

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗЫ КАК МАРКЕРА ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Смирнова Е.Ю., Шевцова А.О.

Научный руководитель – профессор Титова Н.М., доцент Барон А.В.

*Сибирский федеральный университет
Гематологический центр*

При постоянном контакте человека с окружающей средой во внутреннюю среду организма часто попадают вещества, которые сами или продукты их биотрансформации могут проявлять как позитивные, так и негативные эффекты. Для токсикологических исследований используется комплекс методов, позволяющих оценить их цитотоксичность и влияние на метаболические процессы в тканях. Одним из важнейших токсикологических показателей является состояние антиоксидантной защитной системы, включающее оценку продукции активных форм кислорода (АФК), содержания продуктов перекисного окисления липидов и активности антиоксидантных ферментов.

Одним из распространенных ферментов, используемых для оценки токсичности, является глутатион-S-трансфераза. Все GST – гомо- или гетеродимеры с молекулярной массой 57 кДа. В каждой субъединице имеется по одному независимому активному центру, в гетеродимере субъединицы сохраняют свои основные физические и каталитические свойства, характерные для каждой из них. Глутатионтрансферазы обнаружены практически во всех животных клетках, в основном, в их цитозоле, но в незначительном количестве и в субклеточных фракциях – микросомах и митохондриях, которые, вероятно, более защищены от проникновения ксенобиотиков и менее нуждаются в этом ферменте. GST обнаружены в ядре клетки.

GST катализируют огромное множество реакций. GST обезвреживает органические соединения почти всех классов: алкены, арены, аралкены, галогеновые и различные кислородные соединения, производные серы, азота и фосфора (реакции первого, второго, а также третьего типов). Эти соединения представляют собой различные токсические вещества, канцерогены, мутагены, цитостатики, пестициды, лаки, краски.

GST высокоспецифичны к GSH, но не специфичны ко второму субстрату. Общее количество субстратов GST превышает 3000. Обязательно, чтобы субстрат был гидрофобным.

Во многих источниках пишут об использовании GST как маркера окислительного стресса. Используемые в настоящее время для определения активности ферментов методы трудоемки и требуют большого объема биообразцов.

В связи с этим цель нашего исследования: адаптация метода определения активности глутатион-S-трансферазы для работы на биохимическом анализаторе, позволяющем сократить время анализа и минимизировать объемы исследуемых проб.

Объектом исследования служила кровь кроликов породы Шиншилла. Кровь забирали из краевой вены уха, в качестве антикоагулянта использовали гепарин. Кровь центрифугировали при 1700 g, плазму отбирали, а эритроциты трижды отмывали физиологическим раствором. Для эксперимента использовали упакованные эритроциты. Активность глутатион-S-трансферазы определяли по скорости

образования глутатион S-конъюгатов между GSH и 1-хлор-2,4-динитробензолом (ХДНБ).

Увеличение концентрации конъюгатов в ходе реакции регистрировали спектрофотометрически при длине волны 340 нм (максимум поглощения глутатион-S-ХДНБ). На биохимическом анализаторе Sapphire-400 (Токуо BOEKI LTD) активность фермента определяли методом конечной точки.

Результаты. На первом этапе эксперимента была определена активность GST спектрофотометрическим методом. На рисунке 1 приведена зависимость оптической плотности реакции от времени, свидетельствующая о линейном характере исследуемой реакции. Спектрофотометрический метод позволяет достаточно точно, с 5% погрешностью определить активность GST. В эритроцитах кроликов активность фермента составила $13,8 \pm 2,3$ мкмоль*мин/г Hb.

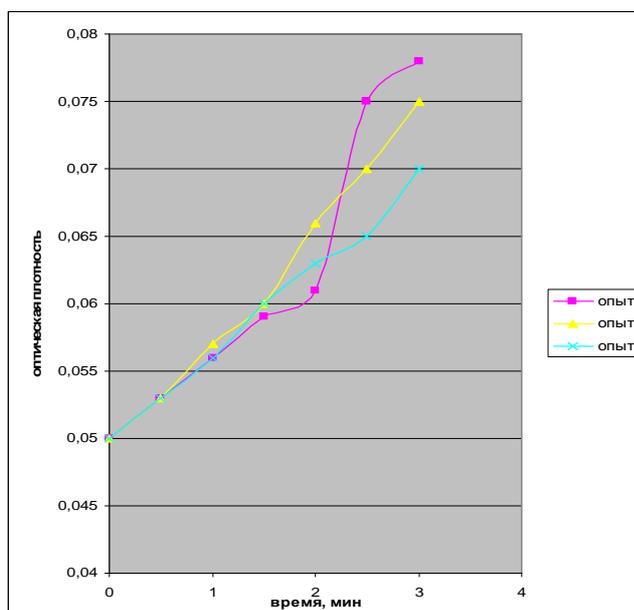


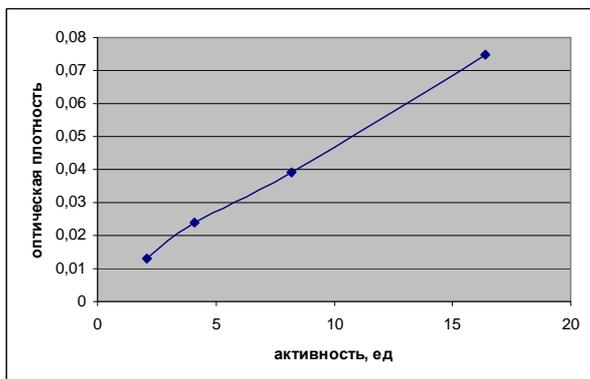
Рисунок 1. Зависимость оптической плотности реакции, катализируемой GST от времени.

Далее на спектрофотометре Spekol был построен калибровочный график, позволяющий, исходя из полученных величин оптической плотности, определять активность GST в опытных пробах (рисунок 2А).

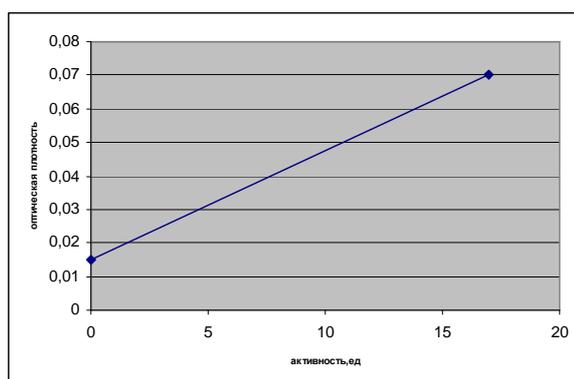
Для модификации спектрофотометрического метода на биохимический анализатор необходимо было подобрать оптимальные условия по концентрации субстрата, ко-субстрата, буфера и источника фермента. Проведенные нами исследования позволили составить протокол для определения активности GST на биохимическом анализаторе. Инкубационная проба содержит - 10 мкл образца, 300 мкл смеси буфера и GSH, и 20 мкл ХДНБ.

На рисунке 2Б приведен калибровочный график (зависимость оптической плотности от количества фермента в стандарте), построенный на биохимическом анализаторе. В качестве стандарта использовался коммерческий препарат лиофилизированной глутатион-S-трансферазы (Sigma, USA), содержащий 5 мг ферментного белка.

Сопоставление двух калибровочных графиков (рисунок 2А и 2Б) свидетельствует о линейности в диапазоне активности фермента от 2,5 до 17 мкмоль*мин*г белка.



А



Б

Рисунок 2. Зависимость изменения оптической плотности от концентрации GST (А - спектрофотометр Spekol, Б – анализатор Sapphire 400).

В результате нашего исследования адаптирована методика определения активности антиоксидантного фермента для биохимического анализатора: минимизированы объемы биообразцов (10 мкл) и используемых реагентов применительно к плазме, печени; оптимизирован состав инкубационной пробы. Сравнение модифицированных методов определения активностей антиоксидантных ферментов с оригинальными свидетельствует о их взаимозаменяемости.