Дзгоев С.Г.

Влияние ионов натрия на активность сывороточной гиалуронидазы 1-го типа

*Владикавказский Научный Центр Российской Академии Наук,
Северо-Осетинский государственный университет
(Россия, Владикавказ)*

doi: 10.18411/lj-10-2018-153

idsp: 000001:lj-10-2018-153

Актуальность исследования гиалуроновой кислоты (ГК) в организме человека связана с научными данными последних десятилетий, в ходе которых обнаружилась её активная роль в ряде патологических состояний, таких как рак, диабет, цирроз, ревматоидный артрит [1].

Высокая скорость обмена, разнообразие форм и размеров высокомолекулярного полимера ГК является результатом ферментативной активности энзимов, синтезирующих и разрушающих ГК. Гиалуронидазы – это семейство энзимов, вовлеченных в деградацию ГК. Они имеют широкий спектр свойств, включая различия в размерах, в чувствительности, в каталитическом механизме, в специфичности субстрата, на котором они функционируют и в оптимальной pH среде, необходимой для ферментативной реакции [2]. Гиалуронидаза плазмы крови **Hyal-1** - первая соматическая гиалуронидаза, выделенная из человеческой плазмы [3]. Это энзим размером 57-кДа, состоящий из одной полипептидной цепи, активность которого высока в крови человека [4]. В сыворотке белых крыс выявлены две изоформы Hyal-1 с молекулярной массой 132 и 73 кДа [5]. Этот фермент проявляет максимальную активность в среде с кислой pH и считается лизосомальным энзимом. Поэтому циркулирующая в крови Hyal-1, находится в неактивном состоянии, поскольку pH крови является слабощелочным. Одним из возможных способов создания кислой pH и, соответственно, создания pH-оптимума для фермента на поверхности клеток, может быть появление углубления плазматической мембраны, куда начинают секретироваться из клетки протоны в обмен на ионы натрия за счет мембранных белков-переносчиков. В этой связи представляло интерес выяснить, как влияют ионы натрия на активность сывороточной Hyal-1 белых крыс.

Материалы и методы исследования:

В экспериментах использовали белых крыс линии Вистар, которые содержались на стандартной диете и свободном доступе к воде. После декапитирования кровь собирали, центрифугировали 5 минут при 600 g, отбирали сыворотку и использовали в экспериментах.

Зимография.

Выявление белков с гиалуронидазной активностью осуществляли методом зимографии с импрегнированной в гель ГК [6] с некоторыми модификациями.

Крысиную сыворотку смешивали с эквивалентным объемом буфера, содержащего 4% додецилсульфат натрия (СДС) и не содержащий редуцирующий реагент. После инкубации при температуре 37°C к образцам добавляли ¼ объема бромфенолового синего в 40% глицерине. Затем 3 мкл смеси добавляли к полиакриламидному гелю (ПААГ) в 7% концентрации в присутствии СДС, содержащему 0.17 мг/мл ГК и проводили электрофорез при силе тока 25мА в течение 70 мин при температуре 4°C. Затем гель инкубировался в 2.5% растворе Тритона X – 100 в течение 80 минут при комнатной температуре и инкубировался в 0.1 М натрий-ацетатном буфере (pH 3.5) в течение 18 часов при температуре 37°C. Затем гель промывался 0.1мг/мл Проназой Е в 20 mM Трис-HCl буфере (pH 8.0) в течение 2 часов при температуре 37°C. Гель окрашивался 0.5 % алциановым синим. После обесцвечивания проводили повторное окрашивание геля красителем кумасси бриллиантовый синий R-250.

Количественное определение белка осуществляли по методу М. Брэдфорд [7].

Результаты исследования

На рисунке 1 представлен гиалуронидазный спектр активности сыворотки крови в зависимости от времени инкубации с СДС. При нулевой инкубации с СДС проявился самый широкий спектр гиалуронидазной активности, представленный белковыми зонами в районе 132, 100, 73 и 47 кДа. Наибольшей ферментативной активностью обладали белки в размере 73 и 47 кДа. Между ними можно было наблюдать белковые зоны с гиалуронидазной активностью, плавно переходящие одна в другую. Белки 132 и 100 кДа слабо выражены. После часовой инкубации с СДС при 37°C гиалуронидазный спектр резко менялся. Гиалуронидазная активность зоны между белками 47 и 73 кДа исчезла, как и белок весом 100 кДа, а активность белковых зон в 132 и 73 кДа значительно возросла. Увеличение времени инкубации до 90 минут практически не изменило спектр гиалуронидазной активности сыворотки крови. Через полтора часа инкубации можно было наблюдать гиалуронидазную активность в двух белковых зонах с молекулярным весом 132 и 73 кДа, приблизительно с той же интенсивностью, как и при 60 минутной инкубации.

Сравнение полученных нами данных с имеющимися в литературе данными показало, что при нулевой инкубации с СДС в сыворотке крови белых крыс тоже были выявлены белки с молекулярным весом 47, 73, 100 и 132 кДа, обладающие гиалуронидазной активностью [5]. Однако, помимо этих белков, в наших условиях эксперимента выявились белки в диапазоне от 47 до 73 кДа, которые также обладали гиалуронидазной активностью. После часовой инкубации с СДС при 37°C у нас также, как и по литературным данным, выявлялись только две белковые зоны с молекулярным весом 73 и 132 кДа, обладающие гиалуронидазной активностью. Такое перераспределение в гиалуронидазной активности, когда одни белки сначала появляются, а затем через определенное время исчезают, скорее всего связано с образованием промежуточных форм при денатурировании молекул Hyal-1 в присутствии детергента СДС. В пользу этого предположения говорит тот факт, что, если активность таких белков как 47 и 100 кДа с течением времени исчезала, то активность таких белков, как 73 и 132 кДа, наоборот, увеличивалась.

Таким образом, в сыворотке крови крыс выявляются две стабильные изоформы Hyal-1 с молекулярным весом 73 и 132 кДа.

Рис.1 Влияние инкубации с СДС на гиалуронидазный спектр активности

На рисунке 2 представлена гиалуронидазная активность Hyal-1 в зависимости от концентрации ионов натрия (50 мМ и 150 мМ). С увеличением концентрации ионов натрия до 50 мМ наблюдалось снижение ферментативной активности как белка с молекулярным весом 73 кДа, так и белка с молекулярным весом 132 кДа.

Рис.2 Влияние концентрации ионов натрия Na^+ (мМ) на гиалуронидазную активность белков с молекулярным весом 132 и 73 кДа.

При увеличении концентрации ионов натрия до 150 мМ гиалуронидазная активность обоих изоформ резко подавлялась. То есть, можно сказать, что ионы Na^+ для обоих изоформ при этой концентрации ещё больше ингибировали ферментативную активность.

Таким образом, концентрация натрия в крови может оказывать регулирующее влияние на активность Hyal-1. При увеличении натрия в крови эффективность работы белков-переносчиков, осуществляющих Na^+/H^+ -обмен через плазматическую мембрану, должна снижаться. Кроме того, результаты данного исследования показывают, что увеличение концентрации натрия в среде инкубации подавляет активность Hyal-1.

1. Laurent, T.C. Biochemistry of hyaluronan / Laurent, T.C.// Acta Otolaryngol Suppl. - 1987; N 442:7-24.
2. Rügheimer, L. Kidney Hyaluronan /L. Rügheimer// Acta Universitatis Upsaliensis Uppsala - 2008: 12-15.
3. Frost, G.I. Purification, cloning, and expression of human plasma hyaluronidase / G.I. Frost [at all] // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1997; VOL. 236:10-15.
4. Csóka, T.B. The hyaluronidase gene HYAL1 maps to chromosome 3p21.2-p21.3 in human and 9F1-F2 in mouse, a conserved candidate tumor suppressor locus / T.B. Csóka [at all] // Genomics 1998; VOL. 48:63-70.
5. Ryu, O Miura. Analysis of glycosaminoglycan – Degrading enzymes by substrate Gel Electrophoresis (Zymography) / Ryu O Miura [at all] // Analytical Biochemistry - 1995; N 225: 333-340.
6. Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding / M. Bradford // Analitic Biochemistry - 1976; N 72: 248-254.
7. Ikegami-Kawai, M. Enhanced activity of serum and urinary hyaluronidase in streptozotocin-induced diabetic Wistar and GK rats / M. Ikegami-Kawai [at all] // Glycobiology – 2004; VOL. 14, N 1:65-72.