

КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ И ПЕЧЕНИ ОЗЕРНОЙ ЛЯГУШКИ (*PELOPHYLAX RIDIBUNDUS*) ЗАВИСЯТ ОТ ЭКОЛОГО-ГЕОГРАФИЧЕСКОЙ ЛОКАЦИИ ЕЕ В ПОПУЛЯЦИИ

© 2023 г. З. Г. Рабаданова^{1,*}, А. М. Джафарова¹

¹Дагестанский государственный университет, Махачкала, Республика Дагестан, Россия

*e-mail r.zukhra@yandex.ru

Поступила в редакцию 19.05.2023 г.

После доработки 30.10.2023 г.

Принята к публикации 30.10.2023 г.

Озерная лягушка (*Pelophylax ridibundus*) имеет обширный ареал распространения, что обусловлено множеством приспособлений, способствующих развитию толерантности к широкому диапазону физико-химических факторов окружающей среды. Особый интерес представляют адаптации этих животных к различному уровню кислорода в условиях средне- и высокогорья. В данной работе проведен сравнительный анализ кинетических параметров лактатдегидрогеназы (ЛДГ) печени озерных лягушек, обитающих в горных и равнинных районах Дагестана. Отловленных в местах обитания животных декапитировали, выделяли печень и икроножные мышцы, которые помещали в жидкий азот. В лаборатории отобранные ткани гомогенизировали и методом дифференциального центрифугирования получали безмитохондриальный цитозоль, в котором определяли активность ЛДГ. Обнаружено, что активность ЛДГ значительно выше в тканях лягушек из горных районов: на 42.4% в мышцах и в 2.38 раза в печени ($p < 0.05$). Высокая эффективность катализа обеспечивается за счет существенных изменений каталитических параметров фермента: увеличения $V_{\max}$ (50.9% в мышцах и на 70% в печени, $p < 0.05$) и снижения K_m (на 45.9% в мышцах и на 69% в печени, $p < 0.05$). Более выраженная, по сравнению с мышцами, разница между активностью ЛДГ в печени предгорных и низинных популяций лягушек позволяет предположить, что чувствительность ЛДГ печени к изменениям напряженности кислорода выше. Вектор ряда других кинетических параметров ЛДГ (K_i , S_{opt} , Δ) в печени животных из горных ландшафтов абсолютно противоположен таковому скелетных мышц. Высокая активность и модификации каталитических свойств ЛДГ в тканях озерных лягушек, обитающих в среднегорье, могут играть важную роль в адаптации этих животных к условиям дефицита кислорода.

Ключевые слова: озерная лягушка, низинные и горные популяции, печень, мышцы, кинетические характеристики лактатдегидрогеназы, пойкилотермия

DOI: 10.31857/S0044452923060074, EDN: GWWEWL

ВВЕДЕНИЕ

Понимание биохимических основ адаптации является одной из ключевых задач современной эволюционной биологии, и организмы, живущие в различных эколого-географических и климатических условиях, представляют собой одни из лучших систем для изучения.

Озерная лягушка (*Pelophylax ridibundus*) имеет обширный ареал распространения и относится к фоновым видам, обладающим наибольшим инвазивным потенциалом и миграционными способностями среди других представителей *R. Esculenta complex*. Ее популяции достаточно многочисленны и способны приспосабливаться к самым экстремальным условиям обитания, в том числе, и к условиям низкого содержания кислорода в среде обитания и

резких перепадов температур. Так, на территории Дагестана, которая характеризуется большим разнообразием природных зон, озерные лягушки были обнаружены в самых различных эколого-географических ландшафтах [1].

Столь широкое распространение данного вида, скорее всего, обусловлено множеством приспособлений, способствующих развитию толерантности к широкому диапазону температур, содержанию кислорода, атмосферному давлению. Особый интерес для эволюционной биохимии и физиологии представляют высотные градиенты, которые включают в себя существенные экологические переходы на относительно коротких линейных расстояниях.

Реакции пойкилотермных позвоночных в условиях среднегорья (800–2500 м над уровнем моря,

$pO_2 \approx 132$ мм рт.ст.) и высокогорья (более 2500 м над уровнем моря, $pO_2 < 111$ мм рт.ст.) гораздо более вариабельны, чем у гомойотермных животных, а механизмы менее изучены. Организмы, обитающие в них, находятся в условиях более низкого уровня кислорода и значительных суточных перепадов температуры. Адаптивные реакции животных в такой ситуации могут быть направлены на снижение уровня метаболизма и физиологической активности животных, реакции со стороны системы эритрона (повышение содержания эритроцитов, гемоглобина, сродства кислорода к гемоглобину) или на активацию анаэробного метаболизма [2–4].

Ранее было показано, что у различных пойкилотермных животных при обитании в условиях дефицита кислорода происходят значительные изменения активности ферментов гликолиза, направленные на повышение количества оборотов данного метаболического пути, с целью компенсации возникшего при снижении напряженности кислорода энергодефицита [5].

Из всех ферментов наиболее изучены различные адаптивные изменения на уровне важнейшего фермента анаэробного гликолиза – лактатдегидрогеназы (ЛДГ, КФ 1.1.1.27) [6]. Интерес к данному ферменту обусловлен тем, что он стоит на стыке аэробного и анаэробного метаболизма и определяет направление и скорость гликолитического потока. Известно, что высокая каталитическая эффективность ЛДГ является основным условием рециркуляции гликолитического потока в условиях недостатка кислорода [7]. Причем роль ЛДГ не ограничивается только лишь восстановлением пирувата или окислением лактата. Множество новых исследователей указывают на то, что основная функция ЛДГ заключается в регуляции соотношения $НАД^+/НАДН$, которое влияет на скорость многих каталитических реакций и транскрипцию генов, связанных с метаболизмом, циркадианными ритмами [8]. Кроме того, ЛДГ может выполнять и множество других неклассических функций. Предполагается, что ЛДГ принимает участие в клеточном цикле и регуляции активности АТФ-зависимого K^+ канала [9, 10].

Несмотря на большое количество работ по изучению активности фермента у широко-ареальных пойкилотермных животных, обитающих в условиях различной напряженности кислорода, механизмы изменения скорости катализа ЛДГ и ее регуляции недостаточно раскрыты. Более того, открытыми остаются вопросы о том, как изменения происходят в ферментах энергетических путей, локализованных в различных органах, существенно отличающихся по уровню аэробного метаболизма. Одним из методов оценки молекулярных механизмов изменений активности ферментов является исследование их каталитических характеристик.

Целью данной работы являлось сравнительное исследование кинетических параметров ЛДГ печени и скелетных мышц озерных лягушек, популяции которых заселяют низинные и горные ландшафты Дагестана.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. Исследования были выполнены на низинных озерных лягушках, отловленных в начале июня в окрестностях города Махачкала ($42^\circ 58'S$, $47^\circ 30'W$, высота над уровнем моря 10 м, $pO_2 \sim 151$ мм рт.ст., среднесуточная температура $+23^\circ C$) и горных, отловленных в Казбековском районе Республики Дагестан ($42^\circ 59'S$ $46^\circ 44'W$, 1400–1500 м, $pO_2 \sim 122$ мм рт.ст., среднесуточная температура $+18^\circ C$). Масса тела животных составляла 28–50 г. В условиях обитания животных, после наркотизации (эфир) и последующего разрушения спинного мозга, декапитировали, выделяли икроножные мышцы и печень, которые помещали в жидкий азот.

Получение безмитохондриального цитозоля. В условиях лаборатории икроножные мышцы и печень измельчали и гомогенизировали в 4 мл 0.1 М фосфатного буфера (рН 7.4). Гомогенат центрифугировали при 600 g (10 мин). Полученный супернатант повторно центрифугировали при 15 000 g в течение 10 мин.

Определение активности ЛДГ. Активность ЛДГ определяли по убыли содержания $НАДН_2$ в реакционной смеси в результате энзиматического восстановления пирувата в лактат, что регистрировалось спектрофотометрически (при длине волны 340 нм в течение 1 мин). Реакционная смесь содержала 2.4 мл 0.1 М фосфатного буфера (рН 7.4), 0.3 мл раствора пирувата натрия (“Sigma”, США), 0.3 мл 1 мМ раствора $НАДН_2$ (“Sigma”, США) и 0.05 мл тканевого экстракта, содержащего 25 мкг белка. Экстракт с заданной концентрацией белка в пробе получали путем предварительного разведения фосфатным буфером исходного безмитохондриального цитозоля. Исследование активности ЛДГ проводили в диапазоне концентраций пирувата от 0.003125 до 12.8 мМ. По результатам строили графики концентрационной зависимости. Активность ЛДГ выражали в наномолях $НАДН$, окисленного в результате ферментативной реакции за 1 мин на 1 мг белка (нмоль/мин*мг белка).

Определение белка. Содержание белка определяли по методу Лоури [11].

Определение кинетических характеристик. Для определения кинетических характеристик (максимальной скорости (V_{max}), константы Михаэлиса (K_m) по концентрационной зависимости скорости окисления $НАДН$ методом наименьших квадратов, использовали пакет СТАТИСТИКА.

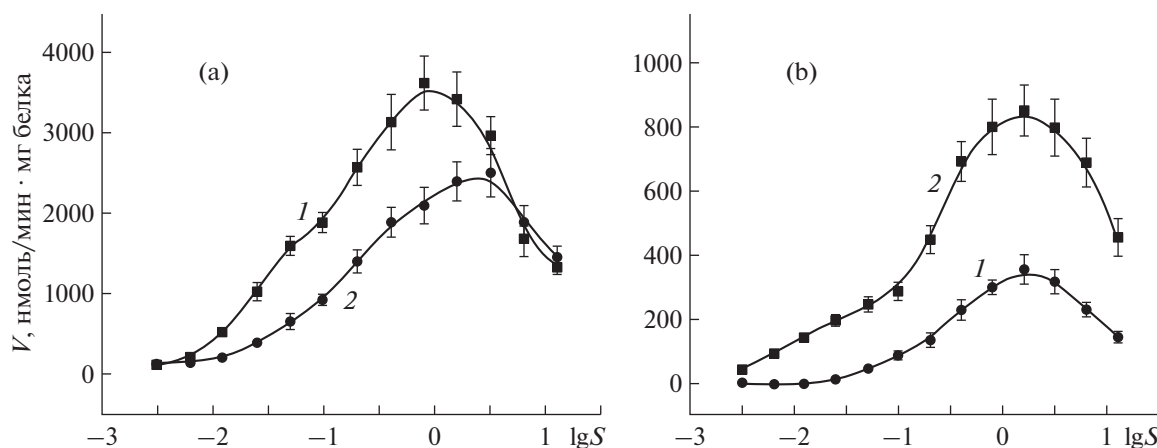


Рис. 1. Концентрационная зависимость ЛДГ скелетных мышц (а) и печени (б) озерных лягушек из низинных (1) и горных (2) районов Дагестана ($n = 11$).

В опции “нелинейное оценивание” использовали уравнение Холдейна.

$$V = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m^{PYR} + [S] + \frac{[S]^2}{K_i^{PYR}}},$$

где $V_{\max}$ — максимальная скорость, K_m^{PYR} — константа Михаэлиса для пирувата, K_i^{PYR} — константа ингибирования для пирувата, V — скорость реакции; $[S]$ — концентрация субстрата.

Оптимальное значение концентраций субстрата (S_{opt}) вычисляли по формуле

$$S_{\text{opt}} = \sqrt{K_m \cdot K_i}.$$

Статистическая обработка результатов. Обработка данных произведена с использованием пакета прикладных программ SPSS Statistics 22 (IBM, США). Однородность дисперсий экспериментальных данных оценивали с помощью критериев Левина и Уэлча. Для сравнения экспериментальных данных использовался непараметрический критерий Манна–Уитни. Различия считались достоверными при $p < 0.05$. Данные на рисунках и таблицах представлены в виде $M \pm m$. Каждая кривая на графиках концентрационной зависимости скорости катализа ЛДГ — среднее 11 независимых экспериментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На рис. 1 представлены концентрационные зависимости активности ЛДГ в тканях озерных лягушек, обитающих в условиях низинных и горных районов Дагестана. Все графики концентрационных зависимостей имеют колоколообразный характер, что свидетельствует о наличии у данного фермента феномена субстратного ингибирования.

Ранее субстратное ингибирование ЛДГ было обнаружено при исследовании кинетики данного фермента как у пойкилотермных [6], так и у гомойотермных животных [12].

Следует отметить то, что характер концентрационной зависимости и активности ЛДГ в печени и мышцах лягушек существенно отличается. Так, у низинных популяций лягушек активность ЛДГ в мышцах при концентрации пирувата 1.6 мМ выше в 6.7 раза по сравнению с таковой печени (скорость катализа ЛДГ в мышцах — 2401.1 ± 225.4 , в печени — 356.2 ± 25.5 ; $p < 0.05$) (рис. 1).

Как видно из рис. 1а, активность ЛДГ в скелетных мышцах горных лягушек выше таковой низинных в широком диапазоне исследованных концентраций пирувата (за исключением самых низких и высоких). Например, при концентрации 1.6 мМ активность ЛДГ у горных лягушек выше таковой низинных на 42.4% (у низинных — 3420.89 ± 334.0 , у горных — 2401.1 ± 225.4 , $p < 0.05$). При этом происходят значительные изменения характера концентрационной зависимости: смещение точки максимума, соответствующей оптимальной концентрации субстрата в сторону более низких концентраций. Следует отметить, что на кинетической кривой ЛДГ низинных лягушек, в отличие от горных, ясно прослеживается сигмоидный характер концентрационной зависимости.

Поскольку концентрационная зависимость ЛДГ четко демонстрирует феномен субстратного ингибирования, то для описания кинетики и нахождения кинетических параметров фермента при насыщающих и фиксированных концентрациях кофактора (НАДН) целесообразно использовать модель Холдейна. Применяя данную математическую модель кинетики ферментативной реакции, были вычислены кинетические характеристики ЛДГ (K_m , $V_{\max}$, K_i) (табл. 1).

Таблица 1. Кинетические характеристики ЛДГ скелетных мышц озерных лягушек из низинных и горных районов Дагестана ($n=11$)

Локация озерных лягушек	Кинетические характеристики					
	$V_{\max}$	K_m	$V_{\max}/K_m$	K_i	S_{opt}	$\Delta(K_i-K_m)$
низинные	3010.15 ± 138.69	0.220 ± 0.018	13681.8 ± 927.5	12.87 ± 0.77	1.68 ± 0.12	12.65 ± 1.31
горные	$4544.52 \pm 306.3^*$	$0.119 \pm 0.008^*$	$38189.1 \pm 4225.7^*$	$5.17 \pm 0.61^*$	$0.615 \pm 0.05^*$	$5.05 \pm 0.33^*$

* — изменения достоверны относительно низинных локаций ($p < 0.05$).

Таблица 2. Кинетические характеристики ЛДГ печени озерных лягушек из низинных и горных районов Дагестана ($n = 11$)

Локация озерных лягушек	Кинетические характеристики					
	$V_{\max}$	K_m	$V_{\max}/K_m$	K_i	S_{opt}	$\Delta(K_i-K_m)$
низинность	654.66 ± 59.00	0.715 ± 0.048	915.60 ± 53.80	3.801 ± 0.36	1.64 ± 0.11	3.085 ± 0.24
среднегорье	$1086.77 \pm 113.21^*$	$0.222 \pm 0.015^*$	$4895.3 \pm 154.64^*$	$10.472 \pm 1.30^*$	1.52 ± 0.09	$10.24 \pm 1.28^*$

* — $p < 0.05$ относительно низинных локаций.

На табл. 1 видно, что значение $V_{\max}$ для ЛДГ скелетных мышц у горных лягушек выше таковой низинных на 50.9%. При этом значения K_m , напротив, ниже на 45.9%. Вследствие таких разнонаправленных изменений кинетических параметров отношение $V_{\max}/K_m$, которое отражает эффективность катализа фермента при физиологических концентрациях субстрата, у горных лягушек в 2.8 раза выше таковой низинных.

Условия обитания оказывают существенный эффект на константу ингибирования (K_i) ЛДГ в условиях избыточной концентрации пирувата. У лягушек, обитающих в условиях среднегорья, K_i снижается в 2.5 раза. Это способствует существенно (на 63.4%) смещению в область низких концентраций точки оптимума S_{opt} . Поскольку значения K_m и K_i для ЛДГ скелетных мышц у горных лягушек снижаются, это, в совокупности, способствует значительному (на 60.1%) сужению для этого фермента показателя диапазона эффективных концентраций пирувата ($\Delta = K_i - K_m$).

Из рис. 1б видно, что характер различий активности и концентрационной зависимости ЛДГ из печени особей горных и низинных локаций такой же, как и в скелетной мышце. При этом активность ЛДГ у горных лягушек значительно выше таковой низинных во всем диапазоне исследованных концентраций субстрата. В частности, при концентрации 1.6 мМ активность фермента у горных выше в 2.38 раза (у горных — 850.0 ± 75.4 , у низинных — 356.2 ± 25.5 , $p < 0.05$). Интересно то, что на графиках концентрационной зависимости ЛДГ печени имеется более выраженная, по сравнению со ске-

летными мышцами, сигмоидность. Она особенно отчетливо видна на кинетической кривой ЛДГ горных лягушек (рис. 1б), из которой следует, что при концентрации 0.1 мМ происходит триггерное изменение характера концентрационной зависимости, указывающее на существенные изменения в механизмах катализа ЛДГ в области данной концентрации пирувата.

Исследование кинетических параметров ЛДГ в печени лягушек показало, что у горных особей $V_{\max}$ увеличивается на 70% относительно низинных (табл. 2).

При этом K_m (рис. 1б), напротив, снижается (на 69%). В результате таких разнонаправленных изменений значений K_m и $V_{\max}$ эффективность катализа ЛДГ в печени горных особей становится выше таковой низинных в 5.3 раза. При этом значение K_i , напротив, существенно (на 64%) увеличивается (табл. 2). Поскольку снижение K_m полностью компенсируется повышением K_i , то теоретические значения S_{opt} для данного фермента у животных, обитающих в двух разных ландшафтах, статистически не отличаются. Вместе с тем как у горных популяций происходит существенное (в 3.32 раза) повышение диапазона эффективных концентраций субстрата (табл. 2).

Таким образом, вектор изменений некоторых кинетических параметров (K_i , S_{opt} и Δ) ЛДГ печени животных, локализованных в горных ландшафтах, абсолютно противоположен таковому в скелетных мышцах. При этом изменения ряда других каталитических характеристик ($V_{\max}$ и K_m , эффективно-

сти катализа) фермента печени лягушек среднегорных локаций имеют тот же характер, что и в мышцах. Интересно то, что различия между двумя обитающими в разных эколого-географических нишах животными в печени более ярко выражены.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Адаптация к гипоксии содержит ряд компенсаторных реакций, направленных на поддержание нормального снабжения тканей кислородом в условиях его затрудненного поступления в кровь. Причем они связаны не только с изменениями в системе эритрона (высоким уровнем эритроцитов, гемоглобина, смещением кривой диссоциации гемоглобина), но и с изменением активности ферментных систем, а именно, с усилением анаэробного гликолиза, позволяющего осуществлять энергетические процессы при недостаточном поступлении кислорода к тканям [13]. Данное исследование было направлено на выяснение механизмов компенсаторно-приспособительных реакций на уровне важнейшего фермента анаэробного метаболизма к условиям более низкого уровня кислорода у озерных лягушек, обладающих широким спектром возможных локаций.

Результаты исследования показали, что активность и эффективность катализа ЛДГ существенно выше в тканях лягушек, обитающих в условиях среднегорья. Причем изменения эффективности катализа происходят за счет повышения $V_{\max}$ на фоне снижения K_m . Таким образом, вклад в изменение активности ЛДГ могут вносить оба кинетических параметра. $V_{\max}$ — это параметр, который зависит от двух величин: концентрации фермента и числа его оборотов (k_{cat}). Концентрация фермента в клетке может увеличиваться, главным образом, за счет повышения его биосинтеза. Возможно, что постоянное обитание горных озерных лягушек в условиях более низкой напряженности кислорода обуславливает более высокий уровень экспрессии данного фермента.

Было обнаружено, что ключевую роль в активации анаэробного метаболизма играет HIF-1 фактор (фактор, индуцируемый гипоксией) — гетеродимерный транскрипционный фактор, регулирующий экспрессию множества генов, играющих важную роль в формировании толерантности к гипоксии и ишемии. HIF увеличивает экспрессию переносчиков глюкозы GLUT1 и GLUT3, что приводит к повышению скорости поглощения глюкозы. Более того, HIF-1 индуцирует сверхэкспрессию специфических гликолитических изоформ для каждого фермента, участвующего в гликолизе [14]. Показано, что HIF-1 повышает экспрессию 11 гликолитических ферментов (альдолазы А, альдолазы С, энолазы 1, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, гексокиназы 1,

гексокиназы 2, лактатдегидрогеназы А, фосфофруктокиназы L, фосфоглицераткиназы 1, пируваткиназы М и триозофосфатизомеразы), способствующие повышению гликолитической способности клеток. Кроме того, HIF-1 подавляет окислительный метаболизм, ограничивая поступление пирувата в цикл трикарбоновых кислот посредством индукции биосинтеза киназы пируватдегидрогеназы [15].

Интересно то, что исследование транскриптома азиатской жабы (*Bufo gargarizans*), обитающей в условиях высокогорья (≥ 2500 м), показало наличие различных генетических механизмов адаптации к гипоксии. Причем модификации генов были направлены в основном на снижение уровня метаболизма и соответственно потребления кислорода, а не на экспрессию белков, непосредственно отвечающих за адаптацию к гипоксии [16].

Особое внимание следует уделить тому, что повышение эффективности катализа ЛДГ может быть обусловлено существенным снижением K_m фермента. Оно может быть связано с перестройками в третичной структуре фермента и конфигурации активного центра таким образом, что аффинность сайта связывания ЛДГ к пирувату становится значительно выше.

Изменения K_m фермента могут быть обусловлены сдвигами в его изоферментном спектре или различными посттрансляционными модификациями. У млекопитающих известны 5 изоформ ЛДГ, обусловленных сочетанием в тетрамере двух типов субъединиц — сердечной (Н) и мышечной (М). Изоферменты ЛДГ имеют дифференциальную экспрессию в разных тканях. Изофермент ЛДГ-1 состоит из четырех Н (4Н) и является основным изоферментом, присутствующим в ткани сердца. Изофермент ЛДГ-2 состоит из трех Н и одной М субъединицы (3Н1М) и является основным изоферментом ретикулоэндотелиальной системы и эритроцитов. Изофермент ЛДГ-3 состоит из двух Н и двух мышечных субъединиц (2Н2М) и является основным изоферментом легких. Изофермент ЛДГ-4 имеет одну Н и три М субъединицы (1Н3М) и является основным изоферментом, присутствующим в почках и печени. Изофермент ЛДГ-5 состоит из четырех М субъединиц (4М) и в значительной степени экспрессируется, главным образом, в скелетных мышцах, а также в печени [17, 18].

Имеются ли у амфибий какие-либо существенные отличия в тканевом распределении изоформ ЛДГ? Известно, что ЛДГ является достаточно консервативным в эволюционном отношении ферментом. Аминокислотный состав мономеров ЛДГ у биологических объектов, находящихся на различных таксономических уровнях, не претерпевает существенных изменений [19]. Точно так же, вероятнее всего, консервативны четвертичная структура ЛДГ и распределение изоформ этого фермента в

тканях. Тем не менее для различных видов животных могут иметь место незначительные отличия в паттернах тканевого распределения молекулярных форм данного фермента [20]. Так, в тканях различных видов лягушек рода *Rana* были обнаружены незначительные сдвиги в спектре изоформ ЛДГ [21, 22], которые зависели от условий их обитания.

Известно, что изоформы ЛДГ отличаются не только строением, но и своими каталитическими свойствами. Так, ЛДГ1 преимущественно катализирует обратную реакцию – превращение лактата в пируват, а ЛДГ5 прямую реакцию – превращение пирувата в лактат.

Следует отметить, что такое представительство различных форм ЛДГ в тканях не является абсолютным. В различных органах могут присутствовать одновременно несколько изоформ ЛДГ, однако содержание одной из изоформ может доминировать. Возможно, что у лягушек, обитающих в условиях более низкой напряженности кислорода, происходят изменения в уровне экспрессии различных субъединиц, что оказывает влияние на спектр имеющихся в данной ткани ортологов фермента и суммарную каталитическую активность.

Сравнительный анализ ЛДГ мышц и печени лягушек показал, что в скелетных мышцах активность фермента значительно выше. Это свидетельствует о том, что скелетные мышцы, являясь эволюционно более древним органом, представляющим в совокупности с кожей так называемую “оболочку” организма первыми подвергающимися воздействию различных неблагоприятных условий среды, и должны иметь механизмы устойчивости к такому фактору, как гипоксия. Следует обратить внимание, что исследование активности ЛДГ в печени демонстрирует более ярко выраженную разницу в активности фермента у горных и низинных популяций лягушек по сравнению с мышцами. Отсюда следует, что печень озерной лягушки, являясь органом с высоким уровнем аэробного метаболизма, более чувствительна к изменениям уровня кислорода в крови.

В печени преобладает ЛДГ 4 (1H3M), которая так же, как и мышечная ЛДГ5, преимущественно катализирует прямую реакцию – превращение пирувата в лактат. Высокая активность ЛДГ в печени горных лягушек может быть обусловлена высоким уровнем экспрессии генов, ответственных за биосинтез субъединиц М. Безусловно, возникает необходимость в проведении дополнительных исследований, посвященных изучению изоферментного спектра и уровня экспрессии различных субъединиц ЛДГ в органах лягушек, отличающихся своей географической локацией в высотном градиенте. Дополнительную информацию о механизмах изменения активности ЛДГ и биологической роли таких изменений позволило бы дать исследование

кинетических свойств ЛДГ при катализе обратной реакции (превращения лактата в пируват).

Одним из наиболее распространенных механизмов изменения активности ферментов является посттрансляционная модификация. Ранее исследования способов модуляции активности гликолитических ферментов в условиях аноксии выявили три таких механизма: 1) ковалентная модификация регуляторных ферментов обратимым фосфорилированием, 2) ассоциация-диссоциация ферментов с субклеточными частицами и 3) регуляция фосфофруктокиназы фруктозо-2,6-дифосфатом для контроля анаболического использования запасов углеводов [18].

Гликолитические ферменты образуют надмолекулярный комплекс, объединяющей якорной субъединицей которого служит F-актин. Такая интеграция гликолитических ферментов позволяет не только быстро туннелировать субстрат, но и осуществлять регуляцию гликолитического потока [23]. Таким образом, модуляции активности ЛДГ могут быть обусловлены изменениями силы взаимодействия фермента с F-актином или другими структурными компонентами клетки.

Показано, что ЛДГ из печени млекопитающих может обратимо связываться с митохондриями *in vitro*, изменяя при этом свою каталитическую активность. Такое связывание, возможно, играет важную регуляторную роль в клетке [24].

Учитывая то, что структура ЛДГ, как и многих компонентов гликолитического метаболизма, достаточно консервативна в эволюционном отношении, механизмы регуляции данного фермента у пойкилотермных животных и гомеотермных животных могут быть схожими.

Показано, что функционирование ЛДГ может быть модифицировано взаимодействиями между различными типами субъединиц [25] или пептидами, которые влияют на взаимодействия между разными типами субъединиц и определяют, таким образом, ее кинетические свойства [26].

Обнаружено, что у рыб при акклимации к низким температурам ЛДГ может переходить из одного конформера (высокотемпературного) к другому (низкотемпературному) [27]. Возможность формирования таких конформеров, скорее всего, обусловлена участием шаперонов.

У пойкилотермов было обнаружено большое разнообразие механизмов химической модификации ЛДГ: фосфорилирование, аденилирование, ацетилирование, убиквитирование и т.д. [28, 29]. У черепах, в условиях аноксии, обнаружено фосфорилирование ЛДГ, приводящее к повышению активности V_{max} , снижению K_m и повышению толерантности фермента к субстратному ингибированию. Shahrari и соавт. [28], Abboud и соавт. [29] предполагают, что у черепах фосфорилирование ЛДГ является обратимым, что связано с активаци-

ей эндогенных протеинкиназ и протеинфосфатаз. Кроме того, была обнаружена другая ковалентная модификация ЛДГ — ацетилирование по остаткам лизина. Показано, что при аноксии у черепах степень ацетилирования ЛДГ не выше, чем в аэробных условиях [27]. Оказалось, что ацетилирование подавляет активность ЛДГ, а деацетилирование, напротив, увеличивает до уровня контроля [21]. Предполагается, что дифференциальное ацетилирование метаболических ферментов играет ключевую роль в адаптивной регуляции ферментов к стрессу окружающей среды [28, 29].

Существенную роль в саморегуляции активности ЛДГ играет обнаруженное у этого фермента ингибирование избытком субстрата (пирувата), которое тоже может быть подвержено внешним регуляторным воздействиям. Результаты исследования показали, что значения K_i ЛДГ в мышцах и печени у лягушек, обитающих в горах, изменяются в противоположных направлениях. Так, в мышцах K_i у горных лягушек снижается, следовательно, в условиях низкой напряженности кислорода ковалентный аддукт между пируватом и ЛДГ образуется в области более низких концентраций пирувата, что усиливает эффект субстратного ингибирования фермента. Это на фоне снижения K_m приводит к тому, что у горных лягушек уменьшается диапазон эффективных концентраций субстрата. Напротив, в печени K_i увеличивается, следовательно, снижается ингибирующий эффект пирувата, в связи с чем, диапазон эффективных концентраций становится шире.

Следует отметить, что определение K_m позволяет определить не только константу диссоциации фермент-субстратного комплекса, но и оценить физиологические концентрации субстрата в компартментах локализации фермента. Исходя из наших данных, у низинных лягушек K_m в печени равно 0.715 ± 0.048 мМ, а в мышцах 0.220 ± 0.018 мМ (т.е. концентрации пирувата в печени лягушек $\approx$ в 3 раза выше ($p < 0.05$), чем в мышцах). При этом у горных лягушек разница в значениях K_m между печенью (0.222 ± 0.015) и мышцами (0.119 ± 0.008) выражена в меньшей степени (т.е. физиологические концентрации пирувата в печени горных лягушек в 1.9 раз выше ($p < 0.05$), чем в мышцах). Весьма примечателен тот факт, что диапазон эффективных концентраций пирувата для ЛДГ печени горных лягушек значительно больше по сравнению с низинными, а для ЛДГ мышц, напротив — существенно меньше. Отсюда следует, что *in vivo* в печени горных лягушек содержание и амплитуда колебания концентрации пирувата значительно выше, чем в мышцах.

Таким образом, кинетические характеристики ЛДГ в органах с разным уровнем метаболизма и интенсивностью аэробных процессов значительно отличаются. Соответственно отличаются и механизмы модуляции активности фермента при

адаптации к обитанию в условиях низкого парциального давления кислорода. При этом все они направлены на компенсаторное повышение эффективности катализа ЛДГ, позволяющее повысить число оборотов гликолиза. В условиях более низких концентраций кислорода на высоте выше 1500 м анаэробный гликолитический путь может вносить существенный вклад в энергоснабжение клеток различных тканей.

Возникает вопрос о целесообразности такой активации анаэробного метаболизма. Известно, что реакции многих представителей земноводных, обитающих на значительных (более 2500 м) высотах, направлены преимущественно на снижение уровня метаболизма и физиологической активности животных, компенсаторные реакции со стороны системы эритрона [2–4], а не на активацию гликолиза. Можно предположить, что повышение активности ЛДГ в тканях горных лягушек может быть связано не столько с ее участием в рециркуляции аэробного метаболизма, сколько с важной ролью данного фермента в регуляции соотношения окисленных и восстановленных форм пиридиновых нуклеотидов, влияющего на скорости многих каталитических реакций [8], или же с участием продукта ЛДГ реакции — лактата в модуляции активности АТФ-зависимого K^+ канала, роль которого в адаптации животных к гипоксии уже доказана [9, 10].

При этом следует отметить, что высокая активность ЛДГ может способствовать избыточному накоплению лактата и развитию лактат-ацидоза. Образовавшийся в анаэробном гликолизе лактат — это своеобразный “метаболический тупик”, который в клетке может превратиться только в пируват. Обратимая реакция (превращения лактата в пируват) катализируется ЛДГ-1, содержание которой в мышцах достаточно мало. Другой путь метаболизации лактата — это превращение его в глюкозу (глюконеогенез). Между мышцами и печенью происходит обмен лактата и глюкозы, который известен как цикл Кори или глюкозо-лактатный цикл. Помимо механизма метаболического клиренса, лактат также может экскретироваться почками при преодолении так называемого почечного порога (~ 5 ммоль/л) [30] или окисляться в сердечной мышце. Таким образом, можно предположить, что у лягушек, обитающих в условиях более низких уровней кислорода, активны механизмы, способствующие быстрому удалению лактата и предотвращению, тем самым, развития лактат-ацидоза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в работе новые данные указывают на значительные различия в активности и кинетических параметрах ЛДГ у озерных лягушек (*Pelophylax ridibundus*), занимающих разные эколого-географические ландшафты: низинные (высота над уровнем моря 10 м) и горные (1400–1500 м).

Обнаружено, что активность ЛДГ существенно выше у лягушек горных локаций, где парциальное давление кислорода составляет в среднем 122 мм рт.ст. Сравнительные исследования активности ЛДГ в различных тканях показали, что ЛДГ печени более чувствительна к изменениям напряженности кислорода по сравнению с мышцами. Анализ кинетических параметров ЛДГ печени и мышц позволил выявить, что высокая эффективность катализа ЛДГ в данных тканях обеспечивается за счет существенного повышения $V_{\max}$ на фоне снижения K_m . Вектор изменений других кинетических параметров ЛДГ (K_i , S_{opt} , Δ) в печени животных горных локаций ландшафтов абсолютно противоположен таковому в скелетных мышцах. Высокая активность и модификации каталитических свойств ЛДГ в тканях озерных лягушек, обитающих в среднегорье, могут играть важную роль в адаптации этих животных к условиям дефицита кислорода.

Таким образом, у горных популяций озерной лягушки компенсаторно-приспособительные реакции к относительно низкому парциальному давлению кислорода на высоте 1400–1500 м связаны не только с изменениями в системе эритрона, но и с модуляцией каталитических свойств фермента, играющего важнейшую роль в рециркуляции гликолитического потока.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Финансирование осуществлялось в рамках программы исследований, запланированных кафедрой зоологии и физиологии Дагестанского государственного университета.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (А.М.Д., З.Г.Р.), сбор данных (З.Г.Р.), обработка данных (А.М.Д., З.Г.Р.), написание и редактирование манускрипта (А.М.Д.).

СООТВЕТСТВИЕ НОРМАМ ЭТИКИ

При выполнении настоящего исследования были соблюдены все нормы и правила проведения экспериментальных работ с использованием лабораторных животных (Директива 2010/63/EU Совета Европейского Сообщества по защите животных, используемых в экспериментальных и других научных целях).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мазаньева ЛФ, Туниев БС (2011) Зоогеографический анализ герпетофауны Дагестана. Современный герпетолог 11 (1/2): 55–76. [Mazanaeva LF, Tuniev BS (2011) Zoogeographic analysis of the herpetofauna of Dagestan. Modern herpetol 11 (1/2): 55–76. (In Russ)].
2. Niu Y, Zhang X, Xu X, Li I, Zhang H, Wu, Storey BK, Chen Q (2022) Physiological and Biochemical Adaptations to High Altitude in Tibetan Frogs *Nanorana parkeri*. Front Physiol 13: 942037. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.942037>
3. Yang W, Qi Y, Bi K, Fu J (2012) Toward understanding the genetic basis of adaptation to high-elevation life in poikilothermic species: A comparative transcriptomic analysis of two ranid frogs, *Rana chensinensis* and *R. kukunoris*. BMC Genomics 13: 588. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-588>
4. Ma M, Pu P, Niu Z, Zhang T, Wu J, Tang X, Chen Q (2023) A novel mechanism for high-altitude adaptation in hemoglobin of black-spotted frog (*Pelophylax nigromaculatus*). Front Ecol Evol 11. <https://doi.org/10.3389/fevo.2023.1103406>
5. Kierans S, Taylor C (2020) Regulation of glycolysis by the hypoxia-inducible factor (HIF): implications for cellular physiology. J Physiol 599: 23–37. <https://doi.org/10.1113/jp280572>
6. Zakhartsev M, Johansen T, Pörtner HO, Blust R (2004) Effects of temperature acclimation on lactate dehydrogenase of cod (*Gadus morhua*): genetic, kinetic and thermodynamic aspects. J Exp Biol 207 (1): 95–112. <https://doi.org/10.1242/jeb.00708>
7. Qiu L, Gulotta M, Callender R (2007) Lactate dehydrogenase undergoes a substantial structural change to bind its substrate. Biophys J 93: 1677–1686. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.109397>
8. Cantó C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, Milne JC, Elliott PJ, Puigserver P, Auwerx J (2009) AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. Nature 458 (7241): 1056–1060. <https://doi.org/10.1038/nature07813>
9. Rong Y, Wu W, Ni X, Kuang T, Jin D, Wang D, Lou W (2013) Lactate dehydrogenase A is overexpressed in pancreatic cancer and promotes the growth of pancreatic cancer cells. Tumor Biol 34: 1523–1530. <https://doi.org/10.1007/s13277-013-0679-1>
10. Crawford R, Budas G, Jovanovic S, Rankin H, Wilson T, Davies A, Jovanovic A (2002) M-LDH serves as a sarcolemmal KATP channel subunit essential for cell protection against ischemia. EMBO J 15: 3936–3948. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf388>
11. Lowry D, Rosembrough H, Farr A, Randall R (1951) Protein measurement with the folin Phenol Reagent. J Biol Chem 193 (1): 265–275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
12. Халилов РА, Джафарова АМ, Джабраилова РН, Хизриева СИ (2016) Кинетические характеристики лактатдегидрогеназы мозга крыс при гипотермии. Нейрохимия 33 (2): 169–179. [Khalilov RA, Jafarova AM,

- Dzhabrailova RN, Khizrieva SI* (2016) Kinetic characteristics of rat brain lactate dehydrogenase during hypothermia. *Neurochemistry* 33 (2): 169–179. (In Russ)].
13. *Webster K* (2003) Evolution of the coordinate regulation of glycolytic enzyme genes by hypoxia. *J Exp Biol* 206 (17): 2911–2922.
<https://doi.org/10.1242/jeb.00516>
 14. *Spinicci K, Jacquet P, Powathil G, Stéphanou A* (2022) Modeling the role of HIF in the regulation of metabolic key genes LDH and PDH: Emergence of Warburg phenotype. *Comp Sys Onco* 2: e1040.
<https://doi.org/10.1002/cso2.1040>
 15. *Bagnall J, Leedale J, Taylor S, Spiller D, White M, Sharkey K, Séé V* (2014) Tight Control of Hypoxia-inducible Factor- α Transient Dynamics Is Essential for Cell Survival in Hypoxia. *J Biol Chem* 289 (9): 5549–5564.
<https://doi.org/10.1074/jbc.m113.500405>
 16. *Yang W, Qi Y, Lu B* (2017) Gene expression variations in high-altitude adaptation: a case study of the Asiatic toad (*Bufo gargarizans*). *BMC Genet* 18 (62).
<https://doi.org/10.1186/s12863-017-0529-z>
 17. *Read J, Winter V, Eszes C, Sessions R, Brady R* (2001) Structural basis for altered activity of M- and H-isozyme forms of human lactate dehydrogenase. *Proteins* 43 (2): 175–185.
[https://doi.org/10.1002/1097-0134\(20010501\)43:2<175::aid-prot1029>3.0.co;2-#](https://doi.org/10.1002/1097-0134(20010501)43:2<175::aid-prot1029>3.0.co;2-#)
 18. *Brooks S, Storey K* (1989) Regulation of glycolytic enzymes during anoxia in the turtle *Pseudemys scripta*. *Am J Physiol* 257(2):278–283.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.1989.257.2.R278>
 19. *Peng H, Deng H, Dyer R, Callender R* (2014) Energy Landscape of the Michaelis Complex of Lactate Dehydrogenase: Relationship Catalytic Mech *Biochem* 53 (11): 1849–1857.
<https://doi.org/10.1021/bi500215a>
 20. *Унжаков А, Илюха В, Мацук Н, Белкин В* (2007) Роль изоферментов лактатдегидрогеназы в адаптациях млекопитающих Карелии. *Труды КарНЦ РАН* 11: 118–126. [*Unzhakov A, Ilyukha V, Matsuk N, Belkin V* (2007) The role of lactate dehydrogenase isoenzymes in adaptations of mammals in Karelia. *Proc of KarRC RAS* 11: 118–126. (In Russ)].
 21. *Moyer F, Speaker C, Wright D* (1968) Characteristics of lactate dehydrogenase isozymes in amphibians. *N Y Acad Sci* 151 (1): 650–669.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1968.tb11925.x>
 22. *Enig M, Ramsay J, Eby D* (1976) Effect of temperature on pyruvate metabolism in the frog: the role of lactate dehydrogenase isoenzymes. *Comp Biochem Physiol. B. Comp Biochem* 53 (2): 145–148.
[https://doi.org/10.1016/0305-0491\(76\)90025-0](https://doi.org/10.1016/0305-0491(76)90025-0)
 23. *Puchulu-Campanella E, Chu H, Anstee D, Galan J, Tao W, Low P* (2013) Identification of the components of a glycolytic enzyme metabolon on the human red blood cell membrane. *J Biol Chem* 288 (2): 848–858.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.428573>
 24. *Place S, Hofmann G* (2005) Comparison of Hsc70 orthologs from polar and temperate notothenioid fishes: differences in prevention of aggregation and refolding of denatured proteins. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288: 1195–1202.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00660.2004>
 25. *Yamamoto S, Storey KB* (1988) Dissociation-association of lactate dehydrogenase isozymes: influences on the formation of tetramers versus dimers of M4-LDH and H4-LDH. *Internat J Biochem* 20 (11): 1261–1265.
[https://doi.org/10.1016/0020-711x\(88\)90229-7](https://doi.org/10.1016/0020-711x(88)90229-7)
 26. *Döbeli H, Schoenenberger G* (1983) Regulation of lactate dehydrogenase activity: reversible and isoenzyme-specific inhibition of the tetramerization process by peptides. *Cell Mol Life Sci* 39: 281–282.
<https://doi.org/10.1007/BF01955304>
 27. *Pörtner H* (2002) Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comp Biochem Physiol. A Mol Integrat Physiol* 132 (4): 739–761.
[https://doi.org/10.1016/s1095-6433\(02\)00045-4](https://doi.org/10.1016/s1095-6433(02)00045-4)
 28. *Shahriari A, Dawson NJ, Bell RA, Storey KB* (2013) Stable suppression of lactate dehydrogenase activity during anoxia in the foot muscle of littorina littorea and the potential role of acetylation as a novel postranslational regulatory mechanism. *Enzyme Res* 461374.
<https://doi.org/10.1155/2013/461374>
 29. *Abboud J, Storey KB* (2013) Novel control of lactate dehydrogenase from the freeze tolerant wood frog: role of posttranslational modifications. *Peer J* 1 (12).
<https://doi.org/10.7717/peerj.12>
 30. *Lehninger A, Nelson D, Cox M* (2005). *Lehninger principles of biochemistry*. New York: W.H. Freeman: 1119.

THE CATALYTIC PROPERTIES OF LACTATE DEHYDROGENASE IN SKELETAL MUSCLES AND LIVER OF THE MARSH FROG (*PELOPHYLAX RIDIBUNDUS*) DEPEND ON ITS ECOLOGICAL AND GEOGRAPHICAL LOCATION

Z. G. Rabadanova^{a,*} and A. M. Dzharfarova^a

^aDagestan State University, Makhachkala, Republic of Dagestan, Russian Federation

*e-mail: r.zukhra@yandex.ru

The marsh frog (*Pelophylax ridibundus*) has a widespread distribution range, which is due to a variety of adaptations that contribute to the development of tolerance to a wide range of physicochemical environmental factors. Of particular interest are the adaptations of these animals to different levels of oxygen in mid- and high-altitude conditions. In this work, a comparative analysis of the kinetic parameters of lactate dehydrogenase (LDH) in the liver of marsh frogs living in the mountainous and lowland regions of Dagestan was carried out. Animals caught

in their habitats were decapitated, the liver and calf muscles were isolated, and they were placed in liquid nitrogen. In the laboratory, the selected tissues were homogenized and mitochondria-free cytosol was obtained by differential centrifugation, in which LDH activity was determined. It was found that LDH activity is significantly higher in the tissues of frogs from mountainous regions: by 42.4% in the muscles and 2.38 times in the liver ($p < 0.05$). The high efficiency of catalysis is ensured due to significant changes in the catalytic parameters of the enzyme: an increase in V_{max} (50.9% in muscles and 70% in the liver ($p < 0.05$)) and a decrease in K_m (45.9% in muscles and 69% in liver, ($p < 0.05$)). A more pronounced difference, compared to muscles, between LDH activity in the liver of foothill and lowland populations of frogs suggests that the sensitivity of liver LDH to changes in oxygen tension is higher. The vector of a number of other kinetic parameters of LDH (K_i , S_{opt} , Δ) in the liver of animals from mountainous landscapes is absolutely opposite to that of skeletal muscles. High activity and modifications of the catalytic properties of LDH in the tissues of marsh frogs living in mid-mountain areas may play an important role in the adaptation of these animals to conditions of oxygen deficiency.

Keywords: lake frog, lowland and mountain populations, liver, muscles, lactate dehydrogenase, poikilothermia, kinetic characteristics