



ИССЛЕДОВАНИЕ ГИАЛУРОНИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ
В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ КРЫС ПРИ ФОРМИРОВАНИИ
РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА

С.Г. ДЗГОЕВ, С.В. СКУПНЕВСКИЙ, А.К. БАДТИЕВ, Е.Г. ПУХАЕВА, Ф.К. РУРУА

Институт биомедицинских исследований – филиал ФГБУН «ФНЦ «Владикавказский научный центр РАН», Пушкинская ул., 47, Владикавказ, 362025, Россия

Аннотация. Цель исследования. Определение гиалуронидазной активности в крови и моче крыс с адьювант-индуцированным ревматоидным артритом по сравнению со здоровыми животными. **Материалы и методы исследования.** Самцы крыс линии Вистар весом 250-300 г были разделены на контрольную ($n = 8$) и опытную группу ($n = 10$). Крысам контрольной группы однократно вводили в правую заднюю конечность подкожно изотонический раствор хлорида натрия, а животным опытной группы – полный адьювант Фрейнда. Через 6 недель у животных обеих групп собирали пробы крови и мочи, после чего методом зимографии в сыворотке крови и моче определяли гиалуронидазную активность. **Результаты и их обсуждение.** В сыворотке крови контрольной и опытной групп животных различий в гиалуронидазной активности не выявлено, в то время как в моче крыс с ревматоидным артритом активность фермента была на 25% больше по сравнению с контрольной группой. **Заключение.** Формирование патологических изменений, характерных для ревматоидного артрита, сопровождается увеличением гиалуронидазной активности в моче, обусловленном, по-видимому, ростом гиалуронидазной активности в коре почек с целью защиты гломерулярного аппарата от избытка гиалуроновой кислоты и ее дериватов в крови.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, гиалуронидаза, кровь, моча.

STUDY OF HYALURONIDASE ACTIVITY IN BIOLOGICAL FLUIDS OF RATS DURING
RHEUMATOID ARTHRITIS DEVELOPMENT

S.G. DZGOEV, S.V. SKUPNEVSKII, A.K. BADTIEV, E.G. PUKHAEVA, F.K. RURUA

*Institute of Biomedical Research – Branch of the Federal State Budgetary Institution of Science “Federal Research Center ‘Vladikavkaz Scientific Center of the Russian Academy of Sciences,’”
47 Pushkinskaya St., Vladikavkaz, 362025, Russia*

Abstract. Purpose of the study is to determine hyaluronidase activity in the blood and urine of rats with adjuvant-induced rheumatoid arthritis compared to healthy animals. **Materials and Methods.** Male Wistar rats weighing 250-300 g were divided into a control group ($n = 8$) and an experimental group ($n = 10$). Control group rats received a single subcutaneous injection of isotonic sodium chloride solution in the right hind limb, while animals in the experimental group received Freund’s complete adjuvant. Six weeks later, blood and urine samples were collected from both groups, and hyaluronidase activity in serum and urine was measured using zymography. **Results and Discussion.** No differences in hyaluronidase activity were detected in blood serum between the control and experimental groups, whereas urine from rats with rheumatoid arthritis showed 25% higher enzyme activity compared to the control group. **Conclusion.** The development of pathological changes characteristic of rheumatoid arthritis is accompanied by an increase in hyaluronidase activity in urine, presumably due to enhanced hyaluronidase activity in the renal cortex aimed at protecting the glomerular apparatus from excess hyaluronic acid and its derivatives in the blood.

Keywords: rheumatoid arthritis, hyaluronidase, blood, urine.

Введение. Основными компонентами межклеточного матрикса являются коллагеновые белки и глюкозаминогликаны, формирующие каркас любого органа и ткани. Именно эти компоненты, связывая большое количество молекул воды, обеспечивают, с одной стороны, поддерживающую среду для клеток, а, с другой стороны, возможность обмена водорастворимых веществ между клеткой и окружающей средой. Главным гликозаминогликаном соединительной ткани является *гиалуроновая кислота* (ГК) [7]. Для ряда заболеваний, продемонстрировано, что степень патологических изменений может коррелировать с ростом концентрации ГК и ее метаболитов [6].

Ревматоидный артрит является заболеванием, для которого характерно нарушение обмена соединительнотканых структур и, как результат, деформация суставов и утрата подвижности [8]. Для данно-

го заболевания также выявлена корреляция патогенеза с содержанием ГК и ферментов ее обмена – гиалуронансинтаз и гиалуронидаз [10, 11]. В этой связи представляло интерес выяснить, как влияют патологические изменения, характерные для ревматоидного артрита, на гиалуронидазную активность в таких биологических жидкостях организма как кровь и моча.

Цель исследования – провести сравнительный анализ гиалуронидазной активности в крови и моче здоровых крыс и крыс с адьювант-индуцированным ревматоидным артритом.

Материалы и методы исследования. Эксперименты проводили на самцах крыс линии Вистар массой 250-300 г, которые содержались на стандартной диете в условиях вивария. 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. Животные были разделены на контрольную и опытную группы. Введение растворов проводили под легким наркозом («Золетил», Франция). Крысам контрольной группы (8) однократно вводили в правую заднюю конечность подкожно изотонический раствор хлорида натрия в соотношении 0,1 мл на 200 г массы тела, а животным опытной группы (10) вместо хлорида натрия полный адьювант Фрейнда *Difco Laboratories (Detroit, Michigan, США)* в том же соотношении. Через 6 недель у животных собирали пробы крови и мочи. Забор крови делали под общим наркозом из сердца, после чего осуществляли эвтаназию животных в CO_2 – затравочной камере. Оценку изменения в суставах, характерных для ревматоидного артрита, делали при помощи рентгенографии тазобедренных суставов на стационарном ветеринарном аппарате *Ecoray Ultra 300V* (Корея).

Осмоляльность проб мочи у животных контрольной и опытной групп была одинаковой в районе 900-1000 мОсм. Концентрацию осмотически активных веществ измеряли криоскопическим методом (*Osmomat 030, Gonotec GMBH, Германия*).

Зимография. Выявление белков с гиалуронидазной активностью осуществляли методом зимографии с импрегнированной в гель гиалуроновой кислотой.

Образцы смешивали с равным объемом буфера, содержащего 4%-ный додецилсульфат натрия без редуцирующего агента, и оставляли при комнатной температуре на один час. Разделение белков проводили за счет диск-электрофореза в системе Лэмбли, но без редуцирующего агента [4]. После электрофореза гель отмывался 2.5%-ным раствором Тритона X-100 в течение 80 мин при комнатной температуре и инкубировался в 0.1 М натрий-ацетатном буфере (pH 3.5) в течение 18 ч при температуре 37 °C. Затем гель инкубировался в 20 мМ Трис-*HCl* буфере, содержащем 0.1 мг/мл проназу *E* («Sigma», Германия) при pH 8.0 в течение 2 ч при температуре 37 °C. Для визуализации зон с гидролизованной ГК гель окрашивался 0.5%-ным раствором алцианового синего («Panreac», Испания). После обесцвечивания проводилось повторное окрашивание геля 0.1%-ным раствором кумасси бриллиантовый синий *R-250* («Serva», Германия) с последующим обесцвечиванием.

Суммарную количественную оценку ферментативной активности определяли по площади неокрашенных пятен на геле, сканируя окрашенный гель на денситометре *GS-900* с программным обеспечением *Image Lab* («Bio-Rad», США). В качестве стандартов молекулярной массы белков применялся набор рекомбинантных белков («Bio-Rad», США).

Осмолярность мочи определяли на осмометре *OSMOMAT 3000 (GONOTEC, Германия)*.

Данные выражали как средние значения \pm ошибка среднего ($M \pm m$). Нормальность распределения контрольной и опытной групп оценивали с применением критерия Шапиро-Уилка. Достоверность отличий между группами определяли по *t*-критерию Стьюдента для независимых выборок. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05

Результаты и их обсуждение. На рис. представлены зимограммы сыворотки крови (А) и мочи (В) крыс с импрегнированной в гель высокополимерной ГА.

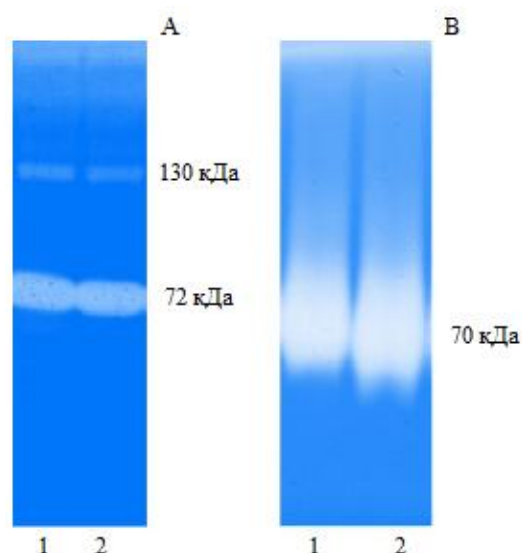


Рис. Зимограмма сыворотки крови (А) и мочи (В) крыс контрольной(1) и опытной (2) групп. Стрелками обозначены молекулярные массы белковых зон, обладающих гиалуронидазной активностью.

Как видно из рис., в сыворотке крови гиалуронидазная активность в виде неокрашенных пятен была характерна для белковых зон в районе 72 и 130 кДа. В моче также обнаруживалась гиалуронидазная активность в виде широкой полосы с центром в районе 68-72 кДа.

В сыворотке крови мы не обнаружили каких-либо достоверных отличий в суммарной гиалуронидазной активности между контрольной и опытной группами, в то время как результаты определения гиалуронидазной активности в моче показали, что у крыс опытной группы наблюдалось увеличение гиалуронидазной активности на 20-25 %, по сравнению с контрольной группой (табл.).

Таблица

Гиалуронидазная активность сыворотки крови и мочи здоровых и больных ревматоидным артритом крыс

	Контрольная группа (n = 8)	Опытная группа (n = 10)
кровь	4571,4 ± 74,6 усл.оптич.ед.	4789,2 ± 82,7 усл.оптич.ед.
моча	20282,7 ± 185,3 усл.оптич.ед.	25389,2 ± 243,4 усл. оптич. ед.*

Примечание: звездочкой обозначена достоверность отличий при $P = 0,037$

ГК, являясь главным гликозаминогликаном соединительной ткани, может находиться в разной степени полимеризации, влияя на способности межклеточного матрикса по связыванию воды. Для ряда патологий, в том числе и для ревматоидного артрита, показано увеличение содержания ГК в сыворотке крови, которое возникает в результате изменения баланса между активностями гиалуронансинтаз и гиалуронидаз – ферментов, синтезирующих и разрушающих гиалуроновую кислоту [3]. Считается, что резкое увеличение концентрации ГК в крови, например, при стрессе, может отражать адаптивную реакцию организма, которая связана не с активированием гиалуронансинтаз, а с ингибированием гиалуронидаз, поскольку энергетически более выгодно подавлять постоянно активную катаболическую реакцию, чем стимулировать синтез, особенно высокомолекулярных полимерных субстратов, составляющих внеклеточный матрикс [5].

Ранее нами было показано, что у больных ревматоидным артритом сывороточная гиалуронидазная активность была больше по сравнению со здоровыми людьми [1]. В данном исследовании каких-либо достоверных изменений сывороточной гиалуронидазной активности у здоровых крыс и у крыс с адьювант-стимулированным ревматоидным артритом обнаружено не было. Такое несоответствие, скорее всего, связано с методом определения гиалуронидазной активности. Ранее нами было показано, что у больных ревматоидным артритом наблюдался рост сывороточной гиалуронидазной активности, которую определяли при помощи цветной реакции методом Моргана-Эльсона, где сыворотка инкубируется с гиалуроновой кислотой [9]. Но данный метод не подходит для определения гиалуронидазной активности в моче, содержащей мочевины. Поэтому для определения гиалуронидазной активности мы использовали

зимографию, где сначала сывороточные белки были разделены при помощи электрофореза, а затем гель инкубировался в среде инкубации. Таким образом, белки, обладающие гиалуронидазной активностью, при зимографии не могут подвергнуться влиянию, например, сывороточных ингибиторов гиалуронидаз, которые могут находиться в крови и активность которых может модулироваться патологическим процессом.

Тем не менее, как показывают результаты данного исследования, в моче у крыс с ревматоидным артритом можно было наблюдать рост гиалуронидазной активности на 20-25 % по сравнению со здоровыми животными. Причиной этому может быть продемонстрированное в нашем недавнем исследовании увеличение гиалуронидазной активности в коре почек крыс с адьювант-стимулированным ревматоидным артритом [2]. Этот процесс, скорее всего, отражает ответную реакцию организма по защите гломерулярного аппарата от избытка ГК и ее дериватов при формировании патологического процесса, что и приводит к росту гиалуронидазной активности в моче.

Заключение. Формирование патологических изменений, характерных для ревматоидного артрита, сопровождается увеличением гиалуронидазной активности в моче, обусловленном, по-видимому, ростом гиалуронидазной активности в коре почек с целью защиты гломерулярного аппарата от избытка гиалуроновой кислоты и ее дериватов в крови.

Литература

1. Дзгоев С.Г., Тотров И.Н. Гиалуронидазная активность сыворотки крови больных ревматоидным артритом. // Тенденции развития науки и образования. 2019. №56(12). С.53-55. doi: 10.18411/lj-11-2019-269
2. Дзгоев С.Г. Моделирование ревматоидного артрита сопровождается изменением кортикопапиллярного соотношения гиалуронидазной активности почек. // Нефрология. 2023. №27(3). С. 86-91. doi.org/10.36485/1561-6274-2023-27-3-86-91
3. Kobayashi T., Chanmee T., Itano N. Hyaluronan: Metabolism and Function. // Biomolecules. 2020. №10(11). С. 1525. doi: 10.3390/biom10111525.
4. Laemmli U.K. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. // Nature 1970. №277. P. 680-685. doi: 10.1038/227680a0.
5. Mioa K., Stern R. Inhibitors of the hyaluronidases. // Matrix Biology. 2002. №21(1). P.31-37. doi: 10.1016/s0945-053x(01)00185-8.
6. Rosales P., Vitale D., Icardi A., Sevic I., Alaniz L. Role of Hyaluronic acid and its chemical derivatives in immunity during homeostasis, cancer and tissue regeneration. // Seminars in Immunopathology . 2024. №46(15). doi:10.1007/s00281-024-01024-7
7. Snetkov P., Zakharova K., Morozkina S., Olekhovich R., Uspenskaya M./Hyaluronic Acid: The Influence of Molecular Weight on Structural, Physical, Physico-Chemical, and Degradable Properties of Biopolymer. // Polymers. 2020. №12(8). P. 1800. doi: 10.3390/polym12081800.
8. Smolen J.S., Aletaha D., McInnes I.B. Rheumatoid arthritis. // Lancet. 2016. №388 (10055). P. 2023-2038. doi:10.1016/s0140-6736(16)30173-8
9. Takahashi T., Ikegami-Kawai M., Okuda R., Suzuki K. A fluorimetric Morgan-Elson assay method for hyaluronidase activity. // Anal. Biochem. 2003. №332. P. 257-263. doi: 10.1016/j.ab.2003.08.005.
10. Wells A.F., Klareskog L., Lindblad S., Laurent T.C. Correlation between increased hyaluronan localized in arthritic synovium and the presence of proliferating cells. A role for macrophage-derived factors. // Arthritis Rheum. 1992. №35 (4). P. 391-396. doi: 10.1002/art.1780350405.
11. Yoshida M., Sai S., Marumo K., Tanaka T., Itano N., Kimata K., Fujii K. Expression analysis of three isoforms of hyaluronan synthase and hyaluronidase in the synovium of knees in osteoarthritis and rheumatoid arthritis by quantitative real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. // Arthritis research & therapy. 2004. №6(6). P. 514-20. doi:10.1186/ar1223

References

1. Dzgoev SG, Totrov IN. Gialuronidaznaya aktivnost' syvorotki krovi bol'nyh revmatoidnym artritom [Hyaluronidase activity of blood serum of patients with rheumatoid arthritis]. Tendencii razvitiya nauki i obrazovaniya. 2019;56(12):3-55. doi: 10.18411/lj-11-2019-269
2. Dzgoev SG. Modelirovanie revmatoidnogo artrita soprovozhaetsya izmeneniem kortikopapillyarnogo sootnosheniya gialuronidaznoj aktivnosti pochek [Modeling of rheumatoid arthritis is accompanied by a change in the corticopapillary ratio of hyaluronidase activity of the kidneys]. Nefrologiya. 2023;27(3):6-91. doi.org/10.36485/1561-6274-2023-27-3-86-91
3. Kobayashi T, Chanmee T, Itano N. Hyaluronan: Metabolism and Function. Biomolecules. 2020;10(11):1525. doi: 10.3390/biom10111525.

4. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 1970;277:680-685. doi: 10.1038/227680a0.
5. Mioa K, Stern R. Inhibitors of the hyaluronidases. *Matrix Biology*. 2002;21(1):31-37. doi: 10.1016/s0945-053x(01)00185-8.
6. Rosales P, Vitale D, Icardi A, Sevic I, Alaniz L. Role of Hyaluronic acid and its chemical derivatives in immunity during homeostasis, cancer and tissue regeneration. *Seminars in Immunopathology* . 2024;46(15). doi:10.1007/s00281-024-01024-7
7. Snetkov P, Zakharova K, Morozkina S, Olekhnovich R, Uspenskaya M./Hyaluronic Acid: The Influence of Molecular Weight on Structural, Physical, Physico-Chemical, and Degradable Properties of Biopolymer. *Polymers*. 2020;12(8):1800. doi: 10.3390/polym12081800.
8. Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2016;388 (10055):2023-2038. doi:10.1016/s0140-6736(16)30173-8
9. Takahashi T, Ikegami-Kawai M, Okuda R, Suzuki K. A fluorimetric Morgan-Elson assay method for hyaluronidase activity. *Anal. Biochem*. 2003;332:257-263. doi: 10.1016/j.ab.2003.08.005.
10. Wells AF, Klareskog L, Lindblad S, Laurent TC. Correlation between increased hyaluronan localized in arthritic synovium and the presence of proliferating cells. A role for macrophage-derived factors. *Arthritis Rheum*. 1992;35 (4):391-396. doi: 10.1002/art.1780350405.
11. Yoshida M, Sai S, Marumo K, Tanaka T, Itano N, Kimata K, Fujii K. Expression analysis of three isoforms of hyaluronan synthase and hyaluronidase in the synovium of knees in osteoarthritis and rheumatoid arthritis by quantitative real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Arthritis research & therapy*. 2004;6(6):514-20. doi:10.1186/ar1223

Библиографическая ссылка:

Дзгоев С.Г., Скупневский С.В., Бадтиев А.К., Пухаева Е.Г., Руруа Ф.К. Исследование гиалуронидазной активности в биологических жидкостях крыс при формировании ревматоидного артрита // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2024. №6. Публикация 3-3. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2024-6/3-3.pdf> (дата обращения: 12.11.2024). DOI: 10.24412/2075-4094-2024-6-3-3. EDN VSINST*

Bibliographic reference:

Dzгоеv SG, Skupnevskii SV, Badtiev AK, Pukhaeva EG, Rurua FK. Issledovanie gialuronidaznoj aktivnosti v biologicheskikh zhidkostyakh krysa pri formirovanii revmatoidnogo artrita [Study of hyaluronidase activity in biological fluids of rats during rheumatoid arthritis development]. *Journal of New Medical Technologies, e-edition*. 2024 [cited 2024 Nov 12];6 [about 5 p.]. Russian. Available from: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2024-6/3-3.pdf>. DOI: 10.24412/2075-4094-2024-6-3-3. EDN VSINST

* номера страниц смотреть после выхода полной версии журнала: URL: <http://medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2024-6/e2024-6.pdf>

**идентификатор для научных публикаций EDN (eLIBRARY Document Number) будет активен после выгрузки полной версии журнала в eLIBRARY