

Spin-Gitter-Relaxationszeit- T_1 -Untersuchungen an Hyaluronsäure.

Spin-Lattice-Relaxationtime- T_1 Measurements of Hyaluronic Acid

H. Hofmann und O. Schmut

Universitäts-Augenklinik Graz, Vorstand: o. Univ.-Prof. Dr. H. Hofmann

H. Sterk und H. Kopp

Institut für Organische Chemie, Universität Graz, Heinrichstraße 28, A-8010 Graz

Z. Naturforsch. 34 c, 508 – 511 (1979); eingegangen am 16. Februar/21. März 1979

Spin-Lattice-Relaxationtime T_1 , Hyaluronic acid, Methylhyaluronate, Dipol-Dipol-Relaxation-mechanism, Aggregation

Reductions with $[^3\text{H}]\text{NaBH}_4$ proof that the decrease in viscosity of hyaluronic acid solutions caused by lowering the pH does not depend on a depolymerisation of hyaluronic acid. At the same time investigations at different pH-values, show a sigmoidal increase of the Spin-Lattice-Relaxationtime T_1 . This increase depends on a progressive aggregation of the hyaluronic acid molecule. The effect seems to be induced by the decrease of ionization of the carboxylgroups, by acidification of the solution.

Einleitung

Die Hyaluronsäure ist ein Glykosaminoglykan, das in der Natur weit verbreitet ist. Man konnte dieses Polysaccharid in Haut, Nabelschnüren, Glaskörper, in der Synovialflüssigkeit und in verschiedenen Tumoren nachweisen. In den Knorpeln bindet die Hyaluronsäure Proteoglykane und bildet auf diese Weise aggregierte Proteoglykane.

Die Hyaluronsäure stellt ein lineares Polysaccharid der Form $(-\text{N}-\text{G}-)_n$ dar, wobei N für N-Acetyl-D-glucosamin und G für D-Glucuronsäure steht. Die glykosidische Bindung ist bei G-N in $\beta(1 \rightarrow 3)$, für N-G in $\beta(1 \rightarrow 4)$ -Stellung. Man weiß, daß die Hyaluronsäure in verschiedenen Konformationen vorkommen kann. Außer in der Form eines Knäuelmoleküls konnte die Hyaluronsäure auch als Doppelhelix sowie in komplexeren Konformationen nachgewiesen werden [1, 2].

Der Übergang dieser verschiedenen Konformationen geht unter anderem bei einer Verminderung der Ionisierung der Carboxylgruppen vor sich [3]. Dafür sprechen auch Viskositätsänderungen, die in Hyaluronsäurelösungen beim Übergang vom alkalischen in den sauren Bereich festgestellt werden können [4].

In der vorliegenden Arbeit soll zunächst gezeigt werden, daß für die Viskositätsänderung von Hyaluronsäure keine Depolymerisation der Hyaluronsäure verantwortlich ist, während gleichzeitig durch Untersuchung der Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1

eine Erhärting der Annahme von strukturellen Änderungen bei verschiedenen pH-Werten versucht wird.

Material und Methoden

Hyaluronsäure: Versetzt man Rinderkluskörperhomogenat mit Aceton (1 : 1), so erhält man ein Präzipitat, das aus Kollagen und Hyaluronsäure besteht. Wird dieses Präzipitat 4 Stunden bei 4 °C in 1 M NaCl gerührt, geht die Hyaluronsäure in Lösung, während das Kollagen ungelöst bleibt. Aus dem Überstand kann die Hyaluronsäure mit Aceton präzipitiert, im Mörser fein gepulvert und an der Luft getrocknet werden. Zur Entfernung des Proteins röhrt man die Hyaluronsäure in 5prozentige Trichloressigsäure ein. Nach 15 min wird zentrifugiert, der Überstand mit 1 M NaOH neutralisiert und die Hyaluronsäure mit Aceton gefällt. Nach Lufttrocknen erhält man eine Hyaluronsäure, die nach der Methode von Lowry [5] weniger als 2% Protein enthält.

Hyaluronsäuremethylester: Der Methylester der Hyaluronsäure wird nach Jeanloz [6] isoliert, allerdings unter Verwendung von Hyaluronsäure anstelle von methylierter Hyaluronsäure.

Depolymerisation mit Ascorbinsäure: Die Hyaluronsäurelösung (1 mg/ml H₂O) wird bei Zimmertemperatur 24 Stunden mit 0.01 M Ascorbat (pH 7,0) inkubiert. Danach wird die depolymerisierte Lösung mit Aceton gefällt und luftgetrocknet.

Reduktion mit $[^3\text{H}]\text{NaBH}_4$: Hyaluronsäure wird in H₂O gelöst (1 mg/ml) und mit verd. HCl auf pH 2,5 gebracht. Nach 24 Stunden bei Zimmertemperatur wird die Lösung mit NaOH neutralisiert und die Hy-

Sonderdruckanforderungen an Prof. H. Sterk.

0341-0382/79/0700-0508 \$ 01.00/0



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

luronsäure mit Aceton gefällt. Diese Hyaluronsäure – sowie zum Vergleich eine unbehandelte Hyaluronsäure – werden mit $[^3\text{H}]\text{NaBH}_4$, wie bei Ögren und Lindahl [7] beschrieben, reduziert. Der Einbau von Tritium wird in einem Beckman Liquid Scintillation Counter LS 8100 gemessen.

Messung der Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 : Die Messungen erfolgten nach der Inversion Recovery-Methode [8] (Mittlerer Fehler $\pm 5\%$), Meßtemperatur 31°C , auf einem Varian HA-100D-Kernresonanzspektrometer für FT-Messungen, ausgerüstet von der Firma Digilab. Die Fouriertransformation erfolgte mit einem Nova 1200 Computer der Firma Data General.

Ergebnisse und Diskussion der $[^3\text{H}]\text{NaBH}_4$ -Reduktion

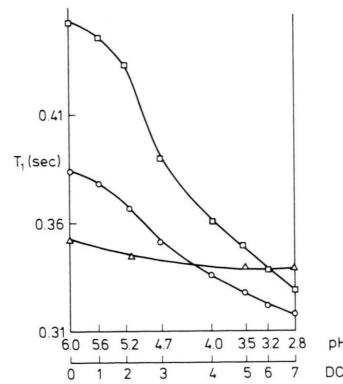
Die mit HCl behandelte Hyaluronsäure zeigte im Vergleich zu nativer Hyaluronsäure keinen vermehrten Tritiumeinbau bei Reduktion mit $[^3\text{H}]\text{NaBH}_4$. Daraus kann geschlossen werden, daß beim Einwirken von Säuren auf Hyaluronsäure keine reduzierbaren Endgruppen – entsprechend einer Depolymerisation – entstehen.

Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Untersuchungen, bei denen die vollständige Wiederherstellung der Viskosität durch Zugabe äquimolarer Mengen an Lauge nach vorhergehendem Ansäuern beobachtet wurde.

Ergebnisse und Diskussion der Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 -Untersuchungen

Um die Möglichkeiten der Spin-Gitter-Relaxationszeituntersuchungen, die vor allem in einer sehr empfindlichen Meßmethodik für die molekularen Bewegungen liegen [9–12], auszunützen, sind Hyaluronsäure sowie Hyaluronsäure mit Ascorbinsäure depolymerisiert und der oben erwähnte Methylester unter Verwendung der Protonen des Acetylsignals als spin label untersucht worden. Die Acetylgruppe führt dabei vom N-Acetyl-D-glucosamin der Hyaluronsäure her. Die Messungen in D_2O unter schrittweiser Erhöhung der $[\text{H}]$ Ionenkonzentration haben das in Abb. 1 dargestellte, gut reproduzierbare, Verhalten gezeigt.

Unter der sicherlich gerechtfertigten Annahme, daß die ^1H -Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 für hoch-



543c (95/79)

Abb. 1. Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 von nativem Hyaluronat (□) mit Ascorbinsäure depolymerisiertem Hyaluronat (○) sowie Hyaluronsäuremethylester (△) in Abhängigkeit von der Zugabe an DCI (Einheit: 0,1 ml).

molekulare Verbindungen in verdünnter Lösung (5prozentig) ausschließlich von der intramolekularen Dipol-Dipol-Relaxation $1/T_1^{\text{DD}}$ abhängt, gilt

$$1/T_1 = 1/T_1^{\text{DD}_{\text{intra}}} \\ = * 1/T_1^{\text{DD}_{\text{intra}}} = 2 \gamma_1^2 \hbar^2 (3 \gamma_1^2 \sum r_{ij}^{-6} + 2 \gamma_1^2 (\hat{I}_f + 1) \hat{I}_f / 3 \\ \cdot \sum r_{if}^{-6}) \tau_c = [13].$$

Dabei läßt sich $1/T_1^{\text{DD}_{\text{intra}}}$ für Protonen zu

$$1/T_1^{\text{DD}_{\text{intra}}} = 6 \gamma^4 \hbar^2 \cdot \sum r_{ij}^{-6} \cdot \tau_c$$

vereinfachen und die Korrelationszeit τ_c nach Bloembergen et al. [14] als

$$\tau_c = \frac{4 \pi \eta a^3}{3 k T}$$

ausdrücken.

Betrachtet man nun Abb. 1 so fällt auf, daß T_1 generell aber nicht linear bei Zugabe von Säure abnimmt. Aus den oben stehenden Formeln muß daraus zwingend geschlossen werden, daß die dafür maßgebliche Veränderung die Korrelationszeit τ_c und damit a oder η betrifft. Eine pH-abhängige Beeinflussung durch andere intramolekulare H-Atome ist wegen der Restriktion aus dem r_{ij}^{-6} Term für die Acetylgruppe nicht möglich.

* γ : Gyromagnetische Konstante; \hat{I} : Kernspin; a : Molekülradius; η : Viskosität.

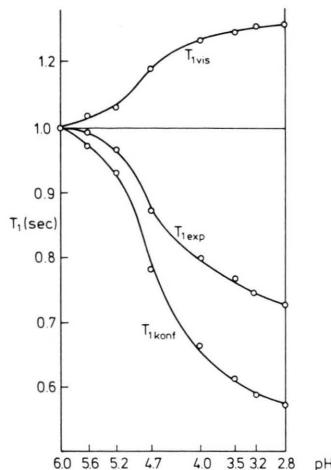


Abb. 2. Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 von nativem Hyaluronat in Abhängigkeit von der DCl-Zugabe jedoch auf konstant η normiert. T_1 vis.: Abhängigkeit von T_1 von der Viskosität; T_1 exp.: gemessene T_1 ; T_1 konf.: Spin-Gitter-Relaxationszeit, die nur von der Konformation abhängt (η : konst. normiert).

Um den Einfluß der pH-Wert abhängig bekannten Viskositätsänderung [15] zu erfassen ist T_1 nach

$$T_1 = K \cdot 1/\eta \quad K = \frac{3 kT}{4 \pi a^3}$$

auf den Startwert normiert und von $\Delta \eta / \Delta \text{pH}$ unabhängig gemacht worden (siehe Abb. 2).

In Abb. 2 sieht man die theoretisch erwartete Verstärkung der T_1 -Änderung nach Entfernung des gegenläufigen Viskositätsverhaltens. Um die nunmehr alleinige Abhängigkeit von T_1 und a leichter diskutieren zu können, empfiehlt es sich, unter Verwendung von $a^2 m_e = I$, τ_C neu zu entwickeln.

$$\tau_C = \frac{4 \pi \eta a^3}{3 kT} = \frac{4 \pi \eta \cdot I^{\frac{3}{2}}}{3 kT \cdot m_e}.$$

m_e stellt dabei die für die Trägheitsmomentberechnung benötigte fiktive Volumelementmasse für die Kugel mit Radius a dar.

Aus dieser Umformung folgt, daß die Abnahme der Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 mit der Zunahme des Trägheitsmomentes I synchron geht. Eine Trägheitsmomentänderung kann jedoch im gegenständlichen Falle (es kommt zu keiner chemischen Reaktion, 5prozentige Lösung) ausschließlich durch intramolekulare Aggregation erklärt werden. Über die Ursachen der Aggregation kann die Spin-Gitter-Relaxationszeit keine zwingende Auskunft liefern. Die

Tabelle I. Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 sowie Viskosität η bei verschiedenen Temperaturen.

°C	pH: 6,5		pH: 3,0	
	η (cP)	T_1	η (cP)	T_1
37	1,91	0,37	1,49	0,28
50	1,25	0,40	1,17	0,30
60	1,07	0,41	0,95	0,32
70	0,91 *	0,45	0,78 *	0,33
80	0,76 *	0,47	0,66 *	0,34
90	0,65 *	0,50	0,57 *	0,35
$\Delta E_a = 5,9 \text{ KJ/mol}$		$\Delta E_a = 3,8 \text{ KJ/mol}$		

* aus den gemessenen η -Werten, berechnete η -Werte.

Annahme einer Aggregation vermutlich in Art eines Brückenmechanismus über die COOH-Gruppe scheint jedoch sinnvoll, insbesondere da der gleichfalls vermessene Methylester der Hyaluronsäure keine Änderung der T_1 mit dem pH zeigt.

Das durch Ascorbinsäure depolymerisierte Hyaluronat weist die pH-Abhängigkeit der Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 noch auf, der Grad der Änderung ist jedoch wesentlich geringer, was gleichfalls im Lichte obiger Vorstellungen einer intramolekularen Aggregation (bei kleinen Molekülen ändert sich bei Aggregation das Trägheitsmoment I weniger) sinnvoll ist.

Neben diesen zitierten Hinweisen für einen Aggregationsmechanismus über Brücken spricht auch die Messung von T_1 bei variabler Temperatur und der daraus folgende Wert der Aktivierungsenergie E_a für einen derartigen Mechanismus. In Tabelle I sind die Meßwerte der Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 sowie die Temperaturabhängigkeit der Viskosität zusammengestellt.

Das Verhalten der Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 wird vom Temperaturverhalten von τ_C nach

$$\tau_C = \tau_{C0} \exp [E_a / RT]$$

bestimmt. Auch hier kann man auf η konst. normieren, das heißt, man bildet die Differenz aus der E_a

der Korrelationszeit und nach $\frac{1}{\eta} = \frac{1}{\eta_0} \exp - \left[\frac{\tilde{E}_a}{RT} \right]$

der \tilde{E}_a der Viskosität. Wie ersichtlich beträgt $\Delta E_a = E_a - \tilde{E}_a$ im alkalischen Bereich 5,6 KJ/mol, während im sauren Milieu die Differenz 3,8 KJ/mol ist. Die Differenz ΔE_a kann aber nur aus einer Aktivierungsenergieänderung aufgrund von temperaturabhängigen Strukturänderungen resultieren. Da chemische Umsetzungen wegen der vollständigen Reversibilität

des Experimentes auszuschließen sind, muß das temperaturabhängige Aufbrechen von Brücken als Ursache angesehen werden. Der geringere Wert im sauren Bereich resultiert dabei vermutlich aus der Entropiezunahme. Die höhere Ordnung, entsprechend der stärkeren Verbrückung im sauren Milieu, führt beim Aufbrechen der intramolekularen Brücken zu einer Entropiezunahme (Realisierungsmöglichkeiten steigen). Mechanismus und Energiebetrag sind plausibel, vergleicht man das sogenannte Aufschmelzen von DNS (intermolekulare Brücken) Stränge [16]. Die Tatsache der bekannt stärkeren Vernetzung in den DNS-Strängen (mindestens je 2 Brücken) schlägt sich erwartungsgemäß in der etwa 4fachen (23,4 KJ/mol) Aktivierungsenergie [16] nieder.

Zusammenfassung

Die Messung der Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 zeigt für die Hyaluronsäure ein sigmoides Ansteigen der Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 entsprechend einer sukzessiven Aggregation beim Übergang zu immer stärkerem saurem Milieu. Messungen an Derivaten sowie Untersuchungen der Temperaturabhängigkeit der Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 erhärten die bereits auf anderem Wege gewonnene Annahme der Aggregation durch Brückenbildung entscheidend. Zusammen mit dem Ergebnis der Reduktion mit $[^3\text{H}]\text{NaBH}_4$ erscheint demnach die Ursache für die pH-Wert-abhängige Viskosität der Hyaluronsäure in einer Konformationsänderung zu liegen.

- [1] I. C. M. Dea, R. Moorhouse, D. A. Rees, S. Arnott, J. M. Guss u. E. A. Balazs, *Science* **179**, 560 (1973).
- [2] E. D. T. Atkins u. J. K. Sheehan, *Science* **179**, 562 (1973).
- [3] B. Chakrabarti u. E. A. Balazs, *J. Mol. Biol.* **78**, 135 (1973).
- [4] H. Hofmann u. O. Schmutz, *Albrecht v. Graefes Arch. klin. exp. Ophthalm.* **198**, 95 (1976).
- [5] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr u. R. J. Randall, *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
- [6] R. W. Jeanloz, *J. Biol. Chem.* **197**, 141 (1952).
- [7] S. Ögren u. U. Lindahl, *J. Biol. Chem.* **250**, 2690 (1975).
- [8] R. Freemann u. H. D. W. Hill, *J. Chem. Phys.* **53**, 4103 (1970).
- [9] R. S. Norton u. A. Allerhand, *J. Amer. Chem. Soc.* **98**, 1007 (1976).
- [10] E. Westhof, O. Röder, I. Croneiss u. H. D. Lüdemann, *Z. Naturforsch.* **30 c**, 131 (1975).
- [11] A. G. Marshall, P. G. Schmidt u. B. D. Sykes, *Biochemistry* **11**, 3875 (1972).
- [12] H. Sterk, H. Kopp u. H. Esterbauer, *Z. Naturforsch.* **34 c** (1979) im Druck.
- [13] H. S. Gutowsky u. D. E. Woessner, *Phys. Rev.* **104**, 843 (1956).
- [14] N. Bloembergen, E. M. Purcell u. R. V. Pound, *Phys. Rec.* **73**, 679 (1947).
- [15] O. Schmutz u. H. Hofmann, *Albrecht v. Graefes Arch. klin. exp. Ophthalm.* **191**, 307 (1974).
- [16] D. Pörschke, *Biochemistry* **15**, 1495 (1976).