

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕКОТОРЫХ КИНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НАДФ-ЗАВИСИМОЙ ИЗОЦИТРАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ ПЕЧЕНИ КРЫС В НОРМЕ И ПРИ РАЗВИТИИ АПОПТОЗА

Л. Н. Цветикова, Т. Н. Попова, Т. И. Рахманова

Воронежский государственный университет

Поступила в редакцию 23.01.2008 г.

Аннотация. С помощью разработанной процедуры очистки были получены ферментативные препараты НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы из печени интактных крыс и животных, подверженных воздействию фактора некроза опухоли- α . Дана сравнительная характеристика кинетических параметров каталитического действия данного фермента из печени крыс исследованных групп. Выявлены изменения сродства фермента к субстратам, различия рН-оптимумов, а также чувствительности к регуляторному воздействию глутатиона.

Ключевые слова: крыса, печень, апоптоз, НАДФ-зависимая изоцитратдегидрогеназа, фактор некроза опухоли- α

Abstract. Enzyme preparation of NADP dependent isocitrate dehydrogenase from intact rat's liver and animals with apoptosis has been received with help of purifications procedure. The comparative characteristics of some catalytic properties of NADP-dependent isocitrate dehydrogenase from liver of investigated animal's group is obtained. The alteration of the enzyme affinity to substrates, pH-optimum of reaction and enzyme sensitivity to action of glutathione is observed.

Key words: rat, liver, apoptosis, NADP-dependent isocitrate dehydrogenase, tumor necrosis factor- α .

ВВЕДЕНИЕ

Апоптоз или запрограммированная смерть клетки, является звеном многих биологических процессов у многоклеточных организмов [1]. Апоптоз играет важнейшую роль в поддержании гомеостаза организма. Существует ряд заболеваний, при которых апоптозу принадлежит решающая роль в реализации механизма развития патологии. В патогенезе болезни Паркинсона важную роль играет нарушение дыхательной функции митохондрий, результатом этого является снижение содержания в клетках энергетических эквивалентов и последующее уменьшение образования глутатиона, возрастание уровня свободных радикалов (СР) и кальция внутри клетки, что ведет к дальнейшему развитию апоптоза [2, 3]. Кроме того, апоптоз имеет место при инфаркте миокарда и токсическом (в частности, алкогольном) гепатите. При этом наблюдается чрезмерная генерация активных форм кислорода (АФК), и отмечается значительный дефицит в организме антиоксидантов (АО) [4, 5]. Считают, что основной причиной гибели клеток внутри атеросклеротической бляшки является апоптоз [6].

Следует отметить, что возрастание внутриклеточного уровня АФК может быть вызвано стимуляцией рецепторов различных типов клеток фактором некроза опухоли- α (ФНО- α) [7, 8]. Ферментативные и неферментативные механизмы поддержания определенного уровня АФК на субклеточном уровне обеспечиваются рядом процессов, сопряженных, в частности, с изменениями концентрации дыхательных субстратов, а также уровня НАД(Ф)/НАД(Ф)Н + Н⁺. [9, 11]. Важную роль в реализации антиоксидантной защиты играет глутатионредуктазная/глутатионпероксидазная (ГР/ГП) ферментная система, ответственная за детоксикацию H₂O₂. Существует предположение, что генерирование НАДФН+Н⁺ для ГР/ГП системы осуществляется не только в ходе пентозофосфатного пути, но и за счет реакции, катализируемой НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназой (НАДФ-ИДГ, К.Ф.1.1.1.42.) [12]. В этой связи вызывает интерес функционирование НАДФ-ИДГ из печени крыс в условиях нормы и при введении животным ФНО- α .

Целью данной работы явилось исследование кинетических и регуляторных свойств НАДФ-ИДГ с использованием высокоочищенных препаратов из печени крыс в норме и при развитии апоптоза, вызванном введением ФНО- α .

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали самцов белых лабораторных крыс массой 150—200 г. Апоптоз индуцировали введением животным актиномина D внутрибрюшинно (20 мкг/кг), с последующим (через 20 минут) введением ФНО- α (1 мкг/кг). Материал забирали через 12 часов после введения ФНО- α [13]. Печень промывали ледяным физиологическим раствором, извлекали и гомогенизировали.

Среда выделения НАДФ-ИДГ имела следующий состав: 50 ммоль/л трис-НС1-буфер, рН 7,8, содержащий 1,5 ммоль/л изоцитрата, 2 ммоль/л $MnCl_2$, 0,1 ммоль/л ЭДТА, 1% β -меркаптоэтанол (β -МКЭ). Гомогенат процеживали через капрон и центрифугировали при 5000 g в течение 10 минут. Супернатант использовали для определения активности и последующей очистки НАДФ-ИДГ.

Гомогенат фракционировали сульфатом аммония в границах насыщения 25—60 % в условиях введения ФНО- α и 35—75 % в условиях нормы. Затем белковую смесь освобождали от низкомолекулярных примесей с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-25. Фракции, обладающие максимальной ферментативной активностью, объединяли и использовали для дальнейшей очистки на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой. После сорбции белка на колонке проводили десорбцию фермента с помощью ступенчатого градиента КС1 в той же среде элюции. Для десорбции НАДФ-ИДГ из печени здоровых животных использовали ступенчатый градиент КС1 от 40 до 80 ммоль/л. Для очистки НАДФ-ИДГ из печени крыс с индуцированным апоптозом использовали ступенчатый градиент КС1 от 20 до 50 ммоль/л. Скорость элюции составляла 20—25 мл/час. Фракции, относящиеся к пику активности, объединяли и использовали для дальнейшей очистки с помощью гель-хроматографии на Toyoperl HW-65.

На колонку с Toyoperl HW-65 наносили ферментный препарат объемом не более 1—3 % от общего объема колонки. Элюцию проводили со скоростью 30 мл/час, каждую фракцию анализировали на присутствие ферментативной активности. Все операции проводили в холодной камере при 0 ... 4 °С.

Активность НАДФ-ИДГ определяли спектрофотометрически при 340 нм. Среда для определения активности НАДФ-ИДГ имела следующий состав: 50 ммоль/л трис-НС1-буфер (рН 7,6—7,8), содержащий 1,5 ммоль/л изоцитрата, 2 ммоль/л $MnCl_2$, 0,25 ммоль/л НАДФ⁺, 0,1 ммоль/л ЭДТА.

За единицу ферментативной активности (Е) принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкмоль продукта реакции за 1 мин при температуре 25 °С. Активность фермента выражали в виде удельной активности. Определение белка проводили по методу Лоури.

Опыты проводили в 4-кратной биологической повторности, аналитические определения для каждой пробы — в 2-кратной повторности. Данные обрабатывали с использованием стандартных статистических методов. Определение достоверности различий проводили по *t*-критерию Стьюдента [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе работы были получены очищенные ферментные препараты НАДФ-ИДГ из печени контрольных крыс и животных, подвергнутых введению ФНО- α с 90,6 и 73,2-кратной степенью очистки и выходом 9,9 % и 12 % соответственно. Удельные активности полученных ферментов составили 5,4 и 6,6 Е/мг белка в норме и при воздействии ФНО- α соответственно (табл. 1)

Показано, что активность НАДФ-ИДГ из печени крыс с индуцированным апоптозом выше в 1,2 раза по сравнению с ферментативной активностью НАДФ-ИДГ в норме.

Установлено, что зависимость скорости реакции, катализируемой НАДФ-ИДГ из печени исследованных групп животных, от концентраций субстрата и кофакторов характеризуется величинами константы Михаэлиса (K_m), представленными в таблице 2. Для проявления активности НАДФ-ИДГ необходимо присутствие ионов Mn^{2+} в реакционной среде. Считают, что истинным субстратом фермента является комплекс [Mn^{2+} -изоцитрат] [15]. При высоких концентрациях ионов Mn^{2+} имеет место падение ферментативной активности. По-видимому, это происходит в результате вытеснения истинного субстрата вследствие конкуренции изоцитрата и кофактора (ионов Mn^{2+}) за субстратсвязывающие центры в молекуле фермента, что свидетельствует о взаимодействии НАДФ-ИДГ и со свободными ионами Mn^{2+} .

Для фермента, выделенного из печени крыс, которым вводили ФНО- α , наблюдается увеличение сродства к коферменту (K_m уменьшается в 2,5 раза), в то время как сродство к субстрату практически не изменяется, а к кофактору — незначительно уменьшается по сравнению с нормой.

Установлены оптимальные значения рН среды для активности НАДФ-ИДГ из печени контрольных

Таблица 1

Очистка НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы из печени крысы в норме и при введении ФНО- α *

Стадия очистки	Условия опыта	Общая активность, Е	Количество белка, мг	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат	Норма	6,9±0,4	118±5,9	0,06±0,003	(100)	(1)
	Индукция апоптоза с помощью ФНО- α	10,5±0,5	120±6,0	0,09±0,003		
Фракционирование (NH ₄) ₂ SO ₄	Норма	5,7±0,28	26,6±1,3	0,21±0,01	81,6	3,5
	Индукция апоптоза с помощью ФНО- α	8,9±0,4	28,3±1,4	0,31±0,015	83,7	3,4
Гель-фильтрация на сефадексе G-25	Норма	5,6±0,2	22,1±1,1	0,25±0,012	80,7	4,2
	Индукция апоптоза с помощью ФНО- α	8,6±0,4	26,6±1,3	0,33±0,16	81,7	3,7
Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	Норма	3,2±0,16	3,5±0,18	0,91±0,045	46,2	15,2
	Индукция апоптоза с помощью ФНО- α	4,8±0,24	3,7±0,19	1,29±0,06	45,4	14,3
Хроматография на Toyopearl HW-65	Норма	0,96±0,05	0,18±0,01	5,44±0,2	9,9	90,6
	Индукция апоптоза с помощью ФНО- α	1,3±0,06	0,19±0,01	6,59±0,32	12,0	73,2

* Примечание: в таблицах 1—2 отличия от нормы достоверны ($0,005 < p < 0,05$)

Таблица 2

Физико-химические параметры НАДФ-изоцитратдегидрогеназы из гепатоцитов крысы в норме и при введении ФНО- α

Опыт	Значения K _m , ммоль/л			pH _{opt}	pK ₁	pK ₂
	Изоцитрат	НАДФ ⁺	Mn ²⁺			
Норма	0,125 ± 0,012	0,15 ± 0,025	0,49 ± 0,024	7,8	7,1	8,6
Введение ФНО- α	0,13 ± 0,01	0,06 ± 0,02	0,395 ± 0,019	7,5	6,8	8,3

и подвергнутых воздействию ФНО- α крыс, а также рассчитаны pK фермента функциональных групп по методу Курганова (табл. 2) [16]. Исследование зависимости активности НАДФ-ИДГ от концентрации ионов водорода выявлено смещение pH-оптимума в кислую среду при развитии апоптоза. Данное явление может иметь адаптивное значение в условиях ацидоза. Из литературных источников известно, что оптимальные значения pH для НАДФ-ИДГ варьируют от 7,4 до 8,5 [17, 18] Величины pK функциональных групп НАДФ-ИДГ близки к pK

имидазольной группы гистидина (5,6—7,0), α -аминогруппы цистина (6,5—8,5), а также аминокгруппы метионина, триптофана, цистеина (7,6—8,4) и сульфгидрильной группы (8,3—8,6).

Сравнительная характеристика регуляторных свойств НАДФ-ИДГ, выделенной из интактной и подверженной воздействию ФНО- α , по отношению к компонентам ГП/ГР системы показала, что для фермента характерны существенные изменения регуляции активности под действием восстановленного и окисленного глутатиона.

Нами было установлено, что восстановленный глутатион (GSH) оказывает на НАДФ-ИДГ из печени крыс, подвергнутых воздействию ФНО- α наибольший активирующий эффект при концентрации 0,3 ммоль/л, при этом активность фермента превышает контрольный уровень в 1,3 раза (рис. 1). Следует отметить, что в условиях нормы GSH достоверно не влияет на ход НАДФ-ИДГ-реакции.

Окисленный глутатион (GSSG) стимулирует активность фермента, как в условиях нормы, так и при патологии (рис. 2). Показано увеличение удельной активности НАДФ-ИДГ при концентрации метаболита 0,5 ммоль/л в 1,4 раза в норме и 1,2 раза при развитии оксидативного стресса. При дальнейшем увеличении концентрации GSSG происходит снижение степени активирующего эффекта при патологии. Следует отметить, что стимуляция активности фермента при развитии апоптоза может увеличивать поставку НАДФН для рециркуляции глутатиона. По литературным данным, глутатионирование может стабилизировать ферменты, делая их менее чувствительными к воздействию АФК и протеаз [19].

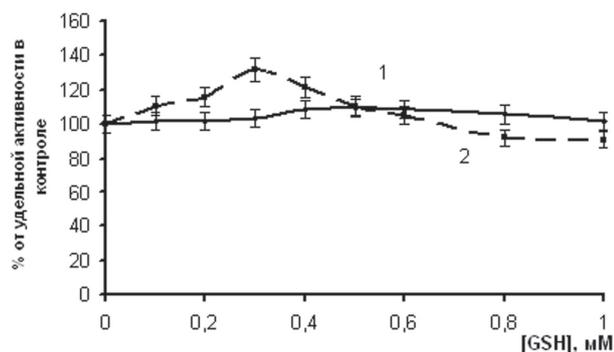


Рис. 1. Влияние восстановленного глутатиона на активность НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы, выделенной из печени крыс в норме (1) и при введении ФНО- α (2)

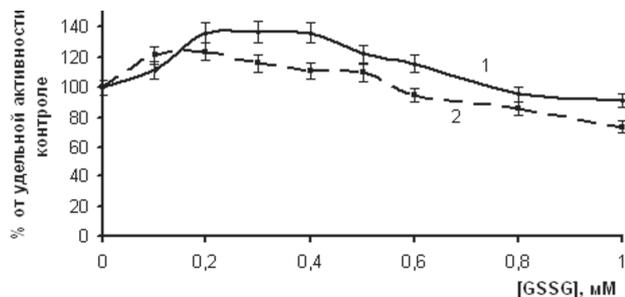


Рис. 2. Влияние окисленного глутатиона на активность НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы, выделенной из печени крыс в норме (1) и при введении ФНО- α (2)

Таким образом, в ходе исследования, проведено с использованием очищенных ферментных препаратов НАДФ-ИДГ были изучены некоторые каталитические свойства фермента из печени крыс в условиях нормы и при индукции апоптоза ФНО- α . Наблюдаемые изменения сродства НАДФ-ИДГ к субстратам, различия рН-оптимумов, а также чувствительности к регуляторному воздействию GSH и GSSG могут иметь значение для интенсификации генерирования НАДФН в гепатоцитах при развитии апоптоза, что важно для нормального функционирования глутатионовой АОС.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Jacobson M.D.* Programmed Cell Death in Animal Development / Jacobson MD, Weil M, Raff MC // Cell. — 1997. — V. 88. — P. 347—354.
2. *Bravi D.* Dopamine agonists in the clinical management of Parkinson's disease: symptomatic or neuroprotective treatment / Bravi D., Nohria V., Megas L. F. // Eur. J. Neurol. — 1996. — V. 3, № 1. — P. 13—18.
3. *Ingebretsen O.C.* Properties of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-specific diphosphopyridine nucleotide-linked isocitrate dehydrogenase from *Blastocladia emersonii* / O.C.Ingebretsen // J. Bacteriol. — 1975. — V. 124, № 1. — P. 65—72.
4. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel / Shimizu S [et al.] // VDAC. — 1999. — V. 399. — P. 483—487.
5. Blocking the Ca(2+) — activated cytotoxic mechanisms of cholinergic neuronal death: a novel treatment strategy for Alzheimer's disease // Branconnier R. J. [et al.] // Psychopharmacol. Bull. — 1992. — V. 28, № 2. — P. 175—181.
6. *Morris C.A.* Purification and properties of a Soluble nicotinamide-adenine dinucleotide-linked isocitrate dehydrogenase from *Crithidia fasciculata* / C.A. Morris, M.M. Weber // J. Biol. Chem. — 1975. — V. 250, № 7. — P. 2681—2689.
7. *Muller K.* Gpl20 of HIV-1 induces apoptosis in rat cortical cell cultures: prevention by memantine. / Muller K. // Eur. J. Pharmacol. — 1992. — V. 226, № 6. — P. 209—214.
8. *Narayanan S.* Laboratory markers as an index of aging / Narayanan S. // Ann. Clin. Lab. Sci. — 1996. — V. 26, № 1. — P. 50—59.
9. *Меерсон Ф.З.* Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца / Ф.З. Меерсон — М. Медицина, 1984.—272 с.
10. *Seelig G.F.* Characterization of the physico-chemical and catalytic properties of human heart NADP-dependent isocitrate dehydrogenase / G.F. Seelig, R.F. Colman // Arch. Biochem. and Biophys., 1978. — V. 188, №2. — P. 394—409.
11. *Skulachev V.P.* Membrane-linked systems, preventing superoxide formation / V.P. Skulachev // Bioscience Reports, 1997. — V.17, №3. — P. 347—366.
12. *Popova T.N.* Citrate and isocitrate in plant metabolism / T.N. Popova, M.A.A. Pinheiro de Carvalho // Biochim. et Biophys. Acta, 1998. — V. 1364, №3. — P. 307—325.

13. Effect of hepatocyte apoptosis induced by TNF- α on acute severe hepatitis in mouse models / Zang G.Q. [et al.] // World J Gastroentero. — 2000. — V. 6, №. 5. — P. 688—692.

14. Лойд Э. Справочник по прикладной статистике. — М.: Финансы и статистика, 1990. — С. 493—513.

15. Попова Т.Н. Исследование НАДФ-специфической ИДГ в высших растениях: Дис. докт. биол. наук. / Т.Н. Попова — М., 1994. — 338 с.

16. Курганов Б.И. Анализ колоколообразных рН-зависимостей скорости ферментативной реакции / Курганов Б.И., Петушкова Е.В. // Биохимия. — 1992. — Т.57, вып. 3. — С. 348—361.

17. Землянухин А.А. Регуляция активности и каталитических свойств гомогенной изоцитратдегидрогеназы (НАДФ) / А.А. Землянухин, Т.Н. Попова, А.Т. Епринцев // Биохимия. — 1986. — Т. 51, № 6. — С. 952—957.

18. Pardo M.A. Purification, properties and enhanced expression under nitrogen starvation of the NADP⁺-isocitrate dehydrogenase from the cyanobacterium *Phormidium laminosum* / M.A. Pardo, M.J. Llama, J.L. Serra // Biochim. Et biophys. acta. Protein Struct, and Mol. Enzymol. — 1999, V.1431, № 1. — P. 87—96.

19. Kil In Sup. Regulation of Mitochondrial NADP-dependent Isocitrate Dehydrogenase Activity by Glutathionylation / In Sup Kil, Jeen-Woo Park // J. Biol. Chem. — 2005. — V. 280, № 11. — P. 10846—10854.

Цветикова Любовь Николаевна — магистрант Воронежского государственного университета; тел.: (4732) 208-278, e-mail: tsvetik_lubik@front.ru

Рахманова Татьяна Ивановна — доцент Воронежского государственного университета; тел.: (4732) 208-278

Попова Татьяна Николаевна — профессор Воронежского государственного университета; тел.: (4732) 208-278

Tsvetikova Lyuba N. — Master's of biology, Voronezh State University; University sq. 1, Voronezh, Tel.: (4732) 208-278, e-mail: tsvetik_lubik@front.ru

Rakhmanova Tatyana I. — associate professor, Voronezh State University; University sq. 1, Voronezh, Tel.: (4732) 208-278

Popova Tatyana N. — professor, Voronezh State University; University sq. 1, Voronezh, Tel.: (4732) 208-278