

ОЧИСТКА И НЕКОТОРЫЕ КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ГЛУТАТИОНПЕРОКСИДАЗЫ ИЗ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ В НОРМЕ И ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ

К. К. Шульгин, Т. И. Рахманова, Т. Н. Попова, А. А. Агарков

Воронежский государственный университет

С помощью гель-фильтрации на сефадексе G-25, ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе, концентрирующей ячейки Millipore, гель-хроматографии на Toyopearl HW-65, были получены высокоочищенные ферментные препараты глутатионпероксидазы из печени интактных и подвергнутых экспериментальному токсическому гепатиту крыс. Исследованы некоторые каталитические свойства фермента в норме и в патологическом состоянии.

ВВЕДЕНИЕ

Научные исследования последних лет привели к формированию новых знаний о молекулярных механизмах развития многих патологий, в том числе и заболеваний печени, согласно которым универсальным звеном патогенеза является окислительный стресс — дисбаланс между интенсивностью свободнорадикального окисления (СРО) и функциональной активностью антиоксидантной системы (АОС) организма [1]. Чрезмерная продукция активных форм кислорода (АФК) в ткани печени при многих патологических состояниях, и в том числе при токсическом гепатите, приводит к окислительным повреждениям нуклеиновых кислот, белков, липидов, что ведет к нарушению клеточного метаболизма и гибели гепатоцитов [2]. Центральное место в системе ферментативной антиоксидантной защиты занимает глутатионпероксидаза (ГП; К.Ф. 1:11.1.9.), катализирующая реакцию детоксикации органических и неорганических пероксидов без образования свободных радикалов, используя в качестве донора водорода восстановленный глутатион [3]. Изучению ферментных процессов посвящено не мало научных работ. Однако в настоящее время актуальными остаются исследования, позволяющие получить сведения об особенностях функционирования ферментов при различных патологических состояниях. В связи с этим целью работы стала очистка ГП из печени интактных крыс и подвергнутых экспериментальному токсическому гепатиту (ЭТГ) и изучение некоторых каталитических свойств фермента.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объекта исследования использовались лабораторные белые крысы (*Rattus rattus L.*),

© Шульгин К. К., Рахманова Т. И., Попова Т. Н., Агарков А. А., 2007

самцы, массой 180—200 г. Животные содержались на стандартном рационе питания в виварии.

Активность фермента определяли на СФ-56 при 340 нм. Реакционная среда для определения активности ГП имела следующий состав: 50 ммоль/л калий-фосфатный буфер (рН 7,4), содержащий 1 ммоль/л ЭДТА, 0,13 ммоль/л NADPH, 0,5 ммоль/л восстановленного глутатиона (GSH), 0,37 ммоль/л H_2O_2 , 1 ед/мл глутатионредуктазы (ГР). Реакцию начинали добавлением ферментного препарата. О скорости протекания реакции судили по уменьшению оптической плотности опытных образцов в результате окисления NADPH в ходе протекания сопряженных ферментативных реакций: образования окисленного глутатиона под действием ГП, и его последующего восстановления, взаимосвязанного с окислением NADPH под действием ГР [2].

За единицу ферментативной активности (Е) принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкмоль продукта за 1 мин. при 25 °С. Содержание белка определяли по методу Lowry (1951) [4].

Токсическое поражение печени вызывали путем индуцирования экспериментального токсического гепатита CCl_4 , являющегося органоспецифичным токсином, в дозе 0,064 мл на 100 г веса, после суточной пищевой депривации животных. Максимальный цитолиз гепатоцитов имел место на 3—4 сутки после однократного введения токсина. Выделение печени осуществляли на 4-й день после введения CCl_4 (~ через 84 часа) [5]. Печень у животных извлекали под наркозом после перфузирования физиологическим раствором. Для получения гомогената навеску печени гомогенизировали в 4-х кратном объеме охлажденной среды выделения (0,1 моль/л трис-HCl-буфер (рН 7,8),

содержащий 1 ммоль/л ЭДТА, 1% β -меркаптоэтанол). Гомогенат центрифугировали при 7000g в течение 12 мин., и супернатант использовали для дальнейшей очистки, которая включала несколько стадий:

1. Освобождение белковой смеси от низкомолекулярных примесей осуществляли с помощью гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-25 (1,7 × 20 см). Образец наносили в количестве не более 20—25% от объема колонки. В качестве элюирующей среды использовали 0,05 ммоль/л трис-HCl-буфер (рН 7,6), содержащий 1 ммоль/л ЭДТА. Скорость элюции составляла 25—30 мл/час. Каждую фракцию объемом 2—3 мл анализировали на присутствие ферментативной активности. Фракции, обладающие максимальной ферментативной активностью, объединяли и использовали для дальнейшей очистки.

2. Ионообменная хроматография на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой (1,2 × 13 см). Среда элюции имела тот же состав, что и буфер, используемый на предыдущей стадии. После сорбции белка на колонке проводили десорбцию фермента с помощью градиента KCl в той же среде элюции. Колонку промывали 50 ммоль/л KCl, что позволяло осуществить удаление сопутствующих белков на данной стадии. Для десорбции фермента использовали градиент KCl 100 ммоль/л. Скорость элюции составляла 20—25 мл/час.

3. Концентрирование ферментного препарата с помощью ячейки Millipore: использовались мем-

браны, пропускающие буферный раствор с низкомолекулярными белками (до 50 кДа). ГП, имеющая молекулярную массу около 114 кДа, оказывалась в ячейке. Полученный ферментный препарат использовали для дальнейшей очистки.

4. Фракционное разделение белков по молекулярным массам проводили на колонке с Тойопеарл HW-65. (2,2 × 65 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 °С. Опыты проводили в 7—8 кратной биологической повторяемости, аналитические определения в каждой пробе — в 2-х повторностях. Для определения достоверности результатов применяли метод вариационной статистики [6].

В работе использовали следующие реактивы и материалы: Сефадекс G-25, («Pharmacia», Швеция), ДЭАЭ-целлюлоза DE-52 («Whatman», Великобритания), Трис («Serva», Германия), NADPH («Reanal», Венгрия), глутатион восстановленный («ICN», США), ГП («Sigma, США»). Остальные реактивы отечественного производства марки «ч.д.а.» или «х.ч.».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты очистки ГП из печени крысы в норме и при патологии представлены в таблице 1. В

Таблица 1

Очистка глутатионпероксидазы из печени интактных и подвергнутых токсическому гепатиту крыс*

Стадия очистки	Условия опыта	Общая активность Еобщ	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
гомогенат	норма	2,64 ± 0,13	0,013 ± 0,006	100	1
	гепатит	9,34 ± 0,46	0,035 ± 0,001	100	1
хроматография на сефадексе G-25	норма	2,38 ± 0,11	0,019 ± 0,0009	90	1,5
	гепатит	7,94 ± 0,39	0,077 ± 0,003	85	2,2
хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	норма	1,06 ± 0,05	0,507 ± 0,025	40	39
	гепатит	2,72 ± 0,13	1,540 ± 0,077	37	44
концентрирование с помощью ячейки Amicon	норма	0,53 ± 0,02	0,923 ± 0,046	20	71
	гепатит	2,05 ± 0,10	2,380 ± 0,119	22	68
хроматография на Тойопеарл HW-65	норма	0,185 ± 0,009	1,420 ± 0,071	7	109
	гепатит	0,747 ± 0,037	3,640 ± 0,182	8	104

* Примечание: в табл. 1, 2 обсуждаются статистические достоверные различия при $P \leq 0,05$

ходе ионообменной хроматографии фермент десорбировался с колонки в ступенчатом градиенте KCl 50—100 ммоль/л. С помощью 109- и 104-кратных очисток были получены ферментные препараты ГП из печени интактных и подвергнутых гепатиту крыс с удельной активностью 1,4 и 3,6 Е/мг белка, соответственно. Необходимо отметить, что при токсическом гепатите наблюдается увеличение активности фермента в гомогенате печени в 2,6 раз по сравнению с контрольным уровнем, что, вероятно, является физико-химическим механизмом защитной реакции организма адаптационного характера на чрезмерное образование АФК при интесификации СРО в условиях развития ЭТГ. Известно, что в процессе метаболизма CCl_4 образуется активный трихлорметильный радикал ($\text{CCl}_3\cdot$), который повреждает клеточные мембраны и стимулирует в них пероксидное окисление липидов (ПОЛ). В результате интенсификации ПОЛ при инициации СРО в гепатоцитах в большом количестве образуются гидропероксиды органических кислот и липидов, на обезвреживание которых направлена работа ГП. Экспериментально установлено, что окислительный стресс вызывает в костном мозге крыс адаптивные изменения, выражающиеся в активации ГП [7]. Изменение уровня функциональной активности ГП может быть также и результатом стимуляции ее синтеза: имеются литературные данные, свидетельствующие о том, что ГП — не конститутивный, а индуцибельный фермент, экспрессию которого усиливают, например, ионы двухвалентных металлов, высвобождающиеся из внутри- и внеклеточных депо при окислительном стрессе [8, 9]. Таким образом, в условиях ЭТГ работа АОС, по-видимому, направлена на предотвращение образования самой опасной АФК — гидроксильного радикала ($\text{OH}\cdot$) в гепатоцитах крысы путем интенсификации протекания ГП-реакций, в ходе которой происходит детоксикация пероксида водорода, способного вступать во взаимодействие с Fe^{2+} в реакции Фентона, в результате чего образуется $\text{OH}\cdot$. Кроме того, ГП превращает гидропероксиды липидов до нерадикальных продуктов, что сдерживает ПОЛ на стадии разветвления цепи.

В ходе работы был проведен подбор оптимальных условий хранения ГП и установлено, что активность фермента полностью сохраняется при хранении препарата в холодильнике, при температуре от $0\text{ }^\circ\text{C}$ до $+4\text{ }^\circ\text{C}$ в течение суток. Выявлено, что при замораживании ($-14\text{ }^\circ\text{C}$) активность фермента теряется на 75% по сравнению с исходной.

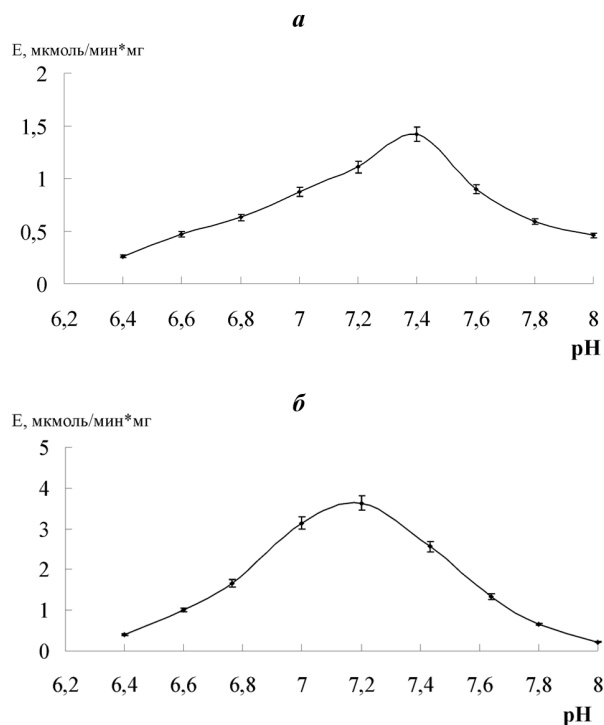


Рис. 1. Зависимость скорости реакции от концентрации ионов водорода для ГП из печени крыс контрольной группы (а) и подвергнутых токсическому гепатиту (б)

При добавлении глицерина в препарат активность ГП снижается на 40% при хранении в диапазоне температур от $0\text{ }^\circ\text{C}$ до $+4\text{ }^\circ\text{C}$, а при хранении при $-14\text{ }^\circ\text{C}$ с глицерином активность фермента теряется на 90% по сравнению с исходной.

На очищенных препаратах ГП из гепатоцитов интактных и подвергнутых ЭТГ крыс были исследованы некоторые каталитические свойства фермента.

Исследование зависимости скорости ГП-реакции от концентрации ионов водорода, показало, что фермент из печени крыс в норме проявляет максимальную ферментативную активность в диапазоне pH 7,2—7,6 (рис. 1). При этом pH оптимум составляет 7,4. Уменьшение pH до 6,8 или увеличение его до 8,0 приводит к снижению активности фермента. При патологии наблюдается смещение оптимального значения pH в более кислую сторону и составляет 7,2, что, вероятно, имеет значение для функционирования фермента в условиях ацидоза, сопровождающего развитие окислительного стресса при токсическом гепатите. В литературе встречается информация о том, что в большинстве случаев оптимум pH для ГП равен 8,5—8,8, но активность фермента измеряют обычно при pH 7,0—7,5, так как при высоких значениях pH вели-

Таблица 2
Кинетические параметры каталитического действия глутатионпероксидазы из печени крыс в условиях нормы и при экспериментальном токсическом гепатите

Группы крыс	Значения K_m , ммоль/л	
	GSH	H ₂ O ₂
Норма	0,033 ± 0,0010	0,208 ± 0,0986
Токсический гепатит	0,011 ± 0,0005	0,185 ± 0,0090

ка спонтанная реакция и ГП становится нестабильной [10].

Зависимость скорости реакции, катализируемой ГП, от концентрации субстратов подчиняется кинетике Михаэлиса-Ментен как в норме, так и при патологии. Значения константы Михаэлиса (K_m) для восстановленного глутатиона составили 0,033 ммоль/л и в норме и 0,011 ммоль/л при развитии токсического повреждения печени (табл. 2). Уменьшение значения K_m в 3,0 раза свидетельствует о повышении сродства фермента к субстрату в условиях оксидативного стресса. Значения K_m для пероксида водорода составили 0,208 ммоль/л в группе контрольных животных и 0,185 ммоль/л в опытной группе. Согласно литературным данным субстратная регуляция составляет первый уровень контроля функционирования фермента. У млекопитающих обнаружены следующие концентрации основных субстратов ГП: GSH от 1 до 10 ммоль/л в различных тканях [11,12]; ROOH — 0,5 мкмоль/л в плазме крови. Сопоставление концентрации субстратов с кинетическими константами свидетельствует, что фермент относительно насыщен GSH, но в большинстве тканей не насыщен пероксидом водорода; промежуточное положение занимают ROOH. Следовательно, реальная активность ГП, вероятно, меньше максимальной и лимитируется количеством возникающего пероксида водорода, который может выступать в качестве индуцибельного фактора по отношению к ферменту.

Таким образом, получение очищенных ферментных препаратов ГП из печени крыс позволи-

ло определить некоторые физико-химические и кинетические особенности функционирования фермента, как в условиях нормы, так и в условиях оксидативного стресса, вызванного введением CCl₄.

Работа поддержана проектом Программы «Развитие научного потенциала высшей школы» РНП.2.1.1.4429

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пескин А.В. Русский мед. журнал. 1999. — №5, С. 13—15.
2. Федорова Н.Ю. Состояние системы глутатионпероксидазы-глутатионредуктазы в стимулированном к регенерации органе и ее роль в клеточной пролиферации: Дисс. канд. Биолог. наук / Н.Ю. Федорова. — Воронеж, 1999. — С. 44—45
3. Кулинский В.И. Биологическая роль глутатиона / В.И. Кулинский, Л.С. Колесниченко // Успехи современной биологии. — 1990. — Т. 110. №1. — С. 20.
4. Lowry O. Protein measuperement with the Folin-Phenol reagent / O. Lowry, N. Roserbrough, A. Farr / J. Biol. Chem // — 1951. — V. 194, №1. — P. 265—271.
5. Кауров Я.В. Способ создания модели гепатита и цирроза печени млекопитающих / Я.В. Кауров, Г.А. Бояринов, В.П. Смирнов. — Пат. РФ.94026117, 1996. Кл. G 09B23128.
6. Ллойд Е., Ледерман У. Справочник по прикладной статистике. М.: Финансы и статистика, 1990. 525 с.
7. Oshino N. The role of H₂O₂ generation in perfused rat liver and reaction of catalas compound I and hydrogen donors / N. Oshino, B. Chance, H. Sies // Arch. Biochem. And Biophys. — 1973. — V. 15, №4. — P. 117—131.
8. Осипов А.Н., Азизова О.А., Владимиров Ю.А. (1990) Успехи биол. химии, № 31, С. 180—208.
9. Владимиров Ю.А. (2000) Соросовский образовательный журнал, №6, С. 13—19.
10. Condell R. Evidence for suitsasily of glutathione peroxidase as a protective enzyme: studies of oxidative damage, ranatusation and proteolysis / R. Condell, A. Tappel // Arch. Biochem. And Biophys. — 1983. — V. 223, №2. — P. 407—416.
11. Ленинджер А. Биохимия / А. Ленинджер. — М.: Мир. — Т.1. 1985. —С. 297.
12. Olinescu Radu. Glutathione as possible medisier of hydrogen peroxide de composithione in erythrocytes / Radu Olinescu // Rev. roum. Biochem. — 1974. — V11, №1. — P. 49—59.