



т. 7, № 2, 1988

УДК 577.158:612.822.1:612.273

# ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИЧЕСКИХ СВОИСТВ ИЗОФЕРМЕНТОВ МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ МОЗГА КРЫС ПРИ ГИПОКСИИ

#### ХВАТОВА Е. М., ГАРСИЯ А.

Горьковский государственный медицинский институт им. С. М. Кирова

Изучены кинетические показатели прямой и обратной малатдегидрогеназной реак-Цин в цитоплазматической и митохондриальной фракциях мозга крыс в норме и при кислородном голодании. Для интактиых животных хазактерна классическая кинетика для малата и NAD в обеих субклеточных фракциях. Вместе с тем, кинетика аля NADH имеет существенные отлачия от классической: кривые насыщения цитоплазматической и митохондриальной малатдегидрогеназы имеют S-образную форму, в координатах Лайнуивера-Берка графики представлены вогнутыми кривыми. При тя желом нарушении кровоснабжения мозга отмечены существелным кривыми. При тя желом нарушении кровоснабжения мозга отмечены существелным кривыми. При тя желом нарушении кровоснабжения мозга отмечены существелным факциях мозга. Нанболее значимые изменения выявлены в митохондриях: кривая насыщения фермента NADH приобретает гиперболическую форму, отмечена полная липеаризация графика в координатах Лайнуивера-Берка, изиснены значения начальных скороетей реакции. В координатах Аайнуивера-Берка, изиснены значения начальных скороетей реакции. Тажже К<sub>ти</sub> и максимальной скорости реакции. Выявлены изменения начальных скоростей, К<sub>ти</sub> и V также для цитоплаяматической малатдегидрогеназы.

Адекватная функция ткани мозга обеспечивается ее высокой энергопродукцией, связанной с аэробным метаболизмом глюкозы. Этот процесс в большой мере зависит от скорости реокисления гликолитяческого NADH в дыхательной цепи митохондрий. В мозгу млекопитающих самой мощной системой генерирования цитоплазматического NAD является малат-аспартатный шунт, работа которого во многом определяется каталитическими свойствами цитоплазматического и митохондриального изоферментов малатдегидрогеназы (иМДГ, мМДГ). В предыдущих работах нами показано изменение активности изоферментов МДГ при гипоксии мозга [1, 2], однако природа этого явления остается неясной.

Настоящее исследование посвящено изучению каталитических свойств изоферментов малатдегидрогеназы в цитоплазматической и митохондриальной фракциях головного мозга в условиях кислородного голодания.

С этой целью определяли кинетические характеристики малатде-<sup>г</sup>идрогеназной реакции для мМДГ и цМДГ моэга животных в разных условиях экспериментального нарушения доставки кислорода.

#### Матерналы и методы

Изучение кинетических характеристик прямой и обратной малатдегидрогеназной реакции проводили в митохондриальной и цитоплазматической фракциях мозга половозрелых крыс-самцов. Кислородное голодание головного мозга достигалось снижением атмосферного давления или нарушснием кровоснабжения мозга. В последнем случае осуществляли двустороннюю перевязку общих сонных артерий с последующей 18-часовой экспозицией животных. Изменение содержания кислорода во вдыхаемом воздухе создавали в барокамере проточного типа за счет снижения атмосферного давления до 143 мм рт. ст. с экспозицией 30 мин.

Субклеточные фракции ткани мозга получали методом дифференциального центрифугирования [3].

Скорость малатдегидрогеназной реакции регистрировали общепринятым спектрофотометрическим методом по изменению концентрации NADH. Прямую малатдегидрогеназную реакцию (малат+NAD→IЩУК+NADH) изучали по Aspray и соавт. [4]. Фиксированная концентрация NAD составляла 1,24 мМ, при этом концентрация малата менялась от 0,275 до 17,6 мМ. Кинетические характеристики для NAD изучали при фиксированной концентрации малата 8,8 мМ и нарастающих концентрациях NAD от 0,0325 до 1.24 мМ. Обратная реакция (ЩУК+NADH→малат+NAD) изучалась в системе. предложенной Foster, Harrison [5]. Концентрация ЩУК составляла постоянно 0,1 мМ. концентрация NADH варьиропала от 0,00625 до 0,4 мМ.

Значения начальных скоростей реакции определяли математически [6]. К<sub>ш</sub> и V рассчитывали по Корниш-Боулену [7]. Анализ зависимести начальной скорости реакции от концентрации субстратов проводила: в поямых величинах и в координатах Лайнунвера-Берка (график двойных сбратных величина). Концентрацию белка определяли по Lowry и соавт. [8].

# Результаты и обсуждение

Изучены кинетические характернстики прямой и обратной реакции для МДГ цитоплазматической и митохондриальной фракций мозга интактных животных. Показано, что кривые насыщения ферментов NAD имсют классическую гиперболическую форму (рис. 1). Аналогичны им по форме и кривые насыщения малатом. Вместе с тем, кривые насыщения ц- и мМДГ восстановленным коферментом имеют существенные отличия от классической кинетики (рис. 2, а). Для цМДГ график имеет выраженную S-сбразную форму с точкой перегиба при концентрации NADH 50 мкМ. Фермент насыщается при концентрации кофермента 150 мкМ. В координатах Лайиуивера-Берка график представлен вогнутой кривой. мМДГ, для которой характерна такая же форма кривой насыщения NADH. насыщается при концентрации восстановленного кофермента 200 мкМ.

Значения К<sub>п</sub> и V для прямой и обратной реакции представлены в таблице. Установлено, что К<sub>п</sub> для коферментов более чем на порядок ниже, чем для малата—субстрата реакции. 226 При острой барометрической гипоксии в цитоплазматической и митохондриальной фракциях мозга установлены неоднозначные изменения кинстических характеристик прямой и обратной малатдегидрогеназной реакции. Для малата и NAD они практически не изменились по сравнению с интактными животными: форма графиков зависимости скорости реакции от концентрации малата и NAD осталась гиперболической, значения K<sub>m</sub> и V существенно не изменились. Вместе с тем, в кинетическия характеристиках обратной реакции установлены существенные изменения.



Рис. 1. Кривые насыщения NAD для изоферментов МДГ мозга интактных животных. 1-цМДГ, 2-мМДГ

Для цМДГ характерно двукратное падение K<sub>m</sub> для NADH при некотором снижении V, показано достоверное изменение зависимости начальной скорости реакции от концентрации NADH (рис. 2, 6). Хотя форма кривой насыщения не изменена, и график остается S-образным, значения начальных скоростей реакции при концентрациях NADH до 75 мкМ достоверно увеличены. Насыщение фермента достигается при меньших концентрациях (75 мкМ). В координатах Лайнуивера-Берка график имеет форму вогнутой кривой, ингибирование избытком NADH не проявляется. То есть при гипоксии цМДГ приобретает способность окислять NADH с высокой скоростью в значительно расширенном диапазоне его концентраций.

Для мМДГ также установлено существенное отличие кинстических показателей реакции окисления NADH в отличие от аналогичных показателей контрольной группы (рис. 2, 6). Наибольшие изменения касаются зависимости скорости реакции окисления NADH от его концентрации. Показано, что при всех изученных концентрациях восстановленного кофермента начальные скорости реакции снижены, наиболее выраженное синжение начальных скоростей отмечается при концентрациях. превышающих насыщающую (75 мкМ). В координатах Лайнуивера-Берка графики аля интактных животных и животных в состоянии кислородного голодания близки по форме.

При тяжелой ишемии в цитоплазматической фракции мозга отмечено более чем двукратное снижение Km для NADH, сопровождающееся уменьшением V (табл.). Исследование начальных скоростей реакции и их зависимости от концентрации восстановленного кофермента выявило существенные изменения в кинетике реакции (рис. 2, в). При низких концентрациях NADH (до 75 мкМ) начальные скорости реакции значительно превышают соответствующие значения у контрольной группы.

227



желой ишемией (в). 1-иМДГ, 2-мМДГ

фермент быстрер насыщается кофактором реакции (при концентрациях 75—100 мкМ). Сехраняется S-образная форма графика зависимости скорести реакции от концентрации NADH.

В митохондриальной фракции выявлено двукратное снижение К для NADH, сопровождающееся уменьшением V (табл.). Такое снижение кинетических показателей реакции согласуется с изменением характера кривой зависимости скорости реакции от концентрации NADH, которая приобретает гиперболическую форму (рис. 2, в). График двойных обратных величин для мМДГ мозга животных с ишемией имеет линейную форму, характерную для классических ферментов, подчиняющихся уравнению Михаэлиса-Ментен.

Таблица

Условия яксперимента		Реакция окисления малата			Реакция окисления NADH	
		Кті но **алату (мМ)	Km ne NAD(MM)	V (имоль NADH/мг белка/мии)	Km no NADH (MM)	V (имоль NADH/мг белка/мин)
Интактные жноотные	цМДГ мМДГ	1.16	0,100 0,098	532,50 372,50	0,0833 0,0666	4654.0 3540.0
Барометриче- ская гиноксия	аМДГ мМДГ	1,05	0.110 0,118	616,50 511,97	0.0370 0.0400	3750.0 2310.0
Ишемия мозга	иМДГ мМДГ	-	-	-	0,0357 0,0313	3750.0 2727.0

Клиетические характеристики митохондриальной и цитоплазматической малатдегидрогеназы мозга интактиых животных и животных с барометрической гилоксией и ишемией

Изучение каталитических свойств малатдегидрогеназы в митохондриальной фракции мозга показало, что для мМДГ характерно подчинение уравиению Михаэлиса-Ментен в случае малата и NAD и отклонение от классической кинетики для реакции окисления NADH. Характер отклоцения позволяет предположить проявление мМДГ моэга положительной кооперативности по NADH. Ранее показано, что классическая кинетика у мМДГ проявляется при солюбилизации фермента с митохондриальной мембраны [9, 10], тогда как связанный с мембранами фермент проявляет неклассическую кинетику [11, 12]. Это позволило нам высказать положение о важности мембранного механизма в регуляции кинетических свойств в активности фермента.

Изучение кинетических характеристик малатдегидрогеназной реакции в митохондриальной фракции мозга при кислородном голодании разной природы показало высокую изменчивость этих показателей. Установлена потеря проявления мМДГ неклассической кинетики по NADH при ишемии мозга. При этом состоянии функция насыщения фермента NADH становится гиперболической, что связано, по-видимому, с потерей ферментом способности регулироваться по адлостерическому типу. Такие изменения каталитических свойств фермента могут объясняться нарушением связи между мМДГ и митохондриальной мембраной.

что иМДГ, очищенная Известно, 113 разных тканей, харакклассической кинстикой лля всех субстратов теризуется н коſ13. 14]. Нами ΜДΓ реакции что ферментов показано, цитоплазматической фракции мозга имеет существенные отклонения от кинстики, проявляющиеся в S-образной классической функции насышення фермента NADH. Причиной, обусловливающей такие отклонения, может быть одновременно действие нескольких кинетически отличающихся форм фермента или конформационная перестройка фермента как результат его взаимодействия с другими белками или мембранами. Для иМДГ различных тканей установлено наличие двух отличающихся по физико-химическим и кинетическим похазателям форм фермента [15-17]. Так как сбе формы иМДГ характеризуются классической кинетикой по значениями Ка для восстановленного кофермента, NADH и близкими их совместное действие должно проявиться выпуклой кривой в координатах Лайнунвера-Берка как результат последовательного насыщения каждой формы [18]. Из этого следует, что найденная нами S-образная функция насыщения фермента в цитоплазматической фракции не может быть результатом одновременного деиствия двух классических по своей кинстике форм иМДГ.

Связывание <u>и</u>МДГ в <u>и</u>итоплазме с другими белками весьма вероятно, так как показана возможность образования комплекса между очнщенными <u>и</u>МДГ и <u>и</u>итоплазматической аспартатаминотрансферазой [19]. Другой возможной причиной найденных отклонений в кинетике реакции может быть связывание <u>и</u>МДГ с мембранами <u>и</u>итоплазмы (например. эндоплазматической сети или/и другими). Это тем более вероятно, что близкая <u>и</u>МДГ по ряду физико-химических свойств мМДГ сиособна связываться с внутренней мембраной митехондрий, проявляя при этом неклассическую кинетику [11, 12].

При изучении кинетических характеристик МДГ в цитоплазматической фракции мозга при гипоксии различного происхождения установлено, что, в отличие от мМДГ, характер насыщения фермента восстановленным коферментом является стабильным показателем. Функция насыцения иМДГ NADH во всех изученных состояниях сохраняет S-образную форму, что свидетельствует об устойчивости механизма аллостерической регуляции активности фермента. Однако остальные кинетические характеристики реакции при этом подвержены большой изменчивости.

Таким образом, проведенные исследования показали наличие различий в стабильности кинетических свойств малатдегидрогеназы митохондриальной и цитоплазматической фракции мозга.

### STUDY OF KINETIC PROPERTIES OF HYPOXYC RATS MDH ISOENZYMES

#### KHVATOVA E. M., GARSIA A.

## S. M. Kirov Medical School, Gorky

Kinetics of MDH--catalyzed reaction in brain mitochondrial (m) and cytosolic (c) fractions has been studied in control and hipoxic mice. Classic kinetics for malate and NAD both for mMDH and cMDH have been detected in control animals; in the case of NADH S-shaped curve has been obtained for either mMDH or cMDH. In hypoxy the kinetics of MDH-catalyzed reaction change essentially, especially for mMDH: saturation curve for NADH becomes hyperbolic. Lineweaver & Berk graf-linear  $K_m$ ,  $V_n \& V_{nat}$  values alter in hypoxy either for mMDH or cMDH.

### **ΛИТЕРАТУРА**

- Хватова Е. М., Шлапакова Т. И., Лавровский С. Н., Савельева С. Н., Дерябина Т. И.-В кн.: Дегидрогеназы в норме и натологии (под ред. Е. М. Хватопой). с. 63-66, Горький, 1980.
- Гарсия А., Ерлыкина Е. И., Шлапакова Т. И., Хохлова Т. С.—В кн.: Механизмы и коррекция восстановительных процессов мозга (под ред. А. Г. Гретена), с. 50—54, Горький, 1982.
- Fonyo A., Somogyi J. Acta physiol. Acad. Sci. Hung., v. 18, № 3, p. 191-198, 1960.
- Aspray T. E., Rihimaki G. M., Wolfe R. G. J. Biol. Chem., v. 254, p. 1576-1579, 1979.
- Foster M., Harrison J. H. Biochem. Biophys. Ros. Commun., v. 64, p. 528-534, 1975.
- 6. Atkins G. L., Nimmo I. A. Anal. Biochem., v. 104, p. 1-9, 1980.
- 7. Корниш-Боулен Э. Основы ферментативной кинстихи, М., Мир, 1979.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem. v. 193, p. 265-275, 1951.
- 9. Хватова Е. М., Гарсия А. Нейрохимия, т. 5, № 3, с. 270-277, 1986.
- 10. Kashiwamata S., Niwa F., Katoh R. J. Neurochem., v. 24, No 1, p. 189-191. 1975.
- Хаатова Е. М., Гарсия А.—В кн.: 16-я конференция фелерации Еврепейских биохимических обществ, с. 180, М., 1984.
- 12. Хватова Е. М., ГарсияА., Корянин А. С.—В кн.: Всесоюзный бнохимический съсзл. т. 2. с. 232—233. М., Наука, 1986.
- 13. Kitto G. B., Kaplan N. O. Biochemistry, v. 5, p. 3966 3900, 1966.
- 14. Kashiwamata S., Niwa F., Kutoh R. J. Neurochem., v. 25, No 1, p. 79-81, 1975.
- 15. Busquets M., Baro J., Cortes A., Bozal J. Int. J Biochem., v. 10. p. 823--835. 1979.
- 16. Baro J., Cortes A., Fas J. B. Int. J. Biochem., v. 13. p. 453-469, 1981.
- 17. Sorribas A., Putg J., Cortes A., Bozal J. Int. J. Biochem., v. 13, p. 355-364, 1981.
- 18. Курганов Б. И. Аллостерические ферменты, М., Наука, 1978.
- 19. Backman L., Yohansson G. FEBS Lett, v. 65, p. 39-4?, 1975.

Полтупила 12, 1 1988

231