

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК: 577.152.1:616
©Коллектив авторов

КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ГЛУТАТИОНРЕДУКТАЗЫ ИЗ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ В НОРМЕ И ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ

А.А. Азарков, Т.Н. Попова, А.В. Семенихина*

Воронежский государственный университет, биолого-почвенный факультет,
кафедра аналитической и медицинской биохимии и микробиологии,
Университетская пл., 1394693, Воронеж; тел.: (0732) 20-82-78;
факс: (0732) 20-87-55; эл. почта: tpopova@bio.vsu.ru

С использованием гомогенных препаратов глутатионредуктазы (ГР, КФ 1.6.4.2.), полученных из печени крыс контрольной группы и животных с токсическим гепатитом, исследованы каталитические свойства этого фермента. Ряд свойств фермента не изменялся в условиях патологии: электрофоретическая подвижность ($R_f=0,23\pm 0,01$), молекулярная масса ($104\pm 5,20$ кДа), рН-оптимум реакции ($7,4\pm 0,37$), близкими были значения рК функциональных групп. Вместе с тем, выявлено снижение сродства фермента к субстрату и коферменту и возникновение субстратного ингибирования в условиях патологии. Обнаружены также особенности регуляции активности ГР под действием ряда метаболитов цикла трикарбоновых кислот.

Ключевые слова: глутатионредуктаза, токсический гепатит, свойства, регуляция активности.

ВВЕДЕНИЕ. Согласно современным представлениям, развитие многих органопатий, в том числе токсических поражений печени, сопровождается гиперпродукцией активных форм кислорода и истощением антиоксидантной системы организма (АОС) [1]. Данный процесс сопряжен с активацией свободнорадикальных процессов (СРП), нарушениями в свойствах биомембран и функционировании клеток, приводящими к окислительному стрессу [2, 3].

В контроле СРП важнейшее место занимает глутатионовая система, включающая глутатион, глутатионпероксидазу и глутатионредуктазу (ГР, КФ 1.6.4.2.). Данная система в клетках млекопитающих обеспечивает детоксикацию H_2O_2 , который является основным источником гидроксильного радикала, образующегося в присутствии Fe^{2+} в реакции Фентона [4, 5].

ГР – распространенный флавиновый фермент [6, 7], катализирующий обратимое NADPH-зависимое восстановление окисленного глутатиона (GSSG) [8]. Биологическая роль ГР заключается в поддержании высокой внутриклеточной концентрации восстановленного глутатиона (GSH) без увеличения его синтеза.

* - адресат для переписки

В последнее время значительное внимание уделяется созданию специфических ферментных биотест-систем с использованием ГР для оценки целевой биологической активности адаптогенной и антиоксидантной направленности в фармакологически активных веществах [9]. В настоящее время в литературе имеются данные относительно каталитических свойств фермента из тканей животных [10] и человека [11] в условиях нормы. Однако, особенности функционирования данного фермента при патологии печени остаются недостаточно исследованными.

В связи с этим целью данной работы явилось исследование кинетических свойств и регуляции активности ГР из печени крысы в условиях нормы и токсического гепатита.

МЕТОДИКА. В качестве объекта исследования использовали печень белых лабораторных крыс (*Rattus rattus L.*) массой 150-200 г, содержащихся на стандартном рационе вивария. Для получения гомогената навеску печени гомогенизировали в 4-х кратном объеме охлажденной среды выделения (0,1 мМ трис-НСI-буфер (рН 7,6), содержащий 1 мМ ЭДТА, 1% β-меркаптоэтанол). Гомогенат центрифугировали при 7000 г в течение 12 мин.

Для создания модели экспериментального токсического гепатита использовали четыреххлористый углерод, который является органоспецифическим токсином, обладающим гепатотропным эффектом. После суточной пищевой депривации крысам с помощью специального зонда в пищевод вводили CCl_4 в виде раствора в вазелиновом масле. Воздействие осуществляли в дозе 0,064 мл на 100 г веса животного [12]. Максимальный цитолиз гепатоцитов наблюдался на 3-4 сутки после однократного введения CCl_4 [13]. Печень крысы, подвергнутой токсическому гепатиту, извлекали под наркозом после многократного перфузирования ледяным физиологическим раствором и использовали для дальнейших исследований.

Активность фермента определяли спектрофотометрически на СФ-56 при 340 нм. О скорости реакции судили по падению оптической плотности в результате окисления NADPH. Измерение активности проводили в 50 мМ калий-фосфатном буфере (рН=7,4), содержащем 1 мМ ЭДТА, 0,80 мМ окисленный глутатион, 0,16 мМ NADPH. За единицу активности (Е) принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкмоль продукта реакции за 1 мин при 25°C. Реакцию начинали внесением ферментного препарата. Содержание белка определяли по методу Лоури и соавт. [14].

Для получения ферментного препарата ГР из печени крысы был разработан метод очистки, включающий несколько стадий: фракционирование белков сульфатом аммония в пределах насыщения 40-70%, гель-фильтрацию на сефадексе G-25 (fine, 1,50×20 см), ионообменную хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе (1,20×13 см), концентрирование с помощью ячейки ("Amicon", США), хроматографию на колонке с Тоуорpearl HW – 65 (2,20×65 см).

Молекулярную массу фермента определяли методом гель-хроматографии на Тоуорpearl HW-65 с использованием калибровочного графика элюции белков-маркеров: фосфорилазы *b*, бычьего сывороточного альбумина, яичного альбумина, карбоангидразы.

Гомогенность активной фракции фермента определяли с помощью электрофореза, который проводили в 7,5% полиакриламидном геле (ПААГ) по методу Дэвиса [15]. Универсальное окрашивание белков в геле осуществляли с использованием нитрата серебра [16]. Все этапы выделения и очистки фермента осуществляли при температуре 0°-4°C.

Опыты проводили в 3-4-кратной биологической повторности, аналитические определения для каждой пробы – в двух повторностях. Данные обрабатывали с использованием стандартных статистических методов [17].

В работе использовали следующие реактивы и материалы: Сефадекс G-25, ("Pharmacia", Швеция), ДЭАЭ-целлюлозу DE-52 ("Whatman", Великобритания),

трис, голубой декстран (“Serva”, Германия), GSSG (“ICN”, США), NADPH, ЭДТА, (“Sigma”, США). Остальные реактивы отечественного производства марки “ч.д.а.” или “х.ч.”.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ. Активность ГР в гомогенате печени крыс, подвергнутых интоксикации CCl_4 , увеличивалась в 2,1 раза по сравнению с контрольной группой животных (табл. 1), что, вероятно, связано с адаптивной реакцией организма в ответ на повышение интенсивности свободнорадикального окисления, сопровождающее развитие патологического процесса. Для выявления особенностей регуляции активности фермента в условиях нормы и при патологии был разработан метод очистки фермента. С помощью 108- и 105-кратных очисток были получены ферментные препараты ГР из печени контрольных и подвергнутых гепатиту крыс с удельной активностью 1,19 и 2,42 Е/мг белка, соответственно. При окрашивании пластинок ПААГ после электрофореза с помощью нитрата серебра фермент как в норме, так и при патологии проявлялся в виде одной основной полосы с электрофоретической подвижностью $R_f = 0,23 \pm 0,01$, что свидетельствует о гомогенности ферментного препарата (рис. 1). Получение фермента в высокоочищенном состоянии позволило исследовать ряд его кинетических и регуляторных свойств.

Таблица 1. Результаты очистки глутатионредуктазы из печени крыс контрольной группы и подвергнутых токсическому гепатиту.

Стадия очистки	Условия опыта	Общая активность Е _{общ}	Количество белка, мг	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат	норма	2,67±0,13	243±10	0,011±0,0006	100	1
	гепатит	6,4±0,32*	276±13*	0,023±0,001*	100	1
Фракционирование (NH ₄) ₂ SO ₄	норма	2,44±0,12	198±9,9	0,013±0,0007	91	1,2
	гепатит	6,1±0,3*	203±10,2*	0,037±0,002*	95	1,6
Хроматография на сефадексе G-25	норма	2,29±0,11	115,0±5,8	0,02±0,001	86	1,82
	гепатит	5,44±0,3*	109,0±5,5*	0,05±0,003*	85	2,2
Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	норма	1,21±0,06	1,98±0,1	0,6±0,03	45	54,5
	гепатит	1,85±0,15*	1,65±0,08*	1,12±0,056*	29	49
Ультрафильтрация с помощью мембран Amicon	норма	0,94±0,05	1,23±0,06	0,76±0,04	18	69
	гепатит	1,79±0,09*	1,25±0,06*	1,43±0,7*	17	62
Хроматография на Toyopearl HW-65	норма	0,25±0,01	0,21±0,01	1,19±0,06	9,3	108
	гепатит	0,61±0,03*	0,25±0,03*	2,42±0,12*	9,5	105

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

ГЛУТАТИОНРЕДУКТАЗА ПЕЧЕНИ В НОРМЕ И ПРИ ГЕПАТИТЕ

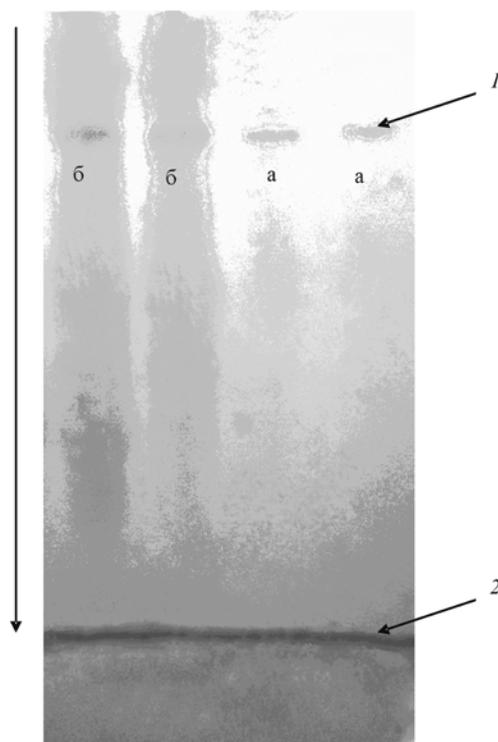


Рисунок 1.

Электрофореграмма ферментных препаратов глутатионредуктазы из печени контрольных животных (а) и подвергнутых экспериментальному токсическому гепатиту крыс (б): глутатионредуктаза (1); маркерная зона (бромфеноловый синий) (2). Направление движения белка указано стрелкой.

Определенная с помощью хроматографии на Toyopearl HW-65 молекулярная масса нативного фермента из печени контрольных крыс и животных, подвергнутых токсическому гепатиту составила $104 \pm 5,20$ кДа (рис. 2). По литературным данным, ГР из эритроцитов человека и печени мышей представляет собой димер с молекулярной массой 105 кДа [18-20].

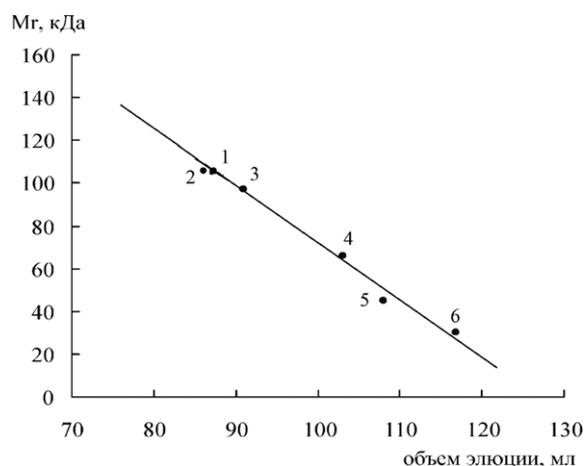


Рисунок 2.

Определение молекулярной массы глутатионредуктазы: 1 – из печени контрольных животных, 2 – подвергнутых экспериментальному токсическому гепатиту; маркерные белки: фосфоорилаза *b* (3), бычий сывороточный альбумин (4), яичный альбумин (5), карбоангидраза (6).

На очищенных препаратах ГР была изучена зависимость скорости реакции от концентраций субстрата (GSSG) и кофермента (NADPH) в норме и при токсическом гепатите. Величины K_m по отношению к GSSG и NADPH представлены в таблице 2. Необходимо отметить, что ингибирующий эффект GSSG характерен только для фермента из печени крыс экспериментальной группы. Очевидно, субстратное ингибирование в условиях патологии может проявляться при накоплении окисленной формы глутатиона. Константа субстратного ингибирования фермента окисленным глутатионом составляет $0,67 \pm 0,034$ мМ. В то же время субстратное ингибирование NADPH имело место для ГР из печени обеих групп животных (табл. 2).

Таблица 2. Кинетические характеристики глутатионредуктазы из печени крыс в норме и при развитии токсического гепатита.

	K_m , мМ		K_s , мМ		рН	рК
	GSSG	NADPH	GSSG	NADPH		
норма	$0,23 \pm 0,012$	$0,20 \pm 0,100$	-	$0,11 \pm 0,006$	$7,40 \pm 0,37$	$6,97 \pm 0,349$; $7,84 \pm 0,392$
гепатит	$0,71 \pm 0,036^*$	$1,70 \pm 0,085^*$	$0,67 \pm 0,034$	$0,06 \pm 0,003^*$	$7,40 \pm 0,37$	$6,95 \pm 0,348$; $7,75 \pm 0,388^*$

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

Показано, что рН–оптимум для ГР как в норме, так и при патологии составляет $7,4 \pm 0,37$. Рассчитанные по методу Курганова и сотр. [21] значения рК функциональных групп фермента из печени крыс контрольной группы и животных с интоксикацией CCl_4 близки к рК имидозольной группы гистидина и сульфгидрильной группы цистеина (табл. 2).

Ранее в нашей лаборатории было показано, что образование восстановительных эквивалентов для функционирования глутатионовой системы в условиях интенсификации СРО наряду с ферментами пентозофосфатного пути могут осуществлять NADP-зависимые изоцитратдегидрогеназа и малатдегидрогеназа [22]. В связи с этим с целью выявления возможных путей координации функционирования ГР и NADPH-генерирующих ферментов было проведено исследование влияния субстратов и продуктов данных реакций на активность ГР как в норме, так и в патологическом состоянии.

Исследование влияния изоцитрата на активность ГР показало, что максимальный активирующий эффект имеет место при $0,30$ мМ концентрации интермедиата как для фермента из печени крыс контрольной группы, так и животных, подвергнутых токсическому гепатиту. При дальнейшем повышении концентрации данного метаболита имеет место снижение активирующего эффекта для ГР из печени обеих групп животных. Ингибирование фермента наблюдается при концентрации изоцитрата свыше $0,80$ мМ и $0,55$ мМ в условиях нормы и при патологии соответственно. Степень ингибирования выше для фермента из печени крыс контрольной группы (рис. 3а). В данном случае константа ингибирования составила $0,25$ мМ, тип ингибирования – конкурентный. При токсическом гепатите ингибирование имело смешанный характер, $K_i = 1,20$ мМ (рис. 4). По-видимому, особенности регуляции активности ГР субстратом ИДГ-реакции могли бы способствовать повышению активности фермента в патологическом состоянии. В связи с этим интересно отметить, что удельная активность NADP-ИДГ возрастает при токсическом гепатите в $1,4$ раза [23].

ГЛУТАТИОНРЕДУКТАЗА ПЕЧЕНИ В НОРМЕ И ПРИ ГЕПАТИТЕ

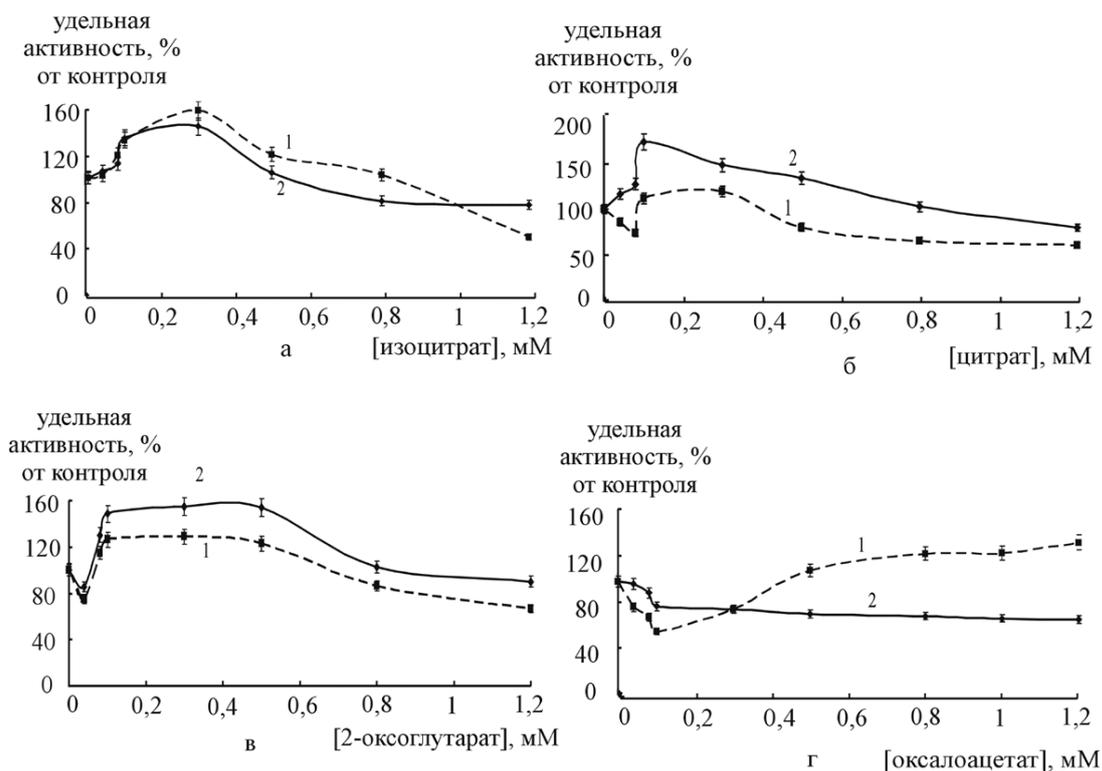


Рисунок 3.

Влияние интермедиатов цикла Кребса (а – изоцитрата, б – цитрата, в – 2-оксоглутарата, г - оксалоацетата) на активность глутатионредуктазы из печени крысы в норме (1) и при экспериментальном токсическом гепатите (2).

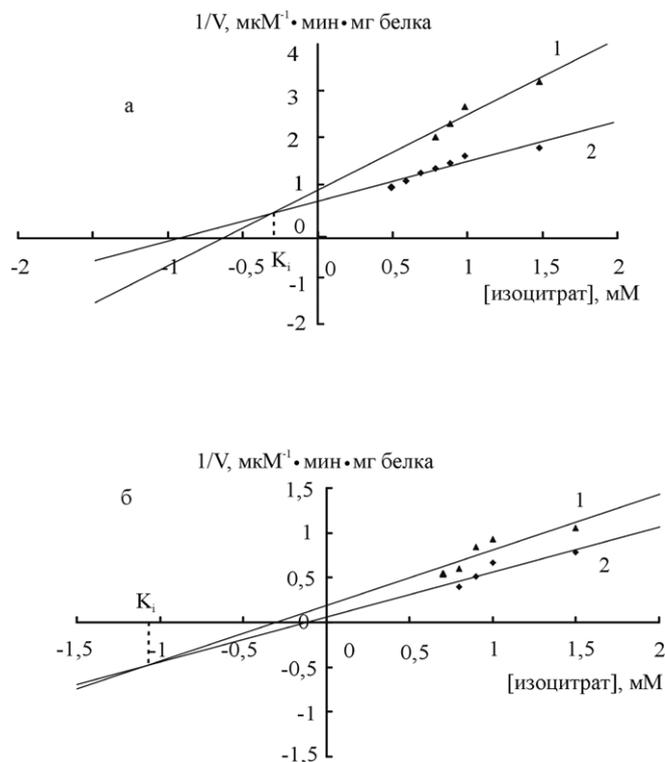


Рисунок 4.

Определение типа и констант игибирования глутатионредуктазы из печени крыс изоцитратом в норме (а) и при токсическом гепатите (б) при фиксированных концентрациях окисленного глутатиона: 1 – 0,4 мМ; 2 – 0,8 мМ.

Обратимую реакцию превращения изоцитрата в цитрат катализирует аконитатгидратаза (КФ 4.2.1.3), которой принадлежит решающая роль в регуляции накопления цитрата. При токсическом гепатите в печени крыс происходит снижение активности данного фермента в 3 раза, причем содержание цитрата увеличивается в 1,3 раза [24]. Нами показано, что при развитии патологии цитрат активирует ГР во всём диапазоне исследуемых концентраций (рис. 3б), что, вероятно, может иметь регуляторное значение в условиях повышения содержания цитрата в клетке при развитии оксидативного стресса, сопровождающего развитие токсического гепатита [25]. Причем, по отношению к ГР из печени интактных животных, цитрат в концентрациях до 0,10 мМ выступает в качестве ингибитора фермента, при этом активность снижается на 40% от исходного уровня. Однако, в диапазоне концентраций от 0,15 до 0,40 мМ активность фермента увеличивается в 1,3 раза. При дальнейшем увеличении концентрации метаболита вновь наблюдается ингибирование фермента. Так, при 1 мМ концентрации цитрата активность фермента составляет 55% от исходной.

Продукт ИДГ-реакции, 2-оксоглутарат (рис. 3в), при концентрации до 0,10 мМ вызывает снижение активности фермента как в норме, так и при развитии токсического гепатита. При дальнейшем повышении концентрации данного метаболита наблюдается повышение ГР-активности, причем максимальный активирующий эффект наблюдается в диапазоне концентраций от 0,10 до 0,50 мМ как в условиях нормы, так и при патологии. При концентрации метаболита свыше 0,8 мМ имеет место ингибирование ГР из печени крыс контрольной группы.

При исследовании регуляции активности фермента с помощью оксалоацетата было выявлено, что при низких концентрациях данный метаболит вызывает ингибирование ферментативной активности как в условиях нормы, так и при развитии токсического гепатита. При концентрации интермедиата свыше 0,45 мМ наблюдается активация ГР из печени крыс контрольной группы, в то время как для фермента из пораженной гепатотоксином печени имеет место усиление ингибирующего эффекта (рис. 3г).

Таким образом, для ГР из печени крысы характерны существенные особенности каталитического действия в условиях развития токсического гепатита: появление субстратного ингибирования, изменение K_m по отношению к GSSG и NADPH, а также регуляции активности фермента под действием некоторых интермедиатов цикла Кребса. Полученные данные свидетельствуют о возможности координации функционирования исследуемого фермента с данным метаболическим путем в условиях, приводящих к интенсификации свободнорадикальных процессов в клетке.

Работа поддержана Программой “Развитие научного потенциала высшей школы” РНП.2.1.1.4429

ЛИТЕРАТУРА

1. Шустанова Т.А., Бондаренко Т.И., Милютин Н.П., Михалева И.И. (2001) Биохимия, **66**, 780-789.
2. Осипов А.Н., Азизова О.А., Владимиров Ю.А. (1990) Успехи биол. химии, **31**(2), 180-208.
3. Владимиров Ю.А. (2000) Соросовский образовательный журнал, **6**(12), 13-19.
4. Oshino N., Chance B. (1977) Biochem. J., **162**, 509-525.
5. Skulachev V.P. (1997) Biosci. Rep., **17**, 347-366.
6. Верболович В.П., Подгорная Л.М. (1987) Лаб. дело, №2, 17-20.
7. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. (1990) Успехи совр. биологии, №1, 20-31.
8. Andersen H.R., Saum B., Nybo H., Nielsen S.B., Anderssen-Ranberg K., Grandjean Ph. (1998) Age and Ageing, **27**, 643-648.

ГЛУТАТИОНРЕДУКТАЗА ПЕЧЕНИ В НОРМЕ И ПРИ ГЕПАТИТЕ

9. Дим К. (1996) Фармацевтик, **2**, 15-17
10. Carlberg I., Mannervik B. (1975) J. Biol. Chem., **250**, 5475-5480.
11. Becker K. (1995) J. Biochem., **234**, 472-478.
12. Сидорова В.Ф., Рябина З.А., Лейкина Е.М. (1966) Регенерация печени у млекопитающих, Медицина, М.
13. Федорова Н.Ю. (1999) Состояние системы глутатионпероксидазы-глутатионредуктазы в стимулированном к регенерации органе и её роль в клеточной пролиферации. Дисс. канд. биол. наук, Воронеж.
14. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951) J. Biol. Chem., **193**, 265-275.
15. Davis B.J., Jones R.G., Farmer G.R. (1964) N.Y. Acad. Sci., **121**, 404-407.
16. Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. (1996) Anal. Chem., **68**, 850-858.
17. Ллойд Э., Ледерман У. (1990) Справочник по прикладной статистике, Фин. и стат М.. с. 493-513.
18. Чернов Н.Н. (1986) Биохимия, **54**, 762-769.
19. Lopez-Varea J., Lee C.Y. (1979) Eur. J. Biochem., **98**, 487-499.
20. Чернов Н.Н. (1997) 2 Съезд Биохим. об-ва РАН, Москва, с. 77.
21. Курганов Б.И., Петушкова Е.В. (1992) Биохимия, **57**, 348-361.
22. Медведева Л.В., Попова Т.Н., Артюхов В.Г., Пинейру де Карвалью М.А.А. (2002) Биохимия, **67**, 838-849.
23. Пашков А.Н., Попов С.С., Семенихина А.В., Рахманова Т.Н. (2005) Бюлл. эксперим. биол. и мед., **139**, 520-524.
24. Пашков А.Н., Попов С.С., Семенихина А.В., Матасова Л.В., Попова Т.Н. (2005) Проблемы эндокринологии, **51**(6), 41-43.
25. Freminet A. (1981) Comp. Biochem. and Physiol., **70**, 427-430.

Поступила 14. 12. 2007.

CATALYTIC PROPERTIES OF GLUTATHIONE REDUCTASE FROM RATS LIVER AT NORM AND TOXIC HEPATITES

A.A. Agarkov, T.N. Popova, A.V. Semenikhina

Voronezh State University, Biology and Soil Science Faculty, Universitetskaya sq., 1, Voronezh, 394693
Russia; tel.: (0732) 20-82-78; fax: (0732) 20-87-55; e-mail: tpopova@bio.vsu.ru

Homogeneous preparations of liver glutathione reductase (GR, EC 1.6.4.2.), obtained from control rats and animals with toxic hepatitis, catalytic properties of this enzyme have been investigated. A number of the enzyme properties did not change under conditions of hepatitis. These included electrophoretic mobility ($R_f=0,23\pm 0,01$), molecular mass ($104\pm 5,20$ kDa), pH-optimum ($7,4\pm 0,37$). There was similarity in pK values of functional groups. At the same time, decrease in affinity of enzyme to a substrate and coenzyme and occurrence substrate-linked inhibition was observed under conditions of this pathology. There were some differences in regulation of GR activity by metabolites of tricarboxylic acid cycle.

Key words: glutathione reductase, toxic hepatitis, properties, activity regulation.