

УДК 577.15:616.36-002

© Коллектив авторов

## **КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА 6-ФОСФОГЛЮКОНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ В НОРМЕ И ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ**

*М.М. Свиридов, А.В. Семенихина, Т.Н. Попова*

Воронежский государственный университет, г. Воронеж,  
Университетская пл., 1, факс: (4732)208-755, semenikhina@bio.vsu.ru,  
tpropova@bio.vsu.ru

При окислительном стрессе, вызванном развитием экспериментального токсического гепатита, в печени крыс наблюдается снижение активности 6-фосфоглюконатдегидрогеназы (6ФГДГ, КФ 1.1.1.44). Получены в состоянии, близком к гомогенному, препараты 6ФГДГ из печени животных контрольной группы и подвергнутых токсическому гепатиту. Молекулярная масса 6ФГДГ из печени крыс в норме и при патологии не отличалась и составила  $114,2 \pm 5,8$  кДа. С использованием полученных препаратов выявлено, что при гепатите происходит изменение  $K_m$  и рН-оптимума. Восстановленный глутатион ингибирует 6ФГДГ из печени крыс контрольной группы и не влияет на фермент из печени животных с токсическим гепатитом. Тормозящий эффект окисленного глутатиона сильнее выражен при исследуемом заболевании. Малат, цитрат, 2-оксоглутарат, изоцитрат оказывают активирующий эффект на фермент в норме и не влияют при развитии патологии. Регуляция активности 6ФГДГ из печени контрольных и подвергнутых гепатиту крыс под действием некоторых нуклеотидов (NAD, ADP, AMP) и интермедиатов углеводного обмена (рибоза-5-фосфат, фруктозо-1,6-бисфосфат, глюкоза, галактоза) имела различный характер. Таким образом, снижение активности 6ФГДГ в условиях окислительного стресса, вызванного развитием токсического гепатита, сопровождается значительными изменениями некоторых кинетических параметров и регуляторных свойств фермента.

**Ключевые слова:** крыса, печень, оксидативный стресс, 6-фосфоглюконатдегидрогеназа, свойства.

**ВВЕДЕНИЕ.** В развитии токсического гепатита существенную роль играют свободнорадикальные процессы. Имеющиеся данные позволяют предположить, что активные формы кислорода (АФК), образующиеся в реакциях митохондриального и микросомального окисления при неполном восстановлении кислорода до воды, а также в реакциях окисления токсических веществ (в частности,  $CCl_4$  оксидазами семейства цитохром P450), принимают непосредственное участие в развитии повреждения гепатоцитов [1, 2]. Контроль свободнорадикальных процессов достигается за счет функционирования многоуровневой системы защиты организма, включающей ферментативное и неферментативное звенья. Восстановленный глутатион является компонентом как неферментативного звена АОС, обеспечивая непосредственную детоксикацию АФК, свободных радикалов и гидропероксидов, так и ферментативного звена, являясь необходимым кофактором глутатионпероксидазной/глутатионредуктазной системы (ГП/ГР), обеспечивающей детоксикацию перекиси водорода и органических пероксидов [3, 4]. Восстановление окисленного

глутатиона происходит в ходе глутатионредуктазной (ГР) реакции, функционирование которой осуществляется только при постоянном притоке в реакцию восстановительных эквивалентов в форме NADPH, образующихся преимущественно в ходе работы окислительной ветви пентозофосфатного пути (ПФП), ключевыми ферментами которой являются глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г6ФДГ) и 6ФГДГ [5]. Имеющаяся в настоящее время научная информация свидетельствует об активации Г6ФДГ в условиях интенсификации свободнорадикального окисления (СРО). Так, активность Г6ФДГ увеличивается при развитии токсического гепатита у крыс [6], при ишемии-реперфузии изолированного сердца мыши [7]. Считают, что сверхэкспрессия данного фермента увеличивает устойчивость клеток к окислительному стрессу [8, 9]. Однако увеличение активности Г6ФДГ не всегда сопряжено с активацией других ферментов данного пути. Так, в работе Salvemini et al. было показано, что увеличение пула глутатиона, наблюдаемое при сверхэкспрессии Г6ФДГ, не сопровождается активацией 6ФГДГ [8]. Но, Ruskas et al., показали стимуляцию Г6ФДГ, 6ФГДГ и трансальдолазы, сопровождающуюся увеличением уровня восстановленного глутатиона в присутствии дегидроаскорбата [10]. По-видимому, разнонаправленное функционирование отдельных звеньев данного метаболического пути может быть реализовано за счет наличия множественных путей регуляции активности ферментов, что может иметь определенное физиологическое значение. Однако если оценка роли Г6ФДГ при окислительном стрессе еще встречается в литературе, то работы характеризующие функционирование 6ФГДГ в данных условиях практически отсутствуют.

В связи с этим значительный интерес представляет исследование каталитических свойств и регуляции активности 6ФГДГ в условиях нормы и при окислительном стрессе, вызванном развитием токсического гепатита.

**МЕТОДИКА.** В качестве объекта исследования использовали взрослых лабораторных белых крыс (*Rattus rattus L.*), самцов массой 150-200 г. Животных содержали на стандартном рационе питания вивария. Токсическое повреждение печени моделировали пероральным введением 33% раствора  $\text{CCl}_4$  в вазелиновом масле из расчета 64 мкл  $\text{CCl}_4$ /100 г веса животного [11]. Забой животных производили на 4 сутки после введения токсического агента. Контрольным животным вводили соответствующую аликвоту вазелинового масла. Печень извлекали после многократного перфузирования ледяным физиологическим раствором.

Развитие токсического повреждения печени крыс отслеживали по изменению активностей аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ) в сыворотке животных. Кровь из хвостовой вены собирали в чистую стеклянную пробирку без антикоагулянта и помещали на 0,5 часа в термостат при 37°C, после расслаивания фаз отбирали верхнюю фазу и центрифугировали её при 1500 g в течение 10 минут, полученную сыворотку использовали для дальнейших исследований. Активность АЛТ увеличивалась в 7,4, АСТ в 4,3 раза, что свидетельствует о развитии патологического процесса.

Интенсивность СРО оценивали по уровню  $\text{Fe}^{2+}$ -индуцированной хемилюминесценции в гомогенате печени крыс, а также с помощью спекрофотометрического определения содержания первичных продуктов пероксидного окисления липидов (ПОЛ) – диеновых конъюгатов (ДК) [12].

Активность 6ФГДГ определяли спекрофотометрически при длине волны 340 нм. О скорости реакции судили по увеличению оптической плотности в результате восстановления NADP в ходе окислительного декарбоксилирования 6-фосфоглюконата до рибулозо-5-фосфата. Измерение активности 6ФГДГ проводили в 50 мМ Трис-HCl-буфере (pH 8,0), содержащем 1 мМ ЭДТА, 0,5 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанол, 1 мМ 6-фосфоглюконат и 0,12 мМ NADP. За единицу активности принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкмоль продукта за 1 мин при 25°C. Общее количество белка определяли по методу Лоури [13].

Очистку фермента проводили в несколько стадий. Навеску ткани печени гомогенизировали в 3-х кратном объеме среды выделения следующего состава: 50 мМ трис-НСl (рН 8,0), содержащий 1 мМ ЭДТА, 0,5 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанол. Гомогенат фильтровали и центрифугировали при 7000 g в течение 10 мин. Высаливание осуществляли сульфатом аммония в границах насыщения 40-75%. Полученный осадок ресуспендировали в 1 мл среды выделения. Для освобождения ферментного препарата от низкомолекулярных примесей применяли гель-фильтрацию на сефадексе G-25 (Fine, 1,4×20 см). В качестве элюирующей среды для 6ФГДГ использовали 10 мМ трис-НСl (рН 8,0), содержащий 1 мМ ЭДТА, 0,5 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанол. Для дальнейшей очистки 6ФГДГ применяли ионообменную хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе (0,75×8 см). Десорбцию 6ФГДГ с ДЭАЭ-целлюлозы осуществляли с помощью линейного градиента концентрации KCl от 0 до 200 мМ. Концентрирование фракций, содержащих активность фермента после хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе, проводили с помощью мембраны Millipore, Biomax-50,000, концентрирующей ячейки Amicon Stirred Ultrafiltration Cell Model-8050 под давлением азота 4,2 атм. и скоростью истечения 20 мл/ч. Полученный ферментный препарат использовали для дальнейшей очистки и определения молекулярной массы с помощью Toyopearl HW-65. Элюцию проводили средой того же состава, что и на предыдущих стадиях с добавлением 100 мМ KCl.

Электрофорез очищенного ферментного препарата проводили в 7,5% полиакриламидном геле (ПААГ) по методу Дэвиса [14]. Универсальное окрашивание белков в геле осуществляли по методике с использованием нитрата серебра [15].

Полученные ферментные препараты использовали для сравнительного исследования кинетических свойств и регуляции активности 6ФГДГ в норме и при развитии токсического повреждения печени.

Опыты проводили в 3-х кратной биологической повторности, аналитические определения для каждой пробы осуществляли в двух повторностях. В таблице и рисунках приводятся средние арифметические значения и их стандартные ошибки. Для определения достоверности результатов исследований применяли метод вариационной статистики. Полученные данные обрабатывали с использованием статистических критериев, различия считали значимыми при  $p < 0,05$ . Для построения графиков использовались данные, обработанные с помощью программ линейной и параболической аппроксимации.

Таблица 1. Очистка 6-фосфоглюконатдегидрогеназы из печени контрольных и опытных животных.

Стадия очистки	Условия опыта	Общая активность $E_{\text{общ}}$	Количество белка, мг	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
гомогенат	норма	7,2±0,4	195±10	0,037±0,002	100	—
	гепатит	5,1±0,3	205±10	0,025±0,002	100	—
высаливание $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	норма	1,2±0,1	62,9±3,2	0,019±0,001	16,62	—
	гепатит	3,1±0,2	97,8±4,9	0,032±0,002	61,13	1,28
хроматография на сефадексе G-25	норма	5,8±0,3	40,8±2,1	0,14±0,01	80,19	3,84
	гепатит	4,4±0,2	39,5±2,0	0,11±0,01	85,74	4,44
хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	норма	1,9±0,1	1,5±0,1	1,36±0,06	26,04	34,11
	гепатит	2,0±0,1	3,5±0,2	0,56±0,03	38,67	22,36
ультрафильтрация (Millipore 50 кДа)	норма	1,7±0,1	1,0±0,1	1,80±0,09	23,96	48,70
	гепатит	1,9±0,1	2,5±0,1	0,77±0,04	37,70	30,76
хроматография на Toyopearl HW-65	норма	0,16±0,01	0,041±0,002	4,00±0,22	2,22	108,11
	гепатит	0,20±0,01	0,062±0,003	3,33±0,17	3,91	133,32

## 6-ФОСФОГЛЮКОНАТДЕГИДРОГЕНАЗА ПРИ ГЕПАТИТЕ

В работе использовали следующие реактивы и материалы: 6-фосфоглюконат и NADP (“Fluka”, Германия), трис (“Serva”, Германия), ДЭАЭ-целлюлоза (“Reanal”, Венгрия), сефадекс G-25, (“Pharmacia”, Швеция), Toyopearl HW-65 (“Toyosoda”, Япония). Остальные реактивы отечественного производства.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** На 4-е сутки развития экспериментального токсического гепатита, характеризующегося максимальным уровнем развития СРО, наблюдалось снижение удельной активности 6ФГДГ в печени крыс на 38% (рис. 1). При этом в гомогенате печени содержание ДК возрастало в 1,8 раза, параметры интенсивности биохемилюминесценции – светосумма (S), интенсивность максимальной вспышки ( $I_{\max}$ ), отражающие степень развития СРО, возрастали в 2,2 раза, наблюдалось также увеличение активности Г6ФДГ в ~1,5 раза, что согласуется с полученными ранее данными [6]. Стимуляция Г6ФДГ, очевидно, приводит к возрастанию содержания 6-фосфоглюконата, который должен или накапливаться в гепатоцитах, или, по-видимому, утилизироваться не только в 6ФГДГ-реакции, но и другими путями. В этой связи возникает вопрос о сопряжении функционирования ключевых ферментов ПФП в условиях окислительного стресса. Имеются данные, что ряд сахаров, метаболическим предшественником которых является 6-фосфоглюконат (рибозо-5-фосфат, эритроза и др.), при чрезмерном их образовании могут усиливать оксидативный стресс и вызывать апоптоз лимфоцитов [16]. Не исключено, что торможение активности 6ФГДГ при окислительном стрессе могло бы способствовать снижению содержания данных метаболитов.

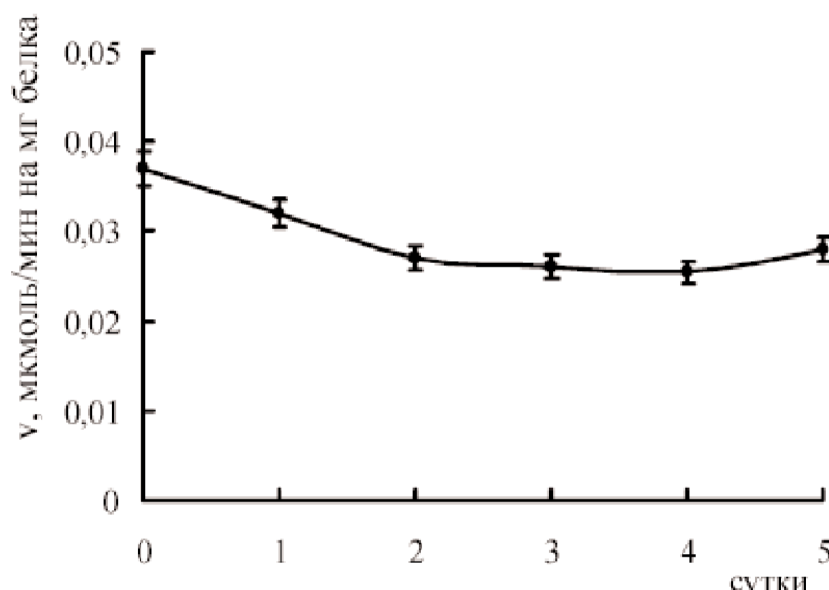


Рисунок 1.

Изменение активности 6-фосфоглюконатдегидрогеназы из печени крыс в динамике развития токсического гепатита (50 мМ трис-HCl-буфер, pH 8,0; 1 мМ ЭДТА, 0,5 мМ β-меркаптоэтанол, 1 мМ 6-фосфоглюконат и 0,12 мМ NADP).

В результате очистки нами были получены препараты 6ФГДГ с 108- и 133-кратной степенью очистки и удельной активностью 4,00 и 3,33 Ед/мг белка соответственно. При окрашивании пластинок ПААГ после электрофореза с помощью нитрата серебра белок проявлялся в виде одной основной полосы с электрофоретической подвижностью  $R_f = 0,35$ , что свидетельствует о том, что ферментный препарат был получен в состоянии близком к гомогенному (рис. 2.). Значения электрофоретической подвижности для фермента, выделенного из печени контрольной и опытной групп животных, были одинаковы.

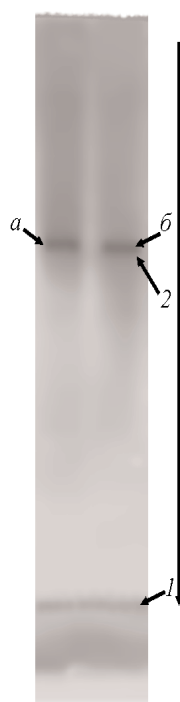


Рисунок 2.

Электрофореграмма ферментных препаратов 6-фосфоглюконатдегидрогеназы из печени контрольных животных (*a*) и подвергнутых токсическому гепатиту (*б*): 1 - зона маркерного красителя (бромфеноловый синий), 2 - зона локализации 6-фосфоглюконатдегидрогеназы, стрелкой показано направление движения белка при электрофорезе.

В связи с высокой нестабильностью фермента исследование каталитических и регуляторных свойств фермента из печени крыс контрольной и опытной групп проводили на ферментном препарате, полученном после стадии концентрирования.

Молекулярная масса 6ФГДГ из печени крыс в норме и при патологии, определенная методом гель-фильтрации через Toyopearl HW-65, составила  $114,2 \pm 5,8$  кДа, что согласуется с данными литературы [17]. По-видимому, изменение активности фермента не связано с реализацией ассоциативно-диссоциативного механизма регуляции.

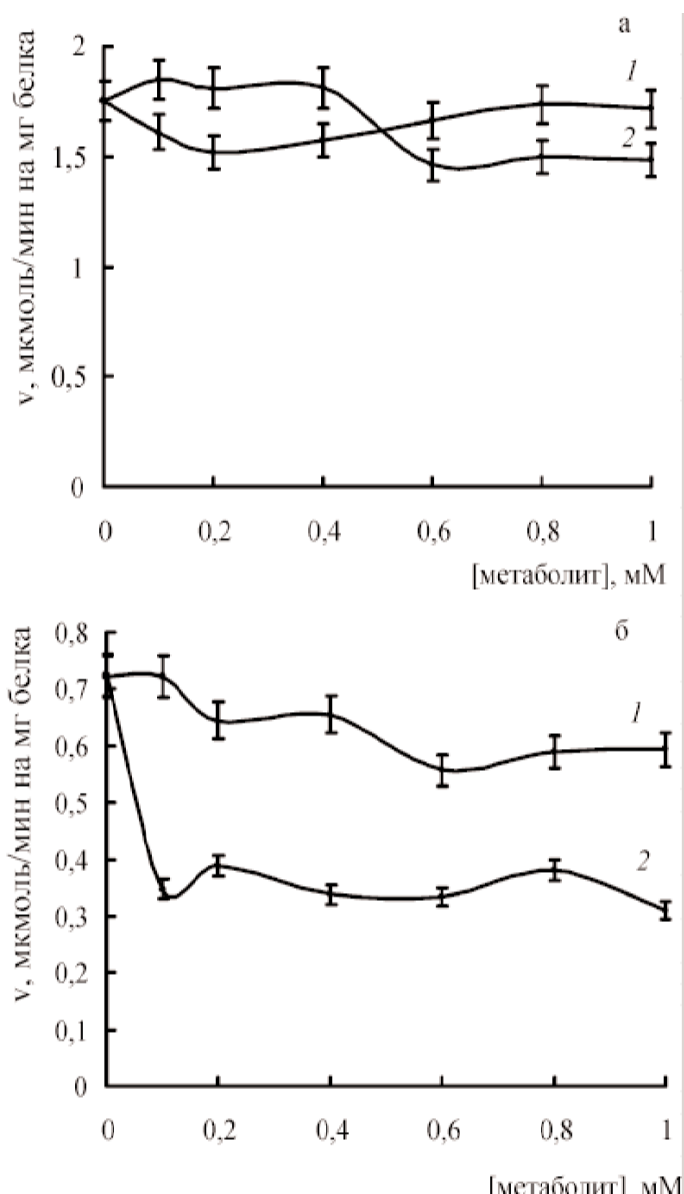
Не исключено, что снижение активности 6ФГДГ при интенсификации СРО может быть связано с конформационными перестройками в молекуле и/или окислением его функциональных групп. Имеются данные, что при старении, которое, как известно, сопровождается накоплением продуктов СРО, наблюдается снижение активности 6ФГДГ обусловленное окислением 11 остатков лизина на молекулу фермента [18].

Исследование зависимости активности 6ФГДГ от концентрации ионов водорода показало, что при токсическом гепатите наблюдается смещение рН-оптимума в кислую сторону, что, вероятно, связано с развивающимся ацидозом. Значения рК функциональных групп фермента из печени крыс контрольной группы, определенных по методу Курганова и сотр. [19], составили 7,3 и 8,5, что близко к рК имидазольной группы гистидина и сульфгидрильной группы цистеина. Величины рК для фермента из печени крыс с токсическим гепатитом были равны 7,2 и 8,4. Значения  $K_m$  для субстрата и кофермента составили  $0,155 \pm 0,008$  мМ и  $0,101 \pm 0,005$  мМ для фермента из печени контрольной группы и  $0,083 \pm 0,004$  мМ и  $0,037 \pm 0,002$  мМ для фермента из печени животных подвергнутых токсическому гепатиту. Полученные данные свидетельствуют об изменении ряда кинетических параметров 6ФГДГ при данной патологии.



## 6-ФОСФОГЛЮКОНАТДЕГИДРОГЕНАЗА ПРИ ГЕПАТИТЕ

Учитывая роль ПФП в поставке восстановительных эквивалентов для функционирования ГП/ГР системы, исследовали регуляцию активности 6ФГДГ с помощью окисленной и восстановленной форм глутатиона. Восстановленный глутатион в концентрациях до 0,4 мМ практически не оказывает влияния на протекание ферментативной реакции в условиях нормы. При дальнейшем повышении концентрации метаболита до 1,0 мМ наблюдается снижение активности фермента на ~25% от первоначального уровня. При токсическом гепатите метаболит не оказывает существенного влияния на ферментативную активность (рис. 3). Окисленный глутатион оказывает ингибирующее действие на фермент, как в условиях нормы, так и при развитии патологии. Однако тормозящий эффект в патологическом состоянии выражен сильнее (рис. 3). Нельзя исключить, что эффекты окисленного и восстановленного глутатиона могут быть связаны с изменением статуса SH-групп 6ФГДГ.



**Рисунок 3.**

Влияние окисленного (1) и восстановленного глутатиона (2) на активность 6-фосфоглюконатдегидрогеназы из печени контрольных (а) и опытных (б) животных (50 мМ трис-НСl-буфер, рН 8,0; 1 мМ ЭДТА, 0,5 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанол, 1 мМ 6-фосфоглюконат и 0,12 мМ NADP).

Ранее было показано, что генерирование восстановительных эквивалентов для функционирования антиоксидантных систем клетки в условиях интенсификации СРО, наряду с ферментами ПФП могут осуществлять NADP-зависимые изоцитратдегидрогеназа и малатдегидрогеназа [6,20]. В связи с этим было проведено исследование влияния субстратов и продуктов данных реакций на активность 6ФГДГ в норме и при развитии токсического повреждения печени крыс (рис.4). Малат, цитрат и 2-оксоглутарат могут оказывать слабый активирующий эффект на 6ФГДГ из печени крыс контрольной группы. Однако данные метаболиты не влияют на активность фермента из печени крыс опытной группы. Изоцитрат оказывал существенный активирующий эффект на фермент из печени контрольных животных в концентрациях 0,1-0,7 мМ (имело место ~ 60% увеличение активности) и практически не влиял на активность фермента животных опытной группы. Регуляция активности фермента с помощью изоцитрата, по-видимому, может способствовать координации генерирования NADPH в ходе реакций катализируемых 6ФГДГ и NADP-изоцитратдегидрогеназой в условиях нормы и развития токсического гепатита.

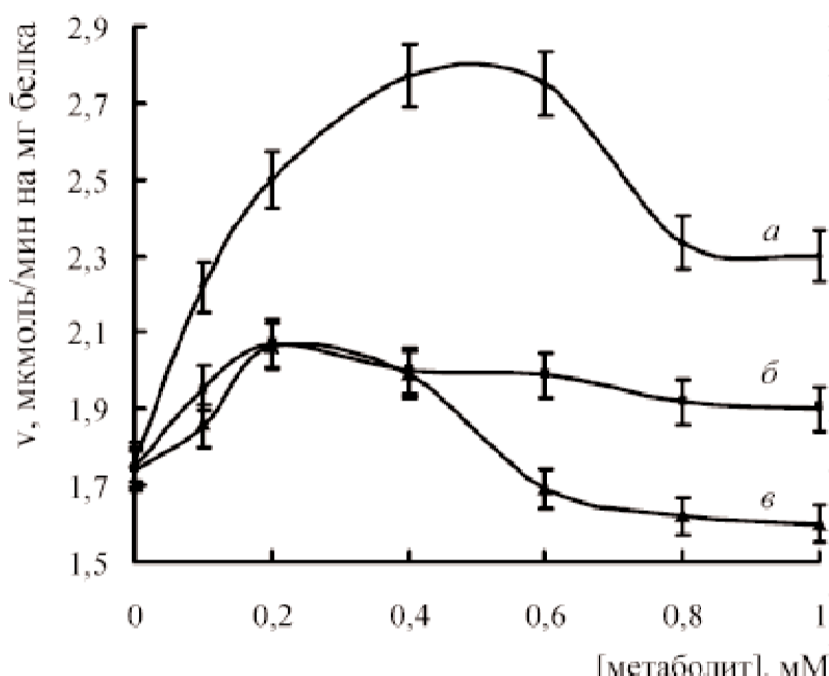
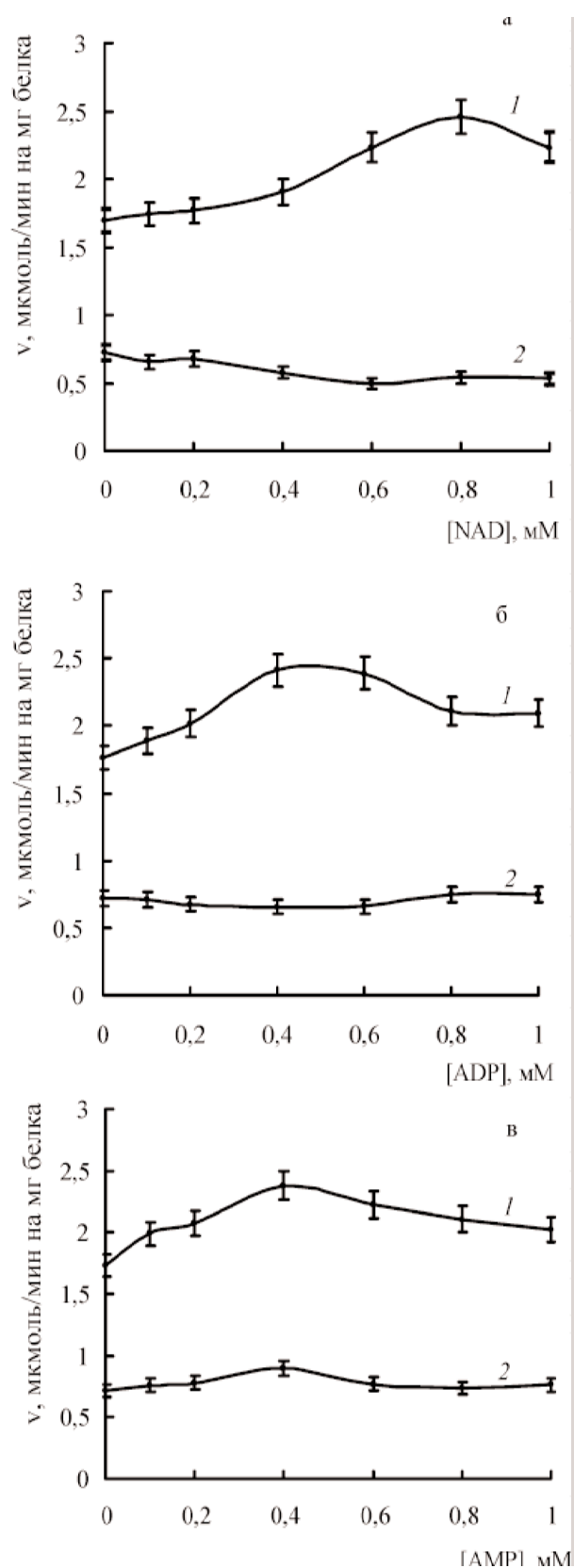


Рисунок 4.

Влияние изоцитрата (а), малата (б) и 2-оксоглутарата (в) на активность 6ФГДГ из печени крыс в норме (50 мМ трис-НСl-буфер, рН 8,0; 1 мМ ЭДТА, 0,5 мМ β-меркаптоэтанол, 1 мМ 6-фосфоглюконат и 0,12 мМ NADP).

NAD не оказывает влияния на функционирование фермента при ЭТГ, однако выступает в качестве активатора 6ФГДГ из печени животных контрольной группы (рис. 5).

АТФ не влияет на активность фермента как в условиях нормы, так и при патологии. Активирующий эффект ADP был более выражен для 6ФГДГ из печени контрольных животных. АМР оказывал существенный активирующий эффект на фермент из печени контрольной группы животных (~37%), но не влиял на активность фермента опытной группы (рис. 5).



**Рисунок 5.**

Влияние некоторых нуклеотидов на активность 6ФГДГ из печени контрольных (1) и подвергнутых токсическому гепатиту крыс (2): а - NAD, б - ADP, в - AMP (50 мМ трис-НСl-буфер, рН 8,0; 1 мМ ЭДТА, 0,5 мМ β-меркаптоэтанол, 1 мМ 6-фосфоглюконат и 0,12 мМ NADP).



Исследование влияния ряда интермедиатов углеводного обмена показало, что фруктозо-1,6-бисфосфат и галактоза практически не влияют на активность 6ФГДГ как в условиях нормы, так и при патологии. Рибозо-5-фосфат оказывает слабый ингибирующий эффект в концентрациях 0,8-1 мМ на фермент, выделенный из печени животных контрольной группы, но не влияет на фермент при гепатите. Глюкоза незначительно активирует фермент из печени крыс контрольной группы.

Можно предположить, что различия каталитических свойств 6ФГДГ, выделенной из печени контрольных животных и крыс с токсическим гепатитом, могут быть обусловлены действием АФК, генерация которых значительно усиливается в условиях окислительного стресса, вызванного развитием патологического состояния. Известно, что АФК способны воздействовать на активность многих ферментов за счет окисления SH-групп или остатков триптофана или атомов металлов переменной валентности, входящих в состав их активных центров [21,22]. Имеются данные об активации NADH-оксидазы, ингибировании аконитатгидратазы,  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы и ряда других ферментов под действием АФК [23]. В связи с этим представляют интерес также данные об изменениях активности ферментов под влиянием шаперонов, синтез которых усиливается при оксидативном стрессе [24]. Так, полагают, что шапероны sHsp могут каким-то образом активировать или стабилизировать 6ФГДГ [25].

Полученные нами данные свидетельствуют, что несмотря на увеличение активности ключевого фермента ПФП - 6ФГДГ в условиях окислительного стресса, вызванного развитием токсического гепатита, активность 6ФГДГ снижается. Это сопровождается изменениями ряда кинетических параметров каталитического действия и регуляции активности фермента.

Авторы выражают глубокую благодарность академику В.П.Скулачеву и профессору Б.И.Курганову за ценные замечания и консультации при обсуждении данных.

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

## ЛИТЕРАТУРА

1. Дудник Л.Б., Вуксна Л.М., Майоре А.Я. (2000) *Вопр. мед. химии*, **46**, 597-609.
2. Park K.I. (2000) *Yonsei Med. J.*, **41**, 825-835.
3. Кения М.В., Лукаш А.И., Гуськов Е.П. (1993) *Успехи соврем. биол.*, **113**, 456-470.
4. Кулинский В.И. (1993) *Успехи соврем. биол.*, **113**, 107-122.
5. Осипов А.Н., Азизова О.А., Владимиров Ю.А. (1990) *Успехи соврем. биол.*, **31**, 180-204.
6. Пашков А.Н., Попов С.С., Семенихина А.В. (2005) *Бюлл. экспер. биол.мед.*, **139**, 520-524.
7. Jain M., Cui L., Brenner D.A. (2004) *Circulation*, **109**, 898-903.
8. Salvemini F., Franze A., Iervolino A. (1999) *J. Biol. Chem.*, **204**, 2750-2757.
9. Leopold J.A., Zhang Y., Scribner A.W. (2003) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **23**, 411-417.
10. Puskas F., Gergely P., Banki K. (2000) *FASEB J.*, **14**, 1352-1362.
11. Федорова Н.Ю. (1999) Состояние системы глутатионпероксидазы-глутатионредуктазы в стимулированном к регенерации органе и её роль в клеточной пролиферации. Дисс.канд.биол.наук, ВГУ, Воронеж.
12. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. (1997) В кн. *Современные методы в биохимии*. М., с. 63-64.
13. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randal R.J. (1951) *J. Biol.Chem.*, **193**, 265-275.

## 6-ФОСФОГЛЮКОНАТДЕГИДРОГЕНАЗА ПРИ ГЕПАТИТЕ

14. Дэвис Г. (1970) Электрофорез, Мир. М.
15. Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. (1996) Anal. Chem., **68**, 850-858.
16. Benov L., Fridovich I. (1998) J. Biol.Chem., **273**, 25741-25744.
17. Маглыш С.С., Горбач З.В., Островский Ю.М. (1982) Биохимия, **47**, 2035-2041.
18. Gordillo E., Ayala A., Bautista J. (1989) J. Biol.Chem., **264**, 17024-17028.
19. Курганов Б.И., Петушкова Е.В. (1992) Биохимия, **57**, 348-361.
20. Сафонова О.А., Попова Т.Н., Артюхов В.Г. (2005) Биомед. химия, **51**, 311-321.
21. Halliwell B., Gutteridge J.M. (1986) Arch. Biochem. Biophys., **246**, 501-514.
22. Fridovich I. (1995) Annu. Rev. Biochem., **64**, 97-112.
23. Панасенко О.О., Ким М.В., Гусев Н.Б. (2003) Успехи биол. химии, **43**, 59-98.
24. Veinger L., Diamant S., Buchner J. (1998) J. Biol.Chem., **273**, 11032-11037.
25. Preville X., Salvemini F., Giraud S. et al. (1999) Exp. Cell Res., **247**, 61-78.

Поступила: 10. 12. 2005.

## CATALYTIC PROPERTIES OF 6-PHOSPHOGLUCONATE DEHYDROGENASE FROM RAT LIVER IN NORMAL STATE AND DURING TOXIC HEPATITIS

*M.M. Sviridov, A.V. Semenikhina, T.N. Popova*

Voronezh State University, Voronezh, Universitetskaya pl., 1; fax: (4732)208-755;  
e-mail:semenikhina@bio.vsu.ru, tpopova@bio.vsu.ru

Experimental toxic hepatitis is accompanied by a decrease of 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD, 1.1.1.44) activity in rat liver. Enzyme preparations of 6PGD, obtained from livers of control group rats and animals with toxic exhibit the same molecular mass of  $114.2 \pm 5.8$  kDa. However G6PD isolated from liver of animals with toxic hepatitis exhibited altered  $K_m$  and pH-optimum values. Reduced glutathione inhibited 6PGD-activity from the liver of control group rats and did not affect the enzyme from liver of animals with toxic hepatitis. Inhibition effect of oxidized glutathione is stronger in the pathological state. Malate, citrate, 2-oxoglutarate and isocitrate activated the enzyme from control animals, but did not the enzyme isolated from animals with hepatitis. Regulation of 6PGD-activity from liver of control and experimental animals by some nucleotides (NAD, ADP, AMP) and ribose-5-phosphate was also different.

**Key words.** rat, liver, oxidative stress, 6-phosphogluconate dehydrogenase, properties.