

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КИНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ АКОНИТАТГИДРАТАЗЫ ИЗ МИОКАРДА КРЫСЫ В УСЛОВИЯХ НОРМЫ, ПРИ ВВЕДЕНИИ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ И ТИОКТОВОЙ КИСЛОТЫ

Н. И. Йама, Т. Н. Попова, Т. И. Рахманова

*Воронежский государственный университет*

Поступила в редакцию 6.02.2008 г.

**Аннотация.** С помощью разработанной процедуры очистки были получены ферментные препараты аконитатгидратазы (АГ; КФ. 4.2.1.3) из сердца интактных крыс и животных, подвергнутых воздействию фактора некроза опухоли —  $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ) и действию тиоктовой кислоты на фоне развития апоптоза. Дана сравнительная характеристика кинетических параметров каталитического действия аконитатгидратазы из сердца крыс исследованных групп. Выявлены изменения сродства фермента к субстратам, а также различия рН-оптимумов для АГ миокарда контрольных животных и крыс, которым вводили ФНО- $\alpha$  и тиоктовую кислоты при развитии апоптоза, что может иметь значение для смещения равновесия АГ-реакции в сторону образования или утилизации цитрата.

**Ключевые слова:** крыса, миокард, свободнорадикальное окисление, аконитатгидратаза, фактор некроза опухоли  $\alpha$ , тиоктовая кислота

**Abstract.** Enzyme preparations of aconitate hydratase (AH, KE. 4.2.1.3) have been purified from heart of intact rats and animals effected by tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) and thioctic acid. The comparative characteristic of kinetic parameters of catalytic action of AH from rats heart from different groups has been done. Changes of enzyme affinity for substrate and differences of pH-optimums for AH from myocardium of intact animals and rats effected by TNF- $\alpha$  and thioctic acid have been detected, that can be impotent for displacement of AH-reaction equilibrium to syntesys and utilization of citric acid.

**Key words:** rat, myocardium, free radical oxidation, aconitate hydratase, tumor necrosis factor, thioctic acid

### ВВЕДЕНИЕ

Фактор некроза опухоли- $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ) — провоспалительный цитокин, который рассматривается как прототип семейства молекул, с одной стороны, играющих важную роль в регуляции нормальной дифференцировки, роста и метаболизма различных клеток, а с другой стороны, выступающих в роли медиаторов патологических иммуновоспалительных процессов при заболеваниях человека как инфекционной, так и не инфекционной природы [1]. Кроме того, ФНО- $\alpha$  принимает участие в регуляции апоптоза клеток, экспрессирующих ФНО-рецепторы, а также способен вызвать генерацию в клеточной мембране активных форм кислорода (АФК), что приводит к активации процессов свободнорадикального окисления (СРО) [2] и высвобождению каталитически активных ионов  $Fe^{2+}$  из вне- и внутриклеточных депо [3]. Ионы  $Fe^{2+}$  обладают прооксидантной активностью, так как, участвуя в реакциях Фентона и Хабера-Вайса, приводят к образованию наиболее агрессивной и опасной

АФК — гидроксильного радикала [4]. Снижение внутриклеточного уровня  $Fe^{2+}$  может достигаться за счет его хелатирования цитратом. В этой связи интерес вызывает изучение особенностей функционирования ферментов, ответственных за накопление и утилизацию цитрата.

Аконитатгидратаза (АГ; КФ. 4.2.1.3) катализирует реакцию обратимой изомеризации цитрата в изоцитрат. Как известно, супероксид-радикал способен переводить АГ в неактивное состояние, что позволяет рассматривать данный фермент в качестве критической мишени действия АФК в условиях интенсификации СРО [5,6].

В последнее время значительное внимание уделяется изучению возможности применения в качестве препаратов, обладающих антиоксидантной активностью, эндогенных веществ, к числу которых относится тиоктовая кислота (ТК). Антиоксидантный эффект ТК обусловлен наличием двух тиоловых групп в молекуле, что позволяет ей связывать свободные радикалы и свободное тканевое железо. Установлено, что ТК не только обладает самостоятельным антиоксидантным потенциалом,

но и обеспечивает мощную поддержку работы других антиоксидантных звеньев в организме [7].

В связи с этим, целью данной работы явилась очистка и сравнительное исследование кинетических свойств АГ из миокарда крысы в условиях нормы, при введении ФНО- $\alpha$  и при действии ТК.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объекта исследования использовали белых крыс (*Rattus rattus* L.), самцов, массой 150—200 г. Для индукции апоптоза животным вводили актиномицин D внутривнутрибрюшинно в дозе 20 мкг/кг веса животного, через 20 минут вводили ФНО- $\alpha$  (1 мкг/кг) [2]. Исследование протекторной функции тиоктовой кислоты проводили через 12 часов после введения ФНО- $\alpha$ , что связано с наибольшей выраженностью цитолитического синдрома и максимальным уровнем развития свободнорадикальных процессов к этому времени [8]. Тиоктовую кислоту после индуцирования апоптоза вводили внутривнутрибрюшинно (35 мг/кг) трехкратно с интервалов в 3 часа.

Активность фермента определяли спектрофотометрически при 233 нм в среде следующего состава: 50 ммоль/л трис-НСI-буфер, рН 8,0 содержащий 0,6 ммоль/л цитрат. О скорости АГ-реакции судили по возрастанию оптической плотности в ходе катализируемого ферментом превращения цитрата. За единицу активности АГ (Е) количество фермента, катализирующее превращение 1 ммоль субстрата за 1 минуту при 25 °С. Активность фермента выражали в виде удельной активности. Определение белка проводили по методу Лоури.

Для получения гомогената навеску ткани сердца растирали в фарфоровой ступке в 3-х кратном объеме охлажденной среды выделения следующего состава: 50 ммоль/л трис-НСI буфер (рН 7,8), содержащий 1 ммоль/л ЭДТА, и 2%  $\beta$ -меркаптоэтанол. Гомогенат фильтровали и центрифугировали при 7000 g 10 мин. Полученный супернатант использовали для дальнейшей очистки, которая включала несколько стадий:

1. *Фракционирование белков сульфатом аммония* в границах насыщения 40-65%. Кристаллический сульфат аммония добавляли в количестве, соответствующем нижней границе насыщения. Смесь центрифугировали при 10000g в течение 15 мин. Затем к надосадочной жидкости добавляли сульфат аммония в количестве, соответствующем верхнему пределу насыщения. После центрифугирования при 15000 g в течение 10 мин получали осадок, содер-

жащий АГ. Полученный осадок растворяли в минимальном объеме исходной среды выделения.

2. *Освобождение белковой смеси от низкомолекулярных примесей* осуществляли с помощью гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-25 (1,4 × 20 см). Образец наносили в количестве не более 20—25% от объема колонки. В качестве среды элюции для АГ использовали 10 ммоль/л трис-НСI буфер (рН 8,0), содержащий 0,1 ммоль/л ЭДТА, 1%  $\beta$ -меркаптоэтанол, 10 ммоль/л Fe<sup>2+</sup>. Скорость элюции составляла 20—25 мл/час. Каждую фракцию объемом 2-3 мл анализировали на присутствие ферментативной активности. Фракции, обладающие максимальной активностью, объединяли и использовали для дальнейшей очистки.

3. *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 ступенчатого градиента КСI в той же среде элюции. Колонку промывали 20 мл 100 ммоль/л КСI, что позволило достичь удаления сопутствующих белков на данной стадии. Фермент десорбировался при использовании 20 мл 200 ммоль/л КСI. Скорость элюции составляла 20—25 мл/час.

4. *Гель-хроматография на колонке с Toyopearl HW-65* (2,2 × 65 см). Ферментный препарат наносили в объеме не более 1—3% от общего объема колонки. Элюцию проводили со скоростью 20 мл/час средой того же состава, что и в предыдущих стадиях.

Все этапы выделения и очистки фермента осуществляли при температуре 0-4°C. Опыты проводили в 3—4 кратной биологической повторяемости, аналитические определения в каждой пробе — в 2-х повторностях. Статистическую обработку данных проводили на IBM PC/AT с использованием программы «Stadia».

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

В результате 127, 134 и 140-кратных очисток были получены препараты АГ из миокарда крыс в условиях нормы, при индукции апоптоза ФНО- $\alpha$  и действии ТК на фоне развития патологии с удельными активностями 30,4; 17,4; и 21,0 Е/мг белка соответственно (табл. 1).

Необходимо отметить, что при индукции апоптоза наблюдается снижение активности фермента в 1,8 раза по сравнению с контрольным уровнем (рис. 1). Это согласуется с данными литературы, свидетельствующими, что АФК, образующиеся в

Таблица 1

Очистка аконитатгидратазы из миокарда крысы в норме, при введении ФНО- $\alpha$  и действии тиоктовой кислоты\*

Стадия очистки	Условия опыта	Общая активность $E_{\text{общ}}$	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат	Норма	12,08±0,60	0,24 ± 0,01	100,00	1,00
	Введение ФНО- $\alpha$	6,72 ± 0,34	0,13 ± 0,01	100,00	1,00
	Введение ТК при индукции апоптоза ФНО $\alpha$	7,52 ± 0,40	0,15 ± 0,01	100,00	1,00
Фракционирование сульфатом аммония	Норма	7,29 ± 0,36	1,46 ± 0,07	60,40	6,10
	Введение ФНО- $\alpha$	3,95 ± 0,20	0,80 ± 0,04	59,00	6,15
	Введение ТК при индукции апоптоза ФНО $\alpha$	4,55 ± 0,23	0,91 ± 0,04	60,50	6,10
Гель-фильтрация на сефадексе G-25	Норма	7,55 ± 0,37	1,51 ± 0,07	62,50	6,30
	Введение ФНО- $\alpha$	3,98 ± 0,20	0,80 ± 0,04	59,00	6,15
	Введение ТК при индукции апоптоза ФНО $\alpha$	4,63 ± 0,23	0,93 ± 0,05	61,60	6,20
Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	Норма	4,25 ± 0,20	8,50 ± 0,42	35,20	35,42
	Введение ФНО- $\alpha$	2,42 ± 0,12	4,84 ± 0,24	36,00	37,20
	Введение ТК при индукции апоптоза ФНО $\alpha$	3,06 ± 0,15	6,12 ± 0,30	40,70	40,80
Гель-хроматография на Тоаурpearl HW-65	Норма	1,52 ± 0,07	30,40±1,52	12,60	127,00
	Введение ФНО- $\alpha$	0,87 ± 0,04	17,40±0,87	13,00	134,00
	Введение ТК при индукции апоптоза ФНО $\alpha$	1,05 ± 0,05	21,00±1,05	14,00	140,00

\* *Примечание:* в таблицах 1, 2 обсуждаются статистически достоверные данные при  $p \leq 0,05$ 

большом количестве в условиях оксидативного стресса, приводят к разрушению важного для каталитической активности Fe-S-кластера АГ, что может приводить к накоплению цитрата, способного выполнять антиоксидантную функцию за счет хелатирования Fe<sup>2+</sup>. Полагают, что это является одним из физико-химических механизмов адаптационного характера в условиях оксидативного стресса. Действие тиоктовой кислоты на фоне введения ФНО- $\alpha$  сопровождалось активацией АГ в сердце крыс по сравнению с данными, полученными при развитии патологии. Очевидно, в условиях реализации антиоксидантного эффекта тиоктовой кислоты происходит торможение СРО в клетке, уменьшение степени повреждения молекулы АГ свободными радикалами, что приводит к изменению активности фермента в сторону нормы.

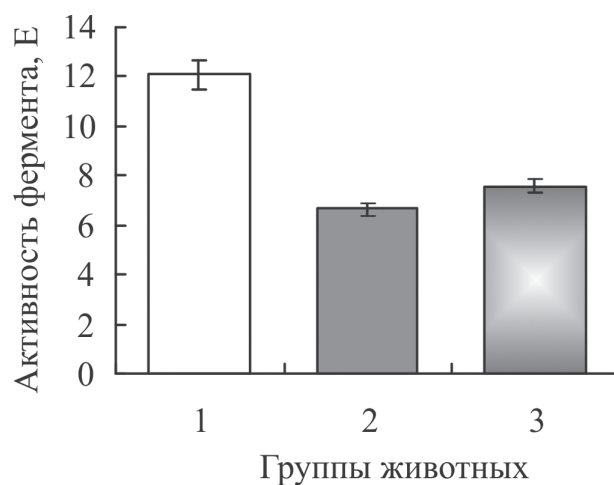
Рис. 1. Активность аконитатгидратазы из сердца крысы в условиях нормы (1), при введении ФНО- $\alpha$  (2) и действии тиоктовой кислоты на фоне индукции апоптоза (3)

Таблица 2

*Кинетические параметры каталитического действия аконитатгидратазы из миокарда крыс в условиях нормы, при введении ФНО- $\alpha$  и действии тиоктовой кислоты*

Условия опыта	Значения $K_m$ , ммоль/л		pH <sub>опт</sub>
	цитрат	изоцитрат	
Норма	0,79 ± 0,04	0,48 ± 0,02	8,0
Введение ФНО- $\alpha$	0,35 ± 0,02	0,17 ± 0,01	7,8
Введение ТК при индукции апоптоза ФНО $\alpha$	0,45 ± 0,02	0,28 ± 0,01	7,9

В ходе очистки при гель-фильтрации через сефадекс G-25 наблюдалось значительное снижение активности АГ, очевидно, связанное с нарушением структуры фермента. В некоторых работах сообщается об изменении исходной структуры Fe-S-кластера АГ вследствие диссоциации атома Fe<sub>a</sub>, участвующего в связывании субстратов, из активного центра фермента при гель-фильтрации или диализе препаратов АГ из тканей животных [9]. Добавление в среду эллюции Fe<sup>2+</sup> в концентрации 10 мкмоль/л предотвращало потерю активности фермента в ходе гель-фильтрационной хроматографии на G-25.

С помощью гель-хроматографии на Toyopearl HW-65 определены молекулярные массы АГ из миокарда исследованных групп животных, которые не отличались и составляли 50,0 ± 5,0 кДа.

В ходе исследований выявлено, что зависимость скорости АГ-реакции от концентрации субстратов в условиях нормы, при индукции апоптоза ФНО- $\alpha$  и действии ТК, подчиняется кинетике Михаэлиса-Ментен. Величины констант Михаэлиса ( $K_m$ ) для АГ из миокарда интактных крыс составляют 0,79 ммоль/л для цитрата, и 0,48 ммоль/л для изоцитрата. Выявлено, что при индукции апоптоза происходит уменьшение сродства фермента к субстратам. Так,  $K_m$  по отношению к цитрату увеличивается в 2,2 раза, а по отношению к изоцитрату — в 2,8 раза по сравнению с данными в условиях нормы. При введении ТК выявлено снижение  $K_m$  в 1,3 раза по отношению к цитрату; и в 1,6 раза по отношению к изоцитрату относительно значений при патологии (табл. 2).

Исследование зависимости скорости протекания АГ-реакции от концентрации ионов водорода показало, что как в условиях нормы, так и при патологии и действии протектора фермент проявляет активность в диапазоне значений pH от 6 до 9. Оптимум pH для АГ из нормального миокарда равен 8,0, а из сердца крыс, подвергнутого воздействию ФНО- $\alpha$  — 7,8. Установлено, что Введение ТК на фоне развития апоптоза сопровождалось смещением pH-оптимума фермента в сторону показателя контрольной группы животных.

Наблюдаемые изменения сродства фермента к субстратам, а также различия pH-оптимумов для АГ из сердца интактных крыс, подвергнутых воздействию ФНО- $\alpha$ , а также действию ТК на фоне развития апоптоза может иметь значение для смещения равновесия АГ-реакции в сторону образования или утилизации цитрата.

Таким образом, в ходе исследования, проведенного с использованием очищенных ферментных

препаратов АГ были изучены кинетические параметры каталитического действия фермента из сердца крыс в условиях нормы и при индукции апоптоза ФНО- $\alpha$ , а также при введении ТК.

*Работа поддержана финансированием Министерства образования и науки РФ по программе «Развитие научного потенциала высшей школы» РНП.2.1.1.4429*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Старикова Э.А. Изменения поверхностного фенотипа эндотелиальных клеток влиянием провоспалительных и противовоспалительных цитокинов / Э. А. Старикова // Мед. Иммунология. — 2003. — Т. 5, № 349. — С. 39—48.
2. Yogge Zhao. Activation of pro-death Bcl-2 family proteins and mitochondria apoptosis pathway in tumor necrosis-induced liver injury / Zhao Yogge // The journal of Biological Chemistry. — 2001. — №29. — P. 27432—27440.
3. Осипов А.Н. Активные формы кислорода и их роль в организме / А.Н. Осипов, О.А. Азизова, Ю. А. Владимиров // Успехи биологической химии. — 1990. — Т. 31, № 2. — С.180—208.
4. Кухтина Е.Н. Влияние железа, цинка, меди на процессы перекисного окисления липидов / Е.Н. Кухтина, Н.Н. Глущенко // Биохимия. — 1996. — Т. 61, № 6. — С. 993—997.
5. Gardner P.R. Aconitase is a sensitive and critical target of oxygen poisoning in cultured mammalian cells and in rat lungs / P.R. Gardner, D.M. Nguyen, C.W. White // Proc. Nat. Acad. Sci. — 1994. — V. 91, №25. — P. 12248—12252.
6. Superoxide Radical and Iron Modulate Aconitase Activity in Mammalian Cells / P.R. Gardner [et al.] // The American Society for Biochemistry and Molecular Biology. — 1995. — V. 270, №22. — P. 13399—13405.
7. Щербак А.В. Метаболическая терапия: доказуемые перспективы, оправдавшиеся надежды / А.В. Щербак // Здоровье Украины. — 2002. — № 10 — С. 37—59.

8. Влияние мелатонина на параметры биофлуоресценции в сыворотке крови крыс при введении фактора некроза опухоли  $\alpha$  / С.С. Попов [и др.] // Материалы 3-ей Всероссийской научно-методической конференции «Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Создание новых физиологи-

чески активных веществ (К 100-летию со дня рождения проф. Б.И. Михантьева)», Воронеж, 22—24 марта, 2007. — Часть. 1. — 291—294.

9. Gawron O.S. Properties of pig heart aconitase / O.S. Gawron // Biochem. J. — 1974. — V.143, №3. — P. 717—722.

---

**Йама Нинон Инес** — аспирант кафедры аналитической и медицинской биохимии и микробиологии Воронежского государственного университета; тел. (4732) 208-278, e-mail: cendrillon46@yandex.ru

**Yama Ninon I.** — PhD student, department of Medical Biochemistry and Microbiology, Voronezh State University, Tel.: (4732) 208-278, e-mail : cendrillon46@yandex.ru

**Попова Татьяна Николаевна** — профессор, зав. кафедрой аналитической и медицинской биохимии и микробиологии Воронежского государственного университета; тел.: (4732) 208-278, e-mail: tpopova@bio.vsu.ru

**Popova Tatiana N.** — professor, department of Medical Biochemistry and Microbiology, Voronezh State University, Tel. (4732) 208-278, e-mail: tpopova@bio.vsu.ru

**Рахманова Татьяна Ивановна** — доцент кафедры аналитической и медицинской биохимии и микробиологии Воронежского государственного университета; тел. (4732) 208-278, e-mail: rtyana@mail.ru

**Rakhmanova Tatiana I.** — associate professor, department of Medical Biochemistry and Microbiology, Voronezh State University, Tel.: (4732) 208-278, e-mail: rtyana@mail.ru