

## ИНДУКЦИЯ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫХ ИЗОФОРМ МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ И АКОНИТАТГИДРАТАЗЫ В ПЕЧЕНИ КРЫС В УСЛОВИЯХ АЛЛОКСАНОВОГО ДИАБЕТА

Аль Дайни Саба Хади, М. Ю. Сыромятников,  
Гати Моханнад Абдулраззак Гати, А. Т. Епринцев

*Воронежский государственный университет*

Поступила в редакцию 06.10.2011 г.

**Аннотация.** При индукции аллоксанового диабета активность малатдегидрогеназы (МДГ) и аконитатгидратазы (АГ) увеличилась соответственно в 3,6 и 1,9 раза. Соотношение цитоплазматической и митохондриальной форм АГ составляло 40,0 % и 60,0 % в норме и в условиях экспериментального диабета — 51,2 % и 48,8 % соответственно, для МДГ полученные показатели составляли соответственно 43,1 % и 56,9 % в норме и 49 % и 51 % в условиях аллоксанового диабета. При аллоксановом диабете индуцируется новая форма аконитатгидратазы с относительной электрофоретической подвижностью  $R_f$  0,81 и новая форма малатдегидрогеназы с относительной электрофоретической подвижностью  $R_f$  0,15. Предполагается, что появление третьей изоформы АГ и МДГ может быть обусловлено индукцией глиоксилатного цикла в органах крыс в условиях экспериментального диабета.

**Ключевые слова:** аллоксановый диабет, малатдегидрогеназа, аконитатгидратазы, глюконеогенез, глиоксилатный цикл.

**Abstract.** The induction of alloxan diabetes aconitate hydratase (AH) and malate dehydrogenase (MDH) activity increased respectively by 3.6 and 1.9. Ratio of cytoplasmic and mitochondrial forms of AH was 40.0% and 60.0% in normal conditions, in experimental diabetes — 51.2 % and 48.8 %, respectively, for the MDH obtained values were respectively 43.1 % and 56.9 % normal and 49 % and 51 % in alloxan diabetes. In alloxan diabetes induced by a new form of aconitate hydratase with a relative electrophoretic mobility  $R_f$  0,81 and a new form of malate dehydrogenase with a relative electrophoretic mobility  $R_f$  0,15. It is assumed that the appearance of the third isoform of MDH and AH may be due to induction of glyoxylate cycle in rat organs in experimental diabetes.

**Keywords:** alloxan diabetes, malate dehydrogenase, aconitate hydratase, gluconeogenesis, glyoxylate cycle.

### ВВЕДЕНИЕ

Известно, что основным энергетическим субстратом в клетках и тканях организма выступают углеводы. Постоянное поступление глюкозы в качестве источника энергии особенно необходимо для нервной ткани и эритроцитов. При экспериментальном диабете ткани испытывают недостаток в глюкозе. В качестве механизма адаптации к данному процессу выступает глюконеогенез. Он имеет особенно важное значение в печени, которая является главным метаболически активным органом, участвующим в поддержании гомеостаза глюкозы. Соотношение между процессами катаболизма и анаболизма глюкозы в клетках печени находится под контролем целого ряда факторов регуляции, включая концентрацию метаболитов,

нуклеотидов, а также воздействие гормонов. В нормальных условиях глюконеогенетические трансформации в печени млекопитающих протекают с относительно низкой скоростью. Интенсификация данного процесса наблюдается при дефиците углеводов, в частности при диабете [1, 2].

Кроме того, при адаптации клеточного метаболизма к изменениям условий среды организм использует стратегию регуляции активности ферментного аппарата клетки. Важная роль в осуществлении адаптивных реакций организма принадлежит малатдегидрогеназной и аконитатгидратазной ферментным системам. Малатдегидрогеназа (МДГ, К.Ф.1.1.1.37) и аконитатгидратаза (АГ, КФ 4.2.1.3), являясь полифункциональными ферментными комплексами, обеспечивает протекание конструктивного и энергетического обменов.

Наличие в клетке различных процессов, связанных с функционированием одного или несколь-

© Аль Дайни Саба Хади, Сыромятников М. Ю., Гати Моханнад Абдулраззак Гати, Епринцев А. Т., 2012

ких ферментов требует сложной многоуровневой регуляции активности. К механизмам такой регуляции причисляют пространственно разделенные изоформы, имеющие различные кинетические характеристики и структуру молекул фермента. В связи с этим большой интерес представляет изучение действия экспериментального диабета на структурно-функциональные трансформации малатдегидрогеназы и аконитатгидратазы в гепатоцитах крыс. Исходя из этого, целью данной работы явилось исследование особенностей функционирования аконитатгидратазы и малатдегидрогеназы в клетках печени крыс в условиях аллоксанового диабета.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали самцов беспородных лабораторных крыс (*Rattus rattus* L.) массой 180—200 г., которые выращивались в виварии при нормальном питании. Индукция диабета осуществлялась введением подкожно 5 % аллоксана (100 мг/кг веса, раствор в 0,9 % NaCl). Наличие аллоксанового диабета у крыс определяли по уровню изменения концентрации глюкозы в плазме крови. Для получения печени опытных животных проводили декапитацию. Для получения ткани печени опытных животных предварительно усыпляли хлороформом и проводили декапитацию. Печень гомогенизировали со средой выделения (1 : 4) следующего состава: 50 мМ трис-HCl буфер с pH 7,5; 4 мМ  $MgCl_2$ ; 3 мМ ДТТ; 2 мМ ЭДТА. Осаждение неразрушенных тканей осуществляли центрифугированием при 7000 g в течение 15 мин. Осадок, содержащий в основном клеточные стенки, отбрасывали. Надосадочную жидкость (супернатант), содержащий изучаемый фермент, использовали для дальнейших исследований. Дифференциальное центрифугирование проводили по методике описанной ранее [3].

Активность малатдегидрогеназы измеряли спектрофотометрически при 340 нм по изменению оптической плотности реакционных смесей, определяемой скоростью расходования НАДН. Среда содержала 50 мМ трис-HCl буфер, pH 7,5; 1,5 мМ оксалоацетат и 0,15 мМ НАДН, 5 мМ  $MgCl_2$ , 4 мМ ДТТ.

Для определения активности аконитатгидратазы использовался метод, основанный на учете разности поглощения цитрата и изоцитрата по сравнению с цисаконитатом. Показателем активности являлось возрастание плотности раствора при 240 нм за счет образования цисаконитата.

Среда содержала 50 мМ трис-HCl буфер, pH 7,8; 4 мМ изоцитрат Na; 1 мМ  $MgCl_2$ .

За единицу активности принимали количество фермента, превращающее 1 мкМ субстрата или образующее 1 мкМ продукта за 1 минуту при 25 °C и оптимальном значении pH. Активность ферментов выражали в ферментативных единицах (Е) в расчете на г сырой массы или на мг белка животного материала. Определение общего количества белка проводили по методу Лоури [4].

Электрофоретические исследования белков проводили в 7,5 % ПААГ [5]. Специфическое проявление аконитатгидрогеназы осуществляли тетразолиевым методом [6].

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Введение аллоксана подопытному животному способствовало увеличению концентрации глюкозы в крови до 15,8 ммоль/л через 10 дней после инъекции. У контрольных животных концентрация глюкозы составила порядка 5,5 ммоль/л. Воздействие аллоксана приводит к разрушению  $\beta$ -клеток островков в поджелудочной железе, вследствие чего возникает недостаток инсулина и развивается ИЗСД (рис. 1).

После выработки аллоксанового диабета активность МДГ и АГ увеличилась соответственно в 3,6 и 1,9 раза (табл. 1). Выявленное увеличение активности аконитатгидратазы и малатдегидрогеназы свидетельствует об ускорении метаболических процессов, в функционировании которых участвуют данные ферменты. Активация митохондриальных окислительных процессов, по-видимому, играет решающую роль в энергообеспечении клет-

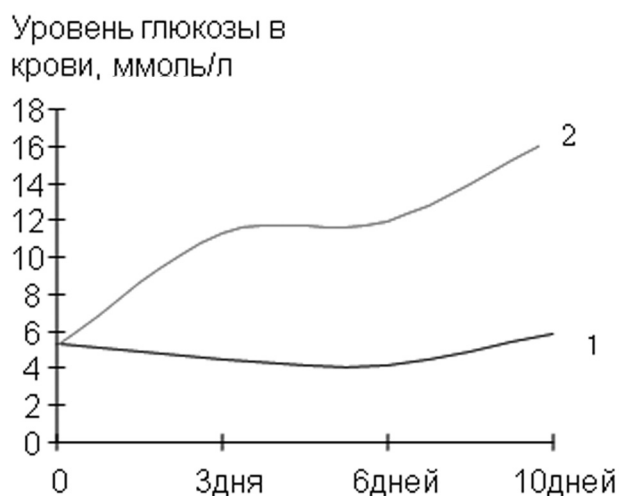


Рис. 1. Динамика изменения уровня глюкозы в крови у крыс: 1 — контрольные животные; 2 — животные с индуцированным аллоксановым диабетом

Таблица 1

Изменение активности аконитатгидратазы  
и малатдегидрогеназы в печени крыс ( $n = 5$ ,  $p < 0,05$ )

| Ферменты | Контроль,<br>Е/г.с.м. | Контроль,<br>Е/мг белка | Опыт,<br>Е/г.с.м. | Опыт,<br>Е/мг белка |
|----------|-----------------------|-------------------------|-------------------|---------------------|
| МДГ      | $0,27 \pm 0,01$       | $0,006 \pm 0,003$       | $0,66 \pm 0,01$   | $0,022 \pm 0,001$   |
| АГ       | $1,48 \pm 0,01$       | $0,041 \pm 0,002$       | $2,30 \pm 0,02$   | $0,077 \pm 0,004$   |

ки в стрессовых условиях, когда затраты организма на биосинтезы и поддержание гомеостаза существенно повышаются [7, 8]. Цитоплазматические же аконитатгидратаза и малатдегидрогеназа могут играть двойственную роль. Во-первых, превращение цитрата в изоцитрат поставляет субстрат для NADP-зависимой изоцитратдегидрогеназы для последующего образования глутамата [9], а, во-вторых, увеличение активности цитозольной аконитазы и малатдегидрогеназы может обеспечиваться индукцией ферментов глиоксилатного цикла в гепатоцитах при аллоксановом диабете.

У опытных крыс, подвергшихся воздействию аллоксанового диабета, наблюдается более чем двухкратное увеличение активности МДГ и АГ в гепатоцитах крыс. При этом данные полученные по распространению АГ и МДГ в различных клеточных компартментах печени крыс свидетельствуют о наличии двух пулов активности: цитоплазматической и митохондриальной. Соотношение цитоплазматической и митохондриальной форм АГ

составляло 40,0 % и 60,0 % в нормальных условиях, в условиях экспериментального диабета — 51,2 % и 48,8 % соответственно. Для МДГ полученные показатели составляли соответственно 43,1 % и 56,9 % в норме и 49 % и 51 % в условиях аллоксанового диабета (рис. 2).

Для решения вопроса об активации при аллоксановом диабете тех или иных метаболических процессов, связанных с малатдегидрогеназной активностью проводили изучение ее изоферментного состава. Электрофоретические исследования, проведенные в полиакриламидном геле, показали, что по сравнению с контрольными животными, в гепатоцитах которых присутствуют две изоформы МДГ<sub>2</sub> и МДГ<sub>1</sub> с Rf 0,22 и 0,34 соответственно, у животных с экспериментальным диабетом появляется дополнительная изоформа МДГ<sub>3</sub> с коэффициентом электрофоретической подвижности Rf 0,15 (рис. 3).

При исследовании изоферментного состава аконитатгидратазы из гепатоцитов печени крыс

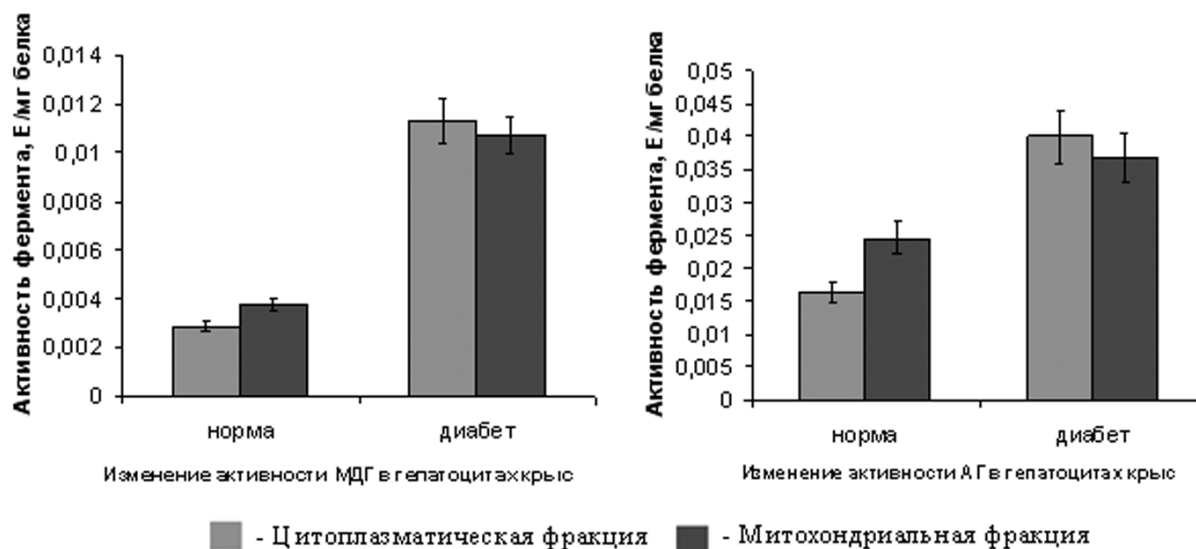


Рис. 2. Изменение активности малатдегидрогеназы и аконитазы в гепатоцитах крыс при экспериментальном диабете

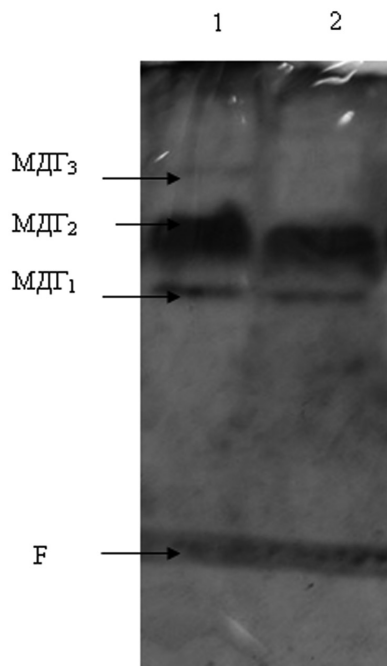


Рис. 3. Электрофоретическое разделение изоформ малатдегидрогеназы из печени крыс: 1 — животное с индуцированным аллоксановым диабетом; 2 — контрольное животное; F — фронт красителя бромфенолового синего

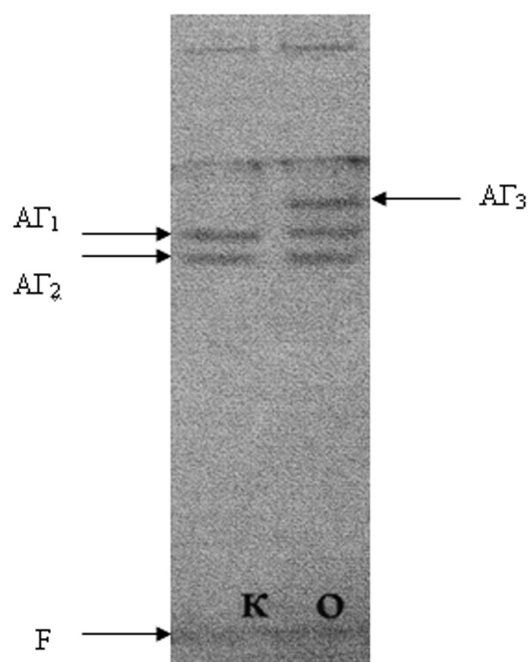


Рис. 4. Изоферментный состав аконитатгидратазы из печени крыс F — фронт красителя (бромфеноловый синий); к — контроль; о — опыт (диабет)

были обнаружены две молекулярные формы фермента: быстро- и медленнодвижущаяся изоформа аконитазы. Значения Rf составили 0,62 и 0,7. При проявлении АГ из опытных животных (больные диабетом), наблюдалось появление третьей белковой полосы, отличной по электрофоретической подвижности от вышеупомянутых изоформ (рис. 4). Индуцированная изоформа из клеток печени характеризовалась более медленной скоростью движения по гелю и ее Rf составила 0,84.

Таким образом, увеличение активности и появление новой изоформы МДГ и АГ в печени крыс при диабете подтверждают возможность участия малатдегидрогеназной и аконитатгидратазной ферментной системы в адаптивной реакции организма при стрессовых условиях. Роль малатдегидрогеназы и аконитатгидратазы в адаптации к изменяющимся условиям среды сводится к интенсификации глюконеогенетических и дыхательных процессов, ускорению внутриклеточного транспорта углеродных соединений. Кроме того, появление дополнительной изоформы АГ и МДГ свидетельствует, по-видимому, об индукции дополнительного метаболического пути — глиоксилатного цикла, в органах крыс в условиях экспериментального диабета.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Епринцев А. Т. Экспрессия и регуляция ферментов глиоксилатного цикла / А. Т. Епринцев, В. Н. Попов, М. Ю. Шевченко. — Воронеж: Центрально-Черноземное книжное изд-во, 2005. — 224 с.
2. Физико-химические характеристики малатдегидрогеназы из бактерий *Rhodopseudomonas palustris* штамм f8pt / А. Т. Епринцев [и др.] // Биохимия. — 2006. — Т. 71, вып. 6. — С. 856—860.
3. Северин С. Е. Практикум по биохимии / С. Е. Северин. — 1989. — 509 с.
4. Lowry O. Protein measurement with the Folinphenol reagent / O. Lowry, N. Rosenbrough, A. Farr. // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 194. — P. 265—275.
5. Davis B. J. Disk Electrophoresis. Method and application to human serum proteins / B. J. Davis, R. G. Jones, G. R. Farmer // Ann. N.Y. acad. sci. — 1964. — Vol. 121. — P. 404—427.
6. Епринцев А. Т. Очистка и некоторые свойства аконитатгидратазы из щитков кукурузы // А. Т. Епринцев, Л. А. Землянухин, М. П. Алексюк // Биохимия. — 1995. — Vol. 80(8). — С. 1244—1250.
7. Игамбердиев А. У. Логика организации живых систем / А. У. Игамбердиев // Воронеж: ВГУ, 1995. — С. 30—112.
8. Хочачка П. Биохимическая адаптация. / П. Хочачка, Дж. Сомеро. — М.: Мир, 1988. — С. 311—337.
9. Glusker J. P. Aconitase / J. P. Glusker // Enzymes. New York-London, 1971. — Vol. 5. — P. 413—439.

*Епринцев Александр Трофимович* — профессор, доктор биологических наук, зав. кафедрой биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет; тел.: (473) 225-05-63 e-mail: bc366@bio.vsu.ru

*Аль Дайни Саба Хади* — аспирант кафедры биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет; тел.: (960) 127-45-68. e-mail: bc366@bio.vsu.ru

*Сыромятников Михаил Юрьевич* — биолог кафедры биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет; тел.: (473) 220-88-77, тел. 8-920-217-97-11. e-mail: bc366@bio.vsu.ru

*Гати Моханнад Абдулраззак* — аспирант кафедры биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет; тел.: (951) 559-12-65, e-mail: bc366@bio.vsu.ru

*Eprintsev Alexander T.* — professor, Sc.D., Head. of the department of biochemistry and cell physiology, Voronezh State University; tel.: (473) 225-05-63, e-mail: bc366@bio.vsu.ru

*Saba Benayed Hadi* — graduate student, department of Biochemistry and Cell Physiology, Voronezh State University; tel.: (960) 127-45-68, e-mail: bc366@bio.vsu.ru

*Syromyatnikov Mikhail Yu.* — biologist, department of Biochemistry and Cell Physiology, Voronezh State University; tel.: (473) 220-88-77, e-mail: bc366@bio.vsu.ru

*Gati Mohannad Abdulrazzak* — a graduate student, department of Biochemistry and Cell Physiology, Voronezh State University; tel.: (951) 559-12-65, e-mail: bc366@bio.vsu.ru