



УДК 577.152.1:616

Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в печени крыс при развитии оксидативного стресса и применение различных видов хроматографии для получения фермента в очищенном виде с целью исследования его свойств

Попова Т.Н.¹, Сафонова О.А.¹, Лущик М.В.², Шульгин К.К.¹,
Крыльский Е.Д.¹, Рахманова Т.И.¹

¹ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», Воронеж

²ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Воронеж

Поступила в редакцию 23.07.2016 г.

В печени животных при развитии патологий, сопровождающихся оксидативным стрессом, обнаружено возрастание активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, что может иметь важное адаптивное значение в связи с необходимостью поставки НАДФН для функционирования глутатионовой антиоксидантной системы. С применением очищенного фермента из печени животных с токсическим гепатитом было исследовано влияние адениннуклеотидов на его активность. Для очистки использовали методы фракционирования сульфатом аммония, гель-фильтрации через сефадекс G-25, ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе и гель-хроматографии через сефадекс G-150.

Ключевые слова: глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, печень крысы, оксидативный стресс, токсический гепатит, ревматоидный артрит, гипертиреоз, хроматографические методы очистки.

The activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in rat liver under oxidative stress development and application of chromatography different types for enzyme purification and its properties study

Popova T.N.¹, Safonova O.A.¹, Lushchik M.V.², Shul'gin K.K.¹,
Kryl'skiy E.D.¹, Rakchmanova T.I.¹

¹Voronezh State University, Voronezh

²Voronezh State Medical University named by N.N. Burdenko, Voronezh

The aim of the work was to estimate the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) in the liver of rats with experimental toxic hepatitis (ETG), rheumatoid arthritis (RA) and hyperthyroidism (HT) and to investigate some properties of the enzyme using purified preparations from rats liver tissue at the control and ETG as model systems. G6PD preparations have been obtained by chromatographic techniques combination. The induction of ETG has been implemented by CCl₄ use, PA – by complete Freund's adjuvant, GT – by triiodothyronine. G6PD activity was determined by spectrophotometry at 340 nm. Isolation and purification of the enzyme in control and ETG have been carried out by mechanical homogenization of the liver tissue, ammonium sulfate fractionation, gel-filtration over Sephadex G-25, ion-exchange chromatography on DEAE-cellulose and gel-chromatography through Sephadex G-150. The increased G6PD

activity has been found in the liver of animals under the development of pathologies accompanied by oxidative stress, that can be of great adaptive significance in relation to the need of NADPH supply for the glutathione antioxidant system functioning. Thus, it has been shown that G6PD activity expressed as U/g of wet weight increased in the liver of rats with ETG 1.5 times, under RA - 1.2 times, at HT - 1.3 times. The highly purified enzyme preparations have been obtained from the liver of control rats and animals with ETG with purification degree of 108.8 and 100.4, specific activity of 4.133 and 6.529 U/protein mg and yield of 8.2% and 8.3% respectively. With their use it has been shown that ATP, ADP and AMP affected in varying degrees on the analyzed enzyme in normal and pathological conditions, apparently due to the modification of its structure under oxidative stress. We can not exclude that some changes may play a role in the limitation of the reactive oxygen species level by NADPH supply for glutathione antioxidant system.

Keywords: glucose-6-phosphate dehydrogenase, rat liver, oxidative stress, toxic hepatitis, rheumatoid arthritis, hyperthyroidism, chromatographic methods of purification.

Введение

К настоящему времени не вызывает сомнений вовлеченность оксидативного стресса в патогенез целого ряда распространенных патологий, сопровождающихся тяжелыми медико-социальными последствиями [1]. В связи с участием печени в интеграции и регуляции процессов метаболизма многих соединений в живом организме, в том числе обезвреживании экзогенных и эндогенных токсинов, а также присутствием в большом количестве различных систем, способных генерировать свободные радикалы, данный орган чутко реагирует на возникновение при таких заболеваниях дисбаланса в организме между скоростью свободнорадикальных реакций и работой антиоксидантных систем (АОС), лимитирующих их протекание. Так, к этиологическим факторам развития повреждений печени, в которые вовлечен оксидативный стресс, могут быть отнесены токсическое действие ксенобиотиков или эндогенных соединений в чрезмерно высоких концентрациях, например, тиреоидных гормонов, а также интенсификация воспалительных процессов, что, в частности, имеет место при такой аутоиммунной патологии, как ревматоидный артрит (РА) [2-5].

В контроле за протеканием свободнорадикальных процессов в живых организмах важную роль играет глутатионпероксидазная/ глутатионредуктазная (ГП/ГР) ферментативная АОС, работа которой зависит от скорости поставки НАДФН, используемого для восстановления глутатиона, окисленного в ходе реакций обезвреживания пероксидов. В данном аспекте несомненный интерес вызывают особенности функционирования НАДФ-зависимого фермента глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ) при оксидативном стрессе. Г6ФДГ (КФ 1.1.1.49) – ключевой фермент пентозофосфатного пути, катализирующий окисление глюкозо-6-фосфата с образованием восстановленного НАДФ. При этом для анализа физико-химических параметров каталитического и регуляторного действия ферментов необходимо получение их в высокоочищенном состоянии. В современной биохимии наиболее широко используемыми в процессе очистки ферментов методами являются различные виды хроматографии [6,7].

В связи с вышесказанным целью данной работы явилась оценка активности Г6ФДГ в печени крыс при экспериментальном токсическом гепатите (ЭТГ), РА и гипертиреозе (ГТ) и исследование некоторых свойств данного фермента с использованием в качестве модельных систем очищенных ферментных препаратов Г6ФДГ из ткани печени крыс в контроле и при ЭТГ, для получения которых использовали комбинацию хроматографических методов.

Эксперимент

В качестве объекта исследования использовали самцов белых лабораторных крыс массой 150-200 г. Индуцирование ЭТГ осуществляли с применением четыреххлористого углерода, являющегося гепатотропным токсином. CCl_4 вводили животным однократно перорально после суточной пищевой депривации в дозе 0.064 мл на 100 г веса животного в виде раствора в вазелиновом масле [8]. Печень забирали на 4-е сутки, когда наблюдался максимальный цитолиз гепатоцитов [9]. РА у животных вызывали путём однократного подкожного введения в подушечку лапки 100 мкл полного адьюванта Фрейнда – комплекса соединений, вызывающего развитие данной патологии [10]. Забор материала осуществляли на 15-е сутки после введения адьюванта Фрейнда. Для моделирования ГТ животным вводили внутривенно трийодтиронин в дозе 100 мкг/100 г массы тела в виде раствора в 0.9% NaCl, трижды в течение 6 дней [11]. Печень забирали на 7-е сутки после начала эксперимента. В качестве маркеров развития патологических изменений в печени использовали активность ферментов-показателей цитолиза (аспартатаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы). При ЭТГ, РА и ГТ было отмечено существенное возрастание данных параметров в сыворотке крови животных, что, видимо, являлось следствием цитолиза гепатоцитов.

Гомогенат печени получали путем гомогенизации навески ткани в фарфоровой ступке в 4-х кратном объеме охлажденной среды выделения (50 mM трис-HCl-буфер (pH 7.8), содержащий 1 mM ЭДТА, 1% β -меркаптоэтанол) и последующего центрифугирования при 5000g в течение 10 мин для отделения неразрушенных клеточных элементов и ядер.

Активность Г6ФДГ определяли спектрофотометрически при 340 нм в среде 50 mM трис-HCl-буфера (pH 7.8), содержащего 3.0 mM глюкозо-6-фосфат, 0.25 mM НАДФ, 1.0 mM $MnCl_2$. В контроль не вносили анализируемую пробу. Реакцию начинали добавлением ферментного препарата. За единицу активности (Е) принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкмоль продукта реакции или превращение 1 мкмоль субстрата за 1 мин при температуре $+25^\circ C$.

Очистку Г6ФДГ из печени крыс осуществляли с помощью фракционирования сульфатом аммония, гель-фильтрации через сефадекс G-25, ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе, гель-хроматографии на сефадексе G-150. В ходе фракционирования выделяли белковую фракцию, выпадающую в осадок в пределах насыщения $(NH_4)_2SO_4$ 35–70%. Освобождение белковой смеси от низкомолекулярных примесей осуществляли на колонке с сефадексом G-25 (Fine, 1.7×20 см). Ферментный препарат наносили на колонку в количестве не более 20-25% от ее объема. В качестве элюирующей среды для Г6ФДГ использовали 10 mM трис-HCl буфер (pH 7.8), содержащий 1% β -меркаптоэтанол и 0.5 mM ЭДТА. Скорость элюции составляла 20-25 $cm^3/час$, ее регулирование осуществлялось путем изменения гидростатического давления. Каждую фракцию объемом 2-3 cm^3 анализировали на присутствие ферментативной активности и проводили оценку эффективности обессоливания с помощью реактива Несслера - реагента на $(NH_4)_2SO_4$ [6]. Фракции, обладающие максимальной ферментативной активностью, объединяли и использовали для дальнейшей очистки. Обессоленный раствор фермента наносили на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой (0.8×13 см), уравновешенную элюирующим буфером, и далее использовали ступенчатый градиент концентраций KCl в этой среде. На сефадекс G-150 (Fine, 2.2×65 см) ферментные образцы Г6ФДГ наносили в количестве не более 1-2% от

объема колонки. Все процедуры выделения и очистки фермента проводили при температуре 0-4⁰С.

Общее количество белка в пробах определяли по методу Лоури [12]. Определение типа и констант ингибирования осуществляли по методу Диксона [13]. Данные, полученные при проведении опытов в 3-4-кратной биологической и 2-х кратной аналитической повторностях, обрабатывали с использованием стандартных статистических методов с применением t-критерия Стьюдента [14]. Обсуждаются статистически достоверные различия при $p < 0.05$.

Обсуждение результатов

Согласно результатам проведенных экспериментов, развитие исследуемых патологических состояний сопровождается повышением активности Г6ФДГ в печени крыс по сравнению с контролем, что может иметь важное адаптивное значение в условиях оксидативного стресса в связи с необходимостью поддержания определенного уровня НАДФН для более интенсивного функционирования глутатионовой АОС. Так, показано, что при ЭТГ происходит увеличение удельной активности Г6ФДГ в печени крыс в 1.5 раза, активности фермента, выраженной в виде Е/г сырой массы, - в 1.8 раза по сравнению с контрольными значениями (рис. 1). Установлено также, что активность Г6ФДГ в печени крыс с РА, выраженная в виде Е/г сырой массы, увеличивалась в 1.2 раза, в виде Е/мг белка - в 1.4 раза (рис. 1). В условиях ГТ в печени животных активность Г6ФДГ, выраженная в Е/г сырой массы, возрастала в 1,3 раза, при этом удельная активность фермента незначительно снижалась (рис. 1). Последнее обстоятельство может быть объяснено с точки зрения повышения содержания белка при гипертиреозе.

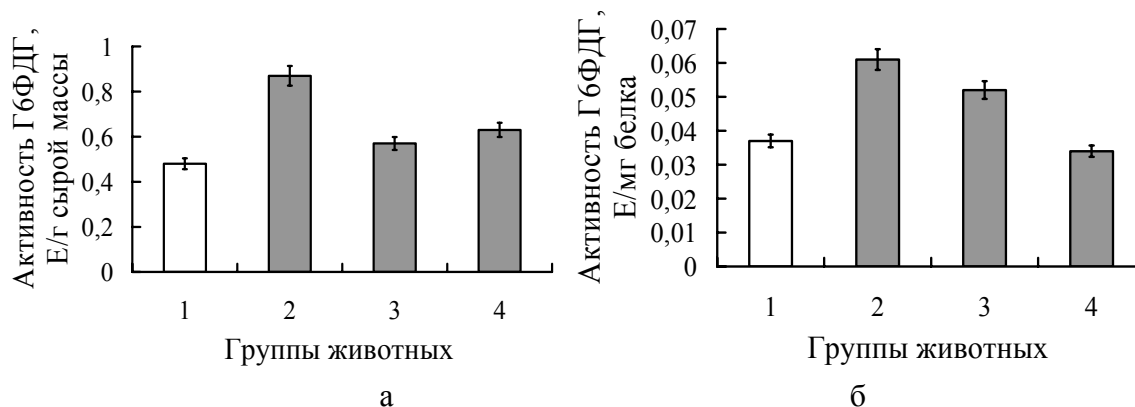


Рис. 1. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в печени крыс, выраженная в виде Е/ г сырой массы (а) и Е/ мг белка (б), в контроле (1), при ЭТГ (2), РА (3) и ГТ (4)

Очистку Г6ФДГ из печени крыс контрольной группы и животных с ЭТГ проводили по вышеописанной схеме. Результаты очистки фермента представлены в таблице 1. Фракционирование сульфатом аммония позволило добиться очистки Г6ФДГ в 5.2 и в 5.0 раз в норме и при ЭТГ соответственно. После стадии гель-фильтрации на сефадексе G-25 во фракциях, относящихся к пику активности Г6ФДГ, сульфат аммония не был обнаружен. Десорбция с ДЭАЭ-целлюлозы основного пика активности Г6ФДГ из печени контрольных животных происходила в диапазоне концентраций КСІ 150-200 мМ, а фермента, выделенного из поврежденной

печени, - в градиенте 100-150 мМ. Вероятно, при патологии происходят конформационные изменения структуры исследуемого фермента и состава аминокислот, находящихся на поверхности белковой глобулы, что находит отражение в различиях хроматографических свойств. Применение ионообменной хроматографии позволило достичь степени очистки Г6ФДГ из печени крыс контрольной группы в 34.7 раза и из печени животных с ЭТГ в 32.9 раза. На заключительном этапе очистки - гель-хроматографии на сефадексе G-150, были получены высокоочищенные ферментные препараты Г6ФДГ из печени контрольных и подвергнутых ЭТГ крыс со степенью очистки 108.8 и 100.4, удельной активностью 4.133 и 6.529 Е/мг белка, выходом 8.2 и 8.3% соответственно (табл.1).

Высокоочищенные ферментные препараты Г6ФДГ из гепатоцитов крысы были использованы для изучения регуляции активности исследуемого фермента адениннуклеотидами, являющимися индикаторами энергетического состояния клетки, содержание которых изменяется при многих патологических состояниях. Было показано, что АТФ, АДФ и АМФ оказывают в различной степени выраженное воздействие на исследуемый фермент в норме и при патологии (рис. 2). АТФ ингибирует по неконкурентному типу Г6ФДГ из печени контрольных и подвергнутых ЭТГ крыс (K_i 0.89 мМ и 0.7 мМ соответственно), причем более сильный ингибирующий эффект наблюдался в условиях нормы (рис. 2а).

Таблица 1. Очистка глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы из печени контрольных и подвергнутых токсическому гепатиту крыс

Стадия очистки	Условия опыта	Активность, Е	Количество белка, мг	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат	норма	7.52±0.19	198.00±2.80	0.04± 0.003	100.0	-
	ЭТГ	13.35±0.23*	205.43±2.60*	0.07±0.006*	100.0	-
Фракционирование (NH ₄) ₂ SO ₄	норма	4.15± 0.10	20.88± 0.29	0.19± 0.02	55.2	5.2
	ЭТГ	6.90± 0.12*	21.22± 0.30*	0.32± 0.02*	51.7	5.0
Гель-фильтрация на сефадексе G-25	норма	4.42± 0.11	20.21± 0.27	0.22± 0.01	58.7	5.8
	ЭТГ	7.41± 0.13*	20.46± 0.26*	0.36± 0.02*	55.5	5.6
Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	норма	2.24± 0.02	1.70± 0.02	1.32± 0.05	29.8	34.7
	ЭТГ	3.70± 0.06*	1.73± 0.02*	2.14± 0.12*	27.7	32.9
Гель-хроматография на сефадексе G-150	норма	0.62± 0.04	0.15± 0.001	4.13± 0.32	8.2	108.8
	ЭТГ	1.11± 0.05*	0.17 ±0.001*	6.53± 0.40*	8.3	100.4

* - отличия от нормы достоверны (уровень значимости – 0.005<P<0.05)

Влияние АДФ на активность фермента имело более сложную зависимость (рис. 2б). При концентрациях АДФ до 0.02 мМ было выявлено незначительное повышение активности фермента, при увеличении концентрации - угнетение активности Г6ФДГ, более выраженное в патологически измененной печени. K_i , определенные в диапазоне концентраций от 0.08 до 0.4 мМ, составили 0.42 и 0.3 мМ в контро-

ле и при ЭТГ. Для АМФ в условиях нормы наблюдался активирующий эффект при концентрации до 1.0 мМ, при повышении концентрации до 3.0 мМ отмечалось незначительное снижение активности Г6ФДГ (рис. 2в). При ЭТГ было выявлено более существенное возрастание активности фермента под действием данного нуклеотида. Так, при концентрации АМФ 2.0-3.0 мМ скорость реакции, катализируемой Г6ФДГ, увеличивалась в 1.8 раза (рис. 2в).

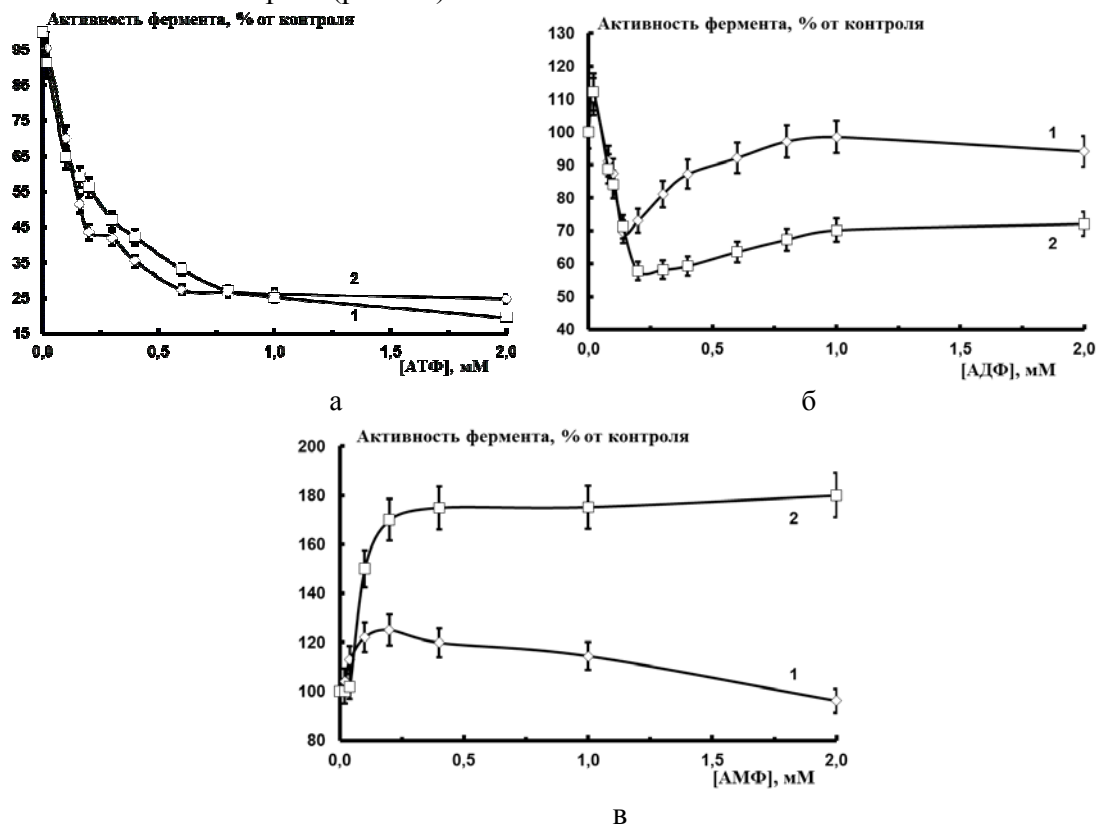


Рис. 2. Влияние АТФ (а), АДФ (б) и АМФ (в) на активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы из печени крыс в норме (1) и при токсическом гепатите (2)

Заключение

Таким образом, обнаружены значительные изменения в активности Г6ФДГ при ЭТГ, РА и ТГ по сравнению с контролем. Комбинирование хроматографических методов позволило получить в высокоочищенном состоянии Г6ФДГ из печени крыс контрольной группы, а также животных с ЭТГ и исследовать некоторые регуляторные свойства данного фермента. Полученные результаты свидетельствуют об изменении функционирования Г6ФДГ, по-видимому, вследствие модификации ее структуры в условиях развития оксидативного стресса. Нельзя исключить, что определенные изменения могут играть роль в лимитировании уровня активных форм кислорода и, как следствие, в уменьшении интенсивности свободнорадикального окисления за счет поставки НАДФН для ГР/ГП АОС.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2014-2016 годы (задание № 6.2477.2014/К).

Список литературы

1. Попова Т.Н., Пашков А.Н., Семенихина А.В., Попов С.С. и др. Свободнорадикальные процессы в биосистемах. Старый Оскол. Кириллица. 2008. 192 с.
2. Lee W.M. // *N. Eng. J. Med.* 1995. Vol. 333. No 17. pp. 1118-1127.
3. Fernandez V., Barrientos X., Kipreos K. // *Endocrinology*. 1985. Vol. 117. pp. 496-501.
4. Вратских Е.В., Балабанова Р.М. // *Научно-практическая ревматология*. 2003. № 1. С. 60-63.
5. Hitchon C.A., El-Gabalawy H.S. // *Arthritis Res. Ther.* 2004. Vol. 6. No. 6, pp. 265-278.
6. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. М. Высшая школа. 1980. 272 с.
7. Рудаков О.Б., Востров И.А., Федоров С.В., Филиппов А.А. и др. Спутник хроматографиста. Методы жидкостной хроматографии. Воронеж. Водолей. 2004. 528 с.
8. Сидорова В.Ф., Рябинина З.А., Лейкина Е.М. Регенерация печени у млекопитающих. М. Медицина. 1966. 240 с.
9. Левенкова М.В., Попова Т.Н., Семенихина А.В. // *Биомедицинская химия*. 2006. Т. 52. № 3. С. 278-286.
10. Wang D., Chang Y., Wu Y., Zhang L. et al. // *Clin. Exp. Immunol.* 2011. Vol. 163. No 2. pp. 225-234.
11. Fernandez V., Simizu K., Barros S.B.M. // *Endocrinology*. 1991. Vol. 129. pp.85-91.
12. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // *J. Biol. Chem.* 1951. Vol. 193. pp. 265-275.
13. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М. Мир. 1982. Т. 2. 515 с.
14. Ллойд Э., Ледерман У. Справочник по прикладной статистике. М. Финансы и статистика. 1990. 525 с.

References

1. Popova T.N., Pashkov A.N., Semenikhina A.V., Popov S.S. et al., Svobodnoradikal'nye protsessy v biosistemakh, Staryi Oskol, Kirillitsa, 2008, 192 p.
2. Lee W.M., *N. Eng. J. Med.*, 1995, Vol. 333, No 17, pp. 1118-1127.
3. Fernandez V., Barrientos X., Kipreos K., *Endocrinology*, 1985, Vol. 117, pp. 496-501.
4. Vratskikh E.V., Balabanova R.M., *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya*, 2003, No 1, pp. 60-63.
5. Hitchon C.A., El-Gabalawy H.S., *Arthritis Res. Ther.*, 2004, Vol. 6, No 6, pp. 265-278.
6. Kochetov G.A. *Prakticheskoe rukovodstvo po enzimologii*. M., Vysshaya shkola, 1980, 272 p.
7. Rudakov O.B., Vostrov I.A., Fedorov S.V., Filippov A.A. et al., *Sputnik hromatografista. Metody zhidkostnoj hromatografii*. Voronezh, Vodolej, 2004, 528 p.
8. Sidorova V.F., Ryabinina Z.A., Leikina E.M. *Regeneratsiya pecheni u mlekopitayushchikh*. M., Meditsina, 1966, 240 p.
9. Levenkova M.V., Popova T.N., Semenikhina A.V., *J. of Biomedical Chemistry*, 2006, Vol. 52, No 3, pp. 278-286.
10. Wang D., Chang Y., Wu Y., Zhang L. et al., *Clin. Exp. Immunol.*, 2011, Vol. 163, No 2, pp. 225-234.
11. Fernandez V., Simizu K., Barros S.B.M., *Endocrinology*, 1991, Vol. 129, pp.85-91.
12. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., *J. Biol. Chem.*, 1951, Vol. 193, pp. 265-275.
13. Dicson M., Webb E. *Enzymes*. M., Mir Publ., 1982, Vol. 2, 515 p.
14. Lloid E., Lederman U. *Spravochnik po prikladnoj statistike*. M., Finansy i statistika Publ., 1990, 526 p.

Попова Татьяна Николаевна – профессор, зав. кафедрой медицинской биохимии и микробиологии, д.б.н., Воронежский государственный университет, Воронеж

Сафонова Ольга Анатольевна – доцент кафедры медицинской биохимии и микробиологии, к.б.н., Воронежский государственный университет, Воронеж

Popova Tatyana N. – prof., grand Ph.D (biology), Department of medical biochemistry and microbiology, Voronezh State University, Voronezh

Safonova Olga A. – Ph.D (biology), associate prof., Department of medical biochemistry and microbiology, Voronezh State University, Voronezh, e-mail: solya333@mail.ru.

Лущик Марина Валерьевна – ассистент кафедры патологической физиологии, к.б.н., Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко, Воронеж

Шульгин Константин Константинович – доцент кафедры медицинской биохимии и микробиологии, к.б.н., Воронежский государственный университет, Воронеж

Крыльский Евгений Дмитриевич – аспирант кафедры медицинской биохимии и микробиологии Воронежского государственного университета, Воронеж

Рахманова Татьяна Ивановна – доцент кафедры медицинской биохимии и микробиологии, к.б.н., Воронежский государственный университет, Воронеж

Lushchik Marina V. Ph.D (biology), assistant, Department of pathological physiology, Voronezh State Medical University named by N.N. Burdenko, Voronezh

Shul'gin Konstantin K. – Ph.D (biology), associate prof., Department of medical biochemistry and microbiology, Voronezh State University, Voronezh

Kryl'skiy Evgenij D. – the postgraduate student, Department of medical biochemistry and microbiology, Voronezh State University, Voronezh

Rakchmanova Tatyana I. – Ph.D (biology), associate prof., Department of medical biochemistry and microbiology, Voronezh State University, Voronezh