

## ОЧИСТКА И НЕКОТОРЫЕ КАТАЛИТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ NAD-ЗАВИСИМОЙ ИЗОЦИТРАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ В НОРМЕ И В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ТОКСИЧЕСКОГО ГЕПАТИТА

Л. Н. Цветикова, Л. В. Матасова, Т. Н. Попова

*Воронежский государственный университет*

NAD-зависимая изоцитратдегидрогеназа (КФ 1.1.1.41; NAD-ИДГ), была очищена из печени крыс по схеме, включающей выделение митохондрий методом дифференциального центрифугирования, гель-фильтрацию на сефадексе G-25 и ионообменную хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе. В результате были получены ферментные препараты из печени контрольных и подвергнутых токсическому гепатиту крыс, очищенные в 45,5 и 42,4 раз с выходом 59,1% и 76,3% соответственно. С использованием очищенных препаратов показано увеличение коэффициента Хилла по отношению к изоцитрату, константы Михаэлиса и константы субстратного ингибирования по отношению к  $\text{NAD}^+$ , а также смещение рН-оптимума фермента при токсическом гепатите.

### ВВЕДЕНИЕ

В основе патогенеза многих болезней, в том числе и заболеваний печени, лежит дисбаланс между образованием активных форм кислорода (АФК) и функционированием антиоксидантных систем (АОС), осуществляющих регуляцию интенсивности свободнорадикальных процессов (СРП) в организме [1—3]. Снижению интенсивности свободнорадикальных процессов может способствовать изменение регуляторных свойств ферментов цикла трикарбоновых кислот (ЦТК). В этой связи вызывает интерес функционирование NAD-зависимой изоцитратдегидрогеназы (КФ 1.1.1.41; NAD-ИДГ), катализирующей в ЦТК превращение изоцитрата в 2-оксоглутарат [4].

### МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве объекта исследования использовали самцов белых лабораторных крыс массой 200—250 г. Животные содержались на стандартном рационе вивария. Экспериментальный токсический гепатит (ЭТГ) создавали после суточной депривации путем однократного перорального введения  $\text{CCl}_4$  в дозе 64 мкл/100 г веса крысы в виде раствора в вазелиновом масле (1:3). На 4 сутки после воздействия  $\text{CCl}_4$  печень декапитуированных животных промывали, извлекали и гомогенизировали.

Выделение и очистку NAD-ИДГ из печени контрольных и подвергнутых ЭТГ крыс проводили по схеме, включающей несколько стадий. Навеску ткани печени гомогенизировали в 4-х кратном объеме среды выделения митохондрий следующей-

го состава: 50 ммоль/л имидазольный буфер (рН 7,2), содержащий 0,4 ммоль/л сахарозы, 1 ммоль/л ЭДТА, 3 ммоль/л  $\text{MgCl}_2$ , 2 ммоль/л  $\beta$ -меркаптоэтанола. Гомогенат фильтровали через слой капрона с квадратными ячейками (0,1 мм) и центрифугировали при 5000 g в течение 10 мин для отделения неразрушенных клеточных элементов и ядер. Для выделения митохондриальной фракции печени супернатант центрифугировали в режиме 15000 g в течение 15 мин [5]. Осадок, содержащий митохондрии, промывали тем же буфером, центрифугировали при 15000g в течение 20 мин и ресуспендировали в 30 ммоль/л растворе  $\text{KHCO}_3$ , рН 7,0—7,2, содержащем 0,6% тритона X-100, 22,5%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1,5 ммоль/л  $\text{MnCl}_2$ , 30% глицерина. В качестве маркерного фермента митохондрий использовали сукцинатдегидрогеназу (СДГ), активность определяли спектрофотометрически при 600 нм.

Для освобождения ферментных препаратов NAD-ИДГ от низкомолекулярных примесей использовали гель-фильтрацию на сефадексе G-25 (Fine, 1,4\*20 см). Элюирующая среда представляла собой 10 ммоль/л имидазольный буфер (рН 7,2), содержащий 20% глицерина, 10 ммоль/л  $\text{NaHCO}_3$ , 2 ммоль/л  $\beta$ -меркаптоэтанола. Фракции, обладающие максимальной ферментативной активностью, объединяли и подвергали ионообменной хроматографии (ИОХ) на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой (0,8\*13 см). После нанесения ферментного препарата на сорбент колонку промывали 20 мл среды элюции следующего состава: 10 ммоль/л имидазольный буфер (рН 7,2), содержащий 20% глицерина, 10 ммоль/л  $\text{NaHCO}_3$ , 1,5—2 ммоль/л цитрата

натрия, 2 ммоль/л  $\beta$ -меркаптоэтанола [6]. Элюцию фермента проводили путем ступенчатого повышения концентрации KCl в среде. Десорбция NAD-ИДГ с колонки происходила при увеличении концентрации KCl в среде элюции до 100 ммоль/л для фермента, выделенного из печени контрольных животных, и 300 ммоль/л для фермента, выделенного из печени животных с ЭТГ. Фракции, характеризующиеся максимальной активностью, использовали для дальнейших исследований. Все процедуры выделения и очистки фермента проводили при температуре 0...+4°C.

Активность NAD-ИДГ определяли спектрофотометрически при 340 нм в среде 50 ммоль/л имидазольного буфера, pH 7,0—7,2, содержащего 0,01 ммоль/л изоцитрата, 0,4 ммоль/л  $\text{NAD}^+$ , 0,01 ммоль/л  $\text{Mn}^{2+}$ . За единицу ферментативной активности (Е) принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкмоль/л продукта реакции за 1 мин при температуре 25°C. Определение содержания белка в пробах проводили по методу Лоури [7].

Опыты проводили в четырехкратной биологической повторности. Аналитические определения для каждой пробы — в двукратной повторности. Достоверность различий определяли по t-критерию Стьюдента. Для построения графиков использова-

ли данные, обработанные с помощью программ линейной и параболической аппроксимации [8].

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Активность NAD-ИДГ в печени контрольных животных была в 2 раза ниже, чем у животных с токсическим гепатитом. Были получены очищенные в 45,5 и 42,4 раз ферментные препараты NAD-ИДГ с удельной активностью  $0,137 \pm 0,007$  и  $0,254 \pm 0,013$  Е/мг белка из печени контрольных крыс и животных подвергнутых токсическому гепатиту соответственно (табл. 1). Выход при этом составил 59,1% и 76,3%.

В большинстве работ отмечается невозможность применения метода Лайнуивера-Берка для определения величин кажущихся  $K_m$  для NAD-ИДГ в связи с существованием кооперативных эффектов при связывании изоцитрата [9—12]. Коэффициента Хилла по отношению к изоцитрату для фермента, выделенного из печени контрольных животных, составил  $2,91 \pm 0,2$ . Коэффициент Хилла по отношению к изоцитрату для фермента, выделенного из печени животных с ЭТГ, составил  $3,52 \pm 0,2$ . Таким образом, при ЭТГ наблюдается увеличение числа центров связывания субстрата, что, вероятно, и объясняет увеличение активности

Таблица 1

*Очистка NAD-зависимой изоцитратдегидрогеназы из печени крысы в норме и при экспериментальном токсическом гепатите*

Стадия очистки	Условия опыта	Общая активность, ФЕ	Количество белка, мг	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат	Норма	$0,221 \pm 0,01$	$70,20 \pm 3,5$	$0,003 \pm 0,00$	100	1
	ЭТГ	$0,443 \pm 0,2$	$74,40 \pm 3,7$	$0,006 \pm 0,00$	100	1
Митохондрии + Тритон X 100	Норма	$0,301 \pm 0,01$	$7,74 \pm 0,3$	$0,039 \pm 0,002$	136.0	12.96
	ЭТГ	$0,468 \pm 0,01$	$6,69 \pm 0,3$	$0,070 \pm 0,003$	105.0	11.64
Гель-фильтрация на сефадексе G-25	Норма	$0,213 \pm 0,01$	$7,60 \pm 0,3$	$0,028 \pm 0,001$	96.4	9,34
	ЭТГ	$0,409 \pm 0,02$	$6,54 \pm 0,3$	$0,065 \pm 0,004$	93.2	10.42
Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	Норма	$0,168 \pm 0,08$	$1,23 \pm 0,06$	$0,137 \pm 0,007$	59.1	45,52
	ЭТГ	$0,262 \pm 0,01$	$1,03 \pm 0,05$	$0,254 \pm 0,013$	76.3	42,39

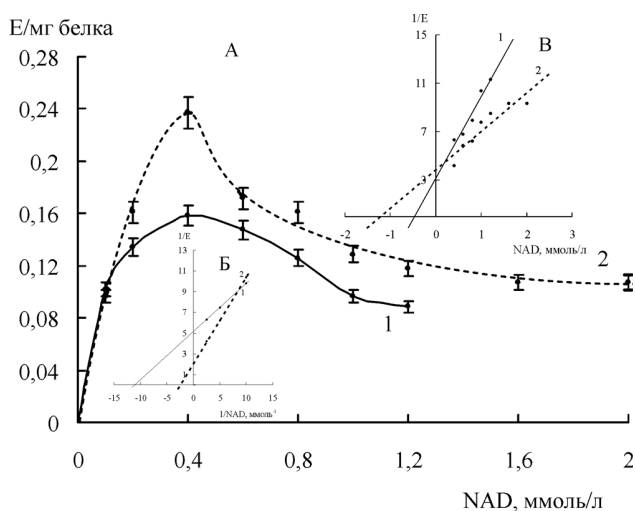


Рис. 1. А — Зависимость активности НАД-ИДГ из печени контрольных животных (1) и животных с экспериментальным токсическим гепатитом (2) от концентрации  $\text{NAD}^+$ . Б — та же зависимость в двойных обратных координатах, В — определение константы субстратного ингибирования  $\text{NAD}^+$  в координатах Диксона

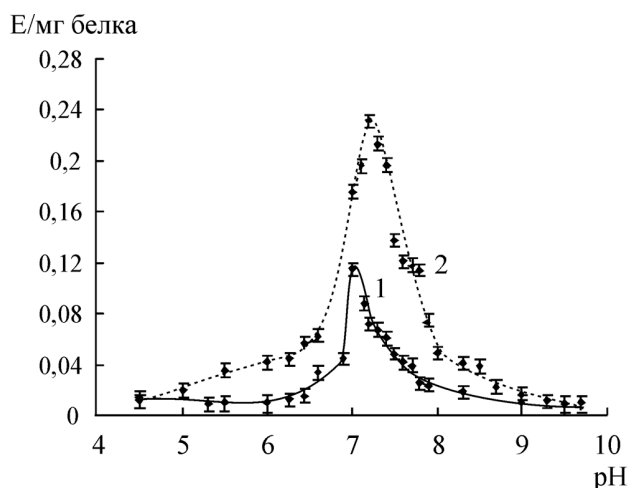


Рис. 2. Зависимость активности НАД-ИДГ от pH среды: 1 — фермент, выделенный из печени контрольных животных; 2 — фермент из печени животных с экспериментальным токсическим гепатитом

фермента. В условиях ЭТГ подобное явление может иметь значение для поддержания гомеостаза клетки. По литературным данным известно, что коэффициент Хилла для НАД-ИДГ, выделенной из сердца быка, равен 2 [13]. И.Г. Моргуновым, С.В. Камзоловым было установлено, что для НАД-ИДГ из *Yarrowia lipolitika* коэффициент Хилла равняется 1,06 [14].

Зависимость начальной скорости реакции, катализируемой НАД-ИДГ, от концентрации  $\text{NAD}$ , как правило, имеет гиперболический характер [15—16]. Для фермента, выделенного из печени контрольных крыс, значение  $K_m$  по отношению к  $\text{NAD}^+$  составило  $0,091 \pm 0,005$  ммоль/л, в то время как значение данного параметра для фермента, выделенного из печени крыс с ЭТГ, было значительно выше и составило  $0,384 \pm 0,015$  ммоль/л (рис. 1). Полученные в наших экспериментах значения  $K_m$  сходны с таковыми для НАД-ИДГ из *Yarrowia lipolitika*, составляющим 136 мкМ [14].

При ЭТГ также увеличивалась и константа субстратного ингибирования избытком  $\text{NAD}^+$ : с  $0,461 \pm 0,01$  ммоль/л в норме до  $1,190 \pm 0,06$  ммоль/л при ЭТГ (рис. 1).

Установлено, что оптимальные значения pH среды для активности НАД-ИДГ из печени контрольных и подвергнутых ЭТГ крыс составили 7,0 и 7,2 соответственно (рис. 2). Из литературных источников известно, что оптимальные значения pH для НАД-ИДГ из сердца быка — 6,7, из пекарских

дрожжей, микроорганизмов *Neurospora crassa* — 7,6 [18], *Rhizobium* — 7,5, *Yarrowia lipolitika* — 7,4 [14]. Наиболее высокий pH-оптимум характерен для НАД-ИДГ из *Euglena gracilis* — 8,0 [19]. Также известно, что для НАД-ИДГ из сердца быка отмечается смещение pH-оптимума с 6,7 до 7,2 при низких концентрациях изоцитрата в отсутствие АДФ [20].

Таким образом, при экспериментальном токсическом гепатите наблюдается повышение коэффициента Хилла НАД-ИДГ для изоцитрата, увеличение константы Михаэлиса и константы субстратного ингибирования по отношению к  $\text{NAD}^+$ , а также смещение pH-оптимума фермента.

Изменения каталитических свойств НАД-ИДГ, выделенной из печени крыс с ЭТГ, возможно, вызваны конформационными изменениями молекулы фермента. Известно, что при экспериментальном токсическом гепатите усиливаются процессы свободнорадикального окисления, в ходе которых может происходить модификация аминокислотных остатков в молекуле фермента. В частности, может происходить карбонилирование остатков пролина, аргинина, лизина и треонина, а также окисление тиоловых групп цистеина [21]. Есть сведения о том, что для активности НАД-ИДГ важны остатки аргинина [22], а в связывании изоцитрата участвуют остатки треонина [23].

Работа поддержана Программой Министерства Образования и Науки РФ РНП "Развитие научного потенциала высшей школы". 2.1.1.4429

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Полунина Т. Е. Лекарственные гепатиты / Т.Е. Полунина // Терапев. архив. — 1999. — Т. 71, № 12, С. 46—49.
2. Drug-induced liver disease: experiences of the Swiss Center for Adverse Drug Effects 1989-91/ Werth B, Kuhn M, Hartmann K, Kobler E, Reinhart WH. // J Suisse Med. — 1993. — V. 123, № 1.
3. Hinson J. A., Forkert P.G. Phase II enzymes and bioactivation // Can. J Physiol. Pharmacol. — 1995. — V. 73, № 10. — P. 1407—1413.
4. Жеребцов Н.А. Биохимия / Н.А. Жеребцов, Т.Н. Попова, В.Г. Артюхов. — Воронеж: Изд-во Воронеж. ун-та, 2002. — 330 с.
5. Прохорова М.И. Методы биохимических исследований / М.И. Прохорова. — СПб.: Изд-во ЛГУ, 1982. — 272 с.
6. Попова Т.Н. Изоцитратдегидрогеназа высших растений: формы, локализация, свойства и регуляция // Диссертация на соискание учебной степени доктора биологических наук. 1994. 336 с.
7. Остерман М. Гель-хроматография / М. Остерман. М.: Мир, 1970. — 310 с.
8. Ллойд Э. Справочник по прикладной статистике / Э. Ллойд, У. Ледерман. — М.: Финансы и статистика, 1990. — С. 493 — 513.
9. Kuehn G.D. Yeast diphosphopyridine nucleotide specific isocitrate dehydrogenase / G.D. Kuehn, L.D. Barnes // Biochemistry — 1971. — V. 10, №21. — P. 3945—3951.
10. Willson V.J.C. The activation of ox-brain NAD-dependent isocitrate dehydrogenase by magnesium ions / V.J.C. Willson, K.F. Tipton // Eur. J. Biochem. — 1981. — V. 113, № 3. — P. 477—483.
11. Willson V.J.C. The effect of pH on the allosteric behavior of ox-brain NAD-dependent isocitrate dehydrogenase / V.J.C. Willson, K.F. Tipton // Eur. J. Biochem. — 1980. — V. 109, № 2. — P. 411—416.
12. Курганов Б.И. Аллостерические ферменты / Б.И. Курганов. — М.: Изд-во «Наука», 1978. — 29 с.
13. Plaut G.W.E. Action of magnesium ion on diphosphopyridine nucleotide-linked isocitrate dehydrogenase from bovine heart / G.W.E. Plaut, V.L. Schramm, T. Aogaichi // J. Biol. Chem. — 1974. — V. 249, №6. — P. 1848—1856.
14. Моргунов И.Г. Выделение, очистка и некоторые свойства НАД-зависимой изоцитратдегидрогеназы дрожжей *Yarrowia lipolytica* — продуцента органических кислот / И.Г. Моргунов, С.В. Камзолова, А.П. Соколов // Микробиология. — 2004. — Т. 73, №3. — С. 300—306.
15. Cook R.A. Isocitrate dehydrogenase (NAD-specific) from *Neurospora crassa* / R.A. Cook, B.D. Sanwal // Methods Enzymol. — 1969. — №13. — P. 42—47.
16. Plaut G.W.E. Isocitrate dehydrogenase (DPN-specific) from bovine heart / G.W.E. Plaut // Methods Enzymol. — 1969. — V. 13, № 1. — P. 34—42.
17. Tezuka T. Isolation and characterization of inner membrane-associated and matrix NAD-specific isocitrate dehydrogenase in potato mitochondria / T. Tezuka, G. Laties // Plant Physiol. — 1983. — V. 72, № 6. — P. 959—963.
18. Sanwal B.D. Control of DPN-specific isocitrate dehydrogenase activity by precursor activation and end product inhibition / B.D. Sanwal, M.W. Zink, C.S. Stachow // Biochem. And Biophys. Res. Commun. — 1963. — V. 12, №6. — P. 510—515.
19. Subcellular location and some properties of isocitrate dehydrogenase isozymes in *Euglena gracilis* / Y. Oda, K. Miyatake, Y. Nakamo et al. // Arg. and Biol. Chem. — 1981. — V. 45, №11. — P. 2619—2621.
20. Chen R.F. Activation and inhibition of DPN-linked isocitrate dehydrogenase of heart by certain nucleotides / R.E. Chen, G.W.E. Plaut // Biochemistry. — 1963. — V. 2, № 5. — P. 1023—1032.
21. Requena J.R. Glutamic and amino adipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins. / Requena J.R. [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2001. — V. 98. — P. 69—74.
22. Soundar S. Evaluation by mutagenesis of the importance of 3 arginines in alpha, beta, and gamma subunits of human NAD-dependent isocitrate dehydrogenase. / Soundar S, Park JH, Huh TL, et al // J Biol Chem. — 2003. — T. 278, №52. — P. 52146—53.
23. Lin A.P. Isocitrate binding at two functionally distinct sites in yeast NAD<sup>+</sup>-specific isocitrate dehydrogenase. / Lin AP, McAlister-Henn L. // J Biol Chem. — 2002. — T. 277, № 25. P. 22475—83.