Биомедицинская химия, 2006, том 52, вып. 6, с. 587-594.

УДК 577.150.5
©Коллектив авторов

РОЛЬ МАЛЫХ МОЛЕКУЛ В РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ДЕГИДРОГЕНАЗ

Ф.Н. Гильмиярова, В.М. Радомская, Ю.В. Мякишева, Г.М. Баишева, Ю.В. Первова, Н.В. Спиридонова

ГОУ ВПО "Самарский государственный медицинский университет Росздрава", кафедра фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой, 443099, г. Самара, ул. Чапаевская, 89; тел./факс: 8(846) 332-91-82; эл. почта: bio-sam@yandex.ru

Изучено влияние силистронга на активность цитоплазматических дегидрогеназ эритроцитов, а также изолированной глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД). Установлено, что силистронг и его биологически активные компоненты – этанол и силимарин, активируют ГАФД, лактатдегидрогеназу, α-ГФДГ в условиях полиферментной полисубстратной системы и изолированной ГАФД. Изучаемые соединения способны экранировать от повреждающего действия, а также восстанавливать активность ферментов, модифицированных пероксидом водорода. Максимальная эффективность характерна для силистронга. Показана возможность силистронга оптимизировать процессы гликолитической оксидоредукции, снижая долю ацилфосфатазной и восстанавливая дегидрогеназную активность ГАФД, что обеспечивает более продуктивное энергообеспечение и нормализует сродство гемоглобина к кислороду и обуславливает антигипоксантное действие.

Ключевые слова: силистронг, этанол, силимарин, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа, α-глицерофосфатдегидрогеназа.

ВВЕДЕНИЕ. Интерес к дегидрогеназам поддерживается новыми фундаментальными данными о структурно-функциональной организации, выявлением "неканонических" свойств, индуцированием модифицирующими факторами других видов активности наряду с дегидрогеназной [1-4]. В прикладном отношении это – возможность энзимотерапевтического воздействия, использование ферментов в качестве молекулярных объектов для тестирования токсичности, изучение механизма действия биологически активных соединений, лекарственных соединений [5]. Известно, что D-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД; КФ 1.2.1.12) - полифункциональный фермент,

являясь ключевым звеном в гликолитической оксидоредукции, также принимает участие в эндоцитозе, сборе микротрубочек, обладает фосфотрансферазной активностью, участвует в репарации и репликации ДНК, экспорте ядерной РНК и в других процессах [6]. Модификация фермента пероксидом водорода ведет к потере дегидрогеназной и появлении ацилтрансферазной, фосфатазной, эстеразной активностей, что изменяет характер энергообеспечения, сродство к кислороду, направленность обменных превращений [2, 3]. В связи с этим информативно использование ГАФД в модельных экспериментах для оценки средств, обладающих протекторными свойствами в условиях усиления прооксидантных процессов, слабости антиоксидантной защиты, что является универсальным метаболическим нарушением при ряде патологических и пограничных состояний [7, 8]. Из плодов расторопши *Silybum marianum* нами получен препарат силистронг (патент РФ № 2112020; ФСП 42-0211-0703-01, регистрационное удостоверение МЗ РФ № 000605/01 от 23.08.01). Суммарное содержание в нем флаволигнанов составляет 600 мг%. Использование метода компьютерных программ прогнозирования фармакологических свойств – PASS (Prediction of Activity spectra for substances: complex and Training) и “Pharma Expert” позволило выявить максимально возможный спектр биологического действия флаволигнанов расторопши [9, 10].

Цель настоящего исследования состояла в изучении действия препарата силистронг и его компонентов на активность некоторых цитоплазматических дегидрогеназ.

МЕТОДИКА. ГАФД выделяли из скелетных мышц интактных кроликов [11]. Лизат эритроцитов готовили после забора крови в вакутейнеры с гепарином, последующего отделения от плазмы (центрифугированием при 600 g в течение 15 мин) и троекратного отмывания 5 мМ калий фосфатным буфером pH 7,4, содержащим 0,15 М NaCl. Отмытые эритроциты гемолизировали в течение часа, добавляя 5 мМ калий фосфатный буфер, содержащий 0,5 мМ ЭДТА, 0,5 мМ дитиотреитол, pH 7,4. Фрагменты мембран осаждали центрифугированием при 600 g в течение 15 мин. Активность ГАФД, лактатдегидрогеназы (ЛДГ), α-глицерофосфатдегидрогеназы (ГФДГ) определяли спектрофотометрически, по окислению NADH [12, 13]. Содержание белка – биуретовым методом и спектрофотометрически при 280 нм.

Поставлено три варианта опытов *in vitro*. Активность ГАФД оценивали после инкубации с 0,3 мМ силистронгом при температуре 25°С в течение 30 минут. Далее для изучения протекторного влияния от повреждающего действия пероксида водорода в аналогичных условиях после инкубации добавлен пероксид водорода в конечной концентрации 10 мкМ с последующим определением активности фермента. Для изучения возможности восстановления силистронгом активности модифицированной пероксидом водорода ГАФД препарат фермента первоначально инкубировали с пероксидом водорода, затем проводили инкубацию с силистронгом, после чего определяли активность. Поскольку одним из активных компонентов спиртосодержащего препарата силистронг являются флаволигнаны, были поставлены серии экспериментов с заменой силистронга этанолом и силимарином в конечной концентрации 0,3 мМ и 0,3 мМ соответственно. Режим инкубации и изучение влияния пероксида водорода, силистронга и его компонентов на ферментативную активность в лизате эритроцитов аналогичен описанному для ГАФД. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программ MS Excel XP, S-Plus 2000, Statistica 5.5.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Проведённые эксперименты по инкубации лизата эритроцитов с силистронгом, этанолом и силимарином показали, что под действием силистронга наблюдается повышение активности ГАФД, ЛДГ и ГФДГ (табл. 1). Наиболее выраженные изменения отмечены у ГАФД: активность этого фермента увеличивается на 110,0%, ЛДГ - на 94,1%, ГФДГ - на 86,5%.

Таблица 1. Активность ГАФД, ЛДГ и ГФДГ (Ед/мг) лизата эритроцитов после инкубации с силистронгом, этанолом и силимарином.

	Контроль	Силистронг	Этанол	Силимарин
ГАФД				
Исходные значения	0,255±0,001	0,261±0,002*	0,251±0,003*	0,258±0,001
Преинкубация с препаратами		0,548±0,042*	0,440±0,0027*	0,281±0,001
ЛДГ				
Исходные значения	0,315±0,004	0,321±0,006*	0,317±0,004	0,319±0,003
Преинкубация с препаратами		0,623±0,007*	0,517±0,006**	0,325±0,006
ГФДГ				
Исходные значения	0,20±0,003	0,209±0,006*	0,192±0,003***	0,205±0,004**
Преинкубация с препаратами		0,373±0,005*	0,244±0,011***	0,322±0,007**

Примечание: Здесь и далее представлены средние значения (± ошибка средней). *p<0,001; **p<0,01; ***p<0,05.

Этанол также увеличивает активность исследуемых ферментов, однако изменения носили менее выраженный характер. Введение в лизат эритроцитов силимарина (изолированной смеси флаволигнанов) повышало активность ГФДГ в 1,57 раза, в то время как активность ГАФД и ЛДГ практически не изменялись.

Таким образом, в составе полиферментной и полисубстратной системы лизата эритроцитов силистронг и его компоненты активируют гликолитические дегидрогеназы и ГФДГ.

Введение в лизат эритроцитов пероксида водорода вызывало полную инактивацию ГАФД, снижение активности ЛДГ в 3 раза, ГФДГ - в 2 раза (табл. 2).

Таблица 2. Влияние пероксида водорода на активность ГАФД, ЛДГ, ГФДГ (Е/мг) лизата эритроцитов после преинкубации с силистронгом, этанолом и силимарином.

	Контроль	Силистронг (1)	Этанол (2)	Силимарин (3)
ГАФД				
1.Исходные значения	0,255±0,001	0,261±0,002*	0,251±0,003*	0,258±0,001*
2. Преинкубация с препаратами 1,2,3		0,548±0,042*	0,440±0,0027*	0,281±0,001*
3. После действия пероксида водорода	0	0,063±0,003*	0,024±0,009*	0,049±0,007*
ЛДГ				
1.Исходные значения	0,315±0,004	0,321±0,006**	0,317±0,004*	0,319±0,003
2. Преинкубация с препаратами 1,2,3		0,623±0,007**	0,517±0,006*	0,325±0,006
3. После действия пероксида водорода	0,104±0,006	0,413±0,012**	0,222±0,017*	0,345±0,012
ГФДГ				
1.Исходные значения	0,20±0,003	0,209±0,006**	0,192±0,003**	0,205±0,004**
2. Преинкубация с препаратами 1,2,3		0,373±0,005**	0,244±0,011**	0,322±0,007**
3. После действия пероксида водорода	0,095±0,009	0,304±0,015**	0,148±0,007**	0,228±0,013**

Преинкубация лизата эритроцитов с силистронгом оказывала экранирующее действие на активность изучаемых ферментов и приводила к уменьшению потери активности ГАФД, вызванной действием пероксида водорода в 4 раза. При этом активность ЛДГ повышалась на 28,7%, а ГФДГ – на 45,4%.

Изучение эффектов этанола и силимарина показало, что оба компонента силистронга способствуют частичному сохранению активности ГАФД, падение которой вызывает пероксид водорода. Более действенным является силимарин. Последующие эксперименты выявили, что именно флаволигнаны опосредуют активацию ЛДГ и ГФДГ силистронгом, поскольку преинкубация с силимарином нивелировала действие H_2O_2. Кроме того, отмечена тенденция к активации ЛДГ и ГФДГ: по сравнению с контрольными значениями активность всех изучаемых ферментов выше, что свидетельствует об антиоксидантных свойствах силистронга и его биологически активных составляющих (этанола и силимарина).

Дальнейшие исследования показали, что силистронг, этанол и силимарин способствуют восстановлению активности ферментов, сниженной после внесения в инкубационную смесь пероксида водорода (табл. 3). Наибольшей восстанавливающей способностью обладает силистронг. Под его влиянием отмечено восстановление 14,6% ГАФД, 86,6% - ЛДГ и 63,6% - ГФДГ. Воздействие этанола оказывает менее выраженный эффект: активность ЛДГ составляет 51,4% от фоновых значений, ГФДГ – 45,3%, а активность ГАФД не меняется. Силимарин восстанавливал 57,1% активности ЛДГ и 41% - ГФДГ. Таким образом, наиболее выраженное восстанавливающее действие на ГАФД отмечено при действии на лизат эритроцитов силистронга и далее (в порядке убывания положительного эффекта) силимарина и этилового спирта.

Таблица 3. Влияние силистронга, этанола и силимарина на активность модифицированных пероксидом водорода ГАФД, ЛДГ, ГФДГ (Е/мг) лизата эритроцитов.

	Контроль	Силистронг	Этанол	Силимарин
ГАФД				
1. Исходные значения	0,255±0,001	0,261±0,002*	0,251±0,003*	0,258±0,001*
2. Преинкубация с пероксидом водорода	0	0	0	0
3. После действия препаратов		0,038±0,003*	0,011±0,001*	0,025±0,006*
ЛДГ				
1. Исходные значения	0,315±0,004	0,321±0,006*	0,317±0,004*	0,319±0,003*
2. Преинкубация с пероксидом водорода	0,104±0,006	0,107±0,0012*	0,109±0,003*	0,102±0,007*
3. После действия препаратов 1,2,3		0,278±0,012*	0,163±0,008*	0,182±0,014*
ГФДГ				
1. Исходные значения	0,20±0,003	0,209±0,006**	0,192±0,003	0,205±0,004
2. Преинкубация с пероксидом водорода	0,095±0,009	0,091±0,006**	0,099±0,003	0,101±0,007
3. После действия препаратов 1,2,3		0,133±0,004**	0,087±0,006	0,084±0,010

Проведенные исследования позволили выявить особенности действия силистронга и его основных компонентов в условиях полиферментной и полисубстратной системы. Пероксид водорода вызывает падение дегидрогеназной активности ГАФД до нуля. Известно, что модификация пероксидом водорода фермента происходит за счет окисления SH-группы остатка цистеина-149, входящего в состав активного центра, до сульфеновой кислоты [12]. Последовательное действие пероксида водорода, ведущего к инактивации ГАФД, а затем силистронга способствует частичному восстановлению активности фермента: она возрастает на 16%.

Для ответа на вопрос о прямом или опосредованном влиянии силистронга и его биологически активных компонентов на активность дегидрогеназ нами поставлена серия экспериментов на изолированной ГАФД. Исследования показали, что активные вещества, содержащиеся в силистронге, способны оказывать непосредственно защищать SH–группы активного центра ГАФД от пероксида водорода (табл. 4).

Таблица 4. Влияние силистронга и пероксида водорода на активность нативной и модифицированной ГАФД из скелетных мышц кролика.

	Контроль	Силистронг
Влияние силистронга на активность ГАФД (Ед/мг)		
Исходные значения	22,21±1,78	21,34±2,41
Преинкубация с препаратом	-	24,94±2,66
Влияние пероксида водорода на активность ГАФД (Ед/мг) после преинкубации с силистронгом		
1.Исходные значения	22,21±1,78	21,34±2,41*
2.Преинкубация с препаратом	-	24,94±2,66*
3. После действия пероксидом водорода	0	1,856±0,277*
Влияние силистронга на активность модифицированной пероксидом водорода ГАФД (Ед/мг)		
1.Исходные значения	22,21±1,78	21,34±2,41*
2.Активность модифицированного фермента	0	0
3.После инкубации с препаратом	-	2,167 ± 0,42*

Силистронг восстанавливал дегидрогеназную активность модифицированной ГАФД. При добавлении к инактивированному пероксидом водорода ферменту силистронга отмечено увеличение активности на 59,8%. Модификация ГАФД пероксидом водорода, приводящая к потере дегидрогеназной активности, сопровождается появлением ацилфосфатазной активности. Следствием этого является разобщение субстратного фосфорилирования, снижение его эффективности, изменение уровня 2,3-дифосфоглицерата. Это приводит к дефициту энергии и увеличению сродства гемоглобина к кислороду, что ведет к развитию гипоксии [5, 13]. В связи с этим установленное нами превентивное и восстанавливающее действие силистронга и его компонентов служит фактором стабилизации окисления и фосфорилирования в системе гликолитической оксидоредукции и оказывает антигипоксантное действие. Следует отметить, что этанол и силимарин незначительно влияют на активность нативной ГАФД (табл. 5, 6). При действии пероксида водорода в присутствии

этанола на ГАФД, активность этого фермента сохраняется, но она на 27,1% ниже, чем в аналогичных экспериментах с использованием силистронга (табл. 5). После инкубации фермента с пероксидом водорода в присутствии этанола дегидрогеназная активность ГАФД была на 41% ниже, чем в аналогичных экспериментах, где в роли восстанавливающего агента выступает силистронг (табл. 5). По способности восстанавливать активность модифицированной ГАФД силимарин уступал этанолу и еще значительнее - силистронгу. Таким образом, суммарный биологический эффект от действия этанола и силимарина на дегидрогеназную активность ГАФД ниже, чем при действии силистронга, что свидетельствует о взаимном потенцировании эффектов различных компонентов силистронга.

Таблица 5. Влияние этанола и пероксида водорода на активность нативной и модифицированной ГАФД из скелетных мышц кролика.

	Контроль	Этанол
Активность ГАФД после преинкубации с этанолом (Ед/мг)		
Исходные значения	22,21±1,78	23,19±2,53
Преинкубация с препаратом	-	26,20±1,27
Влияние пероксида водорода на активность ГАФД (Ед/мг) после преинкубации с этанолом		
1.Исходные значения	22,21±1,78	23,19±2,53*
2.Преинкубация с препаратом	-	26,20±1,27*
3. После действия пероксидом водорода	0	0,988±0,087*
Влияние этилового спирта на активность модифицированной пероксидом водорода ГАФД (Ед/мг)		
1.Исходные значения	22,21±1,78	23,19±2,53*
2.Активность модифицированного фермента	0	0
3.После инкубации с препаратом	-	1,28 ± 0,325*

Таблица 6. Влияние силимарина и пероксида водорода на активность нативной и модифицированной ГАФД мышц кролика.

	Контроль	Силимарин
Влияние силимарина на активность ГАФД (Ед/мг)		
Исходные значения	22,21±1,78	22,69±1,88
Преинкубация с препаратом	-	24,77±2,13
Влияние пероксида водорода на активность ГАФД (Ед/мг) после преинкубации с силимарином		
1.Исходные значения	22,21±1,78	22,69±1,88*
2. Преинкубация с препаратом	-	24,77±2,13*
3. После действия пероксидом водорода	0	0,719±0,192*
Влияние пероксида водорода на активность ГАФД (Ед/мг) после преинкубации с силимарином		
1.Исходные значения	22,21±1,78	22,69±1,88*
2.Активность модифицированного фермента	0	0
3.После инкубации с препаратом	-	0,706 ± 0,076*

Проведенные исследования показали, что силистронг повышает активность изолированной ГАФД, обеспечивая её восстановление как в случае преинкубации, так и при внесении реагентов после модифицирующего влияния окислителя, предупреждает потерю активности фермента. Этот факт, на наш взгляд, является весьма благоприятным, так как дегидрогеназная активность способствует нормальной работе гликолиза, позволяет работать 2,3–дифосфоглицератному шунту, обеспечивающего организм необходимым количеством 2,3–дифосфоглицерата, изменяющего сродство гемоглобина к кислороду, что поддерживает энергетические и пластические процессы в организме. Учитывая сопряженность функции цитоплазматических дегидрогеназ в рамках гликолитического метаболона и глицерофосфатного шунта, установленное в настоящей работе активирующее, протекторное влияние силистронга может способствовать увеличению утилизации глюкозы и других метаболитов в данном пути. Это открывает перспективы использования силистронга в качестве антигипоксанта, при коррекции измененного метаболизма в связи с нарушением баланса про- и антиоксидантных процессов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Фокина К.В., Языкова М.Ю., Даньшина П.В., Шмальгаузен Е.В., Муронец В.И.* (2000) Биохимия, **65**, 83-88.
2. *Harrison M.L., Rathinavelu P., Arese P.* (1991) J. Biol. Chem., **266**, 4106-4111.
3. *Schmalhausen E.V., Muronetz V.I.* (1997) Bioscience. Reports, **17**, 521-527.
4. *Galli F., Rovidatu S., Ghibaelli L.* (1998) Nitric Oxide, **2,** 17-27.
5. *Языкова М.Ю.* (2000) Журн. теоретич. и клин. медицины, **3,** 1-5.
6. *Sirover M.A.* (1999) Biochim. Biophys. Acta, **1432**, 159-184.
7. *Зиновьева В.Н., Спасов А.А.* (2004) Биомедицинская химия, **50**, 231-242.
8. *Tapiero H., Tew K.D., Ba G.N.* (2002) Biomed. Pharmacother., **56**, 200-207.
9. *Поройков В.В.* (1999) Химия в России, **2,** 8-12.
10. *Бабичев А.В., Баишева Г.М., Гильмиярова И.Е., Рыскина Е.А., Павлова И.О.* (2005) Материалы межрегиональной науч.-практич. конф. биохимиков, с. 41-45.
11. *Harris J.I., Waters M.* (1976) Enzymes N.Y., **13,** 1-4.
12. *Наградова Н.К.* (2001) Биохимия, **66,** 1323-1334.
13. *Языкова М.Ю., Муронец В.И.* (2001) Прикл. биохим. микробиол., **37**, 197-201.

Поступила:12. 04. 2006.

THE ROLE OF SMALL MOLECULES IN REGULATION OF ACTIVITY OF CYTOPLASMATIC DEHYDROGENASES

F.N. Gilmiyarova, V.M. Radomskaya, Yu.V. Myakisheva, G.M. Baisheva, Yu.V. Pervova, N.V. Spiridonova

Samara State Medical University, Russian Ministry of Public Health, Department of Basic and Clinical Biochemistry with Laboratory Diagnostics, ul. Chapaevskaya, 89, Samara, Russia 443099; tel./fax: 8(846) 332-91-82; e-mail: bio-sam@yandex.ru

The influence of silistrong on the activity of erythrocyte cytoplasmatic dehydrogenases and also purified glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was studied. Silistrong and its biologically active components (ethanol and silimarine) were found to activate GAPDH, lactate dehydrogenase (LDH), α-glycerophosphate dehydrogenase (GPDH) both in lysates of erythrocytes and in isolated GAPDH.

The compounds studied are able to protect these enzymes and also to restore their activity of enzymes modified by hydrogen peroxide. Maximal activity is a characteristic of silistrong.

Key words: silistrong, ethanol, silimarin, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, lactate dehydrogenase, α-glycerophosphate dehydrogenase.