

УДК 616.36:577.15
©Коллектив авторов

ИНТЕНСИВНОСТЬ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ И КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА NADP-ИЗОЦИТРАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ПЕЧЕНИ КРЫС В НОРМЕ И ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ

Е.М. Андреещева, Т.Н. Попова, В.Г. Артюхов, Т.И. Рахманова, Л.В. Матасова

Биолого-почвенный факультет Воронежского государственного университета,
394063 Воронеж, Университетская площадь, 1; факс: (0732)78-97-55;
эл. почта: tatiana@po.vsu.ru; kate@bio.vsu.ru

Определены параметры интенсивности свободнорадикального окисления и дана сравнительная характеристика каталитических свойств NADP-изоцитратдегидрогеназы (КФ 1.1.1.42; NADP-ИДГ) из печени крыс в норме и при токсическом гепатите. При патологии повышались: содержание диеновых конъюгатов, малонового диальдегида, показатели хемилюминесценции - светосумма, интенсивность максимальной вспышки, тангенс угла падения кинетической кривой. При токсическом гепатите увеличивалась активность NADP-ИДГ из печени крыс. С использованием гомогенных препаратов, выделенных из печени здоровых крыс и крыс с токсическим гепатитом, показано, что ионы Fe^{2+} и Ca^{2+} , H_2O_2 , восстановленный глутатион, оказывают ингибирующее действие, а цитрат и окисленный глутатион - активирующее влияние на NADP-ИДГ, выраженное в разной степени в норме и при патологии.

Ключевые слова: свободнорадикальное окисление, NADP-изоцитратдегидрогеназа, каталитические свойства, токсический гепатит.

ВВЕДЕНИЕ. В настоящее время считают, что ведущим патогенетическим фактором при развитии ряда заболеваний печени является дисбаланс между интенсивностью процессов свободнорадикального окисления (СРО) и функциональной активностью антиоксидантных систем (АОС) организма [1]. Основными механизмами активации СРО служат значительное увеличение выработки активных форм кислорода (АФК) и высвобождение ионов Fe^{2+} из вне- и внутриклеточных депо [2, 3]. Интенсивность СРО поддерживается на стационарном уровне сложной системой антиоксидантной защиты (АОЗ), важнейшим компонентом которой является система глутатионредуктаза/глутатионпероксидаза (ГР/ГП) [4]. Благодаря функционированию системы ГР/ГП в клетках млекопитающих обеспечивается детоксикация H_2O_2 , являющегося основным источником гидроксильного радикала, образующегося в присутствии Fe^{2+} в реакции Фентона [2, 5, 6]. Активность системы ГР/ГП в основном зависит от уровня NADPH в клетке, который является одним из продуктов реакции, катализируемой NADP-изоцитратдегидрогеназой (КФ 1.1.1.42; NADP-ИДГ), обеспечивающей окислительное декарбоксилирование изоцитрата до 2-оксоглутарата. [6]. Однако в настоящее время мало что известно об участии NADP-ИДГ в генерировании

NADP-ИЗОЦИТРАТДЕГИДРОГЕНАЗА ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ

NADPH для системы ГР/ГП. Предполагают возможность сопряжения функционирования NADP-ИДГ и ГР/ГП АОС в условиях ишемического повреждения миокарда крыс [7]. Об этом же свидетельствуют данные об активации NADP-ИДГ в тканях млекопитающих при ишемии и гипоксии различного генеза [8-11]. В ряде работ отмечается взаимосвязь между степенью стимуляции функционирования NADP-ИДГ и глубиной и длительностью ишемического воздействия [11, 12]. Таким образом, нельзя исключить, что в гепатоцитах NADP-ИДГ может быть альтернативным источником восстановительных эквивалентов для ГР/ГП ферментной системы, дополняющим уровень NADPH, обеспечиваемый пентозофосфатным путем, и возможно, также другими ферментативными системами. Участие NADP-ИДГ в регуляции уровня образования NADPH и сопутствующей активации системы ГР/ГП могло бы способствовать АОЗ от окислительного стресса, вызываемого развитием токсического гепатита. В этой связи целью настоящей работы является оценка интенсивности СРО и сравнительная характеристика каталитических и регуляторных свойств NADP-ИДГ в печени крыс в норме и при токсическом гепатите.

МЕТОДИКА. В качестве объекта исследования использовали самцов белых крыс массой 250-300 г (20 и 55 при оценке интенсивности СРО и 20 и 30 при получении высокоочищенных ферментных препаратов из печени контрольных и опытных животных соответственно). Экспериментальную модель токсического гепатита создавали при помощи гепатотропного токсина – CCl_4 [13]. Печень извлекали под кетаминевым наркозом после перфузирования ледяным физиологическим раствором [14].

Оценку интенсивности СРО в норме и при токсическом гепатите осуществляли методом биохемилюминесценции [15], а также путем спектрофотометрического определения содержания первичных и вторичных продуктов ПОЛ – диеновых конъюгатов (ДК) и малонового диальдегида (МДА) [16]. Активность NADP-ИДГ определяли спектрофотометрически при 340 нм в среде: 0,05 М трис-НСl-буфер (рН 7,6), содержащий 1,5 мМ изоцитрат, 2 мМ MnCl_2 , 0,2 мМ NADP. Активность фермента выражали в ферментативных единицах или в виде удельной активности. За единицу ферментативной активности (ФЕ) принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкмоль продукта реакции за 1 мин. при температуре 25°C. Очистка NADP-ИДГ включала следующие стадии: получение бесклеточного экстракта, фракционирование $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (35-70% насыщения), гель-фильтрацию на сефадексе G-25, ионообменную хроматографию на ДЭАЭЦ, гель-хроматографию на сефадексе G-150. Электрофорез проводили по методу Дэвиса. Полученные ферментные препараты использовали для сравнительного исследования каталитических свойств NADP-ИДГ в норме и при токсическом гепатите. Молекулярную массу фермента определяли с помощью гель-хроматографии на сефадексе G-150 и при помощи диск-электрофореза в ПААГ в присутствии SDS [17-19]. Определение типа и констант ингибирования и активации осуществляли методом Диксона [20]. Статистическую обработку результатов проводили с применением стандартных статистических методов [21].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Результаты определения содержания продуктов ПОЛ в цитоплазматической фракции печени крыс в норме и при токсическом гепатите представлены в таблице 1. В патологически измененной печени крыс выявлялся повышенный уровень ДК и МДА (в 2,2 и 6 раз соответственно). Параметры биохемилюминесценции – светосумма хемилюминесценции (S) и интенсивность максимальной вспышки (I_{max}), являющиеся показателями степени развития свободнорадикальных процессов, возрастали в цитоплазматической фракции в 2,2 и 1,7 раз в сравнении с нормой (табл. 1). Величина тангенса угла падения кинетической кривой $\text{tg}\alpha_2$, характеризующая АОА, возросла при патологии на 33%. Показатели хемилюминесценции, а также содержание продуктов ПОЛ в цитоплазматической

фракции печени крыс контрольной группы были существенно ниже, чем у крыс с токсическим гепатитом, и соответствовали значениям референтного интервала для данного вида экспериментальных животных [22], что указывает на отсутствие выраженного окислительного стресса в клетках печени крыс контрольной группы, в то время как у животных экспериментальной группы наблюдался выраженный окислительный стресс. Вместе с тем, показатели АОА в патологическом состоянии, превышающие соответствующие параметры хемилюминесценции в норме, указывают на мобилизацию АОС гепатоцитов на данной стадии развития токсического гепатита.

Таблица 1. Содержание продуктов пероксидного окисления липидов и параметры биохемилюминесценции в цитоплазматической фракции печени крыс в норме и при экспериментальном токсическом гепатите.

Группы животных	Диеновые конъюгаты, мкМ	Малоновый диальдегид, мкМ	Светосумма вспышки хемилюминесценции (S), мV•сек	Интенсивность вспышки (I_{max}), мV	Тангенс угла наклона ($tg \alpha_2$), мV•сек
Норма	6,30±	1,01±	19,28±	1,95±	3,09±
	0,31	0,05	0,96	0,09	0,15
Токсический гепатит	13,20±	6,03±	41,38±	3,32±	4,12±
	0,66*	0,30*	2,06*	0,16*	0,20*

Примечание: представлены средние значения из n=20 (±ошибка средней) в норме и n=55 (±ошибка средней) при токсическом гепатите; * - отличия от нормы достоверны (уровень значимости – 0,005<p<0,05).

Активность NADP-ИДГ в цитоплазме клеток печени, поражённой токсическим гепатитом, увеличивалась в среднем на 30% по сравнению с нормой. В результате 131- и 127-кратной очистки из печени крыс контрольной и опытной групп были получены ферментные препараты цитоплазматической NADP-ИДГ с удельными активностями 69,5 и 92,5 ФЕ на 1 мг белка соответственно (табл. 2). После электрофореза NADP-ИДГ из печени опытных и контрольных животных выявлялись в виде одной полосы с электрофоретической подвижностью, $R_f \sim 0,55$; минорные компоненты не были обнаружены (рис. 1), молекулярные массы NADP-ИДГ также имели одинаковую величину - 113 ± 2 кДа. Молекулярная масса цитоплазматической NADP-ИДГ из печени крыс, определённая при помощи электрофореза в ПААГ в присутствии SDS, составила 56 ± 2 кДа, что позволяет сделать предположение о димерной субъединичной структуре фермента. Значения K_M NADP-ИДГ, определённые методом двойных обратных координат, по изоцитрату составили 0,120 и 0,100 мМ, по NADP 0,150 и 0,060 мМ в норме и при токсическом гепатите, соответственно. Цитрат оказывал активирующий эффект на функционирование NADP-ИДГ, значения K_a составили 0,235 и 0,147 мМ для фермента в норме и при патологии соответственно (рис. 2). Существует предположение, что возрастание концентрации цитрата при интенсификации образования АФК может иметь протекторное значение, связанное с хелатирующими свойствами данного соединения по отношению к ионам Fe^{2+} ,

NADP-ИЗОЦИТРАТДЕГИДРОГЕНАЗА ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ

необходимым для протекания реакции Фентона [7]. Полученные нами данные указывают, что цитрат, являясь активатором NADP-ИДГ, может способствовать также повышению антиоксидантного потенциала за счет возрастания уровня NADPH, существенно определяющего активность ферментной системы ГР/ГП.

Таблица 2. Очистка цитоплазматической NADP-зависимой изоцитратдегидрогеназы из печени крыс в норме и при токсическом гепатите.

Стадия очистки	Группы животных	Объем фракции, мл	Количество белка, мг	Удельная активность, ФЕ/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Цитоплазматическая фракция	норма	16,0	70,30±3,52	0,53±0,02	(100)	(1)
	патология	18,0	59,41±2,97	0,73±0,04*		
Фракционирование (NH ₄) ₂ SO ₄	норма	3,1	5,26±0,26	3,23±0,16	45,6	6,1
	патология	3,5	5,42±0,27	3,79±0,18*	47,4	5,2
Гель-фильтрация на сефадексе G-25	норма	9,0	4,15±0,20	3,87±0,19	43,1	7,3
	патология	8,5	4,09±0,20	4,67±0,23*	44,1	6,4
Ионообменная хроматография на ДЭАЭЦ	норма	10,8	0,48±0,02	27,34±1,36	35,2	51,6
	патология	10,1	0,48±0,02	34,67±1,73*	38,2	47,5
Гель-хроматография на сефадексе G-150	норма	6,7	0,05±0,002	69,53±3,47	9,8	131,2
	патология	6,2	0,05±0,002	92,49±4,62*	11,1	126,7

Примечание: представлены средние значения из n=20 (±ошибка средней) в норме и n=30 (±ошибка средней) при токсическом гепатите; * - отличия от нормы достоверны (уровень значимости – 0,005<p<0,05).

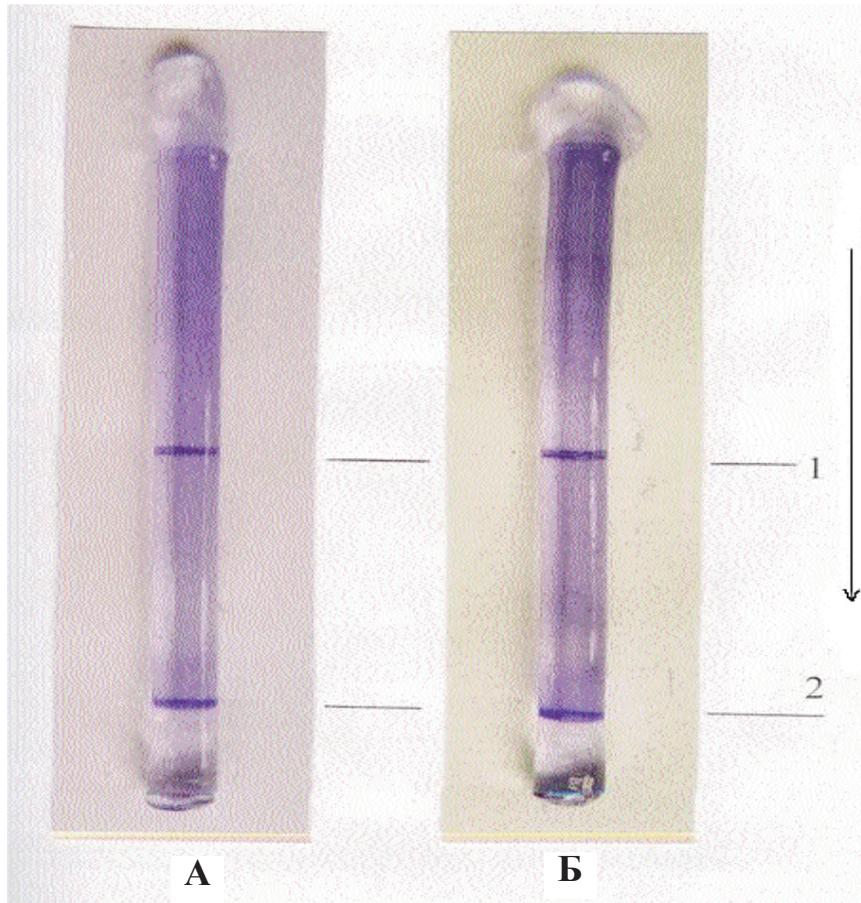


Рисунок 1.

Электрофореграмма ферментных препаратов NADP-изоцитратдегидрогеназы из печени здоровых (а) и подвергнутых экспериментальному токсическому гепатиту (б) крыс: NADP-изоцитратдегидрогеназа (1); маркерная зона (бромфеноловый синий) (2). Направление движения белка указано стрелкой.

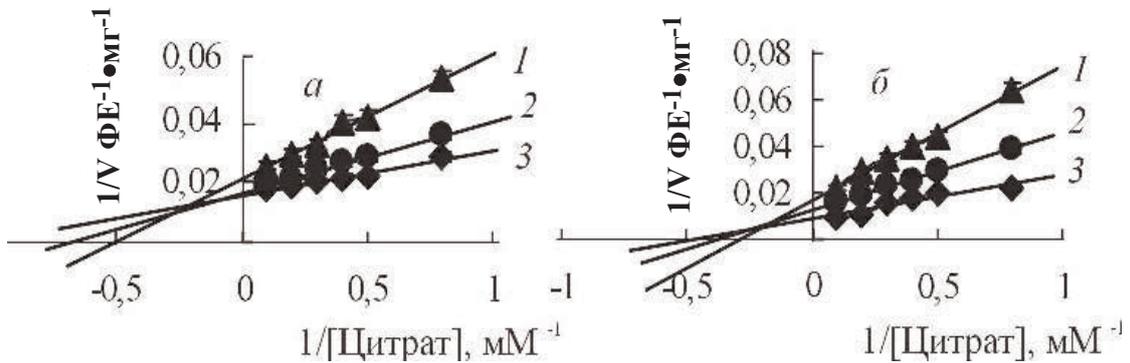


Рисунок 2.

Определение типа и констант активации цитоплазматической NADP-изоцитратдегидрогеназы из печени крыс цитратом в норме (а) и при экспериментальном токсическом гепатите (б) при фиксированных концентрациях изоцитрата: 1 - 0,5 мМ; 2 - 1 мМ; 3 - 1,5 мМ.

NADP-ИЗОЦИТРАТДЕГИДРОГЕНАЗА ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ

Исследование влияния компонентов реакции Фентона на функционирование NADP-ИДГ в клетках печени в норме и при окислительном стрессе, вызванном токсическим гепатитом, показало, что ионы Fe^{2+} оказывали значительный ингибирующий эффект неконкурентного типа, причем более сильное воздействие наблюдалось в норме (величины K_i представлены в табл. 3). Пероксид водорода ингибировал фермент по смешанному типу, величина K_i при токсическом гепатите была больше (табл. 3). Сравнительная характеристика регуляторных свойств NADP-ИДГ, выделенной из нормальной и пораженной токсическим гепатитом печени, по отношению к компонентам системы ГР/ГП показала, что для фермента характерны также существенные изменения регуляции активности под действием восстановленного и окисленного глутатиона (GSH и GSSG соответственно). При патологии K_i для GSH, являющегося конкурентным ингибитором NADP-ИДГ по отношению к изоцитрату, снижалась в 1,8 раза (табл. 3). Вместе с тем, GSSG активировал фермент из печени крыс с токсическим гепатитом по конкурентному типу ($K_a=0,232$ мМ, рис. 3) и не оказывал воздействия в норме. По-видимому, это может иметь значение для снабжения NADPH ГР/ГП АОС при окислительном стрессе. Очевидно, при достаточно высоком уровне GSH в клетке происходит подавление окислительного декарбоксилирования изоцитрата, сопровождающегося образованием NADPH, необходимого для глутатионредуктазной реакции. В то же время, при относительном возрастании содержания GSSG имеет место усиление генерирования NADPH в ходе NADP-ИДГ-реакции, что может быть существенно для активации ГР/ГП-системы в условиях усиления СРО. Было также исследовано влияние ионов Ca^{2+} , играющих, как известно, существенную роль в метаболических сдвигах при окислительном стрессе и процессах СРО [7, 23, 24]. Ингибирующее действие этих ионов, характеризующееся неконкурентным типом, было выражено в меньшей степени при токсическом гепатите, чем в норме (табл. 3).

Таблица 3. Константы ингибирования K_i и тип ингибирования цитоплазматической NADP-изоцитратдегидрогеназы некоторыми ингибиторами в норме и при экспериментальном токсическом гепатите.

Ингибитор	Константа ингибирования K_i , мМ		Тип ингибирования по отношению к изоцитрату
	Норма	Токсический гепатит	
Fe^{2+}	0,067±0,003	0,093±0,004*	неконкурентное
Ca^{2+}	0,252±0,012	0,357±0,017*	неконкурентное
H_2O_2	0,530±0,026	1,020±0,051*	смешанное
GSH	0,762±0,038	0,430±0,021*	конкурентное

Примечание: представлены средние значения из n=8 (±ошибка средней) в норме и n=10 (±ошибка средней) при токсическом гепатите; * - отличия от нормы достоверны (уровень значимости – 0,005<p<0,05).

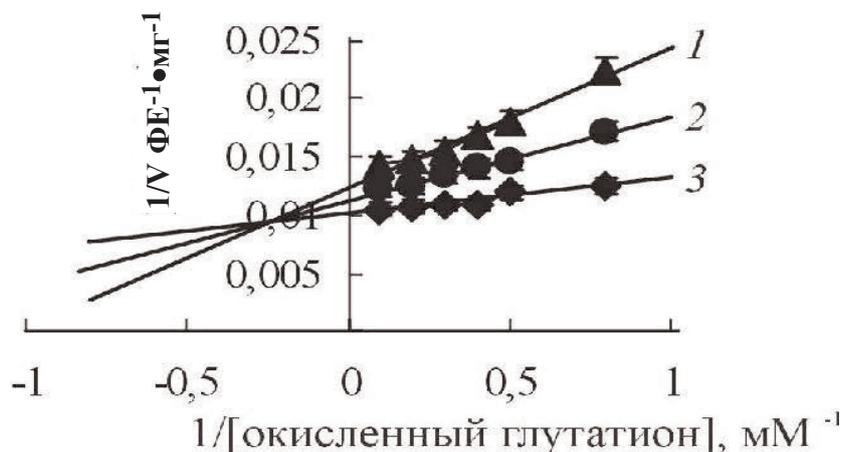


Рисунок 3.

Определение типа и константы активации NADP-изоцитратдегидрогеназы из печени крысы окисленным глутатионом при фиксированных концентрациях изоцитрата: 1 - 0,5 мМ; 2 - 1 мМ; 3 - 1,5 мМ при экспериментальном токсическом гепатите.

Таким образом, функционирование цитоплазматической NADP-ИДГ в условиях окислительного стресса характеризуется некоторыми отличиями регуляторных свойств фермента. По-видимому, это сопряжено с изменением активности NADP-ИДГ в условиях активации СРО, что может иметь значение для генерирования NADPH для ГР/ГП АОС.

Работа поддержана грантом министерства образования и науки РФ по программе “Развитие научного потенциала высшей школы” РНП 2.1.1.4429.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Пескин А.В. (1999) Русский мед. журнал, **5**, 13-15.
2. Осипов А.Н., Азизова О.А., Владимиров Ю.А. (1990) Успехи биол. химии, **31**, 180-208.
3. Владимиров Ю.А. (2000) Соросовский образовательный журнал, **6**, 13-19.
4. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. (1972) Перекисное окисление липидов в биологических мембранах, М.: Наука.
5. Oshino N., Chance B. (1977) Biochem. J., **162**, 509-525.
6. Skulachev V.P. (1997) Bioscience Reports, **17**, 347-366.
7. Медведева Л.В., Попова Т.Н., Артюхов В.Г. и др. (2002) Биохимия, **67**, 838-849.
8. Gromek A., Pastuszko A. (1977) J. Neurochem., **28**, 429-433.
9. Jonadet M., Turchini J. Villie F. (1976) C. R. Sean. Soc. Biol. Fil., **170**, 375-382.
10. Penny J.E., Kukumus J.R., Tyrer J.H. et al. (1975) J. Neurol. Sci., **26**, 187-192.
11. Weber K., Scheuch D.W., Wolf H. (1977) J. Med. Laborat. Diagn., **18**, 285-299.
12. Falholt K., John K., Lund B. et al. (1974) J. Mol. Cell. Cardiol., **6**, 349-359.
13. Сидорова В.Ф., Рябинина З.А. (1966) Регенерация печени у млекопитающих, М.: Медицина.
14. Федорова Н.Ю. (1999) Состояние системы глутатионпероксидазы-глутатионредуктазы в стимулированном к регенерации органе и ее роль в клеточной пролиферации. Дисс. канд. биол. наук. Воронеж.
15. Кузьменко А.И., Морозова Р.П., Николенко И.А. и др. (1997) Биохимия, **62**, 712-715.
16. Стальная И.Д., Гаршивили Т.Г. (1977) Современные методы в биохимии, М.: Медицина, с. 63-68.

NADP-ИЗОЦИТРАТДЕГИДРОГЕНАЗА ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ

17. *Мауэр Г.* (1971) Диск. электрофорез, М.: Мир.
18. *Kulkarni A.P., Mehrotra K.N.* (1970) *Anal. Biochem.*, **38**, 285-288.
19. *Laemmli V.K.* (1970) *Nature*, **227**, 680-685.
20. *Dixon M., Webb E.C.* (1979) *Enzymes*. New York: Acad. Press Inc.
21. *Ллойд Э., Ледерман У.* (1990) Справочник по прикладной статистике, М.: Финансы и статистика.
22. *Меерсон Ф.З.* (1984) Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца, М.: Медицина.
23. *Jenios G., Sadler J., Stevenson P.* (1990) *Biochim. Biophys. Acta*, **1034**, 219-227.
24. *Rafalowska U., Pastuszko A., Gromek A.* (1974) *FEBS Lett.*, **42**, 20-22.

Поступила: 26. 06. 2003.

THE INTENSITY OF FREE RADICAL OXIDATION AND CATALYTIC PROPERTIES OF RAT LIVER NADP-ISOCITRATE DEHYDROGENASE IN THE NORM AND TOXIC HEPATITIS

E.M. Andreescheva, T.N. Popova, V.G. Artyukhov, T.I. Rakhmanova, L.U. Matasova

Voronezh State University, Universitetskaya pl., 1, Voronezh, 394063 Russia; fax: (0732) 78-97-55;
e-mail: tatiana@po.vsu.ru; kate@bio.vsu.ru

Parameters of hepatic free radical oxidation and catalytic properties of NADP-isocitrate dehydrogenase (EC 1.1.1.42; NADP-IDH) have been investigated in normal rats and under conditions of toxic hepatitis. Development of hepatitis was accompanied by the increase of conjugated dienes, malondialdehyde and some chemiluminescence parameters. Toxic hepatitis was also accompanied by the increase of liver NADP-IDH. Homogenous preparations of liver NADP-IDH from normal and toxic rats exhibited different sensitivity to effectors studied (Fe^{2+} , Ca^{2+} , H_2O_2 , reduced glutathione).

Key words: free radical oxidation, NADP-isocitrate dehydrogenase, catalytic properties, toxic hepatitis.