

## КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ПЕЧЕНИ КРЫС В НОРМЕ И ПРИ УМЕРЕННОЙ ГИПОТЕРМИИ

Халилов Р.А.<sup>1</sup>, Джафарова А.М.<sup>1</sup>, Хизриева С.И.<sup>1</sup>, Абдуллаев В.Р.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный университет», Махачкала, e-mail: albina19764@mail.ru

Исследована активность и кинетические характеристики лактатдегидрогеназы (ЛДГ) печени крыс в норме и при умеренной гипотермии. Обнаружено, что гипотермия приводит к повышению активности ЛДГ в диапазоне низких концентраций пирувата (0,05-0,8 мМ) и, напротив, снижению активности в диапазоне высоких (0,8-25,6 мМ). Умеренная гипотермия способствует изменению характера концентрационной зависимости ЛДГ: точка оптимума на графике смещается в сторону более низких концентраций пирувата, а сигмоидность на правом, ингибиторном склоне графика концентрационной зависимости становится менее выраженной. Анализ кинетических характеристик ЛДГ при умеренной гипотермии указывает на незначительное повышение  $V_m$  на фоне снижения  $K_m$ , за счет чего эффективность катализа фермента существенно увеличивается. Гипотермия снижает значение  $K_i$  ЛДГ, что приводит к серьезному повышению значения коэффициента субстратного ингибирования. При этом диапазон концентрации пирувата, при котором фермент работает с максимальной эффективностью, существенно уменьшается. Обсуждаются возможные механизмы и биологический смысл обнаруженных изменений кинетических характеристик ЛДГ печени крыс при низких температурах тела.

Ключевые слова: крысы, гипотермия, печень, лактатдегидрогеназа, кинетические характеристики.

## KINETIC PROPERTIES OF LACTATE DEHYDROGENASE OF THE LIVER OF THE RATS IN NORM AND AT MODERATE HYPOTHERMIA

Khalilov R.A.<sup>1</sup>, Dzhafarova A.M.<sup>1</sup>, Khizriyeva S.I.<sup>1</sup>, Abdullaev V.R.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>The Dagestan state university, Makhachkala, e-mail: albina19764@mail.ru

The activity and kinetic characteristics of lactate dehydrogenase (LDH) in liver of rats were studied in norm and at moderate hypothermia. It was found that hypothermia leads to an increase in LDH activity in the range of low concentrations of pyruvate (0.05–0.8 mM) and, conversely, a to an decrease in activity in of high range (0.8–25.6 mM). Moderate hypothermia contributes to a change in the character of the concentration dependence of LDH: the optimum point on the graph shifts toward lower concentrations of pyruvate, and sigmoidity on inhibitory slope of the curve of the concentration dependence becomes less pronounced. Analysis of the kinetic characteristics of LDH at moderate hypothermia indicates a slight increase in  $V_{max}$  against a background of a decrease in  $K_m$ , as a result of which the catalytic efficiency of the enzyme increases substantially. Hypothermia decreases the value of  $K_i$  LDH, which leads to a significant increase in the value of the coefficient of substrate inhibition. At the same time, the range of pyruvate concentration at which the enzyme works with maximum efficiency is significantly reduced. Possible mechanisms and biological significance of the detected changes in the kinetic characteristics of LDH of rat liver at low body temperatures are discussed.

Keywords: rats, hypothermia, liver, lactate dehydrogenase, kinetic characteristics.

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) – это один из ключевых ферментов гликолиза, который, находясь на развилке путей метаболизма углеводов, участвует в регуляции тонко сбалансированного анаэробного и аэробного гликолиза. Однако функционирование ЛДГ может быть связано не только с его центральной ролью в рециркуляции анаэробного гликолиза, но и в регуляции соотношения НАД<sup>+</sup>/НАДН, поскольку именно оно влияет на скорость многих каталитических реакций. Было показано, что внутриклеточный НАД<sup>+</sup> играет важную роль в регуляции транскрипции генов, связанных с метаболизмом и циркадианными ритмами [1]. Предполагается, что ЛДГ может участвовать в клеточном цикле [2], в регуляции активности АТФ зависимых K<sup>+</sup> каналов [3].

Все многообразие внутриклеточных процессов, связанных определенным образом с каталитической активностью ЛДГ, предполагает необходимость изучения молекулярных механизмов функционирования этого фермента при различных физиологических состояниях животных, в частности при гипотермии. В последние годы гипотермические состояния гомойотермных животных привлекают особый интерес, поскольку их все чаще применяют для повышения устойчивости органов и тканей к различным видам стресса, защиты организма от травматических повреждений, восстановления функции органов и тканей после ишемии-реперфузии, для коррекции и лечения различных заболеваний животных и человека [4].

Ранее нами было показано, что при умеренной гипотермии у крыс происходят существенные изменения активности и кинетических параметров ЛДГ мозга и скелетных мышц [5; 6]. При этом каталитические свойства ЛДГ печени, являющейся интегратором всех биохимических процессов организма в целом, до сих пор остаются неизвестными.

#### **Материалы и методы исследования**

Исследования проводили на белых беспородных крысах (самцах) массой 150-200 г. Умеренную гипотермию вызывали в холодильной камере, в рубашке которой циркулировала вода температурой 4-7 °С. Температуру тела животных в течение 30 мин доводили до 30 °С.

*Получение тканевого экстракта.* Животных декапитировали, выделяли печень и гомогенизировали ее. Гомогенат центрифугировали при 600 g в течение 10 мин. Полученный супернатант повторно центрифугировали при 15000 g в течение 10 мин. Содержание белка в полученном экстракте (безмитохондриальном цитозоле) определяли по методу Лоури [7].

*Определение активности ЛДГ.* Активность ЛДГ определяли по убыли содержания НАДН в реакционной смеси, что регистрировалось спектрофотометрически. Реакционная смесь содержала 2.4 мл 0.1 М фосфатного буфера (рН 7.4), 0.3 мл раствора пирувата натрия (Sigma, США), 0.3 мл 1 мМ раствора НАДН (Sigma, США) и 0,05 мл тканевого экстракта. Исследование активности ЛДГ проводили в диапазоне концентраций пирувата от 0.05 до 25.6 мМ. Активность ЛДГ выражали в наномолях НАДН, окисленного в результате ферментативной реакции за 1 мин на 1 мг белка (нмоль/мин·мг белка).

*Определение кинетических характеристик.* Кинетические характеристики (максимальную скорость ( $V_m$ ), константу Михаэлиса ( $K_m$ ) и константу ингибирования ( $K_i$ )) вычисляли с помощью программного пакета Statistica 6.0 посредством нелинейного многомерного регрессионного анализа, используя в опции «нелинейное оценивание» уравнение Холдейна.

*Статистическая обработка результатов.* Обработка данных произведена с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием пакета

Statistica 6.0. Достоверность различия определяли с помощью критерия Фишера на уровне значимости  $P=0.05$ . Каждая кривая на графиках концентрационной зависимости скорости окисления НАДН - среднее восьми независимых экспериментов. Данные в таблице приведены в виде: среднее  $\pm$  ошибка среднего.

### Результаты исследования и их обсуждение

Была исследована концентрационная зависимость ЛДГ печени крыс в норме. Результаты исследования представлены на рис. 1. Из рис. 1 видно, что кривая концентрационной зависимости ЛДГ печени крыс имеет колоколообразный характер, указывающий на то, что активность фермента увеличивается с повышением концентрации субстрата до максимального значения при определенной концентрации субстрата, называемой точкой оптимума. Эта концентрация для печени интактных крыс составляет  $\approx 0,5$  мМ. Дальнейшее повышение концентрации субстрата приводит к снижению активности ЛДГ, что свидетельствует о наличии у фермента феномена субстратного ингибирования. Ранее сотрудниками кафедры биохимии и биофизики субстратное ингибирование ЛДГ было обнаружено в тканях мышц и мозга крыс [5; 6]. Субстратное ингибирование обусловлено формированием и диссоциацией ковалентного аддукта между пируватом и окисленной формой кофактора [8]. Остаток аминокислоты серина-163 играет ключевую роль в этом механизме, так же как присутствие нескольких активных центров и взаимодействие между субъединицами в тетрамерном белке.

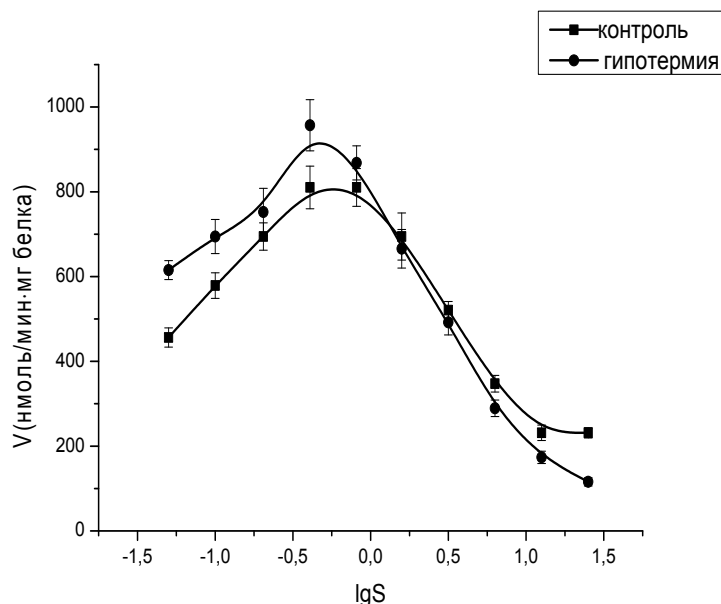


Рис. 1. Концентрационная зависимость активности ЛДГ печени крыс в норме и при гипотермии

Интересно то, что правый (ингибиторный) склон концентрационной зависимости ЛДГ

демонстрирует сигмоидный характер зависимости от концентрации пирувата. Это является свидетельством того, что при некоторой критической концентрации пирувата происходит резкая смена характера ингибирования ЛДГ.

Из рис. 1 видно, что гипотермия приводит к повышению активности ЛДГ в диапазоне низких концентраций пирувата (0,05-0,8 мМ). Так, например, повышение активности ЛДГ при концентрации 0,4 мМ составляет 19,2%. Интересно то, что в области высоких концентраций пирувата (0,8-25,6 мМ) гипотермия, напротив, сопровождается снижением активности фермента. Такое снижение становится наиболее выраженным при максимально использованной концентрации пирувата (25,6 мМ), составляя 50,1%.

Рис. 1. наглядно демонстрирует, что гипотермия влияет не только на активность фермента, но и на характер его концентрационной зависимости: точка оптимума на концентрационной кривой смещается в сторону более низких концентраций пирувата. Кроме того, сигмоидность на правом ингибиторном склоне графика концентрационной зависимости становится менее выраженной. Вместе с тем сигмоидность появляется на левом активаторном склоне концентрационной кривой, что свидетельствует о триггерном механизме связывания субстрата в определенном узком диапазоне.

Поскольку лактатдегидрогеназная реакция характеризуется наличием субстратного ингибирования, то для описания зависимости скорости реакции от концентрации пирувата неприемлемо уравнение Михаэлиса-Ментэн. Субстратное ингибирование для односубстратных ферментативных реакций хорошо описывается моделью Холдейна. Однако в лактатдегидрогеназной реакции участвует не только пируват, но и кофактор - НАДН. Таким образом, эту реакцию можно отнести к двусубстратным, и тогда применение модели Холдейна также представляется неадекватным. Однако, учитывая тот факт, что исследование проводили при фиксированных насыщенных концентрациях кофактора, эффектами его на скорость ферментативной реакции можно пренебречь и использовать уравнение Холдейна в качестве регрессионной модели.

$$V = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m^{nup} + [S] + \frac{[S]^2}{K_{si}^{nup}}};$$

где  $V_{\max}$  – максимальная скорость обратимой реакции;

$K_m$  – константа Михаэлиса для пирувата;

$K_{si}$  – константа субстратного ингибирования для пирувата;

$[S]$  – концентрация пирувата.

Используя это уравнение в опции «нелинейное оценивание» с помощью нелинейного регрессионного анализа были вычислены кинетические характеристики лактатдегидрогеназы (рис. 2, таблица). Исследование показало, что при гипотермии показатель  $V_m$  незначительно

(на 14, 9%) увеличивается. При этом  $K_m$  уменьшается на 20,1%. Незначительное повышение  $V_m$  на фоне более существенного повышения  $K_m$  приводит к тому, что при гипотермии на 43,2% повышается эффективность катализа – величина, характеризуемая отношением  $V_m/K_m$ . Эффективность катализа численно равна константе скорости первого порядка и отражает скорость ферментативной реакции при физиологических концентрациях субстрата.

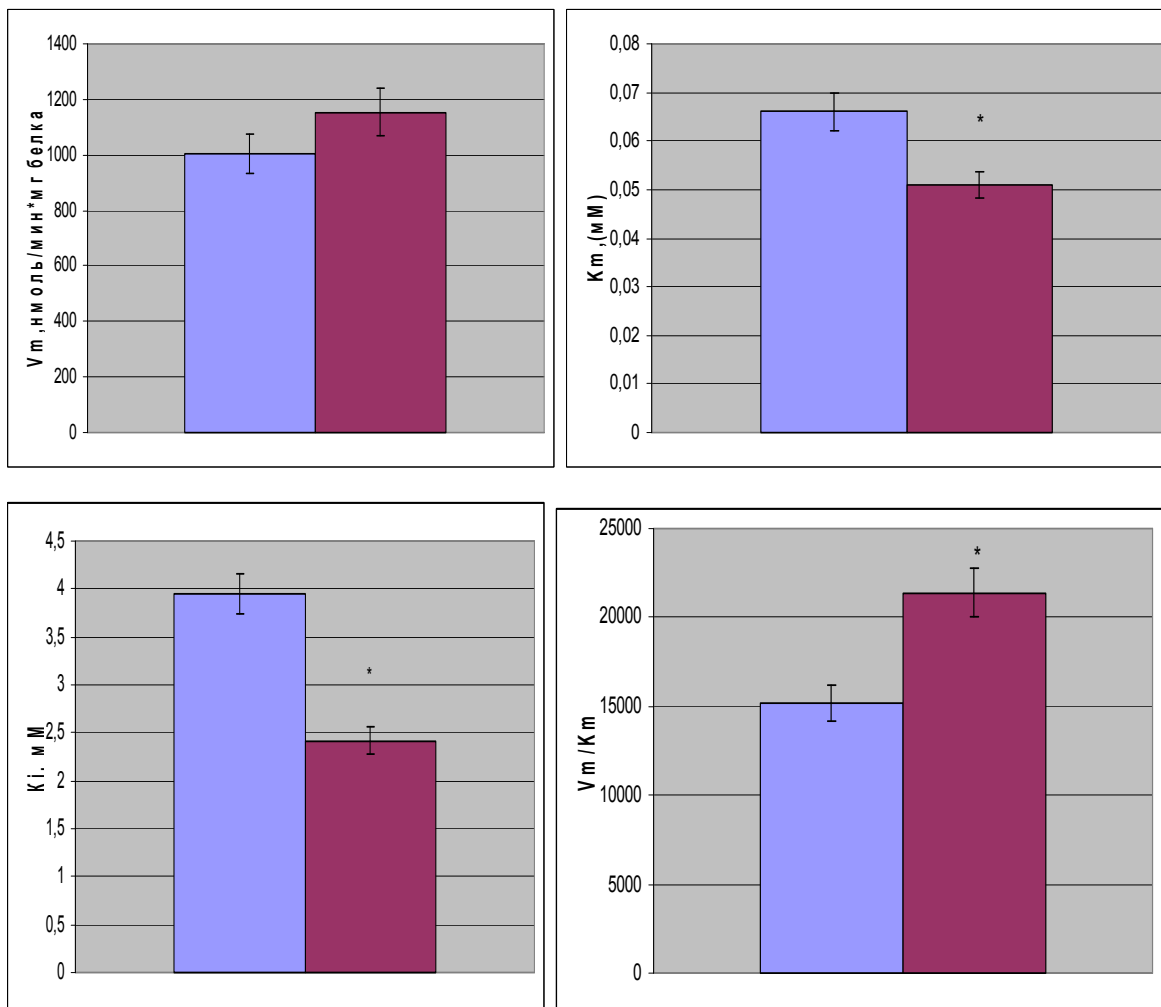


Рис. 2. Кинетические характеристики ( $K_m$ ,  $V_m$ ,  $V_m/K_m$ ,  $K_i$ ) АДГ печени крыс в норме и при умеренной гипотермии (■ - контроль, ■ - умеренная гипотермия); \*- достоверность различий относительно контроля

Исследование показало, что гипотермия оказывает существенное влияние на параметры субстратного ингибирования фермента. Из рис. 2 видно, что значение  $K_i$  при гипотермии значительно (на 38,7%) снижается. Это указывает на то, что при гипотермии увеличивается сродство пирувата, при его высоких концентрациях, к активному центру фермента. Это демонстрирует то, что для ингибирования АДГ при гипотермии требуются более низкие концентрации пирувата, нежели в контроле. Такое снижение константы ингибирования АДГ при гипотермии приводит к тому, что в 2,4 раза увеличивается значение

коэффициента субстратного ингибирования ( $Q$ ), определяемого нами как отношение скорости катализа при оптимальной концентрации субстрата к скорости катализа при максимально взятой в данной работе концентрации субстрата.

#### Кинетические характеристики ЛДГ мозга крыс в норме и при гипотермии

Состояние животного	$Q$	$S_{opt}$	$\Delta=K_i - K_m$
Контроль	$3,51 \pm 0,31$	$0,51 \pm 0,04$	$3,877 \pm 0,02$
Гипотермия	$8,26 \pm 0,62^*$	$0,36 \pm 0,02^*$	$2,365 \pm 0,03^*$

\* - достоверность различий относительно контроля.

Поскольку гипотермия приводит к снижению значений  $K_m$  и  $K_i$ , это в совокупности способствует снижению значения оптимальной концентрации субстрата ( $S_{opt}$ ), что выражается в сдвиге точки максимума на графике концентрационной зависимости в сторону более низких концентраций пирувата. В соответствии с моделью Холдейна можно вычислить точку оптимума. Вычисленные нами теоретические значения  $S_{opt}$  примерно соответствуют графическим и демонстрируют снижение значения  $S_{opt}$  при гипотермии на 29,5%. Нами была вычислена разница между значениями  $K_i$  и  $K_m$  ( $\Delta=K_i-K_m$ ), характеризующая диапазон концентрации пирувата, при котором фермент работает с максимальной эффективностью. Оказалось, что при гипотермии этот диапазон уменьшается на 39%.

Таким образом, исследование показало, что при гипотермии происходят существенные изменения многих кинетических характеристик ЛДГ. При этом повышение максимальной скорости катализа ЛДГ не является достоверным. Максимальная скорость – это величина, которая определяется произведением числа оборотов фермента и его концентрации. Концентрация фермента может изменяться вследствие изменения соотношения скоростей его синтеза и распада. Синтез фермента – это энергоемкий процесс. При гипотермии, в условиях снижения скоростей всех энергосинтезирующих процессов и энергопотребляющих процессов, экспрессия многих белков подавлена. Учитывая, что в печени, как и во всех других органах, могут быть представлены различные изоформы ЛДГ, среди которых наиболее высока концентрация ЛДГ 4 и ЛДГ 5, можно предположить, что при гипотермии происходят изменения не столько количества фермента, сколько его «качества», то есть изменяется количественное соотношение экспрессируемых изоформ ЛДГ. Однако в условиях низких температур возможность дифференциальной экспрессии генов,

кодирующих различные изоцимы, тоже, скорее всего, будет значительно снижена.

Таким образом, временные рамки гипотермии и энергодефицит исключают возможность количественной регуляции активности ЛДГ. Поскольку в нашем исследовании более значимые изменения при гипотермии обнаружены в значениях константы Михаэлиса, то это указывает на то, что повышение эффективности катализа связано с посттрансляционными модификациями в самой молекуле фермента. О механизмах регуляции ЛДГ гомойотермных животных посредством посттрансляционной модификации известно мало. При этом большое разнообразие механизмов регуляции ЛДГ обнаружено у пойкилотермов: фосфорилирование, аденилирование, ацетилирование, убиквитирование и т.д. [9].

Имеются единичные экспериментальные данные, указывающие на регуляцию ЛДГ в клетках опухолевых линий млекопитающих посредством фосфорилирования по остаткам тирозина [10]. В регуляции ЛДГ могут принимать участие шапероны, которые могут изменять конформацию фермента таким образом, что сродство его к субстрату будет значительно увеличиваться. Обнаружено, что при гипотермии изменяется уровень экспрессии шаперонов в тканях гомойотермов [11]. Одной из причин модификации структуры ЛДГ может стать её окисление АФК, концентрация которых многократно увеличивается при стрессе. Было обнаружено, что гидроксильные радикалы, генерируемые *in vitro* в среде Фентона, приводят к угнетению активности ЛДГ [12]. Как известно, гипотермические состояния сопровождаются активацией свободно-радикальных процессов [13]. Поэтому гипотеза об окислительной модификации ЛДГ под действием активных форм кислорода кажется вполне правдоподобной.

Повышение эффективности катализа ЛДГ в результате снижения значения  $K_m$  указывает на реализацию у гомойотермных животных в условиях низких температур механизмов температурной компенсации. Температурная компенсация – это явление, характерное для пойкилотермов и позволяющее поддерживать высокие скорости ферментативных реакций при низких температурах тела животного [14].

Наши данные указывают на реализацию у гомойотермных животных в условиях низких температур механизмов температурной компенсации. Возможно, что в процессе эволюции гомойотермных животных, несмотря на формирование у них принципиально новой стратегии адаптации к температуре, в зачаточном состоянии сохраняются элементы пойкилотермных механизмов регуляции активности фермента. Эти механизмы реализуются в период экстремальных температур окружающей среды, когда терморегуляционные системы уже не справляются с поддержанием постоянной температуры тела.

## Список литературы

1. Cantó C., Gerhart-Hines Z., Feige J.N. et al. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD<sup>+</sup> metabolism and SIRT1 activity. *Nature*, 2009, vol. 458, pp. 1056-1060.
2. Rong Y., Wu W., Ni X., Kuang T. Lactate dehydrogenase A is overexpressed in pancreatic cancer and promotes the growth of pancreatic cancer cells. *J. Tumour. Biol.*, 2013, vol. 34, pp. 1523–1530.
3. Crawford R.M., Budas G.R., Jovanovic S. et al. M-LDH serves as a sarcolemmal K(ATP) channel subunit essential for cell protection against ischemia. *EMBO*, 2002, vol. 21, pp. 3936–3948.
4. Soreide K. Clinical and translational aspects of hypothermia in major trauma patients: from pathophysiology to prevention, prognosis and potential preservation. *Injury*, 2014, vol. 45, pp. 647–654.
5. Халилов Р.А. Исследование температурной зависимости лактатдегидрогеназы мышц крыс при гипотермии / Р.А. Халилов, А.М. Джафарова, Р.Н. Джабраилова // Вестник ДГУ. - 2013. - В. 6. - С. 114-119.
6. Кинетические характеристики лактатдегидрогеназы мозга крыс при гипотермии / Р.А. Халилов [и др.] // Нейрохимия. - 2016. - Т. 33, № 2. - С. 169-179.
7. Lowry D.H., Rosebrough H.J., Farr A.L. Protein measurement with the Pholin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, vol. 193, pp. 265–275.
8. Zakhartsev M., Johansen T., Portner H.O., Blust R. Effects of temperature acclimation on lactate dehydrogenase of cod (*Gadus morhua*): genetic, kinetic and thermodynamic aspects. *J. Exp. Biol.*, 2004, vol. 207, pp. 95–112.
9. Shahriari A., Dawson N.J., Bell R.A., Storey K.B. Stable suppression of lactate dehydrogenase activity during anoxia in the foot muscle of *littorina littorea* and the potential role of acetylation as a novel posttranslational regulatory mechanism. *Enzyme Res.*, 2013, vol. 2013, pp. 1-7.
10. Fan J., Hitosugi T., Chung T. et al. Tyrosine phosphorylation of lactate dehydrogenase a is important for NADH/NAD<sup>+</sup> redox homeostasis in cancer cells. *Mol. Cell. Biol.*, 2011, vol. 31, no. 24, pp. 4938–4950.
11. Terao Y., Miyamoto S., Hirai K. et al. Hypothermia enhances heat-shock protein 70 production in ischemic brains. *Neuro Report*, 2009, vol. 20, no. 8, pp. 745–749.
12. Tangkosakul T., Tantimongcolwat T., Isarankura-Na-Ayudhya C. et al. Native and chimeric metal-binding lactate dehydrogenase as detection and protection tools for oxidative stress induced by Fenton's reaction. *EXCLI Journal*. 2009, no 8, pp. 1-11.



13. Alva N., Palomeque J., Teresa C. Oxidative stress and antioxidant activity in hypothermia and rewarming: can RONS modulate the beneficial effects of therapeutic hypothermia. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/957054>.
14. Hochachka P. *Biochemical adaptation* / P. Hochachka, G.P. Somero. New York: Oxford University Press, 2002. 466 p.