

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. Энгельсгардтом 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 открытым вопрос об условиях реализации каждого из них в нативной клетке.

Введение фенобарбитала (ФБ) животным, как известно, вызывает гиперплазию паренхиматозных клеток печени с пролиферацией гладкого эндоплазматического ретикулума и увеличением числа пероксисом в гепатоците ⁽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 внутривентрально 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 перфузией раствором 0,25 М сахарозы, 2 мМ ЭДТА и 25 мМ трис-HCl, 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 мМ К-фосфатный буфер, pH 7,0; 0,12 мМ НАДФ-Н; 0,85 мМ восстановленный глутатион; 1 мМ ЭДТА; 1 ед. глутатионредуктазы; 0,3 мМ H_2O_2 ; 0,3 мМ KCN. 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 глутатионредуктазы 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, глутатионредуктаза из дрожжей, 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойная кислота), трис-(оксиметил)-аминометан, бычий сывороточный альбумин фирмы «Calbiochem», НАДФ-Н — «Boehringer Mannheim GmbH», ЭДТА — «VEB Berlin — Che-

Активность ГП и содержание глутатиона в печени крыс, получивших ФБ

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

Примечание. В скобках указано число опытов.

* Вес печени/вес тела крысы.

mie», фенobarбитал 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 «антиокислительными» 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 принято в физической химии (см. ⁽²⁰⁾).

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

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

Примечание. Общую активность каталазы определяли в гомогенате в присутствии 0,1% тритона 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 H_2O_2 , 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 ретикулула 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, *Hoppe-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. Irukulla, *Arch. Biochem. and Biophys.*, v. 152, 496 (1972).
- ²⁰ Е. Б. Бурлакова, Н. Г. Храпова, Тез. докл. 2-го Всесоюз. совещ. по механизмам радикальных реакций окисления, Рига, 1973, стр. 45.