

УДК 599.323.4:591.133.2:616.127

© Коллектив авторов

ИНТЕНСИВНОСТЬ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ И РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ NADP-ЗАВИСИМОЙ МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В КАРДИОМИОЦИТАХ КРЫСЫ В НОРМЕ И ПРИ ИШЕМИИ

О. А. Сафонова, Т. Н. Попова, Л. В. Матасова, В. Г. Артюхов

Воронежский государственный университет, 394693, г. Воронеж,
Университетская пл., 1; тел.: (0732) 20-82-78, факс: (0732) 20-87-55,
эл. почта: solga@bio.vsu.ru

При экспериментальной ишемии в цитоплазматической фракции сердечной мышцы крыс увеличивается светосумма (S) в 2,5 раза, максимальная интенсивность хемилюминесценции (I_{\max}) в 2,9 раза, количество малонового диальдегида и диеновых конъюгатов возрастает в 4,6 и 5,8 раза. При ишемии в сердце крыс увеличивается активность NADP-зависимой малакдегидрогеназы (КФ 1.1.1.82; NADP-МДГ) в 1,6 раза. С использованием ферментных препаратов NADP-МДГ, очищенных из нормального и ишемизированного миокарда крыс, определены значения коэффициента Хилла по оксалоацетату ($1,83 \pm 0,07$ и $1,50 \pm 0,10$) и K_m по NADPH ($0,058 \pm 0,003$ и $0,096 \pm 0,004$ мМ) для фермента в норме и при ишемии соответственно. Исследовано влияние ионов Fe^{2+} , Ca^{2+} и Cu^{2+} , H_2O_2 , окисленного и восстановленного глутатиона, адениннуклеотидов на функционирование NADP-МДГ из сердца крысы в норме и при ишемии.

Ключевые слова: крысы, миокард, ишемия, свободнорадикальные процессы, NADP-малакдегидрогеназа.

ВВЕДЕНИЕ. Накопленные в последнее время данные позволяют сделать вывод об участии свободнорадикальных процессов в патогенезе многих заболеваний, в частности, сердечно-сосудистых [1-4]. Согласно гипотезе В. П. Скулачева (1999), в клетке в условиях гипоксии включается ряд защитных механизмов, направленных на понижение внутриклеточной концентрации активных форм кислорода (АФК) и ионов Fe^{2+} , обладающих прооксидантным действием [5]. В этом плане привлекают внимание ферментативные превращения малата, обеспечиваемые малакдегидрогеназой (МДГ), в связи с важной ролью данного метаболита в биохимических процессах, а также адаптации организма к гипоксии [6]. Способность малата диффундировать в митохондрии, передавая восстановительные эквиваленты в электрон-транспортную цепь, и повышать коэффициент дыхательного контроля митохондрий сердца [7] подчеркивает его важное место в регуляции редокс-потенциала кардиомиоцитов. Все эти факты, наряду со способностью малата играть существенную роль в первичной реакции на стрессовые воздействия из-за возможности его быстрой утилизации и усиливать транспорт цитрата — эффективного антиоксиданта, обладающего хелатирующими свойствами по отношению к ионам Fe^{2+} [5], позволяют сделать предположение о важной роли МДГ в регуляции образования АФК в условиях окислительного стресса. Нельзя исключить, что NADPH, образующийся в реакции обратимого превращения малата в оксалоацетат, катализируемой NADP-

ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКАЯ NADP-МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗА

зависимой МДГ (NADP-МДГ; КФ 1.1.1.82), может использоваться глутатионредуктазной/глутатионпероксидазной антиоксидантной системой (АОС). Поскольку для сердечной мышцы животных характерен высокий уровень анаболических процессов и процессов свободнорадикального окисления (СРО), с одной стороны, и низкая активность ферментов пентозофосфатного пути, с другой [8], то восполнение фонда NADPH в цитоплазме клеток играет, очевидно, важную роль в метаболизме миокарда и лимитировании СРО при ишемии.

Целью настоящей работы было исследование интенсивности процессов свободнорадикального окисления и особенностей функционирования NADP-зависимой МДГ из сердечной мышцы крысы в условиях нормы и ишемии.

МЕТОДИКА. В качестве объекта исследования использовали сердечную мышцу самцов белых лабораторных крыс, содержащихся на стандартном рационе вивария. Масса животных составляла 250-300 г. Экспериментальную ишемию миокарда (ЭИМ) моделировали путем окклюзии нисходящей ветви левой коронарной артерии в течение 40 мин. [9].

Для разделения субклеточных фракций миокарда использовали метод дифференциального центрифугирования [10]. В работе использовали среду выделения следующего состава: 50 мМ трис-НСl буфер (pH 7,8), содержащий 0,3 М сахарозу, 1 мМ ЭДТА, 2 мМ β -меркаптоэтанол и 3 мМ $MgCl_2$. В качестве маркерного фермента митохондрий использовали сукцинатдегидрогеназу [11], цитоплазмы – лактатдегидрогеназу [12].

Оценку интенсивности процессов свободнорадикального окисления в норме и при экспериментальной ишемии осуществляли методом Fe^{2+} -индуцированной хемилюминесценции [13]. Регистрировали следующие показатели: светосумму медленной вспышки (S), интенсивность максимальной вспышки (I_{max}), тангенс угла падения кинетической кривой ($tg\alpha_2$).

Определение содержания первичных продуктов ПОЛ – диеновых конъюгатов – осуществляли спектрофотометрически в экстрагированной гептановой фазе липидов при длине волны 233 нм [14]. Определение концентрации вторичного продукта ПОЛ – малонового диальдегида – проводили по качественной реакции с 2-тиобарбигуровой кислотой [15].

Активность NADP-МДГ определяли спектрофотометрически при длине волны 340 нм. Определение активности NADP-МДГ проводили в среде спектрофотометрирования следующего состава: 50 мМ трис-НСl буфер (pH 7,1), содержащий 1 мМ оксалоацетат, 0,15 мМ NADPH. Общее количество белка определяли по методу Лоури и соавт. [16]. В экспериментах использовали сердечную мышцу здоровых крыс и животных, подвергшихся воздействию ЭИМ.

Очистка цитоплазматической NADP-МДГ из нормального и ишемизированного миокарда крысы включала несколько этапов: фракционирование сульфатом аммония в пределах насыщения $(NH_4)_2SO_4$ 30 – 75%, гель-фильтрация на колонке с сефадексом G-25 (fine, 1.4×20 см), ионообменная хроматография на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой (0,8×13 см), гель-хроматография на колонке с сефадексом G-150 (2×60 см).

Все этапы выделения и очистки фермента осуществляли при температуре 0-4°C. Опыты проводили в 3-4-кратной биологической повторности, аналитические определения в каждой пробе – в 2-х повторностях. Данные обрабатывали с использованием стандартных статистических методов [17].

В работе были использованы следующие реактивы и материалы: Tris (“Serva”, Германия), оксалоацетат, глутатион окисленный (“Sigma”, США), глутатион восстановленный, 2-ТБК (“Merck”, Германия), NADPH, ДЭАЭ-целлюлоза, АТР, АДФ, АМФ (“Reanal”, Венгрия), сефадекс G-25, G-150 (“Pharmacia”, Швеция). Остальные реактивы – отечественного производства марки “ч.д.а.” или “х.ч.”

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Результаты исследования интенсивности процессов свободнорадикального окисления в цитоплазматической

фракции кардиомиоцитов крысы в норме и при экспериментальной ишемии миокарда методами биохемилюминесценции (БХЛ) и спектрофотометрического определения содержания продуктов пероксидного окисления липидов (ПОЛ) представлены в таблицах 1 и 2. Показано, что параметры БХЛ: интенсивность максимальной вспышки (I_{\max}) и светосумма медленной вспышки (S) возрастают в цитоплазме кардиомиоцитов крыс, подвергшихся воздействию экспериментальной ишемии, по сравнению с тканью здоровых животных в 2,9 и 2,5 раза соответственно. Данные изменения свидетельствуют об интенсификации процессов свободнорадикального окисления в миокарде в условиях ишемического повреждения ткани. При этом величины, характеризующие антиоксидантный потенциал пробы - тангенс угла падения кинетической кривой ($\text{tg}\alpha_2$) и коэффициент k, определяемый по соотношению I_{\max}/S , увеличиваются на 52% и 16% в цитоплазматической фракции миокарда в условиях ЭИМ соответственно. Это может свидетельствовать о том, что в условиях ишемии начинают действовать компенсаторные механизмы, направленные на снижение уровня свободнорадикальных процессов в организме.

Таблица 1. Параметры хемилюминесценции в цитоплазматической фракции кардиомиоцитов крыс в норме и при экспериментальной ишемии.

Условия опыта	Светосумма медленной вспышки (S)	Интенсивность максимальной вспышки (I_{\max})	Тангенс угла падения кинетической кривой ($\text{tg}\alpha_2$)	Коэффициент k (I_{\max}/S)
Норма	$5,15 \pm 0,23$	$0,89 \pm 0,04$	$0,253 \pm 0,011$	$0,173 \pm 0,007$
Ишемия	$13,05 \pm 0,58^*$	$2,58 \pm 0,11^*$	$0,385 \pm 0,017^*$	$0,200 \pm 0,011^*$

Примечание: * - отличия от нормы достоверны (уровень значимости $p < 0,05$)

Таблица 2. Содержание первичных и вторичных продуктов ПОЛ в цитоплазматической фракции кардиомиоцитов крыс в норме и при экспериментальной ишемии.

Условия опыта	ДК, мкмоль/г сырой массы $\cdot 10^{-5}$	МДА, мкмоль/г сырой массы $\cdot 10^{-5}$
Норма	$1,40 \pm 0,06$	$0,142 \pm 0,007$
Ишемия	$8,12 \pm 0,32^*$	$0,650 \pm 0,029^*$

Примечание: * - отличия от нормы достоверны (уровень значимости $p < 0,05$)

Однако при тяжелых стрессорных и ишемических повреждениях мощность естественных антиоксидантных систем оказывается недостаточной – реализуется выраженная активация ПОЛ, что может приводить к накоплению продуктов данного процесса. Проведенные исследования показали, что в условиях ЭИМ в цитоплазматической фракции кардиомиоцитов крысы концентрация диеновых конъюгатов (ДК) и малонового диальдегида (МДА) возрастает в 5,8 и 4,6 раза. Таким образом, согласно полученным результатам, в кардиомиоцитах крыс при экспериментальной ишемии происходит значительное усиление свободнорадикальных процессов и накопление продуктов ПОЛ.

Изучение субклеточной локализации NADP-МДГ в миокарде крысы показало, что данный фермент сосредоточен в цитоплазме кардиомиоцитов, в митохондриях активности фермента не было обнаружено. Перекрестное загрязнение субклеточных фракций по результатам измерения активностей маркерных ферментов митохондрий и цитоплазмы не превышало 10-12%.

ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКАЯ NADP-МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗА

Установлено, что в сердечной мышце в условиях ишемии внутриклеточная локализация NADP-МДГ не изменяется.

Измерение активности NADP-МДГ в цитоплазматической фракции ткани сердечной мышцы крысы в норме и в условиях интенсификации свободнорадикального окисления, вызванной ишемией, показало, что активность фермента увеличивается в 1,6 раз в миокарде животных, подвергшихся воздействию ОИМ. В связи с этим необходимо отметить, что имеются данные об активации NADP-зависимой малакдегидрогеназы в легочной ткани кролика при острой гипоксии, в результате чего, по мнению авторов, в цитоплазме увеличивается образование восстановленной формы кофермента NADP [18].

Из нормального и ишемизированного сердца крысы были получены очищенные в 113 и 107 раз ферментные препараты NADP-МДГ с удельной активностью 22,7 и 34,3 ФЕ/мг белка соответственно (табл. 3).

Таблица 3. Очистка цитоплазматической NADP-зависимой малакдегидрогеназы из миокарда крысы в норме и при экспериментальной ишемии.

Стадия очистки	Условия опыта	Активность, ФЕ	Количество белка, мг	Удельная активность, ФЕ/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат	Норма	9,87±0,46	48,34±2,10	0,20±0,01	100	1
	Ишемия	15,04±0,70*	47,70±2,12	0,32±0,01*	100	1
Фракционирование (NH ₄) ₂ SO ₄	Норма	4,00±0,17	6,75±0,30	0,59±0,02	40,5	3,0
	Ишемия	5,60±0,22*	7,00±0,31	0,80±0,03*	37,2	2,5
Гель-фильтрация на сефадексе G-25	Норма	4,13±0,19	5,60±0,27	0,74±0,03	41,8	3,7
	Ишемия	5,55±0,23*	6,10±0,29	0,91±0,04*	36,9	2,8
Ионо-обменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	Норма	2,80±0,10	0,45±0,02	6,22±0,22	28,4	31,1
	Ишемия	4,42±0,16*	0,50±0,02	8,84±0,31*	29,4	27,6
Гель-хроматография на сефадексе G-150	Норма	0,91±0,03	0,040±0,001	22,67±1,10	9,2	113,4
	Ишемия	1,58±0,06*	0,046±0,002	34,32±1,58*	10,5	107,3

Примечание: * - отличия от нормы достоверны (уровень значимости $p < 0,05$)

С использованием очищенных ферментных препаратов NADP-МДГ из миокарда крысы были определены некоторые кинетические параметры каталитического действия и исследована регуляция активности фермента в норме и условиях ишемии. Изучение зависимости активности фермента от концентрации субстрата (оксалоацетата) и кофермента (NADPH) показало, что NADP-МДГ проявляет положительную кооперативность по отношению к оксалоацетату как в норме, так и при ишемии. Значения коэффициента Хилла по оксалоацетату составили $1,83 \pm 0,07$ и $1,50 \pm 0,10$ в норме и при экспериментальной ишемии миокарда соответственно. Величина K_m по NADPH, определенная в двойных

обратных координатах Лайнуивера-Берка, составила $0,058 \pm 0,003$ мМ в норме и $0,096 \pm 0,004$ мМ в условиях ишемии. Таким образом, в условиях ишемии наблюдается снижение сродства фермента к коферменту, а также изменение коэффициента Хилла, характеризующего связывание NADP-МДГ с оксалоацетатом.

Из литературных данных известно, что в процессе ишемического повреждения ткани могут участвовать АФК, в частности, H_2O_2 , а также ионы двухвалентных металлов Fe^{2+} , Cu^{2+} и Ca^{2+} [5]. В нашей работе было показано, что ионы Fe^{2+} оказывают ингибирующее действие на NADP-МДГ как в норме, так и при ишемии. Однако NADP-МДГ, выделенная из ишемизированного миокарда, подвергается большему ингибирующему влиянию ионов Fe^{2+} , чем фермент из сердца контрольных животных (рис. 1а). Ионы Cu^{2+} также оказывают сильное ингибирующее влияние на NADP-МДГ, выделенную из сердца крысы, как в норме, так и при ишемии. При этом большее снижение активности наблюдается для фермента, выделенного из нормальных кардиомиоцитов крысы (рис. 1б). Ионы Ca^{2+} подавляют активность фермента из сердца контрольных животных и оказывают активирующее влияние на фермент из ишемизированного миокарда в концентрации до 0,08 мМ (рис. 1в).

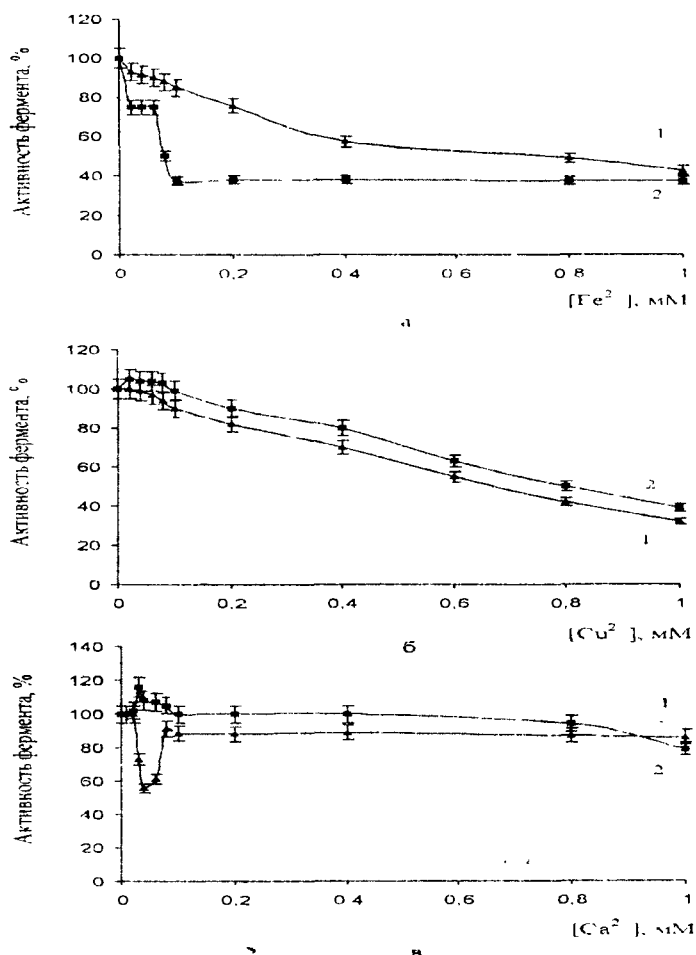


Рисунок 1.

Влияние ионов некоторых металлов (а - Fe^{2+} ; б - Cu^{2+} ; в - Ca^{2+}) на активность NADP-МДГ из миокарда крысы в норме (1) и при экспериментальной ишемии (2)

ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКАЯ NADP-МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗА

Пероксид водорода оказывает ингибирующее действие на функционирование фермента как в норме, так и в условиях ишемии, причем ингибирующий эффект H_2O_2 на активность фермента более выражен для NADP-МДГ, выделенной из сердца здорового животного (рис. 2).

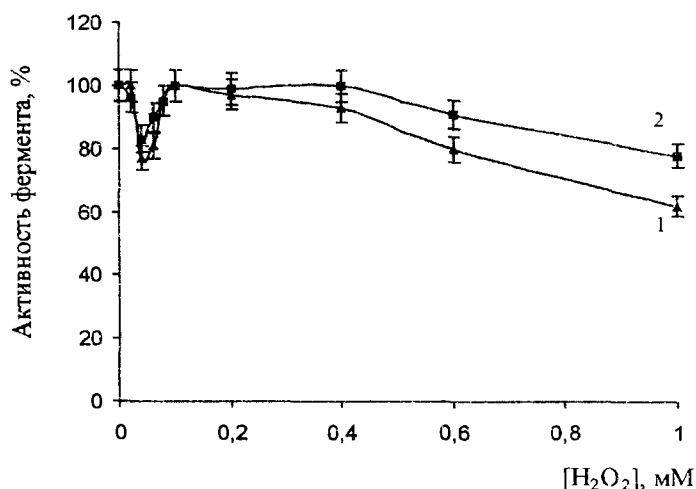


Рисунок 2.
Влияние H_2O_2 на активность NADP-МДГ из миокарда крысы в норме (1) и при экспериментальной ишемии (2)

Показано, что восстановленный глутатион слабо ингибирует исследуемый фермент в условиях нормы в концентрациях выше 0,6 мМ, в то время как на фермент, выделенный из ишемизированного сердца, данный метаболит оказывает активирующее действие (рис. 3а). Выявленное активирующее действие восстановленного глутатиона можно объяснить его участием в восстановлении окисленных в условиях интенсификации СРО SH-групп белка. Глутатион окисленный оказывает тормозящее действие на активность NADP-МДГ, выделенной из кардиомиоцитов здорового животного. Что касается NADP-МДГ из миокарда животных, подвергшихся воздействию экспериментальной ишемии, то окисленная форма глутатиона в концентрации до 0,4 мМ слабо ингибирует фермент, с увеличением же концентрации ингибирующее действие данного метаболита снимается (рис. 3б). Таким образом, выявлено, что окисленная и восстановленная формы глутатиона оказывают различное действие на NADP-МДГ в норме и при ЭИМ, что может играть определенную роль с точки зрения сопряжения функционирования данного фермента с глутатионредуктазной/глутатионпероксидазной АОС.

Известно, что при прекращении кровоснабжения в ткани происходят метаболические нарушения, приводящие к изменению содержания адениннуклеотидов, играющих основополагающую роль в энергетическом обмене клетки [19]. В нашей работе было проведено исследование влияния АТР, АДР и АМР на функционирование цитоплазматической NADP-МДГ из нормального и ишемизированного сердца крысы. Кривые зависимости активности исследуемого фермента от концентрации АТР в норме и при ишемии представлены на рисунке 4. Показано, (рис. 4а) что АТР является ингибитором данного фермента из миокарда здоровых животных, причем наибольшее воздействие на МДГ данное соединение оказывает в концентрации выше 0,1 мМ. При ишемии данный метаболит в концентрации от 0,1 до 0,8 мМ оказывает активирующее влияние на NADP-МДГ. АДР при разных концентрациях оказывает различное действие на активность фермента. Так, в норме при концентрации АДР до 0,14 мМ наблюдается

увеличение активности МДГ, при более высоких концентрациях ADP имеет место ингибирующий эффект. Что касается NADP-МДГ из ишемизированного миокарда, то ADP снижает активность фермента (рис. 4б). Обнаружено, что AMP в концентрации до 0,5 мМ оказывает сильное ингибирующее влияние на функционирование данного фермента, выделенного из сердца здоровых крыс, которое снижается при дальнейшем увеличении концентрации метаболита. На фермент из ишемизированного миокарда данное соединение оказывает слабое ингибирующее действие в концентрациях выше 0,1 мМ (рис. 4в). Согласно полученным результатам, можно предположить участие данных соединений, являющихся индикаторами энергетического состояния клетки, в регуляции активности цитоплазматической NADP-зависимой МДГ в норме и при ишемии миокарда.

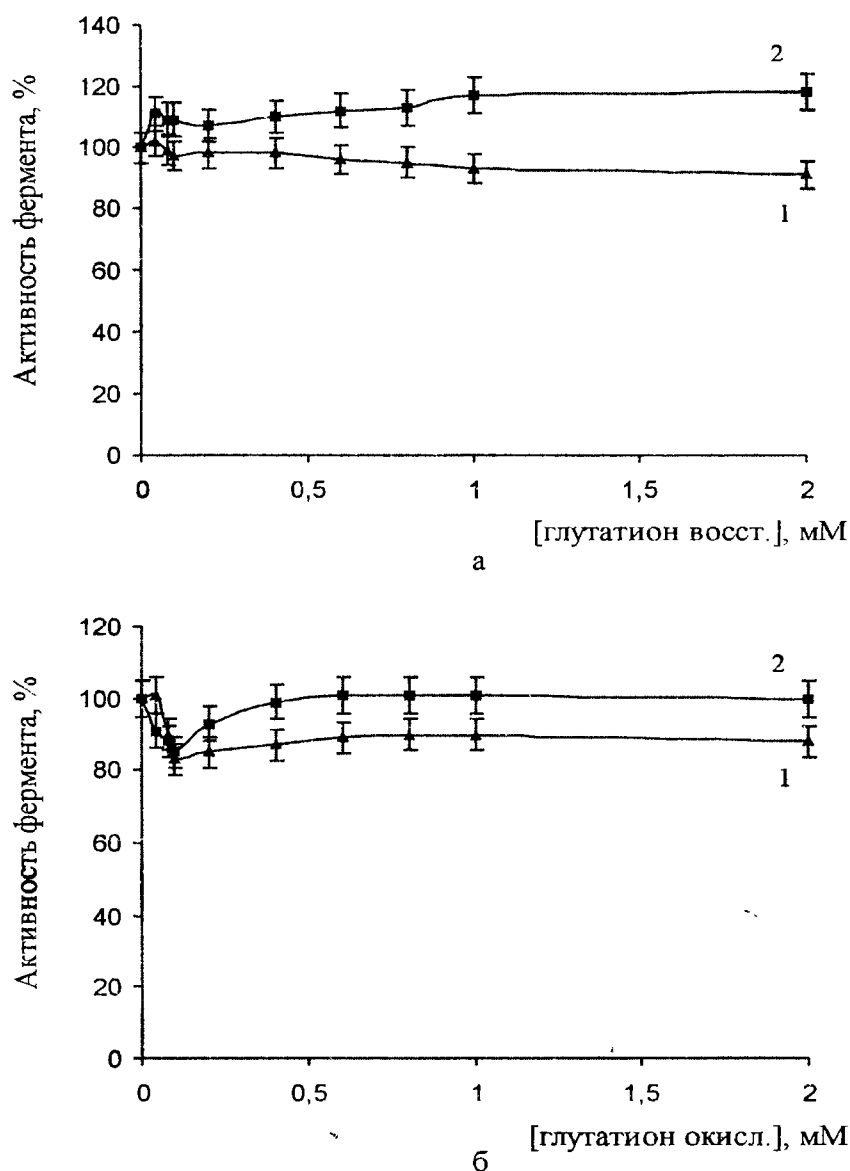
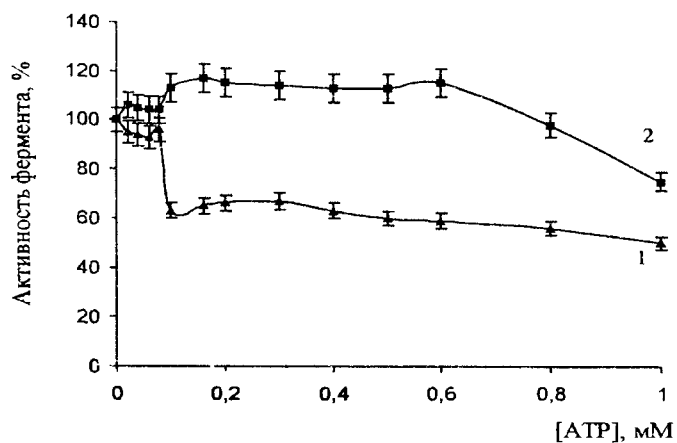


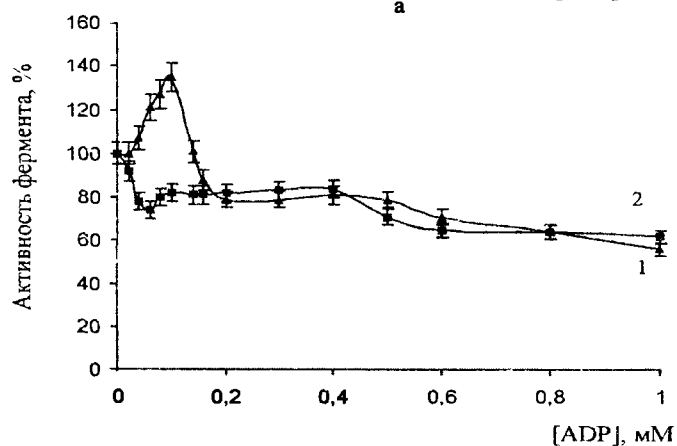
Рисунок 3.

Влияние глутатиона восстановленного (а) и окисленного (б) на активность NADP-МДГ из миокарда крысы в норме (1) и при экспериментальной ишемии (2)

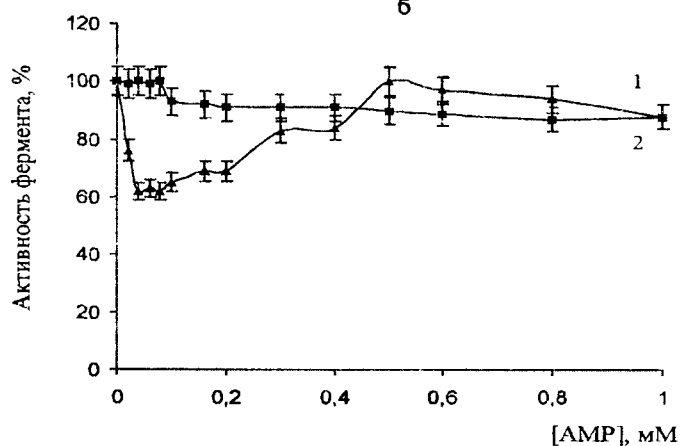
ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКАЯ NADP-МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗА



а



б



в

Рисунок 4.

Влияние адениннуклеотидов (а - АТФ; б - АДФ; в - АМР) на активность NADP-МДГ из миокарда крысы в норме (1) и при экспериментальной ишемии (2)

Изменение активности, кинетических характеристик и регуляции активности исследуемого фермента под действием адениннуклеотидов, H_2O_2 , ионов некоторых металлов и глутатиона в условиях ишемического повреждения ткани свидетельствует о возможности существования взаимосвязи функционирования цитоплазматической NADP-МДГ с комплексом ферментативных и

неферментативных компонентов клетки, обеспечивающих регуляцию интенсивности свободнорадикальных процессов в условиях, приводящих к их интенсификации.

Работа поддержана грантом Программы "Университеты России" УР 07.01.004.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бурлакова Е. Б. (1980) Кардиология, **8**, 48-53
2. Владимиров Ю. А. (1972) Изв. АН СССР, **4**, 489-501
3. Петрович Ю. А., Гуткин Д. В. (1986) Пат. физиол., **5**, 85-92
4. Ланкин В. З., Тихазе А. К., Беленков Ю. Н. (2000) Кардиология, **7**, 48-57
5. Скулачев В. И. (1999) Биохимия, **64**, 1679-1688
6. Глотов Н. А., Шмелева Л. Т. (1973) Укр. биохим. журн., **5**, 605-608
7. Малюк В. И. (1977) Энергетический обмен миокарда при пороках сердца и метаболическая коррекция его нарушений. Автореф. дисс. докт. наук, Киев
8. Диксон М., Узбб Э. (1982) Ферменты, Мир, М., **Т. 3**
9. Меерсон Ф. З. (1984) Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца, Медицина, М.
10. Прохорова М. И. (1982) Методы биохимических исследований, Изд-во ЛГУ, Л.
11. Cooper T. G., Beevers H. (1969) J. Biol. Chem., **244**, 3507-3513
12. Кочетов Г. А. (1980) Практическое руководство по энзимологии, Высш. шк., М.
13. Кузьменко А. И., Морозова Р. П., Николенко И. А. и др. (1997) Биохимия, **62**, 712-715
14. Стальная И. Д. (1977) в: Современные методы в биохимии (под ред. Ореховича В.Н.), Медицина, М., с. 63-64.
15. Стальная И. Д., Гаришвили Т. Г. (1977) в: Современные методы в биохимии (под ред. Ореховича В.Н.), Медицина, М., с. 66-68.
16. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) J. Biol. Chem., **194**, 265-275
17. Ллойд Э., Ледерман У. (1990) Справочник по прикладной статистике, Финансы и статистика, М. с. 493-513
18. Ананьева Г. В., Поступаев В. В., Рябцева Е. Г. (1983) Эксперим. и клинич. энзимол., Хабаровск, с. 8 – 11.
19. Гаццра В. В. (1993) Фармакологическая коррекция энергетического обмена ишемизированного миокарда, Антекс, М.

Поступила: 07. 05 2004 г.

ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКАЯ NADP-МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗА

FREE-RADICAL PROCESSES INTENSITY AND REGULATION OF CYTOPLASMIC NADP-DEPENDENT MALATE DEHYDROGENASE IN RAT CARDIOMYOCYTES AT NORM AND UNDER ISCHEMIA

O. A. Safonova, T. N. Popova, L. V. Matasova, V. G. Artyukhov

Voronezh State University, Universitetskaya sq., 1, Voronezh, 394693 Russia;
tel.: (0732) 20-82-78; fax: (0732) 20-87-55; e-mail: solga@bio.vsu.ru

Experimental ischemia of rat myocardium was accompanied by increase of light sum (S) and maximal intensity (I_{\max}) of chemiluminescence, amount of a malonic dialdehyde and conjugated dienes in cytoplasmic fraction. The activity of NADP-dependent malate dehydrogenase (EC 1.1.1.82; NADP-MDH) was 1.6 times higher in rat heart under ischemia. NADP-MDH was purified from normal and ischemia-exposed rat myocardium. Using NADP-MDH purified enzyme preparations the values of Hill coefficient for oxaloacetate (1.83 ± 0.07 and 1.50 ± 0.10) and K_m for NADPH (0.058 ± 0.003 and 0.096 ± 0.004 mM) were determined for the enzyme at norm and under ischemia respectively. Effects of Fe^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} ions, H_2O_2 , oxidized and reduced glutathione, adenine nucleotides influence on functioning of NADP-MDH from rat heart at norm and under ischemic conditions have been investigated.

Key words: rats, myocardium, ischemia, free-radical processes, NADP-malate dehydrogenase.