

КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ГЛУТАТИОНРЕДУКТАЗЫ ИЗ ПЕЧЕНИ КРЫС В НОРМЕ И ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ

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

Воронежский государственный университет

С использованием частично очищенных ферментных препаратов глутатионредуктазы (К.Ф. 1.6.4.2) из нормальной и пораженной CCl_4 печени крысы, полученных с помощью высаливания сульфатом аммония в границах насыщения 40—70%, гель-фильтрации на сефадексе G-25, ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе, концентрирующей ячейки Millipore были изучены кинетические свойства фермента. Величина K_m по отношению к окисленному глутатиону для фермента из печени крыс контрольной группы и подвергнутых токсическому гепатиту составила 0,31 ммоль/л и 1,11 ммоль/л соответственно. Значения K_m для НАДФН составили 0,15 ммоль/л и 1,25 ммоль/л в условиях нормы и при токсическом гепатите соответственно. рН-оптимум для фермента из печени крыс контрольной и экспериментальной группы лежит в области 7,3—7,5.

ВВЕДЕНИЕ

Развитие ряда патологических состояний различной этиологии, в том числе патологий печени, сопровождается гиперпродукцией активных форм кислорода. Контроль свободнорадикальных процессов в клетке осуществляется с помощью антиоксидантной системы (АОС) [1]. Одним из основных компонентов АОС организма является глутатионредуктазная/глутатионпероксидазная система, для функционирования которой необходимым является поддержание на определённом уровне восстановленного глутатиона (GSH). Регенерация глутатиона осуществляется в ходе глутатионредуктазной реакции [2]. Глутатионредуктаза (ГР, КФ 1.6.4.2) — это флавопротеиновый фермент, содержание которого в клетке зависит от количества рибофлавина в тканях.

В ряде работ были изучены каталитические свойства фермента из тканей животных, человека и ряда микроорганизмов [3,4]. Имеются данные об активности данного фермента при ряде патологических состояний [5]. Однако сравнительная характеристика кинетических параметров каталитического действия ГР в норме и при патологических состояниях, сопряжённых с оксидативным стрессом, до сих пор не проводилась.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объекта исследования использовали белых лабораторных крыс самцов (*Rattus rattus* L.),

массой 150—200 г, выращенных на стандартном рационе вивария. Токсическое повреждение печени моделировали пероральным введением 33% раствора CCl_4 в вазелиновом масле из расчета 64 мкл CCl_4 на 100г веса животного [6]. Забор материала производили на 4 сутки после введения токсического агента. Печень извлекали после многократного перфузирования ледяным физиологическим раствором.

Навеску ткани печени гомогенизировали в 3-х кратном объеме среды выделения следующего состава: 0,05 моль/л трис-НСI буфер (рН 7,6), содержащий 1 ммоль/л ЭДТА, 0,1% β-меркаптоэтанола. Гомогенат фильтровали и центрифугировали при 5000 г в течение 10 мин. Осадок, содержащий клеточные стенки, отбрасывали. Супернатант использовали для определения активности и проведения очистки фермента.

1. Фракционирование белков сульфатом аммония. Определение границ выделения ГР из белкового раствора проводили путём ступенчатого повышения концентрации $(NH_4)_2SO_4$ в смеси. Кристаллический сульфат аммония добавляли к гомогенату в количестве, соответствующем нижней границе насыщения (40%). Смесь центрифугировали при 13000 г в течение 10 мин. Осадок отбрасывали, а к надосадочной жидкости добавляли $(NH_4)_2SO_4$ в количестве, соответствующем верхнему пределу насыщения (70%). После центрифугирования при 15000 г в течении 15 мин получали осадок, содержащий ГР. Полученный осадок ресупендировали в 4 мл среды выделения.

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

2. *Обессоливание на сефадексе G-25.* Освобождение белковой смеси от низкомолекулярных примесей осуществляли с помощью гель-фильтрации через колонку с сефадексом G-25 (1,5 × 20 см) [8]. В качестве элюирующей среды использовали 0,01 М трис-НСl-буфер (рН 7,6), содержащий 0,1 ммоль/л ЭДТА, 1% β-меркаптоэтанол. Скорость элюции составляла 20—25 мл/час, регуляция которой осуществляли 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.

3. *Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе.* Обессоленный раствор фермента наносили на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой (1,2 × 13 см), уравновешенную элюирующей средой, применяемой в ходе очистки на предыдущей стадии. В ходе ионообменной хроматографии фермент десорбировался с колонки в ступенчатом градиенте КСl 50—100 ммоль/л. Скорость элюции — 30—40 мл/ч. Каждую фракцию объемом 1,5—2,0 мл анализировали на присутствие ферментативной активности ГР. Фракции, относящиеся к пику активности объединяли и концентрировали в ячейке Millipore. Для этого использовали мембраны, пропускающие буферный раствор с низкомолекулярными белками (до 50 кДа). ГР, имеющая молекулярную массу около 104 кДа, оказывалась в остаточном объеме. Полученный ферментный препарат использовали для исследования кинетических характеристик ГР.

Измерение активности ГР проводили спектрофотометрически на СФ-56 при 340 нм. О скорости реакции судили по падению оптической плотности в результате окисления НАДФН. Измерение активности проводили в 50мМ калий-фосфатном буфере (7,4), содержащем 1мМ ЭДТА, 0,8мМ глутатион окисленный, 0,16мМ НАДФН. За единицу активности (Е) принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкмоль продукта реакции за 1 мин при 25 °С. Содержание белка определяли по методу Lowry (1951) [7].

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 окисленный («ICN», США). Остальные реактивы отечественного производства марки «ч.д.а.» или «х.ч.».

Все этапы выделения и очистки фермента осуществляли при температуре 0—4 °С. Опыты проводили в 6—8 кратной биологической повторяемости, аналитические определения в каждой пробе в 2-х повторностях. Для определения достоверности результатов применяли метод вариационной статистики [9].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При токсическом гепатите наблюдается увеличение активности ГР в гомогенате печени в 2,1 раза по сравнению с контрольным уровнем, что, вероятно, обусловлено компенсаторной активацией ГР/ГП антиоксидантной системы (АОС) в ответ на интенсификацию СРО в условиях развития токсического гепатита.

С целью проведения сравнительной характеристики кинетических параметров каталитического действия ГР в норме и при токсическом гепатите был разработан многостадийный метод очистки фермента из печени крыс соответствующих групп.

В результате 51- и 48-кратной степени очистки (норма и токсический гепатит соответственно) был получен частично очищенный ферментный препарат ГР с удельной активностью 0,56 и 1,1 Е на мг белка. Выход составил 18% и 17% (таблица 1).

Проведено исследование зависимости скорости реакции, катализируемой ГР, выделенной из печени контрольных животных и крыс, подвергшихся токсическому гепатиту, от концентрации субстрата и кофермента.

Установлено, что кинетика ферментативной реакции, катализируемой ГР, подчиняется уравнению Михаэлиса-Ментен. Полученные значения K_m по окисленному глутатиону (GSSG) и НАДФН в норме и при ЭТГ, определенные в двойных обратных координатах Лйнуйвера-Берка, представлены на рис. 1, 2. Величина K_m по отношению к окисленному глутатиону составила 0,31 ммоль/л в норме и 1,11 ммоль/л при токсическом гепатите (рис. 1). Зависимость скорости реакции от концентрации НАДФН также имеет гиперболический характер (рис. 2), и значения K_m составили в условиях нормы и при токсическом гепатите 0,15 и 1,25 ммоль/л соответственно. Таким образом, при патологии имеет место снижение сродства фермента к субстрату, тогда как скорость реакции превращения GSSG в восстановленный глутатион (GSH) увеличивается. Вероятно, это связано с накоплением в условиях патологии окисленного глутатиона, который вызывает субстратное ингибирование фермента. Необ-

Таблица 1

Очистка глутатионредуктазы из печени крыс контрольной и опытной групп животных

Стадия очистки	Условия опыта	Общая активность, $E_{\text{общ}}$	Удельная активность, E/мг белка	Выход, %	Степень очистки
гомогенат	норма	2,67±0,13	0,011±0,0006	100	1,0
	гепатит	6,4±0,32	0,023±0,001	100	1,0
Фракционирование $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	норма	2,44±0,12	0,013±0,0007	91	1,2
	гепатит	6,1±0,30	0,037±0,002	95	1,6
хроматография на сефадексе G-25	норма	2,29±0,11	0,02±0,001	86	1,8
	гепатит	5,44±0,30	0,05±0,003	85	2,2
хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	норма	1,21±0,06	0,3±0,02	45	27,0
	гепатит	1,85±0,15	0,5±0,003	29	22,0
концентрирование с помощью ячейки Amicon	норма	0,61±0,03	0,56±0,03	18	51,0
	гепатит	1,39±0,13	1,1±0,6	17	48,0

Примечание: в таблице обсуждаются статистические достоверные различия при $P \leq 0,05$

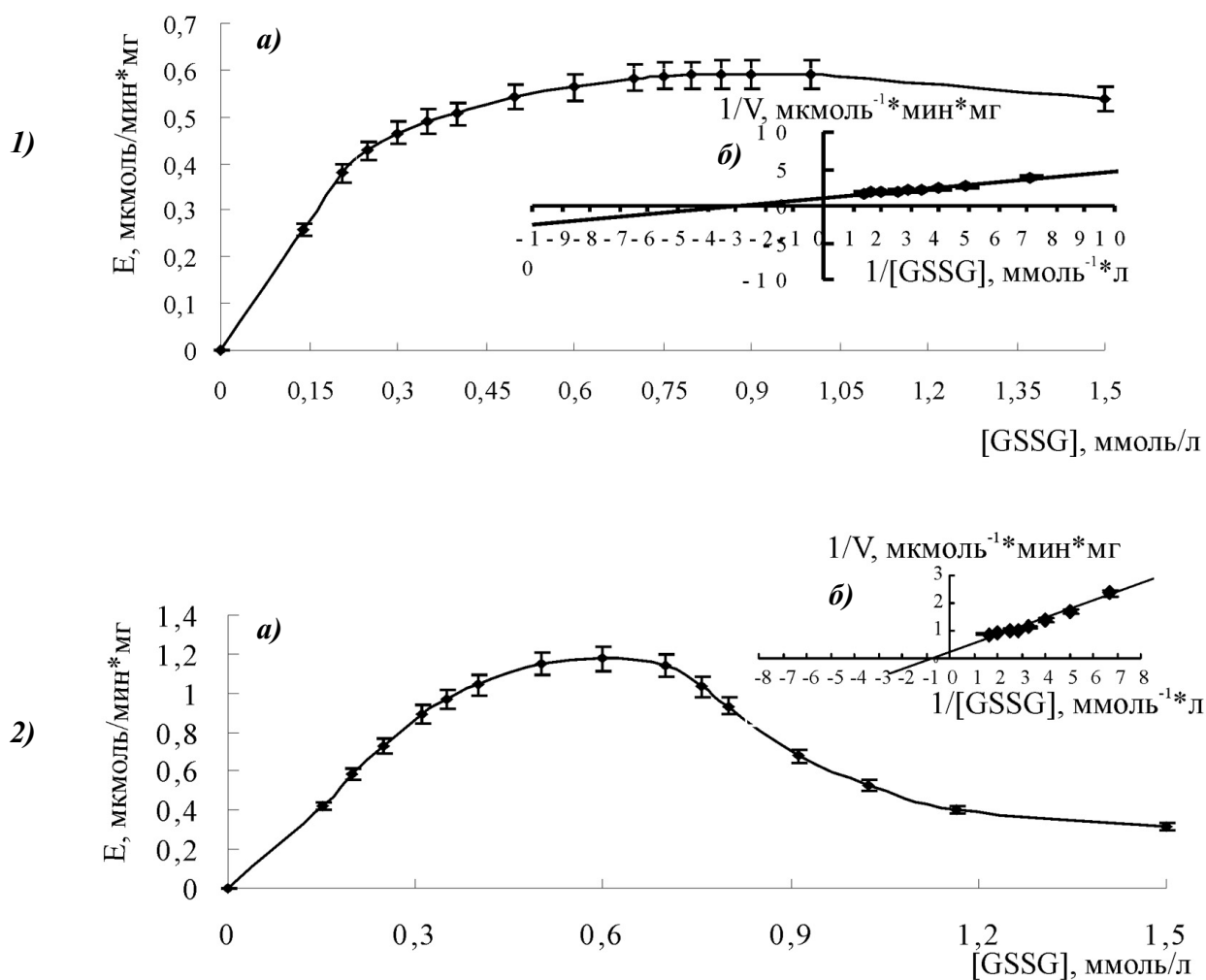


Рис. 1. Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата (глутатиона окисленного) в прямых (а) и обратных (б) координатах Лайнуивера-Берка для ГР из печени крыс контрольной группы (1) и подвергнутых токсическому гепатиту (2)

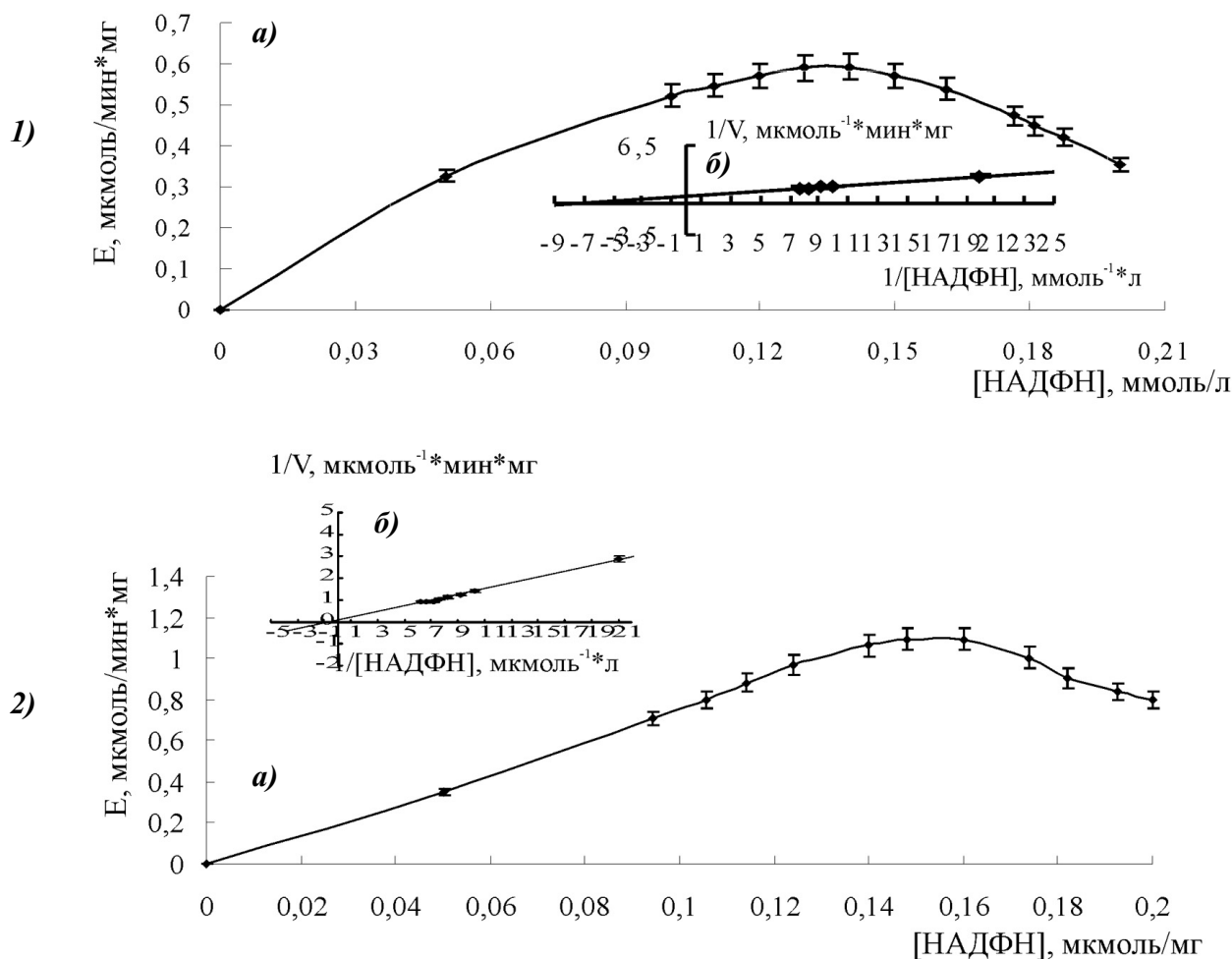


Рис. 2. Зависимость скорости реакции от концентрации кофермента (НАДФН) в прямых (а) и обратных (б) координатах Лайнуивера-Берка для ГР из печени крыс контрольной группы (1) и подвергнутых токсическому гепатиту (2)

ходимо отметить, что ингибирующий эффект GSSG выражен в большей степени для фермента из печени крыс экспериментальной группы.

Показано, что значительных изменений зависимости скорости ферментативной реакции ГР от концентрации ионов водорода в норме и при токсическом гепатите не происходит. Фермент из печени крыс в норме проявляет максимальную активность в диапазоне рН от 7,3 до 7,5. При этом рН оптимум составляет 7,4. Уменьшение рН до 7,0 или увеличение его до 8,0 приводит к резкому снижению активности фермента (рис. 3).

Был проведен подбор оптимальных условий хранения фермента. Установлено, что максимальная активность фермента сохраняется при хранении его при температуре от 0 °С до +4 °С. Так, через 48ч активность фермента составила 75% от исходной. При температуре от 0 °С до -14 °С ак-

тивность снижается и составляет менее 20% от начальной.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Скулачев В.П. Кислород в живой клетке: добро и зло / В.П. Скулачев // Соросовский Образовательный Журнал. — 1996. — №3. — С. 4—16.
2. Кулинский В.И. Биологическая роль глутатиона. / В.И. Кулинский, Л.С. Колесниченко // Успехи современной биологии, 1990. — Т. 110, №1(4). — С. 20—33.
3. Anderson N., Nerski G. Oxidizing and restore semireactions glutathionereductase from E.coli. / N. Anderson, G. Nerski // Biochemistry. — 1994. — 35, №23. — P. 5727—5732.
4. Dusan P., Padradski P. Influence ether on the contents glutathione and glutathionereductase in pea leaves // Z. Naturforsch. 1990. — 45, № 43. — P. 96—106.

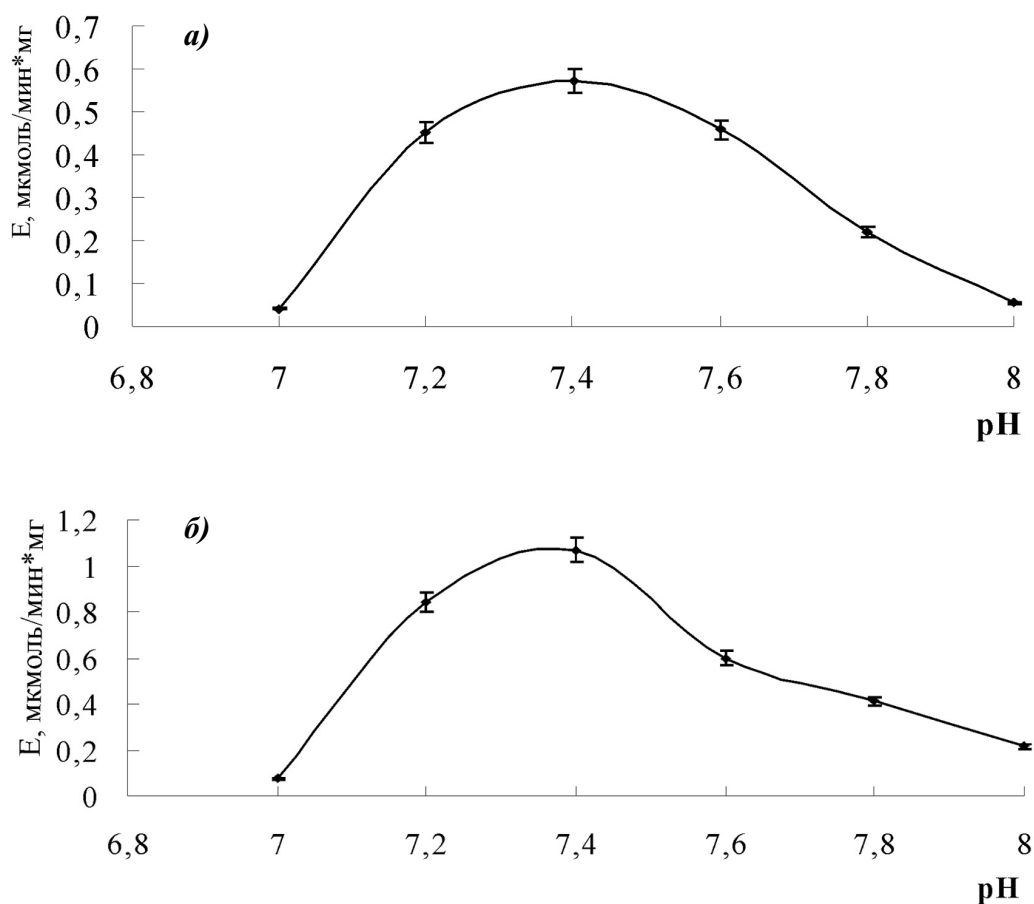


Рис. 3. Зависимость скорости реакции от концентрации ионов водорода для ГР из печени крыс контрольной группы (а) и подвергнутых токсическому гепатиту (б)

5. 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.

6. Miake F., Torikata T., Koga K., Hayashi K. / 1977. — V.82, №2. — P. 449—454.

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

8. Детерман Г. Гель-хроматография / Г. Детерман. — М.: Мир, 1970. — 252 с.

9. Ллойд Е., Ледерман У. Справочник по прикладной статистике. М.: Финансы и статистика, 1990 — 525 с.