

УДК 577.152.1: 616.36 - 002

©Коллектив авторов

РЕГУЛЯТОРНЫЕ СВОЙСТВА ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ ПЕЧЕНИ КРЫС В УСЛОВИЯХ ИНТЕНСИФИКАЦИИ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ

М.В. Левенкова, Т. Н. Попова, А.В. Семенихина

Воронежский государственный университет, биолого-почвенный факультет, кафедра аналитической и медицинской биохимии и микробиологии, 394693 Воронеж, Университетская пл., 1; тел.: (0732) 20-82-78; факс: (0732) 20-87-55; эл. почта: semenikhina@bio.vsu.ru

Проведена оценка интенсивности протекания процессов свободнорадикального окисления в динамике развития токсического гепатита. Показано, что развитие окислительного стресса в печени крыс при патологии сопряжено с увеличением активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.49; Г6ФДГ). В результате 108,8 и 100,4-кратной очистки получены электрофоретически гомогенные препараты Г6ФДГ с удельной активностью 4,133 и 6,529 ФЕ/мг белка в норме и при токсическом гепатите соответственно. Ионы Fe^{2+} и ионы Cu^{2+} оказывают ингибирующее влияние неконкурентного типа на фермент в норме и при патологии, ионы Ca^{2+} - активируют Г6ФДГ. Пероксид водорода ингибирует фермент по смешанному типу (K_i 0,36 мМ и 0,95 мМ в норме и при экспериментальном токсическом гепатите соответственно). Показано участие окисленного и восстановленного глутатиона в регуляции активности Г6ФДГ.

Ключевые слова: крысы, печень, свободнорадикальные процессы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, регуляция активности.

ВВЕДЕНИЕ. К настоящему времени установлено, что свободнорадикальное окисление (СРО) способствует уничтожению отживших клеток, элиминации ксенобиотиков, предупреждает злокачественную трансформацию клеток, моделирует энергетические процессы за счет воздействия на активность дыхательной цепи в митохондриях, пролиферацию и дифференциацию клеток, транспорт ионов, участвует в регуляции проницаемости клеточных мембран, в разрушении поврежденных хромосом, в обеспечении действия инсулина [1, 2]. В то же время интенсификация свободнорадикальных (СР) процессов является одним из ведущих механизмов клеточной патологии, лежащей в основе многих болезней, включая сердечно-сосудистые заболевания, различные злокачественные процессы, аутоиммунные болезни, хронические воспаления, нейродегенеративные заболевания и другие [3]. Контроль за интенсивностью протекания СР процессов осуществляется многоуровневой антиоксидантной системой, важное место в которой отводится глутатионредуктазной/глутатионпероксидазной (ГР/ГП) антиоксидантной системе (АОС), осуществляющей детоксикацию пероксида водорода с помощью восстановленного глутатиона под действием

глутатионпероксидазы [4]. Скорость образования восстановленного глутатиона в сопряженной реакции, катализируемой глутатионредуктазой, зависит в основном от уровня NADPH [5]. Предполагается, что одним из основных поставщиков NADPH, необходимого для работы данной системы являются дегидрогеназы пентозофосфатного пути (ПФП), и, в частности, ключевой фермент ПФП – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г6ФДГ; КФ 1.1.1.49). В связи с этим представляет интерес исследование функционирования Г6ФДГ в условиях активации процессов СРО, наблюдаемых при экспериментальном токсическом гепатите (ЭТГ).

МЕТОДИКА. В качестве объекта исследования использовали самцов белых лабораторных крыс (*Rattus rattus* L.) массой 250-300 г. Экспериментальную модель токсического гепатита воспроизводили путем введения в пищевод гепатотоксина CCl_4 (доза - 0,064 мл на 100 г веса животного) в вазелиновом масле после суточной пищевой депривации. Печень у животных извлекали под кетаминным наркозом после многократного перфузирования ледяным физиологическим раствором. Активность фермента определяли спектрофотометрически на СФ-56 при 340 нм в среде следующего состава: 50 мМ трис-НСl буфер (рН 7,8), содержащий 3 мМ глюкозо-6-фосфат, 1 мМ MgCl_2 , 0,25 мМ NADPH. О скорости протекания реакции судили по восстановлению NADPH в ходе катализируемого ферментом превращения глюкозо-6-фосфата в 6-фосфоглюконолактон. За единицу активности принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкмоль продукта за 1 мин при 25°C. Активность фермента выражали в ФЕ на 1 мг белка. Содержание белка определяли по методу Лоури и др. [6].

Оценку интенсивности протекания СР процессов в гомогенате печени здоровых крыс и животных с ЭТГ осуществляли методом Fe-индуцированной биохемилюминесценции [7]. Определение содержания диеновых конъюгатов (ДК) осуществляли спектрофотометрически в экстрагированной гептановой фазе липидов при 233 нм [8]; малонового диальдегида (МДА) – по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой при 532 нм [9].

Очистка Г6ФДГ из гепатоцитов крыс включала несколько этапов. Навеску ткани печени гомогенизировали в 4-кратном объеме среды выделения следующего состава: 50 мМ трис-НСl буфер (рН 7,8), содержащий 1 мМ ЭДТА, 1% β-меркаптоэтанол. Гомогенат фильтровали и центрифугировали при 3000 g в течении 10 мин. Осадок отбрасывали, а надосадочную жидкость вновь центрифугировали при 15000 g в течении 15 мин. Полученный супернатант фракционировали с помощью сульфата аммония, выделяя фракцию, выпадающую в осадок в пределах насыщения $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 35-70%. Полученный осадок ресуспендировали в 1 мл среды выделения. Освобождение белковой смеси от низкомолекулярных примесей осуществляли с помощью гель-фильтрации через колонку с сефадексом G-25. В качестве элюирующей среды для Г6ФДГ использовали 10 мМ трис-НСl буфер (рН 7,8), содержащий 1% β-меркаптоэтанол и 0,5 мМ ЭДТА. Скорость элюции составляла 20-25 мл/час, ее регулирование осуществлялось путем изменения гидростатического давления. Каждую фракцию объемом 2-3 мл анализировали на присутствие ферментативной активности. Фракции, обладающие максимальной ферментативной активностью, объединяли и использовали для дальнейшей очистки. Обессоленный раствор фермента наносили на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой, уравновешенную буфером, используемым в ходе очистки на предварительной стадии. Для очистки Г6ФДГ использовали ступенчатый градиент концентраций KCl в элюирующем буфере. Десорбция Г6ФДГ из печени контрольных животных происходила в диапазоне концентраций KCl 150-200 мМ, а фермента, выделенного из пораженной токсическим гепатитом печени, в градиенте концентраций KCl 100-150 мМ, что свидетельствует о различиях в хроматографических свойствах исследуемого фермента. Завершающий этап очистки представлял собой гель-хроматографию на сефадексе G-150. Электрофорез проводили в полиакриламидном геле (ПААГ). Контроль гомогенности фермента осуществляли по Дэвису [10].

Опыты проводили в 3-4-кратной биологической повторности, аналитические определения для каждой пробы – в 2-кратной повторности. Данные обрабатывали с использованием стандартных статистических методов [11]. Определение типа и констант ингибирования осуществляли методами Диксона и Корниш-Боуден [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Оценка интенсивности протекания процессов СРО в печени крыс в динамике развития токсического гепатита по таким показателям, как светосумма вспышки хемилюминесценции (S) и интенсивность максимальной вспышки (I_{\max}) показала, что при токсическом гепатите происходит возрастание уровня протекания СР процессов в печени крыс по сравнению с нормой, наблюдаемое уже на первые сутки после введения гепатотоксина (таблица). На четвертые сутки развития ЭТГ величины S и I_{\max} возрастают в 3,7 и в 2,3 раза соответственно, что свидетельствует о значительной интенсификации процессов СРО в пораженном органе. Следует отметить, что в ответ на активацию СР процессов происходит постепенная мобилизация защитных систем организма, о чем свидетельствует повышение тангенса угла падения кинетической кривой ($\operatorname{tg}\alpha_2$) – показателя, характеризующего антиоксидантный статус клетки. На четвертые сутки развития ЭТГ $\operatorname{tg}\alpha_2$ возрастает на 37,2%. Однако, стимуляция действия компенсаторных механизмов, направленных на снижение уровня СРО в клетке, оказывается недостаточной, что приводит к развитию окислительного стресса в печени крысы. Это подтверждается исследованием содержания первичных и вторичных продуктов пероксидного окисления липидов (ПОЛ) – ДК и МДА в ходе развития токсического гепатита. Отмечена корреляция между интенсификацией СР процессов, сопровождающихся накоплением продуктов ПОЛ, длительностью токсического гепатита и активностью Г6ФДГ. После введения гепатотоксина содержание ДК и МДА в пораженном органе возрастало в 1,2 и в 1,4 раза соответственно уже на первые сутки развития ЭТГ, в то же время наблюдалось постепенное увеличение активности Г6ФДГ на 123,8% (рис. 1). Возрастание содержания ДК и МДА в 2,9 и в 3,0 раза на четвертые сутки развития токсического гепатита сопряжено с увеличением активности Г6ФДГ почти на 170 %.

Таблица. Параметры хемилюминесценции в гепатоцитах крыс в норме и при развитии экспериментального токсического гепатита.

Условия опыта	Светосумма вспышки хемилюминесценции (S)	Интенсивность вспышки (I_{\max})	Тангенс угла падения кинетической кривой ($\operatorname{tg}\alpha_2$)
норма	9,640 ± 0,482	1,230 ± 0,061	0,306 ± 0,015
1 день развития ЭТГ	11,867 ± 0,593*	1,304 ± 0,065*	0,313 ± 0,015*
2 день развития ЭТГ	17,440 ± 0,842*	1,431 ± 0,071*	0,324 ± 0,016*
3 день развития ЭТГ	33,140 ± 1,657*	2,700 ± 0,135*	0,346 ± 0,017*
4 день развития ЭТГ	35,790 ± 1,789*	2,850 ± 0,142*	0,420 ± 0,021*

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

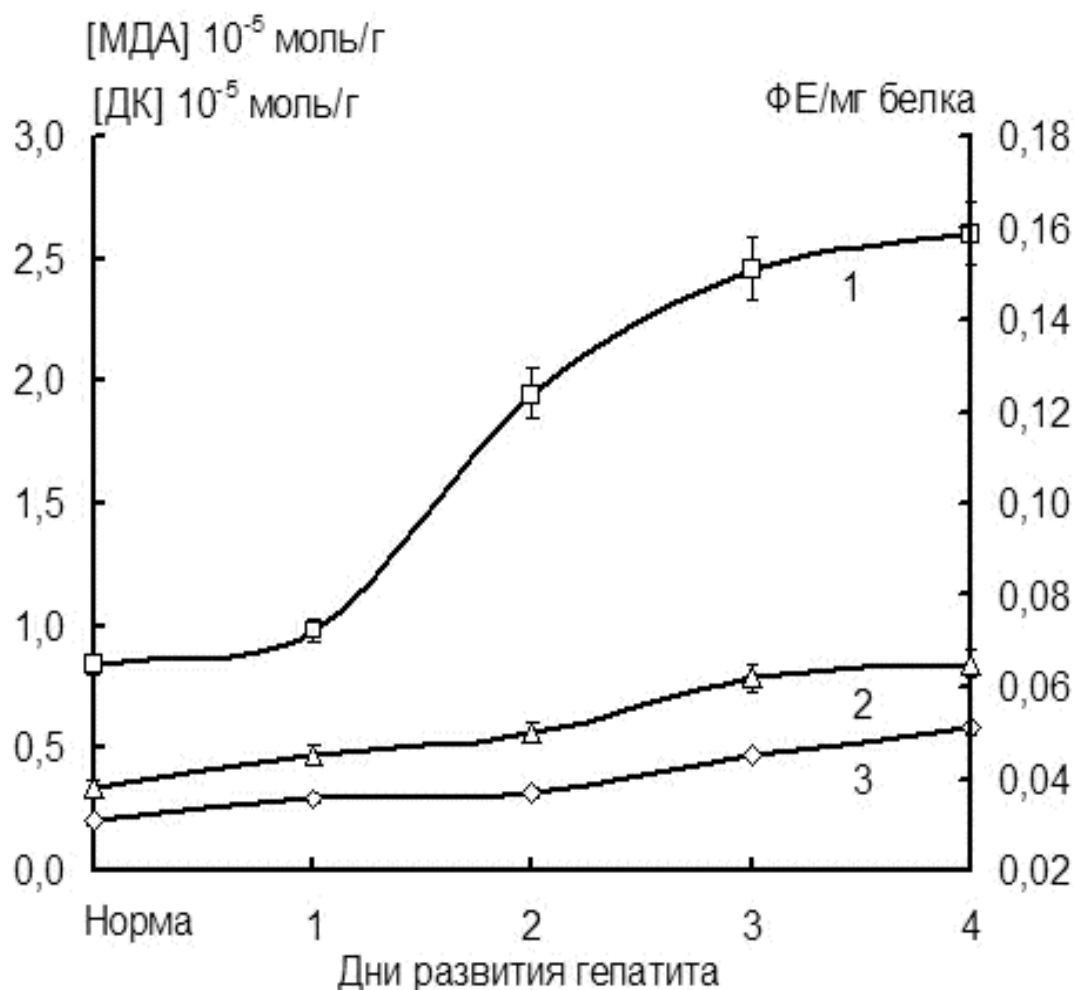


Рисунок 1.

Содержание продуктов ПОЛ и активность Г6ФДГ в гепатоцитах крысы в динамике развития токсического гепатита: 1 - ДК; 2 - активность Г6ФДГ; 3 - МДА

Вероятно, наблюдаемое при патологии увеличение активности этого фермента может иметь значение для работы ГР/ГП АОС, использующей NADPH для восстановления глутатиона.

В результате очистки были получены очищенные в 108,8 и 100,4 раз препараты Г6ФДГ из печени контрольных и подвергнутых ЭТГ крыс с удельной активностью 4,13 и 6,53 ФЕ/мг белка соответственно. Выход составил 8,24 и 8,31%.

Электрофорез в ПААГ свидетельствует о том, что ферментные препараты из печени контрольных и подвергнутых ЭТГ крыс, полученные после гель-хроматографии на сефадексе G-150, во фракциях с максимальной активностью гомогенны. Значения Rf для нормы и патологии совпадают и составляют 0,63.

Полученные ферментные препараты использовали при исследовании каталитических свойств фермента.

Молекулярная масса Г6ФДГ из печени контрольных и пораженных гепатотоксином крыс, определенная с помощью гель-хроматографии на сефадексе G-150, составила $72,5 \pm 3$ кДа. Сходные величины молекулярных масс имеет фермент из эритроцитов человека (60 кДа) [13], листьев петрушки *Petroselinum hortense* (79,3 кДа) [14], из хрусталика глаза быка (62 кДа) [15].

В связи со значительной ролью таких ионов, как Fe^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} в развитии процессов СРО, на очищенных ферментных препаратах было проведено исследование влияния данных ионов на функционирование Г6ФДГ, выделенной из печени контрольных крыс и крыс, подвергшихся воздействию ЭТГ. Установлено, что ионы Fe^{2+} оказывают ингибирующее влияние неконкурентного типа на исследуемый фермент как в условиях нормы, так и при ЭТГ, причем степень ингибирования выше для Г6ФДГ из пораженной гепатотоксином печени. Полученные значения K_i составили 1,4 мМ в норме и 0,5 мМ при патологии, что свидетельствует о большей чувствительности фермента к ингибирующему действию данных ионов при гепатите. Результаты исследования влияния ионов Cu^{2+} , участвующих в индукции процессов ПОЛ на стадии разветвления цепи показали, что ионы Cu^{2+} оказывают ингибирующее влияние неконкурентного типа на фермент в норме и при токсическом гепатите. При токсическом гепатите K_i увеличивается в 2,2 раза. Ионы Ca^{2+} также могут принимать участие в регуляции активности Г6ФДГ (рис. 2). Данные ионы активируют Г6ФДГ в норме и при ЭТГ во всем диапазоне исследуемых концентраций. Наибольший активирующий эффект наблюдается при концентрации ионов Ca^{2+} в среде 0,1 мМ в норме и 0,4 мМ при токсическом гепатите. При этом активность фермента увеличивается на 24% и 30,1% соответственно от исходного уровня. При повышении концентрации ионов от 1,0 до 2,0 мМ активность фермента снижается, но остается выше исходного уровня.

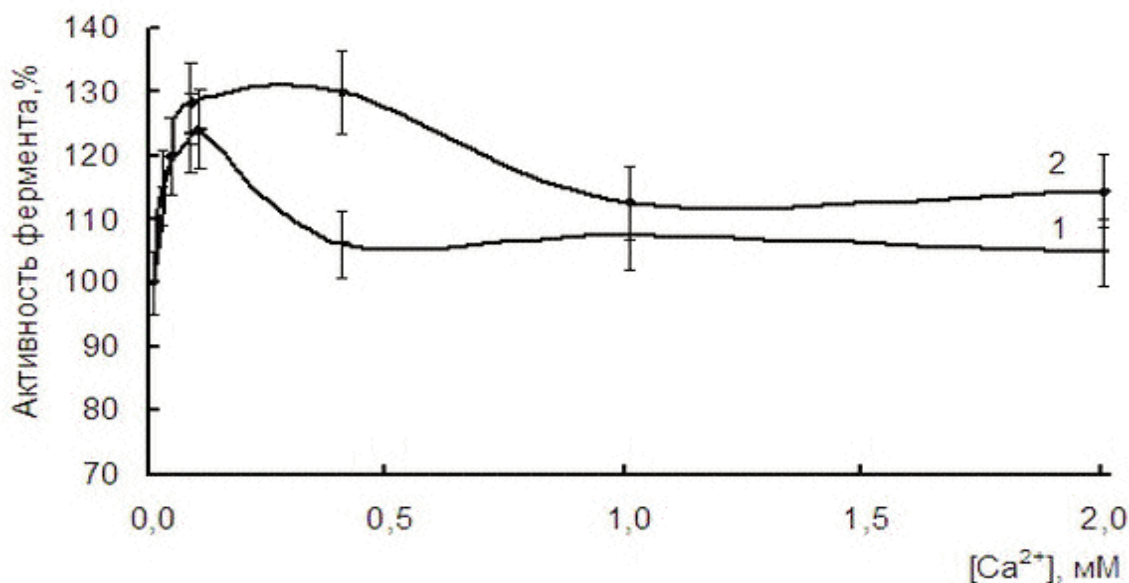


Рисунок 2.

Влияние ионов Ca^{2+} на активность Г6ФДГ из печени контрольных (1) и подвергнутых ЭТГ (2) крыс.

Результаты исследования воздействия пероксида водорода — предшественника наиболее агрессивной АФК (гидроксильного радикала) на активность Г6ФДГ показали, что пероксид водорода ингибирует фермент по смешанному типу с K_i 0,36 мМ и 0,95 мМ в норме и при патологии соответственно (рис. 3). При токсическом гепатите степень ингибирования Г6ФДГ значительно меньше по сравнению с нормой. Снижение чувствительности исследуемого фермента к действию пероксида водорода, наблюдаемое при ЭТГ, вероятно, может способствовать повышению активности Г6ФДГ в условиях интенсификации свободнорадикальных процессов, в связи с необходимостью возрастания темпов обеспечения ГР/ГП системы гепатоцитов NADPH.

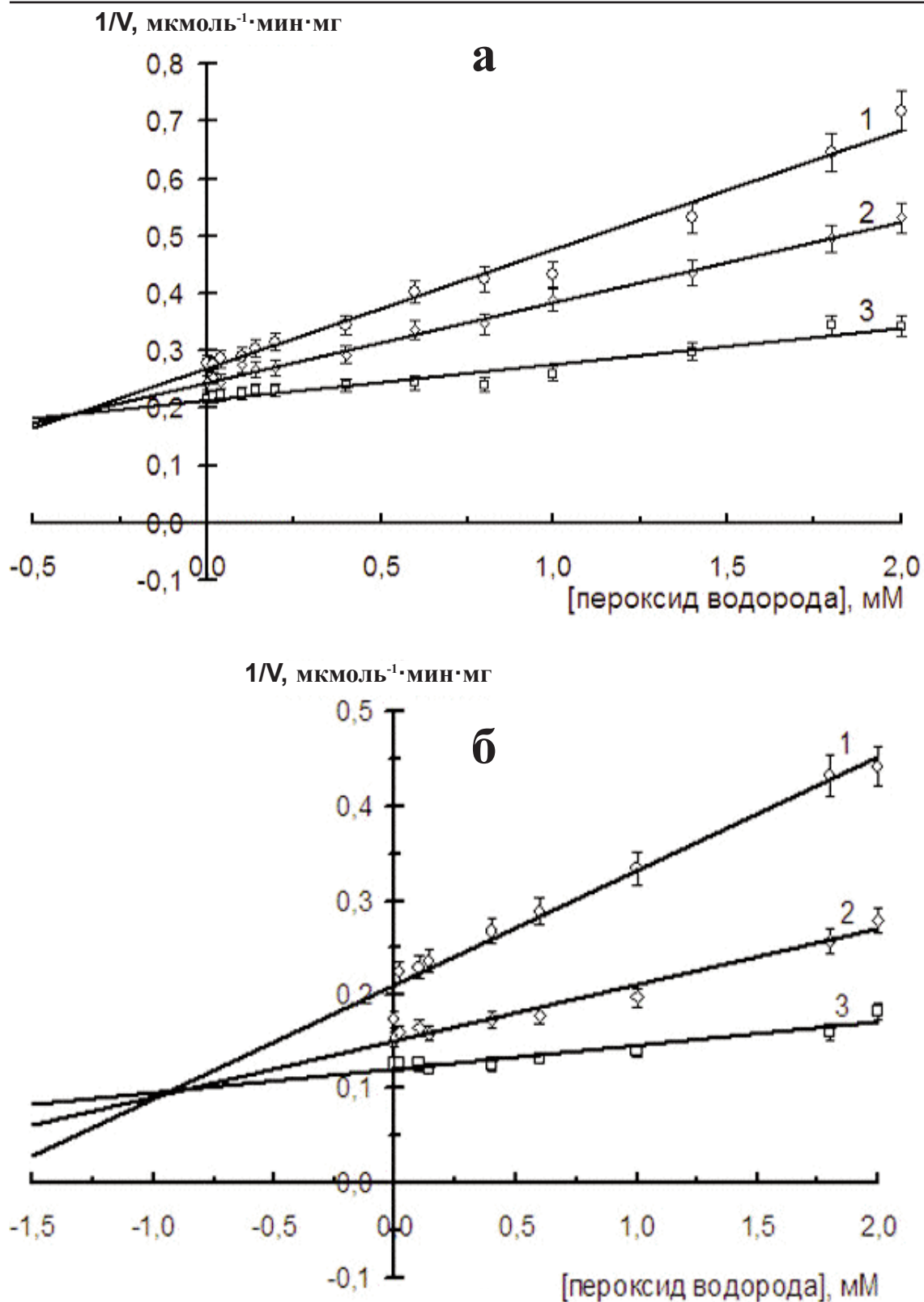


Рисунок 3.

Определение типа и константы ингибирования Г6ФДГ из печени контрольных (а) и подвергнутых ЭТГ (б) крыс пероксидом водорода по методу Диксона при концентрациях глюкозо-6-фосфата: 1 - 1,5 mM; 2 - 3,0 mM; 3 - 4,5 mM.

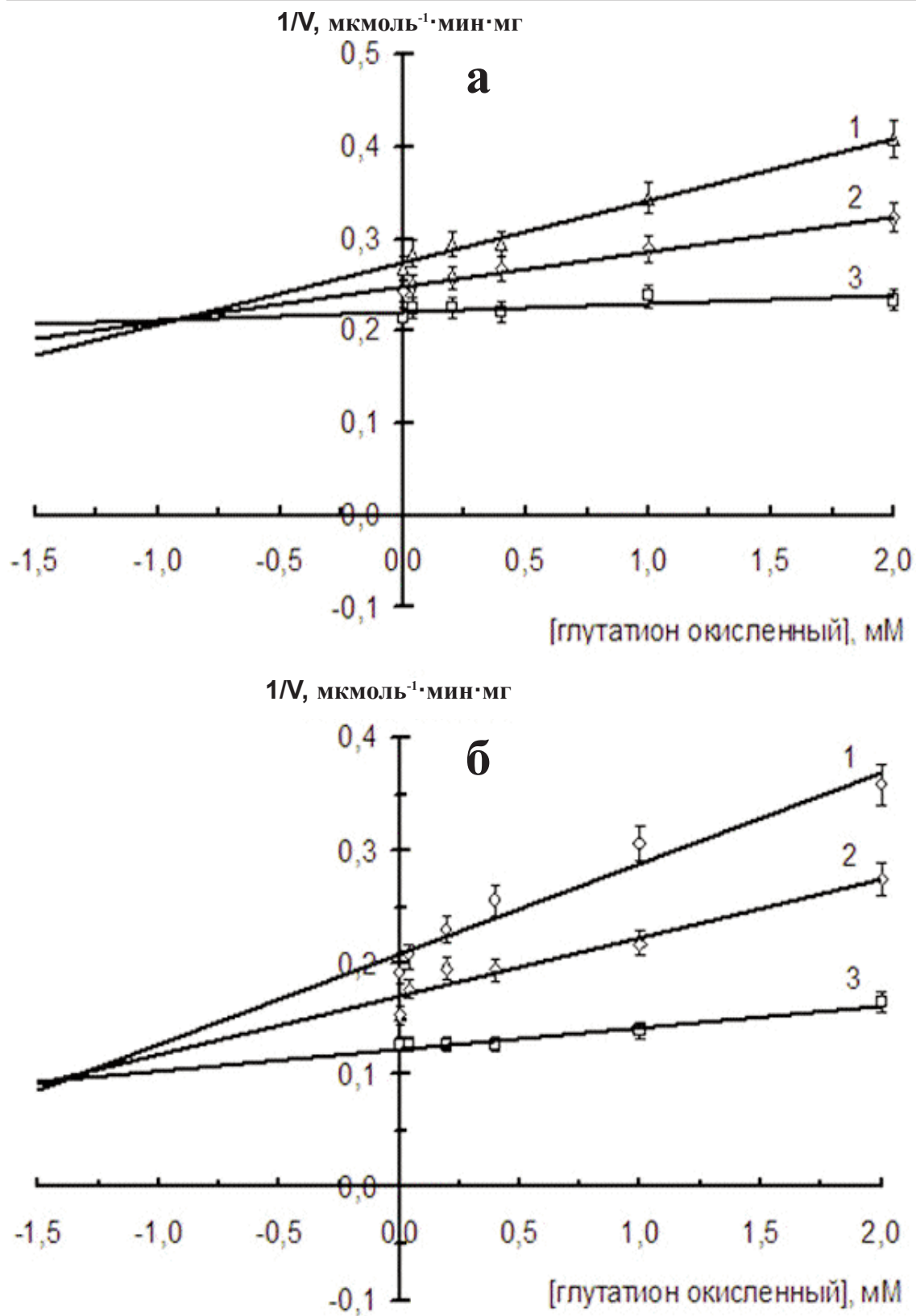


Рисунок 4.

Определение типа и константы ингибирования Г6ФДГ из печени контрольных (а) и подвергнутых ЭТГ (б) крыс окисленным глутатионом по методу Диксона при концентрациях глюкозо-6-фосфата: 1 - 1,5 мМ; 2 - 3,0 мМ; 3 - 4,5 мМ.

Согласно полученным результатам, в норме восстановленный глутатион оказывает ингибирующее действие смешанного типа ($K_i = 1,2$ мМ) на фермент. Для фермента из патологически измененной печени наблюдается активация под воздействием восстановленного глутатиона, причем наибольшее повышение активности Г6ФДГ наблюдается при низких концентрациях данного соединения (от 0,02 мМ до 0,2 мМ).

Окисленный глутатион оказывает ингибирующее воздействие смешанного типа на активность фермента, выделенного из печени контрольных и подвергнутых гепатиту крыс (рис. 4). В условиях активации процессов СРО, наблюдаемых при токсическом гепатите, ингибирующее действие данного метаболита значительно уменьшается, о чем свидетельствует возрастание K_i в 1,64 раз. Повышение устойчивости Г6ФДГ к ингибирующему влиянию окисленного глутатиона может иметь значение для активации данного фермента в патологическом состоянии. По-видимому, регуляция активности Г6ФДГ под действием различных форм глутатиона может иметь значение для сопряжения работы данного фермента с функционированием ГР/ГП АОС.

В результате проведенного исследования установлено, что при развитии токсического гепатита наблюдается постепенная интенсификация процессов СРО, сопровождаемая накоплением первичных и вторичных продуктов ПОЛ. Одновременно, в ответ на развитие оксидативного стресса, происходит увеличение активности Г6ФДГ, что, возможно, связано с мобилизацией ГР/ГП АОС, использующей для своей работы NADPH. Предполагается, что активация Г6ФДГ при патологии не связана с изменением олигомерной структуры этого фермента, а возникает за счет конформационных перестроек фермента. Изменения регуляторных свойств фермента при ЭТГ свидетельствуют об изменении механизмов регуляции его активности.

Работа поддержана грантом Министерства образования и науки РФ по программе "Развития научного потенциала высшей школы" РНП. 2.1.1.4429

ЛИТЕРАТУРА

1. Адамов А.К., Павлова Ю.П. (1990) Журн. микроб., эпидем. и иммунол., №8, 3-5.
2. Стукова Н.Ю. (1991) Изменения функциональной активности кислородзависимых бактерицидных систем фагоцитов при взаимодействии с чумным микробом и его антигенами. Автореф. дис. канд. наук, Саратов.
3. Кожеевников Ю.Н. (1985) Вопр. мед. химии, **31**, №5, 2-7.
4. Федорова Н.Ю. (1999) Состояние системы глутатионпероксидазы-глутатионредуктазы в стимулированном к регенерации органе и ее роль в клеточной пролиферации. Дисс. канд. наук, Воронеж.
5. Осипов А.Н., Азизова О.А., Владимиров Ю.А. (1990) Успехи соврем. биол., **31** (2), 180-208.
6. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951) J. Biol. Chem., **193**, 265-275.
7. Кузьменко А.И., Морозова Р.П., Николенко И.А. и др. (1997) Биохимия, **62**, 712-715.
8. Стальная И.Д. (1977) в: Современные методы в биохимии (под ред. Ореховича В.Н.), Медицина, М., с. 63-64.
9. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. (1977) в: Современные методы в биохимии (под ред. Ореховича В.Н.), Медицина, М., с. 66-68.
10. Davis B.J. (1964) Ann. NY Acad. Sci., **121**, 404-407.

11. Ллойд Э., Ледерман У. (1990) Справочник по прикладной статистике, Финансы и статистика, М.
12. Диксон М., Уэбб Э. (1982) Ферменты, Мир, М., 2.
13. Cai Wang-wei. (1991) Chin. Biochem. J., 7(6), 747-750.
14. Coban T. (2002) Prep. Biochem. Biotechnol., 32(2), 173-187.
15. Ulusu N. (1999) Int. J. Biochem. Cell Biol., 31(7), 787-796.

Поступила: 12. 01. 2005.

**REGULATORY PROPERTIES OF GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE
FROM RAT LIVER UNDER CONDITIONS OF FREE-RADICAL OXIDATION STIMULATED
BY TOXIC HEPATITIS**

M.V. Levenkova, T.N. Popova, A.V. Semenikhina

Voronezh State University, School of Biology and Soil Science, Universitetskaya pl., 1,
Voronezh, 1394693 Russia; tel.: (0732) 20-82-78; fax: (0732) 20-87-55;
e-mail: semenikhina@bio.vsu.ru

Rat liver oxidative stress caused by toxic hepatitis is accompanied by increased activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.4.9; G6PDG). Electrophoretically homogenous G6PDG preparations purified from livers control rats and animals with hepatitis had specific activity of 4.13 and 6.54 EU, respectively. Fe²⁺ and Cu²⁺ ions showed non-competetive type inhibition of G6PDG at normal and under pathological condition, whereas Ca²⁺ activated G6PDG. Hydrogen peroxide exhibited mixed type inhibition of G6PD (K_i 0.36 mM and 0.95 mM at norm and experimental toxic hepatitis, respectively). The participation of oxidised and reduced glutathione in G6PDG activity regulation has been shown.

Key words: rats, liver, free-radical processes, glucose-6-phosphate dehydrogenase, activity regulation.