

УДК 576.355+577.15.024+577.158.1+577.158.7

БИОХИМИЯ

А. М. ГЕРАСИМОВ, Л. Ф. ПАНЧЕНКО, Я. М. КОЕН, В. Д. АНТОНЕНКОВ

**СООТНОШЕНИЕ АКТИВНОСТЕЙ ГЛУТАТИОНПЕРОКСИДАЗЫ
И КАТАЛАЗЫ ПРИ ИНДУЦИРУЕМОЙ ФЕНОБАРБИТАЛОМ
ГИПЕРПЛАЗИИ ПЕЧЕНИ**

(Представлено академиком В. А. Энгельгардтом 22 II 1974)

Распад перекисей органических соединений и перекиси водорода в животных клетках может катализироваться ионами металлов и металлопротеидами, гемопротеидами или глутатионпероксидазой (ГП) (1). Полученные в опытах *in vitro* доказательства принципиальной возможности функционирования различных путей разрушения перекисей оставляют все же до настоящего времени открытый вопрос об условиях реализации каждого из них в нативной клетке.

Введение фенобарбитала (ФБ) животным, как известно, вызывает гиперплазию паренхиматозных клеток печени с пролиферацией гладкого эндоцлазматического ретикулума и увеличением числа пероксисом в гепатоцитах (2). Возрастание активности микросомальных ферментов, участвующих в реакциях перекисного окисления липидов (3) и пероксисомальных энзимов, генерирующих H_2O_2 , может приводить к усилению процессов образования перекисных соединений в клетке. Исходя из предположения, что одним из способов исключения токсического действия перекисей, образующихся в избыточном количестве, может быть активация ферментов, разрушающих перекисную группировку без образования свободных радикалов, мы исследовали влияние ФБ на активность ГП и каталазы печени крыс.

Использовались самцы крыс весом 80–120 г. ФБ натрия вводился внутрибрюшинно один раз в день в дозе 100 мг на 1 кг веса животного в течение трех дней. Контрольной группе крыс инъецировался физиологический раствор. Печень отмывали от крови перфузацией раствором 0,25 M сахараозы, 2 mM ЭДТА и 25 mM трис-НCl, pH 7,4. Гомогенат готовили на той же среде и надосадочную жидкость получали центрифугированием при 100 000 *g* в течение 90 мин. Активность ГП (КФ 1.11.1.9) исследовали при 25° на спектрофотометре «Юникам» SP-8000 методом Палья и Валентине (4), но с изменением концентрации компонентов реакционной смеси: 5 mM К-фосфатный буфер, pH 7,0; 0,12 mM НАДФ-Н; 0,85 mM восстановленный глутатион; 1 mM ЭДТА; 1 ед. глутатионпредуктазы; 0,3 mM H_2O_2 ; 0,3 mM КСН. Активность каталазы (КФ 1.11.1.6) определяли по методу Бергмейера (5) на спектрофотометре «Гилфорд» (модель 240) с автоматической приставкой (модель 532). Содержание глутатиона в кислотном экстракте печени определяли по реакции с 5,5-дитиобис-(2-нитробензойной кислотой) в присутствии глутатионпредуктазы и НАДФ-Н, как описано в (6). Содержание белка определяли по Лоури, содержание ДНК — по Бартону (7), с использованием в качестве стандарта бычьего сывороточного альбумина или ДНК тимуса теленка, соответственно. Использовались реактивы: глутатион, глутатионпредуктаза из дрожжей, 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойная кислота), трис-(оксиметил)-аминометан, бычий сывороточный альбумин фирмы «Calbiochem», НАДФ-Н — «Boehringer Mannheim GmbH», ЭДТА — «VEB Berlin — Chemie».

Таблица 1

Активность ГП и содержание глутатиона в печени крыс, получивших ФБ

Способ расчета	Активность ГП, мкмоль. НАДФ-Н в 1 мин.		Содержание глутатиона, мкмоль.	
	контроль	ФБ	контроль	ФБ
На относительный вес печени *	0,30±0,06 (14)	0,96±0,17 (16)	0,14±0,02 (5)	0,20±0,02 (6)
На 1 мг ДНК	4,01±0,45 (17)	10,09±2,59 (20)	1,68±0,03 (5)	1,91±0,05 (6)

Примечание. В скобках указано число опытов.

* Вес печени/вес тела крысы.

тие», фенобарбитал натрия — «Merk», сахароза — «Chemapol», тритон X-100 — «Schuchardt», остальные получены из местных источников.

Приведенные в табл. 1 и 2 результаты показывают, что введение ФБ вызывает значительное повышение активности ГП и каталазы печени крыс. В опытах *in vitro* ФБ не влиял на активность ферментов. Из многочисленных известных способов расчета активности наиболее адекватным для оценки функциональной значимости изменений, обнаруживаемых в подобного рода экспериментах, на наш взгляд, является расчет на относительный вес печени и на единицу веса ДНК. Первый из них позволяет с известной долей условности выявить изменения данной ферментативной активности, эквивалентные всей массе органа, тогда как второй — одной клетке. В соответствии с этим можно заключить, что несмотря на выраженное (в 1,5 раза) увеличение веса печени, наблюдающееся при введении ФБ, вновь образованные клетки оказываются достаточно хорошо обеспеченными защитными «актиокислительными» ферментами. Обнаруженная активация ГП и каталазы при индуцируемой ФБ гиперплазии печени представляет интерес в связи с тем, что данные ферменты, в отличие от указанных выше катализаторов, разрушают перекисные соединения наиболее выгодным для клетки путем, не приводящим к образованию свободных радикалов, способных индуцировать новые цепи радикального окисления. В этом смысле ГП и каталаза могут рассматриваться как «антирадикальные» ферменты клетки*.

Что касается вклада каждого из этих ферментов в перекисный обмен клетки, то этот вопрос является предметом дискуссии (⁸). Несмотря на способность каталазы реагировать с H_2O_2 по пероксидазному или каталазному механизму, фермент печени *in vivo* функционирует по каталазному типу (⁹). Пероксидазное действие каталазы возможно в присутствии некоторых доноров водорода, концентрация которых в печени чрезвычайно низка (¹⁰). Глутатион является плохим донором водорода для пероксидазной реакции каталазы (¹¹). Если допустить, что определяемая *in vitro* активность фермента отражает его каталитическую эффективность в клетке (¹¹, ¹²) и учесть достаточно высокое содержание глутатиона в печени (табл. 1), можно видеть, что скорость катализируемой глутатионпероксидазной реакции во много раз превышает предполагаемую (¹⁰, ¹²) скорость генерации H_2O_2 в физиологических условиях. Функционально важным преимуществом ГП может быть ее способность восстанавливать не только H_2O_2 , но и перекиси органических соединений (¹³). Увеличение содержания восстановленного глутатиона (табл. 1) и повышение активности глутатионредуктазы (¹⁴) и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (¹⁵) при введении ФБ позволяют признать функциональную

* Здесь термин «антирадикальный» имеет иной смысл, чем принят в физической химии (см. (²⁰)).

Таблица 2

Влияние ФБ на активность каталазы печени крыс (ммоль/мин)

Способ расчета	Общая активность		Активность в надосадочной жидкости *	
	контроль	ФБ	контроль	ФБ
На относительный вес печени	3,05±0,23 (9)	5,75±0,19 (8)	1,56±0,20 (7)	2,95±0,24 (7)
На 1 мг ДНК	33,4±1,9 (9)	52,5±2,3 (8)	18,4±2,3 (7)	27,5±2,7 (7)

Приимечание. Общую активность каталазы определяли в гомогенате в присутствии 0,1% триглицеридазы X-100.

* Центрифугирование при 105 000 g 60 мин.

полноценность глутатионпероксидазного пути обезвреживания перекисей в гиперплазированной печени. Дополнительным свидетельством этого является то, что ГП печени крыс, получавших ФБ, не отличалась от контрольного препарата по степени термолабильности (45°, 20 мин.) или ингибированию избытком восстановленного глутатиона. Наличие значительного количества каталазы во фракции пероксисом (¹⁶), где ГП отсутствует (¹⁷), позволяет сделать заключение о преимущественной роли каталазы в разрушении H₂O₂, генерируемой пероксисомальными ферментами. При введении ФБ доля связанной с пероксисомами и локализованной в цитозоле каталазы не изменяется (табл. 2), что может быть свидетельством интактности механизмов синтеза (¹⁸) и транспорта (¹⁹) вновь образованного фермента из эндоплазматического ретикулума в пероксисомы. Сравнение результатов, приведенных в табл. 1 и 2, показывает, что при действии ФБ активность ГП повышается более значительно, чем каталазы, в результате чего отношение активностей этих ферментов в цитозоле печеночных клеток возрастает в 1,5—2 раза.

Таким образом, активация ГП и каталазы при индуцируемой ФБ гиперплазии паренхиматозных клеток печени может свидетельствовать о важной функции этих «антирадикальных» ферментов, так же как и водорастворимого антиоксиданта — глутатиона, в процессах клеточного деления.

Второй Московский медицинский институт им. Н. И. Пирогова

Поступило 19 II 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ P. J. O'Brien, C. Little, Canad. J. Biochem., v. 47, 493 (1969). ² P. C. Burger, P. B. Herdson, Am. J. Pathol., v. 48, 793 (1966). ³ S. D. Aust, D. L. Roerig, T. C. Pederson, Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 47, 1133 (1972). ⁴ D. E. Paglia, W. N. Valentine, J. Lab. Clin. Med., v. 70, 158 (1967). ⁵ H. U. Bergmeyer, Methods of Enzymatic Analysis, N. Y., 1965, p. 837, 886. ⁶ А. М. Герасимов, А. Б. Капитанов, Л. Ф. Панченко, ДАН, т. 212, 1231 (1973). ⁷ K. Burton, Biochem. J., v. 64, 405 (1956). ⁸ P. Nicholls, Biochim. et biophys. acta, v. 279, 306 (1972). ⁹ R. G. Thurman, B. Chance, Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 168, Art. 2, 348 (1969). ¹⁰ N. Oshino, B. Chance et al., Arch. Biochem. and Biophys., v. 154, 117 (1973). ¹¹ P. Nicholls, Biochim. et biophys. acta, v. 99, 286 (1965). ¹² A. Boveris, N. Oshino, B. Chance, Biochem. J., v. 128, 617 (1972). ¹³ C. Little, P. J. O'Brien, Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 31, 145 (1968). ¹⁴ N. H. Lee, F. M. Belpaire, Biochem. Pharmacol., v. 21, 3171 (1972). ¹⁵ E. Bresnick, Hu Yu Yang, Biochem. Pharmacol., v. 13, 497 (1964). ¹⁶ C. de Duve, P. Baudhuin, Physiol. Rev., v. 46, 323 (1966). ¹⁷ L. Flohé, W. Schlegel, Hörpke-Seyler's Zs. Physiol. Chem., B, 352, 1401 (1971). ¹⁸ T. Sakamoto, T. Higashi, J. Biochem., v. 73, 1088 (1973). ¹⁹ C. M. Redman, D. J. Grab, R. Irulkulla, Arch. Biochem. and Biophys., v. 152, 496 (1972). ²⁰ Е. Б. Бурлакова, Н. Г. Храпова, Тез. докл. 2-го Всесоюзн. совещ. по механизмам радикальных реакций окисления, Рига, 1973, стр. 45.