

MARIA SADOWSKA, JOLANTA ŁAGOCKA

MUKOPOLISACHARYDY - WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNE, IZOLACJA I WYKORZYSTANIE

Streszczenie

Scharakteryzowano budowę chemiczną i fizykochemiczne właściwości ośmiu mukopolisacharydów–glikozaminoglikanów wyizolowanych z tkanki łącznej. Szczególną uwagę zwrócono na strukturę kompleksów polisacharydowo-białkowych i interakcję proteoglikanów z kolagenem. Wskazano na pośredni udział mukopolisacharydów w kruchości mięsa, poprzez wpływ na sieciowanie kolagenu. Omówiono metabolizm mukopolisacharydów, ich fizjologiczne funkcje w organizmach zwierzęcych oraz możliwość różnorakiego zastosowania.

MUKOPOLISACHARYDY - SKŁADNIKI SUBSTANCJI PODSTAWOWEJ TKANKI ŁĄCZNEJ

Wprowadzenie

Bezpostaciowa substancja podstawowa, która wypełnia przestrzeń między komórkami i włóknami tkanki łącznej, składa się z makrocząsteczek oraz wodnego roztworu składników małych cząsteczkowych. Makrocząsteczki można podzielić na dwie główne grupy: mukopolisacharydy (MPS), obecnie najczęściej nazywane glikozaminoglikanami (GAG), oraz glikoproteiny (GP). Jak dotąd wyizolowano 8 różnych typów MPS. Są to: kwas hialuronowy (HA), chondroityna (Ch), siarczan chondroityny A (Ch-4-S) i C (Ch-6-S), siarczan dermatanu (DS), heparyna (H), siarczan heparanu (HS) oraz siarczan keratanu (KS) [5].

Budowa chemiczna glikozaminoglikanów

MPS są grupą heteropolisacharydów, które składają się z powtarzających się jednostek disacharydowych (DiS), zawierających aminocukier połączony wiązaniem β -

glikozydowym z kwasem uronowym lub heksozą.

HA i Ch wyróżniają się wśród pozostałych MPS brakiem grupy siarczanowej, natomiast KS – brakiem grupy karboksylowej. Cechą charakterystyczną H jest obecność, oprócz typowych estrów siarczanowych, także grup N-sulfonowych.

Z uwagi na zmienność ilości oraz rozmieszczenia grup siarczanowych sulfonowane MPS mają mniej regularną strukturę niż HA. Oprócz typowych DiS jednostek, zawierających jedną grupę siarczanową, spotyka się też jednostki disulfonowane: D - w pozycji 2 kwasu D-glukuronowego i w pozycji 6 N-acetylo-D-galaktozaminy oraz E w pozycjach 4 i 6 N-acetylo-D-galaktozaminy [32]. Istnieją też łańcuchy częściowo lub całkowicie desulfonowane [17]. Ze względu na ścisłe pokrewieństwo strukturalne Ch-4-S i Ch-6-S często są ze sobą wzajemnie zhybrydyzowane.

Najbardziej heterogeniczną strukturę spośród wszystkich MPS wykazuje H oraz HS. Część kwasową DiS stanowi zarówno kwas D-glukuronowy jak i L-iduronowy. Drugim składnikiem jest D-glukozamina, której grupa aminowa może być sulfonowana albo acetylowana.

W zależności od stopnia sulfonowania oraz stosunku molowego kwasu L-iduronowego do D-glukuronowego rozróżnia się H oraz HS. Małosulfonowane PS, bogate w kwas D-glukuronowy, uznaje się za HS, a wielosulfonowane, bogate w kwas L-iduronowy, klasyfikuje się jako H [17]. W tej ostatniej ponad 80% D-glukozaminy posiada N-sulfonowaną grupę, natomiast w HS proporcja ta jest znacznie niższa [32]. Neville i wsp. [18] podają, że w H na jedną jednostkę DiS przypada przeciętnie 2,5 grupy siarczanowej.

Volpi [32] rozfrakcjonował H na dwie frakcje: „fast moving” (FM) i „slow moving” (SM), które różniły się masą cząsteczkową (M_{cz}) i stopniem sulfonowania. We frakcji FM stosunek molowy grup siarczanowych do karboksylowych wynosi ok. 2,1, we frakcji SM 2,7, a w nierozfrakcjonowanej H 2,4. Różnice te wynikają z niejednakowej zawartości procentowej jednostek niesulfonowanych oraz mono-, di- i trisulfonowanych w poszczególnych frakcjach. Frakcja SM zawiera 71% jednostek trisulfonowanych, FM natomiast posiada dużą ilość jednostek nisko- lub niesulfonowanych (w sumie 62%).

Zmienność w stopniu sulfonowania wykazuje również DS. Wśród typowych monosulfonowanych DiS wyizolowanych z bydłowej błony śluzowej jelita obecne są też jednostki disulfonowane. Ta dodatkowa grupa siarczanowa występuje w pozycji 2-O kwasu L-iduronowego [32].

Heterogeniczność cząsteczek MPS przejawia się zróżnicowaniem liczby i położenia grup siarczanowych oraz długością łańcucha. Wg Asghara i Henricksona [2] liczba jednostek DiS w cząsteczce MPS może się zmieniać od 25 do 25 000. Powoduje to trudność w jednoznacznym określeniu M_{cz} poszczególnych MPS, czego wyrazem są

bardzo zróżnicowane dane (tab. 1). Rozbieżności sięgają kilku rzędów wielkości. Tak szerokie zakresy M_{cz} dla danego PS cytowane są niekiedy przez tego samego autora. Wg Mathews [12] M_{cz} Ch-4-S, Ch-6-S i DS mieści się w granicach 340–50 000 Da. Karpiak [8] natomiast podaje, że M_{cz} HA może się zmieniać od 50 tys. do 8 mln, a jej wartość zależy od pochodzenia MPS, np. HA ciała szklatego oka ma znacznie mniejszą M_{cz} , niż wydzielony z pępowiny lub skóry. Zróżnicowanie M_{cz} , wynikające z odmiennych źródeł izolacji, widoczne jest też w przypadku innych MPS (tab. 1). Największą spośród wszystkich MPS M_{cz} , rzędu $1 \cdot 10^6$ Da, posiada HA, a najmniejszą, rzędu kilkunastu kDa - H. M_{cz} Ch-4-S, Ch-6-S i DS są natomiast zbliżone i wynoszą średnio kilkadziesiąt do kilkuset kDa.

Tabela 1

Zestawienie M_{cz} mukopolisacharydów różnego pochodzenia

Mukopolisacharyd	Pochodzenie	M_{cz} [kDa]	Źródło
Kwas hialuronowy	–	5000	[3]
	–	50–8000	[8]
	tkanka łączna		
	szczura	23	[12]
	człowieka	300	[12]
	streptococcus	100	[12]
Chondroityno-4-siarczan	–	340–50000	[12]
	bydlęca rogówka	26	[32]
	chrząstka wieloryba	25	[16]
	mięśnie ryb	74–240	[9]
Chondroityno-6-siarczan	–	340–50000	[12]
	–	40–50	[8]
	bydlęca rogówka	26	[32]
	chrząstka rekina	34	[16]
	mięśnie ryb	74–240	[8]
Siarczan dermatanu	–	340–50000	[12]
	bydlęca błona śluzowa jelita	26	[32]
	skóra świnińska	20	[16]
	mięśnie ryb	74–240	[8]
Heparyna	–	12–35	[12]
	–	15–20	[8]
	bydlęca błona śluzowa jelita	12	[32]
	FM*	8	[32]
	SM*	15	[32]

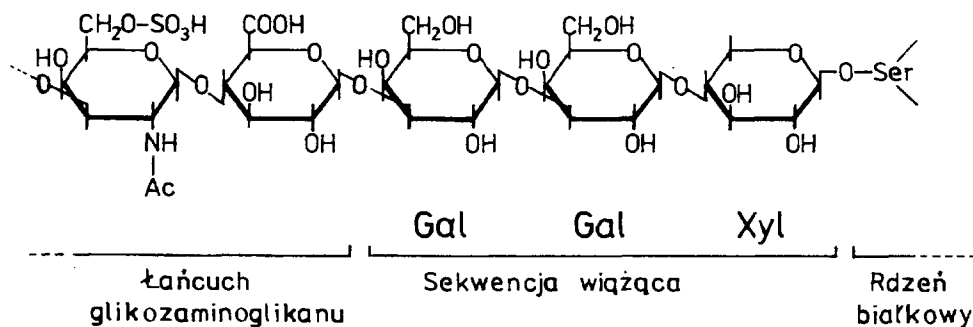
* FM i SM – frakcje heparyny, odpowiednio: „fast moving” i „slow moving”.

W dostępnym piśmiennictwie brak jest danych dotyczących M_{cz} KS. Podaje się jedynie liczbę jednostek DiS, która mieści się w granicach 5–40 [1, 2, 3]. Zatem M_{cz} KS wynosi średnio kilkanaście kDa.

Struktura kompleksów polisacharydowo-białkowych

Z wyjątkiem HA, większość MPS jest związana kowalencyjnie z białkami, tworząc kompleksy, nazywane proteoglikanami (PG). Różnią się one strukturalnie od GP. W GP część sacharydowa stanowi 5–10% ich masy [17], w PG ma ona większy udział niż część białkowa. Poza tym łańcuchy PS, które występują w GP zawierają zwykle nie więcej niż 15 jednostek MS.

PG definiuje się ogólnie jako makrocząsteczki zbudowane z rdzenia białkowego, do którego przyłączone są kowalencyjnie łańcuchy MPS. W przypadku chondroitynosiarczanów (ChS) w połączeniu tym bierze udział trisacharyd o sekwencji Gal-Gal-Xyl, który wiąże się najprawdopodobniej z grupą hydroksylową reszty seryny lub treoniny cząsteczki białka (rys. 1) [27]. KS natomiast tworzy z tymi aminokwasami wiązania kowalencyjne poprzez N-acetyloglukozaminę [19].



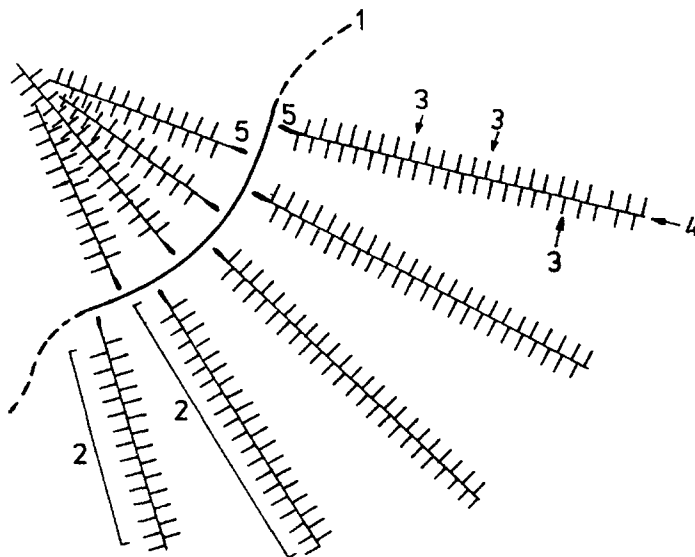
Rys. 1. Struktura połączenia chondroitynosiarczanu z rdzeniem białkowym w proteoglikanie.

W różnych rodzajach tkanek ogólna zawartość i proporcje poszczególnych MPS kształtują się odmiennie. Liczba łańcuchów PS tworzących cząsteczkę GP może zmieniać się od 1 do 100, a każdy PG zawiera zazwyczaj jeden lub dwa typy MPS. M_{cz} tych kompleksów mieści się w granicach od 50 tys. do kilku milionów Da, co jest związane z wielkością i liczbą związanych cząsteczek MPS, jak również z M_{cz} części białkowej [3]. Rdzeń PG zbudowany jest z 2–3 tys. reszt aminokwasowych, a jego długość wynosi 340 nm [2].

Spośród różnych kompleksów polisacharydowo-białkowych dotychczas najlepiej scharakteryzowane są PG chrząstek. Dominują w nich ChS. Obecna jest również nie-

wielka ilość KS. Z powodu dużej zawartości grup anionowych, łańcuchy PS silnie odpychają się wzajemnie. Nadaje to PG usztywnioną, rozwiniętą na zewnątrz rdzenia białkowego strukturę, porównywaną przez niektórych autorów do „szczotki do butelek”.

PG chrząstek mają zdolność łączenia się z HA, który w tych agregatach stanowi część centralną. Wiązanie to odbywa się poprzez N-końcową grupę rdzenia białkowego. Dodatkową stabilność nadają mu globularne białka, połączone zarówno z rdzeniem PG, jak i HA (rys. 2 i 3) o masie ok. 50 kDa. Z pojedynczym łańcuchem kwasu może związać się ok. 100 PG, tworząc w efekcie agregat o M_{cz} ok. $200 \cdot 10^6$ [3, 17].



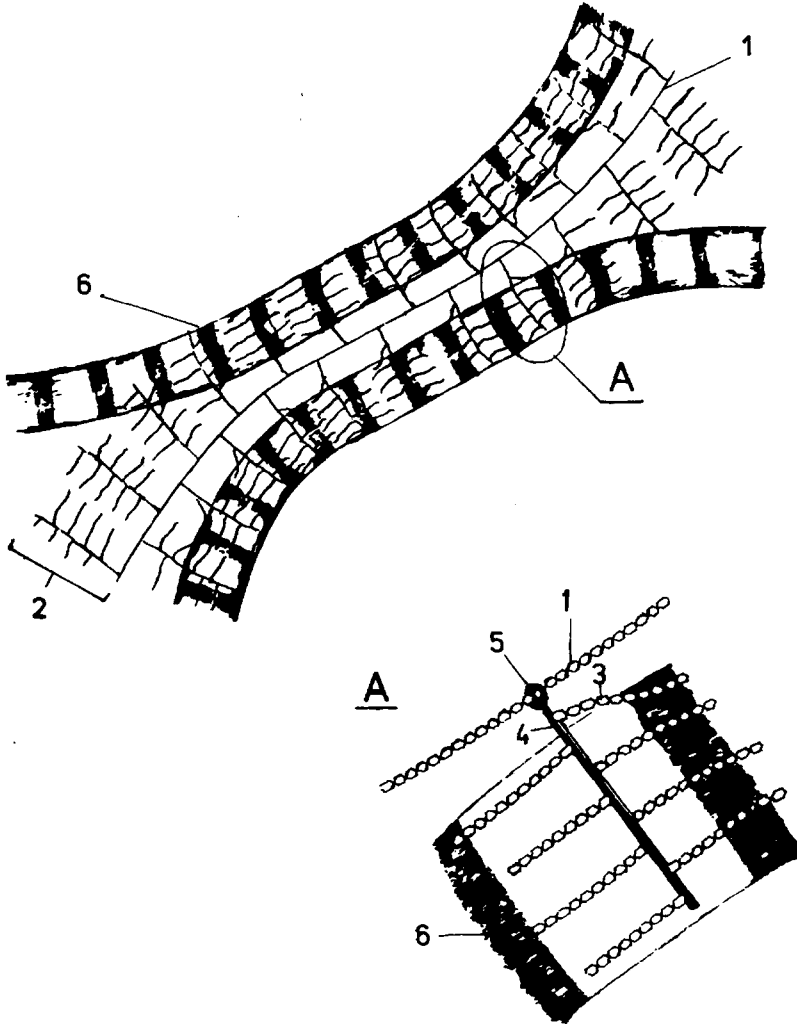
Rys. 2. Struktura kompleksu proteoglikanów chrząstki [wg 17]:

- 1 - kwas hialuronowy,
- 2 - proteoglikan,
- 3 - mukopolisacharydy (gł. siarczany chondroityny),
- 4 - rdzeń białkowy,
- 5 - białko wiążące.

Poszczególne rodzaje mięśniowej tkanki łącznej zawierają różne PG. W omięsnej i namięsnej (*perymysium* i *epimysium*), podobnie jak w chrząstkach, PG zawierają głównie ChS o M_{cz} 95 kDa. W błonie podstawnej (*endomysium*) kompleksy polisacharydowo-białkowe zawierają HS. W ścięgnach natomiast występują małe PG o M_{cz} 50–600 kDa [3].

Połączenie proteoglikanów z kolagenem

Dzięki dużej koncentracji ładunku ujemnego łańcuchy MPS mogą wiązać się elektrostatycznie z kolagenem, tworząc w ten sposób usieciowaną sztywną strukturę (rys. 3). Połączenia te tworzą się między kwasowymi grupami MPS i zasadowymi resztami aminokwasowymi kolagenu. PG tworzą mikrofibrylarne mostki, które łączą ze sobą fibryle kolagenowe. W połączeniach tych widoczna jest okresowość wynikająca prawdopodobnie ze specyficznego rozmieszczenia w kolagenie aminokwasów, oddziałujących elektrostatycznie z MPS.



Rys. 3. Makrocząsteczkowa struktura substancji podstawowej chrząstki [wg 17]: 1 – kwas hialuronowy, 2 – proteoglikan, 3 – chondroityno-4/6-siarczany, 4 – rdzeń białkowy, 5 – białko wiążące, 6 – kolagen typu II.

WYSTĘPOWANIE MUKOPOLISACHARYDÓW

Zawartość mukopolisacharydów w tkankach

Najbogatszym źródłem MPS jest tkanka chrzęstna [3, 8, 17]. Wg Synowieckiego i wsp. [28] sucha masa (s.m.) chrząstek bydłęcej przegrody nosowej zawiera ok. 12% MPS, zaś chrząstek tchawicy – 10%. W rogówce MPS stanowią 1,8% s.m. [14], w kościach i aorcie odpowiednio 3 i 1% s.m. [14], w przeponie brzusznej – 0,9% s.m. [28], zaś w skórze zaledwie 0,3–0,6% s.m. [21, 22, 30].

Skład mukopolisacharydowy różnych rodzajów tkanki łącznej

W większości rodzajów tkanki łącznej obecne są różne MPS. Natomiast w ciałku skłistym oka i mazi stawowej jest tylko HA. Ten MPS w małych ilościach znajduje się we wszystkich rodzajach tkanki łącznej (tab. 2).

Tabela 2

Występowanie mukopolisacharydów

Mukopolisacharyd	Występowanie*
Kwas hialuronowy	pępowina, ciałko szkliste oka, maź stawowa , ściany aorty, chrząstki, więzadło karkowe, zastawki serca, skóra, szpik, otoczki niektórych szczepów dwoinek zapalenia płuc i paciorkowców
Chondroityna	rogówka oka , chrząstki płodów
Chondroityno-4-siarczan	chrząstki, kości, rogówka oka , pępowina, zastawki serca, skóra, ślina, więzadło karkowe, ściany naczyń krwionośnych, mózg, ścięgna
Chondroityno-6-siarczan	chrząstki, kości, rogówka oka , pępowina, zastawki serca, skóra, ścięgna, ściany aorty
Siarczan dermatanu	skóra, ścięgna, więzadło karkowe , zastawki serca, aorta, płuca, mózg, śledziona, mocz, mięśnie gładkie jelita cienkiego, błona śluzowa jelita
Siarczan keratanu	rogówka oka , chrząstki, tarczki międzykręgowe, tętnica, kości
Heparyna	wątroba, komórki tuczne , skóra, krwinki białe, mięśnie, płuca, serce, nerki, śledziona, błona śluzowa jelita, ściany naczyń krwionośnych
Siarczan heparanu	mięśnie gładkie, ściany aorty

* Pogrubieniem wyróżniono główne miejsce występowania

Niektóre rodzaje tkanek wyróżnia specyficzny skład MPS. W rogówce ok. 50% wszystkich MPS stanowi KS, a 20% – ChS [3, 15]. Uważa się tę tkankę za jedyne źródło Ch [14]. Chrząstki zawierają głównie Ch-4-S i Ch-6-S, które według niektórych autorów stanowią w tej tkance 100% wszystkich MPS [17]. W bydłęcej chrząstce tchawicy Ch-4-S stanowi 56% mieszaniny MPS, natomiast Ch-6-S 38% [32], a w

tkance chrzęstnej pisklęcia kury odpowiednio 71 i 26% [20]. W chrząstkach nie stwierdzono obecności DS [27]. Jest on charakterystyczny dla skóry, ścięgien i zastawek serca.

Tkanki zbudowane z kolagenu typu I np. ścięgna zawierają mało PG, których część sacharydową stanowi prawie wyłącznie DS. Między fibrylami kolagenu typu II występuje dużo kompleksów polisacharydowo-białkowych, w których dominują łańcuchy ChS. W tkankach zbudowanych z kolagenu typu III jest HS.

Wpływ różnych czynników na zawartość mukopolisacharydów

Różnice w typie i ilości MPS występują nie tylko pomiędzy poszczególnymi rodzajami tkanek, ale również wśród różnych gatunków zwierząt. Wg Meyera i wsp. [14] skóra królika oprócz DS, będącego w tej tkance głównym PS, zawiera Ch-6-S, który stanowi 30% wszystkich MPS. W skórze świńskiej zawartość tego MPS jest znikoma. Schiller i wsp. [22] stwierdzili, że H, obecna w skórze szczura w ilości 25 mg/100g s.m. nie występuje w skórze ludzkiej, wielbłądziej, świńskiej i króliczej.

Ogólna zawartość MPS w danym rodzaju tkanki jest różna i zależy również od gatunku zwierzęcia. W skórze fok ilość MPS jest o ok. 30% mniejsza niż w skórze bydłowej [30]. W chrząstce świńskiej, końskiej i bydłowej przegrody nosowej zawartość MPS wynosi odpowiednio: 41, 36–39 i 19–23% [7]. Różnice te mogą wynikać z niejednorodności tkanki. Średnia zawartość MPS w bydłowej chrząstce przegrody nosowej wynosi ok. 10% s.m. tkanki, podczas gdy w warstwie środkowej aż 35% [7].

Zróznicowanie składu i ilości MPS w tkankach jest również związane z wiekiem zwierzęcia [2, 3]. W namięśnej 3-dniowych cieląt zawartość MPS wynosi 332 mg/100g s.m., u zwierząt kilkunastomiesięcznych ok. 260, natomiast w tkance 10-letnich krów ok. 200 mg/100g [5]. W bydłowej namięśnej poziom HA obniża się wraz z wiekiem zwierząt. W skórze oprócz HA zmniejsza się również szybkość syntezy ChS. W skórze świńskiej zawartość DS i KS zwiększa się wraz z wiekiem zwierzęcia [14].

Zawartość MPS zależy także od płci, co jest związane z obecnością u osobników żeńskich estrogenu, pobudzającego syntezę MPS. Dotyczy to głównie HA. Wg Cormiera i wsp. [5] zawartość tego MPS w namięśnej 11-miesięcznego byczka jest ok. 50% niższa, niż u jałówki w podobnym wieku.

Na zawartość MPS może mieć wpływ sposób i czas przechowywania surowców, stosowanych do ich izolacji [13]. Przechowywanie tkanki mięśniowej ryb dłużej niż 5 dni w temp. 0°C powoduje daleko posuniętą degradację PG [9]. Podczas składowania chrząstek bydłowych przegród nosowych i tchawic w temp. -18°C nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian zawartości MPS w surowcu, natomiast w temp. 4°C wy-

dajność MPS zmniejszyła się o 26,5% [31]. Degradacja PG spowodowana jest prawdopodobnie działaniem bakteryjnych enzymów – chondroitynazy i hialuronidazy.

CHEMICZNA AKTYWNOŚĆ MUKOPOLISACHARYDÓW

Wprowadzenie

MPS mają charakter polianionów, dzięki czemu wykazują one znaczne powinowactwo do wody, soli i białek. Przy fizjologicznym pH cząsteczki MPS są najczęściej związane z równoważną ilością jonów Na^+ [2]. Skutkiem hydrofilowości łańcuchów jest tworzenie przez nie silnie uwodnionych żeli. Prawie cała ilość wody obecnej w międzykomórkowej substancji podstawowej występuje w formie wody solwatacyjnej cząsteczek MPS [17].

Oddziaływania mukopolisacharydów z białkami

W połączeniach MPS z rdzeniem białkowym w PG główną rolę odgrywają wiązania kowalencyjne. Natomiast wiązanie MPS z kolagenem następuje za pomocą oddziaływań jonowych [1, 2, 9, 12]. Biorą w nich udział głównie grupy $-\text{COO}^-$ i $-\text{OSO}_3^-$ MPS oraz ϵ -aminowe grupy reszt lizyny, guanidylowe grupy reszt argininy oraz N-końcowe grupy α -aminowe białek. Ponieważ grupy aminowe MPS są w większości zacetylowane, mają one niewielkie znaczenie w tych oddziaływaniach. Najsilniej wiąże się grupa karboksylowa i guanidylowa. Dzięki możliwości tworzenia przez te grupy mezomerycznych struktur rezonansowych, powstają między nimi dwa wiązania wodorowe, współdziałające z siłami elektrostatycznymi.

MPS wyizolowane z tkanek zachowują zdolność do tworzenia wiązań jonowych z białkami w wodnym środowisku. Dowodem tego może być większy wyciek ciepły w pasteryzowanych konserwach, wytwarzanych z bydlęcego mięśnia półbłoniastego, peklowanego solanką z dodatkiem MPS w porównaniu z próbami kontrolnymi, do których nie stosowano MPS [31].

Oddziaływanie MPS z kolagenem zależy od pH i siły jonowej roztworu. Wg Einbinder i Schuberta [6] przy pH powyżej 7,0 wiązanie ChS z kolagenem już nie występuje. Poniżej tego pH obserwuje się wyraźny wzrost intensywności oddziaływań, aż do maksymalnej przy pH 3,5. Większa kwasowość powoduje ponownie ostry spadek ilości związanych ChS. HA natomiast oddziałuje z kolagenem tylko przy $\text{pH} < 3,0$, a maksymalna ilość związanych cząsteczek jest o ok. połowę mniejsza niż w przypadku ChS. H najsilniej wiąże się z kolagenem w środowisku o pH 3,0 [2].

MPS z grupami sulfonowymi mogą tworzyć wiązania jonowe nie tylko z grupami aminowymi i guanidylowymi białek, ale również z ich grupami karboksylowymi za

pośrednictwem mostków solnych przy udziale dwuwartościowych kationów. Umożliwia to istnienie wiązania jonowego przy pH, w którym białkowe grupy aminowe nie są już protonowane.

W fizjologicznych warunkach jonowych energia elektrostatycznego oddziaływania MPS z kolagenem wzrasta wraz ze wzrostem gęstości ładunku i długości łańcucha PS. Siła tego wiązania zwiększa się dodatkowo wraz z długością bocznych łańcuchów zasadowych reszt aminokwasowych kolagenu, jak również stopniem sulfonowania łańcucha PS. Pozycja i orientacja grup siarczanowych i karboksylowych w MPS również ma wpływ na siłę oddziaływań z kolagenem [2].

Obecnie istnieją metody, pozwalające na ilościowe oszacowanie oddziaływań MPS z kolagenem. Opierają się one na oznaczeniu ilości grup zasadowych kolagenu, związanych z kwaśnymi MPS. Trawienie tkanek papainą, powodujące degradację PG, umożliwia wiązanie się zablokowanych wcześniej grup kolagenowych z anionowym barwnikiem. Ilość grup w kolagenie związanych z PG wyznacza się z różnicy ilości związanego barwnika przez kolagen przed i po enzymatycznej hydrolizie [17].

Przeprowadzone tą metodą badania wykazały zależność między typem kolagenu a stopniem jego oddziaływania z PG. Najsilniejsze wiązanie istnieje w przypadku kolagenu typu II. W świńskich chrząstkach tchawicy aż 60% zasadowych grup kolagenu jest zablokowanych przez PG a w skórze ludzkiej, zawierającej głównie kolagen typu I, ok. 18%. Pośredni stopień oddziaływania wykazuje kolagen typu III [17].

Barwienie mukopolisacharydów

PG mają zdolność wiązania się z różnymi barwnikami o charakterze kationowym, jak np. czerwień rutenowa, błękit Alcian, Safranin O [3, 17] czy pochodne ftalocyjanin, zawierające w cząsteczce miedź [23, 24, 25]. Wykorzystanie tych barwników w metodach mikroskopowych pozwala na określenie specyficznej lokalizacji PG w stosunku do fibryli kolagenowych.

Najintensywniejsze zabarwienie uzyskuje się, gdy barwnik stosowany jest przy pH zapewniającym całkowite zjonizowanie reaktywnych grup. W ten sposób, stosując w metodach mikroskopowych roztwory błękitu Alcian przy zmiennym pH, można rozróżnić struktury zawierające estry siarczanowe, jak np. H czy ChS, od innych, posiadających jedynie grupy karboksylowe [17].

Oprócz zmiany pH sposobem identyfikacji MPS we fragmentach tkankowych jest stosowanie zmiennego stężenia elektrolitu. Dla różnych MPS różny jest bowiem punkt krytyczny tego stężenia, tzn. taki, przy którym obserwuje się zmniejszenie intensywności lub zanik zabarwienia. Spowodowane jest to współzawodnictwem kationów elektrolitu z kationami barwnika w zajmowaniu miejsc wiążących w tkankowych polianionach [17].

WŁAŚCIWOŚCI FIZYCZNE

MPS są na ogół dobrze rozpuszczalne w wodzie i w roztworach soli. W alkoholu poszczególne rodzaje MPS wykazują różną rozpuszczalność, co wykorzystuje się w metodach ich rozdziału [14].

Lepkość roztworów wodnych tworzonych przez MPS zależy od ich M_{cz} . Największą lepkość wykazują roztwory HA, a najmniejszą H [6, 8, 17].

Wodne roztwory MPS mają zdolność skręcania płaszczyzny światła spolaryzowanego. Dla H skręcalność optyczna wynosi $+50^\circ$. Dla pozostałych MPS wartości te są ujemne i wynoszą odpowiednio: HA – $70-80^\circ$, Ch-4-S – $30-37^\circ$, Ch-6-S – $16-22^\circ$, DS – $55-63^\circ$, KS – 18° [14, 15, 21, 32].

METABOLIZM MUKOPOLISACHARYDÓW

Wprowadzenie

Biosynteza PG jest złożonym procesem, obejmującym syntezę rdzenia białkowego i łańcuchów MPS. Różne typy PG mają różny rdzeń białkowy. Synteza łańcuchów MPS zaczyna się przyłączeniem cukrów do specyficznych aminokwasów rdzenia białkowego, zazwyczaj seryny lub treoniny. Pierwszym cukrem jest najczęściej ksyloza. Następne cząsteczki dołączane są do końca łańcucha. Proces ten katalizuje transferaza glikozyloza.

Strukturalne modyfikacje cząsteczek, takie jak: sulfonowanie, epimeryzacja czy deacetylacja następują dopiero po zakończeniu polimeryzacji. Obok zróżnicowania liczby i długości łańcuchów, związanych z rdzeniem białkowym, przemiany te wpływają na zróżnicowanie typów PG [3].

Podatność mukopolisacharydów na degradację enzymatyczną

Do enzymów katalizujących rozkład PS tkanki łącznej należą: galaktozydazy, glukuronidazy, glikozydazy oraz hialuronidaza. Spośród nich najlepiej poznanym jest hialuronidaza. Rozkładając substancję kitową łączącą poszczególne włókna i komórki, ułatwia ona wymianę materii w przestrzeni tkankowej. Drobnoustroje wytwarzające hialuronidazę charakteryzują się większą inwazyjnością. Uszkodzenie swoistej bariery ochronnej ułatwia przedostawanie się takich czynników chorobotwórczych jak toksyny, wirusy i bakterie.

Pod działaniem hialuronidazy początkowo zachodzi depolimeryzacja dużych cząsteczek HA na nieredukujące, prostsze wielocukrowce. Dopiero w drugiej fazie uwalnia się acetyloglukozamina i kwas glukuronowy. Te dwa etapy rozkładu katalizowane

są prawdopodobnie przez mukopolisacharydazę i mukooligosacharydazę. Procesy depolimeryzacji HA dostrzeżono w chorobie reumatycznej.

Hialuronidaza katalizuje rozkład nie tylko kwasu hialuronowego, ale także innych typów MPS. Różna podatność poszczególnych MPS na degradację pod wpływem hialuronidazy bakteryjnej oraz pochodzącej z gonad męskich jest często wykorzystywana w metodach badania składu i czystości preparatów [14, 15, 21, 27].

Kwas hialuronowy ulega hydrolizie przy udziale enzymów izolowanych z obu źródeł, natomiast Ch-4-S i Ch-6-S trawione są tylko przez hialuronidazę pochodzącą z gonad męskich. DS i KS nie ulegają degradacji pod wpływem żadnego z tych enzymów [14, 16, 21]. Wg Meyera i wsp. [15] KS jest odporny również na działanie β -glukozydazy, diastazy słodcu, β -galaktozydazy, lizozymu, surowego ekstraktu z wątroby.

Oprócz hialuronidazy w metodach oznaczania składu preparatów MPS wykorzystuje się też enzymy z grupy chondroitynaz, produkowane przez szczepy *Proteus vulgaris* i *Flavobacterium heparinum* [20, 27]. Znane są: chondroitynaza ABC, trawiąca Ch-4-S i Ch-6-S oraz DS, a także chondroitynaza AC, degradująca tylko Ch-4-S i Ch-6-S [17]. Zastosowanie tych enzymów w różnych kombinacjach ze specyficznymi chondro-4- i -6-sulfatazami pozwala na oznaczenie w badanym materiale zawartości siarczanów chondroityny A, B i C [20]. Szczep *Flavobacterium heparinum* produkuje też enzymy hydrolizujące H i HS [17].

Na przemianę MPS w organizmie mają wpływ hormony przysadki mózgowej, kory nadnerczy, tarczycy, jąder i jajników. Somatotropina – hormon wzrostowy – pobudza wytwarzanie MPS, zwiększa liczbę komórek tucznych, wzmacnia działanie hialuronidazy.

Szybkość syntezy HA i chondroityno-siarczanów wzrasta po podaniu hormonu wzrostowego lub testosteronu. Wytwarzanie MPS pobudzają też estrogeny. Przeciwnie działanie wykazuje tyroksyna, hamująca wytwarzanie substancji macierzystej. Przy jej braku produkcja MPS jest wzmożona. Innymi hormonami hamującymi metabolizm MPS są kortyzon i hydrokortyzon.

FIZJOLOGICZNE FUNKCJE MUKOPOLISACHARYDÓW W TKANKACH

MPS są elementami budulcowymi tkanki łącznej stanowiąc wraz z pozostałymi składnikami substancji podstawowej wypełniacz przestrzeni między włóknami kolagenu, retikuliny i elastyny.

Szeroko rozwinięta struktura PG oraz ich zdolność wiązania wody decydują o wytrzymałości chrząstek na deformację pod wpływem sił rozciągających lub ściskających [17]. Poza tym MPS regulują ciśnienie osmotyczne, dyfuzję przez tkanki i aktywność enzymów oraz biorą udział w transporcie jonów [28].

W zależności od typu kolagenu przeważającego w danej tkance zmienia się ilość i rodzaj MPS w niej zawartych, a tym samym właściwości strukturalno-mechaniczne. Włókna kolagenu typu I słabo oddziałujące z nielicznymi PG siarczanu dermatanu mają fibryle ściśle upakowane [17]. Wg Bailey'a i Light'a [3] w tkankach takich jak ścięgna DS może ograniczać wzrost średnicy fibryli. Natomiast w chrząstkach szklistych i sprężystych fibryle kolagenu typu II są znacznie od siebie oddalone i nie łączą się we włókna. Zawieszane luźno w substancji podstawowej tworzą silnie usieciowaną strukturę, która jest stabilizowana przez występujące w dużym stężeniu PG siarczanów chondroityny. Kolagen typu III, obecny we włóknach retikuliny, tworzy cienkie, luźno upakowane fibryle, co wynika z niewielkiej ilości MPS obecnych w substancji podstawowej [17].

MPS mają wpływ nie tylko na ostateczną strukturę i właściwości tkanki łącznej, ale również na anabolizm kolagenu. Większość etapów tej biosyntezy dokonuje się w komórkach fibroblastów. Wytwarzane w nich cząsteczki prokolagenu przedostają się następnie do przestrzeni pozakomórkowej, gdzie powstaje tropokolagen. Dalsza synteza tego białka przebiega już w środowisku substancji podstawowej tkanki łącznej. Jej siłą napędową są przede wszystkim oddziaływania jonowe, które prowadzą do uporządkowania cząsteczek tropokolagenu w fibryle kolagenowe. W tym etapie MPS, dzięki dużej zawartości grup anionowych, odgrywają znaczną rolę w agregacji tropokolagenu.

Oddziałując z kolagenem MPS wpływają na jego funkcjonalne właściwości. Badania *in vitro* wykazały, że ilość PG zawartych w tkance wpływa na cieplną stabilność włókien kolagenowych. PG siarczanów chondroityny obecne w roztworze w ilości 30% podwyższają temperaturę skurczu kolagenu o 10°C [3, 26].

Typ i ilość zasocjowanych PG jest istotnym czynnikiem przy określaniu stopnia oporności kolagenu na degradację enzymatyczną. Enzymy, które hydrolizują łańcuchy PG, mogą zwiększać rozpuszczalność kolagenu. Wzrostowi kruchości mięsa wołowego towarzyszy wzrost aktywności β -glukuronidazy – enzymu, degradującego PG. W procesie tym uczestniczą też inne enzymy, jak: katepsyna D, β -galaktozydaza czy hialuronidaza.

W mięśniach ryb degradacja PG, następująca w ciągu kilku dni po śnięciu, przyczynia się do rozwarstwienia filetów, co obniża ich jakość [9].

Kruchość mięsa jest też związana z wiekiem zwierząt. Zwiększenie ilości nierozpuszczalnego kolagenu powoduje jej obniżanie. Cormier i wsp. [5] efekt ten powiązali ze zmniejszaniem się wraz z wiekiem zwierząt ilości MPS, izolowanych z tkanek. Im mniejsza jest bowiem ilość PS, tworzących sieć wokół włókien kolagenowych, tym większe są szanse powstania międzycząsteczkowych wiązań poprzecznych, obniżających rozpuszczalność kolagenu i powodujących wzrost twardości mięsa.

W utrzymywaniu struktury tkanki łącznej i nadawaniu jej specyficznych właściwości mechanicznych główną rolę odgrywają MPS sulfonowane. Natomiast HA tworząc z wodą lepkie, koloidalne roztwory wypełniające przestrzenie międzykomórkowe, stanowi barierę, chroniącą powierzchnię skóry i błon komórkowych przed inwazją bakterii do wnętrza organizmu. Ze względu na śluzową konsystencję HA dobrze osłania narządy wewnętrzne. Poza tym działa jako smar w stawach, jako wypełniacz w ciałku szklistym oka oraz jako amortyzator w tarczach międzykręgowych [17].

Główną funkcją H w organizmie jest zapobieganie krzepnięciu krwi, co wynika z hamowania przez ten MPS powstawania trombiny z protrombiny. Niedobór trombiny uniemożliwia przejście fibrynogenu w fibrynę. Słabą aktywność przeciwkrzepliwą wykazuje też DS.

WYKORZYSTANIE MUKOPOLISACHARYDÓW

Zdolność MPS do wiązania wody, soli i białek można wykorzystać do modyfikowania reologicznych właściwości białek w żywności. Wpływ kwaśnych MPS na lepkość i właściwości emulgujące roztworów białek miofibrylarnych wskazuje na możliwość ich zastosowania do stabilizacji farszu mięsnego [11, 31].

W farmacji szerokie zastosowanie ma obecnie HA. Jego sól sodowa wykorzystywana jest do produkcji healonu – leku używanego w chirurgii oka przy usuwaniu zaćmy, przeszczepianiu rogówki, a także w leczeniu jaskry i uszkodzeń gałki ocznej. HA wstrzykuje się też do stawów w przypadku artretyzmu [29].

Zdolność HA do wiązania wody w tkankach oraz regulowania wymiany kationów i stopnia dyfuzji daje możliwość zastosowania tego MPS w kosmetyce, jako środka uaktywniającego procesy fizjologiczne i regulacyjne komórek skóry. Badania nad opracowaniem receptury kremów kosmetycznych z dodatkiem MPS z chrząstek tchawicy wykazały korzystny wpływ tych związków na konsystencję kremu. Ich obecność umożliwia wprowadzenie podczas emulgowania większej ilości wody, co pozwala na zaoszczędzenie surowców, przy jednoczesnym zachowaniu odpowiedniej konsystencji preparatu. Poza tym możliwe jest zmniejszenie ilości, a nawet wyeliminowanie lanoliny, stosowanej w produkcji kremów jako emulgator [31].

W przemyśle farmaceutycznym wykorzystuje się HA jako środek przeciwkrzepliwą [18, 32].

MPS można wykorzystać w procesie rekonstrukcji kolagenu *in vitro*. Wykazano, że dodatek MPS w postaci wyciągu wodnego ze skóry cielęcej, prowadzi do powstawania fibryli kolagenowych nawet z takich form rozpuszczalnego kolagenu, które pierwotnie nie wykazywały zdolności samobudowy struktury fibrylarniej lub miały ją w ograniczonym tylko stopniu. Prawdopodobnie różne rodzaje MPS wywierają odmienny wpływ na powstawanie włókien kolagenowych. Na przykład DS reguluje

średnicę fibryli, podczas gdy HA pobudza powstawanie pęczków włókien o określonej orientacji [3].

METODY IZOLACJI MUKOPOLISACHARYDÓW

Główną trudnością w procesie izolacji MPS jest usunięcie białek [4, 19]. MPS z materiału ekstrahuje się roztworami wodorotlenku sodu, mocznika oraz chlorku sodu, chlorku guanidyny, soli Ca, Mg, Ba, Zn, Cu [9, 14, 21, 27]. Do wyizolowania mukopolisacharydów z mikroorganizmów niezbędna jest natomiast ekstrakcja gorącymi kwasami lub zasadami, gorącym formamidem lub roztworem fenolu [33].

Najczęściej tkanki traktuje się w pierw enzymami proteolitycznymi, a uzyskane w ten sposób izolaty MPS oczyszcza się dodatkowo chemicznie lub enzymatycznie. W metodach tych największe zastosowanie znajduje papaina [5, 22, 24]. Do wstępnego trawienia używa się również pepsynę [14, 15], pronazę [27] i trypsynę [9]. Trypsynę częściej stosuje się do odbiałczania surowych izolatów [14, 15, 21, 22]. Pozostałości białek można również usunąć z ekstraktu, traktując go alkaliami lub kwasem trichloroocetowym [5, 21]. Ubocznym skutkiem oddziaływania NaOH z MPS jest wzrost zawartości substancji mineralnych w izolacie, co jest spowodowane powstawaniem soli sodowych siarczanów chondroityny [28].

MPS wydziela się z ekstraktu przez strącanie etanolem lub detergentami [4, 5, 9, 15, 21].

METODY ROZDZIAŁU I ANALIZA SKŁADU MUKOPOLISACHARYDÓW

Wydzielone z różnych tkanek izolaty są zazwyczaj mieszaninami różnych typów MPS. Dzięki różnicom w ich M_{cz} oraz w liczbie grup funkcyjnych, ulegających jonizacji, możliwe jest rozdzielenie tych mieszanin na składniki. Największe zastosowanie mają metody chromatografii jonowymiennej oraz selektywnego strącania. Jako wypełnienie kolumny chromatograficznej używa się żywicy anionowe, najczęściej Dowex 1-X2 lub celulozę Ecteola* [4, 5, 14, 22, 27]. Frakcjonowane strącanie MPS przeprowadza się roztworami etanolu o wzrastającym stężeniu w obecności jonów wapnia [14].

Drugim, najczęściej stosowanym związkiem frakcjonującym MPS jest chlorek cetylopirydyny (CPC). MPS tworzą z tym detergentem kompleksy nierozpuszczalne w wodzie, natomiast rozpuszczalne w roztworach soli. Graniczne stężenie soli, przy którym następuje wyraźna zmiana rozpuszczalności kompleksu zależy od gęstości ładunku w cząsteczce MPS. Dzięki temu, stosując roztwory soli o różnych stężeniach, można mieszaninę MPS rozdzielić na składniki [4, 21].

* Ecteola – modyfikowana celuloza, otrzymywana przez kondensację celulozy, epichlorohydryny i trictyloaminy.

Skutecznymi metodami rozdziału i analizy składu mieszaniny MPS są techniki elektroforetyczne. Jako nośniki stosuje się bibułę, polioctan celulozy, poliakrylamid, agar. Zastosowanie znajduje też elektroforeza kapilarna [32]. Uwidocznienie poszczególnych frakcji znajdujących się na nośniku uzyskuje się metodą fluorografii (dla prób znaczonych radioaktywnie) lub przez wybarwienie [16]. Stosuje się barwniki o charakterze kationowym, tworzące z PS trwałe kompleksy [9, 10, 16, 32, 33].

Analiza składu rozdzielanych preparatów polega na porównaniu ich elektroforegramów z obrazem prób wzorcowych. Ponadto używa się specyficznych mukopolisacharydaz, np. chondroitynazy AC lub ABC, hialuronidazy, heparynazy. Porównanie elektroforetycznej migracji MPS zawartych w próbach trawionych tymi enzymami oraz w próbach kontrolnych, nie poddawanych hydrolizie, umożliwia identyfikację [17].

PRACA FINANSOWANA PRZEZ KBN Projekt Badawczy Nr 5 S307 049 06 Nr umowy PB 0922/S3/94/06

LITERATURA

- [1] Arnold E.: Microarchitecture and function. In: Collagen: the anatomy of a protein. John Woodhead-Galloway-London, 1980.
- [2] Asghar A., Henrickson R.L.: Characteristics of collagen in food systems. In: Advances in Food Research. Eds Chichester C.O., Mrak E.M., Schweigert B.S., Academic Press, New York, 2, 1982.
- [3] Bailey A.J., Light N.D.: Connective tissue in meat and meat products. Elsevier Applied Science, London and New York, 1989.
- [4] Brimacombe J.S., Webber J.M.: Mucopolysaccharides. B.B.A. Library, Elsevier, New York, 6, 1964.
- [5] Cormier A., Wellington G.M., Sherbon J.W.: Epimysial connective tissue polysaccharides of bovine semimembranosus muscle and alterations in their type with age and sex differences. *J. Food Sci.*, 36, 1971, 199.
- [6] Einbinder J., Schubert M.: Binding of mucopolysaccharides and dyes by collagen. *J. Biol. Chem.*, 188, 1951, 335.
- [7] Kapuścińska M.: Zastosowanie odpadów tkanki łącznej i chrząstek do produkcji mukopolisacharydów. Praca magisterska, wykonana pod kierunkiem J. Synowieckiego. Politechnika Gdańska, Gdańsk, 1987.
- [8] Karpiak S.E.: Biochemia zwierząt. PWRiL, Warszawa, 1975.
- [9] Kim K., Haard N.F.: Degradation of proteoglycans in the skeletal muscle of Pacific rockfish (*Sebastes Sp.*) during ice storage. *J. Muscle Food.*, 3, 1992, 103.
- [10] Kreuger R.C., Schwartz N.B.: An improved method of sequential alcian blue and ammoniacal silver staining of chondroitin sulfate proteoglycan in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 1987, 167, 295.
- [11] Lippi S., Taranto M.V.: Soy protein-acidic polysaccharide interaction: modification of the emulsification properties of soy protein isolate. *Lebensm. Wiss. und Technol.*, 14, 1981, 55.
- [12] Mathews M.B.: The interactions of proteoglycans and collagen-model systems. In: Chem. Mol. Biol. Intercell. Matrix, Advan. Study Inst. Ed. Balazs E.A., Academic Press, London, England, 2, 1969.

- [13] McIntosh E.N.: Effect of postmortem aging and enzyme tenderizers on mucoprotein of bovine skeletal muscle. *J. Food Sci.*, **32**, 1967, 210.
- [14] Meyer K., Davidson E., Linker A., Hoffman P.: The acid mucopolysaccharides of connective tissue. *Biochim. Biophys. Acta.*, **21**, 1956, 506.
- [15] Meyer K., Linker A., Davidson E.A., Weissmann B.: The mucopolysaccharides of bovine cornea, **205**, 1953, 611.
- [16] Min H., Cowman M. K.: Combined alcian blue and silver staining of glycosaminoglycans in polyacrylamide gels: Application to electrophoretic analysis of molecular weight distribution. *Anal. Biochem.*, **155**, 1986, 275.
- [17] Montes G.S., Janqueira L.C.U.: Histochemical localization of collagen and proteoglycans in tissues. In: *Collagen*. Ed. Nimi M.E., CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, **2**, 1988.
- [18] Neville G.A., Holme K.R., Perlin A.S.: Monitoring the purity of pharmaceutical heparin preparations by High-Field ¹H-Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *J. Pharmac. Sci.*, **78**, 1980, 101.
- [19] Rosenberg L., Choi H., Pal S., Tang L.: Carbohydrate protein interactions in proteoglycans. In: *Carbohydrate-protein interaction*. Ed. Goldstein J.J., Am. Chem. Soc. Washington D.G., 1979.
- [20] Saito H., Yamagato T., Suzuki S.: Enzymatic methods for the determination of small quantities of isomeric chondroitin sulfates. *J. Biol. Chem.*, **243**, 1968, 1536.
- [21] Schiller S., Methews M. B., Jefferson H., Ludowieg J., Dorfman A.: The metabolism of mucopolysaccharides in animals. I. Isolation from skin. *J. Biol. Chem.*, **211**, 1954, 717.
- [22] Schiller S., Slover G., Dorfman A.: A method for the separation of acid mucopolysaccharides: Its application to the isolation of heparin from the skin of rats. *J. Biol. Chem.*, **236**, 1961, 983.
- [23] Scott J.E.: Collagen-proteoglycan interactions. *Biochem. J.*, **187**, 1980, 887.
- [24] Scott J.E., Orford C.R., Hughes E.W.: Proteoglycan collagen arrangements in developing rat tail tendon. An electron-microscopical and biochemical investigation. *Biochem. J.*, **195**, 1981, 573.
- [25] Scott J.E., Orford C.R.: Dermatan sulphate-rich proteoglycan associates with rat tail-tendon collagen at the d band in the gap region. *Biochem. J.*, **197**, 1981, 213.
- [26] Snowden J.M.: The stabilization of in vivo assembled collagen fibrils by proteoglycans/glycosaminoglycans. *Biochim. Biophys. Acta*, **703**, 1982, 21.
- [27] Stuhlsatz H.W., Greiling H.: The preparation of chondroitin 4- and chondroitin 6- sulfates. In: *The methodology of connective tissue research*. Ed. Hall D.A., Joynson-Bruvvers Ltd, Oxford, 1978.
- [28] Synowiecki J.: Otrzymywanie mukopolisacharydów z tkanki łącznej i chrząstek. *Przem. Spoż.*, **42**, 1988, 182.
- [29] Synowiecki J.: Otrzymywanie kwasu hialuronowego z ciała szklстого oczu wołowych. *Przem. Spoż.*, **42**, 1988, 364.
- [30] Synowiecki J., Shahidi F.: Isolation of mucopolysaccharides from processing discards of seal and beef. *Food Chem.*, 1994, 50, 1.
- [31] Synowiecki J.: Informacja własna
- [32] Volpi N.: „Fast moving” and „slow moving” heparins, dermatan sulfate and chondroitin sulfate: qualitative and quantitative analysis by agarose-gel electrophoresis. *Carbohydr. Res.*, **247**, 1993, 263.
- [33] Wardi A. H., Michos G.A.: Alcian blue staining glycoproteins in acrylamide disc electrophoresis. *Anal. Biochem.*, **49**, 1972, 607.

MUCOPOLYSACCHARIDES - PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES, ISOLATION AND APPLICATIONS

Summary

The chemical structure and physicochemical properties of eight mucopolysaccharides-glycosaminoglycans isolated from different types of connective tissue have been described. Special attention has been paid to the structure of polysaccharideprotein complexes and to the interactions of proteoglycans with collagen. The indirect effect of mucopolysaccharides on meat tenderness has been pointed out as involving the participation of these saccharides in collagen crosslinking. In addition the metabolism of mucopolysaccharides, their physiological functions, and their different applications have been described. ☒

INTERNET W TECHNOLOGII I NAUCE O ŻYWNOŚCI

Sekcja Młodej Kadry Naukowej Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności organizuje w dniu 8 września 1997 r. (w przeddzień XXVIII Sesji Naukowej KTChŻ PAN) konferencję poświęconą wykorzystaniu internetu w technologii i nauce o żywności.

Przewidywany jest następujący program spotkania:

09:30 – Otwarcie konferencji

09:45 – Technika wykorzystania internetu do celów naukowych i technicznych,

10:30 – Internet a informacja w zakresie technologii i nauki żywności

11:30 – Zajęcia praktyczne

14:30 – Przerwa obiadowa

16:00 – Zwiedzanie zakładów przetwórstwa rybnego „Proryb”

Koszt uczestnictwa w konferencji 50,- zł.

Zgłoszenia prosimy kierować na adres: mgr J. Newerli, WSM Katedra Towaroznawstwa i Ładunkoznawstwa, ul. Morska 83, 81-225 Gdynia

fax (058) 206 701; e-mail: Joanna@vega.wsm.gdynia.pl.

Ze względu na ograniczone możliwości techniczne zajęć praktycznych uczestnicy będą przyjmowani w kolejności zgłoszeń.