

© Н.В.Кириллова, М.М.Дебель, 2004
УДК [616.611-002-036.12:612.015.1].001.5

Н.В. Кириллова, М.М. Дебель

ОБМЕН КАТАЛАЗЫ У КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТЕ

N.V. Kirillova, M.M. Debel

CATALASE METABOLISM IN RATS WITH CHRONIC GLOMERULONEPHRITIS

Кафедра биохимии Санкт-Петербургской государственной химико-фармацевтической академии, Россия

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬЮ ИССЛЕДОВАНИЯ было изучение обмена каталазы у экспериментальных животных при хроническом гломерулонефрите. **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Работу проводили на беспородных белых крысах-самцах массой тела 140-160 г. Экспериментальную модель гломерулонефрита (нефрит Хейманна) вызывали у лабораторных животных внутримышечным введением гомогената почек здоровых крыс в полном адьюванте Фрейнда. Исследование биохимических показателей у крыс определяли через 3 недели после аутоиммунизации животных. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** В предыдущей работе нами было установлено, что при хроническом гломерулонефрите в результате окислительного стресса происходит резкое падение активности каталазы. Как показало проведенное исследование, это связано с резким угнетением скорости накопления (Ks) ферментативного белка (от 5 до 8 раз) в крови, почках и печени крыс при гломерулонефрите по сравнению с контрольными животными и приводит к достоверному снижению концентрации каталазы в этих тканях. Одновременно наблюдали, по-видимому, компенсаторное уменьшение распада (Kd) ферментативного белка и, как следствие, увеличение времени его «полужизни» ($t_{1/2}$), что в какой-то мере компенсировало дефицит новосинтезированных молекул каталазы. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** В работе было однозначно установлено, что обнаруженное ранее достоверное падение активности каталазы в крови, почках и печени крыс при развитии гломерулонефрита обусловлено резким снижением скорости его биосинтеза / накопления в этих тканях.

Ключевые слова: гломерулонефрит, антиоксидантная защитная система, активные формы кислорода (АФК), каталаза, биосинтез, распад.

ABSTRACT

THE AIM of the investigation was to study catalase metabolism in experimental animals with chronic glomerulonephritis. **MATERIAL AND METHODS.** The work was carried out in not thoroughbred male white rats with body mass 140-160 g. Experimental model of glomerulonephritis (Heimann nephritis) was induced in experimental animals by intramuscular injecting homogenate of healthy rat kidneys in Freund's adjuvant. The biochemical indices in rats were specified in three weeks after autoimmunization of the animals. **RESULTS.** It was found that chronic glomerulonephritis resulting from oxidative stress was followed by a sharp drop of catalase activity. It was shown to be due to a sharp inhibition of the rate of accumulation (Ks) of enzyme protein (from 5 to 8 times) in blood, kidneys and liver of the rats with glomerulonephritis as compared with control animals and to lead to a reliable decrease of catalase concentration in those tissues. At the same time the obviously compensatory decrease of decomposition (Kd) of the fermentative protein was observed and, as a result, a longer period of its «half-life» ($t_{1/2}$) which in certain degree compensated the deficit of newly synthesized molecules of catalase. **CONCLUSION.** It was established that the earlier found reliable drop of catalase activity in blood, kidneys and liver of rats during the development of glomerulonephritis was due to sharply decreased rate of its biosynthesis / accumulation in these tissues.

Key words: gliomerulonephritis, antioxidant defense system, active forms of oxygen, catalase, biosynthesis, decomposition.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что развитие гломерулонефрита сопровождается избыточным образованием свободных кислородных радикалов и нарушением/снижением функциональной активности антиоксидантной защитной системы (АОЗ) организма. Ранее нами было показано, что при хроническом гломерулонефрите в результате окислительного стресса происходит повышение окислительной деструкции белков, которое сопровождается резким падением активности каталазы [1]. Установленное изменение уровня активности антиоксидантных ферментов может быть вызвано различными причинами. Во-первых, инактивация ферментов может

быть вызвана избытком АФК, повышенное генерирование которых при развитии окислительного стресса доказано [2]. В то же время известно, что супероксидный радикал является сильным ингибитором каталазы [3, 4]. Во-вторых, снижение уровня каталазы может быть связано также с мутацией и окислительной деструкцией ДНК при окислительном стрессе. В частности, в настоящее время идентифицировано 47 точечных мутаций гена СОД1 [5, 6]. И, наконец, уровень активности ферментов в клетках, как известно, регулируется скоростями их биосинтеза и распада.

Целью данной работы было изучение скоростей распада и синтеза каталазы у эксперимен-

тальных животных при хроническом гломеруло-нефрите.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работу проводили на беспородных белых крысах-самцах массой тела 140-160 г из питомника РАН «Рапполово». Животные содержались в условиях вивария на стандартном рационе [7]. Все исследования проводили на гемолизированных эритроцитах и постмитохондриальном супернатанте почек и печени, предварительно отмытых от крови в охлажденном 0,9% растворе хлорида натрия. Экспериментальную модель гломерулонефрита (нефрит Хейманна) вызывали у лабораторных животных внутримышечным введением гомогената почек здоровых крыс в полном адьюванте Фрейнда [8]. Развитие заболевания у животных контролировали гистологически [1]. Исследование биохимических показателей у крыс определяли через 3 недели после аутоиммунизации животных.

3-Амино-1,2,4-триазол вводили контрольной группе животных внутрибрюшинно из расчета 1 грамм на 1 кг веса животного, опытной группе животных 3-амино-1,2,4-триазол вводили в той же дозе через 3 недели после развития экспериментального гломерулонефрита. Активность каталазы крови, печени и почек крыс определяли по методике [9], у опытных животных в интервале от 2-х до 144-х час после инъекции 3-амино-1,2,3-триазола. Скорость биосинтеза каталазы и время ее функционирования рассчитывали по методу [10, 11].

Полученные данные были обработаны статистически. Определение достоверности сравниваемых средних величин производили по критерию Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для определения скорости распада каталазы нами был использован ранее предложенный метод Прайса и соавторов [12], основанный на свойстве 3-амино-1,2,3-триазола ингибировать присутствующий в клетках фермент, не оказывая влияния на его биосинтез *de novo*. Предположив, что каталаза синтезируется с постоянной скоростью и в единицу времени разрушается постоянное количество активной каталазы, авторы вывели уравнение для расчета констант биосинтеза (K_s) и разрушения (K_d) каталазы, доказав его применимость для изучения влияния различных внешних факторов на синтез данного фермента:

$$dC / dt = K_s - K_d \cdot C,$$

если $C=0$, при $t=0$,

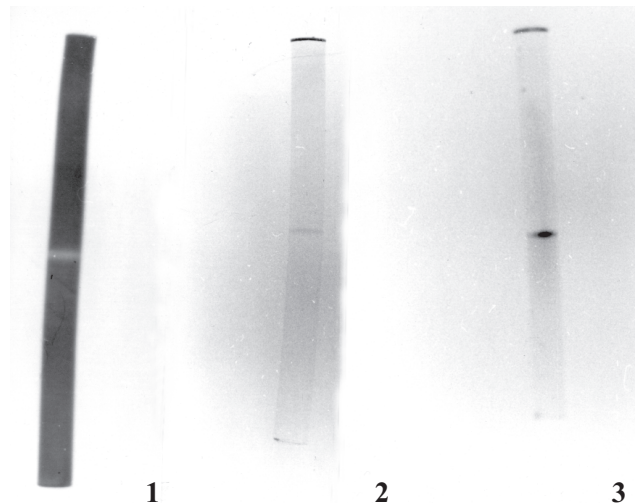


Рисунок 1. Диск-электрофорез каталазы в ПААГ (1, 2) и ПААГ с DS-Na (3). 1 – специфическое окрашивание фермента, 2, 3 – окраска белка кумасси голубым R-250.

то $C_t = K_s / K_d \cdot (1 - e^{-K_d t})$, где:

C_t – активность каталазы во времени t после введения 3-амино – 1,2,3-триазола,

K_s – константа скорости синтеза,

K_d – константа скорости разрушения каталазы (рассчитывают графически).

При постоянном уровне каталазы в печени (C_N) в единицу времени синтезируется и разлагается равное количество молекул каталазы фермента. Следовательно, если известно K_d , K_s , можно легко рассчитать из уравнения: $K_s = K_d \cdot C_N$. Прайс и соавторы показали, что если отложить на оси абсцисс отрезки, соответствующие времени после введения 3-амино – 1,2,3-триазола, а по оси ординат – отрезки, соответствующие константе разрушения каталазы, активность выразится прямой, тангенс угла наклона которой соответствует константе распада каталазы (K_d).

Для расчета скорости синтеза каталазы *in vivo* необходимо было определить, какой массе каталазы соответствует определяемая ферментативная активность. Было установлено, что 1 мг белка электрофоретически гомогенной каталазы (рис. 1), выделенной по методу [12], разлагает 0,915 ммоль H_2O_2 за 1 минуту.

Согласно данным литературы, некоторые авторы считают, что процессы деградации/распада белка могут быть в числе определяющих факторов его биосинтеза. Параметры, характеризующие процессы обмена каталазного белка, находили по экспериментально полученным кривым восстановления активности каталазы *in vivo* (рис. 2, 3), из которых и были рассчитаны константы распада ферментативного белка (K_d).

Как видно из представленных данных (табли-

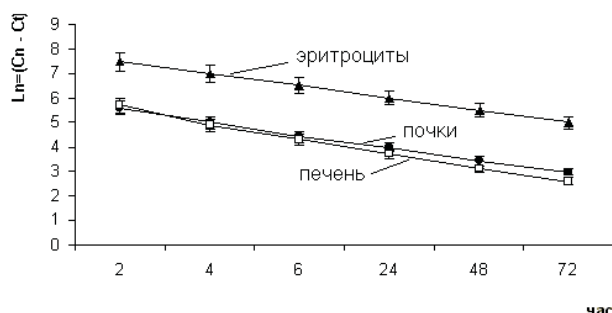


Рис. 2. Кинетика восстановления активности каталазы (контроль). По оси абсцисс — время после введения 3-амино, 1,2,3-триазола; по оси ординат — $\ln(C_n - C_t)$, где C_n — исходный уровень активности каталазы в клетках; C_t — уровень активности каталазы через отрезок времени t после введения 3-амино — 1,2,3-триазола.

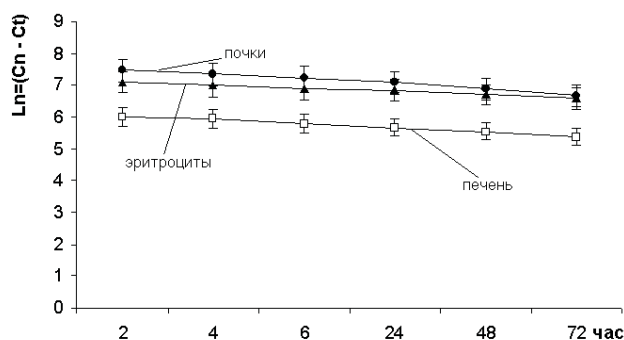


Рис. 3. Кинетика восстановления активности каталазы in vivo (опыт). Обозначения см. подписи к рис. 2.

ца), время функционирования белка каталазы печени, почек и эритроцитов было сравнительно одинаковым и составляло, соответственно, 30,66, 31,07 и 32,23 ч⁻¹. В то же время скорость синтеза/накопления каталазы в эритроцитах была максимальной — 92,44 и превышала в 3,4 раза и почти в 5 раз скорость синтеза/накопления ферментативного белка в печени и почках крыс контрольной группы. При экспериментальном гломерулонефрите у крыс наблюдали резкое снижение от 5 до 8 раз скорость синтеза/накопления белка каталазы, что и приводит к такому же резкому падению содержания ферментативного белка во всех исследуемых клетках тканей. Время функционирования ($t_{1/2}$) каталазы исследуемых органов и тканей у животных опытной группы, наоборот, повышалось в 2–3 раза по сравнению с контрольными значениями на

Параметры обмена каталазы эритроцитов, почек и печени крыс при гломерулонефрите

Идесксы	Kd, сут ⁻¹	t _{1/2} , час	Ks, мкг/час	E, мкмоль/мл
эритроциты				
Контроль	0,516	32,23	92,44	4299,60
Опыт	0,194	85,56	15,71	1939,9
почки				
Контроль	0,535	31,07	19,06	855,85
Опыт	0,214	77,87	3,99	447,16
печень				
Контроль	0,542	30,66	27,14	1200,70
Опыт	0,160	103,90	3,22	480,22

фоне резкого снижения скорости спонтанного распада ферментативного белка.

ОБСУЖДЕНИЕ

Каталаза, как и все антиоксидантные ферменты, является индуцибельным ферментом и ее содержание в клетках регулируется в зависимости от метаболических потребностей организма. Концентрация каталазы у аэробов тесно связана с метаболизмом кислорода, радикалы которого являются одним из важнейших регуляторов биосинтеза фермента. При развитии окислительного стресса, как известно, происходит усиление генерации АФК, являющееся частью каскадного сигнала, приводящего к включению адаптационных процессов в клетках, в том числе и изменению скорости биосинтеза антиоксидантных ферментов. [13, 14].

Ранее, при исследовании кругооборота каталазы, некоторые авторы пришли к выводу, что процессы распада ферментативного белка могут являться или являются в числе определяющих факторов его биогенеза. Так, установлено, что замедление процессов распада ферментативного белка может приводить к увеличению его активности в тканях и в итоге — к кажущемуся ускорению его биосинтеза [15–17].

В данном исследовании скорость распада (K_d) каталазы крови, печени и почек крыс контрольных и опытных групп были рассчитаны по методике [12]. Результаты экспериментов представлены на рис. 2 и 3 и в таблице. Полученные параметры обмена каталазы в эритроцитах, почках и печени экспериментальных животных коррелируют с полученными ранее константами кругооборота каталазы из различных источников [12, 18–20]. Так, константы распада ферментативного белка (K_d) имели следующие значения — 0,516 (эритроциты), 0,535 (почки) и 0,542 (печень) сут⁻¹ и константы скорости биосинтеза/накопления — 92,44 (эритроциты), 19,06 (почки) и 27,14 (печень) мкг за 1 час.

При оценке состояния каталазы в крови, печени и почках опытной группы животных мы наблюдали достоверное, почти в 2 раза, падение активности фермента по отношению к контрольному уровню [1]. Как показали данные по обмену каталазы, это связано с резким угнетением скорости накопления (K_s) ферментативного белка (от 5 до 8 раз) в крови, почках и печени крыс при гломерулонефрите по сравнению с контрольными животными. Последнее и приводит к достоверному снижению концентрации каталазы в этих тканях. Одновременно наблюдали, по-видимому,

компенсаторное уменьшение распада (K_d) ферментативного белка и, как следствие, увеличение времени его «полужизни» ($t_{1/2}$), что в какой-то мере компенсировало дефицит новосинтезированных молекул каталазы. В то же время необходимо отметить, что падение скорости распада ферментативного белка может происходить и за счет снижения способности протеиназ разрушать модифицированные окислением белки. В свою очередь, это может быть связано с изменением количества как самих протеиназ, так накоплением метаболитов – ингибиторов данных ферментов [21].

Интересно отметить, что изменение параметров обмена каталазы характерно не только для почек и эритроцитов, но и печени опытной группы животных. Подобное дистантное воздействие патологического процесса было получено ранее В.П. Комовым и соавт. [22], которые наблюдали подавление биосинтеза фермента в печени крыс, обусловленное воздействием опухоли (лимфосаркомы Плисса). При этом дефицит каталазы при дистантном воздействии опухоли компенсировался пролонгированием времени функционирования фермента ($t_{1/2}$). В работе П.Х. Копылова [18] было также установлено, что изменение скорости образования активной каталазы при дистантном воздействии растущей лимфосаркомы Плисса обусловлено как частичным снижением скорости рибосомального синтеза, так и трансформацией посттрансляционных процессов, транспорта интермедиатов и сборки макромолекул фермента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в нашей работе было однозначно установлено, что обнаруженное ранее достоверное падение активности каталазы в крови, почках и печени крыс [1] при развитии гломерулонефрита обусловлено резким снижением скорости его биосинтеза / накопления в этих тканях. Снижение концентрации каталазы в клетках усугубляет патологические процессы и поражение тканей при развитии гломерулонефрита.

Таким образом, настоящее исследование подтверждает необходимость дальнейшего изучения вторичных патогенетических факторов в развитии гломерулонефрита.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Альдебель ММ, Кириллова НВ. Окислительное по-

вреждение белков при экспериментальном гломерулонефрите. *Нефрология* 2003; 6 (2): 73-76

2. Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause, or consequence. *Lancet* 1994; 344: 721-724

3. Fridovich I. Superoxide radical and Superoxide dismutase. *Annu Rev Biochem* 1995; 64: 97-112

4. Escobar JA, Rubio MA, Lissi EA. SOD and catalase inactivation by singlet oxygen and peroxy radicals. *Free Radical Biol Med* 1996; 20 (3): 285-290

5. Fridovich I. Superoxide dismutase anion radical, superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem* 1997; 272: 18515-18517

6. Wallace SS. *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. In: Scandalios JG ed. CSHL Press, 1997; 49-90

7. Западнюк ИП, Западнюк ВИ, Захария УА, Западнюк БВ. *Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте*. Вища школа, Киев, 1983; 383

8. Альбини Б. *Иммунопатология почки*. Медицина, М., 1983; 116-259

9. Butler E. *Red cell metabolism*. New York; London, 1975; 198

10. Chiga M, Redy J, Svoboda D. Degradation kinetics of liver catalase in rats treated with ethyl- α -p-chlorophenoxyisobutirate. *Lab Invest* 1971; 25: 49-52

11. Schimke RT, Bradly MO. Properties of protein turnover in animal cells and a possible role for turnover in quality control of proteins. *Proteinases and biological control*. In: Reich E, Rifkin DE, Shaw E, eds. Gold Spring Harbor Lab., 1975; 2: 515-530

12. Price VE, Sterling WR, Tarantola VA, Rechcingle MJ. The kinetics of catalase synthesis and destruction in vivo. *J Biol Chem* 1962; 237: 3468 – 3476

13. Смирнова ГВ, Музыка НГ, Глуховенко МН, Октябрьский ОН. Устойчивость к окислительному стрессу у штаммов *E. coli*, дефицитных по синтезу глутатиона. *Биохимия* 1999; 64 (10): 1318-1324

14. Fridovich I. Biological effects of the superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* 1986; 247: 1-11

15. Arias IM, Dogle D, Schimke RT. Studies on the synthesis and degradation of the endoplasmic reticulum of rat liver. *J Biol Chem* 1969; 244 (12): 3303-3315

16. Jones GL, Msters CJ. On the turnover and proteolysis of catalase in tissue of the guinea pig and acatalasemic mice. *Acta Biochem Biophys* 1976; 173: 463-489

17. Loewen PC. *Molecular Biology of free radical scavenging systems*. Laboratory Press Cold Spring Harbor, New-York, 1992; 97-115

18. Копылов ПХ. Изучение биосинтеза и посттрансляционного созревания отдельных молекулярных форм каталазы печени крыс в норме и при некоторых экстремальных воздействиях на организм. *Дисс. канд. наук. ЛХФИ, Л.*, 1983; 175 с.

19. Nakamura A, Minakami S. Turnover of hepatic catalase modified by aminotriazole. *J Biochem* 1973; 74(4): 683-689

20. Poole B, Leighton F, de Duve Ch. The synthesis and turnover of rat liver peroxisomes. *J Cell Biol* 1969; 41: 536-546

21. Carney JM, Starke-Reed PE, Oliver CN et al. Reversal of age-related changes in brain protein oxidation, decrease in enzymatic activity, and loss in temporal and spatial memory by chronic administration of the spin trapping compound N-tret-butyl- α -phenylnitrone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 3633-3636

22. Комов ВП, Рахманина ТФ. Синтез каталазы печени крыс при опухолевом росте. *Вопр онкологии* 1974; 20 (11): 48-50

Поступила в редакцию 22.04.2004 г.