

БИОХИМИЯ / BIOCHEMISTRY

DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.144.59>

ХЛОРИД-АНИОНЫ НЕОБХОДИМЫ ДЛЯ ПРОЯВЛЕНИЯ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ СЫВОРОТОЧНОЙ ГИАЛУРОНИДАЗЫ

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 проведенном исследовании представлены результаты, демонстрирующие необходимость присутствия анионов хлора для проявления гиалуронидазной активности сыворотки крови крыс линии Вистар. В наших предыдущих работах было показано, что только хлориды натрия и калия, по сравнению с другими галогенидами этих катионов, вызывали рост активности фермента в несколько раз, в то время как отличий между хлоридом натрия и хлоридом калия по влиянию на гиалуронидазную активность обнаружено не было. В данной работе создание кислой среды инкубации, необходимой для проявления ферментативной активности, создавалось добавлением в буфер (0,1 М ацетат натрия) соляной или уксусной кислот до финального pH, равного 3,7. Было продемонстрировано, что, если pH доводили соляной кислотой, можно было наблюдать гиалуронидазную активность, которая полностью отсутствовала, если pH среды инкубации фермента доводили уксусной кислотой. Делается вывод, что для проявления гиалуронидазной активности сыворотки крови требуются анионы хлора.

Ключевые слова: сывороточная гиалуронидаза, ацетат натрия, соляная кислота, уксусная кислота.

CHLORIDE ANIONS ARE REQUIRED FOR THE ENZYMATIC ACTIVITY OF 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 present study presents results demonstrating the necessity of the presence of chlorine anions for the manifestation of hyaluronidase activity of blood serum of Wistar rats. In our previous studies it was shown that sodium and potassium chlorides alone, compared to other halides of these cations, caused a several-fold increase in enzyme activity, while no differences between sodium chloride and potassium chloride were found in their effect on hyaluronidase activity. In this work, the creation of an acidic incubation environment required for enzymatic activity was created by adding hydrochloric or acetic acid to the buffer (0.1 M sodium acetate) to a final pH of 3.7. It was demonstrated that if the pH was adjusted with hydrochloric acid, hyaluronidase activity could be observed, which was completely absent if the pH of the enzyme incubation medium was adjusted with acetic acid. It is concluded that chlorine anions are required for the hyaluronidase activity of serum.

Keywords: serum hyaluronidase, sodium acetate, hydrochloric acid, acetic acid.

Введение

Гиалуроновая кислота, являясь основным структурным компонентом соединительной ткани, представляет собой гигантский гетерополисахарид, содержащий большое количество отрицательных зарядов, связывающих и удерживающих в тканях диполи воды и различные катионы [1]. На сегодняшний день многочисленные литературные данные демонстрируют участие этого полимера в таких физиологических процессах, как клеточное деление, пролиферация и миграция клеток, регуляция водно-электролитного обмена [2]. Также продемонстрировано участие гиалуроновой кислоты в формировании целого ряда патологических состояний, таких как онкологические заболевания, сахарный диабет, артриты [3], [4]. Такое разнообразие эффектов, очевидно, связано с регуляторной ролью гиалуроновой кислоты, в зависимости от степени полимеризации которой влияние может быть прямо противоположным. В крови человека и ряда млекопитающих обнаружена значительная гиалуронидазная активность, связанная с сывороточной гиалуронидазой, циркулирующей по организму [5]. На сегодняшний день нет ясного представления о роли этого фермента с кислым pH-оптимумом, что делает изучение катаболизма гиалуроновой кислоты насущной и актуальной задачей.

В нашем предыдущем исследовании было показано, что ионы хлора могут играть существенную роль в активировании сывороточной гиалуронидазы, поскольку замена хлоридов натрия и калия на фториды и бромиды лишала соли этих катионов активирующего влияния [6]. В связи с этим представляло интерес выяснить, будет ли проявляться гиалуронидазная активность в среде инкубации, в которой отсутствуют анионы хлора.

Методы и принципы исследования

В экспериментах использовали крыс линии Вистар обоего пола массой около 300 г, которые содержались в стандартных условиях вивария *ad libitum*. Крыс декапитировали и собирали кровь в центрифужные пробирки. После

сворачивания крови пробирки центрифугировали 5 минут при 600 g, надосадочную жидкость отбирали и использовали в дальнейших экспериментах. Эксперименты на лабораторных животных проводились в полном соответствии с теми этическими нормами и правилами, которые утверждены правовыми актами Российской Федерации и соответствуют рекомендациям биоэтического комитета Института биомедицинских исследований Владикавказского Научного центра Российской академии наук.

Гиалуронидазную активность определяли по флуориметрическому методу Такахаси с использованием реакции Морган-Эльсона в модификации Рейсига [7]. Сыворотку крови (10 мкл) инкубировали при 37° С в течение 3 часов в среде инкубации (140 мкл), содержащей 0,5 мг/мл высокомолекулярной гиалуроновой кислоты (ООО «НПО АЛЬФАРМ», Ростов-на-Дону, Россия). В среде инкубации отсутствовал хлорид натрия, а в качестве буфера использовали 0,1М ацетат натрия (VWR International LLC, США), pH 3,7. Для подавления сопутствующей экзогидролазной активности в среду инкубации добавляли 0,02М слизиной кислоты. pH реакционной среды доводили до 3,7 добавлением концентрированной соляной кислоты или добавлением ледяной уксусной кислоты. Флуоресценцию измеряли при волне возбуждения – 545 нм, эмиссии – 602 нм (Флуорат – 2М, ЛЮМЭКС, Санкт-Петербург, Россия). За единицу активности гиалуронидазы принимали количество фермента, необходимого в данных условиях реакции для образования 1 микромоля конечного п-ацетилглюкозамина за 1 мин. Использованные химические реактивы отечественного производства имели градацию не ниже «хч».

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием t-критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони. Экспериментальные данные, представленные в работе, являются средними значениями \pm ошибка среднего ($M \pm m$).

Результаты и их обсуждение

На рисунке представлена гиалуронидазная активность сыворотки крови крыс линии Вистар. pH среды инкубации, в которой инкубировалась сыворотка, доводили до значения 3,7 добавлением в первом случае концентрированной соляной кислоты, а во втором случае добавлением ледяной уксусной кислоты.

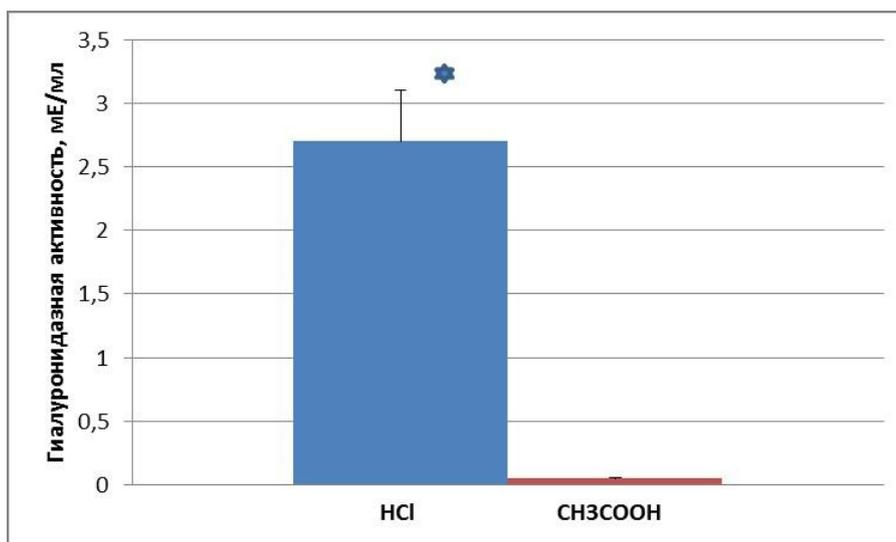


Рисунок 1 - Гиалуронидазная активность сыворотки крови крыс линии Вистар
DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.144.59.1>

Примечание: pH среды инкубации (3,7) создавали добавлением соляной кислоты (HCl) или уксусной кислоты (СНЗСООН); звездочкой обозначены достоверные отличия при $p < 0,001$; результаты представляют средние значения 5 отдельных экспериментов

Как видно из рисунка, когда необходимое pH среды инкубации создавалось добавлением соляной кислоты, значение гиалуронидазной активности сыворотки крови составляло, в среднем, 2,7 мЕ/мл, что хорошо согласуется с нашими ранее полученными результатами по определению гиалуронидазной активности сыворотки крови крыс линии Вистар [6], [8]. Когда же доведение pH среды инкубации до 3,7 обеспечивалось добавлением уксусной кислоты, то гиалуронидазная активность сыворотки крови полностью подавлялась. Следует отметить, что, по сравнению с нашими предыдущими исследованиями, в данном исследовании в качестве буфера использовался ацетат натрия (0,1 М), и в среде инкубации отсутствовал хлорид натрия. Поэтому, источником анионов хлора могла выступать только соляная кислота, которая использовалась для создания кислотной среды. Во втором случае добавление ледяной уксусной кислоты создавало соответствующую pH среды, но не вносило в среду инкубации анионов хлора, вместо которых присутствовали ацетат-анионы.

Полученные результаты позволяют предположить обязательное присутствие анионов хлора в среде инкубации для проявления сывороточной гиалуронидазной активности. Однако, утверждать, что анионы хлора оказывают непосредственное влияние на фермент, не представляется возможным, поскольку в сыворотке крови присутствуют

ингибиторы гиалуронидазы, о которых на сегодняшний день мало, что известно [9]. Таким образом, дозо-зависимое влияние хлоридов на гиалуронидазную активность может быть связано с непосредственным влиянием не на сывороточную гиалуронидазу, а на ее ингибиторы. Для прояснения этого вопроса требуются дальнейшие исследования.

Также нельзя исключать той возможности, что уксусная кислота может подавлять активность сывороточной гиалуронидазы. В самом начале исследований активности гиалуронидазы в литературе появились сведения о том, что ацетат может ингибировать гиалуронидазную активность [10]. В связи с этим, традиционно, в исследованиях сывороточной гиалуронидазной активности, чаще всего, применяют в качестве буфера натриевую соль муравьиной кислоты, добавлением которой и создают кислую среду. Также, как правило, в среде инкубации присутствует хлорид натрия (0,1 М) [11]. В наших экспериментах применение ацетата натрия в качестве буфера в отсутствие в среде инкубации сыворотки крови хлорида натрия не вызывало ингибирования гиалуронидазной активности, если pH доводили соляной кислотой. Этот факт, на наш взгляд, подтверждает представление о том, что причиной подавления активности сывороточной гиалуронидазы, когда pH среды доводили уксусной кислотой, является не присутствие ацетата в среде инкубации, а отсутствие в ней ионов хлора.

Заключение

Хлорид натрия, являясь основным минеральным компонентом крови млекопитающих и человека, оказывает регулирующее влияние на гиалуронидазу сыворотки крови. В этом влиянии главную роль выполняют анионы хлора, которые необходимы для проявления ферментативной активности сывороточной гиалуронидазы на примере крыс линии Вистар. Регулирующее влияние ионов хлора может быть связано с непосредственным воздействием на активный центр фермента, или же опосредовано влиянием на ингибиторы гиалуронидазы, циркулирующих в крови.

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. Csoka A.B. Hypotheses on the evolution of hyaluronan: A highly ironic acid / A.B. Csoka, R. Stern // *Glycobiology*. — 2013. — 23. — p. 398–411. — DOI: 10.1093/glycob/cws218.
2. Garantziotis S. Hyaluronan biology: A complex balancing act of structure, function, location and context / S. Garantziotis, R.C. Savani // *Matrix Biol*. — 2019. — 78–79. — p. 1–10. — DOI: 10.1016/j.matbio.2019.02.002.
3. Soltes L. Degradative action of reactive oxygen species on hyaluronan / L. Soltes, R. Mendichi, G. Kogan et al. // *Biomacromolecules*. — 2006. — 7(3). — p. 659–668. — DOI: 10.1021/bm050867v.
4. Toole B.P. Hyaluronan in morphogenesis. / B.P. Toole // *Semin. Cell Dev. Biol*. — 2001. — 12(2). — p. 79–87. — DOI: 10.1006/scdb.2000.0244.
5. 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.
6. Дзгоев С. Г. Ионы хлора оказывают регулирующее влияние на сывороточную гиалуронидазу / С. Г. Дзгоев // *Международный научно-исследовательский журнал*. — 2024. — 6 (144).
7. Takahashi T. A fluorimetric Morgan-Elson assay method for hyaluronidase activity / T. Takahashi, M. Ikegami-Kawai, R. Okuda et al. // *Anal. Biochem*. — 2003. — 322(2). — p. 257–263. — DOI: 10.1016/j.ab.2003.08.005.
8. Дзгоев С.Г. Изменение гиалуронидазной активности под влиянием основных катионов сыворотки крови / С.Г. Дзгоев // *Международный научно-исследовательский журнал*. — 2024. — 4(142). — с. 1–4. — DOI: 10.23670/IRJ.2024.142.107.
9. Mio K. Inhibitors of the hyaluronidases / K. Mio, R. Stern // *Matrix Biol*. — 2002. — 21(1). — p. 31–37. — DOI: 10.1016/s0945-053x(01)00185-8.
10. Polansky J.R. Brain hyaluronidase: changes in activity during chick development / J.R. Polansky, B.P. Toole, J. Gross // *Science*. — 1974. — 183. — p. 862–864. — DOI: 10.1126/science.183.4127.862.
11. Afify A.M. Purification and characterization of human serum hyaluronidase / A.M. Afify, M. Stern, M. Guntenhöner et al. // *Arch Biochem Biophys*. — 1993. — 305(2). — p. 434–441. — DOI: 10.1006/abbi.1993.1443.

Список литературы на английском языке / References in English

1. Csoka A.B. Hypotheses on the evolution of hyaluronan: A highly ironic acid / A.B. Csoka, R. Stern // *Glycobiology*. — 2013. — 23. — p. 398–411. — DOI: 10.1093/glycob/cws218.
2. Garantziotis S. Hyaluronan biology: A complex balancing act of structure, function, location and context / S. Garantziotis, R.C. Savani // *Matrix Biol*. — 2019. — 78–79. — p. 1–10. — DOI: 10.1016/j.matbio.2019.02.002.
3. Soltes L. Degradative action of reactive oxygen species on hyaluronan / L. Soltes, R. Mendichi, G. Kogan et al. // *Biomacromolecules*. — 2006. — 7(3). — p. 659–668. — DOI: 10.1021/bm050867v.
4. Toole B.P. Hyaluronan in morphogenesis. / B.P. Toole // *Semin. Cell Dev. Biol*. — 2001. — 12(2). — p. 79–87. — DOI: 10.1006/scdb.2000.0244.

5. 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 .
6. Dzgoev S. G. Iony hlora okazyvajut regulirujushee vlijanie na syvorotochnuju gialuronidazu [Chloride ions have a regulating effect on serum hyaluronidase] / S. G. Dzgoev // *International Scientific Research Journal.* — 2024. — 6 (144). [in Russian]
7. Takahashi T. A fluorimetric Morgan-Elson assay method for hyaluronidase activity / T. Takahashi, M. Ikegami-Kawai, R. Okuda et al. // *Anal. Biochem.* — 2003. — 322(2). — p. 257-263. — DOI: 10.1016/j.ab.2003.08.005.
8. Dzgoev S.G. Izmenenie gialuronidaznoj aktivnosti pod vlijaniem osnovnyh kationov syvorotki krovi [Changes in hyaluronidase activity under the influence of major blood serum cations] / S.G. Dzgoev // *International Scientific Research Journal.* — 2024. — 4(142). — p. 1-4. — DOI: 10.23670/IRJ.2024.142.107. [in Russian]
9. Mio K. Inhibitors of the hyaluronidases / K. Mio, R. Stern // *Matrix Biol.* — 2002. — 21(1) . — p. 31-37. — DOI: 10.1016/s0945-053x(01)00185-8.
10. Polansky J.R. Brain hyaluronidase: changes in activity during chick development / J.R. Polansky, B.P. Toole, J. Gross // *Science.* — 1974. — 183. — p. 862-864. — DOI: 10.1126/science.183.4127.862.
11. Afify A.M. Purification and characterization of human serum hyaluronidase / A.M. Afify, M. Stern, M. Guntenhöner et al. // *Arch Biochem Biophys.* — 1993. — 305(2). — p. 434-441. — DOI: 10.1006/abbi.1993.1443.