



УДК 543.544.941: 577.151.0: 616.36-002.2

Исследование параметров каталитического действия глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, выделенной с помощью хроматографических методов, при патологии печени

© 2021 Попова Т.Н.¹, Лущик М.В.², Попов С.С.², Веревкин А.Н.¹, Семенихина А.В.¹, Попова С.Е.¹

¹Воронежский государственный университет, Воронеж

²Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Воронеж

Поступила в редакцию 19.01.2021 г.

DOI: 10.17308/sorpchrom.2021.21/3359

Целью работы было исследование активности ключевого фермента пентозофосфатного пути – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ, КФ 1.1.1.49), при патологии печени, а также выделение фермента с использованием хроматографических методов и изучение его каталитических свойств. Анализ активности Г6ФДГ осуществляли в сыворотке крови пациентов с алкогольным гепатитом, находящихся на лечении в стационаре. В контрольную группу были включены практически здоровые доноры с нормальными показателями общего и биохимического анализов крови. Экспериментальный токсический гепатит (ЭТГ) индуцировали путем перорального введения CCl_4 самцам белых лабораторных крыс (*Rattus norvegicus*) Wistar. Активность Г6ФДГ определяли спектрофотометрически при длине волны 340 нм. Очистку фермента из печени лабораторных животных осуществляли с помощью фракционирования сульфатом аммония, гель-фильтрации через Sephadex G-25 и G-150, а также ионообменной хроматографии через ДЭАЭ-целлюлозу. Чистоту полученных ферментных препаратов оценивали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Общее количество белка в пробах определяли по методу Лоури.

Выявлено, что наряду с существенным возрастанием маркерных показателей патологии печени – аспартатаминотрансферазы (АСАТ) и аланинаминотрансферазы (АЛАТ), происходили изменения активности Г6ФДГ при токсическом гепатите у пациентов и в эксперименте на животных по сравнению с контрольными группами. Применение хроматографических методов для очистки Г6ФДГ из печени крыс в норме и при ЭТГ позволило получить ферментные препараты с удельной активностью 4.13 и 6.53 Е/мг белка; с выходом 8.2 и 8.3%, соответственно, которые были использованы для изучения кинетических свойств. Установлено, что кинетика ферментативной реакции, катализируемой Г6ФДГ, подчиняется уравнению Михаэлиса-Ментен. При ЭТГ наблюдается увеличение скорости ферментативной реакции, сопровождаемое повышением сродства к субстрату и коферменту. Определены константы ингибирования и тип ингибирования для АТР, АДФ и NADPH Г6ФДГ из печени крыс в норме и при ЭТГ. Полученные результаты позволяют предположить, что изменение активности Г6ФДГ при токсическом гепатите сопряжено с конформационными перестройками белковой молекулы без изменения ее первичной структуры на фоне интенсификации свободнорадикальных процессов.

Ключевые слова: токсический гепатит, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, активность, очистка.

Введение

В современном мире число людей с заболеваниями печени неуклонно растет, что, в первую очередь, связано с увели-

чением метаболической нагрузки на данный орган в результате поступления в организм большого количества веществ, в том числе токсинов и лекар-

ственных препаратов. Это приводит к развитию токсического поражения печени, что может проявляться в виде стеатоза, фиброза и цирроза. Несмотря на значительные успехи медицины в лечении заболеваний печени, многие вопросы этиологии и патогенеза в настоящее время требуют уточнения и дальнейшего изучения.

Большое количество исследований свидетельствует о ведущей роли окислительного стресса в патогенезе заболеваний печени. Известно, что метаболизм ксенобиотиков приводит к образованию реактивных молекул, которые вызывают повреждение гепатоцитов. Защиту организма от свободных радикалов осуществляет антиоксидантная система, ключевую роль в которой выполняет восстановленный глутатион. Показано, что снижение его уровня приводит к накоплению продуктов пероксидного окисления липидов, что ведет к повреждению клеточных макромолекул [1]. Поддержание данного тиола в восстановленном состоянии без увеличения его синтеза осуществляется благодаря функционированию глутатионредуктазы за счет восстановительных эквивалентов в виде NADPH. Основным поставщиком NADPH в клетке служит пентозофосфатный путь, ключевым ферментом которого является глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г6ФДГ).

Целью данной работы явилась оценка активности Г6ФДГ в сыворотке крови больных алкогольным гепатитом и в печени крыс при экспериментальном токсическом гепатите, а также очистка данного фермента с использованием хроматографических методов и изучение его каталитических свойств.

Экспериментальная часть

В ходе исследования была сформирована группа больных (74 человека), с алкогольным гепатитом, развивающимся вследствие хронического употребления алкоголя. Использовали сыворотку крови пациентов, находящихся на лечении в

условиях стационара (ГУЗ ВОКПД им. Н.С. Похвисневой, КУЗВО «Воронежский областной клинический психоневрологический диспансер»). Средняя продолжительность заболевания – 6.2 ± 0.4 месяца. Возраст больных – от 22 до 70 лет (средний возраст – 41.4 ± 7.2 года), все пациенты были мужского пола. При наличии острого нарушения мозгового кровообращения, сахарного диабета, вирусных гепатитов, злокачественных новообразований, острого инфаркта миокарда, хронической почечной недостаточности больные не включались в исследование. В контрольную группу вошли 65 практически здоровых доноров в возрасте от 21 до 52 лет с нормальными показателями общего и биохимического анализов крови. Кровь для исследования забиралась в пробирки типа «вакутейнер» в утреннее время, натощак, из локтевой вены. При проведении клинического исследования были соблюдены необходимые этические нормы. Проводимые исследования были одобрены Этическим комитетом Воронежского государственного медицинского университета им. Н.Н. Бурденко.

Объектом исследования также служили самцы белых лабораторных крыс (*Rattus norvegicus*) Wistar массой 150-200 г. (питомник лабораторных животных КролИнфо, Россия, Московская обл.). Все манипуляции были выполнены в соответствии с правилами гуманного обращения с лабораторными животными (Директива 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22.09.2010) и санитарными нормами для вивариев (ГОСТ 33216-2014). Для развития экспериментального токсического гепатита (ЭТГ) крысам вводили CCl_4 в дозе 64 мкл на 100 г веса [2]. Тетрахлорметан вводили однократно перорально в виде раствора в вазелиновом масле. За сутки до этого, животных лишали свободного доступа к пище.

На 4-е сутки после начала эксперимента животным под наркозом производили лапаротомию и перфузировали пе-

чень ледяным изотоническим раствором хлорида натрия через *v. portae*. Навеску ткани гомогенизировали в 0.050M трис-НСl буфере (рН 7.8), содержащем 1% β-меркаптоэтанол, 1 мМ ЭДТА с использованием лабораторного гомогенизатора Daihan HG-15A.

Полученный гомогенат пропускали через фильтр, размер ячеек которого составлял 0.1 мм. Фильтрат центрифугировали при 5000 об/мин на протяжении 10 мин. Для последующих исследований использовали супернатант.

Скорость Г6ФДГ-реакции оценивали по увеличению оптической плотности, обусловленному генерацией NADPH в ходе превращения глюкозо-6-фосфата (Г6Ф) в 6-фосфоглюконолактон. Активность Г6ФДГ определяли сектрофотометрически при $\lambda=340\text{nm}$ в 0.05 мМ трис-НСl буфере (рН7.8), содержащем 0.25мМ NADP, 3.0мМ Г6Ф и 1.0мМ MnCl_2 [3]. В качестве контрольной пробы использовали среду спектрофотометрирования без исследуемого образца. Реакцию запускали добавлением ферментного препарата. За единицу ферментативной активности (Е) принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкмоль продукта реакции или превращение 1 мкмоль субстрата за 1 мин при температуре +25°C.

Очистку Г6ФДГ из печени крыс осуществляли посредством фракционирования $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, гель-фильтрации через Sephadex G-25 и G-150, а также ионообменной хроматографии через ДЭАЭ-целлюлозу.

В ходе фракционирования $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ была выделена фракция белков, выпадающих в осадок при изменении концентрации агента от 35 до 70%. На следующем этапе очистки избавлялись от низкомолекулярных примесей, в том числе от сульфата аммония, при помощи гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-25 (Fine, 1.7×20 см). Разделяемая смесь была нанесена на сорбент в количестве не более 20-25% от его объема. В среду элюирования для Г6ФДГ вносили

β-меркаптоэтанол (конечная концентрация 1%) и ЭДТА (до 0.5 мМ), в качестве растворителя использовали 10 мМ трис-НСl буфер (рН 7.8). Элюирование с сорбента осуществляли со скоростью 20-25 см³/час, для регулирования меняли гидростатическое давление. В ходе элюирования собирали фракции объемом 2-3 мл и в каждой определяли активность исследуемого фермента. Для подтверждения избавления от сульфата аммония использовали реактив Несслера [4]. В дальнейшей работе использовали объединенные фракции с максимальной активностью Г6ФДГ, не содержащие $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Дальнейшую очистку проводили методом ионообменной хроматографии на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой. В качестве элюирующего раствора использовали 10мМ трис-НСl буфер (рН 7.8), содержащий ЭДТА (0.5 мМ) и β-меркаптоэтанол (1%). Для удаления белков, не связавшихся с хроматографическим носителем, сорбент промывали 20 мл среды элюции. Десорбцию заряженных белков с колонки, в том числе и Г6ФДГ, осуществляли посредством создания ступенчатого градиента хлорида калия в элюирующем буфере. Скорость элюции составляла 30 см³/час. В получаемых фракциях объемом 2.5-3.0 см³, определяли активность Г6ФДГ и концентрацию общего белка.

На Sephadex G-150 (Fine, 2.2×65 см) ферментные образцы Г6ФДГ наносили в количестве не более 1-2% от объема колонки. Скорость элюции составляла 25 см³/час.

Определение степени чистоты фракций фермента после фильтрации на Sephadex G-150 проводили методом электрофореза в ПААГ [5]. Гели окрашивали нитратом серебра [6].

Содержали общего белка определяли по методу Лоури [7]. Все экспериментальные процедуры, связанные с выделением и очисткой фермента проводили при 0-4°C.

Опыты осуществляли в 4-кратных биологических и 2-кратных аналитических повторностях. Для обработки ре-

зультатов исследования использовали описательную статистику с определением выборочного среднего, выборочного стандартного отклонения, стандартной ошибки среднего [8]. Результаты работы анализировали, используя t-критерий Стьюдента для множественных сравнений с поправкой Бонферрони. Нормальность распределения значений оценивалось с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Достоверными считали различия при $p < 0.05$.

Обсуждение результатов

В ходе проведенного эксперимента было установлено, что активность Г6ФДГ в сыворотке крови доноров, входящих в контрольную группу, составляла 0.152 Е/мл; удельная активность – 0.0014 Е/мг белка. При алкогольном гепатите активность Г6ФДГ, выраженная в Е на мл сыворотки, снижалась в 1.4 раза ($p < 0.05$) по сравнению с контрольной группой. При этом удельная активность фермента уменьшалась в 1.5 ($p < 0.05$) раза. Следует отметить, что при этом существенно изменялась активность и маркерных ферментов, активность которых служит показателями развития патологии печени – аспартатаминотрансферазы (АСАТ) и аланинаминотрансферазы (АЛАТ). Так, у пациентов с алкогольным гепатитом, активности АСАТ и АЛАТ возрастали в 2.9 ($p < 0.05$) и 2.5 ($p < 0.05$) раза, соответственно, что свидетельствует о существенном нарушении функции печени. По-видимому, снижение активности Г6ФДГ, негативно отражалось на функционировании глутатионредуктазной/глутатионпероксидазной антиоксидантной системы, что было взаимосвязано с нарушением свободно-радикального гомеостаза и реализацией такого механизма патогенеза, как оксидативный стресс. Известно, что Г6ФДГ, как ключевой фермент пентозофосфатного пути, участвует в генерировании основной доли NADPH, необходимого для работы глутатионовой АОС [9]. Наблюдаемое падение активности ис-

следуемого фермента в определенной степени может быть обусловлено истощением резервов организма, направленными на поддержание нормального уровня Г6ФДГ, и переходом клеток в стадию декомпенсации. Это, очевидно, сопряжено с довольно длительным периодом заболевания.

Установлено, что при развитии ЭТГ на фоне интенсификации процессов СО и изменении антиоксидантного статуса происходит возрастание активности Г6ФДГ в печени крыс. Так, на 4-е сутки после введения CCl_4 активность исследуемого фермента увеличивалась в 1.7 ($p < 0.05$) раза по сравнению с группой контрольных животных. Вероятно, рост активности Г6ФДГ является ответом организма на интенсификацию СРП в гепатоцитах при развитии патологии. Известно, что значительная часть генерируемого NADPH данным ферментом используется в ходе функционирования глутатионредуктазной/глутатионпероксидазной антиоксидантной системы на восстановление окисленного глутатиона. Кроме того, повреждение структуры ДНК под влиянием радикалов при развитии патологии приводит к запуску репаративных механизмов, что увеличивает потребности клеток в структурных компонентах ДНК, в том числе пентоз, которые синтезируются в пентозофосфатном пути.

Разнонаправленные изменения ферментативной активности при патологии у людей и экспериментальных животных, очевидно, связаны с различной длительностью течения патологического процесса. При индуцировании ЭТГ в эксперименте на животных включаются компенсаторные механизмы, направленные на коррекцию негативных проявлений, тогда как при длительном хроническом характере заболевания у пациентов, имеют место изменения, сопряженные со стадией декомпенсации.

Хроматографическую очистку Г6ФДГ из печени экспериментальных животных проводили согласно следующей схеме:

1. Фракционирование $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.
2. Гель-фильтрация через Sephadex G-25.
3. Ионообменная хроматография через ДЭАЭ-целлюлозу.
4. Гель-фильтрация через Sephadex G-150.

На начальной стадии с помощью фракционирования ферментного препарата $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ удалось произвести очистку Г6ФДГ в 5.2 раза в контрольной группе и в 5.0 раз в группе животных с ЭТГ. Дальнейшую очистку проводили с помощью гель-фильтрации на колонке с Sephadex G-25, что позволило удалить низкомолекулярные примеси. Фракции, обладающие максимальной активностью и не содержащие примеси сульфата аммония, объединяли и использовали в ходе хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе. Показано, что максимум активности Г6ФДГ из печени контрольных животных наблюдался при десорбции фермента с ДЭАЭ-целлюлозы в диапазоне концентраций хлорида калия 150-200 мМ, а в группе животных с ЭТГ – 100-150 мМ. Наблюдаемые изменения в хроматографических свойствах Г6ФДГ, вероятно, обусловлены изменениями в пространственной структуре молекулы фермента, а также состава аминокислот, находящихся на поверхности белковой глобулы. Проведение ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе способствовало увеличению степени очистки

Г6ФДГ в 34.7 раза в норме и в 32.9 раза при ЭТГ. Очистка ферментного препарата Г6ФДГ на колонке с Sephadex G-150 позволила повысить степень очистки в 108.8 и 100.4 раза в группе контрольных и подвергнутых ЭТГ животных соответственно (таблица 1).

Таким образом, благодаря использованию указанной последовательности хроматографических методов удалось получить чистый ферментный препарат с относительно небольшими потерями.

С использованием метода электрофореза в ПААГ была проведена оценка степени гомогенности ферментного препарата после гель-фильтрации на колонке с Sephadex G-150 (рис. 1). Установлено, что во фракциях с максимальной активностью Г6ФДГ белок проявлялся в виде одной полосы, что свидетельствует о гомогенности исследуемого фермента. При этом значение R_f совпадали как в контроле, так и при ЭТГ и составило 0.63.

В ходе эксперимента было установлено, что кинетика, катализируемой Г6ФДГ, реакции подчиняется уравнению Михаэлиса-Ментен. С использованием метода двойных обратных координат было рассчитано значение K_m для исследуемого фермента из печени контрольных животных по отношению к Г6Ф (0.520 мМ) и NADP (0.049 мМ).

Таблица 1. Очистка глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы из печени контрольных животных и крыс с токсическим гепатитом

Table 1. Purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from the livers of control animals and rats with toxic hepatitis

Фракции, содержащие фермент	Группы животных	Активность фермента, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Супернатант после центрифугивания	контроль	0.04±0.003	100.0	–
	ЭТГ	0.07±0.006*	100.0	–
Осадок, образующийся в 35-70%-ном $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	контроль	0.19±0.020	55.2	5.2
	ЭТГ	0.32±0.020*	51.7	5.0
Фракции после гель-фильтрации на Sephadex G-25	контроль	0.22±0.010	58.7	5.8
	ЭТГ	0.36±0.020*	55.5	5.6
Фракции после хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе	контроль	1.32±0.050	29.8	34.7
	ЭТГ	2.14±0.120*	27.7	32.9
Фракции после гель-фильтрации на Sephadex G-150	контроль	4.13±0.320	8.2	108.8
	ЭТГ	6.53±0.400*	8.3	100.4

* различия достоверны при $p < 0.05$ / differences are significant at $p < 0.05$

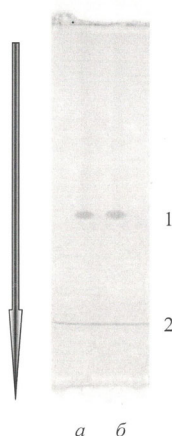


Рис. 1. Электрофореграмма ферментного препарата глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы после гель-фильтрации на колонке с Sephadex G-150 из печени крысы в норме (а) и при экспериментальном токсическом гепатите (б): 1 – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа; 2 – фронт маркера. Стрелкой указано направление движения белка во время электрофореза

Fig. 1. Electropherogram of an enzyme preparation of glucose-6-phosphate dehydrogenase after gel filtration on a column with Sephadex G-150 from rat livers under normal conditions (a) and during experimental toxic hepatitis (b): 1 – glucose-6-phosphate dehydrogenase; 2 – marker front. The arrow indicates the direction of movement of the protein during electrophoresis.

При этом значения K_m из печени крыс с ЭТГ для Г6Ф и NADP составили 0.370 и 0.041 мМ соответственно. Очевидно, что увеличение скорости Г6ФДГ-реакции связано с повышением сродства фермента к субстрату и коферменту. Вероятно, это обусловлено изменениями биохимических процессов в клетке при развитии патологии.

В ходе исследования установлено, что на активность Г6ФДГ из печени как контрольных, так и животных с ЭТГ АТР оказывает ингибирующее влияние по неконкурентному типу (таблица 2). При этом, наибольший эффект отмечен в группе нормальных крыс по сравнению с патологией. Установлено, что наиболее интенсивно активность Г6ФДГ ингибируется при концентрациях АТР до 0.4 мМ в обоих исследуемых группах животных. Увеличение концентрации АТР до 2.0 мМ способствует более плавному снижению активности Г6ФДГ.

Влияние АDP на активность Г6ФДГ носило разнонаправленный характер. Так, при концентрациях АDP до 0.02 мМ наблюдалась незначительная активация ферментативной активности, а при увеличение – активность Г6ФДГ снижалась.

При этом в группе крыс с ЭТГ ингибирующий эффект АDP на активность Г6ФДГ был более выражен по сравнению с контрольной группой. Константы ингибирования для АDP, рассчитанные в диапазоне концентраций 0.08-0.40 мМ, составили 0.42 мМ в группе контрольных животных и 0.30 мМ в группе животных с ЭТГ (таблица 2). Согласно данным литературы, АТР по отношению к НАДФ⁺ является ингибитором неконкурентного типа, а по отношению к глюкозо-6-фосфату – смешанного типа [10].

Показано, что активность Г6ФДГ ингибируется NADPH по конкурентному типу по отношению к NADP и в контрольной и в группе животных с токсическим гепатитом. При этом значение константы ингибирования в группе животных с ЭТГ снижается в 1.32 раза, что свидетельствует о большей чувствительности фермента к действию NADPH при патологии. При низких концентрациях NADPH (0.14 мМ в норме и 0.16 мМ при ЭТГ) степень ингибирования незначительно снижалась. Дальнейшее увеличение уровня метаболита приводило к значительному подавлению активности и при концентрации 2.0 мМ составило

Таблица 2. Константы ингибирования, K_i , и тип ингибирования глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы из печени крыс в норме и при токсическом гепатите
 Table 2. Inhibition constants, K_i , and the type of inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase from rat livers under normal conditions and during toxic hepatitis

Ингибитор	Группы животных	Константа ингибирования K_i , мМ	Тип ингибирования
АТФ	контроль	0.72±0.01	Неконкурентное
	ЭТГ	0.68±0.01	Неконкурентное
ADP	контроль	0.42±0.01	Неконкурентное
	ЭТГ	0.30±0.01	Неконкурентное
NADPH	контроль	1.30±0.03	Конкурентное
	ЭТГ	0.98±0.02*	Конкурентное

55.1% в контроле и почти 70.0% при ЭТГ.

Согласно данным литературы, NADPH ингибирует активность Г6ФДГ, выделенную из печени крыс, мышей, жировой ткани крыс, по конкурентному типу [11, 12]. Константа ингибирования фермента по NADPH из жировой ткани крыс составляет 150 мкМ. Для Г6ФДГ из листьев гороха K_i по NADPH составляет 0.027 мМ [13].

Заключение

Таким образом, показано, что имеют место существенные изменения активности Г6ФДГ как у людей, страдающих

алкогольным гепатитом, так и при токсическом поражении печени у экспериментальных животных. Применение хроматографических методов позволило получить высокоочищенные ферментные препараты из печени экспериментальных животных и изучить ряд кинетических характеристик. Полученные результаты позволяют предположить, что изменение активности Г6ФДГ при токсическом гепатите сопряжено с конформационными перестройками белковой молекулы без изменения ее первичной структуры на фоне интенсификации свободнорадикальных процессов.

Список литературы

1. Iimuro Y., Bradford B.U., Yamashina S., Rusyn I. et al. // *Hepatology*. 2000. Vol. 31. pp. 391-398.
2. Андреещева Е.М., Попова Т.Н., Артюхов В.Г., Матасова Л.В. // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2004. № 4. С. 399-402.
3. Betke K., Brewer G.J., Kirkman H.N. // *Tech. Rep. Ser.* 1967. Vol. 366. pp. 30-32.
4. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. М. Высшая школа. 1980. 272 с.
5. Davis B.J., Jones R.G., Farmer G.R. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1964. Vol. 121. pp. 404-427.
6. Shevchenko A., Wilm H., Vorm O. // *Anal. Chem.* 1996. Vol. 68. pp. 850-858.
7. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // *J. Biol. Chem.* 1951. Vol. 193. pp. 265-275.
8. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М. Практика. 1999. 459 с.
9. Gong Z., Tian G.L., Huang Q.W., Wang Y.M. et al. // *BMC pediatrics*. 2017. Vol. 17. No 172. pp. 1-6.
10. Askar M.A., Sumathy K., Baquer N.Z. // *Indian journal of biochemistry & biophysics*. 1996. Vol. 33. No 6. pp. 512-518.
11. Velasco P., Barcia R., Ibarguren I., Sieiro A.M. et al. // *The International journal of biochemistry*. 1994. Vol. 26. No 2. pp. 195-200.
12. Levy H.R., Vought V.E., Yin X., Adams M.J. // *Archives of biochemistry and biophysics*. 1996. Vol. 326. No 1. pp. 145-151.
13. Семенихина А.В., Попова Т.Н., Матасова Л.В. // *Биохимия*. 1999. Т. 64. № 8. С. 1029-1033.

The investigation of the parameters of the catalytic action of glucose-6-phosphate dehydrogenase isolated by chromatographic methods in liver pathology

© 2021 Popova T.N.¹, Lushchik M.V.², Popov S.S.², Verevkin A.N.¹, Semenikhina A.V.¹, Popova S.E.¹

¹Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation

²Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko, Voronezh, Russian Federation

The aim of the study was the investigation of the activity of the key enzyme of the pentose phosphate pathway – glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH, EC 1.1.1.49) in liver pathology, as well as the isolation of the enzyme using chromatographic methods and the study of its catalytic properties. The analysis of G6PDH activity was carried out in the blood serum of patients with alcoholic hepatitis undergoing treatment in a hospital. The control group included effectively healthy donors with normal indicators of general and biochemical blood tests. Experimental toxic hepatitis (ETH) was induced by the oral administration of CCl₄ to male white Wistar rats (*Rattus norvegicus*). The activity of G6PDH was determined spectrophotometrically at a wavelength of 340 nm. Purification of the enzyme from the liver of laboratory animals was carried out using fractionation with ammonium sulphate, gel filtration through Sephadex G-25 and G-150, and ion exchange chromatography through DEAE-cellulose. The purity of the obtained enzyme preparations was assessed using polyacrylamide gel electrophoresis. The total amount of protein in the samples was determined by the Lowry method.

It was revealed that along with a significant increase in the marker indicators of liver pathology - aspartate aminotransferase (ASAT) and alanine aminotransferase (ALAT), the activity of G6PDH also changed at toxic hepatitis in patients and in experiments on animals compared with the control groups. The use of chromatographic methods for the purification of G6PDH from the liver of rats under normal conditions and during ETH allowed obtaining enzyme preparations with specific activity 4.13 and 6.53 U/mg protein; with yields of 8.2 and 8.3%, respectively, which were used for investigation of the kinetic properties. It was determined that the kinetics of the enzymatic reaction catalysed by G6PDH obeys the Michaelis-Menten equation. During ETH, an increase in the rate of the enzymatic reaction, accompanied by an increase in the affinity for the substrate and coenzyme was observed. The inhibition constants and the type of inhibition were determined for ATP, ADP, and NADPH G6PDH from rat livers under normal conditions and during ETH. The obtained results suggest that changes in G6PDH activity during toxic hepatitis were associated with conformational rearrangements of the protein molecule without changing its primary structure against the background of intensification of free radical processes.

Keywords: toxic hepatitis, glucose-6-phosphate dehydrogenase, activity, purification.

References

1. Iimuro Y., Bradford B.U., Yamashina S., Rusyn I., Nakagami M. et al., *Hepatology*, 2000, Vol. 31, pp. 391-398. 10.1002/hep.510310219
2. Andreeshcheva E.M., Popova T.N., Artyukhov V.G., Matasova L.V., *Bulletin of experimental biology and medicine*, 2004, No 4, pp. 399-402.
3. Betke K., Brewer G.J., Kirkman H.N., *Tech. Rep. Ser.*, 1967, Vol. 366, pp. 30-32.
4. Kochetov G.A., *Prakticheskoe rukovodstvo po enzimologii*, M., Vysshaya shkola, 1980, 272 p.
5. Davis B.J., Jones R.G., Farmer G.R., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1964, Vol. 121, pp. 404-427. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1964.tb14213.x
6. Shevchenko A., Wilm H., Vorm O., *Anal. Chem.*, 1996, Vol. 68, pp. 850-858. DOI: 10.1021/ac950914h
7. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., *J. Biol. Chem.*, 1951, Vol. 193, pp. 265-275.
8. Glants S., *Mediko-biologicheskaya statistika*, Moskow, Praktika, 1999, 459 c.
9. Gong Z., Tian G.L., Huang Q.W., Wang Y.M., Xu H.P., *BMC pediatrics*, 2017, Vol. 17, No 172, pp. 1-6. DOI: 10.1186/s12887-017-0920-y
10. Askar M.A., Sumathy K., Baquer N.Z., *Indian journal of biochemistry & biophysics*, 1996, Vol. 33, No 6, pp. 512-518.
11. Velasco P., Barcia R., Ibarburen I., Sieiro A. M. et al., *The International journal of biochemistry*, 1994, Vol. 26, No 2, pp. 195-200. DOI: 10.1016/0020-711x(94)90145-7
12. Levy H.R., Vought V.E., Yin X., Adams M.J., *Archives of biochemistry and biophysics*,

1996, Vol. 326, No 1, pp. 145-151. DOI: 10.1006/abbi.1996.0058

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

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

Попов Сергей Сергеевич – профессор кафедры госпитальной терапии и эндокринологии, д.м.н., Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко, Воронеж

Веревкин Алексей Николаевич – ассистент кафедры медицинской биохимии и микробиологии, к.б.н., Воронежский государственный университет, Воронеж

Семенихина Анастасия Владимировна – доцент кафедры медицинской биохимии и микробиологии, к.б.н., Воронежский государственный университет, Воронеж

Попова Светлана Евгеньевна – магистр медико-биологического факультета, Воронежский государственный университет, Воронеж

13. Semenikhina A.V., Popova T.N., Matasova L.V., *Biochemistry*, 1999, Vol. 64, No 8, pp. 863-866.

Popova Tatyana N. – prof, grand PhD (biology), department of medical biochemistry and microbiology, Voronezh State University, Voronezh

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

Popov Sergei S. – prof, grand Ph D (medicine, MD), department of hospital therapy and endocrinology, Voronezh State Medical University named after N. N. Burdenko, Voronezh

Verevkin Aleksei N. – Ph.D. (biology), assistant, department of medical biochemistry and microbiology, Voronezh State University, Voronezh, e-mail: wer.all@mail.ru

Semenikhina Anastasia V. – Ph D (biology), associate prof., Department of medical biochemistry and microbiology. Voronezh State University. Voronezh. E-mail: semenikhina@bio.vsu.ru

Popova Svetlana E. – master of medical and biological faculty, Voronezh State University, Voronezh