

УДК 577.152.3
© Коллектив авторов

ОПРЕДЕЛЯЮТ ЛИ ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГЛИКИРОВАНИЕ ГИАЛУРОНИДАЗНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ N-АЦЕТИЛГЛЕКСОЗАМИНАМИ?

*А.Д. Турашев, Е.Г. Тищенко, А.В. Максименко**

Институт экспериментальной кардиологии, Российский Кардиологический
Научно-Производственный Комплекс Росмедтехнологий, 3-я Черепковская ул., 15А,
121552 Москва; тел. (495)-414-67-30, (495)-414-60-25; факс: (495)-414-66-99;
эл. почта: cclibr@comcor.ru; turashev@yandex.ru; alexmak@cardio.ru

Использование в качестве модельных гликирующих агентов N-ацетилглюкозамина и N-ацетилгалактозамина по отношению к нативной гиалуронидазе и её модифицированной хондроитинсульфатом форме показало, что последняя инактивируется в существенно большей мере, чем нативной биокатализатор, тогда как их ингибирование гепарином сходно по величине. Причина такого эффекта во многом казалась связанной с развитием электростатических взаимодействий, поскольку модифицированная гиалуронидаза изменила свой поверхностный электростатический потенциал после связывания с хондроитинсульфатом. Однако варьирование величины ионной силы среды с ферментными производными показало, что их эндогликозидазная активность меняется сходным образом, а воздействие на гликирование предстает весьма многофакторным процессом. При этом N-ацетилгексозамины оказываются естественной “меткой” продуктов деградации эндотелиального гликокаликса. Взаимодействие гиалуронидазных форм с заряженными фрагментами гиалуронана обнаружило, что модифицированная гиалуронидаза достоверно инактивируется в большей степени, чем нативный фермент. Наблюдаемая картина гликирующего воздействия оказалась противоположной той, что была получена для производных гиалуронидазы с нейтральными моно- и ди- сахарами. Такие результаты превращают исследованные производные гиалуронидазы в информативный ферментный тест *in vivo* для определения доминирующего вида гликирующих агентов в кровотоке и их происхождения.

Ключевые слова: гликирование, N-ацетилгексозамины, гиалуронидаза, хондроитинсульфат, электростатические взаимодействия, ионная сила среды, фрагменты гиалуронана.

* - адресат для переписки

ВВЕДЕНИЕ. Неферментативное гликозилирование биомакромолекул (гликирование), особенно при нарушении углеводного обмена, ведёт к образованию конечных продуктов Амадори (AGE, продвинутых конечных продуктов гликирования) [1, 2]. Их накопление в организме способствует развитию нарушений метаболизма, повышению жёсткости сосудистой стенки, продуцированию активных форм кислорода [1-6]. Взаимодействие AGE с их рецептором (RAGE) благоприятствует прогрессированию таких поражений, влияя на энергетику метаболизма миокарда, его функцию, внося вклад в миокардиальное поражение после ишемии/реперфузии [7]. Для терапевтического воздействия важно блокировать образование AGE и использовать растворимую форму их рецептора RAGE [8]. Для реализации первого подхода оказалось возможным стабилизировать белки против гликирующей модификации созданием вокруг их молекулы полисахаридного микроокружения. Это достигалось многоточечным ковалентным присоединением к известной карбогидразе – гиалуронидазе (ГУ) – такого гликозаминогликана как хондроитинсульфат (ХС) [9]. Полученные производные ГУ-ХС оказались стабильнее нативной ГУ при их гликировании нейтральными моно- (глюкоза, галактоза) [10] и ди- (целлобиоза, лактоза, мальтоза) сахарами [11] благодаря экранирующему действию ХС микроокружения. Вопрос универсальности найденного эффекта остается открытым, поскольку среди гликирующих агентов имеются не только нейтральные, но и заряженные сахаридные производные, образующиеся, в частности, при деградации клеточного гликокаликса [12, 13]. Так, обработка гликокаликса ГУ млекопитающих ведёт к образованию олигосахаридов с четным количеством полимерных звеньев, имеющих N-ацетилглюкозамин на восстанавливаемом конце фрагмента [12]. Из таких производных, несущих заряд в широком интервале значений pH, возникают, в частности, гликирующие агенты [14]. Их воздействие может отличаться от действия нейтральных сахаридных производных, благодаря развитию электростатических взаимодействий.

Целью нашего изучения стало выяснение сравнительного влияния N-ацетилглюкоз- и N-ацетилгалактозаминов (как модельных гликирующих агентов в индивидуальном виде и в составе гиалуроновых фрагментов) на каталитическое функционирование гиалуронидазных производных – ГУ и ГУ-ХС.

МЕТОДИКА. Для получения модифицированного препарата гиалуронидазы и изучения влияния N-ацетилгексозаминов на функционирование исследуемых ферментных производных была использована тестикулярная гиалуронидаза (КФ 3.2.1.35) из семенников быка производства ГУП “Иммунопрепарат”, (Уфа, Россия), предварительно очищенная гель-хроматографически (сефадекс G-100, “Pharmacia”, Швеция) по описанной ранее методике [15], калиевая соль гиалуроновой кислоты средней молекулярной массы 700-800 кДа из пуповины человека, натриевая соль высокомолекулярного гепарина бычьего происхождения молекулярной массы 16-18 кДа, хондроитин-4-сульфат из трахеи быка со средней молекулярной массой 30-50 кДа, тринитробензосульфокислота, N-ацетилглюкоз- и N-ацетилгалактозамин, хлористый натрий получены от фирмы “Sigma”, США. Индивидуальные фрагменты (олигомеры) гиалуроновой кислоты общей формулы $\text{GlcA}—[\text{—GlcNHAc—GlcA—}]_n—\text{GlcNHAc}$, где n равно 0 (димер), 1 (тетрамер), 2 (гексамер), 3 (октамер), 4 (декамер гиалуронана), были любезно предоставлены профессором Keiichi Takagaki, (Department of Biochemistry, Hirosaki University School of Medicine, Hirosaki, Япония) [16]. Все остальные реактивы, компоненты буферных растворов были отечественного производства аналитической степени чистоты.

Эндогликозидазную активность производных гиалуронидазы определяли вискозиметрически с помощью вискозиметра Оствальда В-434 (“Canon”, США) в соответствии с рекомендациями [17]. Для этого измеряли время истечения при 37°C с конечной концентрацией в растворе вискозиметра: гиалуроновой

кислоты 0,06% в 0,1 М фосфатном буфере, pH 5,5, содержащем 0,15 М NaCl, гиалуронидазы 0,002 мг/мл (0,1 мл ферментной пробы из инкубационной смеси добавлялось к 0,9 мл раствора субстрата (гиалуроновая кислота), которые помещались в вискозиметр), N-ацетилгексозамина – 0,2 мг/мл, фрагментов гиалуронана не менее 0,01 мг/мл, гепарина – 0,2 мг/мл. Относительную вязкость рассчитывали как отношение времени истечения буферного раствора субстрата с добавленной ферментной пробой из инкубационной смеси ко времени истечения буферного раствора субстрата без фермента. Тангенс угла наклона прямой в координатах обратный логарифм относительной вязкости против времени инкубации/измерения пропорционален величине скорости ферментативной реакции [18]. Эта величина характеризует относительную величину скорости ферментативного разложения субстрата, что сопоставляется с активностью стандартных препаратов гиалуронидазы (бычья тестикулярная гиалуронидаза, ВТН, “Sigma”, США /Н 3884/), выраженных в единицах формулярного стандарта/состава (NFU). Сравнительная удельная эндогликозидазная активность исследуемого очищенного препарата нативной гиалуронидазы составила 950-970 NFU/мг белка. Взаимодействие гиалуронидазных производных с N-ацетилгексозаминами и их смесью вели при pH 5,5 или 7,5, 37°C, а инкубацию с фрагментами гиалуронана при pH 5,5 и 37°C. Установленное значение активности гиалуронидазных производных представляет собой среднее значение трёх экспериментальных измерений. Удельная активность предварительно очищенной нативной гиалуронидазы из семенников быка принимается за 100%.

Получение конъюгированной с хондроитинсульфатом гиалуронидазы проводили согласно ранее описанной нами методики [9]. Остаточная эндогликозидазная активность производного гиалуронидаза-хондроитинсульфат составила 76-78% от активности исходного фермента, степень модификации аминок групп была 84-86%. Содержание белка в модифицированном препарате составляло 3-6%. Содержание белка в нативном и модифицированном препаратах гиалуронидазы определяли по методу Брэдфорд [19]. Титрование тринитробензолсульфоновой кислотой поверхностных аминок групп гиалуронидазных производных выполняли по указаниям [9-11, 20].

Оценка влияния ионной силы раствора на активность гиалуронидазных производных производилась путем вышеописанного измерения активности термостатированного при температуре 37°C буферного раствора нативного и модифицированного фермента с заданными аналитическими концентрациями хлорида натрия при значениях pH раствора 5,5 и 7,5 соответственно. Использовали следующие значения концентраций NaCl: 0,05, 0,1, 0,15, 0,25, 0,5, 0,75 и 1,0 М соответственно. Приведённые значения ферментативной активности представляют среднее из трёх экспериментальных измерений.

Гликирование гиалуронидазных производных осуществляли при их инкубации с N-ацетилгексозаминами (N-ацетилглюкозамином и N-ацетилгалактозамином). Инкубацию гиалуронидазных производных вели в 0,05 М фосфатном буфере с pH 5,5 или pH 7,5 в присутствии 0,15 или 0,75 М хлористого натрия при 37°C. Концентрация белка в растворе составила 0,02 мг/мл, а N-ацетилгексозамина – 2 мг/мл. В ходе инкубации (в присутствии 0,05% азида натрия и без него, различий не обнаружено) в течение восьми суток из реакционного раствора отбирались пробы по 0,1 мл и определялась их эндогликозидазная активность как описано выше.

Резистентность гиалуронидазных производных к ингибированию гепарином оценивали по величине их остаточной эндогликозидазной активности в присутствии избытка гепарина (соотношение весовых концентраций гиалуронидаза/гепарин 1:100) [9, 15]. При одинаковой концентрации по белку (2 мкг/мл) в вискозиметре к реакционной смеси в 0,1 М фосфатном буфере (pH 5,5) добавляли 0,2 мг/мл гепарина и (после 2-4 минут инкубации

ГЛИКИРОВАНИЕ N-АЦЕТИЛГЕКСОЗАМИНАМИ ПРОИЗВОДНЫХ ГИАЛУРОНИДАЗЫ

при комнатной температуре) измеряли эндогликозидазную активность производных гиалуронидазы вискозиметрически. Следует отметить, что время истечения буферного раствора субстрата практически не отличается (в пределах погрешности измерения) от времени истечения буферного раствора субстрата с добавлением гепарина. Приведённые значения представляют среднее из трёх экспериментальных измерений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Гликирующие агенты действуют по поверхностным аминогруппам лизиновых и аргининовых аминокислотных остатков белков с быстрым образованием оснований Шиффа и их последующим медленным перестроением в AGE [10]. Для образования AGE необходимо длительное взаимодействие реагентов, что обусловило, наряду с данными моно- и дисахаридного гликирования ГУ [10, 11], проведение восьмисуточной инкубации производных ГУ с N-ацетилгексозаминами с мониторингом эндогликозидазной активности и резистентности к гепариновому ингибированию ГУ и ГУ-ХС при pH 5,5 (область pH-оптимума активности ГУ) и pH 7,5 (область физиологических значений pH, близкая pH крови).

Экспериментально было обнаружено, что гликирование нативной ГУ N-ацетилгексозаминами не вызывает существенных потерь её активности в сравнении с контрольными данными инкубации одной ГУ без гликирующих агентов (табл. 1). Действие N-ацетилгалактозамина способствовало даже небольшой стабилизации ГУ против инактивации и гепаринового ингибирования. При pH 5,5 наблюдалось заметное падение активности ГУ от действия сочетания N-ацетилгексозаминов, связанное, вероятно, с ростом их активности в инкубационной смеси в этих условиях [10, 11]. В сравнении с контрольными показателями не наблюдалось выраженных изменений гепаринового ингибирования ГУ.

Таблица 1. Гликирование нативной ГУ N-ацетилгексозаминами (N-ацетилглюкозамином и N-ацетилгалактозамином) в течение восьмисуточной инкубации (37°C, 0,15 M NaCl).

Состав инкубационной смеси	Параметры ГУ после восьми суток инкубации			
	pH 5,5		pH 7,5	
	Сохраняемая активность (% от исходной)	Сохраняемая активность в присутствии избытка гепарина (% от исходной)	Сохраняемая активность (% от исходной)	Сохраняемая активность в присутствии избытка гепарина (% от исходной)
ГУ	80	72	82	68
ГУ с N-ацетил-глюкозамином	78	68	80	70
ГУ с N-ацетил-галактозамином	88	78	86	77
ГУ со смесью N-ацетилглюкоз- и N-ацетил-галактозаминов	70	60	80	70

Примечание: Результаты по сохраняемой активности представляют собой среднее значение результатов трёх измерений активности гиалуронидазных производных, соотносённых с исходной активностью ферментного производного, принятой за 100%. Погрешность измерений составила 5%.

Гликирование N-ацетилгексозаминами приводило к достоверному снижению эндогликозидазной активности ГУ-ХС производного (табл. 2). Меньшее инактивирующее действие вызвал N-ацетилгалактозамин, большее – N-ацетилглюкозамин. Заметную инактивацию обнаруживало действие смеси N-ацетилгексозаминов. Ингибирующий эффект гепарина был сходен по глубине с эффектами для случаев ГУ (табл. 1), и был больше в сравнении с ГУ-ХС без N-ацетилгексозаминов (табл. 2). Гликирующая инактивация ГУ-ХС была заметно выше, чем у нативного фермента.

Таблица 2. Гликирование производного ГУ-ХС N-ацетилгексозаминами (N-ацетилглюкозамином и N-ацетилгалактозамином) в течение восьмисуточной инкубации (37°C, 0,15 M NaCl).

Состав инкубационной смеси	Параметры ГУ-ХС после восьми суток инкубации			
	рН 5,5		рН 7,5	
	Сохраняемая активность (% от исходной)	Сохраняемая активность в присутствии избытка гепарина (% от исходной)	Сохраняемая активность (% от исходной)	Сохраняемая активность в присутствии избытка гепарина (% от исходной)
ГУ-ХС	92	90	98	98
ГУ-ХС с N-ацетилглюкозамином	44	33	12	4
ГУ-ХС с N-ацетилгалактозамином	50	37	38	25
ГУ-ХС со смесью N-ацетилглюкоз- и N-ацетилгалактозаминов	42	31	18	6

Примечание: Результаты по сохраняемой активности представляют собой среднее значение результатов трёх измерений активности гиалуронидазных производных, соотнесённых с исходной активностью ферментного производного, принятой за 100%. Погрешность измерений составила 5%.

Эффекты гликирования N-ацетилгексозаминами оказались противоположными гликирующему действию нейтральных моно- и дисахаридов, когда ХС микроокружение стабилизировало ГУ [10, 11]. Вероятно, наблюдаемое различие может быть связано с наличием кулоновских взаимодействий при гликировании ГУ-производных N-ацетилгексозаминами. При связывании с хондроитинсульфатом, видимо, меняется поверхностный электростатический потенциал гиалуронидазы. Действительно, расчётное значение pI для нативной ГУ весьма высоко, и составляет 8,62 [21]. Оказалось, что эндогликозидазная активность ГУ и ГУ-ХС зависит от величины ионной силы среды сходным образом (рис. 1). При этом данная зависимость более выражена при рН 5,5 и менее значительна при рН 7,5. В последнем случае лимитирующее влияние электростатических взаимодействий на процесс гликирования может быть выявлено более заметно при его проведении с повышенной величиной ионной силы инкубационной среды (0,75 M NaCl) со смесью N-ацетилгексозаминов.

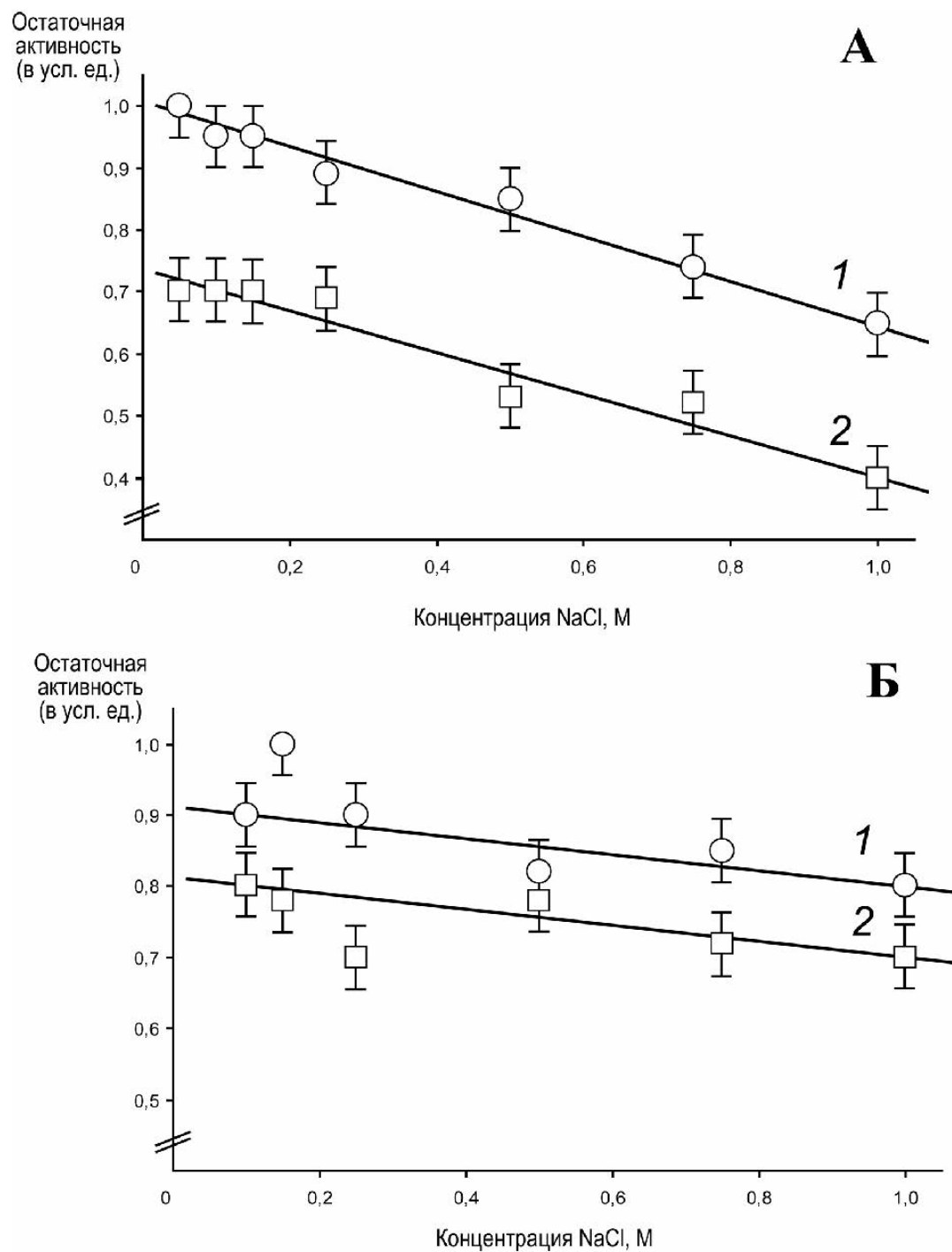


Рисунок 1.

Влияние величины ионной силы среды (концентрация NaCl, М) на эндогликозидазную активность ГУ (кружки) и ГУ-ХС (квадратики) при pH 5,5 (А) и 7,5 (Б).

Величина ионной силы практически не сказывается на гликировании ГУ (кривые 1 и 2 почти совпадают, рис. 2, А и Б) и заметно влияет на гликирование ГУ-ХС лишь на отдаленных сроках инкубации (кривые 3 и 4, рис. 2). Отмеченная выше особенность, наряду с большим влиянием величины ионной силы при pH 7,5, чем при pH 5,5, а также сходство кривых инактивации гиалуронидазных производных на начальных сроках инкубации (рис. 2) не позволяют считать лимитирующим действие электростатических сил. Очевидным становится влияние разных белковых конформаций у нативного и модифицированного фермента (кривая 4, действительно, не достигает сходного положения с кривыми 1 и 2, рис. 2), их разной зависимостью от pH (разная форма и расположение кривых на рис. 2, А и Б, соответственно), многоэтапного получения разнообразных продуктов гликирования, особенно после продолжительной инкубации [9-11, 15]. К тому же, в препарате бычьей тестикулярной ГУ возможна минорная примесь сопутствующего фермента – N-деацетилазы, способствующей превращению N-ацетилглюкозамина у восстанавливающего конца в глюкозамин [22]. Ингибирование активности щелочной фосфатазы, действительно, достигалось действием глюкоз- и галактоз- аминов [23]. В указанном выше многообразии взаимодействий основным становится присутствие в системе самих N-ацетилгексозаминов. Они легко гликируют амидную группу аспарагина в овальбумине [24], в поверхностном S-слое *Halobacter halobium* [25], взаимодействуют со многими белками [26]. В кровотоке N-ацетилгексозамины присутствуют только в составе эндотелиального гликокаликса и продуктов его деградации. Таким образом, при взаимодействии *in vivo* с нативной и модифицированной ГУ N-ацетилгексозамины становятся своеобразной естественной “меткой” появляющихся при сосудистых повреждениях продуктов деградации эндотелиального гликокаликса. Заметим, что именно по карбонилу восстанавливающего конца гиалуроновых олигосахаридов (длиной от 4 до 40 сахаридных остатков) осуществлялось ковалентное присоединение к ним (восстановительным аминированием) флуоресцентной метки (2-аминобензойной кислоты) [27]. Олигосахариды же гиалуронана, молекулярной массой менее 2,5 кДа, ингибировали активность фосфоинозитид 3-киназы, тогда как более крупные (80 или 2000 кДа) - нет [28]. Отмеченные эффекты обосновывают экстраполяцию разных откликов гиалуронидазных производных *in vitro* на воздействие моно- и ди- сахаридов (концентрация которых в крови существенно увеличивается при нарушениях углеводного обмена), с одной стороны, в сравнении с N-ацетилгексозаминами (повышающими своё присутствие в крови при деструкции эндотелиального гликокаликса), с другой стороны, на системы *in vivo*.

Взаимодействие ГУ производных с фрагментами гиалуронана общей формулы $\text{GlcA}—[\text{GlcNHAc}—\text{GlcA}]_n—\text{GlcNHAc}$, где n от 0 до 4, продемонстрировало, что действительно, ГУ-ХС существенно инактивируется в сравнении с ГУ (рис. 3). С увеличением длины сахаридной цепи (рост молекулярного размера) гиалуроновых фрагментов инактивация уменьшалась для ГУ и ГУ-ХС. С увеличением времени инкубации (pH 5,5, 37°C) заметнее усиливалась инактивация ГУ-ХС, особенно смесью фрагментов гиалуронана. За три часа инкубации количество титруемых поверхностных аминокрупп ГУ снижалось на 50%, а ГУ-ХС на 34%. Наблюдаемые эффекты наглядно подтверждали преобладающее инактивирующее действие N-ацетилгексозаминов (расположенных у восстанавливающего конца фрагментов гиалуронана) на ГУ-ХС. Смесью гиалуроновых фрагментов моделировала действие смеси продуктов деградации ЭГЛК.

Таким образом, по характеру влияния на производные ГУ и ГУ-ХС при патологиях, связанных с появлением в кровотоке сахаридных производных, можно судить об их доминирующей фракции. Это позволяет определить участие в развитии сосудистых нарушений как нейтральных сахаридов, так и продуктов деградации гликокаликса [29]. Последнее вполне актуально при нарушениях микроциркуляции [30] и может быть проанализировано *in vivo* с помощью полученных форм ГУ и ГУ-ХС.

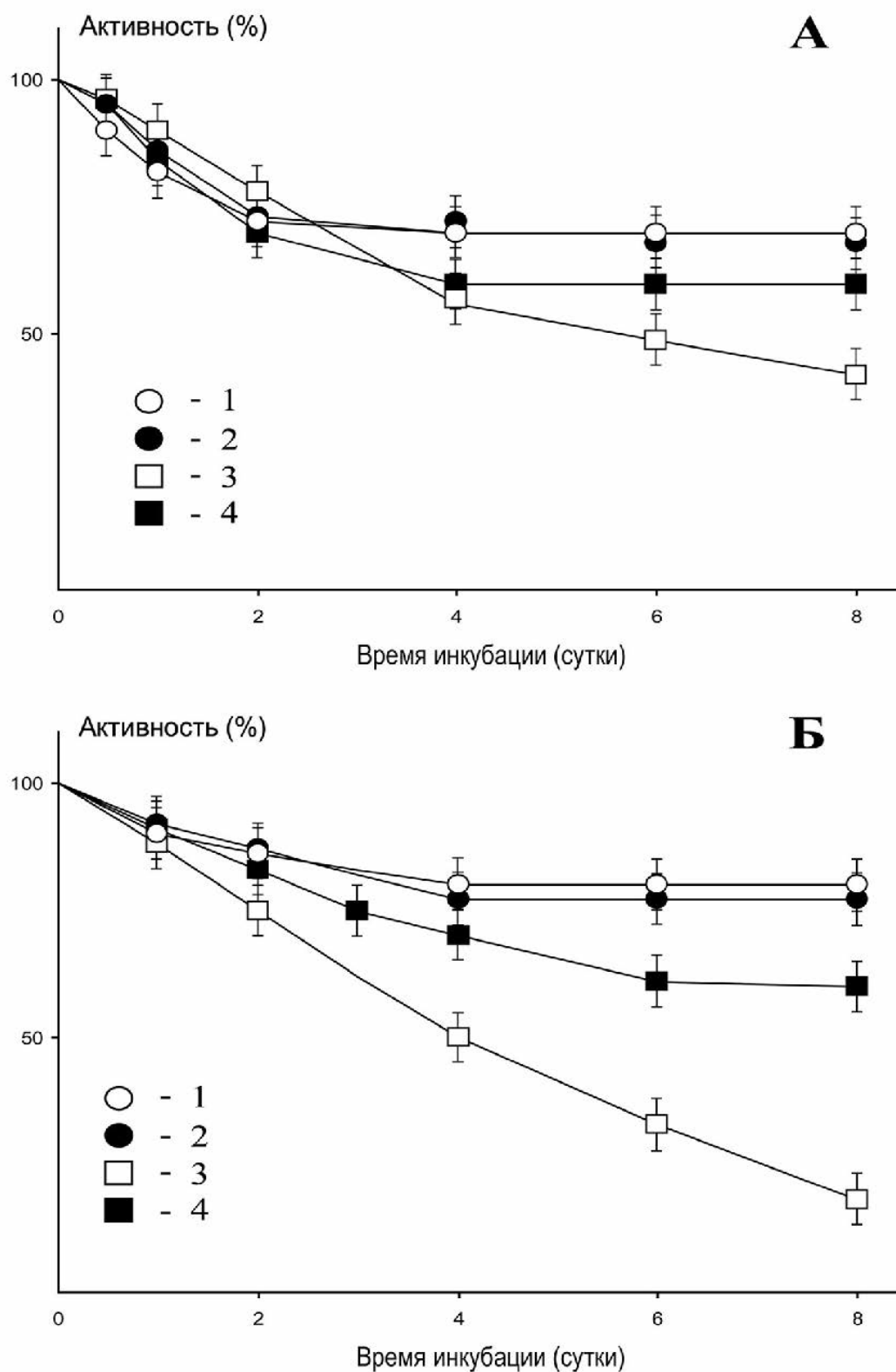


Рисунок 2.

Зависимость сохраняемой эндогликозидазной активности производных ГУ при гликировании смесью N-ацетилглюкоз- и N-ацетилгалактозаминов при pH 5,5 (А) и 7,5 (Б).

Гликирование проводили при величине ионной силы инкубационной среды 0,15 М NaCl (нативная ГУ - пустые кружки, ГУ-ХС - пустые квадратики) и 0,75 М NaCl (нативная ГУ - черные кружки, ГУ-ХС - чёрные квадратики).

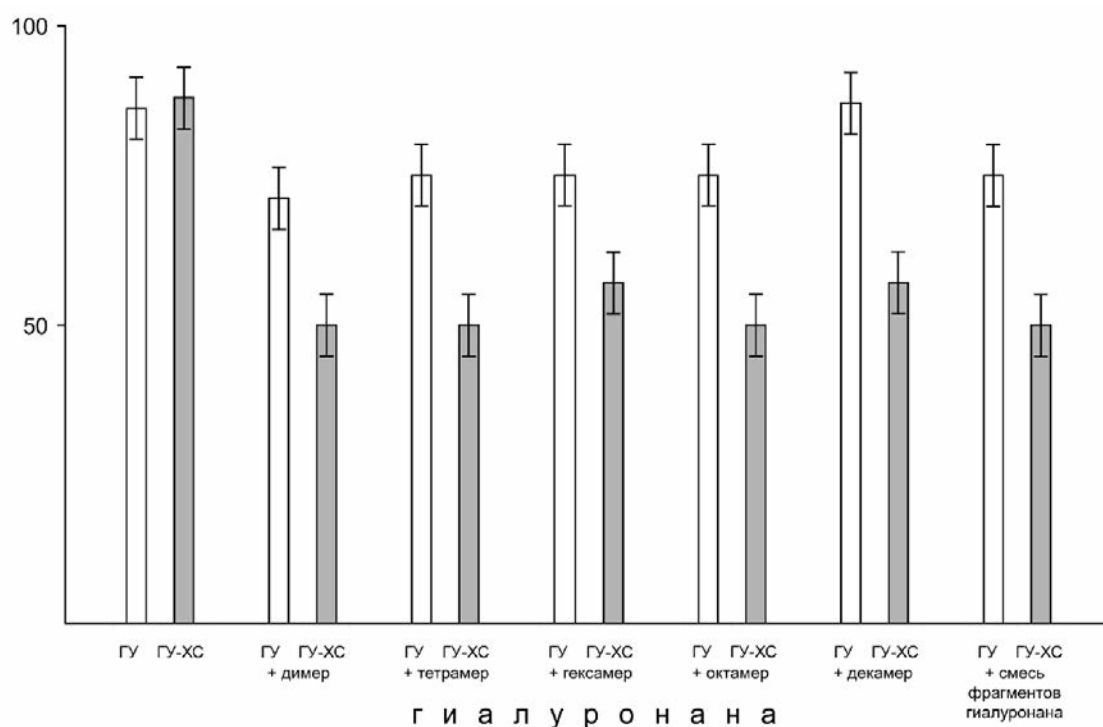


Рисунок 3.

Диаграммное представление величины остаточной эндогликозидазной активности производных ГУ и ГУ-ХС (в %) после трёх часов инкубации (pH 5,5, 37°C) без и в присутствии фрагментов гиалуронана общей формулы $\text{GlcA}-(\text{-GlcNHAc-GlcA-})_n\text{-GlcNHAc}$, где n варьируется от 0 до 4, или их смеси. Соотношение молярных концентраций 'белок : сахаридное производное' 1 : 100.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Картина инактивирующего воздействия N-ацетилгексозаминов (как индивидуальных модельных агентов, так и в составе фрагментов гиалуронана) на активность ГУ оказывается противоположной, наблюдаемой с нейтральными сахарами. Отмеченное различие пригодно для практического определения *in vivo* с помощью ГУ и ГУ-ХС вида доминирующих гликирующих агентов и их происхождения.

Настоящее исследование выполнено при финансовой поддержке грантами РФФИ 09-04-00023, 07-04-12057-офи и Росмедтехнологий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Goldin A., Beckman J.A., Schmidt A.M., Creager M.A. (2006) *Circulation*, **114**, 597-605.
2. Shapiro B.P., Owan T.E., Mohammed S.F., Meyer D.M., Mills L.D., Schalkwijk C.G., Redfield M.M. (2008) *Circulation*, **118**, 1002-1010.
3. Zhang M., Kho A.L., Anilkumar N., Chibber R., Pagano P.J., Shah A.M., Cave A.C. (2006) *Circulation*, **113**, 1235-1243.
4. McNulty M., Mahmud A., Feely J. (2007) *Am. J. Hypertens.*, **20**, 242-247.
5. Ge J., Jia Q., Liang C., Luo Y., Huang D., Sun A., Wang K., Zou Y., Chen H. (2005) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **25**, 2157-2163.
6. Ceriello A., Motz E. (2004) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **24**, 816-823.

7. *Bucciarelli L.G., Kaneko M., Ananthakrishnan R., Harja E., Lee L.K., Hwang Y.C., Lerner S., Bakr S., Li Q., Lu Y., Song F., Qu W., Gomez T., Zou Y.S., Yan S.F., Schmidt A.M., Ramasamy R.* (2006) *Circulation*, **113**, 1226-1234.
8. *Basta G.* (2008) *Atherosclerosis*, **196**, 9-21.
9. *Максименко А.В., Щечилина Ю.В., Тищенко Е.Г.* (2003) *Биохимия* **68**, 1055-1062.
10. *Турашев А.Д., Тищенко Е.Г., Максименко А.В.* (2009). *Мол. мед.*, №3, 51-56.
11. *Турашев А.Д., Тищенко Е.Г., Максименко А.В.* (2009) *Мол. мед.*, №6, 50-55.
12. *Stern R., Kogan G., Jedrzejewski M.J., Soltés L.* (2007) *Biotechnol. Adv.*, **25**, 537-557.
13. *Максименко А.В.* (2008) *Хим.-фарм. журн.*, **42**, 3-13.
14. *Grimsrud P.A., Xie H., Griffin T.J., Bernlohr D.A.* (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 21837-21841.
15. *Максименко А.В., Щечилина Ю.В., Тищенко Е.Г.* (2001) *Биохимия*, **66**, 563-572.
16. *Takagaki K., Kojima K., Majima M., Nakamura T., Kato I., Endo M.* (1992) *Glycoconj. J.*, **9**, 174-179.
17. *Vercruyssen K.P., Lauwers A.R., Demeester J.M.* (1995) *Biochem. J.*, **310** (Pt 1), 55-59.
18. *Максименко А.В., Петрова М.Л., Тищенко Е.Г., Щечилина Ю.В.* (2000) *Биоорг. химия*, **26**, 357-361.
19. *Bradford M.M.* (1976) *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
20. *Sprado A.A.C., Draghetta W., Dellama S.N., Camargo H.C.M., Greene L.J.* (1979) *Anal. Biochem.*, **96**, 317-321.
21. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q7YS45>
22. *Chen F., Kakizaki I., Yamaguchi M., Kojima K., Takagaki K., Endo M.* (2009) *Glycoconj. J.*, **26**, 559-566.
23. *Pollak A., Coradello H., Leban J., Maxa E., Sternberg M., Widhalm K., Lubec G.* (1983) *Clin. Chim. Acta.*, **133**, 15-24.
24. *Johansen P.G., Marshall R.D., Neuberger A.* (1961) *Biochem. J.*, **78**, 518-527.
25. *Lechner J., Wieland F.* (1989) *Annu. Rev. Biochem.*, **58**, 173-194.
26. *Spiro R.G.* (2002) *Glycobiology*, **12**, 43R-56R.
27. *Seyfried N.T., Blundell C.D., Day A.J., Almond A.* (2005) *Glycobiology*, **15**, 303-312.
28. *Ghatak S., Misra S., Toole B.P.* (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 38013-38020.
29. *Максименко А.В., Турашев А.Д., Тищенко Е.Г.* (2008) *Мол. мед.*, №2, 12-17.
30. *Максименко А.В., Турашев А.Д.* (2009) *Регионар. кровооб. микроцирк.*, **8**(4), 3-13.

Поступила: 09. 06. 2010.

ELECTROSTATIC INTERACTIONS DETERMINE GLYCATION OF HYALURONIDASE DERIVATIVES WITH N-ACETHYLHEXOSAMINES?

A.D. Turashev, E.G. Tischenko, A.V. Maksimenko

Institute of Experimental Cardiology, Russian Cardiology Research-and-Production Complex,
ul. 3-ya Cherepkovskaya 15A, Moscow, 121552 Russia; tel.: +7-495-414-67-30, +7-495-414-60-25;
fax: +7-495-414-66-99; e-mail: cclibr@comcor.ru, turashev@yandex.ru

Glycation of native hyaluronidase and its chondroitin sulfate modified form was studied with N-acetylglucosamine, N-acetylgalactosamine and their mixture, as well as hyaluronan fragments ($n = 0-4$) and their mixture. The modified form of hyaluronidase exhibited higher inactivation than native enzyme. The chondroitin sulfate modification of hyaluronidase altered its surface electrostatic potential, but this effect was not crucial for inactivation of hyaluronidase derivatives. The observed picture of the glycation action on hyaluronidase derivatives was opposite for glycation with mono- and di-saccharides. Such results give us the informative enzyme test for in vivo system in order to determine the dominant type of glycation agents in bloodstream and its origin.

Key words: glycation, N-acethylhexosamines, hyaluronidase, chondroitin sulfate, electrostatic interactions, ionic strength of medium, hyaluronan fragments.