

УДК 577.152.3 + 636.22
©Коллектив авторов

ГИДРОЛИЗ НУКЛЕОЗИД-5'-ТРИФОСФАТОВ В ПЕЧЕНИ И ПОЧКАХ КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ АЛЛОКСАНОВОМ ДИАБЕТЕ

И.М. Русина, А.Ф. Макаричов, Е.А. Макар, В.Л. Кубышин

Институт биохимии НАН Беларуси, Беларусь, 230009 Гродно, БЛК 50
эл. почта: val@unibel.biochem.by; тел.: 8-0152-336301; факс: 8-0152-334121

В работе впервые исследована активность и свойства растворимого фермента, осуществляющего гидролиз нуклеозид-5'-трифосфатов в печени и почках крыс в норме и при аллоксановом диабете. Установлено, что в экстрактах из печени животных опытной группы активность НТРаза снижается на 34% ($p < 0,01$); достоверной разницы в активности фермента в почках не обнаружено. Кажущаяся константа Михаэлиса НТРаза печени контрольных крыс для ИТР была достоверно ниже, чем у диабетиков ($32,3 \pm 1,3$ и $54,3 \pm 1,0$ мкМ соответственно, $p < 0,01$). Значения K_m фермента почек животных обеих групп практически не различались. НТРаза проявляет максимальную активность при pH 7,0 и характеризуется широкой субстратной специфичностью, осуществляя гидролиз различных нуклеозид-5'-три- и дифосфатов. По данным гель-хроматографии, молекулярная масса фермента равна $63,7 \pm 0,9$ кДа.

Ключевые слова: нуклеозидтрифосфатаза, аллоксановый диабет, печень, почки, крысы.

ВВЕДЕНИЕ. Знание свойств ферментов и механизмов их регуляции в тканях человека и животных представляет собой биохимическую основу для целенаправленной разработки методов коррекции отклонений метаболизма. В литературе имеются многочисленные данные о сдвигах в энергетической обеспеченности клетки в условиях сахарного диабета. При этом заметно изменяется не только концентрация АТФ, гидролиз которого служит одним из основных источников энергии, но и других нуклеозид-5'-трифосфатов, выполняющих специализированные функции в некоторых биосинтетических путях и межклеточной коммуникации [1-4]. Колебания уровней высокоэнергетических трифосфатов находятся в тесной зависимости от активности ферментов их биосинтеза [4-6]. Однако в настоящее время практически ничего не известно о ферментах катаболизма нуклеозид-5'-трифосфатов, которые также могут вносить определенный вклад в формирование энергетического статуса клетки при данной патологии. В биологических объектах гидролиз нуклеозид-5'-трифосфатов осуществляется разнородной группой ферментов, объединяемых под названием НТРаза (КФ 3.6.1.15); различные представители этой группы участвуют во многих важных энергетически зависимых процессах [7-9].

В настоящей работе нами исследованы активность и свойства растворимой НТРаза печени и почек крыс в норме и при хроническом аллоксановом диабете.

МЕТОДИКА. В работе использовали сефакрил S-200 ("Pharmacia"); алкогольдегидрогеназа, альбумин из сыворотки человека (ЧСА), α -химотрипсиноген, лактатдегидрогеназа, пируваткиназа, АТФ, УТФ, ГТФ, СТФ ("Reanal"); овальбумин, миоглобин, кумасси G-250 ("Serva"); ИТР, ХТР, dТТР, цитохром c ("Sigma"); аллоксан ("Lachema"), остальные реагенты производства ("Реахим").

ГИДРОЛИЗ НТР ПРИ ДИАБЕТЕ

Дополнительную очистку нуклеозид-5'-трифосфатов проводили методом ионообменной хроматографии на колонке с сервацелом ДЭАЭ 32 ("Reanal").

Эксперименты выполнены на белых крысах-самцах линии Вистар массой 150-200 г, содержащихся на обычном рационе вивария со свободным доступом к воде. Сахарный диабет вызывали путем однократного внутривентрального введения аллоксана в дозе 170 мг/кг натошак. Соответствующую навеску препарата растворяли в 1 мл 0,15 М цитратного буфера, pH 4,5 непосредственно перед введением животному. Развитие сахарного диабета контролировали, определяя концентрацию глюкозы в крови глюкозооксидазным методом [10] с помощью набора фирмы ("P.Z Sorbim", Польша).

Недостаточность инсулина, вызванная инъекцией аллоксана, приводила к устойчивой гипергликемии и глюкозурии в течение 112 суток у 60% экспериментальных животных. Уровень глюкозы в крови опытных крыс составлял 12,4-32,0 ммоль/л.

Начальную скорость гидролиза ИТР измеряли по образованию неорганического фосфата (P_i), количество которого регистрировали методом Sargu et al. [11]. Реакционная среда объемом 0,2 мл содержала 50 мМ трис-малеатный буфер, pH 7,0, 10 мМ $MgCl_2$, 0,05-0,5 мМ ИТР, 1 мг/мл ЧСА и исследуемый образец. Реакцию проводили при 37°C в течение 10-40 мин и останавливали, добавляя 1,5 мл реагента для определения P_i . Смесь инкубировали 25 мин при 37°C и измеряли поглощение при 318 нм. За единицу активности (Ед) принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкмоль P_i за 1 мин.

Хроматографию экстрактов осуществляли на калиброванной белками-стандартами колонке с сефакрилом S-200 (\varnothing 2,2x46) в 20 мМ трис-HCl буфере, pH 7,5, содержащем 0,1 М NaCl, при скорости потока 5 см³/ч. Молекулярную массу НТРАЗы рассчитывали по графику в координатах $\lg M_r - \lg V_e/V_0$.

Концентрацию белка определяли спектрофотометрически при 280 нм и по методу Bradford [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. На 112 сутки эксперимента крыс (по 6 животных в контрольной и опытной группах) декапитировали, печень и почки гомогенизировали в 20 мМ трис-HCl буфере, pH 7,5, содержащем 0,15 М KCl, 0,2 мМ ЭДТА, в соотношении 1:9 в стеклянном гомогенизаторе и центрифугировали при 105000 g в течение 60 мин для получения экстрактов.

Результаты определения НТРАЗной активности показаны на рисунке 1. Как видно из представленных данных, активность фермента в экстрактах из почек диабетных крыс была несколько выше по сравнению с контрольной группой (рис. 1А, соответственно $1,94 \pm 0,27$ и $1,62 \pm 0,09$ Ед/г сырой ткани), однако эти различия статистически недостоверны ($p=0,294$). Иная картина наблюдается в печени, где у животных опытной группы НТФазная активность достоверно снижалась с $3,74 \pm 0,2$ до $2,48 \pm 0,3$ Ед/г сырой ткани ($p<0,01$, рис. 1Б).

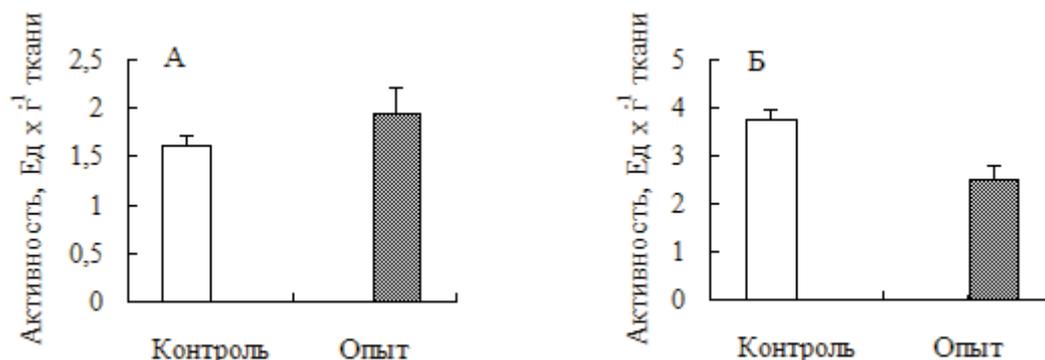


Рисунок 1.

Содержание растворимой НТРАЗы в почках (А) и печени (Б) контрольных и диабетных крыс.

Комментируя эти результаты, прежде всего, следует сказать, что развитие аллоксанового диабета сопряжено со снижением уровня нуклеозид-5'-трифосфатов в печени крысы. По данным Weber et al. [4], например, концентрации АТР, GTP, UTP и CTP у опытных животных составляли соответственно 66, 62, 54 и 63% в сравнении с контрольной группой. Аналогичная ситуация наблюдается и в некоторых других органах и тканях – хрусталике глаза, сердечной и скелетной мышцах [6, 13]; при этом изменения уровней нуклеозид-5'-трифосфатов сопряжены с пониженной активностью ферментов их биосинтеза – оротатфосфорибозил-трансферазы, уридинфосфорилазы, уридин-цитидинкиназы, урацилфосфорибозил-трансферазы, CTP-синтетазы, IMP-дегидрогеназы и др. [4, 6]. В то же время было показано, что в почках крыс на 2-14 сутки развития стрептозотоцинового диабета возрастают активности CTP-синтетазы, дигидрооротат-дегидрогеназы и уровни CTP и UTP соответственно [2, 5, 14]. Поскольку нуклеозид-5'-трифосфаты принимают участие в осуществлении ряда специализированных жизненно важных функций (UTP – в биосинтезе гликогена и гликопротеинов; GTP – в глюконеогенезе и трансляции белков; CTP – в синтезе фосфолипидов), и, кроме того, способны к перефосфорилированию с ADP, можно предположить, что снижение активности NTPазы в печени крыс является результатом включения биохимического адаптационного механизма, позволяющего клеткам печени поддерживать скорости биосинтетических процессов и, возможно, локальные концентрации АТР. С этих позиций становится понятным тот факт, что в почках диабетных животных отсутствуют видимые изменения NTPазной активности. Необходимо также отметить, что исследуемая NTPаза проявляет максимальную активность при физиологических значениях pH (pH-оптимум 7,0; данные не показаны) и обладает широкой субстратной специфичностью, осуществляя гидролиз ITP, UTP, CTP, GTP, IDP, XTP и в меньшей степени dTTP и АТР (рис. 2). По-видимому, данный фермент выполняет общую функцию в различных органах и тканях, участвуя в регуляции внутриклеточных концентраций нуклеозид-5'-трифосфатов.

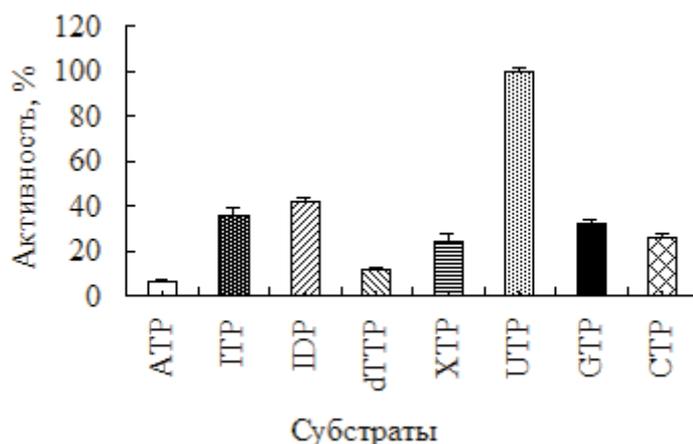


Рисунок 2.
Субстратная специфичность NTPазы из печени крысы.

Изменения активности ферментов при патологических состояниях организма могут быть обусловлены причинами различного характера. Очевидно, что если речь не идет об энзимопатиях наследственной природы (нарушение структуры фермента вследствие мутаций), основные механизмы, определяющие развитие данного феномена, включают в себя изменение количества фермента (индукция или репрессия синтеза, усиление распада) и модуляцию каталитической

ГИДРОЛИЗ NTP ПРИ ДИАБЕТЕ

активности, что может осуществляться на уровне микроокружения (обратимое ингибирование или активация) либо ковалентной модификации. Для выяснения причин, лежащих в основе снижения активности NTPазы в печени диабетических крыс, мы провели исследование кинетических свойств фермента, частично очищенного методом гель-хроматографии.

На рисунке 3 представлены хроматограммы экстрактов из ткани почек и печени контрольных крыс. Очевидно, что NTPазная активность обеих тканей главным образом обусловлена присутствием в них фермента с молекулярной массой $63,7 \pm 0,9$ кДа ($n=4$). На хроматограммах также видны небольшие пики активности, которые элюируются в свободном объеме колонки, содержащем мелкие фрагменты мембран, не осаждающиеся при скоростном центрифугировании. Кроме того, в экстракте из почек обнаруживается высокомолекулярный растворимый фермент с NTPазной активностью, вклад которого в суммарную скорость гидролиза ИТР, судя по площади пиков, составляет приблизительно 19%.

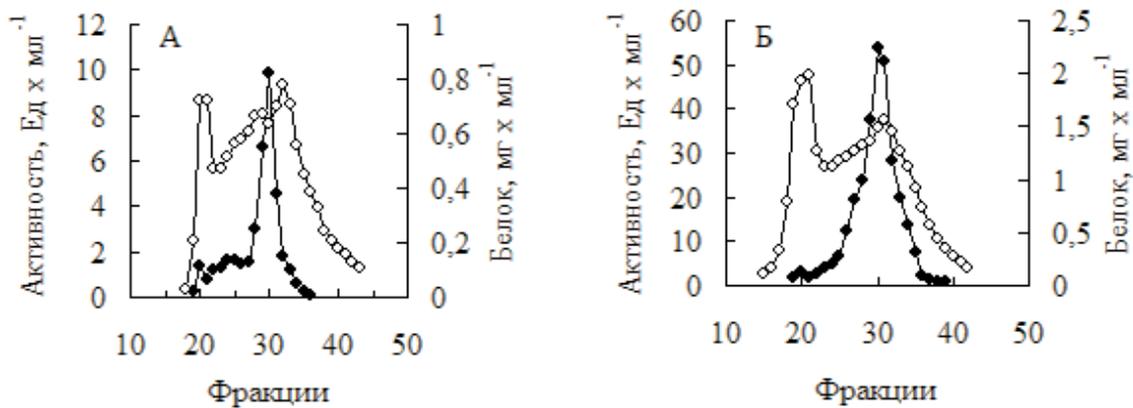


Рисунок 3.

Хроматография экстрактов из почек (А) и печени (Б) крыс на колонке с сефакрилом S-200:

● - NTPазная активность, ○ - концентрация белка.

Частично очищенная NTPаза с молекулярной массой 63,7 кДа подчинялась кинетике Михаэлиса-Ментен в диапазоне концентраций ИТР 25-250 мкМ. Существенной разницы между значениями K_M фермента из почек контрольных и опытных животных не наблюдалось (соответственно $44,1 \pm 0,3$ и $41,3 \pm 0,4$ мкМ ($n=4$)). Однако кажущаяся K_M NTPазы из печени диабетических крыс была достоверно выше ($p < 0,01$) по сравнению с ферментом из печени животных контрольной группы. На рисунке 4 в координатах Хейнса показаны графики зависимости начальной скорости реакции гидролиза ИТР, катализируемой NTPазой печени, от концентрации субстрата. Значения K_M , рассчитанные по уравнениям линейной регрессии, составляли $32,3 \pm 1,3$ и $54,3 \pm 1,6$ мкМ соответственно для контрольной и опытной групп ($n=4$). Таким образом, кинетический анализ указывает на изменение каталитических свойств NTPазы в печени диабетических крыс, что, вероятно, вызвано регуляторной ковалентной модификацией фермента и может являться одной из причин снижения его активности. На данном этапе нельзя ничего сказать о влиянии диабета на экспрессию 63,7-кДа NTPазы, так как мы, по всей видимости, имеем дело с неизвестным ранее ферментом, отчетливо отличающимся своими свойствами от уже описанных растворимых NTPаз [15-20]. В литературе отсутствуют какие-либо сведения об очистке или первичной структуре этого фермента, в связи с чем пока не представляется возможным провести исследование его экспрессии на уровне белка или мРНК.

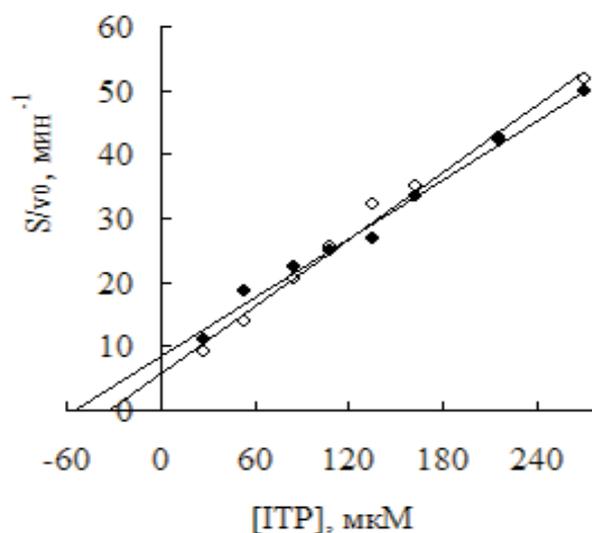


Рисунок 4.

Зависимость скорости реакции, катализируемой НТРазой печени, от концентрации ИТР:

○ - контроль, ● - диабет

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Результаты настоящей работы свидетельствуют о том, что изучены далеко не все возможные адаптационные механизмы поддержания энергетического обмена в клетках печени при сахарном диабете. Точно так же остается неясной биологическая роль ряда растворимых НТРаз [15-17], функции которых могут заключаться в участии в адаптационных механизмах клетки, направленных на поддержания гомеостаза нуклеозид-5'-трифосфатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баранов В.Г., Соколова И.М., Гаспарян Э.Г., Ярошевский Ю.А., Никитин А.И. (1983) Экспериментальный сахарный диабет. Роль в клинической диабетологии, Наука, Л.
2. Cortes P., Dumler F., Goldman J., Levin N.W. (1987) Diabetes **36**, 80-87.
3. Williams M., Jarvis M.F. (2000) Biochem. Pharmacol., **15**, 1173-1185.
4. Weber G., Lui M.S., Jayaram H.N., Pillwein K., Natsumeda Y., Faderan M.A., Reardon M.A. (1985) Adv. Enzyme Regul., **23**, 81-99.
5. Kunjara S., Sochor M., Ali M., Bennett M., Greenbaum A.L., McLean P. (1992) Biochem. Med. Metab. Biol., **47**, 168-180.
6. Gertz B.J., Haugaard E.S. (1979) Metabolism, **28**, 358-362.
7. Kim S.H., Smith J., Claude A., Lin, R.J. (1992) EMBO J., **11**, 2319-2326.
8. Donson M.S., Lehman I.R. (1993) J. Biol. Chem., **268**, 1213-1219.
9. Zimmerman H. (1996) Prog. Neurobiol., **49**, 589-618.
10. Камышников В.С. (2000) Справочник по клинико-химической лабораторной диагностике, Беларусь, Минск.
11. Sapru M.K., Geetha H., Taranath S.K. (1987) Ind. J. Biophys., **24**, 340-343.
12. Bradford M.M. (1976) Anal. Biochem., **72**, 248-254.
13. Hothersall J.S., Muirhead R.P., Taylaur C.E., Kunjara S., McLean P. (1993) Biochem. Med. Metab. Biol., **50**, 292-300.
14. Cortes P., Levin N.W., Dumler F., Rubenstein A.H., Verghese C.P., Venkatachalam K.K. (1980) Am. J. Physiol., **238**, E349-E357.
15. Lewis M., Weissman S. (1965) Arch. Biochem. Biophys., **109**, 490-498.
16. Нарыжный С.Н., Крутяков В.М. (1982) Биохимия, **47**, 569-574.

ГИДРОЛИЗ НТР ПРИ ДИАБЕТЕ

17. *Makarchikov A.F.* (2001) *J. Biochem. Mol. Biol. Biophys.*, **5**, 525-531.
18. *Brighywell R., Tappel A.L.* (1968) *Arch. Biochem. Biophys.*, **124**, 333-343.
19. *Dalhmnn N., Kirchgesser M.* (1990) *Biochem. Int.*, **20**, 317-327.
20. *Asai T., O'Sullivan J., Tatibana M.* (1983) *J. Biol. Chem.*, **258**, 6816-6822.

Поступила: 31. 01. 2005.

NUCLEOSIDE-5'-TRIPHOSPHATE HYDROLYSIS IN THE LIVER AND KIDNEY OF RATS WITH CHRONIC ALLOXAN DIABETES

I.M. Rusina, A.F. Makarchikov, E.A. Makar, V.L. Kubyshin

Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Belarus, BLK 50, Grodno 230009, Belarus; tel.: 8-0152-336301; fax: 8-0152-334121; e-mail: val@unibel.biochem.by

Activity and some properties of a soluble enzyme hydrolyzing nucleoside-5'-triphosphates were studied in the liver and kidney of normal and diabetic rats. The enzyme activity was shown to be reduced by 34% ($p < 0.01$) in the liver extracts of diabetic animals, while no difference was observed in the kidney. When ITP was used as substrate, the apparent Michaelis constant of the enzyme was significantly lower in the liver of controls as compared to experimental rats ($32.3 \pm 1.3 \mu\text{M}$ and $54.3 \pm 1.0 \mu\text{M}$, respectively, $p < 0.01$). The K_M values of the enzyme in the kidney were not distinguishable in both groups. NTPase exhibits maximal activity at pH 7.0 and has a broad substrate specificity with respect to different nucleoside-5'-tri- and diphosphates. Molecular mass of the enzyme was estimated by gel filtration to be $63.7 \pm 0.9 \text{ kD}$.

Key words: nucleoside triphosphatase, alloxan diabetes, liver, kidney, rats.