



УДК 577. 152.141.

Применение ионообменной хроматографии для очистки глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы из мозга крысы в норме и при церебральной ишемии-реперфузии

Суховеева О.В., Агарков А.А., Попова Т.Н. Дедикова Н.А.

Воронежский государственный университет, Воронеж

Поступила в редакцию 22.04.2011 г.

Аннотация

С помощью фракционирования сульфатом аммония, обессоливания на сефадексе G-25, ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе получены очищенные ферментные препараты глутатионпероксидазы (ГП, КФ 1.11.1.9) и глутатионредуктазы (ГР; КФ. 1.6.4.2) из мозга крыс контрольной группы с удельными активностями 0,37 и 0,21 Е/мг белка и животных с церебральной ишемией-реперфузией с удельными активностями 0,62 и 0,69 Е/мг белка; степень очистки составила 34,0, 30,0, и 44,5, 45,0 соответственно. С использованием полученных ферментных препаратов изучены кинетические свойства ферментов.

Ключевые слова: крыса, мозг, ишемия-реперфузия, свободнорадикальное окисление, глутатионредуктаза, глутатионпероксидаза

Using fractionation by ammonium sulfate, gel-filtration on Sephadex G-25, ion-exchange chromatography on DEAE-cellulose purified enzyme preparations of glutathione peroxidase (GP; EC 1.11.1.9) and glutathione reductase (GR; EC 1.6.4.2) from brain of rat of control group with specific activity 0.37, 0.21 E/mg of protein and from brain of animals under cerebral ischemia-reperfusion with specific activity 0.62, 0.69 E/mg of protein have been obtained; the degree of purification was 34.0, 30.0, and 44.5, 45.0 accordingly. Using of the purified enzyme preparations kinetic properties of enzymes have been established.

Keywords: rat, brain, ischemia-reperfusion, free radical oxidation, glutathione reductase, glutathione peroxidase

Введение

Известно, что процессы свободнорадикального окисления (СО) биомолекул протекают в условиях физиологической нормы на стационарном уровне. В то же время чрезмерному образованию свободных радикалов (СР) способствуют многие патологические процессы [1]. В настоящее время существует концепция о существенной патогенетической роли СР в повреждении клеток головного мозга, обусловленном ишемией. Именно ишемия является наиболее распространенной причиной нарушений функций мозга [2]. Ишемия представляет собой ухудшение или полное прекращение локального кровоснабжения, что взаимосвязано с нарушением работы антиоксидантной защиты (АОЗ) организма. Нарушение

функционирования системы АОЗ, контролирующей каскад свободнорадикальных реакций, неизбежно отражается на эффективности процессов детоксикации активных форм кислорода (АФК) в клетке и может привести к возникновению окислительного стресса и связанных с ним необратимых изменений в тканях [3]. Окислительный стресс является характерным звеном патогенеза ряда заболеваний, включая ишемическое поражение головного мозга [4].

Одним из основных компонентов ферментативного звена АОЗ является ГР/ГП система [5]. ГП катализирует разложение гидропероксидов без образования СР, используя в качестве донора водорода восстановленный глутатион (GSH) [6]. Функционирование ГП тесно сопряжено с работой ГР, регенерирующей GSH из его окисленной формы [7], используя в качестве донора протонов НАДФН.

Поэтому актуальной проблемой является исследование функционирования ферментов АОЗ организма в условиях ишемии-реперфузии головного мозга, что может способствовать более глубокому пониманию процессов, происходящих при патологии, на молекулярном уровне.

Теоретическая часть

Среди многих механизмов, приводящих к увеличению продукции АФК в ткани мозга, существенное значение имеет ишемия и последующее возобновление кровотока (реперфузия). Так, очаговая ишемия характеризуется гиперпродукцией СР посредством активации NO-синтазы и циклооксигеназы-2 в нейронах, что приводит к повреждению митохондрий [8,9]. Возникающий в условиях гипоксии ацидоз угнетает метаболические процессы и ионный транспорт. Это обстоятельство, приводит к внутриклеточному накоплению свободных ионов Ca^{2+} и запуску реакций глутамат - кальциевого каскада [10], развитию клеточного отека, а также оказывает непосредственное цитотоксическое воздействие, изменяя физико-химические свойства мембран нейронов и сосудистого эндотелия [11].

Активация глутаматных рецепторов способствует активации процессов пероксидного окисления липидов (ПОЛ). Механизм ПОЛ в клетках центральной нервной системы аналогичен механизмам в других тканях. Однако интенсивность процесса ПОЛ в головном мозге значительно выше [12]. Во многом это определяется высоким содержанием в нем полиненасыщенных жирных кислот – субстратов ПОЛ. Так, содержание фосфолипидов в мозге в 1,5 раза больше, чем в печени, и в 3–4 раза больше, чем в сердце. Высокая интенсивность ПОЛ также определяется высокими концентрациями ионов металлов с переменной валентностью, необходимых для функционирования ферментов и работы дофаминовых рецепторов. Нарушения кислородного метаболизма при ишемии мозга приводят к высвобождению данных ионов металлов, становящихся катализаторами свободнорадикальных реакций. Кроме того, для мозга характерно низкое содержание основных компонентов АОЗ. Именно дефицит АОЗ в ткани мозга объясняет ее особую чувствительность к свободнорадикальным соединениям [9].

Эксперимент

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

Развитие ишемии головного мозга у животных опытных групп моделировали путем 30-минутной окклюзии обеих общих сонных артерий [13]. После снятия окклюдоров (реперфузия) восстановление кровотока контролировали визуально. Спустя трое суток животные были умерщвлены под наркозом и головной мозг извлечен из полости черепа по стандартной методике. Брашными ножниц рассекали кости черепа по границе между ее основанием и сводом. После отделения свода черепа вместе с твердой мозговой оболочкой перерезали черепные нервы и извлекали мозг.

Животные были разделены на 2 экспериментальные группы: 1 группа (контроль) – ложнооперированные животные; 2 группа – животные с постишемической реперфузией головного мозга.

Активность ферментов определяли спектрофотометрически на СФ-56. О скорости ГП-реакции судили по уменьшению оптической плотности при длине волны 340 нм в результате окисления НАДФН, протекающего за счет осуществления сопряженных ферментативных реакций: образования окисленного глутатиона под действием ГП и его последующего восстановления, взаимосвязанного с окислением НАДФН, под действием ГР. Измерение активности ГП проводили в среде спектрофотометрирования следующего состава: 50 мМ калий-фосфатный буфер (рН 7,4), содержащий 1 мМ ЭДТА, 0,12 мМ НАДФН, 0,85 мМ восстановленного глутатиона, 0,37 мМ H_2O_2 , 1 ед/мл глутатионредуктазы. Контрольная проба не содержала восстановленный глутатион. Об интенсивности протекания реакции, катализируемой ГР, судили по уменьшению оптической плотности при длине волны 340 нм в результате окисления НАДФН, протекающего за счет реакции восстановления глутатиона. Измерение активности данного фермента проводили в 50 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 1 мМ ЭДТА, 0,16 мМ НАДФН и 0,8 мМ окисленного глутатиона. Содержание белка определяли по методу Лоури и соавт.

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

1. Для получения гомогената навеску ткани мозга растирали в фарфоровой ступке в трехкратном объеме охлажденной среды выделения (0,05 М Tris-HCl-буфер (рН 7,8), содержащий 1 мМ ЭДТА и 1% β -меркаптоэтанола). Гомогенат фильтровали и центрифугировали при 7000g в течение 10 мин. Полученную белковую смесь использовали для фракционирования белков сульфатом аммония. Определение границ высаливания ГР и ГП из белкового раствора проводили путём ступенчатого повышения градиента концентрации $(NH_4)_2SO_4$ в гомогенате мозга. Кристаллический сульфат аммония добавляли к гомогенату в количестве, соответствующем нижней границе насыщения (40% - в случае выделения ГР, 30% - в случае выделения ГП). Полученные смеси центрифугировали при 13000 g в течении 10 мин. Осадки отбрасывали, а к надосадочным жидкостям добавляли $(NH_4)_2SO_4$ в количестве, соответствующем верхнему пределу насыщения (70% - для ГР, 60% - для ГП). После центрифугирования при 15000 g в течении 15 мин получали соответствующие осадки, содержащие ГР и ГП. Полученные осадки ресуспендировали в 4 мл среды выделения.

2. Обессоливание на сефадексе G-25. Освобождение соответствующих белковых смесей от низкомолекулярных примесей осуществляли с помощью гелефильтрации через колонку с сефадексом G-25 (1,5 × 20 см). В ходе обессоливания раствора, содержащего ГР и ГП, в качестве элюирующей среды использовали 0,01 М трис-HCl-буфер (рН = 7,6), содержащий 0,1 мМ ЭДТА, 1% β -меркаптоэтанол. Скорость элюции составляла 20 - 25 мл/час, её регулирование осуществлялось путем

изменения гидростатического давления. Фракции 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, как ГР, так и ГП использовали ступенчатый градиент концентраций KCl в элюирующем буфере. Элюирующая среда содержала вышеназванные ингредиенты. В ходе ионообменной хроматографии ферменты десорбировались с колонки в ступенчатом градиенте KCl 50-100 мМ. Скорость элюции – 30-40 мл/ч. Соответствующие фракции объемом 1,5 – 2,0 мл анализировали на присутствие ферментативной активности ГР и ГП.

Опыты проводили в 3-4 кратной биологической повторности, аналитические определения для каждой пробы – в двух повторностях. Данные обрабатывали с использованием стандартных статистических методов [14].

Обсуждение результатов

С помощью 34,0- и 44,5 - кратных очисток были получены ферментные препараты ГП и ГР с удельными активностями 0,37 и 0,21 Е/мг белка из мозга крыс контрольной группы. Исследуемые ферменты из мозга животных с постишемической реперфузией головного мозга были очищены в 30,0 и 45,0 раз, удельные активности составили 0,62 и 0,69 Е/мг белка соответственно (табл. 1 и 2 соответственно).

Таблица 1. Очистка глутатионпероксидазы из мозга крыс контрольной группы и животных с ишемией-реперфузией*

Стадия очистки	Условия опыта	Общая активность $E_{\text{общ}}$	Количество белка, мг	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат	норма	0.261±0.0141	23.7±1.16	0.011±0.0005	100	1.0
	ишемия-реперфузия	0.610±0.0254*	28.6±1.35	0.021±0.0009*	100	1.0
Фракционирование $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	норма	0.234±0.0115	15.6±0.65	0.015±0.0006	90	1.4
	ишемия-реперфузия	0.587±0.0234*	18.3±0.85	0.032±0.0015*	96	1.5
Хроматография на сефадексе G-25	норма	0.201±0.0013	9.1±0.35	0.022±0.0009	77	2.2
	ишемия-реперфузия	0.557±0.0241*	10.9±0.52	0.051±0.0024*	91	2.4
Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	норма	0.102±0.0004	0.273±0.14	0.374±0.0173	39	34.0
	ишемия-реперфузия	0.197±0.0012*	0.321±0.17	0.621±0.0214*	32	30.0

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

Необходимо отметить, что в гомогенате мозга крыс с экспериментальной ишемией-реперфузией наблюдалось увеличение удельной активности ГП в 3,3 раза, ГР - в 1,9 раза. Вероятно, этот результат обусловлен функционированием компенсаторных механизмов организма в ответ на развитие окислительного стресса при ишемическом поражении мозга.

Установлено, что в ходе ионообменной хроматографии на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой ГП из мозга животных исследуемых групп десорбировалась в виде одного основного пика при 100 мМ концентрации КСl (рис. 1А). ГР в данных условиях элюировалась при той же концентрации хлорида калия (рис. 1Б). После нанесения ферментных препаратов ГП и ГР на колонку сначала пропускали 20 мл среды элюции (0,1 мМ трис-НСl-буфер (рН 7,6), содержащий 1 мМ ЭДТА, 1% β-меркаптоэтанол), а затем 20 мл 50 мМ раствора КСl для десорбции сопутствующих белков. Это позволило увеличить степень очистки ГП в 15,5 и 12,5 раз, а ГР – в 23,4 и 21,4 раза в условиях нормы и при экспериментальной ишемии-реперфузии соответственно.

Таблица 2. Очистка глутатионредуктазы из мозга крыс контрольной группы и животных с ишемией-реперфузией*

Стадия очистки	Условия опыта	Общая активность E _{общ}	Количество белка, мг	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат	норма	0.113± 0.1131	24.1±1.155	0.0047± 0.0001	100	1.0
	ишемия-реперфузия	0.447± 0.2911*	29.2±1.352	0.0153± 0.0006*	100	1.0
Фракционирование (NH ₄) ₂ SO ₄	норма	0.105± 0.0041	18.75± 0.851	0.0056± 0.0002	93	1.3
	ишемия-реперфузия	0.421± 0.0131*	21.26± 1.014	0.0198± 0.0008*	94	1.3
Хроматография на сефадексе G-25	норма	0.092± 0.0031	10.34± 0.457	0.0089± 0.0003	81	1.9
	ишемия-реперфузия	0.371± 0.0162*	11.56± 0.521	0.0321± 0.0012*	83	2.1
Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	норма	0.039± 0.0012	0.186± 0.008	0.2090± 0.0084	35	44.5
	ишемия-реперфузия	0.138± 0.0061*	0.200± 0.009	0.6897± 0.0302*	31	45.0

*Примечание: в таблице обсуждаются статистически достоверные различия при P≤0,05.

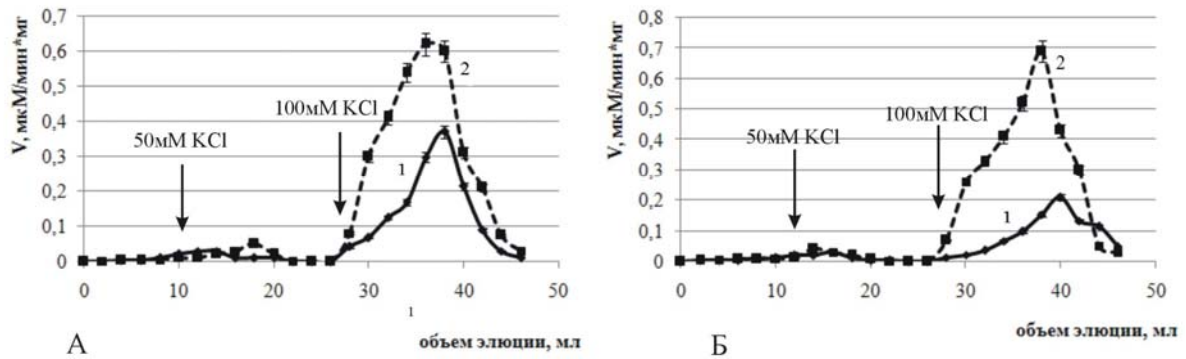


Рис. 1. Элюция глутатионпероксидазы (А) и глутатионредуктазы (Б) из мозга контрольных крыс (1) и животных с ишемией-реперфузией в ходе хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе

С использованием полученных ферментных препаратов были исследованы некоторые кинетические параметры каталитического действия ГП и ГР.

Изучение зависимости скорости ГП- и ГР-реакций от концентрации ионов H^+ , показало, что ферменты из мозга крыс в норме проявляют максимальную ферментативную активность в диапазоне рН: 7,2-7,6. При этом рН-оптимум для обоих ферментов составляет 7,4. Уменьшение рН до 6,8 или увеличение его до 8,0 приводит к резкому снижению ферментативных активностей (рис. 2).

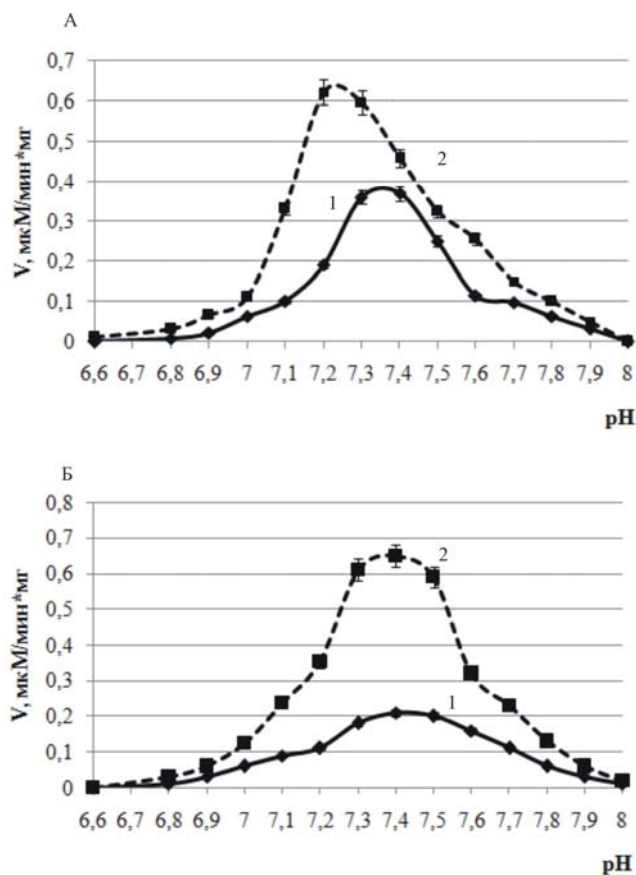


Рис. 2. Зависимость скорости реакции, катализируемой глутатионпероксидазой (А) и глутатионредуктазой (Б), выделенными из мозга контрольных крыс (1) и животных с ишемией-реперфузией головного мозга (2)

При патологии наблюдается смещение рН оптимума ГП в более кислую сторону, который в данных условиях составляет 7,2 (рис. 2А(1)). По-видимому, это имеет значение для функционирования фермента в условиях ацидоза, сопровождающего развитие окислительного стресса при ишемии. Однако значительных изменений зависимости скорости ферментативной реакции ГР от концентрации ионов водорода в норме и при патологии не выявлено (рис. 2Б).

Установлено, что кинетика ферментативных реакций, катализируемых ГП и ГР, подчиняется уравнению Михаэлиса-Ментен. Полученные значения K_m для ГП- и ГР-реакций в норме и при ишемии-реперфузии головного мозга, определенные в двойных обратных координатах Лайнуивера-Берка, представлены в табл. 3.

Таблица 3. Значения K_m глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы из мозга крыс исследуемых групп*

Экспериментальные группы животных	Значения K_m ГР, мМ		Значения K_m ГП, мМ	
	GSSG	НАДФН	GSH	H ₂ O ₂
Норма	1.92±0.056	0.21±0.006	3.32±0.13	2.03±0.06
Ишемия-реперфузия	0.73±0.019*	0.12±0.004*	2.14±0.07*	1.17±0.03*

*Примечание: отличия достоверны (уровень значимости - $p \leq 0,05$)

Величина K_m для ГП по отношению к GSH в норме составляет 3,32 ммоль/л. Выявлено, что в условиях постишемической реперфузии происходит снижение K_m фермента к GSH в 1,6 раза. Это было характерно и для сродства фермента по отношению к H₂O₂. В условиях патологии происходило снижение K_m в 1,7 раза. По-видимому, увеличение сродства ГП к субстратам при патологии имеет значение для более эффективной элиминации АФК, чрезмерное генерирование которых происходит в данных условиях.

Необходимо отметить также, что при патологии происходит увеличение сродства к субстратам и для ГР. Так, величина K_m по отношению к окисленному глутатиону уменьшается в 2,6 раза, к НАДФН – в 1,8 раза по сравнению с ферментом, выделенным из ткани мозга контрольных животных (табл. 3). Данное обстоятельство также может способствовать снижению уровня СО в условиях постишемической реперфузии головного мозга, поскольку образующийся восстановленный глутатион может принимать как непосредственное участие в обезвреживании свободных радикалов, так и являться субстратом для ГП.

Список литературы

- 1.Федин А.И. Современная концепция патогенеза и лечения острой ишемии мозга // Материалы науч-практ конф «Лечение ишемии мозга». 2001. № 30 С.5 – 23.
- 2.Боголепов Н.К. Церебральные кризисы и инсульт. М. : Медицина, 1971. 392с.
- 3.Ланкин В.З., Тихадзе А.К., Беленков Ю.Н. Антиоксиданты в комплексной терапии атеросклероза: pro et contra// Кардиология. 2004. №2. С 72-81
- 4.Биленко М.В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов.М.: Медицина,1989. С. 135-137.
- 5.Пентюк А.А. Активности глутатионзависимых ферментов, каталазы и СОД в печени и сердце крыс с дефицитом витамина //Биохимия. 1987. №6. С. 1009.

6. Oshino N., Chance B. Properties of glutathione release observed during reduction of organic hydroperoxide demethylation of aminipurine and oxidation of some substances in perfused rat liver and their implication for the physiological function of catalase // *Biochem. J.* 1977. V. 162. № 3. P. 509-525.

7. Ченас Н.К., Ракаускенс Р.К., Кулис Ю.Ю. Соотношение между глутатионредуктазной и диафоразной активностью глутатионредуктазы из *Sacharomyces cerevisiae*// *Биохимия.* 1989. Т. 54. №7. С. 1090–1097.

8. Соловьева Э.Ю., Миронова О.П., Баранова О.А. Свободнорадикальные процессы и антиоксидантная терапия при ишемии головного мозга. // *Журн. неврол. психиат.* 2008. Т. 108. № 6. С. 37-42.

9. Болдырев А.А. Окислительный стресс и мозг. // *Соросовский образовательный журнал.* 2001. Т.7. № 4. С 21–28.

10. Lascola C., Welch K., Caplan, D. *Primer of Cerebrovascular Diseases* // San-Diego: Academic Press. 1997. P. 114–117.

11. Behmanesh S. Kempiski O. Mechanism of endothelial cell swelling from lactacidosis studied in vitro // *Amer. J. Physiol.* 2000. V. 279. № 4. P. 1512–1517.

12. Parker L. *Free radicals in the brain.* Springer. / L. Parker // Berlin. - 1992. — P.380.

13. Бульон В.В. Хныченко Л.С., Сапронов Н. С. Коррекция последствий постишемического реперфузионного повреждения головного мозга цитофлавино. // *Бюлл. exper. биол. и мед.* 2000. Т 129. № 2. С 149-151.

14. Ллойд Э. Ледерман У. *Справочник по прикладной статистике* М.: Финансы и статистика. 1990. С.493-513.

Суховеева Ольга Вадимовна – аспирант, кафедра медицинской биохимии и микробиологии, ВГУ, Воронеж

Попова Татьяна Николаевна – проф., д.б.н., зав. кафедрой медицинской биохимии и микробиологии биолого-почвенного факультета Воронежского государственного университета, Воронеж, тел. 8(473)2208278

Агарков Александр Алексеевич – ассистент, к.б.н., кафедра медицинской биохимии и микробиологии, ВГУ, Воронеж

Дедикова Наталья Александровна – магистрант, кафедра медицинской биохимии и микробиологии, Воронеж

Suhoveeva Olga V. – the post-graduate student of the Department of Medical Biochemistry and Microbiology, Biology and Soil Science Faculty of Voronezh State University, Voronezh, e-mail: ooldeenka@mail.ru

Popova Tatyana N. – Dr. of Biology, Prof., the Head of the Department of Medical Biochemistry and Microbiology, Biology and Soil Science Faculty, Voronezh State University, Voronezh

Agarkov Alexander A. – Dr. of Biology, the Assistant of the Department of Medical Biochemistry and Microbiology, Biology and Soil Science Faculty of Voronezh State University, Voronezh

Dedikova Natalia A. – The undergraduate student of the Department of Medical Biochemistry and Microbiology, Biology and Soil Science Faculty of Voronezh State University, Voronezh