

М. Ш. МОГИЛЕВСКИЙ и И. С. КЛЮЧАРЕВА

О МУЦИНАЗНЫХ СВОЙСТВАХ КРОВЯНЫХ СЫВОРОТОК ЧЕЛОВЕКА И БЕЛЫХ КРЫС

(Представлено академиком А. И. Абрикосовым 19 XI 1952)

Растворы гиалуроновой кислоты (г. к.) обладают замечательным свойством образовывать при смешении их с белками (яичным альбумином или лошадиной сывороткой) гиалуроновобелковые комплексы в нейтральной или слабо кислой среде. При подкислении растворов до рН 4,5 гиалуроновобелковые комплексы выпадают в них в виде своеобразных муциноподобных сгустков. Образование гиалуроновобелковых комплексов не требует длительного времени: подкисление гиалуроновобелковых смесей немедленно после их приготовления ведет к выпадению в них стойких сгустков муцина.

Изучая муцинообразующую способность г. к., мы обнаружили, что если белковым компонентом гиалуроновобелковой смеси является сыворотка человека, то при подкислении смеси сгусток либо вовсе не образуется либо, образовавшись, быстро разрушается. Создавалось впечатление, что сыворотка человека содержит муциназу, которая и предотвращает образование муцина. Этот феномен представляет интерес, в частности, с точки зрения лежащего в его основе механизма. Изучение его составило цель настоящей работы.

Исследовалось влияние сывороток человека и теплокровных животных на муцинообразующую способность и вязкость гиалуроната. Препараты гиалуроната натрия выделялись из лупочных канатиков человека по методу, описанному в (1). Общий азот препаратов составлял 3,2—4,5%.

Действие сывороток на муцинообразование изучалось следующим образом. В ряд пробирок наливали по 0,5 мл физиологического раствора, затем в 1-ю пробирку наливали 0,5 мл испытуемой сыворотки и после перемешивания переносили из нее 0,5 мл во 2-ю, из 2-й — в 3-ю и т. д. Из последней пробирки удаляли 0,5 мл. К пробиркам добавляли еще по 0,5 мл физиологического раствора и по 0,5 мл водного раствора гиалуроната (со стандартной относительной вязкостью, равной 3). Смеси помещались в водяную баню при 37° на 25 мин. Затем пробирки охлаждали и к каждой добавляли по 0,2 мл 2*N* уксусной кислоты и отмечали результаты (выпадение или отсутствие муцина). Влияние сывороток на вязкость гиалуроната исследовалось при помощи вискозиметра Оствальда. К 9—8 мл раствора гиалуроната добавляли 1—2 мл сыворотки; смесь перемешивали и наливали в вискозиметр. Вязкость определялась при 37°. Для опытов применяли только свежие сыворотки.

Данные, представленные в табл. 1, показывают, что гиалуроновобелковые смеси, в которых белковыми компонентами являлись сыворотки человека и белых крыс, не обнаруживали способности к муцинообразо-

ванию. Так, из опытов №№ 1, 2, 3, 9 и 10 видно, что когда гиалуроновобелковые смеси содержали сыворотки человека или белых крыс в разведениях 1:3, 1:6 и 1:12, в них не образовались сгустки муцина. При меньших же концентрациях этих сывороток в смесях (1:24 и 1:36) последние образовывали стойкие сгустки муцина.

Таблица 1

Муцинообразующая способность гиалуроновобелковых смесей в зависимости от вида содержащихся в них сывороток

№№ опы- тов	Разведение (в физиологич. р-ре)	Разведение сыворотки				
		1:3	1:6	1:12	1:24	1:36
1	Человек (донор № 35)	—	—	—	±	+
2	" (" № 40)	—	—	—	+	+
3	" (" № 41)	—	—	—	+	+
4	Лошадь	+	+	+	+	+
5	Баран	+	+	+	+	+
6	Кролик	+	+	+	+	+
7	Морская свинка	+	+	+	+	+
8	Белая мышь	+	+	+	+	+
9	Белая крыса (1)	—	—	—	+	+
10	Белая крыса (2)	—	—	—	+	+
11	Курица	+	+	+	+	+
12	Человек (до-) Сыворотки про- нор № 40) } греты 30 мин.	+	+	+	+	+
13	Белая крыса } при 58°	+	+	+	+	+

Примечание. + сгусток муцина образуется, — сгусток муцина не образуется, ± нитевидный сгусток муцина.

Феномен отсутствия муцинообразования не обнаружен в гиалуроновобелковых смесях, содержавших сыворотки лошади, барана, кролика, морской свинки, белых мышей и курицы (опыты №№ 4, 5, 6, 7, 8 и 11). Из данных опыта видно, что способность сывороток человека и белых крыс препятствовать муцинообразованию находится в прямой зависимости от концентрации их в гиалуроновобелковых смесях. Предварительные опыты показали, кроме того, что это свойство проявляется наиболее отчетливо при 37° и определенной экспозиции (20—25 мин.).

Мы предположили, что феномен отсутствия муцинообразования в смесях гиалуронат + сыворотка человека или сыворотка белых крыс обязан не особенностям белков этих сывороток, а присутствию в них энзима, подавляющего образование комплекса между сывороточными белками и гиалуронатом. Эта гипотеза подверглась экспериментальной проверке. Прежде всего обнаружилось, что прогревание сывороток при 58° в течение 30 мин. лишает их полностью муциназных свойств. Так, из табл. 1 (опыты №№ 12 и 13) видно, что смеси, содержавшие гиалуронат и прогретые сыворотки человека или белых крыс, обнаружили способность к муцинообразованию. Далее исследовалось влияние сывороток человека и белых крыс на муцинообразование при условии, когда они добавлялись к гиалуроновобелковым смесям, содержавшим белки иного происхождения.

Данные, представленные в табл. 2, показывают, что нативные сыворотки человека и белых крыс способны подавлять муцинообразование при добавлении их к гиалуроновобелковым смесям, содержащим еще и другие белки. Так, в опытах №№ 1, 2, 3, 4 и 5, в которых гиалуроновобелковые смеси содержали наряду с кроличьей сывороткой сыворотку человека, муциновые сгустки не образовались после подкисления смеси.

Между тем как в контрольном опыте № 9, где к гиалуронату была добавлена только кроличья сыворотка, сгусток муцина образовался.

Муцин образовался также и в опыте № 6, где смесь содержала одновременно обе сыворотки — кролика и человека, но где количество последней было недостаточно (всего 0,05 мл), чтобы воспрепятствовать образованию муцина. В опытах с сывороткой белых крыс (№№ 7 и 8) были получены аналогичные результаты.

Суммируя представленные данные (табл. 1 и 2), мы приходим к выводу, что сыворотки человека и белых крыс содержат, по видимому, энзим, подавляющий образование муцина гиалуроновобелковым комплексом.

Остается решить, какова природа фермента, содержащегося в сыворотках человека и белых крыс и препятствующего муцинообразованию. Как известно, в литературе обсуждается вопрос о многообразных функциях гиалуронидазы. Предполагается, что гиалуронидаза является комплексом по меньшей мере трех энзимов: муциназы, разрушающей связь между полисахаридной и белковой частью агрегата, что проявляется в потере гиалуроновобелковой смесью способности образовать сгусток в кислой среде; деполимеразы, деполимеризующей г. к.; и гидролазы, разрушающей гликозидную связь между компонентами полисахарида — глюконовой кислотой и ацетилглюкозаминном. Возникает вопрос, какие свойства гиалуронидазы проявляются в наших опытах. Мы исследовали, присуща ли сывороткам человека и белых крыс способность деполимеризовать гиалуронат.

Опыты показали, что сыворотки человека и белых крыс понижают заметно вязкость г. к., однако в такой же степени, как и физиологический раствор и сыворотки других теплокровных.

Таблица 2

Влияние сывороток человека и белых крыс на муцинообразующую способность гиалуроновобелковых смесей

Ингредиенты смесей в мл	№№ опытов									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Сыворотка человека	0,3	0,25	0,2	0,15	0,1	0,05	—	—	—	—
Сыворотка кролика	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,45	—	—	0,2	—
Физиологический раствор (0,9%)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	—	—	0,3	0,5
Раствор гиалуроната ($\eta=3$) . . .	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Сыворотка белых крыс	—	—	—	—	—	—	0,5	0,5	—	—
Яичный альбумин (0,5% раствор)	—	—	—	—	—	—	0,5	0,5	0,5	0,5
Образование сгустка муцина при рН 4,5	—	—	—	—	—	+	—	—	+	+

Примечание. + сгусток образуется, — сгусток не образуется.

Так, из табл. 3 видно, что сыворотка человека (опыт № 3) понизила вязкость гиалуроната на 45,5%, сыворотка белых крыс (опыт № 6) на 46,6%, сыворотка кролика (опыт № 4) на 43,2%, а физиологический раствор (опыт № 2) на 48,9%. Из этого вытекает, что понижение вязкости растворов гиалуроната сыворотками различных животных обязано со-

держаться в них электролитам, а не энзиму. На это указывает еще и то обстоятельство, что вязкость гиалуроната под влиянием сывороток понижается мгновенно до определенного уровня, оставаясь на нем при дальнейшем продолжительном хранении смесей, в то время, как под влиянием энзима (гиалуронидазы) вязкость гиалуроната падает посте-

Таблица 3

Влияние кровяных сывороток на вязкость растворов гиалуроната

№№ опытов	Ингредиенты смеси	Исходная вязкость* $\frac{\eta_h - \eta_w}{\eta_w}$	Объем в мл	Вязкость смеси	
				$\frac{\eta_h - \eta_w}{\eta_w}$	в %
1	Гиалуронат „к-9“	2	9	1,76	100
	Дистиллированная вода		1		
2	Гиалуронат „к-9“	2	9	0,90	51,1
	Физиологический раствор (0,9%)		1		
3	Гиалуронат „к-9“	2	9	0,96	54,5
	Сыворотка донора (№ 302)		1		
4	Гиалуронат „к-9“	2	9	1,0	56,8
	Сыворотка кролика		1		
5	Гиалуронат „к-9“	2	9	0,95	54,0
	Гретья сыворотка донора (№ 302)		1		
6	Гиалуронат „к-9“	2	9	0,94	53,4
	Сыворотка белых крыс		1		
7	Гиалуронат „к-9“	2	9	0,94	53,4
	Гретья сыворотка белых крыс		1		
8	Гиалуронат „к-9“	2	9	1,34	74,85
	Сыворотка донора диализованная (4 часа против водопроводной воды)		1		
9	Гиалуронат „к-9“	2	9	1,30	73,9
	Сыворотка кролика диализованная (4 часа против водопроводной воды)		1		

* η_h — вязкость гиалуроната, η_w — вязкость воды.

пенно, достигая предела лишь через определенное время. Необходимо подчеркнуть, что прогретые сыворотки понижают вязкость г. к. в такой же степени, как и нативные (опыты №№ 5 и 7), а частично диализованные сыворотки (опыты №№ 8 и 9) теряют в значительной степени способность понижать вязкость г. к.

Результаты опытов, представленные в табл. 3, хорошо объясняются данными работ одного из нас (3, 4) совместно с Л. Коган, показавшими, что электролиты способны резко понижать вязкость г. к.

Суммируя результаты всех опытов, можно видеть, что сыворотки человека и белых крыс, обладая муциназными свойствами, вовсе лишены, однако, способности деполимеризовать г. к. Отсюда вытекает, что эти сыворотки лишены также способности гидролитически расщеплять г. к., так как гидролизу полисахарида должна предшествовать деполимеризация его молекул.

Ленинградский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера

Поступило 18 IX 1952

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ D. McClean, H. J. Rogers, C. W. Williams, Lancet, 1, 355 (1943).
² Е. Я. Гейман, Усп. совр. биол., 23, в. 3, 323 (1947). ³ М. Могилевский, Л. Коган, Биохимия, 13, в. 5 (1948). ⁴ М. Могилевский, Л. Коган, Вопр. мед. хим., 1, в. 1—2, 344 (1949).