

ДЕЙСТВИЕ АЛЬФА-ТОКОФЕРОЛА И МАЛЫХ ДОЗ ОБЛУЧЕНИЯ НА АКТИВНОСТЬ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ КЛЕТОК МОЗГА МЫШЕЙ

Трещенкова Ю.А.

Федеральное государственное учреждение науки Институт биохимической химии им. Н.М. Эмануэля РАН (ИБХФ РАН), 119334, Россия, Москва, ул. Косыгина 4, **E-mail:** tresch@sky.chph.ras.ru

В настоящее время сохраняется интерес к изучению антиоксидантов, особенно сверхмалых доз (СМД), влияющих на различные типы макромолекул клеток и метаболические пути тканей организма. Выявлены общие закономерности и механизмы действия малых доз биологически активных веществ [1,2]. Природные формы токоферолов (альфа, бета, гамма, дельта) обладают антиоксидантными свойствами, из которых альфа-токоферол имеет самую высокую биологическую активность. Значительная часть альфа-токоферола локализуется в липидном бислое мембран различных типов клеток и может влиять на структурное состояние мембран [3]. В последнее время показано, что альфа-токоферол участвует в различных физиологических и биохимических функциях в клетке, не связанных с антиокислительной активностью. Так, например, альфа-токоферол может модулировать активность ряда ферментов как на посттрансляционном уровне, так и на уровне транскрипции, влияя на сигнальную систему и другие функции клетки [4-6].

Влияние ионизирующего излучения малой мощности на гликолиз тканей и отдельных ферментов гликолитического пути недостаточно изучено. Ранее нами было обнаружено, что хроническое гамма-облучение в малых дозах (0,6 рад/сут) влияет на активность и изоферментный состав лактатдегидрогеназы (ЛДГ) цитоплазмы клеток мозга мышей [7]. Также нами показана зависимость активности альдолазы и ЛДГ от мощности дозы [8]. ЛДГ микросом клеток мозга чувствительна к действию малых и больших доз фенозана, который обладает широким спектром действия, включая антиоксидантные [9]. В данной работе изучали действие альфа-токоферола (в дозах 10^{-14} или 10^{-4} моль/кг) и совместно с облучением (16 сГр/мин) на кинетические свойства (V_{max} , K_m , V_{max}/K_m) ЛДГ в цитоплазме, микросомах и митохондриях клеток мозга мышей.

Методы исследования. Работа выполнена на мышах линии Balb, самцах, массой 19-24 г. Животных содержали на стандартной диете. Опыт состоял из 6 групп (по 10 мышей в каждой группе). 1 группа - контроль с введенным 0,5% спиртом, следующим группам внутрибрюшинно вводили альфа-токоферол в дозах 10^{-14} или 10^{-4} моль/кг и облучали: группа 2 - 10^{-14} моль/кг, группа 3 - 10^{-14} моль/кг + облучение, группа 4 - 10^{-4} моль/кг, группа 5 - 10^{-4} моль/кг + облучение, группа 6 - облучение (16 сГр/мин). Альфа-токоферол (аТ) растворяли в спирте (фирмы Merck, Германия) и затем растворы готовили методом последовательного разведения дистиллированной водой. Мышей однократно облучали в течение 1 мин (на аппарате РУМ). Растворы альфа-токоферола (10^{-14} или 10^{-4} моль/кг) вводили за 40 мин. до облучения. Мозг извлекали через сутки после действия токоферола или токоферола+облучение (аТ+О). Мозг гомогенизировали в 0,32 моль/л сахарозе, pH 7,4. Фракции мозга получали с помощью дифференциального центрифугирования. Цитоплазму и микросомы получали при 105 000g на центрифуге Beckman (ротатор SW 28). Митохондрии очищали в градиенте сахарозы. Активность ЛДГ определяли спектрофотометрически при 340 нм с субстратами пируватом (фирмы Serva) или лактатом (фирмы Sigma) в широком интервале концентраций [7]. Кинетические параметры (V_{max} , K_m) рассчитывали методом Корниш-Боудена [10] и вычисляли отношение V_{max}/K_m , характеризующее «эффективность» ферментов. Белок определяли методом Лоури [11].

Результаты и обсуждение. На рис. 1 представлены данные по влиянию облучения, альфа-токоферола на $V_{max}/мг$ белка ЛДГ (субстрат пируват) в цитоплазме, микросомах и митохондриях. аТ в дозе 10^{-14} (СМД) или 10^{-4} моль/кг повышали $V_{max}/мг$ белка ЛДГ в цитоплазме и микросомах, практически не влияли на митохондрии. У облученных животных обе дозы аТ увеличивали $V_{max}/мг$ белка ЛДГ в цитоплазме (в 1,35 и 1,5 раза соотв.), в микросомах (в 1,29 и 1,24 раза) и в митохондриях (в 1,2 раза).

Малые дозы облучения существенно повышали V_{max}/mg (1,5 раза) в цитоплазме и понижали (в 1,25 раза) в микросомах и митохондриях. Таким образом, наиболее чувствительна ЛДГ к действию аТ и облучения в цитоплазме, а наименее в митохондриях. Повышение V_{max} ЛДГ наблюдалось нами ранее при действии хронического облучения (0,6 рад/сут [7] и однократного действия 0,15 Гр [8]).

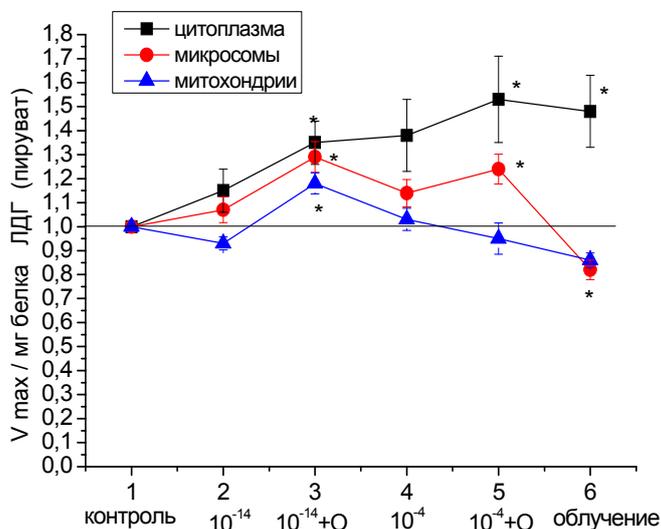


Рис.1. Влияние альфа-токоферола в дозах 10^{-14} (СМД) и 10^{-4} моль/кг, облучения (16сГр/мин) и их совместного действия на V_{max}/mg белка ЛДГ (субстрат пируват) в субклеточных фракциях мозга через 24 часа после воздействия. Данные представлены в относительных единицах. 1 – контрольные значения V_{max}/mg белка ЛДГ. Достоверно относительно контроля * $p < 0,05$.

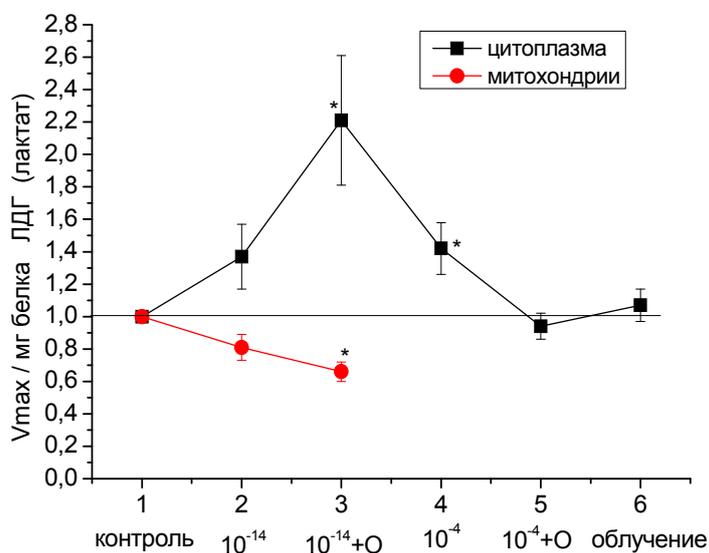


Рис.2. Влияние альфа-токоферола в дозах 10^{-14} (СМД) и 10^{-4} моль/кг, облучения (16сГр/мин) и их совместного действия на V_{max}/mg белка ЛДГ (субстрат лактат) в субклеточных фракциях мозга через 24 часа после воздействия. Данные представлены в относительных единицах. 1 – контрольные значения V_{max}/mg белка ЛДГ. Достоверно относительно контроля * $p < 0,05$.

В цитоплазме (рис.2) наблюдалось повышение V_{max}/mg белка ЛДГ(в 1,4 раза) (субстрат лактат) при действии СМД и малых доз альфа-токоферола. У облученных

мышей с дозой СМД V_{max} /мг белка ЛДГ существенно возрастала (2,2 раза) и, напротив, с дозой 10^{-4} моль/кг понижалась до контрольных значений. Облучение практически не влияло на этот параметр. В митохондриях аТ в СМД уменьшает V_{max} /мг белка ЛДГ в 1,23 раза, а у облученных мышей в 1,5 раза. В цитоплазме, обнаруженные изменения V_{max} /мг белка ЛДГ между субстратом пируватом и лактатом имеют положительную взаимосвязь ($p=0,015$). Положительный характер взаимосвязи получен между изменениями V_{max} /мг белка с субстратом пируватом в цитоплазме и микросомеми ($p=0,17$) и обратный с митохондриями ($p=0,127$).

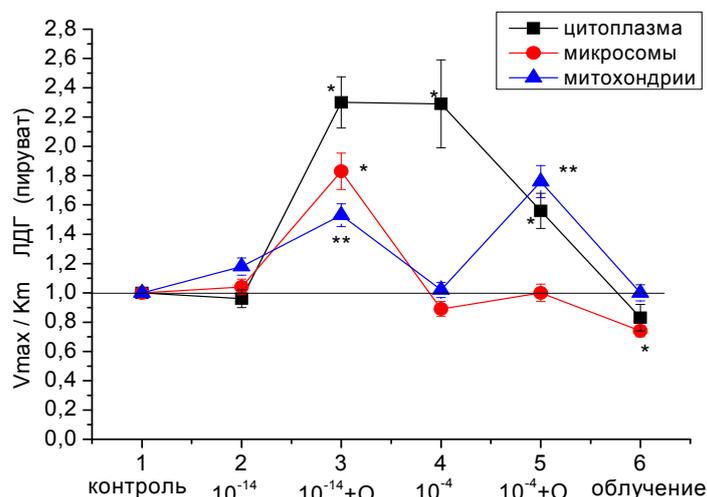


Рис.3. Влияние альфа-токоферола в дозах 10^{-14} (СМД) и 10^{-4} моль/кг, облучения (16сГр/мин) и их совместного действия на «эффективность» (V_{max}/K_m) ЛДГ (субстрат пируват) в субклеточных фракциях мозга через 24 часа после воздействия. Данные представлены в относительных единицах. 1 – контрольные значения V_{max}/K_m ЛДГ. Достоверно относительно контроля * $p < 0,03$, ** $p < 0,01$.

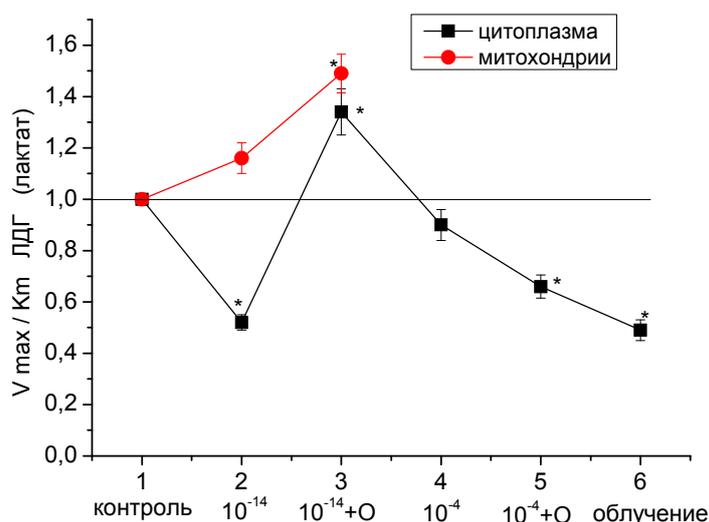


Рис.4. Влияние альфа-токоферола в дозах 10^{-14} (СМД) и 10^{-4} моль/кг, облучения (16сГр/мин) и их совместного действия на «эффективность» (V_{max}/K_m) ЛДГ (субстрат лактат) в субклеточных фракциях мозга через 24 часа после воздействия. Данные представлены в относительных единицах. 1 – контрольные значения V_{max}/K_m ЛДГ. Достоверно относительно контроля * $p < 0,02$

Эффективность (V_{max}/K_m) ЛДГ с субстратом пируватом (рис.3) практически не отличалась от контрольных значений при действии дозы СМД аТ во всех субклеточных

фракциях и значительно повышалась при дозе 10^{-4} моль/кг (в 2,3 раза) в цитоплазме. У облученных животных эффективность ЛДГ возрастала при СМД дозе в цитоплазме, микросомах и митохондриях (в 2,3, 1,8 1,5 раза соответственно). У облученных мышей с дозой 10^{-4} моль/кг аТ повышение эффективности наблюдалось в цитоплазме (в 1,56 раза) и митохондриях (в 1,76 раза). Облучение снижало в цитоплазме (в 1,2 раза) и наиболее в микросомах (в 1,35 раза).

В цитоплазме V_{max}/K_m ЛДГ (рис.4) резко снижалась (в 2 раза) при СМД аТ и незначительно при дозе 10^{-4} моль/кг. У облученных мышей эффективность ЛДГ возрастала (в 1,34 раза) при СМД дозе. Значительное снижение эффективности фермента получено у облученных мышей при дозе дозе 10^{-4} моль/кг (в 1,5 раза) и поле облучения (в 2 раза).. В митохондриях СМД доза аТ облученных мышей существенно увеличивает V_{max}/K_m (в 1,5 раза).

Таким образом получены значительные изменения $V_{max}/\text{мг}$ белка и V_{max}/K_m ЛДГ в субклеточных фракциях мозга как при действии разных доз альфа-токоферола, так и при совместном действии с малыми дозами облучения. Обнаружены различия этих параметров ЛДГ между субстратами пируватом и лактатом. ЛДГ катализирует обратимую реакцию пируват+НАДН \leftrightarrow лактат+НАД $^{+}$. Отношение НАД/НАДН важно для функционирования гликолиза. Так, облучение сдвигает реакцию к образованию лактата и НАД $^{+}$ и уменьшению пирувата и НАДН. Подобным образом происходит при действии аТ в СМД дозе и дозе 10^{-4} моль/кг и совместно с облучением. мембранами субклеточных структур клетки. Меняется содержание лактата и пирувата, которые являются важными метаболитами в клетке. Одним из способов регуляции активности гликолитических ферментов является их обратимое связывание с мембранами субклеточных структур клетки. Так, в условиях *in vitro* показано взаимодействие некоторых анионных фосфолипидов с ЛДГ [12]. Как указывалось выше, альфа-токоферол может влиять на структуру мембран и таким образом на связывание ЛДГ с мембранами. Предполагается дальнейшее изучение механизма действия альфа-токоферола на ЛДГ субклеточных структур клеток мозга.

Литература

1. Бурлакова Е.Б. // Вестн.РАН, 1994, т.64, №5, с.425.
2. Подколзин А.А., Гуревич К.Г. // Действие биологически активных веществ в малых дозах. М. Изд-во КМК, 2002.
3. Белов В.В., Мальцева Е.Л., Пальмина Н.П. // Биофизика, 2007, т.52, № 1, с. 75.
4. Azzi A., Breyer I., Feher M., Pastori M., et al. // J. Nutr., 2000, v.130, N 7, p. 1649.
5. Azzi A., Ricciarelli R., Zingg J-M. // FEBS Letters, 2002, v.519, N 1-3, p.8.
6. Zingg J-M., Meydani M., Azzi A. // Mol. Nutr. Food Res., 2010, v. 54, N 5, p. 679.
7. Трещенкова Ю.А., Бурлакова Е.Б. // Радиационная биология. Радиоэкология, 1997, т. 37, № 1, с. 3.
8. Трещенкова Ю.А // Радиобиологический съезд, тезисы докладов, Киев, 1993, с. 1010.
9. Трещенкова Ю.А., Голощапов А.Н., Бурлакова Е.Б. // Радиационная биология. Радиоэкология, 2003, т. 43, № 3, с. 320.
10. Корниш-Боуден Э. // Основы ферментативной кинетики, М. Изд-во Мир, 1979.
11. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Raudall R.J. // J. Biol. Chem., 1951, v. 193, N 1, p.265.
12. Terlecki G., Czapinska E., Gutowicz J. // Cell Mol. Biol. Lett., 2002, v.7, N 3, p. 895.

EFFECT OF ALPHA-TOCOPHEROL AND LOW-DOSE IRRADIATION ON THE ACTIVITY OF LACTATE DEHYDROGENASE OF THE BRAIN CELLS OF MICE

Yu.A. Treschenkova

Federal State Institution of Science Institute of Biochemical Chemistry. NM Emanuel Academy of Sciences (RAS IBCP), 119334 Moscow, Russia, st. Kosygin 4, E-mail: tresch@sky.chph.ras.ru