

УДК 577.391.547.963

АКТИВНІСТЬ ТА ІЗОЗИМНИЙ СПЕКТР ЛАКТАТДЕГІДРОГЕНАЗИ ЕРИТРОЦИТІВ ЩУРІВ ЗА УМОВ ДІЇ ІОНІЗУЮЧОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ НИЗЬКОЇ ІНТЕНСИВНОСТІ

Л. Старикович, Н. Пермякова, Я. Верніковська

Львівський національний університет імені Івана Франка,
вул.Грушевського 4, м. Львів 79005, Україна,
e-mail: kfbh@franko.lviv.ua

Досліджено активність та ізоферментний спектр лактатдегідрогенази еритроцитів щурів за умов дії іонізуючого випромінювання низької інтенсивності впродовж 30-ти діб дозою 0.258 мКл/кг та впродовж 20 діб дозами 0.258, 1.29 і 2.58 мКл/кг у разі щодобового опромінення.

Зафіксовано зростання активності цього ферменту на 10–20-ту добу опромінення з наступним зниженням активності до нормального рівня у термінальні терміни. Вивчення динаміки ізозимного спектра ЛДГ у першій серії дослідів засвідчило перерозподіл ізозимів ЛДГ (H_2M_2 і M_4 -форма) на 20- та 30-ту доби опромінення. Друга серія дослідів виявила, що активація загальної активності ЛДГ супроводжується зростанням відносної активності ізоформи ЛДГ-3 (H_2M_2) та зменшенням ЛДГ-5 (M_4) в разі опромінення щодобово дозами 0.258 і 2.58 мКл/кг. За умов хронічного опромінення 1.29 мКл/кг виявлено зростання фракції ЛДГ-4 (H_1M_3) також завдяки гомоолігомера ЛДГ-5 (M_4).

Ключові слова: еритроцити, лактатдегідрогеназа, ізозимний спектр, іонізуюче випромінювання малої інтенсивності.

Дія іонізуючого випромінювання різної інтенсивності на організми тварин спричиняє зміни активності ферментів вуглеводного обміну [8, 18, 25]. Це явище може бути пов'язане не тільки з радіоіндукованими порушеннями їхньої третинної та четвертинної структури, а й з дією опромінення на різні ланки регуляції ферментативної активності, в тому числі внаслідок варіацій ізозимного спектра [25].

З'ясовано, що зміни активності ферментів можуть бути менш інформативними порівняно зі змінами ізоферментного складу, тобто забезпечення стаціонарного рівня загальної ферментативної активності може відбуватися за умов перерозподілу множинних молекулярних форм ферменту [18, 25]. Головними енергетичними процесами, які забезпечують функціонування червонокривців, є окиснення глюкози в гліколізі та пентозофосфатному шляху. Кінцевим ферментом

гліколізу є лактатдегідрогеназа (ЛДГ), аналіз ізозимного спектра якої може дати уявлення про стан енергозабезпечення.

Дослідження активності та ізоферментного спектра лактатдегідрогенази клітин HeLa людини [25], ЛДГ печінки [4, 13, 16, 20], ЛДГ головного мозку щурів [13], м'язовою тканини [15], ЛДГ сироватки крові [4, 20], а також еритроцитів щурів [1, 2, 17] засвідчило, що за різних умов радіаційного впливу простежуються неоднозначні коливання активності згаданого ферменту після одноразового опромінення або в разі довготривалої дії іонізуючої радіації.

Тому нашою метою було дослідження активності та ізоферментного спектра ЛДГ за умов дії хронічного щодобового опромінення щурів дозою 0,258, 1,29 та 2,58 мКл·кг⁻¹.

На білих лабораторних безпородних щурах-самках масою тіла 150–180 г, яких утримували у віварії на стандартному раціоні, проводили дві серії дослідів. У першій серії дослідів тварин роділяли на 4 групи: перша – контрольні тварини; друга, третя та четверта групи – щурі, яких опромінювали на апараті РУМ-11 із використанням фільтрів Cu 0,5, Al 1,0 з потужністю дози для другої групи 1,075 мКл·кг⁻¹·с⁻¹, а третьої та четвертої – 4.3 мКл·кг⁻¹·с⁻¹, експозиційна щодобова доза становила, відповідно, 0,258, 1,29 та 2,58 мКл·кг⁻¹. Умови опромінення: напруга 170 кВ, сила струму – 10 мА, шкірно-фокусна відстань 178 см. Дозиметричний контроль проводили за допомогою клінічного дозиметра 27–012 (Otto. Schon, Germany). Контрольних і опромінених тварин декапітували під ефірним наркозом на 20-ту добу опромінення, коли сумарні дози становили 5,16, 25,80 та 51,60 мКл·кг⁻¹, відповідно.

У другій серії дослідів тварин розділяли на дві групи: перша – контрольні тварини; друга – щурі, яких опромінювали на апараті РУМ-11 із використанням фільтрів Cu 0,5, Al 1,0 за потужністю дози 1,075 мКл·кг⁻¹·с⁻¹, напругою 140 кВ, силою струму – 5 мА, шкірно-фокусною відстанню 178 см. Контрольних і опромінених тварин декапітували під ефірним наркозом на 10-, 20- та 30-ту доби опромінення, коли сумарні дози, відповідно, становили 2,58, 5,16 та 7,74 мКл·кг⁻¹.

Для досліджень брали гепаринізовану кров і двічі промивали 0,155 моль-розчином хлориду натрію і центрифугували 5 хв при 600 г за умов охолодження. Еритроцити гемолізували додаванням дистильованої води (1:1) та наступним заморожуванням у рідкому азоті. Після розморожування центрифугували 15 хв при 4400 г за умов охолодження і брали гемолізати для подальших досліджень. У гемолізатах досліджували активність ЛДГ [22] та відносну активність ізоферментів методом диск-електрофорезу [23] з візуалізацією за Маркертом [14]. Статистичне опрацювання виконували за Ойвінім [9].

Дослідження активності ЛДГ в еритроцитах у тварин різних груп засвідчило, що в нормі активність коливається у межах від 140 до 250 нмоль NADH·хв⁻¹ на мг білку. Середнє значення, отримане для двох серій дослідів, становило 195 нмоль NADH·хв⁻¹ на 1 мг білка.

У першій серії дослідів, за умов щодобового опромінення дозою $0,258 \text{ мКл} \cdot \text{кг}^{-1}$ на 10- та 20-ту доби експерименту, зафіксовано зростання активності цього ферменту на 85–103 % на 10-, 20-ту добу опромінення з наступним зниженням активності до нормального рівня у термінальні терміни. Виявлені зміни можуть бути зумовлені декількома причинами. Це може бути пов'язане з регуляторними впливами ефекторів, модифікацією ферменту шляхом фосфорилування [10] тощо. За умов дії іонізуючого випромінювання низької інтенсивності домінують ушкодження білково-ліпідних комплексів мембран еритроцитів, тому вірогідне порушення аніонтранспортної системи. Ця система структурно пов'язана з білком смуги 3 [7, 10, 11] і забезпечує певний рівень лактату й пірувату в клітині. Отже, активність ЛДГ може змінюватися внаслідок варіації співвідношення лактат/піруват [10, 12]. Ушкодження мембрани, що виникають у разі опромінення, впливатимуть на роботу цілого гліколітичного метаболону, який пов'язаний з якірним білком смуги 3. Хоча в метаболоні ЛДГ безпосередньо не контактує з цим білком, однак конформаційні варіації під впливом мікрооточення білка смуги 3 можуть передаватися на досліджуваний фермент, змінюючи його конформацію або призводячи до дисоціації його в цитозоль [3, 7, 19]. Різні ізозими ЛДГ відрізняються не тільки кінетичними параметрами, а й спорідненістю до клітинних структур. Домінування того чи іншого ізоферменту ЛДГ з різними кінетичними параметрами завжди пов'язане з певним рівнем лактату й пірувату [12]. Ізозими Н-типу каталізують реакцію перетворення лактату в піруват, а ізоферменти М-типу – зворотний процес; H_4 -ЛДГ максимально активна за низьких концентрацій пірувату, а її надлишок пригнічує активність цього ферменту; M_4 -ЛДГ найактивніша в разі вищих концентрацій пірувату. Гібридні форми ізоферментів ЛДГ посідають проміжне місце між H_4 та M_4 типом [3, 14, 21, 24]. У тканинах із перевагою аеробного обміну речовин переважають ЛДГ-1 та ЛДГ-2, а в тканинах із вираженою здатністю до анаеробного обміну (печінка, скелетна мускулатура) – ЛДГ-4 та ЛДГ-5 [13, 14, 24]. Отже, виявлені зміни активності можуть бути обумовлені змінами ізозимного спектра.

Дослідження залежності швидкості реакції v_0 від концентрації ферменту e (у рівнянні $v_0 = k \cdot e$) дали змогу виявити, що в разі опромінення змінюється значення k і становить $1,00 \pm 0,07$ (норма $0,66 \pm 0,08$), що може бути непрямим доказом перерозподілу в ізозимному спектрі ЛДГ. Ми з'ясували, що ізоферментний спектр ЛДГ еритроцитів щурів представлений п'ятьма головними фракціями, співвідношення яких наведено в табл. 1. Із цих даних випливає, що у нормі в еритроцитах щурів головні компоненти – ЛДГ-4 (H_1M_3) та ЛДГ-5 (M_4), а ЛДГ-1 (H_4) є мінорною фракцією, що значно збігається з дослідженнями ізозимів ЛДГ в еритроцитах мишей [6].

У результаті дії іонізуючого випромінювання за умов щодобового опромінення дозою $0,258 \text{ мКл} \cdot \text{кг}^{-1}$ на 10-ту добу спостерігали зниження відносної активності ЛДГ-4. У найвіддаленіші терміни опромінення ми виявили дещо інший перерозподіл ізозимів; на тлі зростання загальної ферментативної активності достовірно

збільшується ЛДГ-3, а ЛДГ-5 зменшується (див. табл. 1). Однак найсуттєвіші зміни відбуваються уже на 20-ту добу опромінення. Отже, дослідження дії іонізуючого випромінювання цієї дозою впродовж 30-ти діб дало змогу виявити специфічні зміни функціонально кінцевого ферменту гліколізу еритроцитів: зростання активності ЛДГ-3 та зменшення – ЛДГ-5.

Таблиця 1

Відносна активність ізоферментів ЛДГ еритроцитів периферійної крові шурів у разі опромінення щодобовою дозою 0,258 мКл/кг у динаміці експерименту, $M \pm m$, $n = 6$

Варіанти дослідів	Ізоморфи				
	ЛДГ – 1	ЛДГ - 2	ЛДГ – 3	ЛДГ – 4	ЛДГ – 5
Контроль	8,50±2,03	13,86±4,29	11,61±1,02	27,34±3,97	38,69±2,10
на 10-ту добу	10,99±1,08	19,71±2,91	9,92±1,81	14,40±0,50*	44,98±1,99
на 20-ту добу	9,24±2,18	12,56±2,98	26,94±0,44*	22,68±3,13	28,58±0,56*
на 30-ту добу	10,32±1,88	19,65±1,21	30,21±2,89*	25,48±1,78	14,34±1,82*

* Відмінність між контрольними та дослідними результатами достовірна.

Оскільки найбільші зміни ми спостерігали на 20-ту добу опромінення [1, 2, 17], то подальші дослідження ізозимного спектра виконували саме в цей термін радіаційного впливу, опромінюючи шурів щодобовою дозою 0,258, 1,29 та 2,58 мКл/кг. За умов дії іонізуючого випромінювання щодобовою дозою 0,258 мКл/кг та в 10 разів більшою простежується достовірно зростання загальної ферментативної активності ЛДГ (на 6 та 19%, відповідно) та відносної ізоформи ЛДГ-3 і зменшення – ЛДГ-5 (табл. 2). За інших умов опромінення (1,29 мКл/кг) зафіксовано зниження відносної активності ЛДГ-5 та зростання ЛДГ-4 разом зі зростанням на 29 % загальної ферментативної активності.

Таблиця 2

Відносна активність ізоферментів ЛДГ еритроцитів периферійної крові шурів на 20-ту добу опромінення різними щодобовими дозами $M \pm m$, $n = 6$

Щодобова доза, мКл/кг	Ізоморфи				
	ЛДГ – 1	ЛДГ – 2	ЛДГ – 3	ЛДГ – 4	ЛДГ – 5
Контроль	8,50±2,03	13,86±4,29	11,61±1,02	27,34±3,97	38,69±2,10
0,258	9,24±2,18	12,56±2,98	26,94±3,44*	22,68±3,13	28,58±3,56*
1,290	3,00±0,05	13,00±5,13	14,67±4,91	42,33±6,69	27,00±4,04
2,580	4,00±1,00	10,00±2,31	34,66±5,04*	21,67±4,98	29,67±2,68*

* Відмінність між контрольними та дослідними результатами достовірна.

Перерозподіл в ізозимному складі, який ми спостерігали, ймовірно, пов'язаний зі змінами в експресії генів, що забезпечують синтез Н- та М-субодиниць, у

напрямі збільшення частки мономерів М-типу, оскільки інші параметри, які впливають на процес збирання тетрамеру певного типу *in vitro* (розбавлення ферменту, іонна сила, рН) [6, 8], визначені умовами модельного досліду. Можна припустити, що активація ферменту забезпечує зростання співвідношення лактат/піруват на цей термін опромінення, що виявлено в попередніх дослідах [1, 2, 17].

Отже, виявлено зростання гібридних форм ферменту ЛДГ-3 та ЛДГ-4 за умов опромінення сумарними дозами 5,16 та 51,6 мКл/кг. Сумарна доза 25,8 (протягом 20-ти діб) та 2,58 мКл/кг (опромінення впродовж 10-ти діб) спричиняє збільшення активності ЛДГ-4. У всіх варіантах досліду загальною тенденцією було зменшення відносної ферментативної активності ЛДГ-5. Зростання рівня ферментативної активності гетероолігомерів порівняно з гомоолігомерами (M₄ та H₄), які мають інші кінетичні параметри та виявляють меншу спорідненість до клітинних структур, можна розглядати як результат адаптаційних реакцій еритроциту.

1. Великий М.М., Верніковська Я.І., Старикович Л.С. Дослідження впливу вітаміну D₃ на метаболічні процеси в еритроцитах щурів за умов дії екстремальних факторів // Укр. біохім. журн. 1999. Т. 71. № 6. С. 17–22.
2. Великий Н.Н., Старикович Л.С., Коробов В.Н. и др. Влияние хронического воздействия рентгеновского излучения на метаболизм и функционирование эритроцитов // Радиационная биология. Радиоэкология. 1999. Т. 39, В. 4. С. 425–430.
3. Глазко В.И., Созинов И.А. Генетика изоферментов животных и растений. Киев: Урожай, 1993. 523 с.
4. Каменец Л.Я. Влияние локального облучения на изоферментный состав ЛДГ печени крыс // Радиобиология. 1973. Т. 13. Вып. 4. С. 586–588.
5. Карасев В.А., Стефанов В.Е., Курганов Б.И. Надмолекулярные биоструктуры, организация, функционирование, происхождение // Итоги науки и техники. Сер. Биол. Химия, 1989. 200 с.
6. Корочкин Л.И., Серов О.Л., Пудовкин А.И. и др. Генетика изоферментов. М.: Наука, 1977. 275 с.
7. Курганов Б.И. Физико-химические механизмы регуляции активности ферментов // Физ. химия: совр. проблемы / Под ред. И.М.Колотыркина. 1985. С. 180–213.
8. Куцый М.П., Копылов В. А. Влияние ионизирующей радиации на связывание ферментов с субклеточными структурами // Радиобиология. 1976. Т. 16. Вып. 15. С. 810–814.
9. Лакин Г.Ф. // Биометрия. М.: Высшая школа. 1990. 351 с.
10. Луцак В.И. Взаимодействие ЛДГ со структурными компонентами клетки, возможное физиологическое значение // Биохимия. 1992. Т. 57. Вып. 8. С. 1142–1154.
11. Луцак В.І. Утворення надмолекулярних комплексів як шлях регуляції активності гліколітичних ферментів // Укр. біохім. журн. 1996. Т. 68. № 2. С. 20–28.

12. *Островский Ю. М., Величко М.Г., Якубчик Т.Н.* Пируват и лактат в животном организме. Минск.: Наука и техника, 1984. С. 173.
13. *Панских Н.И., Хмель М.В., Кошарная Л.М.* Сравнительная характеристика активности лактатдегидрогеназы головного мозга и печени облученных крыс в условиях гипоксической гипоксии //Вестн. Львов. ун-та. сер. биол. 1984. Вып. 15. С. 28–32.
14. *Райдер К., Тейлор К.* Изоферменты. М.: Мир, 1983. 108 с.
15. *Савицкий И.В., Мардашко А.А.* Состояние лактатдегидрогеназной реакции в мышечной ткани облученных животных.// Радиобиология, 1982. Т. 22. Вып. 3. С. 388–392.
16. *Солонина Е.Д., Алексеева Л.В.* Динамика ЛДГ в ранние сроки после облучения в нелетальной дозе.//Радиобиология, 1982. Т. 22. Вып. 5. С. 669–671.
17. *Старикович Л.С., Верніковська Я.І., Виговська Т.В., Махневич Т.Р.* Дослідження впливу рентгенівського опромінення на структурно-функціональні характеристики еритроцитів щурів і активність окремих ферментів гліколізу// Укр. біохім. журн. 1996. Т. 68. № 6. С. 80–85.
18. *Черкасова Л.С., Миронова Г.М.* Влияние ионизирующей радиации на ферменты углеводного обмена// Радиобиология, 1976. Т. 10. № 3. С. 657–664.
19. *Черницкий Е.Л., Воробей А.В.* Структура и функции эритроцитарных мембран. Минск: Наука и техника, 1981. 200 с.
20. *Шамрай Е.Ф., Каменец Л.Я.* Влияние облучения на изоферментный состав ЛДГ печени и сыворотки крови крыс.// Радиобиология, 1972. Т. 12. Вып. 3. С. 356–359.
21. *Яковлева В.И.* Изоферменты //Усп. биол. химии. М.: Наука, 1968. Т. 9. С. 55–94.
22. *Chapman R.C., Hennessey M.A., Waltersdorf A.M.* The erythrocytes metabolism// J. Clin. Invest. 1962. Vol. 41. N 6. P. 1249–1256.
23. *Davies B.J.* Disk-electrophoresis: Method and application of human serum protein //Ann. N.Y. Acad. Sci. 1964. Vol. 121. N 12. P. 404–415.
24. *Dawson D.M., Goodfriend T.L., Kaplan N.O.* Lactic dehydrogenases. Functions of two types //Science. 1964. Vol. 143. N 3609. P. 929–933
25. *Karher K.H.* Enzymological examination an indication of radiation effects in experiments and clinical practice //Biochem. Indicator of radiation injury man. IAEA. Viena. 1971. Vol. 409. N 17. P. 277–283.
26. *Markert C.L., Moller F.* Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic and species specific patterns //Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1959. Vol. 45. N 5. P. 753–763.

**THE ACTIVITY AND ISOENZYMES COMPONENTS OF THE
ENZYMES IN THE ERYTHROCYTES OF RATS, FOLLOWING
CHRONIC LOW RATE OF IONIZING RADIATION**

L. Starikovich, N. Permyakova, Ya. Vernikovska

*Ivan Franko National University of L'viv,
Hrushevskoho st. 4, L'viv 79005, Ukraine,
e-mail: kfbh@franko.lviv.ua*

It was shown that the X-ray radiation (daily dose 0.258 mKl/kg during of 30 days and daily dose 0.258, 1.29 and 2.58 mKl/kg during of 20 days radiation action) are led to the changes of lactate dehydrogenase activity in the erythrocytes of rats.

The increase of lactate dehydrogenase activity are obtained on the 20-30 days of radiation action.

Chronical effect of low-rate X-ray irradiation make the changes of lactate dehydrogenase isoenzymes composition on the 10 days of irradiation.

Keywords: lactate dehydrogenase, X-ray irradiation, erythrocytes, isoenzymes.

Стаття надійшла до редколегії 29.06.2001

Прийнята до друку 12.07.2001