

УДК 577.152.1

НЕКОТОРЫЕ РЕГУЛЯТОРНЫЕ СВОЙСТВА ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ ПЕЧЕНИ КРЫС В НОРМЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ

© 2004 г. М.В. Левенкова, Т.Н. Попова, А.В. Семенихина, С.В. Назарова

Воронежский государственный университет

При развитии токсического гепатита содержание продуктов перексидного окисления липидов – диеновых конъюгатов и малонового диальдегида увеличивается \approx в 3 раза. Показано, что интенсификация свободнорадикального окисления сопровождается возрастанием активности Г6ФДГ. Выявлено, что на четвертый день развития токсического гепатита активность фермента увеличивается в 2 раза. Путем очистки с помощью фракционирования сульфатом аммония, гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-25 и ионнообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе получены препараты Г6ФДГ из печени контрольных и подвергнутых токсическому гепатиту крыс, очищенные в 14,4 и 21,6 раз. Выход составил 12,3 и 19,4% соответственно. С использованием очищенных препаратов изучено влияние ряда нуклеотидов и пероксида водорода на Г6ФДГ в условиях нормы и токсического гепатита.

ВВЕДЕНИЕ

В условиях физиологической нормы процессы свободнорадикального окисления (СРО) находятся под контролем антиоксидантной системы (АОС) организма. Однако при избыточной генерации активных форм кислорода (АФК), вследствие действия ионизирующей радиации, инфекционных агентов, токсинов, ишемии и других патологических факторов, процесс СРО принимает каскадный характер, что приводит к липид-липидным и белок-липидным нарушениям в структуре клеточных мембран, разобщению процессов окислительного фосфорилирования и сопряженного с ним тканевого дыхания и, как результат, к тяжелому дисбалансу метаболизма. При болезнях печени несмотря на многообразие этиологических факторов на субклеточном уровне выявляются однотипные механизмы деструкции, среди которых особую роль играют процессы СРО с участием АФК [1,2].

Утилизация АФК осуществляется ферментативной и неферментативной АОС, важное место в которой отводится глутатионредуктазной / глутатионпероксидазной (ГР/ГП) АОС. Эффективность функционирования данной системы, обеспечивающей детоксикацию пероксида водорода зависит от уровня в клетке НАДФН, который в основном определяется активностью пентозофосфатного пути (ПФП) [3]. Данные об особенностях функционирования ключевого фермента ПФП – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ, КФ 1.1.1.49) при реорганизации метаболизма в условиях интенсификации процессов СРО ограничены. Выявление этих аспектов позволит по-

лучить сведения о регулировании скорости протекания реакции, катализируемой Г6ФДГ, в условиях окислительного стресса. В связи с этим целью настоящей работы стало исследование особенностей регуляции каталитической активности Г6ФДГ в условиях физиологической нормы и при экспериментальном токсическом гепатите (ЭТГ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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. Максимальный цитолиз гепатоцитов наблюдался на 3-4 сутки после однократного введения CCl_4 [4]. 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 ммоль/л трис-НСI буфер (рН 7,8), содержащей 3 ммоль/л глюкозо-6-фосфата, 1 ммоль/л $MgCl_2$, 0,25 ммоль/л НАДФ. О скорости протекания реакции судили по возрастанию оптической плотности опытных образцов в результате восстановления НАДФ 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 мг белка. Содержание белка определяли по методу Лоури [5].

Определение содержания диеновых конъюгатов (ДК) осуществляли спектрофотометрически в экстрагированной гептановой фазе липидов при 233 нм [6]; малонового диальдегида (МДА) – по качественной реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой при 532 нм [7].

Очистка цитоплазматической Г6ФДГ из гепатцитов крыс включала несколько этапов.

Навеску ткани печени гомогенизировали в 4-х кратном объеме среды выделения следующего состава: 50 ммоль/л трис-НСI буфер (рН 7,8), содержащий 1 ммоль/л ЭДТА, 1% β-меркаптоэтанол. Гомогенат фильтровали и центрифугировали при 3000 г в течении 10 минут. Осадок, содержащий в основном клеточные стенки, отбрасывали. Надосадочную жидкость вновь центрифугировали при 13000 г в течении 15 минут. 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 (1,5x20 см). В качестве элюирующей среды для Г6ФДГ использовали 10 ммоль/л трис-НСI буфер (рН 7,8), содержащий 1% β-меркаптоэтанол и 0,5 ммоль/л 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 (1,2x 13 см), уравновешенную буфером, используемым в ходе очистки на предварительной стадии. Для очистки Г6ФДГ использовали ступенчатый градиент концентраций КСI

в элюирующем буфере. Десорбция Г6ФДГ из печени контрольных животных происходила в диапазоне концентраций КСI 150-200 ммоль/л, а фермента, выделенного из пораженной токсическим гепатитом печени, в градиенте концентраций КСI 100-150 ммоль/л, что свидетельствует о различиях в хроматографических свойствах исследуемого фермента.

Полученные данные анализировали с помощью t-критерия Стьюдента при 95% уровне значимости [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что пероксидное окисление липидов (ПОЛ) – постоянно протекающий в организме процесс, при действии ряда факторов приобретает патогенетический характер [9]. В основе механизма токсического действия четыреххлористого углерода лежит существование в печени гомолитического пути распада тетрахлорметана $\text{CCl}_4 \rightarrow \text{CCl}_3 + \text{Cl}^{\bullet}$ [4]. Радикалы-метаболиты повреждающего агента инициируют процессы пероксидного окисления ненасыщенных жирных кислот в мембранах клеток печени [3]. Нами было проведено исследование содержания первичных и вторичных продуктов ПОЛ – ДК и МДА в гомогенате печени крыс в динамике развития токсического гепатита. Из данных, представленных в таблице 1, следует, что в ходе развития токсического гепатита происходит увеличение содержания ДК и МДА приблизительно в 1,5 раза на 1-2 сутки и в ≈ 3 раза на 3-4 сутки после однократного введения гепатотоксина.

Интенсификация ПОЛ, наблюдаемая при развитии ЭТГ была сопряжена с возрастанием ферментативной активности Г6ФДГ. Так, на четвертые сутки после введения четыреххлористого углерода активность фермента увеличивалась почти в 2 раза (рис.1). Вероятно, существует взаимосвязь между активацией ключевого фермента ПФП – Г6ФДГ в условиях окислительного стресса и функционированием ГР/ГП системы.

В результате 14,4- и 21,6- кратной степени очистки нами были получены частично очищенные пре-

Таблица 1

Содержание продуктов пероксидного окисления липидов в печени крыс в норме и при экспериментальном токсическом гепатите (ЭТГ)

Условия опыта	Диеновые конъюгаты, моль/г сырой массы * 10^{-5}	Малоновый диальдегид моль/г сырой массы * 10^{-5}
норма	0,843 ± 0,042	0,200 ± 0,010
1 день развития ЭТГ	0,980 ± 0,049	0,288 ± 0,014
2 день развития ЭТГ	1,950 ± 0,097	0,320 ± 0,016
3 день развития ЭТГ	2,460 ± 0,123	0,417 ± 0,021
4 день развития ЭТГ	2,600 ± 0,130	0,580 ± 0,029

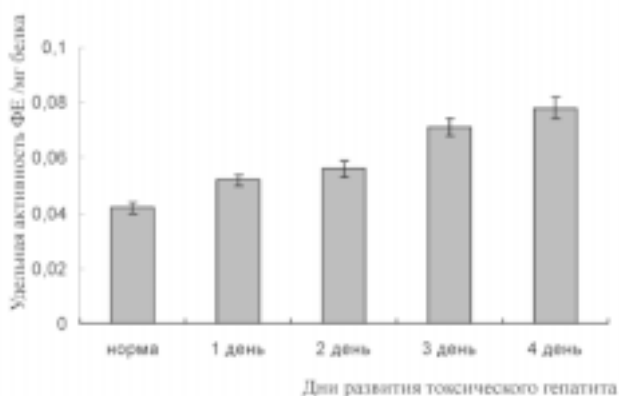


Рис.1. Изменение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в печени крысы при развитии токсического гепатита.

параты Г6ФДГ из печени контрольных и подвергнутых ЭТГ крыс с удельной активностью 1,02 и 2,64 ФЕ на мг белка соответственно. Выход составил 12,3 и 19,4% (табл.2).

С использованием очищенного ферментного препарата Г6ФДГ проведено сравнительное изучение

регуляции активности фермента под воздействием нуклеотидов и пероксида водорода.

Установлено, что H_2O_2 подавляет функциональную активность фермента во всем диапазоне исследуемых концентраций (0,02-2 мМоль/л) (рис.2). Однако, при токсическом гепатите степень ингибирования Г6ФДГ значительно уменьшалась. Снижение ингибирующего действия пероксида водорода, возможно, способствует стимуляции функционирования Г6ФДГ в условиях интенсификации свободнорадикальных процессов, в связи с необходимостью возрастания темпов обеспечения ГР/ГП системы гепатоцитов НАДФН.

Было исследовано влияние адениннуклеотидов (АТФ и АДФ) на активность Г6ФДГ, выделенной из печени контрольных и подвергнутых токсическому гепатиту животных. Показано, что АТФ во всем диапазоне исследуемых концентраций (0,02-2 ммоль/л) подавляет активность фермента, как в условиях нормы, так и при патологии печени. Следует отметить, что при концентрациях нуклеотида 0,02-0,12 ммоль/л наблюдался более значительный ингибирующий эффект на функционирование Г6ФДГ из печени крыс, подвергнутых токсическому гепатиту. Однако, с по-

Таблица 2

Очистка глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы из печени контрольных и подвергнутых токсическому гепатиту крыс

Стадия очистки	Условия опыта	Объем фракции, мл	Общая активность, ФЕ	Кол-во белка, мг	Удельная активность, ФЕ/мг белка	Выход %	Степень очистки
Гомогенат	норма	12,4	3,98 ± 0,199	56,00 ± 2,80	0,071 ± 0,003	100,0	1,0
	токсический гепатит	11,8	6,63 ± 0,331	58,70 ± 2,90	0,122 ± 0,006	100,0	1,0
Фракционирование $(NH_4)_2SO_4$	норма	2,2	2,12 ± 0,106	5,91 ± 0,29	0,359 ± 0,017	53,2	5,1
	токсический гепатит	2,0	2,45 ± 0,122	6,00 ± 0,30	0,410 ± 0,020	36,9	3,4
Гель-фильтрация на сефадексе G-25	норма	8,0	2,15 ± 0,107	5,72 ± 0,27	0,376 ± 0,015	54,0	5,3
	токсический гепатит	8,0	2,56 ± 0,128	5,79 ± 0,26	0,440 ± 0,021	38,6	3,6
Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	норма	10,0	0,49 ± 0,024	0,48 ± 0,02	1,021 ± 0,052	12,3	14,4
	токсический гепатит	10,0	1,29 ± 0,060	0,49 ± 0,02	2,64 ± 0,124	19,4	21,6

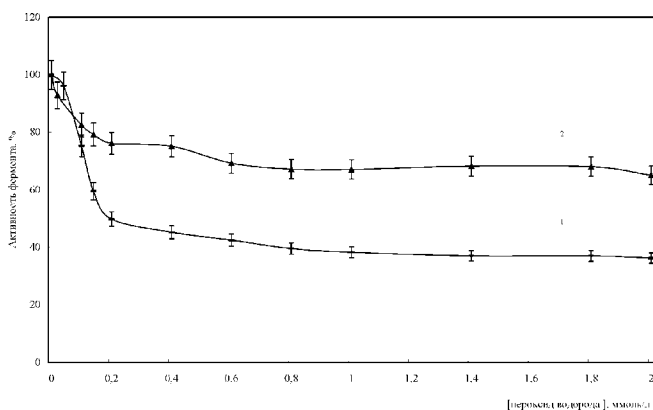


Рис.2. Влияние пероксида водорода на активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, выделенной из печени контрольных (1) и подвергнутых токсическому гепатиту (2) крыс.

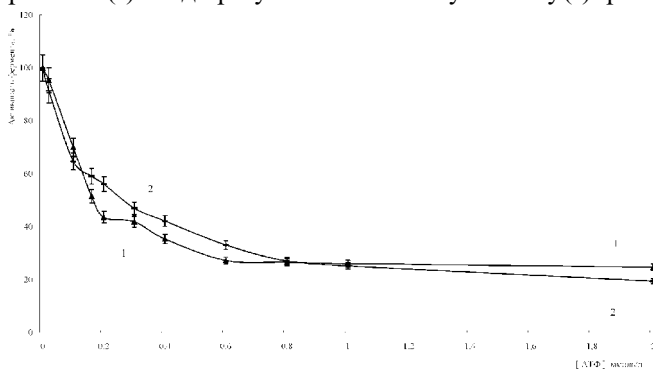


Рис.3. Влияние АТФ на активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в норме (1) и при токсическом гепатите (2).

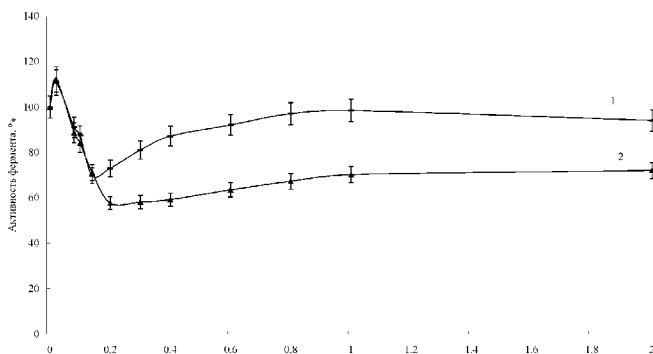


Рис.4. Влияние АДФ на активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в норме (1) и при токсическом гепатите (2).

вышением концентрации АТФ уменьшение функциональной активности Г6ФДГ было более выражено в условиях нормы. Для фермента из пораженной гепатотоксином печени было обнаружено более значительное ингибирующее действие АДФ (рис.3). Наиболее сильно выраженный ингибирующий эффект наблюдался при концентрациях АДФ от 0,1 до 0,2 ммоль/л. При более высоких концентрациях нуклеотида степень ингибирования снижалась. Отмече-

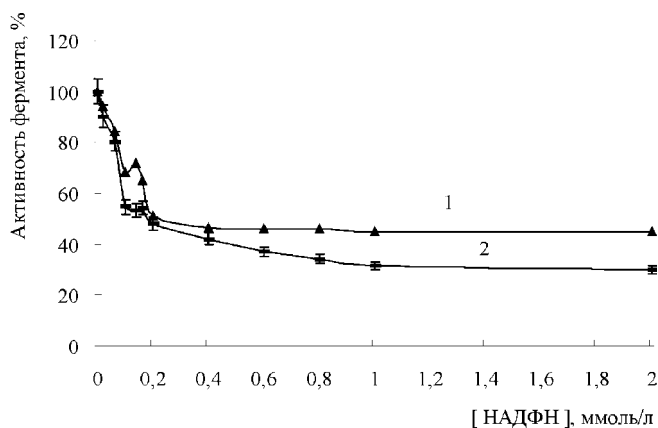


Рис.5. Влияние НАДФН на активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, выделенной из печени контрольных (1) и подвергнутых токсическому гепатиту (2) крыс.

но, что при низких концентрациях АДФ (0,02-0,06 ммоль/л) наблюдалось незначительное повышение активности Г6ФДГ как в условиях нормы, так и при токсическом гепатите.

Результаты исследования воздействия НАДФН, являющегося одним из продуктов реакции, на активность Г6ФДГ показали, что данный нуклеотид также оказывает заметное влияние на скорость ферментативной реакции (рис.4). Для фермента из патологически измененной печени наблюдается более выраженное угнетение ферментативной активности, чем в норме.

Выявленные особенности функционирования Г6ФДГ из печени крыс при развитии токсического гепатита свидетельствуют об изменении механизмов регуляции активности данного фермента в условиях активации СРО.

Работа поддержана грантом программы "Университеты России" УР 07.01.004.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Биленко М.В.* Ишемические и реперфузионные повреждения органов. / М.В Биленко – М.: Медицина, 1989.-368с.
2. *Владимиров Ю.А., Арчаков А.И.* Перекисное окисление липидов в биомембранах. / Ю.А. Владимир, А.И. Арчаков – М.: Наука, 1972.-252с.
3. *Гулак П.В.* Гепатоцит: функционально-метаболические свойства/ П.В. Гулак, А.М. Дудченко, В.В. Зайцев и др. – М.: Наука, 1985.-268с.
4. *Федорова Н.Ю.* Состояние системы глутатионпероксидазы-глутатионредуктазы в стимулированном к регенерации органе и ее роль в клеточной пролиферации: Дисс. канд. биол. наук/ Н.Ю. Федорова. – Воронеж, 1999.-С.44-45.

5. *Lowry O.* Protein measurement with the Folin-Phenol reagent/ *O. Lowry* , *N. Rosebrough*, *A. Farr* // *J. Biol. Chem.*- 1951.-V.194, № 1.- P.265-271.

6. *Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г.* Современные методы в биохимии (под. ред. Ореховича В.Н.)/И.Д. Стальная, Т.Г. Гаришвили. – М.: Медицина, 1997. С.63-64.

7. *Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г.* Современные методы в биохимии (под. ред. Ореховича В.Н.)/И.Д. Стальная, Т.Г. Гаришвили. – М.: Медицина, 1997. С.66-68.

8. *Лакин Г.Ф.* Биометрия/ Г.Ф. Лакин – М.: Высш. школа, 1990.-351с.

9. *Сидорова В.Ф., Рябина З.А.* Регенерация печени у млекопитающих/ В.Ф. Сидорова, З.А. Рябина. – М.: Медицина. 1996. – 240с.