

УДК 577.152.193

## ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ФЕРМЕНТА ГЛУТАТИОНПЕРОКСИДАЗЫ ТИПА I И ЕГО КОМПЛЕКСОВ С ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТАМИ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫХ АГЕНТОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

И.С. Панина, Л.Ю. Филатова\*, А.В. Кабанов, Н.Л. Клячко

(кафедра химической энзимологии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, \*e-mail: luboff.filatova@gmail.com)

Проведено исследование кинетики термоинактивации глутатионпероксидазы типа I – фермента, играющего ключевую роль в системе антиоксидантной защиты организма. Показано, что при температуре 37°C олигомерная глутатионпероксидаза инактивируется по мономолекулярному механизму. Предложен эффективный способ стабилизации фермента при помощи полиэлектролитов разной природы.

**Ключевые слова:** активные формы кислорода, глутатионпероксидаза, полиэлектролит, кинетика инактивации, стабилизация.

Окислительные процессы, протекающие в организме с участием активных форм кислорода (АФК), привлекают в последние годы все возрастающий интерес ученых. АФК – это высоко реакционно-способные химические частицы, такие как содержащие кислород свободные радикалы ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $HO_2^{\cdot}$ ,  $HO^{\cdot}$ ,  $NO^{\cdot}$ ,  $ROO^{\cdot}$ ) и молекулы, способные легко продуцировать свободные радикалы ( $H_2O_2$ ,  $ROOH$ ,  $ROOR$ ). АФК повреждают многие биомолекулы за счет неспецифического окисления и инициирования цепных реакций. Избыточная активация реакций свободнорадикального окисления встречается при самых различных заболеваниях (атеросклероз, болезни Паркинсона и Альцгеймера, диабет, катаракта, онкологические заболевания, преждевременное старение) [1].

В защите от АФК в организме участвуют ферментные системы и низкомолекулярные соединения. Низкомолекулярные антиоксиданты окисляются активными формами кислорода, но они не предотвращают образование АФК, а лишь борются с негативными последствиями [2].

Более эффективной является ферментативная система антиоксидантной защиты организма. Супер-оксиддисмутаза, каталаза и глутатионпероксидаза – важнейшие антиоксидантные ферменты, необходимые для нормальной жизнедеятельности организмов млекопитающих [3–7]. Глутатионпероксидаза катализирует процесс разложения пероксида водорода и органических перекисей с одновременным окислением глутатиона, что и придает этому ферменту первооче-

редное значение в антиоксидантной защите организма [8, 9].

В связи с этим актуальной становится разработка методик получения высокоэффективных и стабильных антиоксидантных препаратов на основе глутатионпероксидазы для лечения и профилактики заболеваний центральной нервной системы и других опасных поражений организма. Цель настоящей работы – разработка методик получения стабильных препаратов на основе фермента глутатионпероксидазы I.

### Материалы и методы

**Материалы.** Для измерения активности глутатионпероксидазы использовали препарат фермента из эритроцитов быка (лиофилизированный порошок, активность 713 ед./мг белка), глутатионредуктазу (ГР) из пекарских дрожжей (суспензия в 3,6 М  $(NH_4)_2SO_4$  (рН 7,0), содержащая 0,1 мМ дитиотрейтола), восстановленный глутатион (GSH) и никотинамид аденин динуклеотид фосфат (НАДФН), все фирмы «Sigma», перекись водорода фирмы «Chemapol». Для приготовления буферного раствора, в котором проводили измерение активности, использовали этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА), дигидрофосфат калия, гидроксид калия фирмы «Sigma-Aldrich», соляную кислоту фирмы «Реахим».

В качестве добавок к глутатионпероксидазе выбрали следующие полимеры: блок-сополимер полиэтиленгликоля с полилизинном (молекулярная масса

9,9 кДа, 30 первичных аминогрупп, ПЛ-ПЭГ) и блок-сополимер полиэтиленгликоля с полиэтиленимином (молекулярная масса 12,6 кДа, 48 первичных аминогрупп, ПЭИ-ПЭГ) фирмы «Alamanda Polymers» (США); полиакриловые кислоты (молекулярной массой 5,1 и 240 кДа, ПАК) фирмы «Aldrich».

Реактивы, используемые для проведения электрофореза: акриламид и N,N'-метилден-бисакриламид фирмы «Диа М» (Россия); тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД) и персульфат аммония фирмы «Helicon» (Россия); Трис, глицин, додецилсульфат натрия и бриллиантовый синий фирмы «Sigma».

### Методы

**Измерение активности глутатионпероксидазы.** Активность препарата глутатионпероксидазы определяли спектрофотометрически по убыли поглощения окисленной формы никотинамид аденин динуклеотид фосфата при длине волны 340 нм по методу [10].

В кварцевую кювету вносили 1 мл калий-фосфатного буфера (0,5 М  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  с рН 7,0, содержащий 0,5 мМ ЭДТА), 10 мкл 0,0084 М НАДФН, 10 мкл 0,15 М Г-SH, 3 мкл глутатионредуктазы (2,2 мг/мл), 1,5 мкл 0,136 М  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Реакцию инициировали добавлением 5–8 мкл раствора глутатионпероксидазы (0,3 и 1 мг/мл) и регистрировали изменение оптической плотности при длине волны  $\lambda = 340$  нм и 37°C.

Измерение точной концентрации исходных растворов перекиси водорода проводили спектрофотометрически при длине волны 240 нм (коэффициент молярной экстинкции  $\epsilon_{240}$  принимали равным  $46,3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Полученные результаты обсчитывали методом линейной регрессии с помощью программы Microsoft Excel.

**Исследование стабильности глутатионпероксидазы** при 37°C проводили спектрофотометрическим методом, путем отбора аликвот через фиксированные промежутки времени с последующим измерением активности в стандартных условиях.

**Нативный электрофорез препаратов глутатионпероксидазы** проводили по методике Bio-Rad [11].

**Получение препаратов глутатионпероксидазы, содержащих полиэлектролиты и блок-сополимеры.** Полиэлектролиты (блок-сополимер полилизина и полиэтиленгликоля, блок-сополимер полиэтиленимином и полиэтиленгликоля, полиакриловые кислоты) растворяли в 0,02 М калий-фосфатном буфере (КФБ) с рН 7,0.

К растворам фермента (0,6 и 2,0 мг/мл) в этом же буфере, добавляли равные объемы растворов полиэлектролитов в 1-, 10- и 100-кратном молярном из-

бытке. Полученные растворы оставляли на разные промежутки времени (1, 12 ч или 1 сут) при температуре 4°C для образования комплексов.

**Исследование активности и стабильности препаратов глутатионпероксидазы с полиэлектролитами и блок-сополимерами.** Активность и стабильность препаратов глутатионпероксидазы с полиэлектролитами и блок-сополимерами определяли спектрофотометрически, по описанным выше методикам, сравнивая полученные значения со значениями для фермента без добавок.

**Исследование образцов глутатионпероксидазы методом динамического рассеяния света.** За изменением размера частиц глутатионпероксидазы в процессе инкубации при 37°C следили при помощи анализатора размеров частиц «Zetasizer Nano». Для этого растворы фермента (концентрацией 0,3 и 1,0 мг/мл) в калий-фосфатном буфере (0,02 М  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , рН 7,0) пропускали через фильтры «Millipore» с диаметром пор 0,22 мкм с последующим термостатированием при 37°C и измерением размеров частиц через определенные промежутки времени. Аналогичным образом проводили измерение размеров частиц глутатионпероксидазы в смесях с полимерами.

### Результаты и их обсуждение

Нестабильность ферментов при повышенных температурах – один из факторов, препятствующих применению этих активных биокатализаторов. Среди множества факторов, влияющих на активность и стабильность ферментов, можно выделить такие, как специфические свойства самого фермента, рН среды и состав буферного раствора, температура и давление, присутствие активаторов или ингибиторов (в том числе и катионов некоторых металлов). Рассмотрим более подробно влияние некоторых из перечисленных факторов на стабильность глутатионпероксидазы типа I.

Глутатионпероксидаза представляет собой тетрамер, состоящий из четырех нековалентно связанных идентичных субъединиц [12, 13]. Мономер представляет собой полипептидную цепь, состоящую из 178 аминокислотных остатков и содержащую остаток селеноцистеина, который принимает участие в катализе [12]. Из литературных данных известно, что значение рН, оптимальное для функционирования глутатионпероксидазы I, равно 7,0 [8]. Именно при этом значении рН были исследованы кинетические закономерности инактивации фермента, которые в литературе не описаны.

Кривые инактивации глутатионпероксидазы в полулогарифмических координатах приведены на рис. 1,

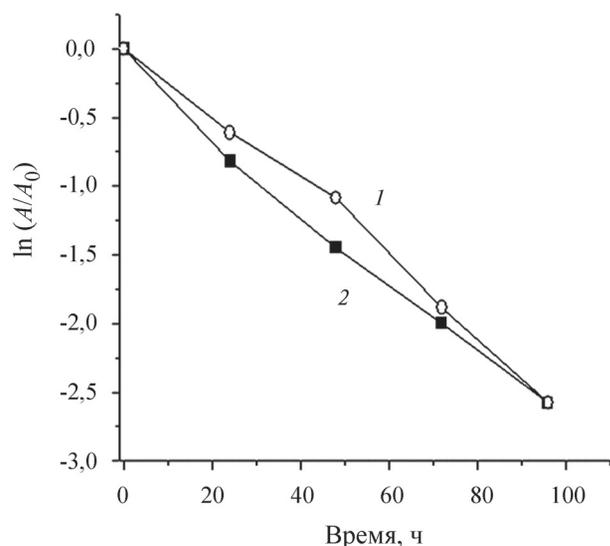


Рис. 1. Термоинактивация глутатионпероксидазы при концентрации фермента, мг/мл: 1 – 0,3; 2 – 1 (37°C; 0,02 М КФБ; pH 7,0)

из которого видно, что инактивация фермента протекает по первому порядку с константой инактивации, равной  $0,027 \pm 0,002 \text{ ч}^{-1}$ .

Для более детального понимания процесса инактивации глутатионпероксидазы растворы фермента с разной степенью инактивации были исследованы физико-химическими методами нативного электрофореза и динамического рассеяния света, а также добавлением низкомолекулярного агента. Методом нативного электрофореза показано, что молекулярная масса фермента в процессе инактивации не изменяется. Величина эффективного гидродинамического радиуса неинaktivированной глутатионпероксидазы при концентрации фермента 0,3 и 1,0 мг/мл составляет величину порядка 4 нм, в процессе инактивации при 37°C существенного изменения размеров частиц не происходит. Таким образом, исходя из вышеприведенных данных, можно сделать вывод о том, что процессы агрегации/диссоциации не являются причиной инактивации глутатионпероксидазы.

В литературе [14] показано, что взаимодействие между Sec35 и Cys91 приводит к необратимой инактивации фермента. Для проверки данной гипотезы растворы фермента инкубировали в присутствии ДТТ при 37°C и pH 7,0. Добавление в раствор глутатионпероксидазы ДТТ до конечной концентрации 10 мМ с последующим инкубированием при комнатной температуре в течение 10 мин не вызывает изменения активности фермента в пределах погрешности эксперимента. Однако через 1 сут инкубирования при 37°C остаточная активность фермента в присутствии ДТТ равна нулю, в то время как фермент без

ДТТ сохраняет порядка 50% активности. Следовательно, образование мостика –S–Se– может являться одной из возможных причин инактивации глутатионпероксидазы.

Таким образом, возможными причинами инактивации глутатионпероксидазы в физиологических условиях являются конформационные изменения молекулы фермента и окисление селеноцистеина активного центра, соответствующие кинетике первого порядка.

Известно, что добавление полиэлектролитов является хорошим способом подавления как окисления ответственных за катализ групп, так и конформационных изменений белковых глобул.

В качестве полиэлектролитов были использованы полиакриловые кислоты массой 5,1 и 240 кДа, блок-сополимер полилизина и полиэтиленгликоля массой 9,9 кДа и блок-сополимер полиэтиленimina и полиэтиленгликоля массой 12,6 кДа, содержащий 48 первичных аминогрупп на одну молекулу.

Известно, что на поверхностях белковых глобул имеются положительно и отрицательно заряженные участки, с которыми и могут взаимодействовать молекулы положительно и отрицательно заряженных полимеров. Количественной мерой процесса инактивации глутатионпероксидазы в присутствии полиэлектролитов было принято значение константы инактивации, которое сравнивали с соответствующими величинами для индивидуального фермента при прочих равных условиях.

Установлено, что в присутствии 1-, 10- и 100-кратных избытков указанных выше полимеров инактивация фермента протекает по первому порядку. Величины констант инактивации первого порядка индивидуальной глутатионпероксидазы и фермента в присутствии полиэлектролитов приведены в таблице, где показано, что значения констант инактивации при молярном соотношении ПЛ-ПЭГ:фермент, равном 1:1 и молярных соотношениях ПЭИ-ПЭГ:фермент в интервале 1:1–1:10 фактически эквивалентны величине этого параметра для индивидуальной глутатионпероксидазы. Значения констант инактивации существенно возрастают с увеличением мольных соотношений ПЛ-ПЭГ:фермент до 10:1–100:1, а ПЭИ-ПЭГ:фермент до 100:1.

Отрицательно заряженные группы аспарагиновой и глутаминовой кислот молекулы фермента и отрицательно заряженные группы фрагментов полилизина и полиэтиленimina молекул блок-сополимеров взаимно притягиваются, что приводит

**Количественные параметры инактивации  
глутатионпероксидазы в присутствии полимеров при  
37°C и pH 7,0**

Полиэлектролит	Полиэлектролит: фермент, моль/моль	Коэффициент инактивации, ч <sup>-1</sup>
ПЭИ-ПЭГ (12,6 кДа)	1	0,021±0,006
	10	0,052±0,016
	100	0,053±0,015
ПЛ-ПЭГ (9,9 кДа)	1	0,023±0,003
	10	0,025±0,002
	100	0,037±0,005
ПАК (5,1 кДа)	1	0,022±0,002
	10	0,022±0,001
	100	0,021±0,001
ПАК (240 кДа)	1	0,027±0,001
	10	0,079±0,001
Фермент	0	0,027±0,002

к образованию фермент-полиэлектролитных комплексов. Незаряженные фрагменты полиэтиленгликоля покрывают образующиеся частицы и нивелируют токсическое действие фрагментов полилизина и полиэтиленimina. По-видимому, именно катионные фрагменты блок-сополимеров оказывают денатурирующее действие на фермент, что проявляется в возрастании значений констант инактивации при высоких мольных соотношениях полимер/фермент.

Отрицательно заряженная полиакриловая кислота массой 5,1 кДа в отличие от положительно заряженных блок-сополимеров оказывает стабилизирующее действие на глутатионпероксидазу: наблюдается снижение значения константы инактивации первого порядка с 0,027 ч<sup>-1</sup> до приблизительно 0,022 ч<sup>-1</sup>. Величина константы инактивации фермента в присутствии полиакриловой кислоты понижается приблизительно на 20% и не зависит от мольного соотношения полимер:фермент в диапазоне от 1:1 до 100:1. В присутствии полиакриловой кислоты существенно более высокой молекулярной массы (240 кДа) происходит дестабилизация фермента, что проявляется в увеличении среднего значения константы инактивации первого порядка в 3 раза.

На начальную активность глутатионпероксидазы блок-сополимер полилизина и полиэтиленгликоля практически не влияет при мольных соотношениях полимера и фермента, не превышающих 100:1 (рис. 2). При увеличении молярного соотношения

ПЭИ-ПЭГ:фермент от 1:1 до 10:1 не наблюдается потери ферментом активности, при молярном соотношении 100:1 глутатионпероксидаза сохраняет около 60% своей первоначальной активности.

Что касается влияния полиакриловых кислот на активность глутатионпероксидазы, то при мольных соотношениях ПАК<sub>5,1 кДа</sub>:фермент от 1:1 до 100:1 глутатионпероксидаза сохраняет 80–100% началь-

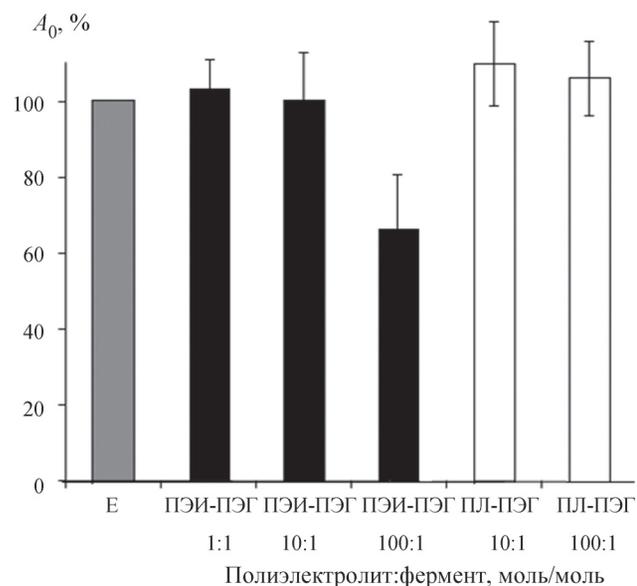


Рис. 2. Влияние блок сополимеров ПЛ-ПЭГ и ПЭИ-ПЭГ на активность фермента при pH 7,0 и 37°C

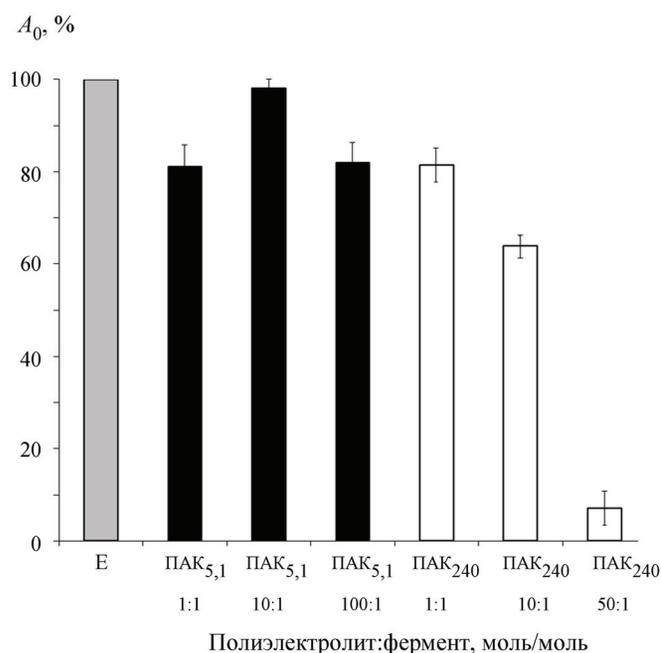


Рис. 3. Влияние полиакриловых кислот на активность фермента при pH 7,0 и 37°C

ной активности. При увеличении мольного соотношения ПАК<sub>240 кДа</sub>:фермент от 1:1 до 50:1 происходит снижение активности глутатионпероксидазы от 80 до 5% от начальной активности фермента (рис. 3).

Методом динамического светорассеяния показано, что значение эффективного гидродинамического радиуса ( $R_h$ ) для молекулы глутатионпероксидазы составляет величину порядка 4 нм, для полиэлектролитов величина  $R_h$  эквивалентна 2–4 нм. В условиях, когда наблюдается стабилизационный эффект (при взаимодействии ГП с полиакриловыми кислотами), происходит укрупнение частиц до значения эффективного гидродинамического радиуса порядка 50 нм, что свидетельствует о возможном достижении стабилизационного эффекта за счет комплексообразования.

Таким образом, выдвинуто предположение, что инактивация глутатионпероксидазы при 37°C протекает за счет окисления селеноцистеина и конформационных изменений в молекуле.

Исследовано влияние на стабильность глутатионпероксидазы полимеров катионной и анионной природы (блок-сополимеров полилизина и полиэтиленгликоля а также полиэтиленимина и полиэтиленгликоля, полиакриловых кислот с разной молекулярной массой (5,1 и 240 кДа). Обнаружен стабилизационный эффект полиакриловой кислоты массой 5,1 кДа.

Подобраны условия, при которых полиакриловая кислота оказывает максимальное стабилизирующее действие (без потери активности) на глутатионпероксидазу за счет формирования комплексов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sies H., Helmut M. // Exper. phys. 1997. **82**. P. 291.
2. Скулачев В.П. // Сорос. Образов. Жур. 1996. **3**. С. 4.
3. Mills G. // Arch. of Biochem. Biophys. 1960. **86**. P. 1.
4. Nagababu E., Chrest F., Rifkind J. // Biochim. Biophys. Acta. 2003. **25**. С. 1.
5. Rotruck J., Pope A. // Science. 1973. **179**. P. 588.
6. Flohe R. // Free Rad. Biol. Med. 1999. **27**. P. 951.
7. Arthur J. // CMLS Cell. Mol. Life Sci. 2000. **57**. P. 1825.
8. Оковитый С.В. // ФАРМинд.-практ. 2003. **5**. С. 85.
9. Muller F., Lustgarten M., Jang Y. // Free Radic. Biol. Med. 2007. **43**. P. 477.
10. Koller L., South P., Exon J., Whitbeck G. // Can. J. Comp. Med. 1984. **48**. P. 431.
11. Ячейка для электрофореза Mini-PROTEAN® Tetra. Инструкция по эксплуатации», С. 14.
12. Miwa S., Nakashima K., Ariyoshi E. // J. Haem. 1. 1975. **29**. P. 157.
13. Toppo S., Flohe L., Ursini F. // Biochem. et biophys. Acta. 2009. 1790. P. 1486.
14. Asahi M., Fujii J., Takao T. // J. Biol. Chem. 1997. **272**. P. 19152.

Поступила в редакцию 30.01.13

## INVESTIGATION OF PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF BOTH GLUTATHIONE EROXIDASE I AND ITS COMPLEXES WITH POLYELECTROLYTES AS PROMISING AGENTS FOR THE TREATMENT OF CENTRAL NERVOUS SYSTEM DISEASES

I.S. Panina, L.Y. Filatova\*, A.V. Kabanov, N.L. Klyachko

(M.V. Lomonosov Moscow State University, Chemistry department, Division of chemical enzymology, \*e-mail: luboff.filatova@gmail.com)

**A study of kinetics of thermal inactivation of glutathione peroxidase I was carried out. Glutathione peroxidase is an enzyme that plays a key role in the antioxidant protection system of the body. It was shown that oligomeric glutathione peroxidase I is inactivated by monomolecular mechanism (37°C, pH 7.0, the enzyme concentrations of 0.3 and 1 mg/ml). An effective way to stabilize the enzyme by polyelectrolytes of different nature was proposed.**

**Key words:** active forms of oxygen, glutathione peroxidase I, polyelectrolyte, kinetic of inactivation, stabilization.

**Сведения об авторах:** Панина Ирина Сергеевна – студентка кафедры химической энзимологии химического факультета (irinaspanina@gmail.com); Филатова Любовь Юрьевна – науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (luboff.filatova@gmail.com); Кabanov Александр Викторович – зав. лабораторией кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, директор Центра нанотехнологий и доставки лекарств Университета Северной Каролины (США), докт. хим. наук (skabanov@me.com); Клячко Наталья Львовна – профессор кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, докт. хим. наук (nlklyachko@gmail.com).