

УДК 616.155.1-008
©Коллектив авторов

**ИЗМЕНЕНИЕ КИНЕТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК
СУПЕРОКСИДИСМУТАЗЫ И ГЛУТАТИОНПЕРОКСИДАЗЫ
В ПЕЧЕНИ И ЭРИТРОЦИТАХ КРЫС С ДЕФИЦИТОМ БЕЛКА
И ДОПОЛНИТЕЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ В РАЦИОН Cu, Zn, Mn И Se**

А.В. Васильев, В.И. Ивахненко, Г.Ю. Мальцев

ГУ НИИ питания РАМН, 109240, Москва, Устьинский пр-д, 2/14;
тел.: 113-15-92; факс: 113-07-09

Исследованы изменения кинетических параметров супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы печени и эритроцитов крыс в условиях дефицита белка и при добавлении в рацион органических соединений Cu, Zn, Mn, Se. Выявлены различия в кинетических параметрах ферментов между эритроцитами и печенью. Установлено, что в контрольной группе имеет место увеличение K_m^{TBP} для ГП в печени и эритроцитах на 2 и 4 –х недельных сроках после перевода на полусинтетический рацион. В то же время для СОД K_m по NADH - O_2^- генерирующей системе на 2-х недельном сроке снижена. Белковая недостаточность, а так же потребление органических комплексов металлов приводит к снижению K_m для ГП на 2-х недельном сроке, в тоже время на 4-х недельном сроке эти изменения менее очевидны.

Ключевые слова: Супероксиддисмутаза, глутатион пероксидаза, Cu, Zn, Mn, Se.

ВВЕДЕНИЕ. Дефицит белка в рационе в значительной степени сказывается на быстро обновляющихся органах (печень, почки, селезёнка) и на тканях с высокой начальной продукцией клеток (гемопоез) [1]. Ферменты антиоксидантной защиты (АОЗ) этих органов и тканей - супероксиддисмутаза (СОД) и глутатионпероксидаза (ГП) также чувствительны к дефициту белка и микроэлементов. Это проявляется в виде окислительного стресса (ОС). Показано, что в условиях белкового дефицита в печени значительно возрастает концентрация продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), активность ГП, снижается концентрация восстановленного глутатиона и активность СОД [2], изменяется текучесть мембран клеток [3]. Поскольку СОД и ГП являются металлозависимыми ферментами (СОД - Cu, Zn и Mn зависимые формы и ГП - Se зависимые формы [4, 5]), то есть основания предполагать, что обеспеченность этими микроэлементами может стабилизировать их кинетические свойства, включая экспрессию синтеза изоферментов. В связи с этим представляется целесообразным исследование кинетических свойств СОД и ГП в динамике и изменения концентрации продуктов ПОЛ при белковой недостаточности и учетом добавки в рацион органических соединений Cu, Zn, Mn и Se.

МЕТОДИКА. Исследования проведены на крысах-самцах Вистар с исходной массой тела 40 ± 3 г. Животные получали полусинтетический рацион, рекомендованный ГУ НИИ питания РАМН. Животные первой группы (К) и второй группы (К+Ме) получали рацион, включающий по калорийности 12% белка (в виде казеина), 32% жиров (1/3 лярд и 2/3 подсолнечное масло) и 56% углеводов (крахмал маисовый). Животные третьей группы (МБ) и четвертой группы (МБ+Ме) получали рацион, содержащий 8 % белка, 32% жиров и 60% углеводов. Животные групп К+Ме и МБ+Ме дополнительно получали в составе рациона комплексы ферментативных гидролизатов сывороточных белков молока с Cu и Zn [6, 7], аспарагината Mn и Se - спиролину [8]. Общую группу сравнения (ОВ) содержали на общевиарном рационе в течение двух дней. Содержание металлов на 1 кг диеты составило в группе К и МБ -- Mn - 50 мг, Zn - 6 мг, Cu - 4,7 мг, Se - 0,1 мг, в группах К+Ме и МБ+Ме -- 100 мг Mn, 12 мг Zn, 9,4 мг Cu, 0,2 мг Se. Животных содержали в условиях вивария, при этом постоянно осуществляли контроль над приростом массы тела и поедаемостью корма.

После забоя на 2, 14 и 28 дни после перевода на полусинтетический рацион собирали кровь в гепаринизированную пробирку, центрифугировали, готовили водный гемолизат в соотношении 1:1 (по объёму). Одновременно проводили ретроградную перфузию печени, охлажденным раствором 0,9% NaCl и после просушивания на фильтровальной бумаге готовили гомогенат на физиологическом растворе в соотношении 1:1 (масса ткани : объём) в гомогенизаторе типа Поттера-Эльвейма.

Общие биохимические показатели определяли в плазме крови на биохимическом анализаторе Конеллаб 30i. Содержание малонового диальдегида (МДА) определяли по методу [9], диеновых конъюгатов (ДК) по методу [10]. Активность СОД и ГП в гомогенатах печени и гемолизатах эритроцитов измеряли на анализаторе ФП-901 ("Labsystem") по адаптированной схеме измерения [11, 12]. Для определения активности ГП использовали в качестве субстрата трет-бутиловую гидроперекись (ТБП) и восстановленный глутатион ("Sigma"). Кинетические параметры ГП определяли в диапазоне концентраций ТБП. Активность СОД и кинетические свойства определяли с использованием в качестве субстрата СОД O_2^- генерирующую систему, состоящую из NADH, феназинметасульфата (ФМС) и нитросинего тетразолия (НСТ) ($NADH-O_2^-$) [13, 14]. Кинетические параметры СОД определяли в диапазоне концентраций NADH. Использовали реактивы фирмы NADH ("Sigma"), НСТ ("ICN Biomedicals") и ФМС (ICN Biomedicals). Выбор рабочих диапазонов O_2^- - генерирующей системы проводили с использованием коммерческого препарата эритроцитарной супероксиддисмутазы ("Biozyme laboratories" 3333 ед/мг). Данные обрабатывали общепринятыми критериями параметрической статистики.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ Достоверное снижение прироста массы тела отмечалось в группе с низким содержанием белка (8% по калорийности) примерно на 35% ($p < 0,1$) на 28 день. При этом, как проявление белковой недостаточности, отмечалось достоверное снижение содержания в плазме альбумина и общего белка на 20 - 25% к 28 дню исследования ($p < 0,05$). В группе МБ+Ме не отмечено достоверных отклонений по данным показателям.

В таблице представлены данные по содержанию продуктов ПОЛ. Отмечено увеличение содержания МДА в печени на малобелковых рационах (с и без дополнительного обогащения металлоорганическими комплексами) на 14 день. На 28 день содержание продуктов ПОЛ в печени достоверно повышалось в группах с дополнительным потреблением микроэлементов: ДК на 9 - 11%, и МДА на 51% в группе К+Ме и на 81% в группе МБ+Ме. В плазме крови в малобелковой группе содержание ДК достоверно снижалось к 28 дню исследования, возможно, за счёт снижения липопroteинов очень низкой плотности [15].

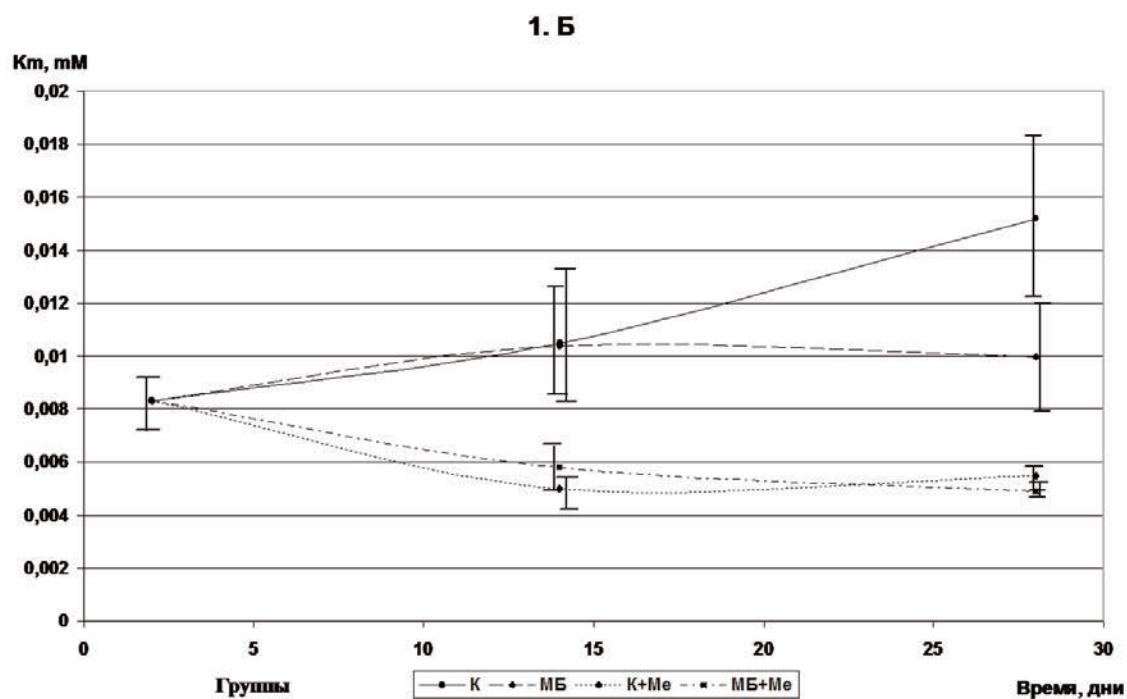
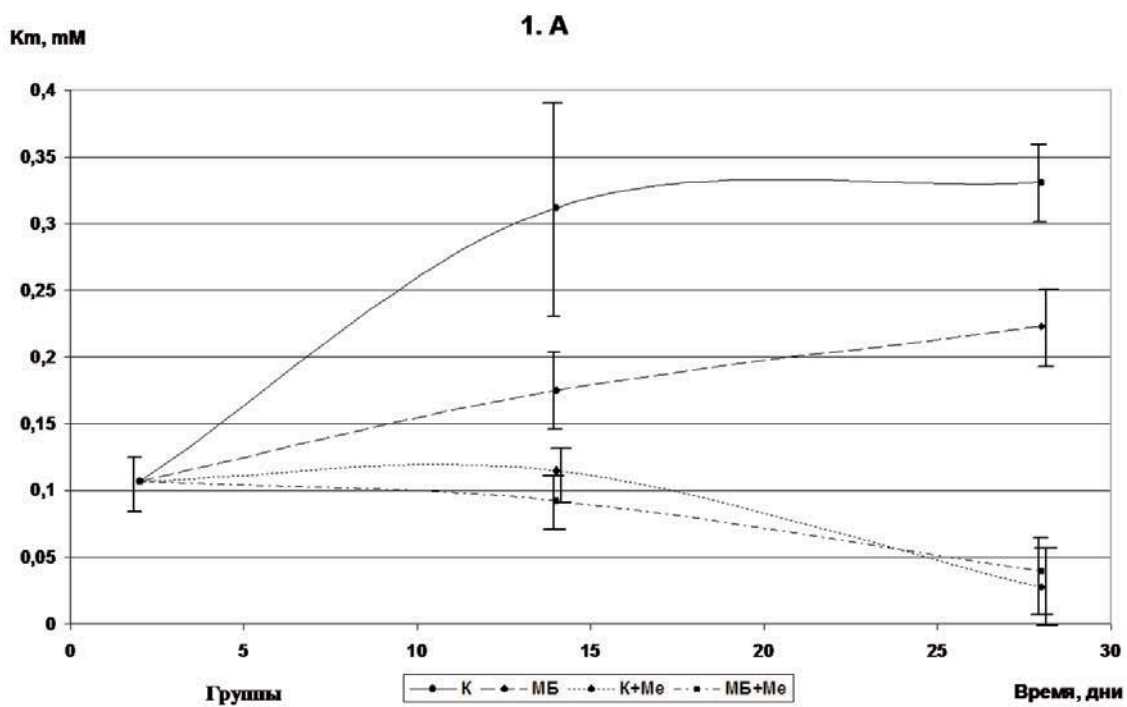
Таблица. Содержание ПОЛ в эритроцитах, печени и плазме крови крыс получавших низкобелковый рацион с обогащением Cu, Zn, Mn, Se, нмоль/мл.

Срок (дни)	ТБК-продукты			
	эритроциты			
	КОНТРОЛЬ	МБ(8%)	К + Ме	МБ + Ме
2	6,97 ± 0,73			
14	11,3 ± 1,9	10,4 ± 1,0	9,37 ± 0,55	10,3 ± 1,4
28	9,40 ± 1,2	13,3 ± 2,2	8,55 ± 1,1	9,25 ± 0,51
	печень			
2	41,1 ± 3,1			
14	20,8 ± 2,2	36,8 ± 3,3*	20,5 ± 2,2	35,7 ± 2,8*
28	30,7 ± 3,1	29,9 ± 3,3	46,5 ± 3,8*	55,8 ± 3,2*
	плазма			
2	135 ± 13,5			
14	68,4 ± 8,8	55,2 ± 6,0	77,9 ± 7,58	78,6 ± 6,7
28	33,8 ± 4,31	28,6 ± 3,7	34,7 ± 4,3	32,8 ± 4,6
	ДК			
	эритроциты			
	КОНТРОЛЬ	МБ(8%)	К + Ме	МБ + Ме
2	23,4 ± 1,7			
14	32,5 ± 4,6	36,8 ± 1,9	37,6 ± 2,8	28,5 ± 2,1
28	32,5 ± 4,3	29,9 ± 2,1	26,8 ± 1,9	33,6 ± 3,7
	печень			
2	19,8 ± 0,94			
14	15,6 ± 0,54	17,3 ± 0,32*	16,1 ± 0,56	16,2 ± 0,41
28	18,8 ± 0,57	19,6 ± 0,63	20,8 ± 0,6*	20,5 ± 0,42*
	плазма			
2	22,9 ± 2,7			
14	22,1 ± 2,4	16,1 ± 1,6	22,3 ± 1,3	18,3 ± 2,1
28	30,0 ± 3,7	16,3 ± 1,7*	25,1 ± 2,3	21,4 ± 1,7

Примечание. * - достоверное различие от контрольной группы, $p < 0,05$.

Таким образом, можно отметить избыточное накопление МДА в печени на малобелковом рационе независимо от добавления в рацион металлоорганических комплексов. В плазме крови малобелковой группы, наоборот, отмечается снижение содержания ДК ненасыщенных жирных кислот.

На рисунках 1 и 2 представлены данные по исследованию кинетических параметров ГП и СОД ферментативных реакций в гемолизатах и гомогенатах печени крыс. Исследование кинетических особенностей глутатионпероксидазной и супероксиддисмутазной реакций проводили по общепринятой схеме оценки параметров K_m и V_{max} .



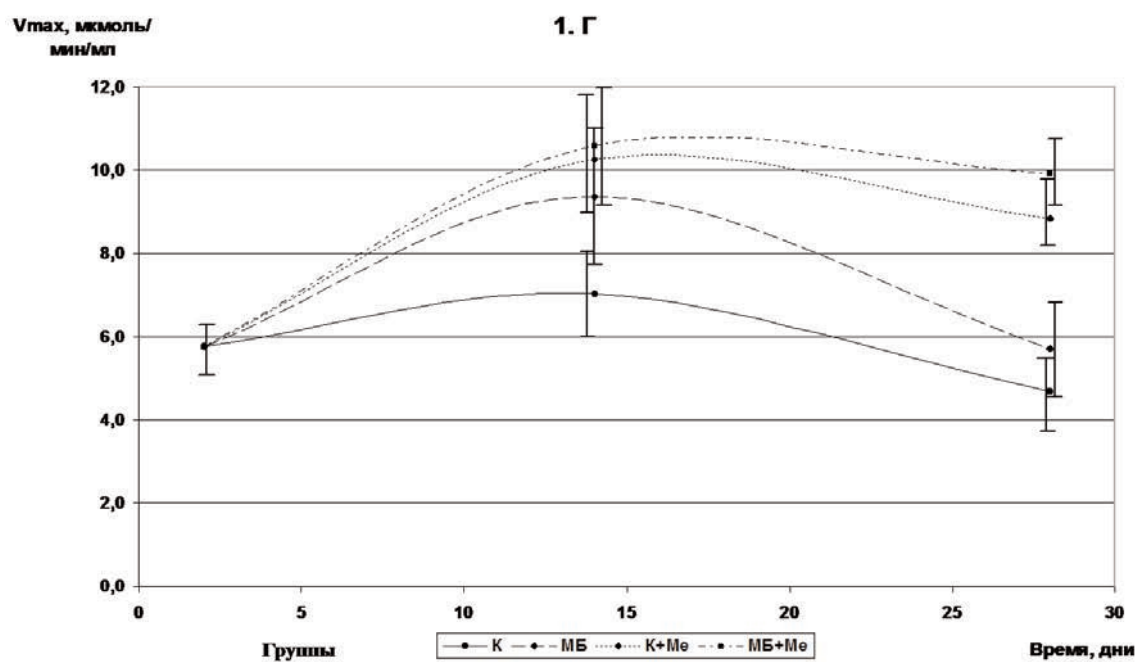
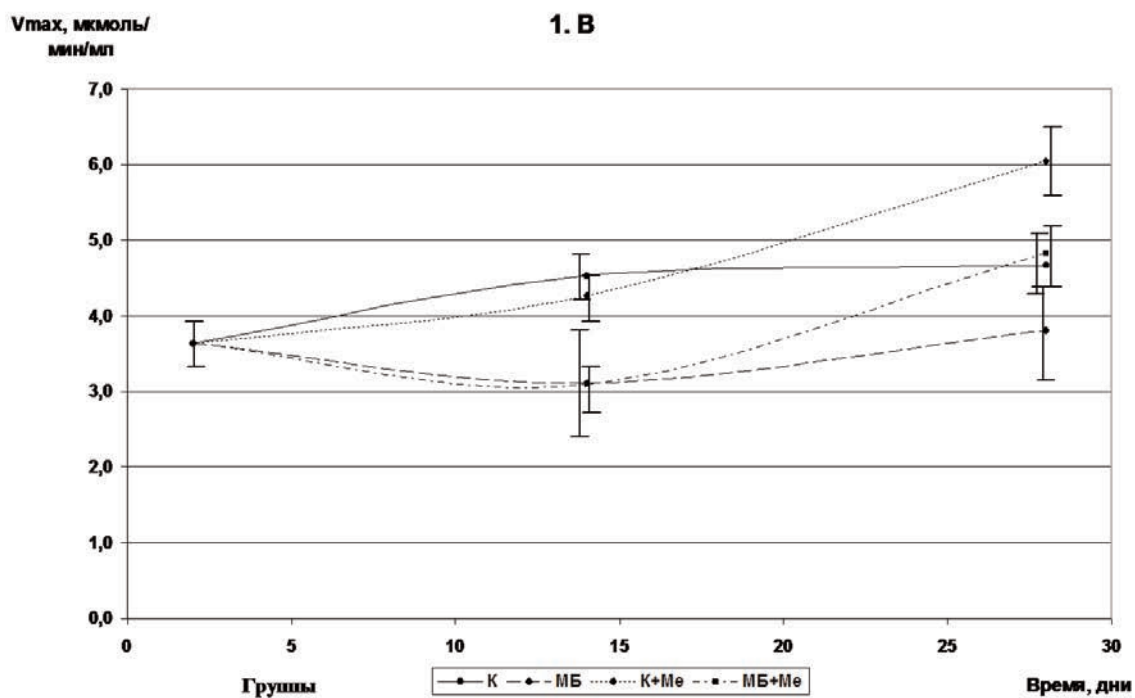
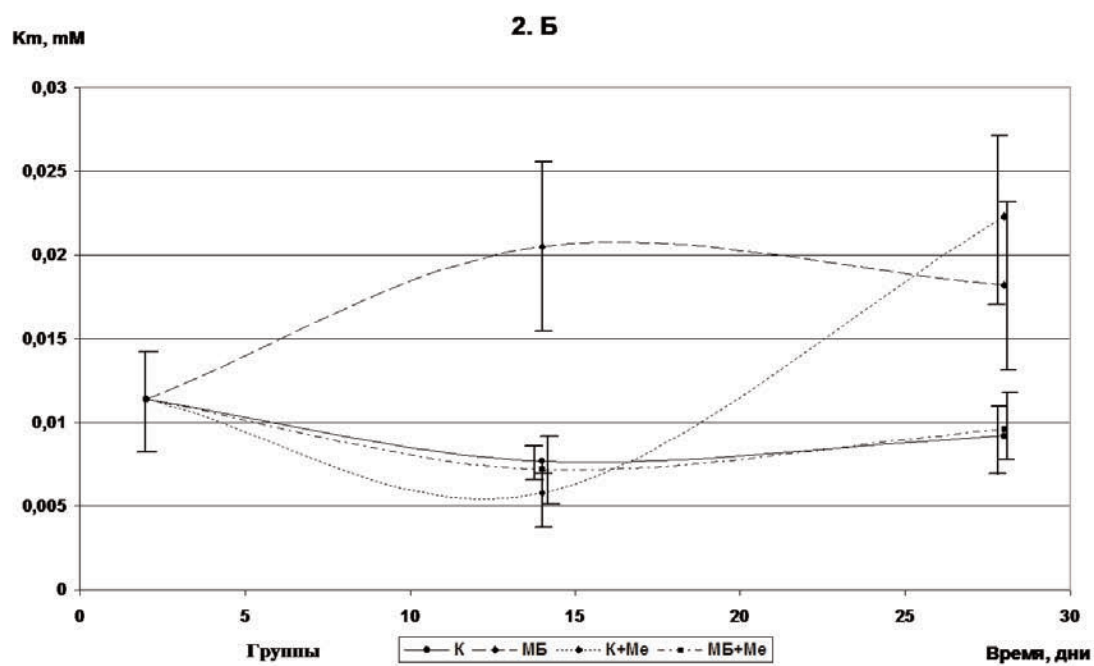
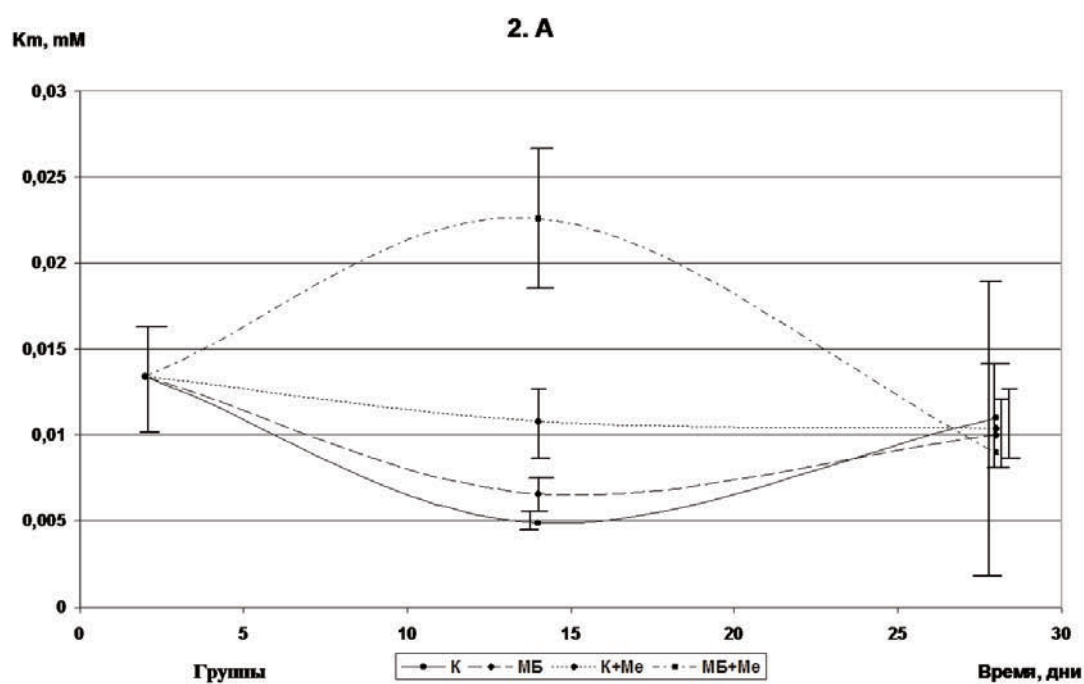


Рисунок 1.

Динамика кинетических параметров глутатионпероксидазной реакции в печени и эритроцитах на малобелковом рационе и рационе, обогащенном органическими комплексами металлов Cu, Se, Mn, Zn.

А. Для K_m ГП печени. Б. Для K_m ГП эритроцитов. В. Для V_{\max} ГП печени.

Г. Для V_{\max} ГП эритроцитов.



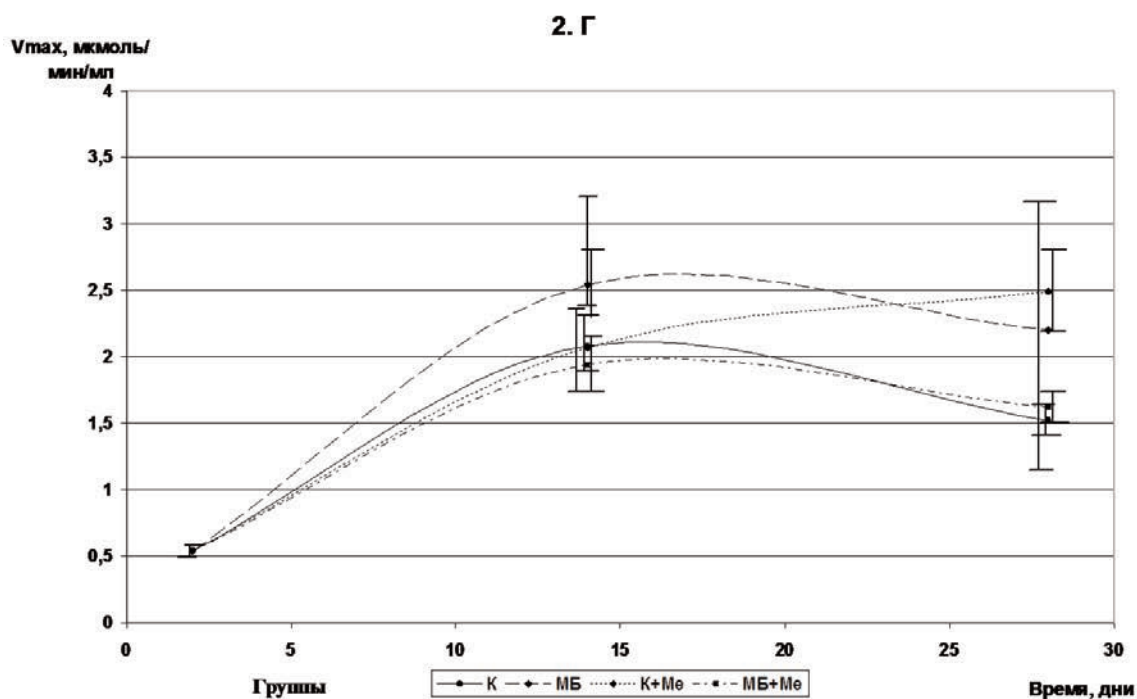
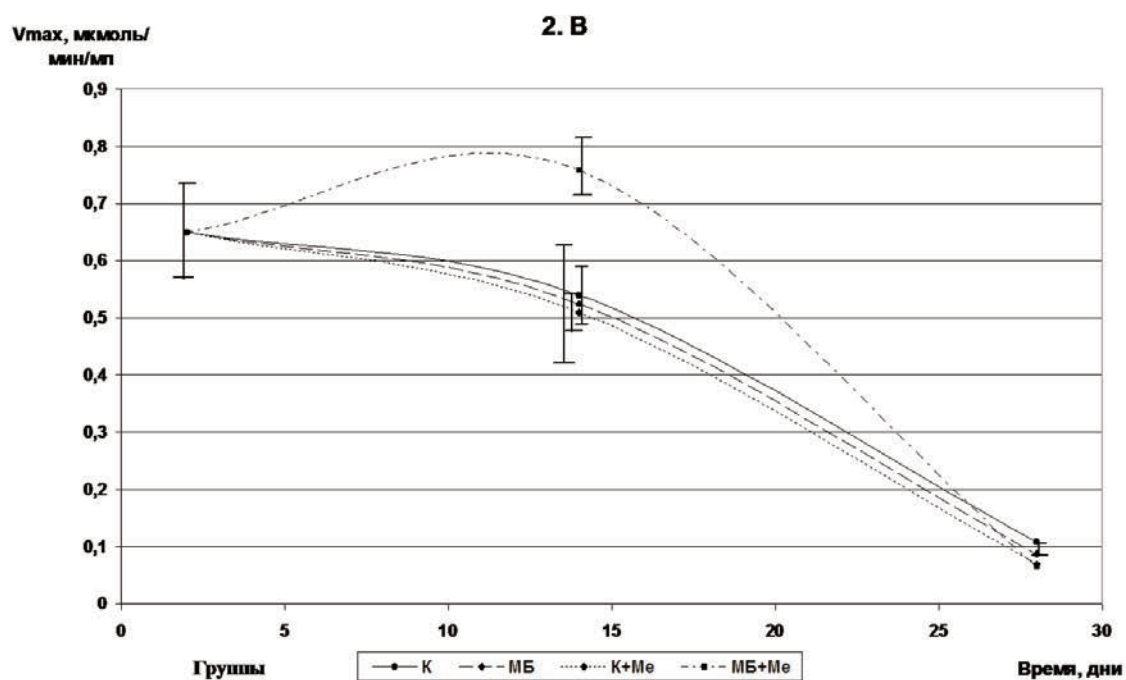


Рисунок 2.

Динамика кинетических параметров супероксиддисмутазной реакции в печени и эритроцитах на малобелковом рационе и рационе, обогащенном органическими комплексами металлов Cu, Se, Mn, Zn.

А. Для K_m ГП печени. Б. Для K_m ГП эритроцитов. В. Для V_{\max} ГП печени.
Г. Для V_{\max} ГП эритроцитов.

Зависимость скорости глутатионпероксидазной реакции от концентрации субстрата ТБП исследовали с использованием коммерческого препарата глутатионпероксидазы ("Sigma", 132 ед/мг). Полученные значения $K_m^{ТБП}$, $V_{max}^{ТБП}$ соответственно составили 12,9 мкМ и 11,7 мкмоль/(мл·мин).

Сравнительные исследования ГП выявили следующие значения K_m для эритроцитов и печени $K_m^{эр ТБП} = 8,3 \pm 0,8$ мкМ и $K_m^{печ ТБП} = 107,0 \pm 21$ мкМ на второй день (группа ОВ). Вместе с тем для этой группы $V_{max}^{печ ТБП} = 3,6 \pm 0,26$ мкмоль/(мл·мин) и для эритроцитов $V_{max}^{эр ТБП} = 5,8 \pm 0,3$ мкмоль/(мл·мин).

Исследования динамики изменений кинетических параметров глутатионпероксидазной реакции выявили изменения $K_m^{ТБП}$ и $V_{max}^{ТБП}$ в течение эксперимента. Отмечено, что в контрольной группе значительное достоверное возрастание $K_m^{ТБП}$ ГП имеется в печени приблизительно на 200% на 14 и 28 дни и в эритроцитах на 83% на 28 день по сравнению с началом эксперимента ($p < 0,05$). (рис. 1. А-Г) В группе МБ достоверное увеличение $K_m^{ТБП}$ ГП в печени носило менее выраженный характер: на 108% на 28 день. Обогащение рациона Se проявляется достоверным снижением $K_m^{ТБП}$ ГП: в отличие от контрольной группы $K_m^{ТБП}$ ГП групп К+Ме и МБ+Ме на 28 день достоверно ниже, чем в группе ОВ на 74% и 63% в печени и на 44% и 41% в эритроцитах соответственно. $V_{max}^{ТБП}$ ГП печени в группе К увеличилась на 25 – 30% на 14 и 28 дни. Добавление Se привело к достоверному увеличению $V_{max}^{ТБП}$ ГП в печени групп К+Ме и МБ+Ме на 28 день на 66% и на 33% соответственно. В эритроцитах $V_{max}^{ТБП}$ ГП эритроцитов всех исследуемых групп на 14 день достоверно выше, чем в группе ОВ (на 22%, 63%, 78% и 84% соответственно в группах К, МБ, К+Ме и МБ+Ме).

Сравнение с контрольной группой показало достоверное снижение $K_m^{ТБП}$ ГП в группе МБ по сравнению с группой К в печени на 28 день на 34%. Обогащение рациона Se сопровождалось снижением величины $K_m^{ТБП}$ ГП групп К+Ме и МБ+Ме на 28 день в эритроцитах (на 64 % в группе К+Ме и на 67% в группе МБ+Ме) и в печени на 14 и 28 дни (на 63% и 92 % в группе К+Ме и на 71% и 88% в группе МБ+Ме). $V_{max}^{ТБП}$ ГП в группе МБ на 14 день достоверно ниже, чем в группе К в печени на 31% и выше в эритроцитах на 33%. $V_{max}^{ТБП}$ в эритроцитах групп с обогащением рациона металлом на 14 и на 28 дни выше, чем в группе К (на 14 день на 46% и на 51% и на 28 день на 88% и на 111% соответственно в группах К+Ме и МБ+Ме). В печени группы МБ+Ме $V_{max}^{ТБП}$ ГП на 14 день на 32% ниже, чем в группе К.

В зависимости от концентрации супероксид-анион радикала $O_2^{\cdot -}$ был отработан диапазон концентраций $O_2^{\cdot -}$ - генерирующей системы включающей NADH, ФМС и НСТ на препарате СОД (Biozyme laboratories 36 mg - 220000 ед/мг). Значения кинетических параметров $K_m^{NADH-O_2^{\cdot -}} = 10,39$ мкМ, $V_{max}^{NADH-O_2^{\cdot -}} = 6,196$ нмоль/(мл·мин).

Исследования показали, что $K_m^{NADH-O_2^{\cdot -}}$ для СОД эритроцитов и печени контрольной группы на 14 и 28 день эксперимента находится в пределах от 11,4 до 7,7 мкМ и от 13,4 до 11,0 мкМ соответственно (рис. 2. А-Г). $V_{max}^{NADH-O_2^{\cdot -}}$ СОД печени всех групп ниже на 83%-90% на 28 день по сравнению с группой ОВ, а в эритроцитах на 14 день $V_{max}^{NADH-O_2^{\cdot -}}$ СОД увеличивается во всех группах на 260–370%. То есть характер изменений СОД печени является обратным изменению эритроцитарного фермента.

Выявлены отклонения кинетических параметров супероксиддисмутазной реакции от контрольной группы в опытных группах. Достоверно увеличивается $K_m^{NADH-O_2^{\cdot -}}$ СОД печени по сравнению с К на 14 день в группах К+Ме и МБ +Ме на 120% и 364%. Аналогично в эритроцитах достоверные увеличения $K_m^{NADH-O_2^{\cdot -}}$ СОД отмечаются так же на 14 день в группе МБ на 164% и на 28 день группах МБ и К+Ме на 99% и 144% соответственно.

$V_{max}^{NADH-O_2^{\cdot -}}$ СОД печени в группе МБ+Ме на 14 день достоверно повышается на 40% выше, чем в группе К. На 28 день в печени групп К+Ме и МБ+Ме имеется снижение на 36% и 39%. Достоверные отклонения значения $V_{max}^{NADH-O_2^{\cdot -}}$ СОД эритроцитов имеются на 28 день в группах К+Ме и МБ на 63,9% и 44,9% выше, чем в группе К соответственно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Исследование кинетических параметров супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы крысят-отъёмышей после перевода на полусинтетический рацион позволило установить, что на ранних этапах онтогенетического развития имеются существенные изменения этих параметров: снижение специфичности ГП к субстрату при довольно стабильной максимальной скорости при нормальной обеспеченности белком на протяжении всего эксперимента и разная направленность изменений максимальной скорости супероксиддисмутазной реакции – снижение в печени и усиление в эритроцитах. Это обстоятельство приводит к заключению, что становление антиоксидантных ферментов в значительной степени связано с изменением кинетических свойств, возможно, за счет синтеза новых ферментов. Белковая недостаточность так же приводит к изменению свойств ГП: снижение сродства к субстрату на коротких сроках и, как адаптация к развившемуся ОС, увеличение сродства к субстрату на 28-й день.

Значительное снижение K_m для ГП при добавлении металлов и в печени и в эритроцитах является следствием дополнительного потребления селена с рационом. Для СОД в печени и эритроцитах при добавлении металлов на двух недельном сроке адаптация обусловлена увеличением величины K_m при одновременном возрастании максимальной скорости, однако, на четвёртой неделе эти параметры нарушаются, что обусловлено нарастающим ОС.

Таким образом, введение органических соединений металлов приводит к неоднозначными проявлениями. Наряду с усилением ОС, возможно поддержание оптимального каталитического статуса двух ключевых ферментов антиоксидантной системы.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Yoshimura H.* (1971) FAO/WHO ad hoc committee of experts on energy and protein: requirements and recommended intakes Rome, 22 March - 2 April.
2. *Sidhu P., Garg M.L., Dhawan D.K.* (2004) *Nutr Hosp.*, **19**, p.341-347.
3. *Нодиров К., Ленская Е.Г., Токмурзин Ж.У., Айдарханов Б.Б., Синявский Ю.А., Сагиндыкова С.Е.* (1985) *Вопр. питания*, №1, 47–50.
4. *Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.В.* (2001) *Окислительный стресс*. Москва. МАИК “Наука/Интерпериодика”.
5. *Тутельян А.В., Княжев В.А., Хотимченко С.А., Голубкина Н.А.* (2002) Селен в организме человека: метаболизм, антиоксидантные свойства роль в канцерогенезе. М.: Москва Издательство РАМН.
6. *Fridovich I.* (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**(30), 18515-18517.
7. *Мазо В.К., Зорин С.Н., Гмошинский И.В., Зилова И.С., Шатров Г.Н.* (2003) *Вопр. дет. диет.*, **1**(6), 6–10.
8. *Мазо В.К., Зорин С.Н., Гмошинский И.В., Зилова И.С., Шатров Г.Н.* (2004) *Вопр. дет. диет.*, **2**(3), 9-11.
9. *Кукес В.Г., Асланян Н.В., Голубкина Н.А., Хотимченко С.А., Ших Е.В.* (2002) *Микроэлементы в медицине*, **3**(4), 13-14.
10. *Ernster Z., Nordenbrandt K.* (1967) *Methods Enzymol.*, **10**, p.575-576.
11. *Гаврилов В.Б., Мишкорудная М.И.* (1983) *Лабор. дело*, 3. 33-35.
12. *Mille G.* (1959) *J. Biol. Chem.*, **244**, 502-506.
13. *Мальцев Г.Ю., Тышко Н.В.* (2002) *Гигиена и санитария*, 2, 69-71.
14. *Мальцев Г.Ю., Васильев А.В.* (1994) *Вопр. мед. химии*, **40**(2), 56–58.
15. *Madani S., Prost J., Narce M. et al.* (2003) *J. Nutr.*, **133**, 4102-4106.

Поступила: 03. 05. 2006

CHANGES IN KINETIC PROPERTIES OF SUPEROXIDE DISMUTASE AND
GLUTATHIONE PEROXIDASE IN THE LIVER FROM RATS AND ERYTHROCYTES
AT DEFICIENCY OF PROTEIN AND ADDITIONAL DIETARY ADMINISTRATION
OF Cu, Zn, Mn AND Se

A.V. Vasiljev, V.I. Ivakhnenko, G.Yu. Maltsev

Institute of Nutrition RAMS, Ustinsky proezd, 2/14, Moscow, 109240 Russia;
tel: (095)113-15-92; fax: (095) 113-07-09

The kinetic parameters of liver and erythrocyte superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GP) have been investigated in rats kept under conditions of low protein diet (8%) and during addition of organic compounds containing Cu, Zn, Mn, Se. There were differences in kinetic parameters of hepatic and erythrocyte enzymes. After 2 and 4 weeks of maintenance of rats at a semi-synthetic diet there was an increase of K_m value of liver and erythrocyte GP for tert-butyl hydroperoxide. After two weeks there was a decrease in K_m of SOD for NADH- $O_2^{\cdot -}$ generating system. The low protein diet and consumption of Cu, Zn, Mn, Se caused a decrease of K_m value of liver and erythrocytes GP and development of oxidative stress in liver as a result dietary administration Cu and Mn.

Key words: superoxide dismutase, glutathione peroxidase, Cu, Zn, Mn, Se.