через посредство активирования гиалуронидазы.

4. При облучении у. ф. (1500 у. ф. е.) растворов гиалуроната не затрагиваются глюкозидные связи в молекуле полисахарида.

Институт эпидемиологии и микробиологии
им. Пастера

Поступило
13 V 1950

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ П. Н. Киселев, М. Ш. Могилевский и Л. С. Коган, Бюлл. эксп. биол. и мед., 3, 207 (1949). ² D. McClean, H. J. Rogers and B. W. Williams, Lancet, 1, 355 (1943). ³ W. T. J. Morgan and D. McClean, Journ. Soc. Chem. Ind., 51, 44, 912 (1932). ⁴ М. Могилевский и Л. Коган, Биохимия, 13, в. 5, 417 (1948). ⁵ C. W. Hale, Biochem. Journ., 38, No. 5, 362 (1944). ⁶ G. L. Hobby, M. H. Dawson, K. Meyer and E. Chaffee, Journ. Exp. Med., 73, No. 1, 109 (1941).