



УДК 577.152.1. : 616.323.4

Применение ионообменной хроматографии для очистки глутатионредуктазы из печени крысы в условиях нормы, при токсическом гепатите и введении тиоктовой кислоты

Агарков А.А., Попова Т.Н. Семенихина А.В.

ГОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж

Аннотация

Проведена очистка глутатионредуктазы (ГР; КФ. 1.6.4.2) из печени крысы в условиях нормы, при токсическом гепатите и введении тиоктовой кислоты на фоне патологии с помощью фракционирования сульфатом аммония, обессоливания на сефадексе G-25, ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе, концентрирования на ячейке Millipore, гель-хроматографии на Тоаурpearl HW-65. Были получены гомогенные ферментные препараты ГР из печени животных контрольной группы, крыс, подвергнутых токсическому гепатиту, и животных с патологией, которым вводили тиоктовую кислоту, с удельной активностью 1,19, 2,42, 1,64 Е/мг белка; степень очистки составила 108, 105, 109 соответственно. При окрашивании пластинок ПААГ после электрофореза с помощью нитрата серебра фермент во всех случаях проявлялся в виде одной основной полосы с электрофоретической подвижностью $R_f = 0,23 \pm 0,01$, что свидетельствует о гомогенности полученных ферментных препаратов

Ключевые слова: крыса, печень, гепатит, тиоктовая кислота, свободнорадикальное окисление, глутатионредуктаза

Purification of glutathione reductase (GR; EC 1.6.4.2) from rat liver in conditions of norm, at toxic hepatitis and introduction of thioctic acid at pathology with the help of fractionation by ammonium sulfate, gel-filtration on Sephadex G-25, ion-exchange chromatography on DEAE-cellulose, concentration on cell Millipore, gel-chromatography on Toyopearl HW-65 has been carry out. Homogeneous enzymes preparations of GR from liver of control group animals, rats with toxic hepatitis, and animals with a pathology which were subjected to treatment of thioctic acid, with specific activity 1.19, 2.42, 1.64 E/mg of protein have been obtained; the degree of purification was 108, 105, 109 accordingly. After electrophoresis enzyme in all cases was revealed as one band with electrophoretic mobility $R_f = 0.23 \pm 0.01$.

Введение

В развитии токсического гепатита существенную роль играют свободнорадикальные процессы. Имеющиеся данные позволяют предполагать, что активные формы кислорода (АФК), образующиеся в реакциях митохондриального и микросомального окисления при неполном восстановлении кислорода до воды, а также в реакциях окисления токсических веществ (в частности, CCl_4 оксидазами

семейства P_{450}), принимают непосредственное участие в развитии повреждения гепатоцитов [1-2].

Поэтому актуальной проблемой остается поиск антиоксидантных веществ, способных инактивировать свободные радикалы и препятствовать их образованию. Перспективной в этом плане является тиоктовая кислота (ТК). В организме ТК образует динамичную окислительно-восстановительную систему, которая участвует в переносе ацильных групп в составе многокомпонентных ферментных систем. Основное значение имеет её участие в качестве кофактора в окислительном декарбоксилировании альфа-кетокислот. Антиоксидантный эффект ТК обусловлен наличием двух тиоловых групп в молекуле, а также способностью связывать молекулы радикалов и свободное тканевое железо [3,4]. ТК не только обладает самостоятельным антиоксидантным потенциалом, но и обеспечивает мощную поддержку работы других антиоксидантных звеньев в организме. В этом отношении ее протекторное действие тесно связано с гомеостазом в системе глутатиона [5].

За счет функционирования последнего, как компонента неферментативного звена АОС, обеспечивается непосредственная детоксикация АФК, свободных радикалов и гидропероксидов. Восстановленный глутатион также является необходимым кофактором глутатионпероксидазной /глутатионредуктазной системы (ГП/ГР), выполняющей детоксикацию перекиси водорода и органических пероксидов. При этом образуется окисленный глутатион (GSSG). [6,7]. Восстановление GSSG происходит в ходе ГР – реакции, функционирование которой осуществляется только при постоянном притоке в реакцию восстановительных эквивалентов в форме NADPH.

Теоретическая часть

ГР катализирует НАДФ-зависимое восстановление одной молекулы окисленного глутатиона до двух молекул восстановленной его формы [8,9]. Было установлено, что существование тиоловых групп в молекуле фермента обеспечивает акт взаимодействия с GSSG посредством формирования смешанного дисульфида: фермент-SH+GSSG=фермент-SS-G+ GSH [10,11].

Глутатионредуктаза из эритроцитов человека представляет собой димер с молекулярной массой 105 кДа, состоящий из двух идентичных субъединиц, каждая из которых состоит из 478 аминокислотных остатков и содержит четыре структурных домена. Субъединицы связаны между собой дисульфидной связью, являющейся центром симметрии молекулы глутатионредуктазы. Каждая полипептидная цепь содержит одну молекулу FAD, 30% - альфа-спиральных участков и 30% -бета-складчатых структур. Субъединица молекулы фермента включает три структурных домена: ФАД - содержащий (домен F), НАДФН – связывающий (домен N) и контактный (домен С), соединяющий субъединицы молекулы ГР. Активные центры расположены на «стыке» 4 доменов: домен F, N, С одной субъединицы и домена с другой субъединицы. Полипептидная цепь ГР «начинается» в домене F проходит домен N, затем снова через домен F и заканчивается в домене С. Отмечается, что субстраты ГР: НАДФН и GSSG связываются по разные стороны субъединицы. В центре домена F и домена N находится β -структурные области, состоящие, соответственно, из 5 и 4 параллельных тяжей. Отмечается заметное сходство структур доменов F и N. Главное различие между ними определяется α -спиральными участками в домене F, ФАД и НАДФН связываются ферментом в

«открытых» конформациях и занимают приблизительно эквивалентные положения в соответствующих доменах [12,13].

Эксперимент

В качестве объекта исследования использовали печень самцов белых лабораторных крыс (*Rattus rattus* L.) массой 150-200 г. животных содержали на стандартном рационе в виварии.

Для создания модели экспериментального токсического гепатита использовали четыреххлористый углерод – органоспецифический токсин, обладающий гепатотропным эффектом. Крысам с помощью специального зонда в пищевод вводили CCl_4 в виде 33% раствора в вазелиновом масле из расчета 64 мкл токсина на 100 г веса животного [14]. Забой животных производили на 4 сутки после введения токсического агента. Контрольным животным вводили соответствующую аликвоту вазелинового масла.

Животные были разделены на 4 экспериментальные группы: I – норма (интактные животные, которых содержали в условиях стандартного режима виварии); II – животные, подвергнутые интоксикации CCl_4 ; III – группа интактных животных, которым вводили ежедневно, внутривентриально ТК в дозе 35 мг/кг, в течение 4-х дней эксперимента; VI – группа животных с токсическим поражением печени, которым вводили ежедневно, внутривентриально ТК в дозе 35 мг/кг, в течение 4-х дней эксперимента [15].

Печень крысы извлекали под наркозом после многократного перфузирования ледяным физиологическим раствором и использовали для дальнейших исследований.

Активность фермента определяли спектрофотометрически на СФ-56 при 340 нм. О скорости реакции судили по падению оптической плотности в результате окисления NADPH. Измерение активности проводили в 50 мМ калий-фосфатном буфере (pH=7,4), содержащем 1мМ ЭДТА, 0,80 мМ глутатион окисленный, 0,16 мМ NADPH. За единицу активности (Е) принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкмоль продукта реакции за 1 мин при 25⁰С. Реакцию начинали внесением ферментного препарата. Содержание белка определяли по методу Лоури и соавт.

Очистка ГР из печени животных всех исследуемых групп включала несколько стадий:

1. Для получения гомогената навеску печени гомогенизировали в фарфоровой ступке в 4-х кратном объеме охлажденной среды выделения, содержащей 0,1 мМ трис-НСl-буфер (pH=7,6), содержащий 1 мМ ЭДТА, 1% β-меркаптоэтанол. Гомогенат фильтровали и центрифугировали при 7000g в течение 12 мин. Полученную белковую смесь использовали для фракционирования белков сульфатом аммония. Определение границ высаливания ГР из белкового раствора проводили путём ступенчатого повышения градиента концентрации $(NH_4)_2SO_4$ в гомогенате печени. Кристаллический сульфат аммония добавляли к гомогенату в количестве, соответствующем нижней границе насыщения (40%). Смесь центрифугировали при 13000 g в течении 10 мин. Осадок отбрасывали, а к надосадочной жидкости добавляли $(NH_4)_2SO_4$ в количестве, соответствующем верхнему пределу насыщения (70%). После центрифугирования при 15000 g в течении 15 мин получали осадок, содержащий ГР. Полученный осадок ресуспендировали в 4 мл среды выделения.

2. Обессоливание на сефадексе G-25. Освобождение белковой смеси от низкомолекулярных примесей осуществляли с помощью гель-фильтрации через колонку с сефадексом G-25 (1,5 × 20 см). В качестве элюирующей среды использовали 0,01 М трис-HCl-буфер (pH = 7,6), содержащий 0,1 ммоль/л ЭДТА, 1% β-меркаптоэтанол. Скорость элюции составляла 20 - 25 мл/час, её регулирование осуществлялось путем изменения гидростатического давления. Каждую фракцию объемом 2 - 3 мл анализировали на присутствие ферментативной активности. Фракции, обладающие максимальной ферментативной активностью, объединяли и использовали для дальнейшей очистки.

3. Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе. Обессоленный раствор фермента наносили на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой (1,2 × 13 см), уравновешенную элюирующей средой, применяемой в ходе очистки на предыдущей стадии. Для очистки ГР использовали ступенчатый градиент концентраций KCl в элюирующем буфере. Элюирующая среда содержала вышеназванные ингредиенты. В ходе ионообменной хроматографии фермент десорбировался с колонки в ступенчатом градиенте KCl 50-100 ммоль/л. Скорость элюции – 30-40 мл/ч. Каждую фракцию объемом 1,5 – 2,0 мл анализировали на присутствие ферментативной активности ГР.

4. Фракции, относящиеся к пику активности объединяли и концентрировали в ячейке Millipore. Для этого использовали мембраны, пропускающие буферный раствор с низкомолекулярными белками (до 50 кДа). ГР, имеющая молекулярную массу около 104 кДа, оказывалась в остаточном объеме.

5. Хроматография на колонке с Toyopearl HW-65. Калибровку колонки с Toyopearl HW-65 осуществляли с помощью набора белков-метчиков с известными молекулярными массами. Ферментный препарат наносили в объеме 2 мл. Элюцию проводили со скоростью 20 мл/час средой того же состава, что и на предыдущих стадиях с добавлением 100 мМ KCl, собирали фракции объемом по 1,5 мл и анализировали на присутствие ферментной активности, а также на содержание белка во фракции.

Гомогенность активной фракции фермента определяли с помощью электрофореза, который проводили в 7,5% полиакриламидном геле (ПААГ) по методу Дэвиса. Универсальное окрашивание белков в геле осуществляли с использованием нитрата серебра. Все этапы выделения и очистки фермента осуществляли при температуре 0⁰-4⁰С.

Опыты проводили в 3-4 кратной биологической повторности, аналитические определения для каждой пробы – в двух повторностях. Данные обрабатывали с использованием стандартных статистических методов [16].

Обсуждение результатов

С помощью 108-, 105- и 109 - кратных очисток были получены ферментные препараты ГР с удельной активностью 1,19 и 2,42, 1,64 Е/мг белка из печени крыс контрольной группы, животных подвергнутых токсическому гепатиту и крыс с патологией, которым вводили тиоктовую кислоту (табл. 1).

При окрашивании пластинок ПААГ после электрофореза с помощью нитрата серебра фермент как в норме, так и в экспериментальных группах проявлялся в виде одной основной полосы с электрофоретической подвижностью $R_f = 0,23 \pm 0,01$, что свидетельствует о гомогенности ферментного препарата (рис.1). Необходимо отметить, что в гомогенате печени крыс с экспериментальным токсическим гепатитом наблюдалось увеличение удельной активности ГР в 2,1 раза. Вероятно,

этот результат обусловлен функционированием компенсаторных механизмов организма в ответ на развитие окислительного стресса при токсическом гепатите. Однако, введение тиоктовой кислоты животным с токсическим гепатитом приводило к изменению удельной активности ГР в сторону нормы. Возможно, данный эффект имеет место в связи с проявлением тиоктовой кислотой протекторных свойств, что приводит к снижению уровня свободнорадикального окисления.

Таблица 1 Результаты очистки глутатионредуктазы из печени крыс контрольной группы, подвергнутых токсическому гепатиту и животных с патологией, которым вводили тиоктовую кислоту (ТК)*

Стадия очистки	Условия опыта	Общая активность $E_{\text{общ}}$	Количество белка, мг	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат	норма	2,67±0,11	243±9,66	0,011±0,0004	100	1
	гепатит	6,40±0,29	276±11,98	0,023±0,0084	100	1
	Гепатит+ТК	4,25±0,18	283±13,87	0,015±0,0006	100	1
Фракционирование $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	норма	2,44±0,09	198±9,85	0,013±0,0006	91	1,2
	гепатит	6,10±0,27	203±10,18	0,037±0,0018	95	1,6
	Гепатит+ТК	3,84±0,15	142±7,09	0,027±0,0007	90,4	1,8
Хроматография на сефадексе G-25	норма	2,29±0,08	115,00±5,77	0,020±0,0006	86	1,82
	гепатит	5,44±0,28	109,00±5,48	0,050±0,0028	85	2,2
	Гепатит+ТК	3,23±0,13	90,00±4,45	0,036±0,0014	76	2,4
Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	норма	1,21±0,04	1,98±0,08	0,600±0,0271	45	54,5
	гепатит	1,85±0,11	1,65±0,06	1,120±0,0514	29	49
	Гепатит+ТК	1,35±0,05	1,63±0,07	0,830±0,0414	31,8	55,3
Ультрафильтрация с помощью ячейки Amicon	норма	0,94±0,04	1,23±0,05	0,760±0,0349	35	69
	гепатит	1,79±0,07	1,25±0,04	1,430±0,0598	28	62
	Гепатит+ТК	1,12±0,04	1,17±0,05	0,960±0,0354	26	64
Хроматография на Toyopearl HW-65	норма	0,25±0,01	0,21±0,01	1,190±0,0498	9,3	108
	гепатит	0,61±0,02	0,25±0,03	2,420±0,1132	9,5	105
	Гепатит+ТК	0,41±0,01	0,25±0,01	1,640±0,0658	9,6	109

*Примечание: в таблице обсуждаются статистически достоверные различия при $P \leq 0,05$.

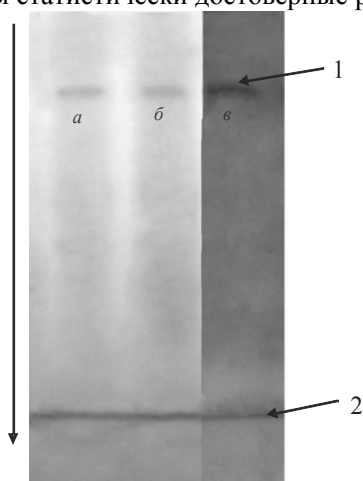


Рис.1. Электрофореграмма глутатионредуктазы из печени крыс в норме (а), при экспериментальном токсическом гепатите (б) и при введении тиоктовой кислоты крысам с патологией(в): 1 – зона локализации фермента, 2 – фронт маркера (бромфеноловый синий); стрелкой показано направление движения белка при электрофорезе

Установлено, что в ходе ионообменной хроматографии на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой фермент из печени животных всех исследуемых групп десорбировался в виде одного пика при 100 мМ концентрации KCl (рис. 2). После нанесения ферментного препарата на колонку сначала наносили 20 мл среды элюции (0,1 мМ трис-HCl-буфер (pH 7,6), содержащий 1 мМ ЭДТА, 1% β-меркаптоэтанол), а затем 20 мл 50 мМ раствора KCl для десорбции сопутствующих белков. Это позволило увеличить степень очистки ГР в 30,1 раза в условиях нормы, в 22,3 раза при экспериментальном токсическом гепатите и в 23,1 раза при введении тиоктовой кислоты животным с патологией. Использование в качестве завершающего этапа очистки фермента гель-хроматографии на колонке с Тоаурpearl HW-65 способствовало получению гомогенного фермента и определению молекулярной массы фермента. Выявлено, что молекулярная масса ГР из печени представленных групп животных составляет $104 \pm 4,47$ кДа. По-видимому, данные условия эксперимента не влияют на четвертичную структуру молекулы фермента, что подтверждено с помощью электрофореза в ПААГ с добавлением 0,1% додецилсульфата Na.

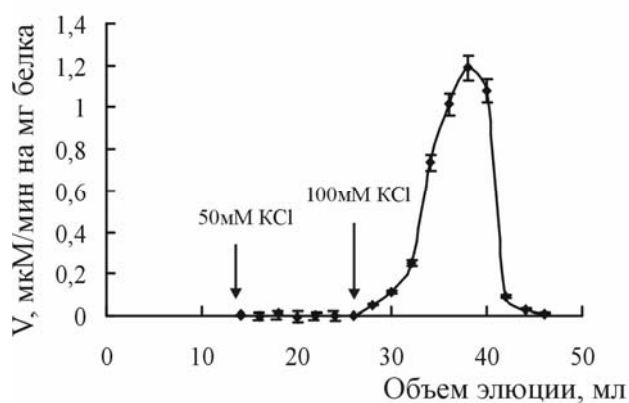


Рис. 2 Элюция глутатионредуктазы из печени крыс исследуемых групп животных в ходе хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе

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

Список литературы

1. Дудник Л.Б., Вискна Л.М., Майоре А.Я. Пероксидное окисление липидов и его связь с изменением состава и антиокислительных свойств липидов при коматогенных формах острого вирусного гепатита В // *Вопр. мед. хим.* 2000. Т.6. С.46-52.
2. Park K.I. Transplantation of neural stem cells: cellular and gene therapy for hypoxic - ischemic brain injury // *Yonsei Med. J.* 2000. V.41. N6. P. 825-835.
3. Deneke, S.M. Thiol-based antioxidants // *Curr.Top. Cell Regul.* 2000. V. 36. P. 151-180.
4. Self, W.T., Tsai, L., Stadtman, T.C. Synthesis and characterization of selenotrisulfide-derivatives of lipoic acid and lipoamide // *Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V.97. N. 23. P. 12481-12486.
5. Щербак А.В. Метаболическая терапия: доказуемые перспективы, оправдавшие надежды // *Здоровье Украины.* 2002. № 10. С. 37-59.
6. Кения М.В. Лукши А.И., Гуськов Е.П. Роль низкомолекулярных антиоксидантов при окислительном стрессе // *Успехи современной биологии.* 1993. Т. 113. Вып. 4. С. 456-469.

-
7. Кулинский В.И. Колесниченко Л.С. Структура, свойства, биологическая роль и регуляция глутатионпероксидазы // Успехи современной биологии. 1993. Т.113. №1. С. 107-123.
 8. Зиямутдинова З. К. Холмухамедова Н.М. Изменение процессов перекисного окисления липидов и содержания индивидуальных ганглиозидов, фосфолипидов в печени крыс с токсическим экспериментальным гепатитом // Вопр. мед. хим. 1991. Т.37. Вып.5. С.16-18.
 9. Helle R. Andersen Low activity of superoxide dismutase and high activity of glutathione reductase in erythrocytes from centenarians // Age and Ageing. 1998. V.27. P.643-648.
 10. Charles E. Mile, Thompson E. Thomas, Langdon G. Robert Hepatic Glutathione Reductase I. PURIFICATION AND GENERAL KINETIC PROPERTIES // J. Biol. Chem. 1962. V. 237. N. 5. P.1596-1600.
 11. Millerand Holly, Al Claibornej Peroxide Modification of Monoalkylated Glutathione Reductase stabilization of an active-site cysteine-sulfenic acid // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. N 29. P. 19342-19350.
 12. Krauth-Siegel R.L. Glutathione reductase from human erythrocytes. The sequences of the NADPH domain and of the interface domain // Eur. J. Biochem. 1982. V. 121. P. 259-267.
 13. Schirmer R.H. Structural comparison of the flavoenzyme glutathione reductase with other proteins // Biomol. Struct. 1978. V.1. N. 6. P.33-38.
 14. Федорова Н.Ю. Состояние системы глутатионпероксидазы-глутатионредуктазы в стимулированном к регенерации органе и ее роль в клеточной пролиферации: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Н.Ю. Федорова. – ВГУ. Воронеж. 1999. – 24 с.
 15. Макеева А.В. Исследование воздействия тиоктовой кислоты на свободнорадикальный гомеостаз в тканях крыс при патологиях, сопряженных с оксидативным стрессом: автореф. дис. ... канд. биол. наук / А.В. Макеева – ВГУ. Воронеж. 2007. – 24 с.
 16. Ллойд Э. Ледерман У. Справочник по прикладной статистике М.: Финансы и статистика. 1990. - С.493-513.