

**Anita NIESOBSKA, Anna TRUSEK-HOŁOWNIA**

e-mail: anita.niesobska@pwr.edu.pl

Zakład Inżynierii Bioprocessowej i Biomedycznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Wroclawska, Wrocław

**Enzymatyczna hydroliza kwasu hialuronowego****Wstęp**

Kwas hialuronowy (hialuronian, HA) jest naturalnym glikozaminoglikanem o wysokiej masie cząsteczkowej, zbudowanym z naprzemiennie ułożonych reszt N-acetylo-D-glukozaminy i kwasu glukuronowego. Ta stosunkowo prosta liniowa struktura chemiczna występuje u wszystkich ssaków, a nawet u bakterii, co wskazuje, że HA jest cząsteczką o istotnym znaczeniu biologicznym [Necas i in., 2008]. W organizmie człowieka hialuronian występuje w skórze, pepowinie, mazi stawowej, ciałku szklistym oka, nerkach, strunach głosowych, krążkach międzykręgowych kręgosłupa, mózgu, moczu i surowicy krwi [Chao i in., 2007].

Kwas hialuronowy znalazł również zastosowanie w diagnostyce chorób nowotworowych [Kogan i in., 2008]. HA wchodzi w skład stromy wielu powszechnych nowotworów, uczestniczy w ich rozwoju i rozprzestrzenianiu się. Jego obecność zaobserwowano także na powierzchni komórek nowotworowych. Akumulacja hialuronianu jest najbardziej widoczna w przypadku nowotworów, które rozwijają się w komórkach i tkankach zwykle go pozbawionych, takich jak nabłonek jednowarstwowy oraz stroma tkanki łącznej [Tammi i in., 2008]. Skuteczne leczenie chemioterapeutykami wymaga więc takich modyfikacji metabolizmu nagromadzonego w chorej tkance HA, aby zwiększyć dostępność leku do wnętrza komórek nowotworowych. Rozkład hialuronianu i rozluźnienie macierzy zewnątrzkomórkowej możliwe jest przez wykorzystanie enzymów hydrolitycznych – hialuronidaz.

Przedmiotem badań w niniejszej pracy była hydroliza natywnego oraz immobilizowanego kwasu hialuronowego przy udziale enzymu hialuronidazy. Podjęto próbę symulacji warunków panujących na powierzchni komórek w tkance nowotworowej, gdzie HA tworzy na powierzchni błony strukturę żelową. W tym celu przeprowadzono eksperymenty utworzenia warstwy hialuronianu na powierzchni membrany płaskiej i wstępnie zbadano jak enzym hydrolizuje zlokalizowany na membranie kwas hialuronowy.

**Badania doświadczalne****Materiały**

W badaniach wykorzystano kwas hialuronowy w postaci soli sodowej ze *Streptococcus equi*, hialuronidazę wołową (*Sigma-Aldrich*), tris(hydroksymetylo)aminometan (*Fluka*), siarczan sodu bezwodny CZDA (POCH).

**Hydroliza natywnego HA**

Reakcje hydrolizy natywnego kwasu hialuronowego przeprowadzono w objętości 15 mL w 24 °C. Roztwory kwasu hialuronowego o stężeniu 0,1 g·L<sup>-1</sup> i enzymu o stężeniu 2,5·10<sup>-3</sup> g·L<sup>-1</sup> przygotowano w buforze Tris-HCl o pH 6,5; 6,8; 7,0 i 7,2. W trakcie trwania procesu pobierano próbki w odpowiednich odstępach czasu i poddawano je analizie HPLC.

**SE-HPLC hydrolizatów kwasu hialuronowego**

Hydrolizaty analizowano wykorzystując *Waters LC Module I PLUS HPLC System* (*Waters, USA*) wyposażony w szeregowo połączone kolumny do filtracji żelowej *PolySep-GFC-P3000* i *PolySep-GFC-P6000*. Zastosowano następujące warunki analizy: temperatura kolumny 30°C, temperatura detektora 40°C, faza mobilna 0,05 M siarczan sodu, przepływ 1 mL·min<sup>-1</sup>, objętość nastrzyku 50 µL, czas analizy 35 minut, detekcja UV przy długości fali 205 nm [Ruckmani i in., 2013]. Do opracowania otrzymanych chromatogramów wykorzystano program *Millennium 32* (*Waters, USA*). Masy cząsteczkowe uzyskanych hydrolizatów określano na podstawie

krzywej standardowej wyznaczonej dla standardów *Pullulan Standard Set (Fluka)* w zakresie mas 342÷805 000 Da. Zastosowane kolumny o rozdzielczości 250÷10<sup>6</sup> Da pokrywały cały zakres wielkości możliwych do uzyskania oligo- i polisacharydów oraz natywnego HA.

**Immobilizacja HA na membranie**

W eksperymentach immobilizacji HA wykorzystano membrany typu VS firmy *Millipore* o średnicy 25 mm i średnicy porów 0,025 µm. Membranę zamontowano w module z przepływem krzyżowym, przy którym osadzono na powierzchni membrany kwas hialuronowy. Masę HA immobilizowanego na membranie określono z bilansu.

**Hydroliza HA osadzonego na membranie**

Membranę z osadzonym HA przeniesiono do modułu z przepływem wzdłużnym. Przy niskim przepływie (2,2·10<sup>-2</sup> L·h<sup>-1</sup>) i ciśnieniu za membraną uzyskano wystarczające ciśnienie, aby fizycznie upakowany HA nie ulegał odrywaniu, a uzyskiwany był permeat na poziomie 7,3·10<sup>-3</sup> L·h<sup>-1</sup>.

Proces hydrolizy prowadzono cyrkulując roztwór hialuronidazy o stężeniu 2,5 mg·L<sup>-1</sup> w buforze Tris-HCl przy pH 6,8 nad membraną. Współczynnik retencji enzymu wynosił 1. W odpowiednich odstępach czasu pobierano próbki retentatu oraz permeatu i badano postęp hydrolizy za pomocą analizy HPLC. Stopień hydrolizy (SH) wyznaczano według wzoru

$$SH = \frac{W}{H} \cdot 100\% \quad (1)$$

gdzie:

SH – stopień hydrolizy [%]

W – liczba cząsteczek uzyskana po danym czasie hydrolizy

H – maksymalna liczba cząsteczek, jaką można uzyskać w wyniku hydrolizy wszystkich wiązań glikozydowych w kwasie hialuronowym

**Wyniki i dyskusja****Hydroliza natywnego hialuronianu**

Stężenia kwasu hialuronowego i hialuronidazy dobrano we wcześniejszych eksperymentach, kiedy to również sprawdzono wpływ temperatury na przebieg reakcji. Badania wykazały, że stopień hydrolizy nie różnił się znacznie dla reakcji prowadzonych w temperaturze 24 °C i 37 °C (temperaturze ciała ludzkiego). Stąd dalsze eksperymenty prowadzono w temperaturze pokojowej (ok. 24 °C).

Zdrowe tkanki ludzkie mają pH ok.7,2; pH tkanek nowotworowych oscyluje wokół 6,8 [Gatenby i Gawlinski, 1996], podczas gdy pH optymalne dla działania enzymu to 4,0 [Kakizaki i in., 2010]. Ze względu na potencjalną możliwość wykorzystania hialuronidazy do rozkładu hialuronianu obecnego na powierzchni komórek nowotworowych, zakres pH ograniczono do wartości potencjalnie mogących wystąpić w organizmie. W tab. 1 przedstawiono stopień hydrolizy natywnego kwasu hialuronowego w zależności od pH buforu, w jakim proces prowadzono.

Z danych zaprezentowanych w tab. 1 wynika, że hydroliza najefektywniej zachodziła w najniższym badanym pH 6,5, co potwierdza fakt, iż enzym preferuje środowisko kwaśne. Wyniki przy pH 6,8; 7,0 i 7,2 są bardzo zbliżone (oscylują w zakresie błędów analitycznego). Wg Kakizaki i in. [2010] w pH ok. 7,0 enzym wykazuje nie tylko aktywność hydrolityczną, ale również transglikozylacyjną. Niemniej w badanym przypadku w środowisku obojętnym obserwowano sukcesywną hydrolizę.

Na podstawie chromatogramów stwierdzono, że enzym preferencyjnie hydrolizował wiązania w długich łańcuchach. W konsekwencji takiej reakcji hydrolizat z danego czasu reakcji nie był zróżnicowany pod względem mas cząsteczkowych. Im dłuższy czas reakcji tym uzyskiwane były produkty o niższej masie cząsteczkowej. Średnią masę cząsteczkową odpowiadającą pikowi uzyskanemu przy analizie z danego czasu reakcji w określonym  $pH$  przedstawiono na rys. 1.

Tab. 1. Stopień hydrolizy natywnego kwasu hialuronowego w czasie w danym  $pH$ .

$pH$	Czas hydrolizy [h]	Stopień hydrolizy [%]
6.5	0,0056	0,426
	1	1,124
	24	3,287
6.8	0,0056	0,196
	1	0,515
	24	1,671
7.0	0,0056	0,219
	1	0,529
	24	1,587
7.2	0,0056	0,233
	1	0,538
	24	1,595

Masa cząsteczkowa użytego do badań natywnego kwasu hialuronowego wynosiła ok.  $2,5 \cdot 10^6$  Da. Jak zaprezentowano na rys. 1 już po 20 sekundach reakcji powstają fragmenty o masie od 16- do 34-krotnie mniejszej niż wyjściowego HA. Hydrolizaty uzyskane po 24 h zawierały 23 podjednostki (w  $pH$  6,5), a w  $pH$  6,8÷7,2 odpowiednio więcej, średnio 52 podjednostki.

### Hydroliza unieruchomionego HA

Z uwagi na zagadnienie hydrolizy kwasu hialuronowego znajdującego się w tkance nowotworowej, gdzie  $pH$  jest bliskie 6,8, dalsze badania nad degradacją immobilizowanego na membranie HA prowadzono w tymże  $pH$ . Stężenie powierzchniowe HA na membranie wynosiło  $10,0 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$ . Hydrolizaty uzyskane w określonym czasie przedstawiono na rys. 2.

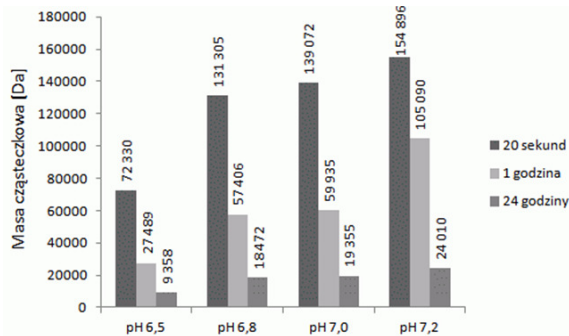
Jak można zauważyć, hydroliza przebiegała z odcinaniem łańcuchów o znacznie mniejszej masie cząsteczkowej (średnio 15 podjednostek), aniżeli w przypadku hydrolizy hialuronianu natywnego. Skład jakościowy zmieniał się przez pierwszą godzinę trwania procesu, gdzie po 60 min odnotowano fragmenty dłuższe niż po 30 minutach reakcji. Świadczyć to może o łączeniu się krótszych łańcuchów polisacharydowych w wyniku wcześniej wspomnianej aktywności transglikozylacyjnej enzymu. Obliczony stopień hydrolizy po 3 godzinach trwania degradacji był niewielki i wynosił 0,93 %. Świadczy to o silnych oporach procesu związanych z dyfuzją zewnętrzną cząsteczek enzymu.

### Wnioski

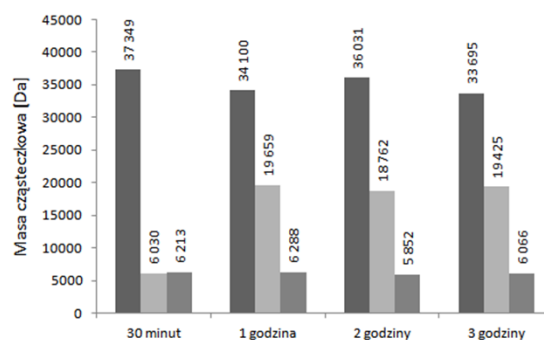
Przedmiotem badań była enzymatyczna hydroliza natywnego i unieruchomionego na membranie kwasu hialuronowego. Ze względu na obecność tego wielkocząsteczkowego polimeru w tkance wielu nowotworów, gdzie blokuje on dojście leków do chorych komórek, sprawdzenie dostępności enzymu do warstwy HA może być niezwykle użyteczne z punktu widzenia zwiększenia efektywności leczenia.

Z przeprowadzonych eksperymentów wynika, że jest możliwa hydroliza HA prowadzona w  $pH$  dalekim od optymalnego, a wynikającym z  $pH$  panującego w organizmie człowieka, w tym w zmienionych nowotworowo tkankach. W tym  $pH$  nie można wykluczyć aktywności transglikozylacyjnej hialuronidazy, zauważalnej szczególnie przy braku wolnego HA w środowisku reakcji.

Przedstawione wyniki stanowią wstęp do dalszych badań nad hydrolizą kwasu hialuronowego, immobilizowanego w postaci warstwy, w kontekście zwiększenia dostępności leków do chorych komórek. Badania nad dyfuzją leków przy częściowo zhydrolizowanej warstwie HA będą stanowiły informację, czy zjawisko oporów dyfuzyj-



Rys. 1. Rozkład mas cząsteczkowych hydrolizatów natywnego kwasu hialuronowego w zależności od czasu hydrolizy i  $pH$



Rys. 2. Rozkład mas cząsteczkowych w hydrolizatach uzyskanych w procesie degradacji powierzchniowej hialuronianu immobilizowanego na membranie płaskiej.

nych w dostępie enzymu do substratu umożliwi lub nie przeprowadzenie zamierzonego celu.

### LITERATURA

- Chao K.L., Muthukumar L., Herzberg O., 2007. Structure of human hyaluronidase-1, a hyaluronan hydrolyzing enzyme involved in tumor growth and angiogenesis. *Biochemistry*, **46**, 6911-6920. DOI: 10.1021/bi700382g
- Gatenby R., Gawlinki E., 1996. A reaction-diffusion model of cancer invasion. *Cancer Res.*, **56**, 5745-5753
- Kakizaki I., Ibori N., Kojima K., Yamaguchi M., Endo M., 2010. Mechanism for the hydrolysis of hyaluronan oligosaccharides by bovine testicular hyaluronidase. *FEBS J.*, **277**, 1776-86. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2010.07600.x.
- Kogan G., Soltes L., Stern R., Gemeiner P., 2007. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnol. Lett.*, **29**, 17-25. DOI: 10.1007/s10529-006-9219-z
- Necas J., Bartosikova L., Brauner P., Kolar J., 2008. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Vet. Med.-Czech.*, **53** (Suppl 8), 397-411
- Ruckmani K., Shaikha Saleem Z., Khalilb Pavne, Muneerab M.S., Thusleem O.A., 2013. Determination of sodium hyaluronate in pharmaceutical formulations by HPLC-UV. *J. Pharmaceut. Anal.*, **3**, 324-329. DOI: 10.1016/j.jpha.2013.02.001
- Tammi R.H., Kultti A., Kosma V.-M., Pirinen R., Auvinen P., Tammi M.I., 2008. Hyaluronan in human tumors: Pathobiological and prognostic messages from cell-associated and stroma hyaluronan. *Semin. Cancer Biol.*, **18**, 288-295. DOI: 10.1016/j.semcancer.2008.03.005

*Praca została wykonana w ramach dotacji na realizację zadania badawczego „Hydroliza związków policukrowych” przyznanej przez Wydział Chemiczny Politechniki Wrocławskiej na rok akademicki 2014/2015, nr decyzji B40150.*

*Prezentacja wyników podczas XII Ogólnokrajowej Konferencji Naukowej "Postępy Inżynierii Bioreaktorowej" finansowana ze środków Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego (KNOW) na lata 2014-2018 dla Wrocławskiego Centrum Biotechnologii.*