

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ НА ФОНЕ РАЗВИТИЯ ТОКСИЧЕСКОГО ГЕПАТИТА И ЭКЗОГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ ЛИПОВОЙ КИСЛОТЫ

A.V. MAKEEVA*, M.V. LUSHCHIK*, V.I. BOLOTSKIKH*, T.N. POPOVA**

*ФГБОУ ВО Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко
ул. Студенческая, 10, г. Воронеж, 394036, Россия, e-mail: makeeva81@mail.ru

**ФГБОУ ВО Воронежский государственный университет
Университетская площадь д.1, г. Воронеж, 394693, Россия

Аннотация. Проведено изучение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в условиях активации свободнорадикальных процессов при токсическом гепатите. Установлено, что на 4 сутки развития токсического гепатита активность фермента возрастает на 70% от контроля. Предполагается, что активация фермента может играть роль для работы глутатионредуктазной/глутатионпероксидазной антиоксидантной системы. Ионы Fe^{2+} и ионы Cu^{2+} оказывают ингибирующее влияние неконкурентного типа на фермент в норме и при патологии, ионы Ca^{2+} – активируют его. Вероятно, при развитии токсического гепатита в условиях оксидативного стресса под воздействием ионов металлов происходят конформационные изменения исследуемого фермента, влияющие на его активность. В работе показано участие экзогенной альфа-липоевой кислоты на функционирование фермента. Введение липоевой кислоты в дозах 16 и 35 мг/кг животным с патологией печени приводило к дозозависимому снижению активности фермента как в печени, так и в сыворотке крови подопытных животных. Снижение его активности при введении липоевой кислоты на фоне развития патологии печени может быть связано с уменьшением необходимости поставки восстановительных эквивалентов для работы глутатион-зависимой антиоксидантной системы.

Ключевые слова: печень, сыворотка крови, крысы, свободнорадикальные процессы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, регуляция активности, липоевая кислота.

REGULATION OF ACTIVITY OF GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE IN THE BACKGROUND OF THE DEVELOPMENT OF TOXIC HEPATITIS AND THE ACTION OF EXOGENOUS LIPOIC ACID

A.V. MAKEEVA*, M.V. LUSHCHIK*, V.I. BOLOTSKIKH*, T.N. POPOVA**

*Voronezh State N.N. Burdenko Medical University
Studencheskaya Str., 10, Voronezh, 394036, Russia, e-mail: makeeva81@mail.ru

**Voronezh State University, Universitetskaya pl.1, Voronezh, 394693, Russia

Abstract. The activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in the conditions of activation of free radical processes under toxic hepatitis is studied. It is established that on the 4th day of development of toxic hepatitis, the enzyme activity increased by 70% from control. It is assumed that the activation glucose-6-phosphate dehydrogenase can play a role to work glutathione reductase/glutathione peroxidase of the antioxidant system. Ions Fe^{2+} and Cu^{2+} ions exert the inhibiting impact of noncompetitive type on enzyme at the norm and at pathology, Ca^{2+} ions - activate glucose-6-phosphate dehydrogenase. Probably, the development of toxic hepatitis in conditions of oxidative stress under the influence of metal ions occur conformational changes of the investigated enzyme, affecting its activity. This article shows the involvement of exogenous alpha-lipoic acid on the functioning of glucose-6-phosphate dehydrogenase. Administration of lipoic acid at doses of 16 and 35 mg / kg to animals with liver pathology resulted in a dose-dependent decrease in enzyme activity in both the liver and serum of experimental animals. A decrease in the activity glucose-6-phosphate dehydrogenase in the administration of alpha-lipoic acid on the background of the development of liver pathology may be associated with a decrease in the need for the delivery of regenerative equivalents to work the glutathione-dependent antioxidative system.

Key words: liver, blood serum, rats, free-radical processes, glucose-6-phosphate dehydrogenase, activity regulation, lipoic acid.

Введение. В настоящее время одним из важнейших направлений медицинской биохимии является исследование функционирования метаболических систем разного уровня сложности в условиях развития патологического процесса. Центральное место в метаболизме клетки занимают процессы *свободнорадикального окисления* (СРО), которые принимают участие в регуляции интенсивности пролиферации клеток, биосинтезе простагландинов и катехоламинов [4]. В то же время избыток радикальных продуктов вызывает повреждение биологических мембран, изменяя их проницаемость, функциональную актив-

ность ферментов, нуклеиновых кислот, белков и липидов, приводя к развитию ряда заболеваний. Состояние *окислительного стресса* (ОС) фактически охватывает весь организм, но интенсивность его проявления, определенная специфика изменения отдельных компонентов антиоксидантной и прооксидантной систем может быть разной в разных тканях, что обусловлено их структурной организацией, особенностью биохимических процессов и функциональной активностью [2]. Существует целый ряд антиоксидантных систем организма, которые принимают участие в элиминации продуктов СРО. Для эффективной работы некоторых из них, в том числе и глутатионредуктазной/глутатионпероксидазной *антиоксидантной системы* (АОС) необходимым условием является поставка восстановительных эквивалентов. Существенная роль в поддержании определенного уровня НАДФН в клетке принадлежит *пентозофосфатному пути* (ПФП), ключевым ферментом которого является *глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа* (Г6ФДГ) [3]. Очень часто в условиях развития патологического процесса действия эндогенных защитных механизмов бывает недостаточно и поэтому в медицинской практике все чаще используются экзогенные антиоксидантные препараты. Одним из эффективных антиоксидантов при лечении нейродегенеративных заболеваний, заболеваний печени и сахарного диабета является *альфа-липоевая кислота* (ЛК). В организме ЛК образует динамичную окислительно-восстановительную систему, которая участвует в переносе ацильных групп в составе многокомпонентных ферментных систем. Она не только обладает самостоятельным антиоксидантным потенциалом, но и обеспечивает мощную поддержку функционирования других антиоксидантных звеньев в организме [5].

Цель исследования – изучение регуляции активности Г6ФДГ в условиях активации процессов СРО, наблюдаемых при *экспериментальном токсическом гепатите* (ЭТГ), а также степени влияния экзогенной ЛК на интенсивность свободно-радикальных процессов в условиях развития патологии.

Материалы и методы исследования. В качестве объекта исследования использовали взрослых лабораторных белых крыс (*RattusrattusL.*), самцов, массой 250-300 г. Животные были разделены на 4 экспериментальные группы: I – интактные животные (которые содержались в условиях стандартного режима вивария); II – крысы, подвергшиеся воздействию экспериментального токсического гепатита; III – группа животных с токсическим поражением печени, которым вводили ежедневно, внутривентриально ЛК в дозе 16 мг/кг, в течение 4-х дней эксперимента; IV – группа животных с токсическим гепатитом, которым вводили ежедневно, внутривентриально ЛК в дозе 35 мг/кг, в течение 4-х дней эксперимента. Для создания модели ЭТГ использовали CCl_4 , который является органоспецифическим токсином, обладающим гепатотропным эффектом. После суточной пищевой депривации крысам с помощью специального зонда в пищевод вводили CCl_4 в вазелиновом масле (доза - 0,064 мл на 100 г веса животного). Печень крыс, подвергнутых токсическому гепатиту, использовали для дальнейших исследований. Активность Г6ФДГ определяли спектрофотометрически на СФ-56 при длине волны 340 нм в среде спектрофотометрирования следующего состава: 50 мМ трис- HCl буфер ($pH=7,8$), содержащий 3 мМ глюкозо-6-фосфата, 1 мМ $MgCl_2$, 0,25 мМ НАДФ. О скорости протекания реакции судили по возрастанию оптической плотности в результате восстановления НАДФ в ходе катализируемого ферментом превращения глюкозо-6-фосфата в 6-фосфоглюконолактон. Реакцию начинали внесением ферментного препарата в среду. За единицу активности принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкМ продукта реакции за 1 мин при температуре 25°C. Активность фермента выражали в ферментативных единицах (E) на 1 мг белка или в E в расчете на 1 г сырой массы материала. Данные обрабатывали с использованием t -критерия Стьюдента с вычислением среднего значения, стандартного отклонения, различия считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение. К настоящему времени установлено, что токсический гепатит может приводить к усилению *пероксидного окисления липидов* (ПОЛ) и деструкции гепатоцитов. Нами проведено исследование по изменению активности Г6ФДГ в динамике развития токсического гепатита. Показано, что после введения гепатотоксина наблюдалось повышение активности исследуемого фермента (на 20% на первые сутки, на 30% на вторые сутки, на 60% – на третьи сутки, на 70% от контроля на четвертые сутки). Однако, начиная с 5 суток активность фермента постепенно снижается, составляя 140% от контроля. Ранее было показано, что максимальный цитолиз гепатоцитов и ПОЛ наблюдается на четвертые сутки после введения гепатотоксина [3]. Таким образом, повышение активности Г6ФДГ связано с ее участием в поддержании определенного уровня НАДФН для работы *глутатионредуктазной/глутатионпероксидазной антиоксидантной системы* (ГР/ГП АОС) в условиях ОС, достигающего максимума развития к четвертым суткам токсического гепатита. В этой связи регуляторные свойства Г6ФДГ изучались на четвертые сутки развития патологии.

Известно, что ионам Fe^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} принадлежит значительная роль в развитии процессов СРО. Избыточное накопление железа в организме оказывает токсическое действие на печень, при достижении уровня железа в печени 2,0-4,0 мг/г происходит интенсификация ПОЛ и снижение количества цитохрома $P450\alpha$ микросомах [3]. Показано, что возрастание уровня ионов железа при ОС способствует усиленной генерации *активных форм кислорода* (АФК) [5]. При изучении патогенеза болезни Альцгеймера обнаружена аккумуляция железа в гиппокампе, коре головного мозга, базальных ядрах Мейнрета, сенильных

бляшках и внутриклеточных нейрофибриллярных клубочках, с которыми связана интенсивная генерация АФК [1]. Известно, что одним из маркеров старения является липофусцин. Его образование индуцируется железом и является прямым следствием липидной перекисидации. Ионы Cu^{2+} принимают участие в индукции процессов ПОЛ на стадии разветвления цепи, ионы Ca^{2+} , связываясь со специфическими внутриклеточными рецепторными белками, активируют ферментные системы, принимающие участие в восстановлении молекулярного кислорода. Вероятность избыточного поступления в организм железа, меди и кальция достаточно велика, что может приводить к изменению ряда метаболических систем организма и развитию ОС.

Проведено исследование влияние данных ионов на функционирование Г6ФДГ, выделенной из печени контрольных крыс и при ЭТГ.

Установлено, что ионы Fe^{2+} ингибируют Г6ФДГ по неконкурентному типу в норме и при токсическом гепатите. Полученные значения K_i составили 1,4 мМ в норме и 0,5 мМ при патологии печени. Снижение активности фермента наблюдалось во всем диапазоне выбранных концентраций (0,01-2,0 мМ) (рис. 1). Наибольшее ингибирование фермента наблюдалось при патологии. Так, при максимальной концентрации ионов железа 2,0 мМ активность Г6ФДГ уменьшается в 1,5 раза в норме и в 2,3 раза при токсическом гепатите.

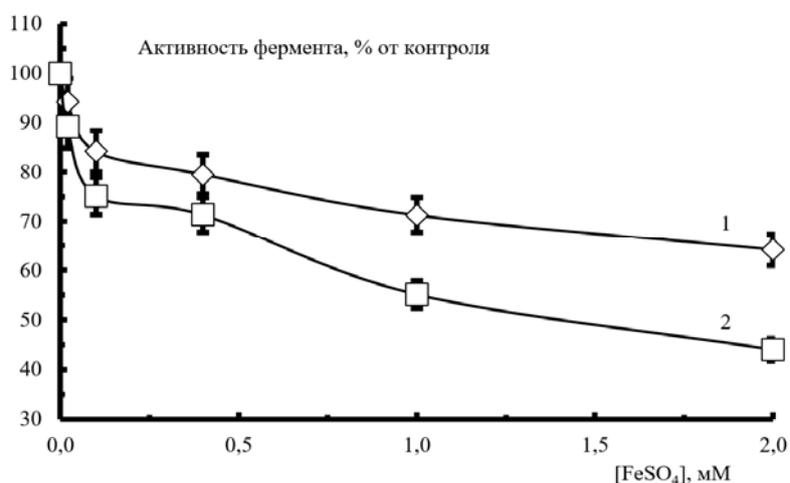


Рис. 1. Влияние ионов железа на активность Г6ФДГ из печени контрольных (1) и подвергнутых токсическому гепатиту (2) крыс

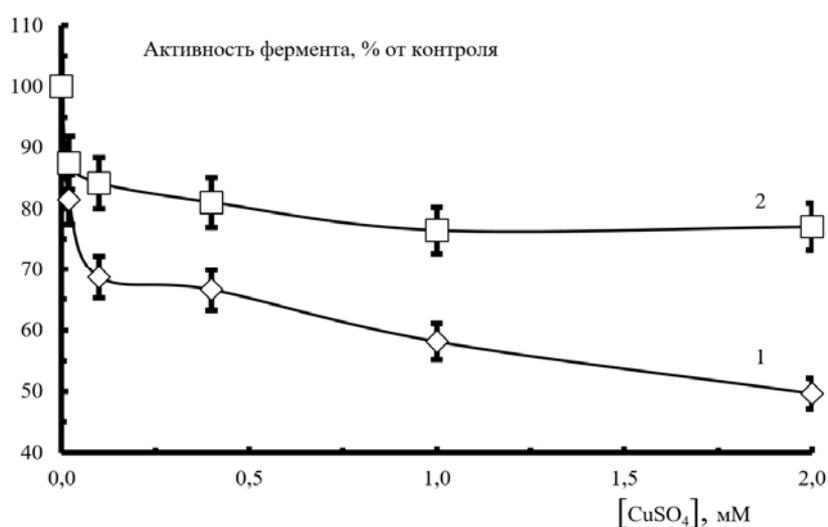


Рис. 2. Влияние ионов меди на активность Г6ФДГ из печени контрольных (1) и подвергнутых токсическому гепатиту (2) крыс

Известно, что медь, обладая способностью к донорноакцепторным электронным взаимодействиям, в том числе и взаимным, индуцируют СРО путем неполного восстановления молекулы кислорода с формированием АФК, таких как гидроксильный радикал, супероксид-анион радикал. Активация ПОЛ под действием ионов меди приводит к нарушению значительного количества клеточных функций и является одним из универсальных патогенетических механизмов развития ряда заболеваний. Так, выявлена роль солей меди и особенно железа в развитии инсулинорезистентности [6]. Результаты проведенных нами исследований показали, что ионы Cu^{2+} ингибируют активность Г6ФДГ по неконкурентному типу в норме и при ЭТГ (рис. 2).

Значения K_i составили 0,54 мМ в норме и 1,2 мМ при патологии печени. В условиях нормы ионы Cu^{2+} оказывали более выраженное ингибирующее влияние. При максимальной концентрации ионов Cu^{2+} в среде спектрофотометрирования, равной 2,0 мМ, активность фермента составляет 49,6% и 77,0% от исходного уровня в норме и при ЭТГ соответственно.

Нами установлено, что ионы Ca^{2+} повышают активность Г6ФДГ как в условиях нормы, так и при ЭТГ (рис. 3).

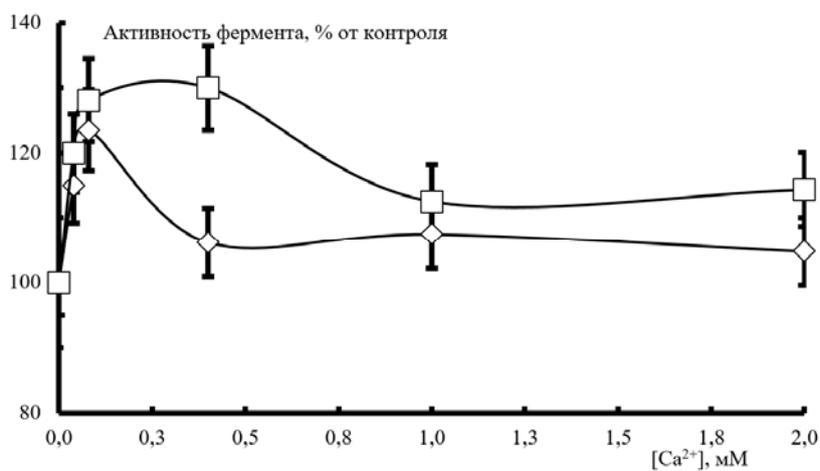


Рис. 3. Влияние ионов кальция на активность Г6ФДГ из печени контрольных (1) и подвергнутых токсическому гепатиту (2) крыс

Однако, наибольший активирующий эффект наблюдается при концентрации ионов Ca^{2+} в среде спектрофотометрирования 0,1 мМ в норме и 0,4 мМ при токсическом гепатите. При этом активность фермента увеличивается на 24,0% и 30,1% соответственно от исходного уровня. При более высоких концентрациях ионов Ca^{2+} (1,0-2,0 мМ) активность фермента снижается, но остается выше контрольного уровня. Так, при 2,0 мМ концентрации ионов Ca^{2+} степень активации фермента составляет 4,8% в норме и 14,4% при патологии.

Вероятно, при развитии токсического гепатита под воздействием ионов металлов происходят конформационные изменения исследуемого фермента, влияющие на его активность. Изменение регуляции активности Г6ФДГ может оказывать влияние для работы ГР/П АОС в условиях активации процессов ПОЛ.

Высокая эффективность и патогенетическое действие ЛК доказано многочисленными экспериментальными и клиническими исследованиями. Согласно данным литературы, гепатопротективное действие липоевой кислоты связано с накоплением гликогена в печени, торможением накопления липидов в печени (при некоторых патологических состояниях), повышением активности ряда ферментов, улучшением функциональной активности печени [7]. Нами проведено исследование влияния разных доз ЛК на изменение каталитической активности Г6ФДГ. Показано, что введение ЛК в дозах 16 и 35 мг/кг животным с патологией печени приводило к дозозависимому снижению активности как в печени, так и в сыворотке крови крыс. Так, при введении ЛК в дозах 16 и 35 мг/кг животным с ЭТГ удельная активность Г6ФДГ в ткани печени крыс снижалась в 1,3 и 1,5 раза соответственно, а активность, выраженная в виде Е/г сырой массы, в 1,2 и 1,3 раза (табл. 1) относительно животных с патологией. Известно, что ЛК способна повышать интра- и экстрацеллюлярный уровни глутатиона, таким образом, возможно, приводя к нормализации активности Г6ФДГ в печени животных с токсическим гепатитом.

Таблица 1

Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в ткани печени и сыворотке крови крыс в норме, при токсическом гепатите и действии альфа-липоевой кислоты

Группа животных	Гомогенат печени		Сыворотка крови	
	Е/г сырой массы	Е/мг белка	Е/мл	Е/мг белка
I	0,48±0,019	0,037±0,0015	0,016±0,0006	0,0012±0,00005
II	0,87±0,035*	0,061±0,0024*	0,031±0,0012*	0,0024±0,00010*
III	0,76±0,030*	0,048±0,0019*	0,027±0,0011*	0,0019±0,00008*
IV	0,73±0,029*	0,040±0,0016*	0,025±0,0010*	0,0015±0,00006*

Примечание: * – отличия от нормы достоверны (уровень значимости $p < 0,05$)

В сыворотке крови животных с патологически измененной печенью также было выявлено снижение удельной активности Г6ФДГ при введении ЛК в дозах 16 и 35 мг/кг в 1,3 и 1,6 раза (табл. 1) соответственно, по сравнению с группой животных, подвергнутых действию CCl_4 .

Выводы. Интенсификация процессов СРО, наблюдаемая при токсическом гепатите сопряжена с повышением активности Г6ФДГ. Активация фермента в условиях патологии может иметь значение для функционирования ГР/ГП АОС, использующей для своей работы НАДФН. Полученные данные свидетельствуют, что контроль образования активных форм кислорода при патологии может осуществляться за счет изменения активности Г6ФДГ, происходящего в результате модификации кинетических свойств и регуляции активности под действием ионов металлов Fe^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} . Очевидно, снижение активности исследуемого фермента при введении ЛК на фоне развития патологии печени может быть связано с уменьшением необходимости поставки восстановительных эквивалентов для работы глутатион-зависимой антиоксидантной системы.

Литература

1. Агарков А.А., Попова Т.Н., Семенихина А.В., Шульгин К.К. Исследование влияния ионов железа на активность глутатионредуктазы из печени крыс в норме и при токсическом гепатите // Фундаментальные исследования. 2008. № 7. С. 29.
2. Дубинина Е.Е., Щедрина Л.В., Незнанов, Н.Г. Залуцкая Н.М., Захарченко Д.В. Окислительный стресс и его влияние на функциональную активность клеток при болезни Альцгеймера // Медицинская биохимия. 2015. Т. 61, вып. 1. С. 57–69.
3. Левенкова М.В. Свойства и регуляция активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в условиях оксидативного стресса при токсическом поражении печени крыс: дис.... канд. биол. наук. Воронеж: ВГУ, 2006. 180 с.
4. Луцкий М.А., Куксова Т.В., Смелянец М.А., Лушникова Ю.П. Свободнорадикальное окисление липидов и белков – универсальный процесс жизнедеятельности организма // Успехи современного естествознания. 2014. № 12 (часть 1). С. 24–28.
5. Макеева А.В., Попова Т.Н., Матасова Л.В., Йама И.Н. Влияние липоевой кислоты на содержание цитрата, активность аконитатгидратазы и оксидативный статус при ишемии миокарда у крыс // Биохимия. 2008. Т. 73, №.1. С. 93–97.
6. Тиньков А.А. Экспериментальное исследование влияния солей железа и меди на свободнорадикальное окисление и локальные механизмы регуляции метаболизма жировой ткани: автореф. дисс.... канд. мед. наук. Челябинск, 2014. 24 с.
7. Шавловская О.А. Эффективность тиоктовой (альфа-липоевой) кислоты в терапии диабетической полинейропатии // Эффективная фармакотерапия. 2016. №12. С. 8–14.

References

1. Agarkov AA., Popova TN, Semenikhina AV, Shulgin KK. Issledovanie vliyaniya ionov zheleza na aktivnost' glutationreduktazy iz pecheni krysv v norme i pri toksicheskom gepatite [The influence of Fe ions on the activity of glutathione reductase from rat liver at norm and toxic hepatitis]. Fundamental research. 2008;7:29. Russian.
2. Dubinina EE. Okislitel'nyj stress i ego vliyanie na funkcional'nuyu aktivnost' kletok pri bolezni Al'cgejmera [Oxidative stress and its effect on cells functional activity of alzheimer's]. Biomedical chemistry. 2015;61(1):57-69. Russian.

3. Levenkova MV. Svoystva i regulyaciya aktivnosti glyukozo-6-fosfatdehidrogenazy v us-loviyah oksidativnogo stressa pri toksicheskom porazhenii pecheni krya [Properties and regulation of activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in the conditions of an oxidative stress at toxic damage of a liver of rats] [dissertation]. Voronezh (Voronezh region): VSU; 2006. Russian.

4. Lutskii MA. Svobodnoradikal'noe okislenie lipidov i belkov – universal'nyj process zhiznedeyatel'nosti organizma [Lipid and protein free radical oxidation as a universal vital process of organism]. The success of modern science. 2014;12(1):24-8. Russian.

5. Makeeva AV, Popova TN, Matasova LV, Yama IN. Vliyanie lipoevoj kisloty na sodержanie citrata, aktivnost' akonitatgidratazy i oksidativnyj status pri ishemii miokarda u krya [Effects of lipoic acid on citrate content, aconitate hydratase activity, and oxidative status during myocardial ischemia in rats]. Biochemistry. 2008;73(1):76-9. Russian.

6. Tinkov AA. Eksperimental'noe issledovanie vliyaniya solej zheleza i medi na svobodnoradikal'noe okislenie i lokal'nye mekhanizmy regulyatsii metabolizma zhirovoj tkani [Experimental study of the effect of salts of iron and copper on free radical oxidation and local mechanisms of regulation of the metabolism of adipose tissue] [dissertation]. Chelyabinsk (Chelyabinsk region); 2014. Russian.

7. Shavlovskaya OA. Effektivnost' tioktovoj (al'fa-lipoevoj) kisloty v terapii diabeticheskoy polinejropatii [Efficacy of Thiocctic (Alpha-Lipoic) Acid in Treatment of Diabetic Polyneuropathy]. Effective pharmacotherapy. 2016;12:8-14. Russian.

Библиографическая ссылка:

Макеева А.В., Лушник М.В., Болотских В.И., Попова Т.Н. Регуляция активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы на фоне развития токсического гепатита и экзогенного действия липоевой кислоты // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2018. №3. Публикация 3-2. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2018-3/3-2.pdf> (дата обращения: 16.05.2018). DOI: 10.24411/2075-4094-2018-16035.*

* номера страниц смотреть после выхода полной версии журнала: URL: <http://medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2018-3/e2018-3.pdf>