

УДК 577.3

## ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИКРОНОЖНЫХ МЫШЦ СУСЛИКОВ ПРИ ЗИМНЕЙ СПЯЧКЕ И В ДИНАМИКЕ ИНДУЦИРОВАННОГО СОГРЕВАНИЯ

Р. А. Халилов, А. М. Джафарова, И. С. Мейланов

Дагестанский государственный университет

Исследована концентрационная зависимость активности лактатдегидрогеназы икроножной мышцы сусликов при зимней спячке и в динамике индуцированного согревания. Гибнация сусликов сопровождается снижением активности лактатдегидрогеназы; при этом максимальная скорость не изменяется, а константы Михаэлиса и субстратного ингибирования увеличиваются. Индуцированное согревание спящих сусликов приводит к противоположным эффектам: температурно-зависимому повышению активности лактатдегидрогеназы, при этом максимальная скорость не изменяется, а константы Михаэлиса и субстратного ингибирования уменьшаются.

Concentration dependence of lactate dehydrogenase activity in the ground squirrel gastrocnemius muscle at hibernation and in the dynamics of induced warming was investigated. Hibernation of the ground squirrel is accompanied by decrease in activity of the lactate dehydrogenase, the maximum rate doesn't change, and the Michaelis constant and the constant of substrate inhibition increase. The induced warming of a sleeping squirrel resulted in opposite effects - temperature- dependent increase of the lactate dehydrogenase activity, the maximum rate doesn't change, and the Michaelis constant and the constant of substrate inhibition decrease.

Ключевые слова: лактатдегидрогеназа, икроножная мышца, суслики, зимняя спячка, индуцированное согревание, константа Михаэлиса, максимальная скорость, константа субстратного ингибирования.

Keyword: lactate dehydrogenase; ground squirrel; gastrocnemius muscle; hibernation; induced warming; maximal rate; Michaelis constant; constant of substrate inhibition.

Молекулярные механизмы температурных адаптаций – это одно из самых интересных научных направлений экологической биохимии и физиологии [1]. Особое внимание исследователи уделяют температурным адаптациям ферментов, среди которых классическим объектом является лактатдегидрогеназа (ЛДГ) [2, 3]. Изменение активности фермента может свидетельствовать либо об изменении скорости его биосинтеза, либо об изменениях в самой структуре белка. О модификации фермента можно судить по изменению его кинетических характеристик.

Известно, что по отношению к температуре существуют различные стратегии температурных адаптаций: пойкилотермия, гомойтермия и гетеротермия [3]. Было обнаружено, что акклимация и акклиматизация к низким температурам у рыб сопровождается изменением кинетических характеристик ЛДГ, направленным на сохранение высокой скорости катализа при низкой температуре тела. Причем механизмы этих изменений до сих пор до конца не выяснены [4]. Ранее нами было показано [5], что искусственное снижение температуры тела (гипотермия) гомойтермных животных (крыс) приводит к уменьшению максимальной скорости ( $V_m$ ) ЛДГ мышц, однако при этом значение константы Михаэлиса ( $K_m$ ) также уменьшается. Это указывает на компенсаторный характер обнаруженных изменений и позволяет предположить, что в мышцах гомойотермного животного при гипотермических состояниях могут проявиться пойкилотермные механизмы терморегуляции на уровне ЛДГ.

Одной из ветвей эволюции гомойотермов является гетеротермия, в частности зимняя спячка мелких млекопитающих, представляющая собой комплекс адаптации к условиям нехватки пищевых ресурсов и низких температур. Она сопровождается значительным снижением температуры тела и подавлением метаболизма [6]. Спячка длится несколько месяцев и сопровождается периодическими пробуждениями с разогреванием тела в течение нескольких часов до 37°C. Столь существенные

изменения физиологического состояния животного требуют гибких механизмов адаптации гликолитических ферментов. В данной работе нами предпринято исследование активности и кинетических характеристик (ЛДГ) икроножных мышц сусликов при различных физиологических состояниях: летнем бодрствовании, глубоком зимнем сне (середина баута) и в динамике индуцированного согревания.

#### Материалы и методы исследования

**Животные.** Исследования были проведены на малых кавказских сусликах (*Citellus pygmaeus* Pall.). Животные содержались в условиях вивария на обычном рационе.

Были изучены следующие состояния животных: 1) летнее бодрствование (контроль, температура тела 36–37°C), 2) глубокая спячка (середина баута, температура тела 1–2°C), 3) индуцированное согревание (температура тела доведена до 10°C, 20°C, 30°C, 37°C).

**Выделение экстракта ткани.** Животных декапитировали, выделяли икроножную мышцу. Навеску ткани измельчали и гомогенизировали в 4-кратном объеме 0.1 М фосфатного буфера (рН 7.4). Гомогенат центрифугировали при 600 г в течение 10 мин. Центрифугат, профильтрованный через 4 слоя марли, повторно центрифугировали при 15000 г в течение 10 мин. Полученный супернатант хранили в холодильнике при 4°C.

**Определение активности ЛДГ.** Исходный экстракт разводили фосфатным буфером. В кювету спектрофотометра приливали 2.4 мл 0.1 М фосфатного буфера (рН 7.4), 0.3 мл раствора пирувата натрия, 0.3 мл 1 мМ раствора НАДН. Реакцию инициировали добавлением в кювету 0.05 мл экстракта (40 мкг белка). Регистрировали оптическую плотность на длине волны 340 нм в течение 2 минут.

Активность ЛДГ выражали в нМ НАДН/(мин·мг белка)

**Определение белка.** Белок определяли по методу Лоури [7].

**Определение концентрационной зависимости и кинетических характеристик лактатдегидрогеназы.** Исследование активности ЛДГ проводили в диапазоне концентраций пирувата от 0.1 до 25.6 мМ. По результатам строили графики концентрационной зависимости.

Кинетические характеристики ЛДГ ( $K_m$ ,  $V_m$ ,  $K_i$ ) находили методом наименьших квадратов в соответствии с математической моделью субстратного ингибирования с одним ингибиторным местом связывания:

$$V = \frac{V_m [S]}{K_m + [S] + \frac{[S]^2}{K_i}}$$

где  $V_m$  – максимальная скорость;  $K_m$  – константа Михаэлиса;  $K_i$  – константа ингибирования.

#### Результаты исследования

Из табл. 1 видно, что характер изменений активности ЛДГ при различных состояниях животных зависит от концентрации субстрата. При низких концентрациях пирувата (0.1–0.8 мМ) в состоянии зимнего оцепенения активность ЛДГ сусликов существенно снижается по сравнению с летними бодрствующими гибернантами, а при высоких, напротив, повышается. Так, например, при концентрации пирувата 0.4 мМ снижение активности ЛДГ у спящих сусликов составляет 51%.

**Таблица 1.** Концентрационная зависимость активности ЛДГ (нМ /мин·мг белка) икроножной мышцы сусликов при зимней спячке и индуцированном согревании

Состояние животного	Концентрация пирувата (мМ)								
	0.1	0.2	0.4	0.8	1.6	3.2	6.4	12.8	25.6
Летний контроль	3019±107	3970±98	4521±120	4452±116	3710±106	2513±94	1542±58	753±30	415±32
Глубокая спячка (2°C)	996*±44	1597*±54	2250*±38	3110*±102	4313*±115	5500*±132	6053*±172	5724*±165	5204*±118



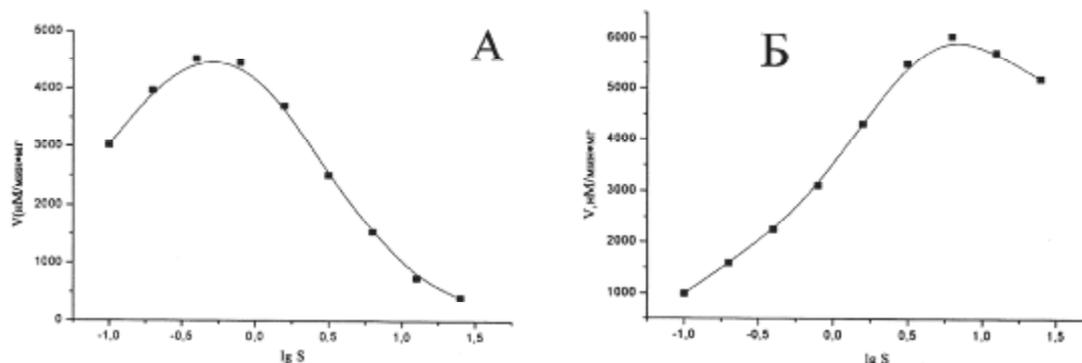
сопровождается сдвигом точки оптимума на графике в сторону более низких концентраций (она становится приблизительно равной контрольным значениям). При этом активность фермента при концентрациях ниже  $S_{opt}$  повышается, а при концентрациях выше  $S_{opt}$ , напротив, наблюдается значительное снижение.

В табл. 2 представлены данные по влиянию гипернации и индуцированного согревания на основные кинетические характеристики  $V_m$ ,  $K_m$ ,  $K_i$ . Интересно то, что при всех исследованных состояниях  $V_m$  не изменяется, составляя примерно одну и ту же величину.  $V_m$  – это величина, пропорциональная концентрации фермента, повышение или уменьшение ее свидетельствует об изменении концентрации фермента ( $V_m = [E] \cdot K_2$ ). Если  $V_m$  не изменяется, значит, концентрация фермента тоже не изменяется, поэтому обнаруженные изменения скорости катализа связаны, скорее всего, с изменениями в самой структуре фермента.

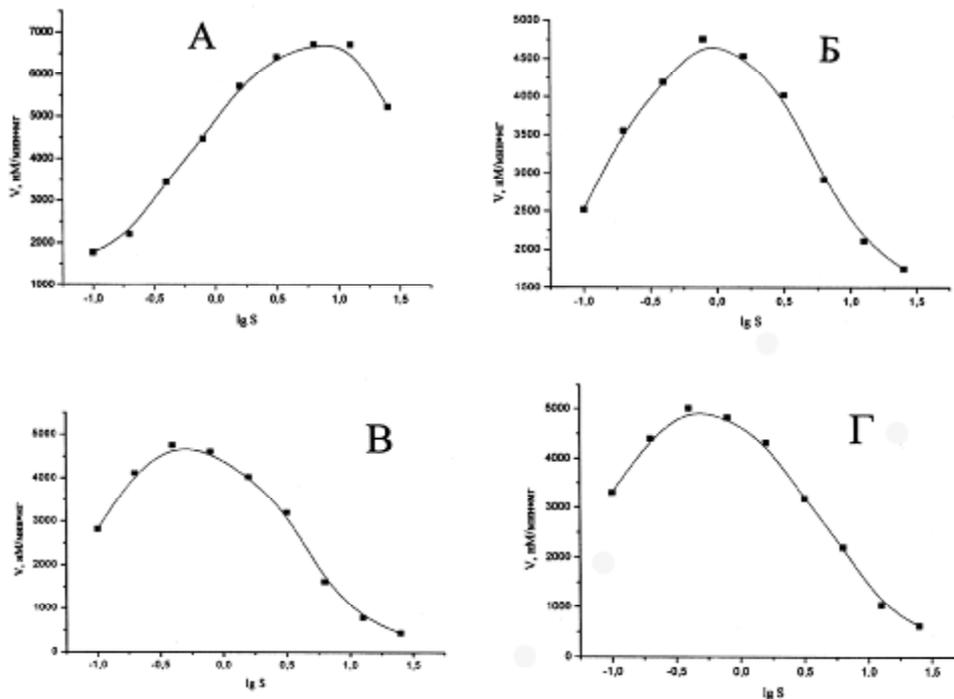
Из табл. 2 видно, что  $K_m$  в состоянии торпидности значительно (в 6 раз) увеличивается. Такое повышение  $K_m$  в период гипобиоза указывает на то, что в данном случае фермент малоактивен (фактически «не работает»). Согревание сусликов до 10°C приводит к уменьшению  $K_m$  в 2 раза по сравнению со спящими животными. Дальнейшее повышение температуры приводит к уменьшению значения  $K_m$  до исходного значения контрольных животных. При 37°C  $K_m$  становится меньше таковой бодрствующих сусликов на 21%.

**Таблица 2.** Кинетические характеристики ЛДГ икроножной мышцы сусликов при зимней спячке и последующем индуцированном согревании

Состояние животного	$V_m$	$K_m$	$K_i$	$V_m/K_m(c^{-1})$	$S_{opt}$	$\Delta = K_i - K_m$
Летний контроль ( $t_T$ 37°C)	7211.537 ±257.6977	0.138±0.012	1.760±0.1251	52257.51	0.49	1.622
Глубокая спячка ( $t_T$ 2°C)	7190.701 ±408.7122	0.907±0.1323 $p < 0.001$	74.915±4.2403 $p < 0.001$	7928.01	8.24	74.008
Индукционное согревание ( $t_T$ до 10°C)	7757.508 ±329.5781	0.499±0.0618 $p < 0.001$	58.737±13.4944 $p < 0.001$	15546.11	5.41	58.238
Индукционное согревание ( $t_T$ до 20°C)	5809.513 ±301.2099 $p < 0.05$	0.126±0.0219	7.809±0.656 $p < 0.05$	46107.25	0.99	7.683
Индукционное согревание ( $t_T$ до 30°C)	7686.287±698.8579	0.163±0.0346	1.946±0.3514	47155.13	0.56	1.783
Индукционное согревание ( $t_T$ до 37°C)	7087.084±260.9868	0.109±0.0117	2.666±0.1212	65019.12	0.54	2.557



**Рис. 1.** Концентрационная зависимость активности ЛДГ икроножной мышцы сусликов: А – в период летнего бодрствования (контроль); Б – в период глубокой спячки (середина баута,  $t_T = 1.5-2^\circ\text{C}$ )



**Рис. 2.** Концентрационная зависимость активности ЛДГ икроножной мышцы сусликов при индуцированном согревании: А – до 10°C; Б – до 20°C; В – до 30°C; Г – до 37°C

Естественно, что такое повышение  $K_m$  в состоянии оцепенения сказывается на значении константы скорости образования фермент-субстратного комплекса ( $K_1$ ), определяемой нами как отношение  $V_m/K_m$ . Из табл. 2 видно, что отношение  $V_m/K_m$  в состоянии торпидности в 6.6 раза меньше по сравнению с контролем. Повышение температуры тела животного приводит к постепенному повышению константы до уровня контрольных значений. А при согревании до 37°C эффективность катализа даже превышает таковую летних сусликов. Кроме того, нами был вычислен диапазон концентраций пирувата, в котором фермент может работать с максимальной скоростью ( $\Delta = K_1 - K_m$ ). Оказалось, что в состоянии спячки он значительно шире.

Константа ингибирования во время спячки увеличивается в 42.5 раза. Как известно, увеличение  $K_i$  свидетельствует об уменьшении сродства ингибитора, в данном случае собственного субстрата – пирувата, к активному центру фермента. Увеличение  $K_i$  при гибернации указывает на ослабление этого комплекса. Это приводит к уменьшению степени субстратного ингибирования при гипотермическом состоянии и, как следствие, к сдвигу оптимума концентрационной кривой вправо. Естественно, что повышение температуры тела сказывается на  $K_1$ , оно значительно уменьшается, то есть сродство субстрата, при высоких его концентрациях, к активному центру фермента возрастает.

Суммируя все полученные данные, можно предположить, что обнаруженные изменения активности и кинетических констант ЛДГ сусликов при зимней спячке и индуцированном согревании носят адаптивный характер. Известно, что при гибернации сусликов существенно снижаются скорости всех метаболических потоков, в том числе и гликолиза [9]. Вместе с тем индуцированное согревание сопровождается большими энергозатратами, что требует высокой эффективности катализа от фермента, ответственного за рециркуляцию анаэробного пути окисления глюкозы. Такие изменения, скорее всего, связаны не с изменением количества фермента, а с его конформационной модификацией. Прямое влияние температуры тела на конформацию ЛДГ *in vivo* маловероятно. Можно предположить, что в изменении конформации могут принимать участие шапероны. Если при этом конформация должна измениться на уровне протомеров, то четвертичная структура

должна быть предварительно разобрана, чтобы шапероны имели доступ к большей площади поверхности протомеров.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hochachka P., Somero G. Biochemical adaptation. New-York: Oxford University Press, 2002.
2. Fields P.A and Houseman D.E. Decreases in activation energy and substrate affinity in cold-adapted A4-Lactate dehydrogenas: evidence from the Antarctic Notothenioid fish *Chaenocephalus Aceratus* // Mol. Biol. And Evol. 2004. Vol. 21. P. 2246-2255.
3. Somero G.H. Adaptation of enzymes to temperature: searching for basic "strategies" // Comp. Biochem. Physiol. Part B. 2004. Vol. 139. P. 321-333.
4. Activity, stability and structural studies of lactate dehydrogenases adapted to extreme thermal environments / N. Coquelle, E. Fioravanti, M. Weik, F. Velliux, D. Madern // J. Mol. Biol. 2007. Vol. 374. P. 547-562.
5. Халилов Р.А., Джафарова А.М., Мейланов И.С. Исследование кинетических характеристик лактатдегидрогеназы икроножной мышцы крыс при гипотермии // Изв. вузов. Сев.-Кав. регион. Естеств. науки. 2011. № 1. С. 75-78.
6. Калабухов Н.И. Зимняя спячка млекопитающих. М.: Наука, 1985. 260 с.
7. Lowry D.H., Rosembrough H.J., Farr A.L. Protein measurement with the Folinphenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193. P. 265-275.
8. Effects of temperature acclimation on lactate dehydrogenase of cod (*Gadus morhua*): genetic, kinetic and thermodynamic aspects / M. Zakhartsev, T. Johansen, H. Dörther, R. Blust // J. Experimental Biology. 2004. Vol. 207. P. 95-112.
9. Storey K.B., Storey J.M. Metabolic rate depression in animals: transcriptional and translational controls // Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. 2004. Vol. 19. P. 207-233.

Поступила в редакцию 10.04.2012 г.  
Принята к печати 28.09.2012 г.