

УДК 577.152.9

РОЛЬ АДЕНИННУКЛЕОТИДОВ В РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ И МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ NADP-ИЗОЦИТРАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ КАРДИОМИОЦИТОВ КРЫСЫ

© 2001 г. Л.В.Медведева, Т.Н.Попова, В.Г.Артюхов, Л.В.Магасова

Воронежский государственный университет

С использованием электрофоретически гомогенных ферментных препаратов исследования активности NADP-изоцитратдегидрогеназы (КФ 1.1.1.42) из цитоплазматической (цNADP-ИДГ) и митохондриальной (мNADP-ИДГ) фракций миокарда крысы под действием адениннуклеотидов в условиях нормы и ишемии. Установлено, что в норме АТФ является ингибитором, а АДФ – активатором мNADP-ИДГ, однако данные метаболиты не влияют на активность цитоплазматической изоформы фермента. Показано, что в условиях 20- и 45-минутной ишемии для специфически компартиментализованных форм NADP-ИДГ характерны существенные изменения регуляции активности под действием АТФ и АДФ.

Среди различных метаболических нарушений при ишемии миокарда наиболее значительные изменения происходят в системе окислительного метаболизма вследствие недостатка дыхательных субстратов [1]. Эти изменения соответствуют ранним стадиям ишемического повреждения и приводят к нарушению окислительного фосфорилирования и энергетического обмена кардиомиоцитов в целом. Общеизвестным является факт, что при ишемии изменяется соотношение АДФ/АТФ. Это может иметь существенное значение для регуляции активности специфически компартиментализованных форм ферментов и оказывать влияние на интенсивность протекания биосинтетических процессов клетки. Особый интерес представляет изучение влияния адениннуклеотидов на активность фермента, ответственного за поставку NADPH для процессов биосинтеза жирных кислот, аминокислот и функционирования глутатионредуктазной системы кардиомиоцитов, – NADP-зависимой изоцитратдегидрогеназы (NADP-ИДГ, К.Ф. 1.1.1.42.). Образование NADPH в реакции, катализируемой NADP-ИДГ, сопряжено с окислительным декарбоксилированием изоцитрата до 2-оксоглутарата. Существует предположение, что реакции, катализируемой NADP-ИДГ, отводится основная роль в восполнении фонда NADPH в сердечной мышце животных [2]. Имеются данные об особенностях функционирования NADP-ИДГ в ряде объектов растительного и животного происхождения, в том числе для фермента, выделенного из сердца [3, 4]. В последние годы появился ряд работ, в которых предметом интенсивных исследований и дискуссий стал вопрос о вовлечении NADP-ИДГ

в координацию процессов углеродного и азотного обмена, так как продукт данной реакции, 2-оксоглутарат, может являться предшественником важнейших аминокислот – глутамата и глутамина [4]. Однако исследования изменений NADP-ИДГ при ишемии единичны и сводятся лишь к определению ферментативной активности при различных патологических состояниях. Работы по изучению особенностей регуляции активности NADP-ИДГ в условиях ишемии практически отсутствуют. В этой связи целью данной работы явилось исследование регуляции активности NADP-ИДГ из сердечной мышцы крысы в норме и при ишемии под действием адениннуклеотидов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали сердечную мышцу белых крыс-самцов, содержащихся на стандартном рационе вивария. Масса животных составляла 250-300 г. Ишемию миокарда воспроизводили путем окклюзии нисходящей ветви левой коронарной артерии на уровне левого ушка предсердия в течение 20 и 45 минут [5].

Активность NADP-ИДГ определяли спектрофотометрически. О скорости ферментативной реакции судили по возрастанию оптической плотности при 340 нм в результате восстановления NADP в процессе окислительного декарбоксилирования изоцитрата. Определение активности NADP-ИДГ проводили в среде спектрофотометрирования следующего состава: 50 ммоль/л трис-НСl-буфер, рН 7.6, содержащий 0.1 ммоль/л $MnCl_2$, 0.05 ммоль/л изоцитрат, 0.4 ммоль/л NADP. За единицу

активности принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкмоль/л продукта за 1 мин. при 25°C. Общее количество белка определяли по методу Лоури [6].

Разделение клеточных фракций и исследование субклеточной локализации NADP-ИДГ осуществляли методом дифференциального центрифугирования [7]. Для этого навеску сердечной мышцы гомогенизировали в охлажденной фарфоровой ступке в 3-х-кратном объеме среды выделения следующего состава: 50 ммоль/л трис-НСI-буфер, рН 7,6, 10 ммоль/л ЭДТА, 0,3 моль/л сахараза, 0,5 ммоль/л β-меркаптоэтанол. Гомогенат фильтровали через слой капрона с квадратными ячейками (0,1 мм) и центрифугировали при 3500g в течение 10 минут для отделения неразрушенных тканевых элементов и мембран кардиомиоцитов. Супернатант центрифугировали при 15000 g в течение 20 минут. Осадок, содержащий, в основном, митохондрии, ресуспендировали в среде следующего состава: 50 ммоль/л трис-НСI-буфер, рН 7,6, содержащий 0,175 моль/л КСI, и повторно центрифугировали при 15000 g в течение 15 мин. Солюбилизацию NADP-ИДГ осуществляли в гомогенизаторе Поттера-Эльвейгельма в среде 50 ммоль/л трис-НСI-буфера, рН 7,6, содержащего 0,1 ммоль/л ЭДТА, 0,5 ммоль/л β-меркаптоэтанол, 20 % глицерина и 1 % тритона X-100. В надосадочной жидкости, представляющей собой цитоплазматическую фракцию кардиомиоцитов, и в полученном митохондриальном осадке определяли активность NADP-ИДГ, а также маркерных ферментов: сукцинатдегидрогеназы (митохондриальный маркер) [8], и лактатдегидрогеназы (цитозольный маркер) [9].

Очистку NADP-ИДГ из цитоплазматической (цNADP-ИДГ) и митохондриальной (мNADP-ИДГ) фракций миокарда нормальных и подвергнутых ишемии животных проводили по схеме, включающей несколько стадий.

Белки цитоплазматической фракции миокарда фракционировали сульфатом аммония, выделяя фракцию, выпадающую в осадок в пределах насыщения $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 30-60 %. Полученный осадок ресуспендировали в 1 мл среды выделения вышеуказанного состава, не содержащей сахарозы.

На следующей стадии очистки как митохондриальную фракцию, так и цитоплазматическую высоленную фракцию подвергали гель-фильтрации через колонку с сефадексом G-25 (Fine, 1.4 x 20 см). Элюцию NADP-ИДГ осуществляли буфером следующего состава: 10 ммоль/л трис-НСI-буфер, рН 7,8, содержащий 0,5 ммоль/л β-меркаптоэтанол и 0,1 ммоль/л ЭДТА. Дальнейшую очистку цNADP-ИДГ и мNADP-ИДГ проводили с помощью ионообменной хроматографии на колонке с ДЭАЭ-цел-

люлозой (0,5 x 13 см). Десорбцию фермента осуществляли путем ступенчатого повышения концентрации КСI. Затем использовали гель-хроматографию на сефадексе G-150 (45 x 2 см). Все процедуры выделения и очистки фермента осуществляли в холодной камере при температуре 0...+4 °С.

Электрофорез проводили в 7,5 % ПААГ по методу Дэвиса [10]. При проявлении на белок гели окрашивали кумасси голубым R-250.

Полученные ферментные препараты использовали для сравнительного исследования регуляции активности NADP-ИДГ адениннуклеотидами в условиях нормы и ишемии.

Опыты проводили в 3-х-кратной биологической повторности. Аналитические определения для каждой пробы - в 2-х-кратной повторности. Для определения достоверности результатов применяли метод вариационной статистики. Данные обрабатывали с использованием стандартных статистических методов [11].

Использовали следующие реактивы и материалы: сефадексы G-25, G-150, (Pharmacia, Швеция); ДЭАЭ-целлюлоза (Serva, Германия); трис (Serva, Германия); изоцитрат (Sigma, Германия), NADP, ADP, ATP (Reanal, Венгрия). Остальные реактивы - отечественного производства марки "ч.д.а." или "х.ч."

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В таблице представлены данные по изучению субклеточной локализации NADP-ИДГ в кардиомиоцитах нормальных и подвергнутых экспериментальной 45-минутной ишемии крыс. Было показано, что наибольшее количество фермента как в нормальном, так и ишемизированном миокарде содержится в цитоплазме (~85%). Около 15% общей активности фермента связано с митохондриальной фракцией. Активности маркерных ферментов митохондрий и цитоплазмы - сукцинатдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы - свидетельствовали, что перекрестное загрязнение субклеточных фракций не превышало характерные для данного метода показатели [7]. Активность NADP-ИДГ в цитоплазме кардиомиоцитов при ишемии возрастала в 1,8 раза, в митохондриальной фракции - в 2,5 раза. В этой связи следует отметить, что ранее в некоторых работах отмечалось, что в условиях гипоксии и ишемии имеет место повышение активности NADP-ИДГ в тканях животных. Так, в цитоплазме клеток коры головного мозга крыс активация NADP-ИДГ при ишемии составляет 43% [12]. Однако возможные механизмы данной активации в условиях ишемии оставались не изученными. Исходя из полученных данных, можно предполагать, что перераспределение NADP-ИДГ-активности между субклеточными фракциями миокарда, очевидно, не

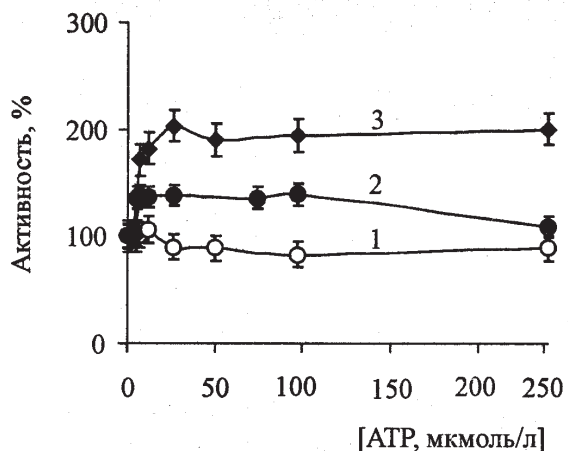


Рис. 1. Влияние АТР на активность цитоплазматической NADP-изоцитратдегидрогеназы из нормального (1) и подвергнутого экспериментальной ишемии в течение 20 (2) и 45 минут (3) миокарда крысы

имеет места при ишемии и, следовательно, одной из вероятных причин повышения активности NADP-ИДГ в условиях ишемии, по-видимому, является активация фермента в результате изменения некоторых его регуляторных свойств. С использованием электрофоретически гомогенных ферментных препаратов цNADP-ИДГ и мNADP-ИДГ, полученных в результате 111,8- и 86,0-кратной очистки из нормального и 104,8- и 77,0-кратной - из ишемизированного миокарда крысы, была осуществлена сравнительная характеристика регуляции активности фермента с помощью адениннуклеотидов в норме и при патологии.

Результаты исследования влияния адениннуклеотидов на скорость реакции, катализируемой NADP-ИДГ

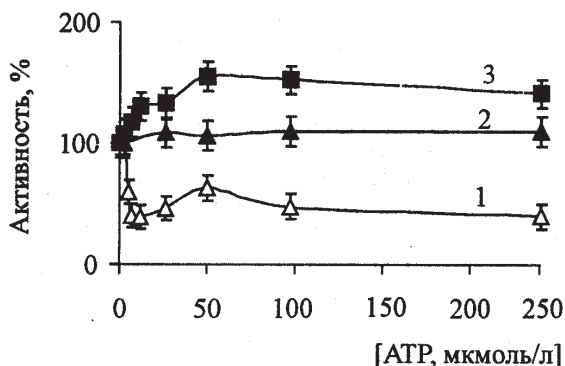


Рис. 2. Влияние АТР на активность митохондриальной NADP-изоцитратдегидрогеназы из нормального (1) и подвергнутого экспериментальной ишемии в течение 20 (2) и 45 минут (3) миокарда крысы

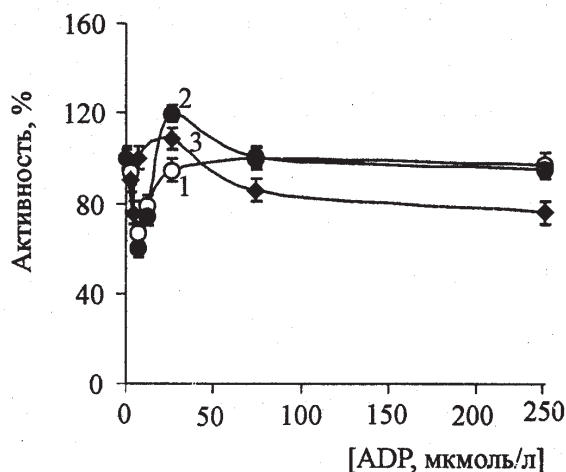


Рис. 3. Влияние АДФ на активность цитоплазматической NADP-изоцитратдегидрогеназы из нормального (1) и подвергнутого экспериментальной ишемии в течение 20 (2) и 45 минут (3) миокарда крысы

из субклеточных фракций нормального миокарда крысы, выявили различную чувствительность изоформ по отношению к АТР и АДФ. АТР в диапазоне концентраций 10-250 мкмоль/л практически не влияет на цNADP-ИДГ, но ингибирует мNADP-ИДГ (рис. 1, 2). Напротив, АДФ в концентрациях 75-250 мкмоль/л не оказывает влияния на активность цNADP-ИДГ, однако вызывает активацию мNADP-ИДГ (рис. 3, 4). Таким образом, мNADP-ИДГ в норме характеризуется большей чувствительностью к регулируемому воздействию адениннуклеотидов по сравнению с цитоплазматической.

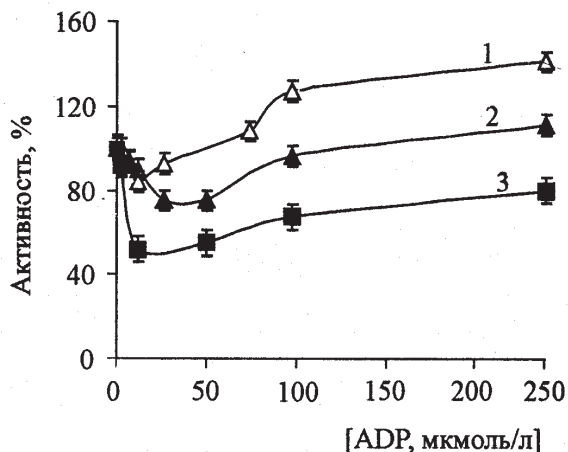


Рис. 4. Влияние АДФ на активность митохондриальной NADP-изоцитратдегидрогеназы из нормального (1) и подвергнутого экспериментальной ишемии в течение 20 (2) и 45 минут (3) миокарда крысы

В ходе исследования было обнаружено также существование отличий в характере влияния адениннуклеотидов на активность различно локализованных форм фермента в зависимости от длительности ишемии. Выявлено, что активация цNADP-ИДГ, выделенной из подвергнутого 20-минутной ишемии миокарда крысы, происходит под действием ADP при концентрациях 50-75 мкмоль/л (рис. 3). Для цNADP-ИДГ из кардиомиоцитов, подвергнутых 45-минутной ишемии, ADP повышает активность фермента при более низких концентрациях: 25-50 мкмоль/л.

Как уже отмечалось выше, активность мNADP-ИДГ в норме, в отличие от цNADP-ИДГ, значительно повышается при концентрациях ADP 75-250 мкмоль/л. В условиях же 20-минутной ишемии происходит снижение степени активирующего эффекта ADP на мNADP-ИДГ в среднем на 20% по сравнению с нормой. После 45-минутной ишемии в присутствии ADP наблюдается ингибирование активности мNADP-ИДГ (степень ингибирования при концентрации ADP, равной 50 мкмоль/л, составляет 55%) (рис. 4).

Показано, что АТФ во всем диапазоне исследуемых концентраций повышает активность цNADP-ИДГ из миокарда крыс, подвергнутых экспериментальной ишемии в течение 20 и 45 мин. Так, при 100 мкмоль/л концентрации АТФ активность фермента увеличивается на 40% и 90% соответственно (рис. 1). Для мNADP-ИДГ из кардиомиоцитов крыс, подвергнутых 20-минутной ишемии, при концентрации АТФ выше 10 мкмоль/л имеет место снижение степени ингибирующего воздействия, наблюдаемого в норме (рис. 2). После 45-минутной ишемии миокарда под действием АТФ происходит стимуляция мNADP-ИДГ, как и цитоплазматической формы фермента, в диапазоне концентраций метаболита 10-250 мкмоль/л.

Таким образом, очевидно, что адениннуклеотиды могут играть существенную роль в регуляции активностей цитоплазматической и митохондриальной

NADP-ИДГ из кардиомиоцитов крыс как в норме, так и при ишемии. Отличия в регуляции активностей цNADP-ИДГ и мNADP-ИДГ, по-видимому, связаны с определенным физиологическим значением различно локализованных форм фермента. Выявленные эффекты действия АТФ и АДФ на ферментативную активность при ишемии, по всей видимости, могут способствовать стимуляции функционирования NADP-ИДГ, что имеет значение для обеспечения NADPH ряда биосинтетических процессов, а также глутатионредуктазной/глутатиопероксидазной антиоксидантной системы кардиомиоцитов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Розумна Н.М. // Украинський біохім. журн. 1974. Т. 46. № 3. С. 295-298.
2. Pfeifer R., Rarl G., Scholz R. // Biol. Chem. Hopp-Seyler. 1986. V. 367. P. 1061-1068.
3. Seelig, G.F., Colman, R.F. // Arch. Biochem. Biophys. 1978. V. 188. P. 394-409.
4. Popova T.N., Pinheiro de Carvalho, M.A.A. // Biochim. Biophys. Acta. 1998. V. 1364. P. 307-325.
5. Браунвальд Ю., Мароко П.Р., Либби П. Метаболизм миокарда. Под ред. Чазова Е. М. Медицина. 1975. С. 391-409.
6. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R. // J. Biol. Chem. 1951. V. 194. P. 265-271.
7. Johnson D., Lardy H. // Methods in enzymology. 1967. V. 10. P. 94-102.
8. Cooper T.G., Beevers H. // J. Biol. Chem. 1969. V. 224. P. 3507 - 3513.
9. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. М. Высш. шк. 1980. 273 с.
10. Davis B.J. // N.Y. Acad. Sci. 1964. V. 121. P. 404-407.
11. Ллойд Е., Ледерман У. Справочник по прикладной статистике. М. Финансы и статистика. 1990. 525 с.
12. Pastushko A., Gromek A. // Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. Sci. Biol. 1976. V. 24. P. 415-422.