

**АКТИВНОСТЬ ГИАЛУРОНИДАЗЫ 1-ГО ТИПА
В КЛЕТКАХ СОБИРАТЕЛЬНЫХ ТРУБОК И ИНТЕРСТИЦИЯ
ПАПИЛЛЯРНОЙ ЗОНЫ ПОЧЕК КРЫС**

© 2019 г. С. Г. Дзгоев^{1, 2, *}

¹*Северо-Осетинский государственный университет имени К.Л. Хетагурова,
Владикавказ, Россия*

²*Владикавказский Научный Центр РАН, Владикавказ, Россия*

**E-mail: stanislavdzgoev@yandex.ru*

Поступила в редакцию 30.10.2018 г.

После доработки 28.12.2018 г.

Принята к публикации 11.01.2019 г.

В клетках собирательных трубок и интерстициальной ткани почечного сосочка крыс линии Вистар методом зимографии выявлены две изоформы гиалуронидазы 1-го типа с молекулярной массой 63 и 73 кДа. Для клеток собирательных трубок основной изоформой был 63 кДа-белок, а в интерстиции – 73 кДа-белок. Использование коллагеназы для получения клеток собирательных трубок не влияло на активность обеих изоформ гиалуронидазы 1-го типа, в то время как инкубация ферментативных экстрактов почечных сосочков с коллагеназой в гораздо большей степени вызывала снижение гиалуронидазной активности 73 кДа-белка по сравнению с 63 кДа-белком. Обсуждаются механизмы постсинтетической модификации изоформ ГИАЛ1.

Ключевые слова: почки, собирательные трубки, соединительная ткань, гиалуроно-вая кислота, гиалуронидаза 1-го типа

DOI: 10.1134/S0869813919030038

Содержание гиалуроносовой кислоты (ГК) в почечной медулле в десятки раз превышает содержание ГК в корковой зоне почек [1]. Являясь основным структурным компонентом межклеточного матрикса, ГК может создавать сопротивление току воды из просвета собирательных трубок в кровеносные сосуды. Изменения степени полимеризации ГК может быть одним из факторов, регулирующих процесс осмотического концентрирования мочи в почках [2]. Уровень ГК в почечной медулле увеличивается при гидратации и снижается при дегидратации. Считается, что за высокое содержание ГК в интерстиции почечной медуллы ответственны интерстициальные клетки соединительной ткани [1, 3]. Синтез ГК осуществляется в плазматических мембранах при участии 3 типов гиалуронатсинтаз: HAS 1–3. Деполимеризация ГК обеспечивается различными гиалуронидазами, главными из которых считаются гиалуронидаза 1-го типа (ГИАЛ1) и гиалуронидаза 2-го типа (ГИАЛ2) [4]. ГИАЛ2 является мембраносвязанным ферментом, а ГИАЛ1 относится к лизосомальным ферментам, активность которого выявляется в крови и моче [5, 6]. Установлено, что активность ГИАЛ1 в почках, а также в крови и моче зависит от степени гидратации организма и может регулироваться вазопрессинном и другими гормонами [7, 8]. Но, несмотря на достигнутые успехи в понимании роли

обмена ГК в регуляции водно-электролитного баланса организма, на сегодняшний день многие вопросы еще остаются без ответа. Так, например, неясно, есть ли отличия в изоформах ГИАЛ1 в канальцевых структурах почечного сосочка и межклеточного матрикса. В экспериментах на гомогенатах почечного сосочка у крыс были выявлены две изоформы ГИАЛ1 размером 63 и 73 кДа [9, 10]. Однако не было понятно, в каких структурах почечного сосочка присутствуют данные белки. Для прояснения этого вопроса целью настоящей работы было установить, какие изоформы ГИАЛ1 содержат клетки собирательных трубок, и имеются ли какие-нибудь различия в изоферментном составе ГИАЛ1 клеток собирательных трубок и интерстициальной ткани почечной медуллы.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на самцах крыс линии Вистар массой 250–350 г, которые содержались на стандартной диете в условиях вивария. Это исследование проводилось в соответствии с принципами Базельской декларации и рекомендациями биоэтического комитета Северо-Осетинского государственного университета. В одном эксперименте использовали одну-две крысы, которых декапитировали, извлекали почки, выделяли сосочковые зоны и измельчали их до кусочков объемом 1–3 мм³. Затем измельченные кусочки помещали в буфер, содержащий (мМ): 135 NaCl, 5 KCl, 1 CaCl₂, 1.2 MgSO₄, 2 NaH₂PO₄, 10 глюкозы, 10 трис-HCl (“Serva”, Германия), 10 HEPES (“Serva”, Германия), pH 7.4, и использовали для получения клеток почечного сосочка, ферментативного экстракта ГИАЛ1 межклеточного матрикса или для выделения клеток собирательных трубок.

Получение клеток почечного сосочка. Измельченные кусочки почечных сосочков, находящиеся в охлажденном буфере объемом 2 мл, помещали в устройство, состоящее из двух шприцов объемом 5 мл, соединенных друг с другом через иглу с внутренним диаметром 0.5 мм, и дезинтегрировали, прогоняя буфер с кусочками ткани из одного шприца в другой. Обычно 8–10 раз было достаточно для образования однородной суспензии. Затем суспензию фильтровали через капроновый фильтр с диаметром пор 0,2 мм и центрифугировали 5 мин при 50 g и 4°C. Супернатант отбирали и использовали для получения ферментативного экстракта ГИАЛ1, а полученный осадок пересаждали 3 раза в 1 мл буфера. Осадок, состоящий из клеточных конгломератов и канальцевых фрагментов, ресуспендировали в буфере до концентрации 3–5 мг/мл и использовали для выявления активности ГИАЛ1.

Получение ферментативного экстракта ГИАЛ1 межклеточного матрикса. Отобранный после первого центрифугирования супернатант еще раз центрифугировали 10 мин при 10000 g и 4°C. Осадок отбрасывали, а надосадочную жидкость считали ферментативным экстрактом ГИАЛ1 межклеточного матрикса и использовали для выявления гиалуронидазной активности.

Получение клеток собирательных трубок. Суспензию клеток собирательных трубок осуществляли по методу Стокса с некоторыми модификациями [11]. Измельченные кусочки ткани инкубировали при 37°C в буфере, содержащем 2 мг/мл коллагеназы (“Serva”, Германия) и 2 мг/мл гиалуронидазы. Для предотвращения агрегации частиц ткани в буфер через 30–45 мин инкубации добавляли ДНКазу (“Serva”, Германия) до конечной концентрации 0.001% и инкубировали еще 20–30 мин с периодическим аспирированием до исчезновения видимых кусочков ткани. Затем суспензию центрифугировали 3 мин при 50 g, супернатант отбрасывали, а осадок ресуспендировали в 1 мл буфера, не содержащего ферментов, и снова центрифугировали. Процедуру повторяли трижды. Промытый осадок ресуспендировали в

этом же буфере до концентрации 3–5 мг/мл и использовали для определения гиалуронидазной активности.

Зимография. Выявление белков с гиалуронидазной активностью осуществляли методом зимографии с импрегнированной в гель ГК. 50 мкл суспензии клеток собирательных трубок обрабатывали при частоте 40 кГц на ультразвуковом дезинтеграторе UD-11 (“Techpan”, Польша) 3 раза по 10 с с промежуточным охлаждением образцов во льду, после чего смешивали с эквивалентным объемом буфера, содержащего 4%-ный раствор додецилсульфата натрия без редуцирующего агента, и оставляли при комнатной температуре на один час. Бесклеточные ферментативные экстракты подвергали такой же процедуре, за исключением озвучивания. После инкубации к образцам добавляли бромфеноловый синий и глицерин до финальной концентрации 0.01 и 10% соответственно. Разделение белков проводили за счет диск-электрофореза в системе Лэммли, но без редуцирующего агента [12]. Аликвоты по 20–40 мкл, содержащих 30–50 мкг белка, наносили в карманы верхнего 4%-ного ПААГ и проводили электрофорез при 50 В, пока образцы не вошли в гель. Затем напряжение доводили до 110 В (20–25 мА) и разделяли белки в нижнем 7.5%-ном ПААГ с импрегнированной ГК (0.17 мг/мл) в течение 70 мин при температуре 4°C. 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 (рН 3.5) в течение 18 ч при температуре 37°C. Затем гель инкубировался в 20 мМ Трис-HCl буфере, содержащем 0.1 мг/мл проназы Е (Merck, Германия) при рН 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. Количественные оценки гиалуронидазной активности полос и определение молекулярной массы делали, сканируя окрашенный гель на денситометре GS -900 с программным обеспечением Image Lab (“Bio-Rad”, США).

Количественное определение белка осуществляли по методу М. Брэдфорд [13].

Статистическую обработку данных проводили методом парных сравнений с использованием *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Почечные сосочки состоят из таких клеточных структур как собирательные трубки, тонкие нисходящие и восходящие отделы петель Генле юкстамедуллярных нефронов и кровеносные сосуды *vasa recta*. Пространство между этими структурами занимает соединительная ткань, образованная интерстициальными клетками [11]. Для того, чтобы провести сравнительную характеристику изоформ ГИАЛ1 в клетках почечного сосочка и интерстициальной ткани, мы использовали механический способ дезинтеграции за счет гидростатического давления жидкости на кусочки ткани при прохождении через иглу из одного шприца в другой. Использование каких-либо гидролитических ферментов, применяемых для получения клеточных суспензий, было недопустимо по причине их возможного влияния на внеклеточную гиалуронидазную активность. Данный способ по сравнению с гомогенизацией позволяет сохранять клетки, в основном, в целостном состоянии в виде отдельных клеток, клеточных конгломератов и фрагментов трубок. Осаждая их при низкоскоростном центрифугировании, мы исходили из того, что в осадке будет содержаться внутриклеточный пул ГИАЛ1, связанный, главным образом, с клеточными конгломератами собирательных трубок, составляющих основу почечного сосочка, а в надосадочной жидкости останется ГИАЛ1 межклеточного матрикса, разрушенных

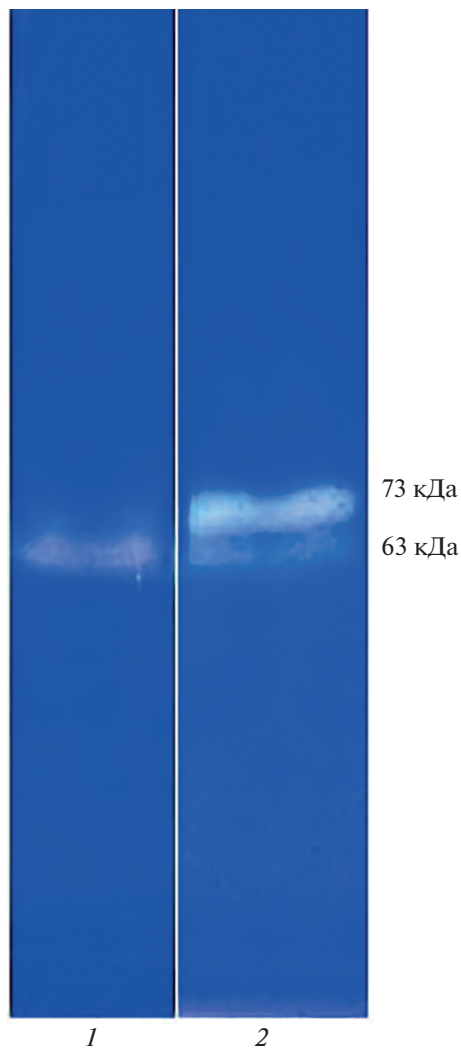


Рис. 1. Зимограмма ГИАЛ1 клеток почечного сосочка (1) и ферментативных экстрактов ГИАЛ1 межклеточного матрикса (2). Справа обозначены молекулярные массы белков, обладающих гиалуронидазной активностью. Представленная на рисунке зимограмма ГИАЛ 1 является результатом одного из 6 отдельных экспериментов.

клеток, а также отдельных клеток и небольших клеточных конгломератов, не выпавших в осадок. Дальнейшее высокоскоростное центрифугирование приводило к осаждению всех этих компонентов из надосадочной жидкости.

Как видно из рис. 1, для клеточных конгломератов и ферментативных экстрактов ГИАЛ1 межклеточного матрикса почечного сосочка были характерны две изоформы ГИАЛ1 с молекулярной массой 63 и 73 кДа. Однако соотношения активностей этих двух белков были прямо противоположными. Если в клеточных конгломератах почечного сосочка основной изоформой ГИАЛ1 был 63 кДа-белок, то в ферментативных экстрактах основной изоформой ГИАЛ1 был 73 кДа-белок. Ранее

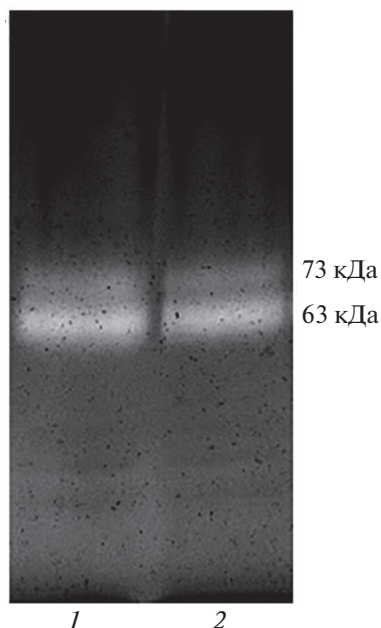


Рис. 2. Зимограмма ГИАЛ1 клеток почечного сосочка, полученных механическим способом (1) и клеток собирательных трубок почечного сосочка, полученных по методу Стокса (2). Справа обозначены молекулярные массы белков, обладающих гиалуронидазной активностью. Представленная на рисунке зимограмма ГИАЛ 1 является результатом одного из 5 отдельных экспериментов.

нами было установлено, что в гомогенатах ткани печени, селезенки и кожи крыс линии Вистар, так же, как и в почечной медулле, находятся две изоформы ГИАЛ1 с молекулярной массой 63 и 73 кДа, причем активность 73 кДа-белка в почечной медулле была значительно выше по сравнению с другими органами, и уступала лишь плазме крови, где активность данной изоформы была максимальна [10]. Таким образом, можно предположить, что изоформа ГИАЛ1 с молекулярной массой 63 кДа характерна для дифференцированных клеток тканей, в то время как изоформа ГИАЛ1 с молекулярной массой 73 кДа синтезируется в клетках соединительной ткани и может секретироваться в интерстициальное пространство органов, а также в кровеносное русло. Активность 73 кДа-белка в целом почечном сосочке в несколько раз превышает активность 63 кДа-белка, учитывая то, что при получении клеточных конгломератов почечного сосочка объем почечных сосочков по сравнению с объемом буфера, в котором осуществлялась дезинтеграция ткани, был меньше, как минимум, в 6–8 раз. Поэтому в работах на ферментативных экстрактах из гомогенатов почечных сосочков активность 63 кДа-белка выявляется в виде минорной зоны по сравнению с активностью 73 кДа-белка [9, 10].

Почечные сосочки состоят, как было отмечено выше, из разных типов клеток, но в основном из клеток собирательных трубок. Поэтому определяемая активность ГИАЛ1 в клеточных конгломератах, скорее всего, связана именно с клетками собирательных трубок. Чтобы убедиться в этом, был проведен сравнительный анализ гиалуронидазной активности в клетках почечного сосочка и клеток собирательных трубок. Мы использовали известный из литературы метод Стокса для получения клеток собирательных трубок почечного сосочка с использованием гидролитических

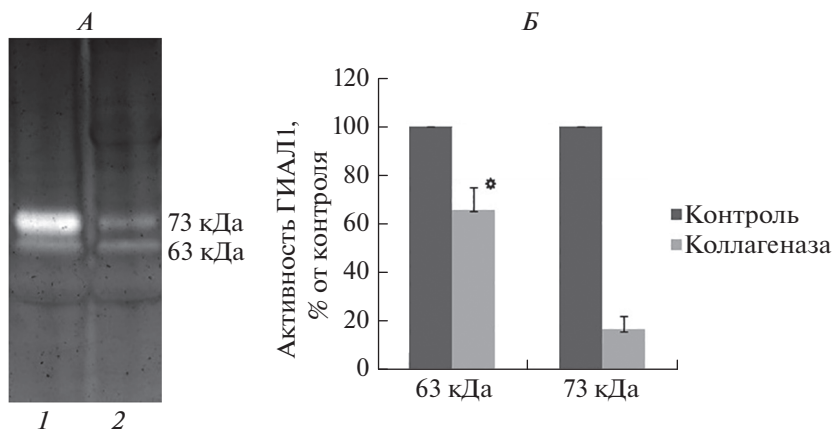


Рис. 3. А – Зимограмма ферментативных экстрактов ГИАЛ1 межклеточного матрикса почечного сосочка в отсутствие (1) и в присутствии (2) коллагеназы. Перед проведением зимографии ферментативные экстракты инкубировали с коллагеназой (1 мг/мл) при 37°C в течение 30 мин. Справа обозначены молекулярные массы белков, обладающих гиалуронидазной активностью. Представленная на рисунке зимограмма ГИАЛ 1 является результатом одного из 5 отдельных экспериментов.

Б – Влияние коллагеназы на гиалуронидазную активность 63 и 73 кДа-белков ферментативных экстрактов межклеточного матрикса почечного сосочка. Относительная оптическая плотность полосы каждого белка в отсутствие коллагеназы принималась за 100% и считалась контролем. Результаты являются средними данными 5 отдельных экспериментов, приведены значения $M \pm SEM$. Звездочкой обозначены достоверные отличия при $p < 0.05$.

ферментов, таких как коллагеназа и гиалуронидаза. Данный метод позволяет получать препараты клеток собирательных трубок со степенью чистоты более 90% [11].

На рис. 2 видно, что в клетках собирательных трубок, полученных по методу Стокса, главной изоформой ГИАЛ1 также был 63 кДа-белок, активность которого сопоставима с аналогичным показателем в клеточных конгломератах почечного сосочка.

Для того, чтобы выяснить, влияет ли коллагеназа на активность ГИАЛ1, нами были проведены эксперименты на ферментативных экстрактах межклеточного матрикса почечного сосочка, которые предварительно инкубировали с коллагеназой.

Присутствие коллагеназы во внеклеточной среде приводило к снижению активности обеих изоформ ГИАЛ1 (рис. 3А). Однако степень подавления гиалуронидазной активности 73 кДа-белка была гораздо больше по сравнению с 63 кДа-белком и составляла около 83%, в то время как для 63 кДа-белка снижение гиалуронидазной активности под действием коллагеназы составляло около 34% (рис. 3Б).

Наши результаты позволяют говорить, что для получения суспензии клеток собирательных трубок использование протеолитических ферментов, таких как коллагеназа, не влияет на активность внутриклеточного пула ГИАЛ1, недоступного для действия экзогенных протеаз. В то же время, в интерстиции почечного сосочка коллагеназы могут выступать в роли ингибиторов ГИАЛ1, подавляя гиалуронидазную активность. Тот факт, что степень снижения активности двух изоформ ГИАЛ1 разная, указывает на то, что 63 кДа-белок является более устойчивой к протеолитическому действию коллагеназы изоформой, по сравнению с 73 кДа-белком, характерным для интерстициальной ткани.

Продемонстрировано, что у человека в крови присутствует изоформа ГИАЛ1 с молекулярной массой 57 кДа, которая в результате эндопротеолиза может превращаться в изоформу с молекулярной массой 45 кДа, выявляемую в моче [5]. Кроме того, известно, что множественные формы ГИАЛ1, выявляемые в условиях нативного электрофореза, могут отличаться друг от друга степенью гликозилирования, в частности, содержанием сиаловых кислот, а обработка сиалазой приводит к снижению количества изоферментов в различных органах и тканях человека [14]. Какие взаимосвязи существуют между 63 и 73 кДа-белками почечного сосочка крыс, еще предстоит выяснить. Очевидно, что для понимания механизма регуляции и роли ГИАЛ1 в обеспечении осморегулирующей функции почек, важно определить, каковы отличия в структуре этих изоформ фермента.

Таким образом, нами обнаружено, что содержащиеся в почечном сосочке две изоформы ГИАЛ1 с молекулярной массой 63 и 73 кДа, могут быть связаны с разными почечными структурами. 63 кДа-белок, очевидно, является внутриклеточным белком, характерным для клеток собирательных трубок, в то время как 73 кДа-белок является основной изоформой межклеточного пространства. В пользу данного утверждения говорит тот факт, что в сыворотке крови крыс главной изоформой ГИАЛ1 является 73 кДа-белок, в то время как 63 кДа-белок отсутствует [10, 15].

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ. Проект № 17-44-150268.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hansell P., Goransson V., Odland C., Gerdin B., Hallgren R.* Hyaluronan content in the kidney in different states of body hydration. *Kidney Int.* 58: 2061–2068. 2000.
2. *Knepper M.A., Saidel G.M., Hascall V.C., Dwyer T.* Concentration of solutes in the renal inner medulla: interstitial hyaluronan as a mechanoosmotic transducer. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 284: F433–F446. 2003.
3. *Goransson V., Hansell P., Moss S., Alcorn D., Johnsson C., Hallgren R., Maric C.* Renomedullary interstitial cells in culture; the osmolality and oxygen tension influence the extracellular amounts of hyaluronan and cellular expression of CD44. *Matrix Biol.* 20: 129–136. 2001.
4. *Triggs-Raine B., Natowicz M.R.* Biology of hyaluronan: Insights from genetic disorders of hyaluronan metabolism. *World. J. Biol. Chem.* 6(3): 110–120. 2015.
5. *Csoka T.B., Frost G.I., Wong T., Stern R.* Purification and microsequencing of hyaluronidase isozymes from human urine. *FEBS Lett.* 417: 307–310. 1997.
6. *Frost G.I., Csoka A.B., Wong T., Stern R.* Purification, cloning, expression of human plasma hyaluronidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236: 10–15. 1997.
7. *Dzgoev S.G.* Selective vasopressin V2-agonist desmopressin stimulates blood hyaluronidase activity. *Bull. Exp. Biol. Med.* 159(4): 424–426. 2015.
8. *Rügheimer L., Olerud J., Johnsson C., Takahashi T., Shimizu K., Hansell P.* Hyaluronan synthases and hyaluronidases in the kidney during changes in hydration status. *Matrix Biology.* 28: 390–395. 2009.
9. *Ikegami-Kawai M., Suzuki A., Karita I., Takahashi T.* Increased hyaluronidase activity in the kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Biochem.* 134(6): 875–880. 2003.
10. *Дзгоев С.Г.* Сравнительная характеристика изоформ гиалуронидазы 1-го типа в соматических тканях и сыворотке белых крыс. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 102(8): 963–967. 2016. [Dzgoev S.G. Comparative characterization of hyaluronidase isoforms of the 1-st type in somatic tissues and serum of white rats. *Russ. J. Physiol.* 102(8): 963–967. 2016. (In Russ.)].
11. *Stokes J.B., Grupp C., Kinne R.K.* Purification of rat papillary collecting duct cells: Functional and metabolic assessment. *Am. J. Physiol. Renal Physiology.* 253(2): F251–F262. 1987.
12. *Laemmli U.K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680–685. 1970.
13. *Bradford M.M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254. 1976.

14. *Fiszer-Szafarz B., Litynska A., Zou L.* Human hyaluronidases: electrophoretic multiple forms in somatic tissues and body fluids. Evidence for conserved hyaluronidase potential N-glycosylation sites in different mammalian species. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 45: 103–116. 2000.
15. *Ikegami-Kawai M., Okuda R., Nemoto T., Inada N., Takahashi T.* Enhanced activity of serum and urinary hyaluronidases in streptozotocin-induced diabetic Wistar and GK rats. *Glycobiology.* 14: 65–72. 2004.

Hyaluronidase-1 Activity in the Cells of the Collecting Ducts and Interstitium of the Papillary Zone of Rat Kidney

S. G. Dzgoev^{a, b, *}

^a*North Ossetian State University, Vladikavkaz, Russia*

^b*Vladikavkaz Scientific Center of RAS, Vladikavkaz, Russia*

**e-mail: stanislavdzgoev@yandex.ru*

Abstract—By the method of zymography, two isoforms of hyaluronidase-1 with a molecular mass of 63 and 73 kDa were identified in the cells of the collecting ducts and interstitial tissue of the rat renal papillae. In the collecting ducts cells, the main isoform was 63 kDa-protein; in the interstitial tissue it was 73 kDa-protein. The use of collagenase to obtain the cells of the collecting ducts did not affect the activity of hyaluronidase-1, while incubation of the enzymatic extracts of the renal papillae with collagenase caused a decrease in hyaluronidase activity. The mechanisms of post-synthetic modification of hyaluronidase-1 isoforms are discussed.

Keywords: kidney, collecting duct, connective tissue, hyaluronan, hyaluronidase-1

ЦИТИРОВАТЬ:

Дзгоев С.Г. Активность гиалуронидазы 1-го типа в клетках собирательных трубок и интерстиция папиллярной зоны почек крыс. *Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова.* 105(3): 295—302.

DOI: 10.1134/S0869813919030038

TO CITE THIS ARTICLE:

Dzgoev S.G. Hyaluronidase-1 Activity in the Cells of the Collecting Ducts and Interstitium of the Papillary Zone of Rat Kidney. *Russian Journal of Physiology.* 105(3): 295—302.

DOI: 10.1134/S0869813919030038