

УДК 599.323.4:616.127:577.15

НЕКОТОРЫЕ КИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ И РЕГУЛЯТОРНЫЕ СВОЙСТВА НАДФ-ЗАВИСИМОЙ МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ КАРДИОМИОЦИТОВ КРЫСЫ В НОРМЕ И ПРИ ИШЕМИИ

© 2004 г. О. А. Сафонова, Т. Н. Попова, Л. В. Матасова

Воронежский государственный университет

С использованием методов дифференциального центрифугирования, фракционирования сульфатом аммония, гель-фильтрации на сефадексе G-25, ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе и гель-хроматографии на сефадексе G-150 из нормального и ишемизированного миокарда крысы выделена и очищена НАДФ-зависимая малатдегидрогеназа (КФ 1.1.1.82; НАДФ-МДГ). На очищенных ферментных препаратах НАДФ-МДГ определены значения коэффициента Хилла по оксалоацетату ($1,83 \pm 0,07$ и $1,5 \pm 0,1$) и K_m по НАДФН ($0,058 \pm 0,003$ и $0,096 \pm 0,004$ ммоль/л) для фермента в норме и при ишемии соответственно. Исследовано влияние ионов Fe^{2+} , Ca^{2+} и Cu^{2+} , H_2O_2 , окисленного и восстановленного глутатиона на функционирование НАДФ-МДГ из сердца крысы в норме и при ишемии.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время считают, что в основе механизма патогенеза многих сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе и ишемической болезни сердца, лежит дисбаланс между генерированием активных форм кислорода (АФК) и функционированием антиоксидантных систем (АОС), обеспечивающих защиту клеточных структур от повреждающего действия кислородных метаболитов [1, 2]. Согласно гипотезе В. П. Скулачева (1999) в клетке в условиях гипоксии включается ряд защитных механизмов, направленных на понижение внутриклеточной концентрации АФК и ионов Fe^{2+} , обладающих прооксидантным действием [3]. В этом плане привлекают внимание ферментативные превращения малата, обеспечиваемые малатдегидрогеназой (МДГ), в связи с ключевым положением данного метаболита в цикле трикарбоновых кислот и малат-оксалоацетатном цикле, а также его важной ролью в биохимической адаптации организма к гипоксии [4]. Способность малата диффундировать в митохондрии, передавая восстановительные эквиваленты в электрон-транспортную цепь, и повышать коэффициент дыхательного контроля митохондрий сердца [5] подчеркивают его важное место в регуляции редокс-потенциала кардиомиоцитов. Все эти факты, наряду со способностью малата играть существенную роль в первичной реакции на стрессовые воздействия из-за возможности его быстрой утилизации, позволяют сделать предположение о важной роли МДГ в регуляции образования АФК в условиях окислительного стресса. Кроме того, нельзя исклю-

чить, что НАДФН, образующийся в реакции обратимого превращения малата в оксалоацетат, катализируемой НАДФ-зависимой МДГ (НАДФ-МДГ (КФ 1.1.1.82)), может использоваться глутатионредуктазной / глутатионпероксидазной АОС.

Поскольку для сердечной мышцы животных характерен высокий уровень анаболических процессов и процессов свободнорадикального окисления (СРО) с одной стороны и низкая активность ферментов пентозофосфатного пути с другой [6], то восполнение фонда НАДФН в цитоплазме клеток играет, очевидно, важную роль в метаболизме миокарда и лимитировании СРО при ишемии. В связи с вышесказанным представляет интерес исследование особенностей функционирования НАДФ-зависимой МДГ из сердечной мышцы крысы в условиях нормы и ишемии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали сердечную мышцу самцов белых лабораторных крыс, содержащихся на стандартном рационе вивария. Масса животных составляла 250-300 г. Экспериментальную ишемию миокарда (ЭИМ) моделировали путем окклюзии нисходящей ветви левой коронарной артерии в течение 40 мин.

Активность НАДФ-МДГ определяли спектрофотометрически при длине волны 340 нм. О скорости протекания реакции судили по убыванию оптической плотности в результате превращения оксалоацетата в малат, катализируемого МДГ. Определение активности НАДФ-МДГ проводили в среде спектрофотометрирования следующего состава: 50 ммоль/л трис-НСl

буфер (рН 7,1), содержащий 1 ммоль/л оксалоацетата, 0,15 ммоль/л НАДФН. За единицу ферментативной активности (ФЕ) принимали количество фермента, катализирующего превращение 1 мкмоль НАДФН за 1 минуту при температуре 25°C. Общее количество белка определяли по методу Лоури и соавт. [7]. В экспериментах использовали сердечную мышцу здоровых крыс и животных, подвергшихся воздействию ЭИМ.

Для разделения субклеточных фракций миокарда использовали метод дифференциального центрифугирования [8]. Навеску ткани сердечной мышцы гомогенизировали в 3-х-кратном объеме среды выделения следующего состава: 50 ммоль/л трис-НСI буфер (рН 7,8), содержащий 0,3 моль/л сахарозы, 1 ммоль/л ЭДТА, 2 ммоль/л β-меркаптоэтанола и 3 ммоль/л MgCl₂. Гомогенат фильтровали через слой капрона с квадратными ячейками (0,1 мм) и центрифугировали при 3500 g в течение 10 минут для отделения неразрушенных клеточных элементов и ядер. Для разделения цитоплазматической и митохондриальной фракций миокарда супернатант подвергали центрифугированию при 15000 g в течение 15 мин. Полученный супернатант, представляющий собой в основном цитоплазматическую фракцию миокарда и содержащий НАДФ-МДГ, использовали для дальнейшей очистки. Осадок, содержащий митохондрии, ресуспендировали в 50 ммоль/л трис-НСI буфере (рН 7,8), содержащем 0,175 моль/л KCl, и снова центрифугировали в вышеуказанном режиме. Полученные таким образом митохондрии разрушали обработкой 1% тритоном X-100 в среде 50 ммоль/л трис-НСI буфера (рН 7,8), содержащего 20% глицерин, 2 ммоль/л β-меркаптоэтанол, а также способом замораживания-оттаивания. В качестве маркерного фермента митохондрий использовали сукцинатдегидрогеназу (СДГ), цитоплазмы – лактатдегидрогеназу (ЛДГ). Активность маркерных ферментов субклеточных фракций миокарда определяли спектрофотометрически: СДГ – при 600 нм [9], ЛДГ – при 340 нм [10].

Очистка НАДФ-МДГ из цитоплазматической фракции нормального и ишемизированного миокарда крысы включала следующие стадии:

1. Фракционирование сульфатом аммония. Выделяли белковую фракцию, выпадающую в осадок в пределах насыщения (NH₄)₂SO₄ 30 – 75%. Осадок, полученный после 20 мин. центрифугирования при 15000 g, ресуспендировали в минимальном объеме среды следующего состава: 50 ммоль/л трис-НСI буфер (рН 7,8), содержащий 1 ммоль/л ЭДТА, 2 ммоль/л β-меркаптоэтанола и 3 ммоль/л MgCl₂.

2. Гель-фильтрация на колонке с сефадексом G-25. Для освобождения белковой смеси от низкомолекулярных примесей ее пропускали через колонку с сефадексом

G-25 (Fine, 1,4×20 см). Ферментный препарат наносили в количестве не более 20% от объема колонки. В качестве элюирующей среды для НАДФ-МДГ использовали 10 ммоль/л трис-НСI буфер (рН 7,8), содержащий 1 ммоль/л ЭДТА, 2 ммоль/л β-меркаптоэтанола. Скорость элюции составляла 20-25 мл/час.

3. Ионообменная хроматография на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой (0,8×13 см). На данной стадии очистки использовали среду элюции того же состава, что и на предыдущей. После нанесения свободного от низкомолекулярных примесей ферментного препарата на сорбент колонку промывали 20 мл среды элюции вышеуказанного состава для десорбции несвязанных белков. Элюцию фермента проводили путем ступенчатого повышения концентрации KCl в среде элюции. Десорбция НАДФ-МДГ с колонки происходила при увеличении концентрации KCl в среде элюции с 15 до 50 ммоль/л. Скорость элюции составляла 20-25 мл/час.

4. Гель-хроматография на колонке с сефадексом G-150 (2×60 см). На колонку наносили ферментный препарат объемом не более 1-3 % от общего объема колонки. Элюцию проводили со скоростью 20 мл/час средой того же состава, что и на предыдущих стадиях.

Все этапы выделения и очистки фермента осуществляли при температуре 0-4°C. опыты проводили в 3-4-кратной биологической повторности, аналитические определения в каждой пробе – в 2-х повторностях. Данные обрабатывали с использованием стандартных статистических методов [11].

В работе были использованы следующие реактивы и материалы: Tris (“Serva”, Германия), оксалоацетат, глутатион окисленный (“Sigma”, США), глутатион восстановленный (“Merck”, Германия), НАДФН, ДЭАЭ-целлюлоза (“Reanal”, Венгрия), сефадекс G-25, G-150 (“Pharmacia”, Швеция). Остальные реактивы – отечественного производства марки “ч.д.а.” или “х.ч.”

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение субклеточной локализации НАДФ-МДГ в миокарде крысы показало, что данный фермент сосредоточен в цитоплазме кардиомиоцитов, в митохондриях активности фермента не было обнаружено. Установлено, что в сердечной мышце в условиях ишемии внутриклеточная локализация НАДФ-МДГ не изменяется.

Измерение активности НАДФ-МДГ в цитоплазматической фракции ткани сердечной мышцы крысы в норме и в условиях интенсификации свободно-радикального окисления, вызванной ишемией, показало, что активность фермента увеличивается в 1,6 раз в кардиомиоцитах животных, подвергшихся воздействию ЭИМ.

Результаты очистки НАДФ-МДГ из кардиомиоцитов крысы в норме и при ишемии представлены в таблице. Из нормального и ишемизированного сердца крысы были получены очищенные в 113 и 99 раз ферментные препараты НАДФ-МДГ с удельной активностью 22,7 и 31,8 ФЕ/мг белка соответственно.

На очищенных ферментных препаратах НАДФ-МДГ из миокарда крысы были определены некоторые кинетические параметры каталитического действия и исследована регуляция активности фермента в норме и условиях ишемии. Изучение зависимости активности фермента от концентрации субстрата – оксалоацетата, и кофермента – НАДФН, показало, что НАДФ-МДГ проявляет положительную кооперативность по отношению к оксалоацетату как в норме, так и при ишемии. Значения коэффициента Хилла по оксалоацетату составили $1,83 \pm 0,07$ и $1,5 \pm 0,1$ в норме и при экспериментальной ишемии миокарда соответственно. K_m по НАДФН, опреде-

ленная в двойных обратных координатах Лайнуивера-Берка, составила $0,058 \pm 0,003$ ммоль/л в норме и $0,096 \pm 0,004$ ммоль/л в условиях ишемии. Таким образом, в условиях ишемии наблюдается снижение сродства фермента к коферменту, а также изменение коэффициента Хилла, характеризующего связывание НАДФ-МДГ с оксалоацетатом.

Из литературных данных известно, что в процессе ишемического повреждения ткани могут участвовать АФК, в частности, H_2O_2 , а также ионы двухвалентных металлов Fe^{2+} , Cu^{2+} и Ca^{2+} [3]. В нашей работе было показано, что ионы Fe^{2+} оказывают ингибирующее действие на НАДФ-МДГ как в норме, так и при ишемии. Однако НАДФ-МДГ, выделенная из ишемизированного миокарда, подвергается большему ингибирующему влиянию ионов Fe^{2+} , чем фермент из сердца контрольных животных (рис. 1).

Ионы Cu^{2+} также оказывают сильное ингибирующее влияние на НАДФ-МДГ, выделенную из сер-

Таблица

Очистка НАДФ-зависимой малатдегидрогеназы из миокарда крысы в норме и при экспериментальной ишемии

Стадия очистки	Условия опыта	Объем фракции, мл	Активность, ФЕ	Количество белка, мг	Удельная активность, ФЕ/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат	Норма	4,4	$9,87 \pm 0,46$	$48,34 \pm 2,10$	$0,20 \pm 0,01$	100	1
	Ишемия	4,6	$15,04 \pm 0,70$	$47,70 \pm 2,12$	$0,32 \pm 0,01$	100	1
Фракционирование $(NH_4)_2SO_4$	Норма	1	$4,00 \pm 0,17$	$6,75 \pm 0,30$	$0,59 \pm 0,02$	40,5	3,0
	Ишемия	1,2	$5,60 \pm 0,22$	$7,00 \pm 0,31$	$0,80 \pm 0,03$	37,2	2,5
Гель-фильтрация на сефадексе G-25	Норма	6,5	$4,13 \pm 0,19$	$5,60 \pm 0,27$	$0,74 \pm 0,03$	41,8	3,7
	Ишемия	7	$5,55 \pm 0,23$	$6,10 \pm 0,29$	$0,91 \pm 0,04$	36,9	2,8
Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	Норма	12	$2,30 \pm 0,10$	$0,45 \pm 0,02$	$5,11 \pm 0,22$	23,3	25,6
	Ишемия	12	$3,50 \pm 0,16$	$0,50 \pm 0,02$	$7,00 \pm 0,31$	23,3	21,9
Гель-хроматография на сефадексе G-150	Норма	7	$0,68 \pm 0,03$	$0,030 \pm 0,001$	$22,67 \pm 1,10$	6,9	113,4
	Ишемия	7,5	$1,27 \pm 0,06$	$0,040 \pm 0,002$	$31,75 \pm 1,58$	8,6	99,2

Примечание: в таблице обсуждаются статистически достоверные отличия при $P < 0,05$.

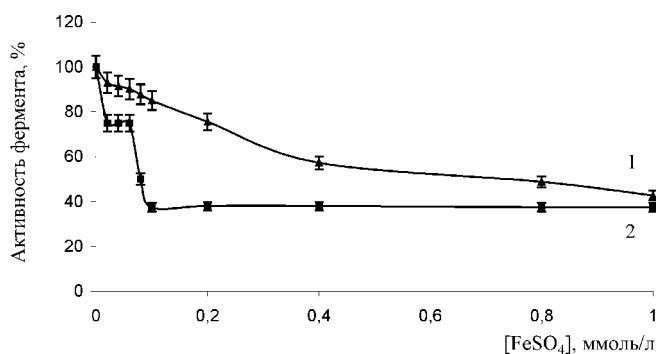


Рис. 1. Влияние ионов Fe^{2+} на активность НАДФ-МДГ из миокарда крысы в норме и при экспериментальной ишемии: 1 – норма, 2 – экспериментальная ишемия миокарда.

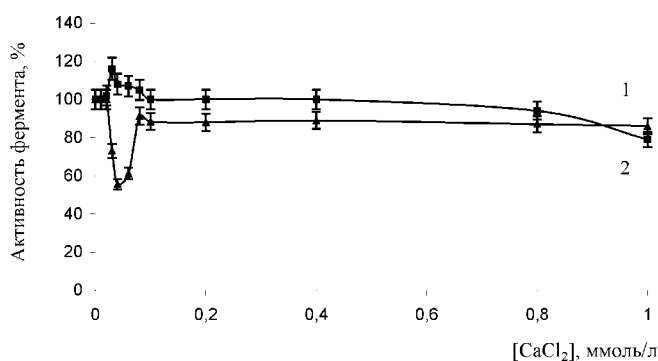


Рис. 2. Влияние ионов Ca^{2+} на активность НАДФ-МДГ из миокарда крысы в норме и при экспериментальной ишемии: 1 – норма, 2 – экспериментальная ишемия миокарда.

дца крысы, как в норме, так и при ишемии. При этом большее снижение активности наблюдается для фермента, выделенного из нормальных кардиомиоцитов крысы. Так, при концентрации CuSO_4 в среде спектрофотометрирования 0,4 ммоль/л НАДФ-МДГ из нормального сердца крысы теряет 30 % активности, в то время как фермент из ишемизированного миокарда – 20 % активности (рис. 2).

Ионы Ca^{2+} подавляют активность фермента из сердца нормальных животных, причем наиболее сильное торможение активности наблюдается при концентрации Ca^{2+} в среде до 0,1 ммоль/л. Что касается НАДФ-МДГ из ишемизированного миокарда, то ионы Ca^{2+} в концентрации до 0,08 ммоль/л оказывают активирующее влияние на фермент. При более высоких концентрациях стимулирующий эффект снижается, а при концентрациях CaCl_2 выше 0,8 ммоль/л имеет место уменьшение активности исследуемого фермента (рис. 3).

Пероксид водорода оказывает ингибирующее действие на функционирование фермента как в норме, так и в условиях ишемии, причем ингибирующий эффект H_2O_2 на активность фермента более выражен для НАДФ-МДГ, выделенной из сердца здорового живот-

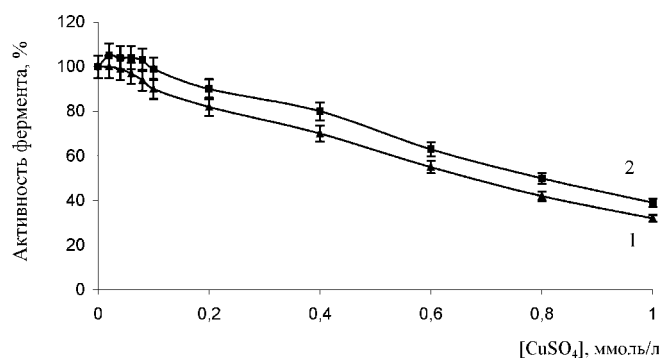


Рис. 3. Влияние ионов Cu^{2+} на активность НАДФ-МДГ из миокарда крысы в норме и при экспериментальной ишемии: 1 – норма, 2 – экспериментальная ишемия миокарда.

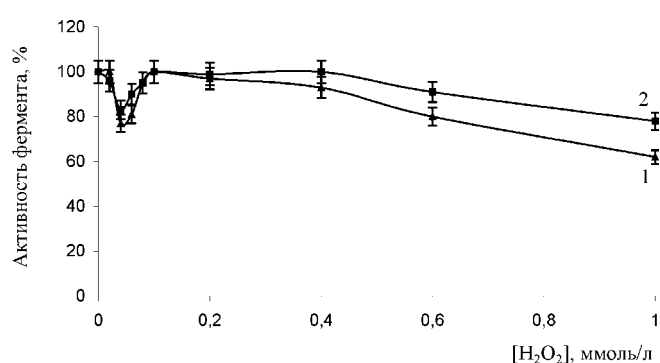


Рис. 4. Влияние H_2O_2 на активность НАДФ-МДГ из миокарда крысы в норме и при экспериментальной ишемии: 1 – норма, 2 – экспериментальная ишемия миокарда.

ного (рис. 4). Достоверные различия в ингибирующем действии пероксида водорода на функционирование НАДФ-МДГ в норме и при ишемии наблюдаются при концентрации АФК выше 0,5 ммоль/л.

Одной из АОС живого организма, функционирование которой может быть связано с рядом ферментативных систем, обеспечивающих генерирование НАДФН в клетке, является глутатионредуктазная / глутатионпероксидазная система, субстратами которой служат глутатион окисленный и восстановленный. В данной работе было проведено исследование влияния окисленного и восстановленного глутатиона на активность НАДФ-МДГ из кардиомиоцитов крысы в норме и в условиях ЭИМ.

Показано, что глутатион восстановленный слабо ингибирует исследуемый фермент в условиях нормы в концентрациях выше 0,6 ммоль/л, в то время как на фермент, выделенный из ишемизированного сердца, данный метаболит оказывает активирующее действие: активность фермента повышается более чем на 10 % в присутствии восстановленного глутатиона (рис. 5). Выявленное активирующее действие восстановленного глутатиона можно объяснить его участием в восстановлении окисленных в условиях

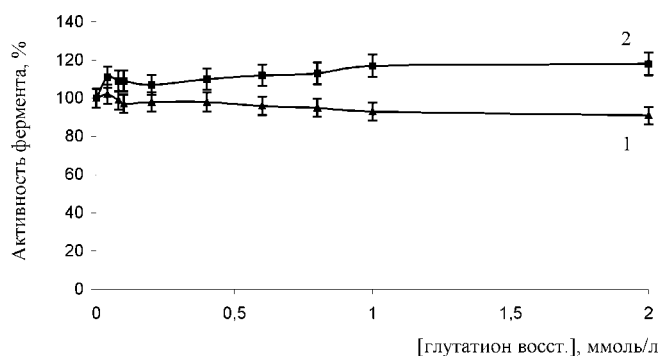


Рис. 5. Влияние глутатиона восстановленного на активность НАДФ-МДГ из миокарда крысы в норме и при экспериментальной ишемии: 1 — норма, 2 — экспериментальная ишемия миокарда.

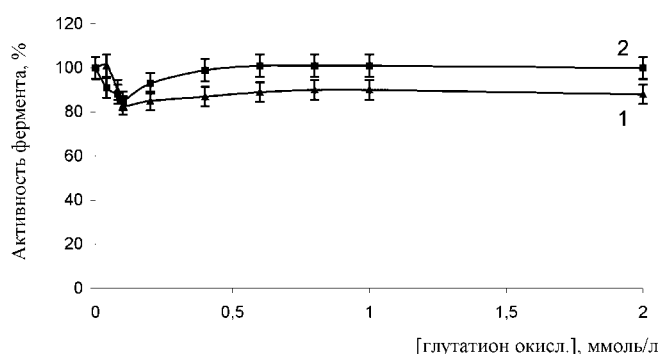


Рис. 6. Влияние глутатиона окисленного на активность НАДФ-МДГ из миокарда крысы в норме и при экспериментальной ишемии: 1 — норма, 2 — экспериментальная ишемия миокарда.

интенсификации СРО SH-групп белка. Глутатион окисленный оказывает тормозящее действие на активность НАДФ-МДГ, выделенной из кардиомиоцитов здорового животного. Так, активность фермента снижается на 18 % при концентрации данного метаболита 0,1 ммоль/л, но при дальнейшем увеличении концентрации окисленного глутатиона степень его ингибирующего действия снижается. Что касается НАДФ-МДГ из миокарда животных, подвергшихся воздействию экспериментальной ишемии, то окисленная форма глутатиона в концентрации до 0,4 ммоль/л слабо ингибирует фермент, с увеличением же концентрации ингибирующее действие данного метаболита снимается. Таким образом, выявлено, что окисленная и восстановленная формы

глутатиона оказывают различное действие на НАДФ-МДГ в норме и при ЭИМ, что может играть определенную роль с точки зрения сопряжения функционирования данного фермента с глутатионредуктазной / глутатионпероксидазной АОС.

Обобщая полученные результаты, можно предположить участие ионов ряда металлов (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+}), H_2O_2 , а также глутатиона окисленного и восстановленного в регуляции функционирования НАДФ-МДГ в условиях интенсификации свободнорадикального окисления, происходящей при ишемическом повреждении ткани. Выявленные изменения каталитических свойств исследуемого фермента могут иметь значение для регуляции клеточного метаболизма и, возможно, процессов свободнорадикального окисления, активирующихся при ишемии миокарда.

Работа поддержана грантом УР 07.01.004.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Меерсон Ф.З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. М. Медицина. 1984. 272 с.
2. Ланкин В.З., Тихазе А.К., Беленков Ю.Н. // Кардиология. 2000. Т. 7. С. 48-57.
3. Скулачев В.П. // Биохимия. 1999. Т. 64. Вып. 12. С. 1679-1688.
4. Глотов Н.А., Шмелева Л.Т. // Укр. биохим. журн. 1973. № 5. С. 605-608.
5. Малик В.И. Энергетический обмен миокарда при пороках сердца и метаболическая коррекция его нарушений: Автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. Киев. 1977. 46 с.
6. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М. Мир. 1982. Т. 3. С. 904-911.
7. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. // J. Biol. Chem. 1951. V. 194. № 1. P. 265-271.
8. Прохорова М.И. Методы биохимических исследований. Л. Изд-во ЛГУ. 1982. 272 с.
9. Cooper T.G., Beevers H. // J. Biol. Chem. 1969. V. 244. № 13. P. 3507-3513.
10. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. М. Высш. шк. 1980. 272 с.
11. Ллойд Э., Ледерман У. Справочник по прикладной статистике. М. Финансы и статистика. 1990. С. 493 – 513.