

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2024.142.107>

ИЗМЕНЕНИЕ ГИАЛУРОНИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ПОД ВЛИЯНИЕМ ОСНОВНЫХ КАТИОНОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ

Научная статья

Дзгоев С.Г.^{1,*}

¹ORCID : 0000-0002-2428-8024;

¹Владикавказский Научный Центр РАН, Владикавказ, Российская Федерация

* Корреспондирующий автор (stanislavdzgoev[at]yandex.ru)

Аннотация

Целью исследования было установить, как влияют и влияют ли вообще основные катионы крови натрия и калий на активность сывороточной гиалуронидазы крыс линии Вистар. Гиалуронидазную активность определяли флюориметрическим методом Моргана-Эльсона в модификации Т. Такахаша. Было показано, что динамика роста гиалуронидазной активности сыворотки крови при увеличении концентрации обоих катионов была одинаковой и достигала максимальных значений в районе 50-100 мМ. В присутствии натрия наблюдалась тенденция к небольшому росту гиалуронидазной активности по сравнению с калием. Дальнейшее увеличение концентрации как натрия, так и калия приводило к снижению активности сывороточной гиалуронидазы. Делается вывод, что катионы натрия и калия могут оказывать регулирующее влияние на фермент, стимулируя рост гиалуронидазной активности при низких концентрациях и подавляя гиалуронидазную активность при высоких концентрациях.

Ключевые слова: гиалуронидаза, сыворотка крови, натрий, калий.

CHANGES IN HYALURONIDASE ACTIVITY UNDER THE INFLUENCE OF MAJOR BLOOD SERUM CATIONS

Research article

Dzgoev S.G.^{1,*}

¹ORCID : 0000-0002-2428-8024;

¹Vladikavkaz Scientific Centre of RAS, Vladikavkaz, Russian Federation

* Corresponding author (stanislavdzgoev[at]yandex.ru)

Abstract

The aim of the study was to determine how and whether the major blood cations sodium and potassium affect the activity of serum hyaluronidase in Wistar rats. Hyaluronidase activity was determined by the Morgan-Elson fluorimetric method modified by T. Takahashi. It was shown that the dynamics of serum hyaluronidase activity growth with increasing concentration of both cations was similar and reached maximum values in the region of 50-100 mM. In the presence of sodium there was a tendency to a slight increase in hyaluronidase activity compared to potassium. Further increase in the concentration of both sodium and potassium resulted in a decrease in serum hyaluronidase activity. It is concluded that sodium and potassium cations may have a regulatory effect on the enzyme, stimulating the increase in hyaluronidase activity at low concentrations and inhibiting hyaluronidase activity at high concentrations.

Keywords: hyaluronidase, blood serum, sodium, potassium.

Введение

Научные данные последних лет по исследованию обмена гиалуроновой кислоты (ГК) в организме человека демонстрируют её активную роль не только в реализации физиологических функций, но и в ряде патологических состояний, в связи с чем дальнейшее изучение свойств и обмена данной молекулы является актуальной задачей [1].

Гиалуроновая кислота является основным компонентом соединительной ткани млекопитающих и человека, представляющим собой линейный гетерополисахарид, размеры которого достигают 1-2 МДа [2], [3]. Синтез такой молекулы обеспечивается гиалуронансинтетазами различных клеток и сопровождается по мере элонгации цепи внутри клетки ее экстракцией во внеклеточное пространство, где она может подвергаться деградации под действием гиалуронидаз, главными из которых являются гиалуронидазы 1 и 2-го типов [4]. Считается, что степень деградации гиалуроновой кислоты существенно меняет физико-химические свойства межклеточного матрикса, а образующиеся продукты деградации могут проявлять самые разные регуляторные эффекты. Так, например, высокополимерная гиалуроновая кислота обладает антиангиогенными свойствами, в то время как продукты деградации гиалуроновой кислоты размером 20 кДа, которые образуются под действием гиалуронидазы 2-го типа, наоборот, являются ангиогенными [5].

Гиалуронидазная активность плазмы крови очень высокая в крови человека. Считается, что этот фермент-гиалуронидаза 1-го типа (ГИАЛ1) является лизосомальным ферментом и проявляет максимальную активность в кислой среде [6]. В сыворотке крыс также наблюдается максимальная гиалуронидазная активность по сравнению с печенью, почками, кожей и селезенкой [7]. Поскольку циркулирующая в крови Hyal-1 находится в неактивном состоянии, на сегодняшний день не ясно, какую роль может выполнять столь значительная активность этого фермента и каковы способы его активирования. Одним из возможных способов создания рН-оптимума фермента предполагается появление на поверхности клеток органов так называемой гиалуроносомы – углубления цитоплазматической мембраны, куда секретируются протоны за счет катионных мембранных белков-переносчиков [8]. В этой связи

представляло интерес выяснить, как влияют главные катионы организма натрия и калий на гиалуронидазную активность сыворотки крови крыс.

Цель исследования — определить как изменяется гиалуронидазная активность сыворотки крови крыс в зависимости от концентрации ионов натрия и калия

Методы и принципы исследования

В экспериментах использовали самцов крыс линии Вистар массой 150-250 г, которые содержались на стандартной диете и свободном доступе к воде. После декапитирования кровь собирали, центрифугировали 5 минут при 600 г, отбирали сыворотку и использовали в экспериментах. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ и рекомендациям биоэтического комитета Института биомедицинских исследований Владикавказского Научного центра Российской академии наук.

Гиалуронидазную активность определяли флюориметрическим методом Моргана-Эльсона в модификации Т. Такахаши в условиях 3-х часового гидролиза при 37°C по конечному продукту N-ацетилглюкозамину [9]. Активность сопутствующих экзогидролаз ингибировали 0.02М слизиной кислотой, добавляемой в реакционную смесь. Флюоресценцию измеряли при волне возбуждения – 545 нм, эмиссии – 602 нм (Флюорат – 2М, ЛЮМЭКС, Санкт-Петербург, Россия). За единицу активности гиалуронидазы принимали количество фермента, необходимого в данных условиях реакции для образования 1 микромоля конечного глюкозамина за 1 мин.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием t-критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони. Данные выражали как средние значения \pm ошибка среднего ($M \pm m$). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимали равным 0,05.

Основные результаты

На рисунке 1 представлено изменение гиалуронидазной активности сыворотки крови при добавлении ионов натрия и калия от 0 до 300 мМ (0, 20, 50, 100, 200 и 300 мМ). Как видно из рисунка, гиалуронидазная активность в отсутствие катионов была в районе 3,5 мЕ/мл. Однако с увеличением в среде инкубации концентрации как натрия, так и калия активность фермента возрастала и при концентрации катионов 50-100 мМ наблюдалось увеличение ферментативной активности в 1,5-2 раза. После чего дальнейшее увеличение концентрации обоих катионов приводило к снижению ферментативной активности, а при концентрации 300 мМ ферментативная активность практически подавлялась. Каких либо достоверных отличий по влиянию на гиалуронидазную активность ионов натрия по сравнению с ионами калия не было обнаружено. Графики обоих катионов практически совпадали, несмотря на тенденцию к небольшому росту гиалуронидазной активности в присутствии ионов натрия.

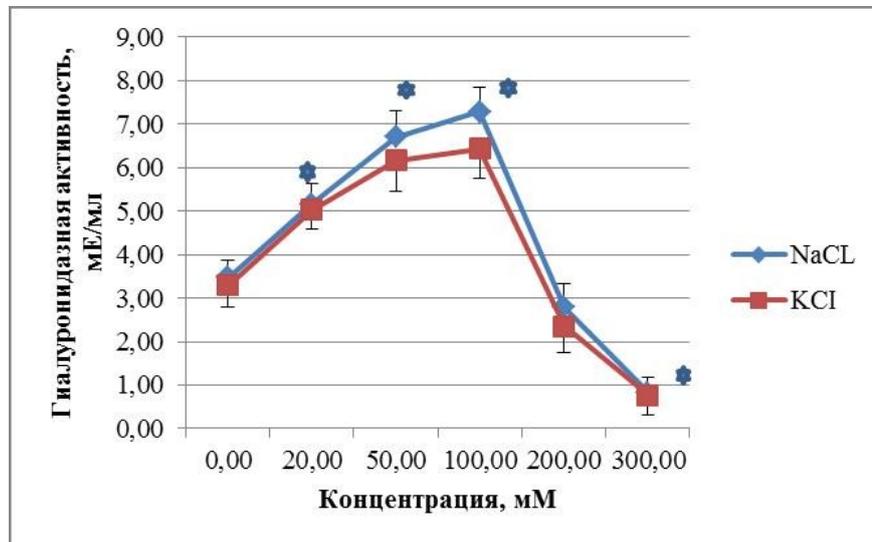


Рисунок 1 - Влияние катионов натрия и калия на гиалуронидазную активность сыворотки крови крыс линии Вистар
DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2024.142.107.1>

Примечание: звездочкой обозначены достоверные отличия при $p < 0,05$ по сравнению с контролем на обоих графиках. Каждая точка представляет средние значения 7 отдельных экспериментов

Обсуждение

Высокая гиалуронидазная активность сыворотки крови, очевидно, обеспечивает эффективный процесс деградации гиалуроновой кислоты в кровеносном русле. Известно, что гиалуроновая кислота поглощается клетками при участии таких мембранных рецепторов как CD44, которые в комплексе с гиалуронидазой 2-го типа располагаются в инвагинациях плазматических мембран, где за счет белков переносчиков, осуществляющих Na/H обмен, создается кислая среда и начинается деградация гиалуроновой кислоты. Это так называемая гиалуриносома, которая

предопределяет следующий за этим внутриклеточный этап, где под действием лизосомальной гиалуронидазы 1-го типа молекула полимера распадается до моносахаридов [10]. Циркулирующая в крови гиалуронидаза также считается гиалуронидазой 1-го типа, активность которой проявляется в кислой среде. Увеличение концентрации натрия в сыворотке крови может активизировать процесс секреции ионов водорода посредством белков-переносчиков, осуществляющих Na^+/H^+ -обмен и влиять на скорость деградации гиалуроново́й кислоты. Однако, как показывают результаты данного исследования, натрий в бесклеточной среде инкубации, где не может происходить формирования гиалуроносом, способен оказывать непосредственное регулирующее влияние на гиалуронидазную активность сыворотки крови, при низких концентрациях активируя фермент, а при высоких, наоборот, подавляя. Подтверждением этому высказыванию может быть тот факт, что аналогичный дозозависимый эффект на гиалуронидазную активность сыворотки крови был характерен и для ионов калия. По-видимому, калий, имея одинаковый заряд и сопоставимую массу, способен связываться с участками связывания натрия и имитировать его эффекты. Возможно, что такие участки связывания основных катионов крови могут быть не только на самой молекуле гиалуронидазы, но и на ингибиторах гиалуронидаз, циркулирующих в крови [8]. В этом случае изменение активности сывороточной гиалуронидазы может осуществляться посредством изменения степени ингибирования фермента.

Заключение

Основные катионы сыворотки крови натрия и калий в бесклеточной среде инкубации могут оказывать регулирующее влияние на активность сывороточной гиалуронидазы крыс линии Вистар при низких концентрациях активируя фермент, а при высоких, наоборот, подавляя его активность.

Конфликт интересов

Не указан.

Рецензия

Все статьи проходят рецензирование. Но рецензент или автор статьи предпочли не публиковать рецензию к этой статье в открытом доступе. Рецензия может быть предоставлена компетентным органам по запросу.

Conflict of Interest

None declared.

Review

All articles are peer-reviewed. But the reviewer or the author of the article chose not to publish a review of this article in the public domain. The review can be provided to the competent authorities upon request.

Список литературы / References

1. Erickson M. Chain Gangs: New Aspects of Hyaluronan Metabolism / M. Erickson, R. Stern // *Biochemistry Research International*. — 2012. — 2012. DOI: 10.1155/2012/893947.
2. Laurent T.C. Hyaluronan / T.C. Laurent, J.R. Fraser // *FASEB J*. — 1992. — 6(7). — p. 2397-404. DOI: 10.1096/fasebj.6.7.1563592.
3. Цепилов Р.Н. Гиалуроно́вая кислота – «старая» молекула с «новыми» функциями: биосинтез и деполимеризация гиалуроново́й кислоты у бактерий и в тканях позвоночных, в том числе в процессах канцерогенеза / Р.Н. Цепилов, А.В. Белодед // *Биохимия*. — 2015. — 80(9). — с. 1315-1333. DOI: 10.1134/S0006297915090011.
4. Triggs-Raine B. Biology of Hyaluronan: Insights from Genetic Disorders of Hyaluronan Metabolism / B. Triggs-Raine, M. R. Natowicz // *World J Biol Chem*. — 2015. — 6(3). — p. 110-20. DOI: 10.4331/wjbc.v6.i3.110..
5. Moretto P. Regulation of Hyaluronan Synthesis in Vascular Diseases and Diabetes / P. Moretto, E. Karousou, M. Viola et al. // *J. Diabetes Reseach*. — 2015. — p. 167283. DOI: 10.1155/2015/167283.
6. Frost G. I. Purification, Cloning, and Expression of Human Plasma Hyaluronidase / G. I. Frost, A. B. Csóka, T. Wong et al. // *Biochem Biophys Res Commun*. — 1997. — 236(1). — p. 10-15. DOI: 10.1006/bbrc.1997.6773.
7. Дзгоев С.Г. Сравнительная характеристика изоформ гиалуронидазы 1-го типа в соматических тканях и сыворотке белых крыс / С.Г. Дзгоев // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. — 2016. — 102(8). — с. 963-967.
8. Stern R. Hyaluronan Catabolism: a New Metabolic Pathway / R. Stern // *Eur J Cell Biol*. — 2004. — 83(7). — p. 317-325. DOI: 10.1078/0171-9335-00392..
9. Takahashi Suzuki K. T. A Fluorimetric Morgan-Elson Assay Method for Hyaluronidase Activity / T. Takahashi Suzuki K., M. Ikegami-Kawai, R. Okuda // *Anal. Biochem*. — 2003. — 322(2). — p. 257-263. DOI: 10.1016/j.ab.2003.08.005.
10. Bourguignon L.Y.W. CD44 Interaction with Na^+/H^+ Exchanger (NHE1) Creates Acidic Microenvironments Leading to Hyaluronidase-2 and Cathepsin B Activation and Breast Tumor Cell Invasion / L.Y.W. Bourguignon, P.A. Singleton, F. Diedrich et al. // *J Biol Chem*. — 2004. — 279(26). — p. 26991-7007. DOI: 10.1074/jbc.M311838200

Список литературы на английском языке / References in English

1. Erickson M. Chain Gangs: New Aspects of Hyaluronan Metabolism / M. Erickson, R. Stern // *Biochemistry Research International*. — 2012. — 2012. DOI: 10.1155/2012/893947.
2. Laurent T.C. Hyaluronan / T.C. Laurent, J.R. Fraser // *FASEB J*. — 1992. — 6(7). — p. 2397-404. DOI: 10.1096/fasebj.6.7.1563592.
3. Tsepilov R.N. Gialuronovaja kislota – «staraja» molekula s «novymi» funktsijami: biosintez i depolimerizatsija gialuronovoj kisloty u bakterij i v tkanjah pozvonocnyh, v tom chisle v protsessah kantserogeneza [Hyaluronic Acid – "Old" Molecule with "New" Functions: Hyaluronic Acid Biosynthesis and Depolymerization in Bacteria and in Vertebrate Tissues, Including in Carcinogenesis Processes] / R.N. Tsepilov, A.V. Beloded // *Biochemistry*. — 2015. — 80(9). — p. 1315-1333. DOI: 10.1134/S0006297915090011. [in Russian]
4. Triggs-Raine B. Biology of Hyaluronan: Insights from Genetic Disorders of Hyaluronan Metabolism / B. Triggs-Raine, M. R. Natowicz // *World J Biol Chem*. — 2015. — 6(3). — p. 110-20. DOI: 10.4331/wjbc.v6.i3.110..

5. Moretto P. Regulation of Hyaluronan Synthesis in Vascular Diseases and Diabetes / P. Moretto, E. Karousou, M. Viola et al. // *J. Diabetes Reseach.* — 2015. — p. 167283. DOI: 10.1155/2015/167283.
6. Frost G. I. Purification, Cloning, and Expression of Human Plasma Hyaluronidase / G. I. Frost, A. B. Csóka, T. Wong et al. // *Biochem Biophys Res Commun.* — 1997. — 236(1). — p. 10-15. DOI: 10.1006/bbrc.1997.6773.
7. Dzgoev S.G. Sravnitel'naja harakteristika izoform gialuronidazy 1-go tipa v somaticheskikh tkanjah i syvorotke belyh kryz [A Comparative Characterization of Hyaluronidase type 1 Isoforms in Somatic Tissues and Serum of White Rats] / S.G. Dzgoev // *Russian Physiol. Journ. named after I.M. Sechenov.* — 2016. — 102(8). — p. 963-967. [in Russian]
8. Stern R. Hyaluronan Catabolism: a New Metabolic Pathway / R. Stern // *Eur J Cell Biol.* — 2004. — 83(7). — p. 317-325. DOI: 10.1078/0171-9335-00392..
9. Takahashi Suzuki K. T. A Fluorimetric Morgan-Elson Assay Method for Hyaluronidase Activity / T. Takahashi Suzuki K., M. Ikegami-Kawai, R. Okuda // *Anal. Biochem.* — 2003. — 322(2). — p. 257-263. DOI: 10.1016/j.ab.2003.08.005.
10. Bourguignon L.Y.W. CD44 Interaction with Na⁺-H⁺ Exchanger (NHE1) Creates Acidic Microenvironments Leading to Hyaluronidase-2 and Cathepsin B Activation and Breast Tumor Cell Invasion / L.Y.W. Bourguignon, P.A. Singleton, F. Diedrich et al. // *J Biol Chem.* — 2004. — 279(26). — p. 26991-7007. DOI: 10.1074/jbc.M311838200