



УДК 577.125

М.В. НАУМОВА, И.В. СЕМАК

ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ПОВРЕЖДЕНИЕ КАТАЛАЗЫ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ СИСТЕМЕ МЕДЬ - БИЛИРУБИН

Phenomenon of generation of reactive oxygen species during complexation between copper and bilirubin was used for evaluation of the possibility of oxidative damage of catalase under conditions of cholestasis. Using SDS-electrophoresis it was found, that incubation of catalase in copper - bilirubin system is accompanied by fragmentation and partial aggregation of the enzyme. Using method of own protein fluorescence quenching it was shown catalase ability to bind copper. In view of the obtained results it may be assumed, that reduction of catalase activity during cholestasis is determined to a considerable degree by oxidative damage of catalase.

Процессы свободнорадикального окисления (СРО) играют важную роль в жизнедеятельности клеток [1, 2]. С одной стороны, реакции СРО являются необходимым этапом различных метаболических процессов, с другой - их усиление во многих случаях либо следствие, либо причина тех или иных патологических изменений в клетках и тканях. Интенсивность СРО в живых организмах регулируется антиоксидантной системой, состоящей из большого числа согласованно работающих ферментов и низкомолекулярных антиоксидантов. При многих заболеваниях нормальное функционирование антиоксидантной системы нарушается, что неизбежно приводит к активизации свободнорадикальных реакций и в конечном итоге - к серьезным нарушениям клеточного метаболизма. Так, при внепеченочном холестазе снижение активности каталазы, глутатион S-трансферазы и супероксиддисмутазы (СОД) сопровождается интенсификацией процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), вследствие чего нарушаются белоксинтезирующая и обезвреживающая функции печени и изменяется проницаемость мембран гепатоцитов [3]. Вместе с тем тонкие механизмы подавления антиоксидантной защиты при холестазе до конца неизвестны, что существенно ограничивает возможность направленной коррекции данной патологии.

Характерной особенностью холестаза является избыточное накопление в гепатоцитах билирубина и меди, которые могут вступать в реакцию комплексообразования. Происходящее при этом восстановление Cu(II) до Cu(I) сопровождается генерацией активных форм кислорода (АФК), способных повреждать белки, нуклеиновые кислоты и инициировать процессы ПОЛ. В качестве мишеней АФК могут также выступать ферменты, обеспечивающие их детоксикацию. Принимая во внимание сказанное, мы изучили возможность окислительного повреждения каталазы в присутствии меди и билирубина.

Материал и методика

В работе были использованы коммерческие препараты каталазы из печени быка (Sigma). Анализируемый образец инкубировали в реакционной смеси, содержащей 10 мМ трис-НСl буфер (рН 7,4), 200 мкМ билирубина

и 200 мкМ CuCl_2 , в темноте при 37 °С в течение 2, 4, 6, 24 ч. Затем аликвоту реакционной смеси использовали для последующего анализа. Электрофорез белков проводили в 12,5 % полиакриламидном геле в денатурирующих условиях по методу [4]. Гели, окрашенные Кумасси R-250, подвергались денситометрическому анализу с помощью специализированного программного обеспечения фирмы Amersham Pharmacia.

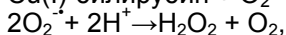
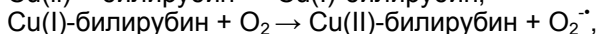
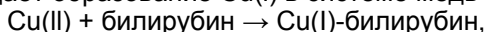
Для детекции образования Cu(I) в присутствии билирубина использовали спектрофотометрический метод. Реакционная смесь содержала 10 мМ трис- HCl (pH 7,4), 60 мкМ CuCl_2 , 30 мкМ билирубина и 600 мкМ батocupроина. Регистрация спектров осуществлялась с помощью спектрофотометра Cary 100 (Varian, Австралия) сразу после добавления реагентов в реакционную смесь.

Для оценки способности каталазы связывать медь применяли метод тушения собственной флуоресценции каталазы. Инкубационную среду, содержащую 10 мМ трис- HCl (pH 7,4) и каталазу из печени быка (0,877 мкМ), титровали CuCl_2 (10÷500 мкМ) и регистрировали собственную флуоресценцию каталазы в диапазоне длин волн от 300 до 400 нм, используя длину волны возбуждения 290 нм. Спектр флуоресценции и метрический анализ проводили с помощью спектрофлуориметра Cary ECLIPSE (Varian, Австралия).

Активность каталазы оценивали спектрофотометрически по степени разрушения пероксида водорода за единицу времени [5].

Результаты и их обсуждение

Для исследования механизмов, отвечающих за инициацию и последствия свободнорадикальных реакций при различных патологиях, применяют различные физико-химические и биохимические бесклеточные тест-системы, а также экспериментальные модели на уровне субклеточных фракций, клеток, органов или тканей [6]. Для оценки возможности окислительного повреждения каталазы при холестазах мы использовали феномен генерации АФК при комплексообразовании меди с билирубином. В ходе реакции с билирубином Cu(II) восстанавливается до Cu(I) . Взаимодействие молекулярного кислорода с Cu(I) сопровождается генерацией супероксид-анион-радикала, который спонтанно дисмутирует в пероксид водорода. Последний реагирует с Cu(I) в составе комплекса с образованием гидроксильного радикала, способного повреждать биосубстраты (белки, нуклеиновые кислоты и липиды). Использование хелатора Cu(I) (батocupроина) подтверждает образование Cu(I) в системе медь - билирубин (рис. 1):



Степень окислительного повреждения каталазы в системе медь - билирубин оценивали с помощью

SDS-электрофореза в полиакриламидном геле. Денситометрический анализ гелей, окрашенных Кумасси R-250, показал, что увеличение времени инкубации каталазы в модельной системе (рис. 2, дорожки 5-7) сопровождается уменьшением интенсивности окрашивания белковой полосы, соответствующей нативному ферменту (рис. 2, дорожка 1). Окислительное повреждение каталазы достигает максимальных значений (68 %)

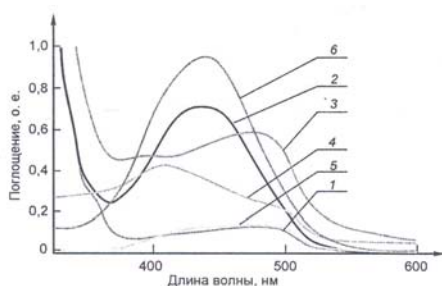


Рис. 1. Спектрофотометрическая детекция образования Cu(I) в присутствии билирубина. Цифрами обозначены спектры: 1 – медь(II) в присутствии батocupроина; 2 – билирубин в присутствии батocupроина; 3 – медь(II) в присутствии билирубина и батocupроина; 4 – медь(II) в присутствии билирубина; 5 – медь(II); 6 – билирубин

через 6 ч. Следует отметить, что ни медь, ни билирубин сами по себе не влияли на каталазу (см. рис. 2). Поэтому обнаруженный феномен, по-видимому, обусловлен иницируемыми гидроксильным радикалом фрагментацией и частичной агрегацией каталазы. Интересно, что в случае повреждения каталазы апкилпероксильным радикалом наблюдается похожая картина. Однако агрегация молекул каталазы превалирует над их фрагментацией [7]. Таким образом, преобладание того или иного типа повреждения во многом определяется природой радикала, взаимодействующего с каталазой.

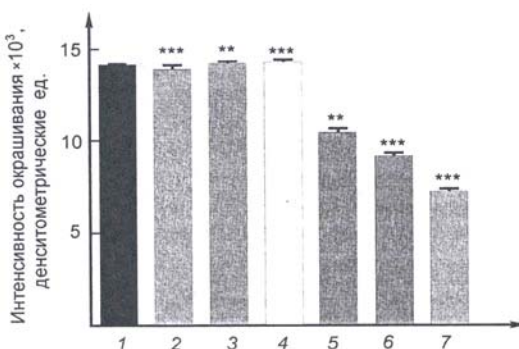


Рис. 2. Интенсивность окрашивания Кумасси R-250 электрофоретических полос, соответствующих нативной каталазе из печени быка:

- 1 – в присутствии меди и билирубина ($t_{\text{инк}} - 0$ ч);
- 2 – без меди и билирубина ($t_{\text{инк}} - 6$ ч);
- 3 – в присутствии меди ($t_{\text{инк}} - 6$ ч);
- 4 – в присутствии билирубина ($t_{\text{инк}} - 6$ ч);
- 5 – в системе медь – билирубин ($t_{\text{инк}} - 2$ ч);
- 6 – в системе медь – билирубин ($t_{\text{инк}} - 4$ ч);
- 7 – в системе медь – билирубин ($t_{\text{инк}} - 6$ ч)

Подобный механизм окислительного повреждения был предложен для объяснения фрагментации альбумина в системе $\text{Cu(II)} - \text{H}_2\text{O}_2$ [8]: на первом этапе происходит связывание Cu(II) с альбумином, медь(II), входящая в состав комплекса белок – медь, при взаимодействии с пероксидом водорода восстанавливается до Cu(I) с образованием $\text{OH}\cdot$ -радикала. Гидроксильный радикал, являясь наиболее реакционноспособным из всех известных АФК, при высвобождении *in situ* модифицирует близлежащие аминокислотные остатки, приводя в итоге к разрыву полипептидной цепи.

Обнаруженный нами феномен деградации каталазы обусловлен, по-видимому, ее способностью связывать ионы Cu(II) , благодаря чему обеспечивается образование гидроксильного радикала в непосредственной близости от белковой поверхности.

Для экспериментального подтверждения взаимодействия каталазы с медью был использован метод тушения собственной белковой флуоресценции. Титрование каталазы медью вызывает уменьшение интенсивности флуоресценции, причем длина волны максимума спектра эмиссии сохраняется. Это свидетельствует о том, что микроокружение остатков триптофана в молекуле белка не изменяется.

Данные по тушению, как правило, представляют в координатах Штерна – Фольмера: F_0/F от $[Q]$, где F_0 и F – интенсивности флуоресценции в отсутствие и в присутствии тушителя соответственно, а $[Q]$ – концентрация тушителя. Ожидается, что соотношение F_0/F должно линейно зависеть от концентрации тушителя. Вместе с тем в случае тушения медью собственной флуоресценции каталазы график в координатах Штерна – Фольмера изогнут вверх (рис. 3 а), что может быть обусловлено эффектом внутреннего фильтра и/или образованием комплекса флуорофора и тушителя. С целью исключения эффекта внутреннего фильтра при построении были использованы зависимости исправленные интенсивности флуоресценции, которые вычисляли с помощью уравнения: $F_{\text{испр}} = F_{\text{набл}} \cdot 10^{(A_{\text{возб}} + A_{\text{исп}})/2}$, где $A_{\text{возб}}$ – поглощение при длине волны возбуждения, $A_{\text{исп}}$ – поглощение при длине волны испускания.

График, построенный с учетом откорректированных интенсивностей, сохранял нелинейность, что свидетельствует в пользу комплексообразования.

Следует отметить, что у каталазы, по всей видимости, отсутствуют специфические сайты связывания меди, поскольку на электрофореграмме

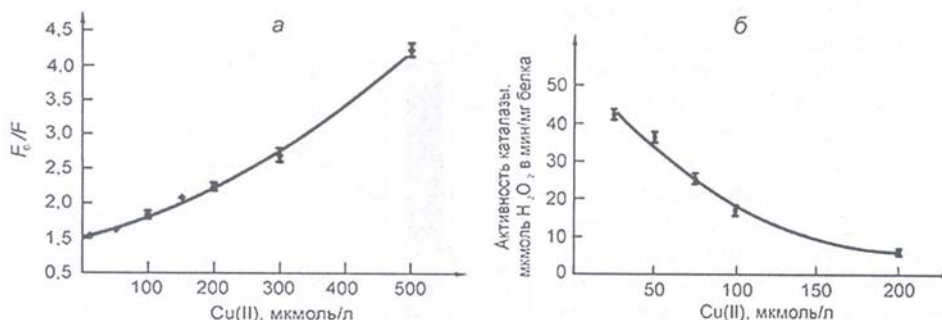


Рис. 3. Тушение медью собственной белковой флуоресценции каталазы – а; ингибирование активности каталазы ионами меди – б

не наблюдались четко выраженные белковые полосы с более низкой молекулярной массой по сравнению с нативным белком.

Интересным представляется тот факт, что ионы меди в отсутствие билирубина не вызывают фрагментацию каталазы, однако существенно снижают ее ферментативную активность (рис. 3 б).

В настоящее время не вызывает сомнений, что индуцированное медью окислительное повреждение биосубстратов играет важную роль в развитии целого ряда заболеваний [9-11]. Cu(II) в присутствии аскорбата и тиолов вызывает деградацию ДНК, что в конечном итоге может инициировать канцерогенез [12, 13]. Предполагают также, что окислительная модификация липопротеинов в присутствии меди является одной из основных причин атеросклеротического повреждения [14]. Кроме того, было показано, что опосредованное медью окисление белка-предшественника амилоида индуцирует его фрагментацию и самоагрегацию, что может стать сигналом для запуска ней роде генеративных процессов при болезни Альцгеймера [12]. Наши результаты дополняют уже имеющиеся данные о важной роли окислительно-восстановительных реакций с участием меди в патогенезе различных заболеваний.

1. Осипов А.Н., Азизова О.А., Владимиров Ю.А. // Успехи биол. химии. 1990. Т. 31. С. 180.
2. Droge W. // Physiol Rev. 2002. Vol. 82 P. 47.
3. Семак И.В., Корик Е.О., Канапацкая И.А. и др. // Вести. БГУ. 2000. № 1. С. 47.
4. Laemmli U.K. // Nature. 1970. Vol. 227. P. 680.
5. Aebi H. // Methods in enzymology / Ed. by L. Parker. New York. 1984. P. 105.
6. Anderson D. // Drag Saf. 1990. Vol. 5. P. 27.
7. Mayo J.C., Tan D.X., Sainz R.M. et al. // Free Radic. Res. 2003. Vol. 37. № 5. P. 543.
8. Kocha T., Yamaguchi M., Ohtaki H. et al. // Biochim. Biophys. Acta. 1997. Vol. 1337. P. 319.
9. Tapiero H., Townsend D.M., Tew K. D. // Biomed. Pharmacother. 2003. Vol. 57, № 9. P. 386.
10. Uriu-Adams J.Y., Keen C L. // Mol. Aspects Med. 2005. Vol. 26. №4-5. P. 268.
11. Atwood C.S., Perry G., Zeng H. et al. // Biochemistry. 2004. Vol. 43. №2. P. 560.
12. Hiraku Y., Kawanishi S. // FEBS Lett. 1996. Vol. 393. №2-3. P.317.
13. Oikawa S., Kawanishi S. // Biochemistry. 1996. Vol. 35. № 14. P. 4584.
14. Witztum J.L., Steinberg D. // J. Clin. invest. 1991. Vol. 88. №6. p. 1785.

Поступила в редакцию 27.06.06.

Мария Викторовна Наумова - младший научный сотрудник НИЛ биохимии обмена веществ кафедры биохимии.

Игорь Викторович Семак - кандидат биологических наук, доцент, заведующий кафедрой биохимии.