

DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.144.55>

ИОНЫ ХЛОРА ОКАЗЫВАЮТ РЕГУЛИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ НА СЫВОРОТОЧНУЮ ГИАЛУРОНИДАЗУ

Научная статья

Дзгоев С.Г.^{1,*}¹ ORCID : 0000-0002-2428-8024;¹ Владикавказский Научный Центр РАН, Владикавказ, Российская Федерация

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

Аннотация

В задачу данного исследования входило выяснение влияния ионов хлора на гиалуронидазную активность сыворотки крови крыс. Ранее нами было показано, что, как хлорид натрия, так и хлорид калия могут оказывать регулирующее влияние на фермент, стимулируя рост гиалуронидазной активности при низких концентрациях и подавляя гиалуронидазную активность при высоких концентрациях. Поскольку данный эффект был характерен для хлоридов натрия и калия представляло интерес выяснить, как влияют соли других галогенов этих катионов на сывороточную гиалуронидазную активность. Было показано, что добавление в среду инкубации фторида натрия или бромида калия не вызывали активирования фермента. Делается вывод, что ионы хлора скорее, чем катионы натрия и калия, способны оказывать влияние на сывороточную гиалуронидазу.

Ключевые слова: сывороточная гиалуронидаза, хлорид натрия, фторид натрия, хлорид калия, бромид калия.

CHLORIDE IONS HAVE A REGULATORY EFFECT ON SERUM HYALURONIDASE

Research article

Dzgoev S.G.^{1,*}¹ ORCID : 0000-0002-2428-8024;¹ Vladikavkaz Scientific Centre of RAS, Vladikavkaz, Russian Federation

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

Abstract

The aim of this study was to determine the effect of chlorine ions on the hyaluronidase activity of rat blood serum. We have previously shown that both sodium and potassium chloride can exert a regulatory effect on the enzyme, stimulating the growth of hyaluronidase activity at low concentrations and inhibiting hyaluronidase activity at high concentrations. Since this effect was characteristic of sodium and potassium chlorides, it was of interest to find out how salts of other halogens of these cations affect serum hyaluronidase activity. It was demonstrated that the addition of sodium fluoride or potassium bromide to the incubation medium did not cause activation of the enzyme. It is concluded that chlorine ions are more likely than sodium and potassium cations to influence serum hyaluronidase.

Keywords: serum hyaluronidase, sodium chloride, sodium fluoride, potassium chloride, potassium bromide.

Введение

Гиалуроновая кислота (гиалуронан) является гликозаминогликаном, состоящим из многократно повторяющихся дисахаридных звеньев, включающих D-глюкуроновую кислоту и N-ацетил-D-глюкозамин. Размеры этого полимера могут достигать 10^7 Да [1], [2]. Являясь основным структурным компонентом межклеточного матрикса, она может находиться как в высокополимерном состоянии, так и в виде фрагментов гораздо меньшего размера. Несмотря на простоту строения, интерес к этой молекуле не только не ослабевает, но все больше возрастает, поскольку, если раньше роль гиалуроновой кислоты сводилась только к гидратации тканей, то исследования последних лет демонстрируют участие этого полимера в целом ряде как физиологических так и патологических процессов, протекающих в человеческом организме. Причем, в зависимости от размера молекулы, влияние может быть противоположным. Так, гиалуронан с высокой молекулярной массой проявляет антиангиогенные и противовоспалительные свойства, в то время как гиалуронан с низкой молекулярной массой, наоборот, обладает ангиогенными и провоспалительными эффектами [3], [4].

Фрагментация и деградация гиалуроновой кислоты обеспечивается, в основном, гиалуронидазами 1-го и 2-го типов [5]. Гиалуронидаза 1-го типа была первой соматической гиалуронидазой, выделенной из сыворотки крови в чистом виде и охарактеризованной. Этот фермент активен в кислой среде, поэтому считается лизосомальным [6], [7]. Несмотря на то, что с тех пор прошло достаточно много времени, до сих пор до конца не ясно, каково значение циркуляции этого фермента с кислым рН-оптимумом в кровеносном русле. Предполагается, что не все ткани, демонстрирующие гиалуронидазную активность, способны синтезировать гиалуронидазу 1-го типа, а могут получать фермент из кровеносного русла в результате эндцитоза [8]. В этой связи изучение факторов, оказывающих влияние на активность сывороточной гиалуронидазы представляется актуальной задачей.

Ранее нами было показано, что хлорид натрия оказывал существенное влияние на гиалуронидазу, активность которой определяли в сыворотке крови крыс линии Вистар. Было продемонстрировано, что внесение в среду инкубации низких концентраций соли вызывало рост активности фермента, но когда концентрация соли превышала 100 мМ, можно было наблюдать постепенное снижение активности гиалуронидазы в зависимости от концентрации соли. При замене хлорида натрия на хлорид калия динамика изменения сывороточной гиалуронидазной активности

была одинаковой [9]. В связи с этим представляло интерес выяснить, будут ли соли других галогенов этих катионов оказывать аналогичное влияние на сывороточную гиалуронидазную активность.

Методы и принципы исследования

Эксперименты проводились на самцах белых крыс линии Вистар весом 200-300 г, содержащихся в условиях вивария. Животных декапитировали, после чего собирали кровь, давали ей свернуться, а затем центрифугировали при 600 г и температуре 4°C в течение 5 минут. Сыворотку отбирали и использовали для проведения опытов, или хранили в замороженном при -20°C виде до дня применения в экспериментах. Все процедуры, выполненные с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ.

Образцы инкубировали в течение 3 часов при 37°C в присутствии гиалуроновой кислоты (0,5 мг/мл), после чего активность гиалуронидазы сыворотки крови определяли при помощи флюориметрического метода Моргана-Эльсона в модификации Такахаши [10]. Длина волны возбуждения – 545 нм, эмиссии - 602 нм (Флюорат – 2М, ЛЮМЭКС, Санкт-Петербург, Россия). Сопутствующую экзогидролазную активность подавляли добавлением в среду инкубации 0.03 М слезовой кислоты. Единицей ферментативной активности считалось то количество фермента, которое при данных условиях реакции приводило к образованию 1 микромоля конечного п-ацетилглюкозамина в течение 1 минуты.

Статистическая оценка достоверности отличий полученных результатов проводилась при помощи t-критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони для множественных сравнений. Результаты, представленные в статье являются средними значениями \pm ошибка среднего ($M \pm m$).

Результаты и их обсуждение

На рисунке №1 показана динамика изменения сывороточной гиалуронидазной активности при добавлении в среду инкубации разных концентраций хлорида и фторида натрия (0, 50, 100 и 200 мМ). Как видно из рисунка №1, если с увеличением концентрации хлорида натрия до 100 мМ наблюдался достоверный рост ферментативной активности, то в присутствии соответствующих концентраций фторида натрия подобный эффект отсутствовал. При одинаковой концентрации 100 мМ хлорид натрия вызывал рост активности гиалуронидазы в 2-2,5 раза, в то время как добавление фторида натрия вызывало тенденцию к снижению ее активности. При увеличении концентрации до 200 мМ хлорид натрия так же как и фторид натрия вызывали снижение активности сывороточной гиалуронидазы. Однако, если хлорид натрия снижал активность фермента до значений, сопоставимых с контрольными, то фторид натрия вызывал почти полное подавление ферментативной активности.

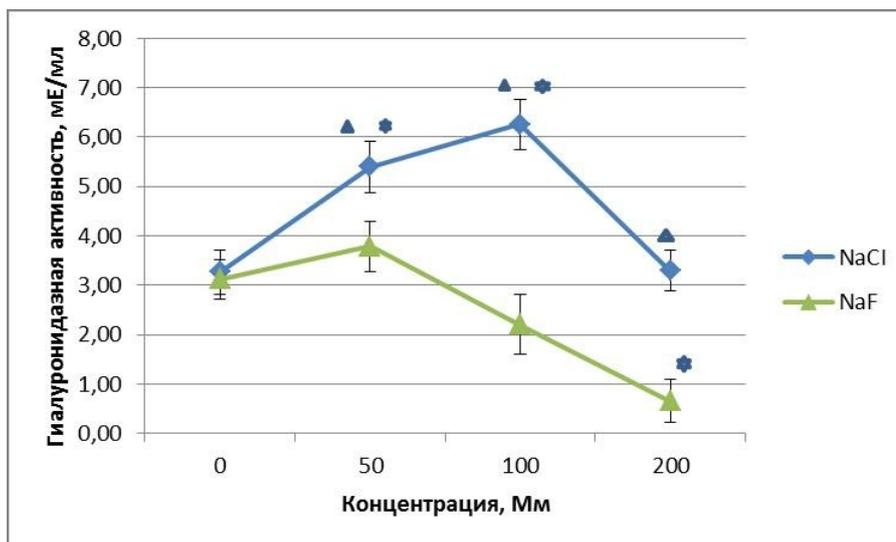


Рисунок 1 - Влияние хлорида и фторида натрия на активность гиалуронидазы сыворотки крови крыс линии Вистар
DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.144.55.1>

Примечание: звездочкой обозначены достоверные отличия при $p < 0,05$ по сравнению с контролем на обоих графиках; треугольником обозначены достоверные отличия при $p < 0,05$ между хлоридом и фторидом натрия в каждой точке; результаты представляют средние значения 6 отдельных экспериментов

Аналогичная картина обнаруживалась при сравнении графиков зависимости сывороточной гиалуронидазной активности от различных концентраций хлорида и бромид калия (Рис. 2). Так же как и фторид натрия, по сравнению с хлоридом натрия, бромид калия, по сравнению с хлоридом калия, не оказывал стимулирующего влияния на сывороточную гиалуронидазную активность при концентрации 100 мМ, а при концентрации 200 мМ подавлял ферментативную активность в гораздо большей степени, нежели хлорид калия.

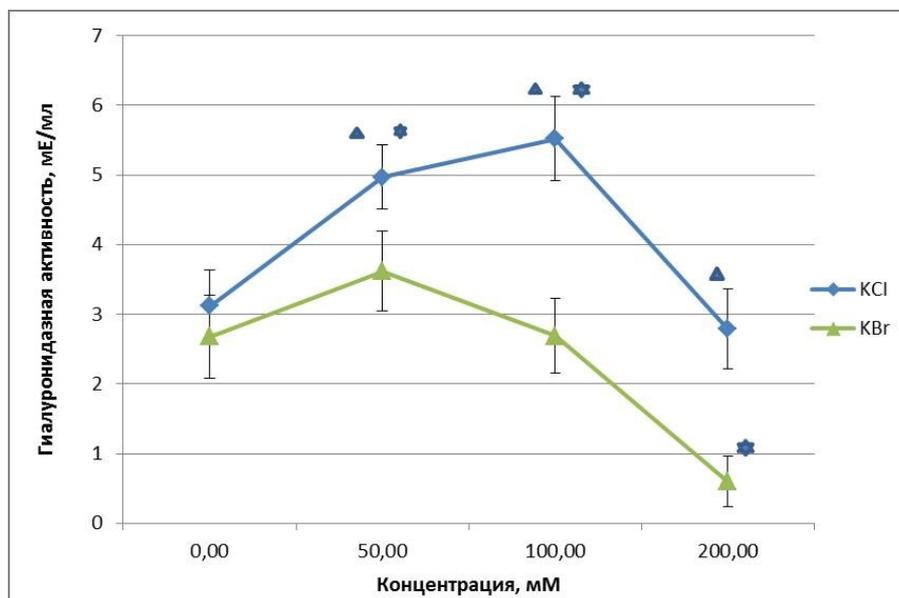


Рисунок 2 - Влияние хлорида и бромида калия на активность гиалуронидазы сыворотки крови крыс линии Вистар
DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.144.55.2>

Примечание: звездочкой обозначены достоверные отличия при $p < 0,05$ по сравнению с контролем на обоих графиках; треугольником обозначены достоверные отличия при $p < 0,05$ между хлоридом и бромидом калия в каждой точке; результаты представляют средние значения 6 отдельных экспериментов

Таким образом, в отсутствие ионов хлора как натрия, так и калий не вызывали достоверного роста гиалуронидазной активности, несмотря на тенденцию к некоторому увеличению при концентрации 50 мМ. Активирующее влияние хлорида натрия на сывороточную гиалуронидазную активность с максимумом в районе 100 мМ известно достаточно давно [6]. Тем не менее возникал вопрос о том, с анионами хлора связано это влияние, или же с катионами натрия? Как было показано нами ранее, замена натрия на калий никак не влияла на график зависимости сывороточной гиалуронидазы от концентрации катиона. Хлорид калия, так же как и хлорид натрия, вызывал значительный рост гиалуронидазной активности, достигающий максимальных значений при 100 мМ [9]. В то же время, как показывают результаты данной работы, замена ионов хлора на другие галогены не вызывала достоверного увеличения активности фермента ни у солей натрия, ни у солей калия, что указывает на определяющую роль ионов хлора в активировании сывороточной гиалуронидазы. Увеличение концентрации галогенидов натрия и калия до 200 мМ вызывало снижение гиалуронидазной активности, что также хорошо согласуется с литературными данными о влиянии хлорида натрия на гиалуронидазную активность сыворотки крови. Однако, по сравнению с хлоридами, фториды и бромиды этих катионов оказывали гораздо больший ингибирующий эффект, и, почти полностью, подавляли активность сывороточной гиалуронидазы, что также подчеркивает особую роль хлоридов в регуляции ферментативной активности сывороточной гиалуронидазы.

Заключение

Ионы хлора необходимы для увеличения активности гиалуронидазы, определяемой в крови крыс линии Вистар. Высокие концентрации хлоридов как натрия, так и калия оказывают гораздо меньший ингибирующий эффект на сывороточную гиалуронидазную активность белых крыс, по сравнению с фторидом натрия и бромидом калия. Разнонаправленное в зависимости от концентрации влияние хлорида натрия на активность гиалуронидазы сыворотки крови, очевидно, связано в большей степени с анионами хлора, чем с катионами натрия.

Конфликт интересов

Не указан.

Conflict of Interest

None declared.

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.

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. Laurent T. C. Hyaluronan / T. C. Laurent, J. R. Fraser // FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. — 1992. — 6(7). — p. 2397-404.

2. Fraser J. R. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover / J. R. Fraser, T. C. Laurent, U. B. Laurent // *J Intern Med.* — 1997. — 242. — p. 27–33. DOI: 10.1046/j.1365-2796.1997.00170.x.
3. Stern R. Hyaluronan fragments: an information-rich system / R. Stern, A. A. Asari, K. N. Sugahara // *European Journal of Cell Biology.* — 2006. — 85(8). — p. 699-715. DOI: 10.1016/j.ejcb.2006.05.009.
4. Kobayashi T. Hyaluronan: Metabolism and Function / T. Kobayashi, T. Chanmee, N. Itano // *Biomolecules.* — 2020. — 10(11). — p. 1525. DOI: 10.3390/biom10111525.
5. Erickson M. Chain Gangs: New Aspects of Hyaluronan Metabolism / M. Erickson, R. Stern // *Biochem Res Int.* — 2012. — 2012. №7. — p. 893947. DOI: 10.1155/2012/893947.
6. Afify A. M. Purification and Characterization of Human Serum Hyaluronidase / A. M. Afify, M. Stern, M. Guntenhoner et al. // *Archives of Biochemistry and Biophysics.* — 1993. — 305(2). — p. 434–441. DOI: 10.1006/abbi.1993.1443.
7. 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.
8. Gasingirwa M. C. Endocytosis of hyaluronidase-1 by the liver / M. C. Gasingirwa, J. Thirion, J. Mertens-Strijthagen et al. // *Biochemical Journal.* — 2010. — 430(2) . — p. 305–313. DOI: 10.1042/BJ20100711.
9. Дзгоев С. Г. Изменение гиалуронидазной активности под влиянием основных катионов сыворотки крови / С. Г. Дзгоев // *Международный научно-исследовательский журнал.* — 2024. — 4(142). DOI: 10.23670/IRJ.2024.142.107.
10. Takahashi T. A fluorimetric Morgan-Elson assay method for hyaluronidase activity / T. Takahashi, M. Ikegami-Kawai, R. Okuda, K. Suzuki // *Anal. Biochem.* — 2003. — 322(2) . — p. 257-263. — DOI: 10.1016/j.ab.2003.08.005.

Список литературы на английском языке / References in English

1. Laurent T. C. Hyaluronan / T. C. Laurent, J. R. Fraser // *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* — 1992. — 6(7). — p. 2397-404.
2. Fraser J. R. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover / J. R. Fraser, T. C. Laurent, U. B. Laurent // *J Intern Med.* — 1997. — 242. — p. 27–33. DOI: 10.1046/j.1365-2796.1997.00170.x.
3. Stern R. Hyaluronan fragments: an information-rich system / R. Stern, A. A. Asari, K. N. Sugahara // *European Journal of Cell Biology.* — 2006. — 85(8). — p. 699-715. DOI: 10.1016/j.ejcb.2006.05.009.
4. Kobayashi T. Hyaluronan: Metabolism and Function / T. Kobayashi, T. Chanmee, N. Itano // *Biomolecules.* — 2020. — 10(11). — p. 1525. DOI: 10.3390/biom10111525.
5. Erickson M. Chain Gangs: New Aspects of Hyaluronan Metabolism / M. Erickson, R. Stern // *Biochem Res Int.* — 2012. — 2012. №7. — p. 893947. DOI: 10.1155/2012/893947.
6. Afify A. M. Purification and Characterization of Human Serum Hyaluronidase / A. M. Afify, M. Stern, M. Guntenhoner et al. // *Archives of Biochemistry and Biophysics.* — 1993. — 305(2). — p. 434–441. DOI: 10.1006/abbi.1993.1443.
7. 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.
8. Gasingirwa M. C. Endocytosis of hyaluronidase-1 by the liver / M. C. Gasingirwa, J. Thirion, J. Mertens-Strijthagen et al. // *Biochemical Journal.* — 2010. — 430(2) . — p. 305–313. DOI: 10.1042/BJ20100711.
9. Dzgoev S. G. Izmenenie gialuronidaznoj aktivnosti pod vlijaniem osnovnyh kationov syvorotki krovi [Changes in hyaluronidase activity under the influence of basic serum cations] / S. G. Dzgoev // *International Research Journal.* — 2024. — 4(142). DOI: 10.23670/IRJ.2024.142.107. [in Russian]
10. Takahashi T. A fluorimetric Morgan-Elson assay method for hyaluronidase activity / T. Takahashi, M. Ikegami-Kawai, R. Okuda, K. Suzuki // *Anal. Biochem.* — 2003. — 322(2) . — p. 257-263. — DOI: 10.1016/j.ab.2003.08.005.