

ВЛИЯНИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПАРАМЕТРЫ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ МОЗГА КРЫС

INFLUENCE OF ACTIVE OXYGEN SPECIES ON STRUCTURAL AND FUNCTIONAL PARAMETERS OF BRAIN LACTATE DEHYDROGENASE

**R. Khalilov
A. Jafarova
Z. Rabadanova
M. Jafarov**

Summary. The activity and some physicochemical parameters of rat brain lactate dehydrogenase (LDH) were studied in a model chemical system that generates ROS (Fenton's medium). It was found that the activity of LDH in the brain of rats decreases, and the rate of inactivation of the enzyme is nonlinear in time. A study of the intrinsic fluorescence of LDH showed a decrease in the intensity of the total fluorescence of LDH, which may indicate small conformational changes in the structure of the enzyme. At the same time, a study of the content of sulfhydryl and carbonyl groups in the LDH molecule found that a decrease in LDH activity negatively correlates with an increase in the content of carbonyl groups and positively correlates with a decrease in the content of sulfhydryl groups in the LDH preparation.

Keywords: rats, oxidative stress, lactate dehydrogenase, reactive oxygen species.

Халилов Рустам Абдуразакович

К.б.н., доцент, Дагестанский государственный университет, (г. Махачкала)
dagbiofak@mail.ru

Джафарова Альбина Мехьядиновна

К.б.н., доцент, Дагестанский государственный университет, (г. Махачкала)
albina19764@mail.ru

Рабданова Зухра Гусейновна

К.б.н., доцент, Дагестанский государственный университет, (г. Махачкала)
r.zukhra@yandex.ru

Джафаров Мурсал Биниевич

Астраханский государственный медицинский университет
mursal-dag@mail.ru

Аннотация. Исследована активность и некоторые физико-химические параметры лактатдегидрогеназы (ЛДГ) мозга крыс в модельной химической системе, генерирующей АФК (среде Фентона). Обнаружено, что активность ЛДГ мозга крыс убывает, причем это скорость инактивации фермента не линейна во времени. Исследование собственной флуоресценции ЛДГ показало снижение интенсивности общей флуоресценции ЛДГ, что может свидетельствовать о небольших конформационных изменениях структуры фермента. В то же время, исследование содержания сульфгидрильных и карбонильных групп в молекуле ЛДГ обнаружило, что снижение активности ЛДГ отрицательно коррелирует с повышением содержания карбонильных групп и положительно коррелирует со снижением содержания сульфгидрильных групп в препарате ЛДГ.

Ключевые слова: крысы, оксидативный стресс, лактатдегидрогеназа, активные формы кислорода.

Процессы метаболизма кислорода в организме связаны с образованием активных форм кислорода (АФК), обладающих выраженной реакционной способностью. Любая стрессорная реакция организма сопровождается кратковременным подъемом АФК и развитием окислительного стресса [3]. Показано, что состояние оксидативного стресса развивается при многих экстремальных состояниях: гипоксии, гипотермии, гипертермии. Уже установлено, что свободные радикалы участвуют в патогенезе множества заболеваний человека [1]. Процессы старения организма также развиваются на фоне оксидативного стресса [6].

К окислительному стрессу особенно чувствительны ткани, для которых характерна высокая скорость потре-

бления кислорода. Это в первую очередь относится к головному мозгу. Высокая чувствительность мозга к окислительному стрессу обусловлена его биохимическими, физиологическими и анатомическими особенностями [12].

Особый интерес может представлять влияние АФК на ферменты, выполняющие в мозге важнейшие физиологические и метаболические функции, в частности лактатдегидрогеназу.

Цель работы

Исследование влияния АФК на структурно-функциональные параметры ЛДГ мозга крыс.

Материал и методы

Опыты проводились на белых ненаркотизированных (аутбрендных) крысах Wistar массой 220–230 г, полученных из питомника «Столбовая» (НЦБМТ ФМБА России) и содержащихся в стандартных условиях вивария (средняя температура воздуха — 26°C, влажность воздуха — 40–60 %) Дагестанского государственного университета. Эксперименты выполнены с соблюдением Приказа Минздрава России № 199н от 01.04.2016 г. («Правила надлежащей лабораторной практики»). Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям. Во избежание возрастных и суточных колебаний на результаты экспериментов, опыты проводили в одно и то же время дня (с 9 до 11ч).

Ферментативный препарат получали посредством высаливания с последующим диализом.

Животное декапировали, выделяли мозг, очищали от кровеносных сосудов. Навеску ткани (1 г) измельчали и гомогенизировали в 4-х кратном объеме буфера содержащий ЭДТА и дитиотреитол (0,0019 г на 25 мл буфера). Затем гомогенат центрифугировали 30 мин при 10000g. Далее измеряли объем экстракта. К полученному объему медленно добавляли мелкоизмельченный сульфат аммония, перемешивали еще в течение 30 мин., затем центрифугировали в течение 1 часа при 20000 g. Осадок отбрасывали и определяли его объем супернатанта. К полученному раствору снова добавляли сульфат аммония; после добавления последней порции соли раствор продолжали перемешивать еще в течение 30 мин, а затем центрифугировали 1 час при 20000 g. Супернатант отбрасывали. Осадок, содержащий лактатдегидрогеназу, растворяли в буфере, содержащем дитиотреитол, переливали в диализные мешки и погружали в стакан с большим объемом фосфатного буфера, оставляли на ночь. На следующий день ферментативный препарат замораживали и хранили при температуре –70°C.

Содержание белка определяли по методу Лоури [9].

Индукция свободно-радикальных процессов in vitro в модельной системе

Для индукции свободно-радикальных процессов использовали среды Фэнтонна, содержащие различные концентрации перекиси водорода (H_2O_2) и сульфата железа ($FeSO_4$). Суспензию препарата ЛДГ добавляли в среду Фэнтонна и инкубировали в термостате при 37°C. Через равные промежутки времени отбирали аликвоты, в которых определяли активность ЛДГ, содержание карбонильных и сульфгидрильных групп, а также собственную флуоресценцию ЛДГ.

Активность ЛДГ определяли по убыли содержания НАДН в реакционной смеси в результате энзиматического восстановления пирувата в лактат, что регистрировалось спектрофотометрически (при длине волны 340 нм). Реакционная смесь содержала 2,4 мл 0,1 М фосфатного буфера (pH 7,4), 0,3 мл раствора пирувата натрия, 0,3 мл 1 мМ раствора НАД•H₂ и 0,05 мл тканевого экстракта. По результатам строили графики концентрационной зависимости.

Концентрацию SH-групп измеряли колориметрическим методом.

Степень окислительной модификации фермента оценивали по содержанию в них карбонильных групп [14].

Измерения собственной флуоресценции лактатдегидрогеназы проводили на спектрофлуориметре Hitachi F-7000 с автоматической коррекцией спектров. Спектр флуоресценции снимали в диапазоне 290 нм ≤ λ ≤ 400 нм при длине волны 280 нм (суммарная флуоресценция) и 295 нм (триптофановая флуоресценция). Обработку спектров производили в программе Origin 8.6. Среднестатистические спектры флуоресценции получали путем усреднения спектральных линий, полученных в повторных экспериментах (n=8) с использованием Фурье фильтрации (по 5 точкам).

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью компьютерной программы Statistica. Рассчитывали параметры M — средняя арифметическая и m — средняя ошибка средней арифметической. При сравнительной оценке двух величин вычисляли критерий достоверности Стьюдента. Различия считались достоверными при p < 0,05.

Результаты и обсуждения

Исследование эффектов АФК, генерируемых in vitro, на структурно-функциональные параметры ЛДГ мозга крыс

Исследовано влияние АФК на активность ЛДГ мозга крыс при инкубации очищенного ферментативного препарата в классической среде Фэнтонна, содержащей $10^{-3}M FeSO_4$, $3 \cdot 10^{-4}M H_2O_2$ и $10^{-3}M ЭДТА$ [14].

Исследование показало, что в такой модельной системе активность ЛДГ во времени убывает. Так, в течение 10 минут инкубации активность фермента снизилась на 16 %, за 20 минут инкубации — на 47,6 % и за 30 минут — на 54,6 %. При этом дальнейшая инкубация фермента в среде Фэнтонна не сопровождается изменениями его активности.

Интересно то, что активность фермента, измеренная в среде Фэнтонна сразу же после добавления — на

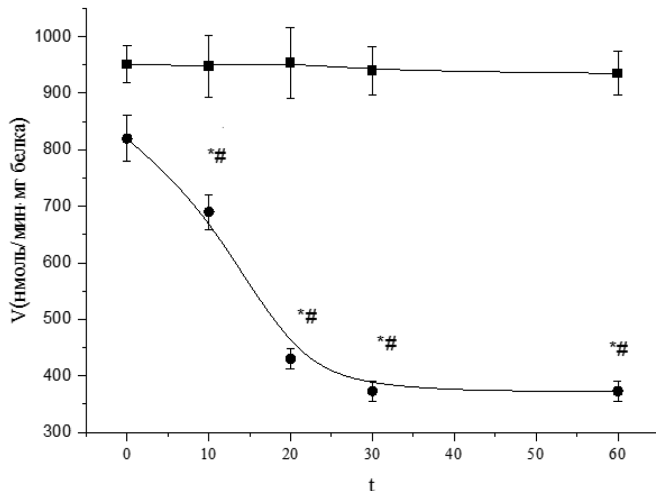


Рис. 1. Кинетика изменения активности ЛДГ мозга крыс в среде, содержащей буфер (контроль — ■) и среде Фентона (●), содержащей: 10^{-3}M FeSO_4 ; $3 \cdot 10^{-4}\text{M H}_2\text{O}_2$; 10^{-3}M ЭДТА . Температура инкубации — 37°C .
Примечание: * — достоверность отличий относительно начальной активности ЛДГ, # — достоверность отличий относительно контроля.

Начальная активность, оказалась ниже таковой контроля на 13,8 %. Это свидетельствует о том, что АФК, генерируемые в среде Фентона, с высокой скоростью, уже за несколько секунд экспозиции фермента в среде (время, затраченное на перемешивание реагентов) приводят к снижению активности фермента. Это снижение становится наиболее выраженным на 20-й минуте инкубации. Из рис. 1 видно, что инкубация фермента в буфере за этот же промежуток времени приводит лишь к очень незначительному снижению активности фермента. Особое внимание обращает на себя тот факт, что в первые 20 минут инкубации скорость инактивации ЛДГ высокая и составляет примерно 0,096 ед. активности в мин. После 20 минут инкубации скорость снижается, составляя 0,031 ед. активности в мин.

Окислительная модификация отдельных аминокислотных остатков сопровождается глубокими нарушениями структурной организации белков [1]. Происходит изменение молекулярной массы белков (агрегация или фрагментация), денатурация, повышение гидрофобности, снижение изоэлектрической точки, связанное с потерей основных аминокислотных остатков (лизина, аргинина, гистидина), или превращением в результате окисления гистидиновых, пролиновых и цистеиновых остатков в аспарагиновые, глутаминовые и цистеиновые, соответственно. Окисление белков увеличивает вероятность их протеолитического распада. Ответственным за протеолиз окисленных белков в клетках млекопитающих является протеасомный комплекс [13]. Селективный протеолиз может предотвратить накопление в клетке окисленных белков. В противном случае последние образуют агрегаты в связи с увеличением

гидрофобных взаимодействий и дополнительных ковалентных сшивок между молекулами.

Таким образом, окисление боковых радикалов белков приводит к образованию таких продуктов, как карбонильные группы и дисульфиды, которые используются в качестве маркеров окислительного повреждения белков [1]. Содержание дисульфидов увеличивается вследствие окисления сульфгидрильных групп остатков цистеина. Таким образом, по содержанию сульфгидрильных и карбонильных групп в молекуле фермента можно судить о степени её окислительной модификации посредством АФК.

Исследование динамики изменения содержания сульфгидрильных групп в препарате ЛДГ мозга крыс

Была исследована динамика изменения содержания SH-групп в препарате ЛДГ инкубируемом в среде Фентона, содержащей 10^{-3}M FeSO_4 , $3 \cdot 10^{-4}\text{M H}_2\text{O}_2$ и 10^{-3}M ЭДТА .

Оказалось, что инкубация приводит к снижению содержания сульфгидрильных групп за 10 минут на 14,6 %, за 20 минут — на 66,4 % и за 60 минут — на 72,4 %. При этом за этот же период времени изменения содержания SH-групп в контрольном препарате весьма незначительны. Так, например, за 60 минут инкубации содержание SH-групп снижается только на 7 %.

Уровень сульфгидрильных (тиоловых) групп, принадлежащих остаткам цистеина, является важным маркером окислительной модификации белков. Тиоловые группы играют ключевую роль в структуре и катализе ферментов; однако из-за их реактивной природы, они часто являются мишенями свободных радикалов [11]. В условиях окислительного стресса SH-группы белков депротонируются с образованием дисульфидов. Причем это окисление может носить обратимый характер [1]. Несмотря на то, что остатки цистеина не принимают прямое участие в катализе, они могут играть важную роль в формировании функционально значимой конформации ЛДГ [15]. Было показано, что модификация пяти ключевых остатков цистеина в молекуле ЛДГ свободными радикалами способствует изменению её пространственной конфигурации [7].

Исследование содержания карбонильных групп в препарате ЛДГ мозга крыс

Исследование содержания карбонильных групп в препарате ЛДГ, инкубируемом в среде Фентона, показало, что количество карбонильных групп во времени инкубации увеличивается (рис. 3).

Это нарастание не носит линейный характер. Наиболее значимое повышение карбонильных групп на-

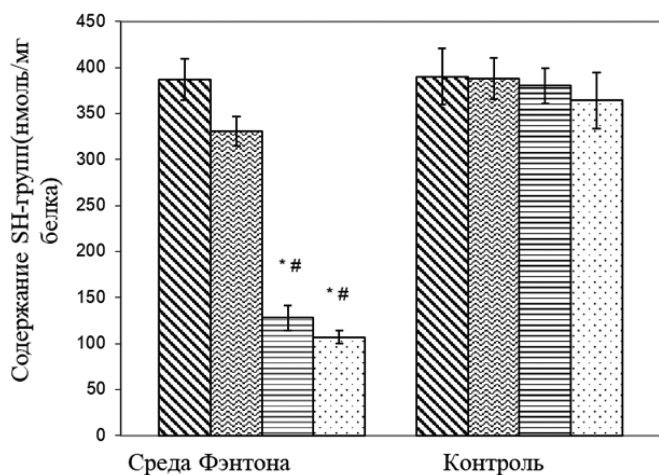


Рис. 2. Динамика изменения содержания сульфгидрильных групп в препарате ЛДГ, инкубированного в среде Фэнтонa, содержащей: 10^{-3} М FeSO₄, $3 \cdot 10^{-4}$ М H₂O₂ и 10^{-3} М ЭДТА.

Примечание: * — достоверность отличий относительно начальных значений, # — достоверность отличий относительно контроля.

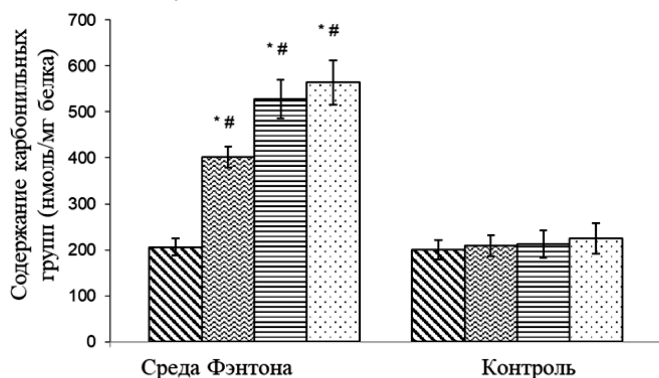


Рис. 3. Динамика изменения содержания карбонильных групп в препарате ЛДГ, инкубированного в среде Фэнтонa, содержащей: 10^{-3} М FeSO₄, $3 \cdot 10^{-4}$ М H₂O₂ и 10^{-3} М ЭДТА.

Примечание: * — достоверность отличий относительно начальных значений, # — достоверность отличий относительно контроля.

блюдалось в первые 10 минут инкубации и составляет 95,4 %. Дальнейшая инкубация фермента в среде также приводит к повышению карбонильных групп (в 2,6 раз за 20 минут и 2,77 раз 60 минут). Однако, это повышение не столь драматично по сравнению с содержанием карбонильных групп в препарате ЛДГ, экспонированном в среде Фэнтонa в течение 10 минут. Из рис. 3 видно, что в контроле содержание карбонильных групп за весь период инкубации фермента в буферном растворе содержание карбонильных групп мало изменяется. Оно становится заметным только на 60-й минуте инкубации, однако это повышение статистически не достоверно и составляет всего лишь 12,1 %.

Корреляционный анализ выявил наличие отрицательной корреляции ($r = -0.88$) между снижением активности ЛДГ и накоплением карбонильных групп в ферментативном препарате в условиях генерации радикалов кислорода.

Известно, что карбонильные производные в белках образуются в результате металлкатализируемого окисления пролиновых, аргининовых, лизиновых, гистидиновых остатков аминокислот [5]. Было показано, что по сравнению с другими формами окислительной модификации белков, механизм их карбонилирования гораздо сложнее, и эта реакция необратима [8]. Поэтому карбонильные группы белков могут являться надежными маркерами окислительной модификации.

Известно, что остатки аргинина171 и гистидина195, локализованные глубоко от поверхности фермента в активном центре ЛДГ, играют важную роль в катализе фермента [10]. Обнаружено, что их химические модификации могут привести к существенному снижению активности ЛДГ [15].

Таким образом, результаты нашего исследования свидетельствуют в пользу того, что ингибирование ЛДГ под действием радикалов кислорода может быть связано с окислительной модификацией остатков положительно заряженных аминокислот, локализованных в активном центре фермента.

Исследование динамики изменений спектров флуоресценции ЛДГ мозга крыс, инкубированной в среде Фэнтонa

Для выяснения возможных механизмов влияния АФК на активность ЛДГ была использована флуоресцентная спектроскопия. Результаты анализа интенсивности суммарной ($\lambda_{\text{возб}} = 280$ нм) флуоресценции ЛДГ в зависимости от времени инкубации фермента с реактивом Фэнтонa представлены на рис. 4.

Как видно из рис. 4 максимум интенсивности суммарной флуоресценции ЛДГ наблюдается при $\lambda = 333$ нм, что может свидетельствовать об основном вкладе в спектр флуоресценции белка остатков триптофана [4]. Это возможно в том случае, когда основная масса триптофанных остатков ЛДГ находится примерно в одинаковом гидрофобном или в достаточно жестком окружении. Было показано, что ядро молекулы ЛДГ отличается достаточно высокой степенью гидрофобности [10]. В полученных спектрах флуоресценция остатков тирозина не обнаруживается, так как значительная доля энергии возбуждения с остатков тирозина мигрирует на триптофаны и высвечивается в качестве триптофанового компонента [2]. На рис. 4 видно, что с увеличением времени инкубации снижается интенсивность флуоресценции

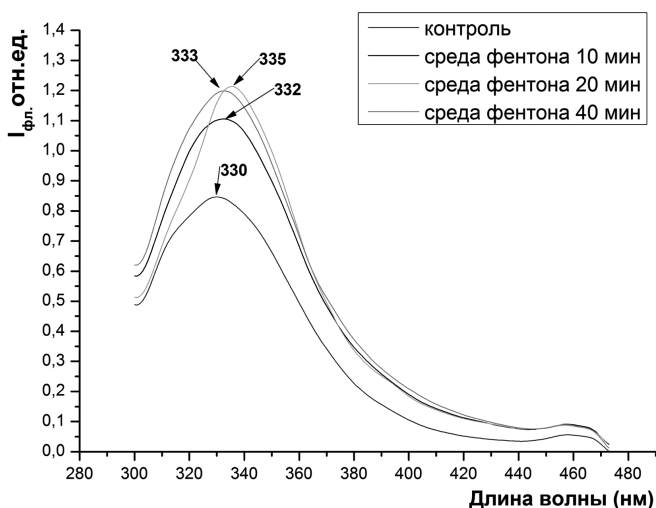


Рис. 4. Динамика изменения спектров флуоресценции ЛДГ мозга крыс, инкубированной в среде Фентона, содержащей 10^{-3}M FeSO_4 , $3 \cdot 10^{-4}\text{M H}_2\text{O}_2$ и 10^{-3}M ЭДТА

ции остатков триптофана, а также происходит смещение пика флуоресценции на 2–5 нм относительно контроля. Эти результаты свидетельствуют о том, что индольное кольцо остатков триптофана в пробе больше экспонируется в среду (растворитель), чем у нативного фермента. Следовательно, радикалы кислорода способствуют разворачиванию молекулы ЛДГ. Относительно небольшое

смещение пика флуоресценции свидетельствует о не-больших конформационных изменениях структуры ЛДГ за период инкубирования ферментативного препарата с реактивом Фентона. Таким образом, смещение пика флуоресценции в красную область может свидетельствовать о том, что под действием радикалов кислорода ЛДГ переходит в состояние «расплавленной глобулы». При этом снижение интенсивности собственной флуоресценции может свидетельствовать об окислении остатков ароматических кислот АФК, генерируемые в среде Фэнтона.

Таким образом, исследование динамики изменения активности ЛДГ мозга крыс в среде Фентона, содержащей 10^{-3}M FeSO_4 , $3 \cdot 10^{-4}\text{M H}_2\text{O}_2$ и 10^{-3}M ЭДТА , показало, что активность фермента со временем снижается. Причем это снижение отрицательно коррелирует с повышением содержания карбонильных групп и положительно коррелирует (за исключением первых 10 минут инкубации) со снижением содержания сульфгидрильных групп в препарате ЛДГ. Данные флуоресцентной спектроскопии также свидетельствуют о существенных изменениях в интенсивности и спектрах флуоресценции ЛДГ, инкубированной в среде Фентона, указывающими на разворачивание белковой молекулы и окисление остатков ароматических аминокислот.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дубинина Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток. Жизнь и смерть, созидание и разрушение монография СПб. 2006. — 400 с.
2. Дюбко Т.С. О некоторых аспектах применения флуоресцентного анализа в криобиологии. Собственная флуоресценция белков. Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія: біологія. 2006. 3 (729): 221–231.
3. Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс. Патологические состояния и заболевания. 2008. 284 с.
4. Онищенко Е.Н., Дюбко Т.С., Семенченко А.Ю. Влияние низкомолекулярных криопротекторов и замораживания на флуоресцентные свойства микросомальных белков. Актуальные проблемы медицины и биологии: Сб. научн. трудов. 2004. — 106–117.
5. Фомина М.А., Абаленихина Ю.В. Способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях: методические рекомендации. Рязань: РИО РязГМУ. 2014. — 60 с.
6. Хавинсон В.Х. и др. Свободнорадикальное окисление и старение. — СПб.: Наука, 2003. — 327 с.
7. Boike L. «An analysis of oxidative damage to lactate dehydrogenase in context of neurodegeneration and catechol-based phenolic antioxidant chemistry». Undergraduate Honors Theses. 2017. — 1144.
8. Dalle-Donne I., Ross R., Guistarini D., Milzani A., Colombo R. Clinica Chimica Acta. 2003. 329. — 23–38.
9. Lowry D.H., Rosembrough H.J., Farr A.L. Protein measurement with the Pholin phenol reagent. J. Biol. Chem, 1951. 193. 265–275.
10. McClendon S, Zhadin N, Callender R. The approach to the Michaelis complex in lactate dehydrogenase: the substrate binding pathway. Biophys J. 2005. 89(3): — 2024–2032. doi: 10.1529/biophysj.105.062604
11. Poole L. B. The Basics of Thiols and Cysteines in Redox Biology and Chemistry Free Radic Biol Med. 2015. 148-157. doi:10.1016/j.freeradbiomed
12. Sayre L.M. Chem. Res. Toxicol. 2008. (21): 172–188.
13. Shringarpure R, Grune T, Davies KJ. Protein oxidation and 20S proteasome-dependent proteolysis in mammalian cells. Cell Mol Life Sci. 2001; 58(10):1442–50. doi: 10.1007/PL00000787.
14. Venditti P, Rosa R.D., Meo S.D. Free Rad. Biol. Med. 2004. 36(3): 348–358.
15. Yanbin Z, Zheng W., Baoyu Q., Xicheng W. Inactivation of Lactate Dehydrogenase from Pig Heart by Phthalaldehyde Tsinghua Science and echnology. 2003. 8(4): 428–433

© Халилов Рустам Абдуразакович (dagbiofak@mail.ru); Джафарова Альбина Мехьядиновна (albina19764@mail.ru); Рабаданова Зухра Гусейновна (r.zukhra@yandex.ru); Джафаров Мурсал Биниевич (mursal-dag@mail.ru) Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»