

© Коллектив авторов

## УРОВНИ ЭКСПРЕССИИ И АКТИВНОСТЬ ИЗОФЕРМЕНТОВ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ АЛЛОКСАНОВОМ ДИАБЕТЕ

*А.Т. Епринцев\*, И.Р. Бондарева, Н.В. Селиванова*

Воронежский государственный университет,  
394006, Воронеж, Университетская пл., 1; \*эл. почта: bc366@bio.vsu.ru

В печени крыс с аллоксановым диабетом обнаружено значительное снижение активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ, КФ 1.1.1.27), обусловленное уменьшением экспрессии соответствующих генов. Это снижение активности ЛДГ, по-видимому, связано с уменьшением уровня цитоплазматической изоформы ЛДГ. Выявлено, что концентрация транскриптов генов *ldha* и *ldhb* в печени здоровых крыс выше, чем у животных с аллоксановым диабетом. Причём экспрессия гена *ldha* была снижена почти в 9 раз, тогда как экспрессия гена *ldhb* снижалась всего лишь в 1,25 раза. Полученные нами данные свидетельствуют о важной роли ЛДГ в адаптивной реакции клеточного метаболизма при развитии сахарного диабета I типа.

**Ключевые слова:** лактатдегидрогеназа; диабет; аллоксан; активность; экспрессия; ген; изофермент

**DOI:** 10.18097/PBMC20226801032

### ВВЕДЕНИЕ

Диабет — это серьёзное хроническое заболевание, которое возникает либо тогда, когда поджелудочная железа не вырабатывает достаточного количества инсулина, либо когда организм не может эффективно использовать выделяемый им инсулин. Болезнь характеризуется гипергликемией с нарушениями углеводного, жирового и белкового обмена [1]. В эритроцитах больных сахарным диабетом значительно изменяются концентрации промежуточных продуктов гликолиза. Концентрации глюкозы, глюкозо-6-фосфата, фруктозо-6-фосфата и лактата значительно увеличиваются, в то время как концентрации фруктозо-1,6-дифосфата, 1,3-дифосфоглицерола, глицеральдегид-3-фосфата и 3-фосфоглицерата снижаются [2]. Более поздние исследования выявили также изменения в активности гликолитических ферментов [3]. Ранее в нашей лаборатории была показана важная роль глюконеогенеза в обеспечении адаптивной реакции клеточного метаболизма у крыс с аллоксановым диабетом. Так, повышается активность ферментов глюконеогенеза (включая ферменты, катализирующие обратимые реакции гликолиза) [4, 5].

Роль лактатдегидрогеназы (ЛДГ, КФ 1.1.1.27) в этих процессах связана с превращением пирувата в лактат с участием NADH в качестве донора электронов. Известно, что ЛДГ является гомо- или гетеротетрамером, состоящим из субъединиц двух различных типов (А и В), способных ассоциировать с образованием 5 различных изоферментов (А4; А3В1; А2В2; А1В3 и В4) [6]. Изменение активности ЛДГ и профиль её изоферментов помогают клеточному метаболизму контролировать адаптацию к различным заболеваниям (диабет, лейкемия, инфаркт миокарда). Уровень активности данного фермента в плазме крови используется в качестве неспецифического диагностического маркера при разных патологиях [6].

Известно, что развитие диабета зачастую сопровождается лактоацидозом, связанным со значительным увеличением активности ЛДГ в крови [7]. Однако информация о важной роли ЛДГ в клетках печени крыс в условиях аллоксанового диабета достаточно разрознена и до конца не изучена, а данные о субклеточной локализации ЛДГ весьма незначительны. В связи с этим целью данного исследования было выяснение биохимических и молекулярных механизмов регуляции функционирования ЛДГ в печени крыс в условиях экспериментального сахарного диабета.

### МЕТОДИКА

#### *Объект исследования*

Объектом исследования служили самцы белых лабораторных крыс линии Wistar массой 150-200 г, выведенные в биопитомнике “Стезар” (Россия). Животных содержали в условиях вивария при стандартной температуре с естественным освещением и свободным доступом к воде и корму. Они были разделены на 2 группы: 1 группу (контрольную, “Норма”, n=10) составили животные, которым вводили 0,9% (масса/объём) раствор NaCl. Во 2 группу (опытную, “Диабет”, n=10) были включены крысы с экспериментальным сахарным диабетом.

#### *Моделирование экспериментального сахарного диабета*

Индукцию сахарного диабета вызывали путём однократной внутрибрюшинной инъекции 5% (масса/объём) моногидрата аллоксана в 0,9% (масса/объём) растворе NaCl [8]. Забор крови проводили из кончика хвоста утром натощак в стерильных условиях. Измерение уровня глюкозы осуществляли с помощью глюкометра Саттелит плюс (“ЭЛТА”, Россия). Спустя 14 суток животных декапитировали и анализировали биоматериал (печень).

### Экстракция ЛДГ

Для получения гомогената печень крыс растирали в ступке на холоде в соотношении 1:5 к среде выделения (Трис-НСl буфер, содержащий 350 мМ сахарозу 1 мМ EDTA, 2 мМ KCl, 3 мМ DTT, pH 8,0) и центрифугировали 5 мин при 3000 g и 4°C. Для дальнейших исследований использовали полученный супернатант.

### Измерение активности ЛДГ

Активность ЛДГ определяли спектрофотометрически с помощью коммерческого набора ЛДГ-ВИТАЛ (“Витал Девелопмент Корпорэйшн”, Россия), измеряя уменьшение оптической плотности при  $\lambda=340$  нм, связанное с расходом NADH в ходе превращения пирувата в лактат. Среда измерения активности ЛДГ содержала 10 мМ калий-фосфатный буфер, pH 7,8, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ KCl; 3 мМ пируват, 1,25 мМ NADH. За единицу активности (Е) ЛДГ принимали количество фермента, необходимое для превращения 1 мкмоль субстрата в 1 мин при 25°C. Для определения содержания белка использовали метод Лоури. Активность ферментов выражали в виде удельной активности (Е/мг белка).

### Исследование изоферментного состава ЛДГ

Для анализа изоферментного состава ЛДГ печени крыс проводили электрофорез в полиакриламидном геле по модифицированной методике Дэвиса в двух полиакриламидных гелях различной концентрации [9]. Нижний гель (8%) включал 8% акриламид/метиленабисакриламид (А/В; 74:1; масса/объем); 1,5 М Трис-НСl, pH 8,8; 3 мМ свежеприготовленный раствор персульфата аммония; 3 мМ TEMED. Верхний гель (4%) включал 4% А/В; 0,5М Трис-НСl, pH 6,8; 3 мМ персульфат аммония; 3 мМ TEMED. В качестве электродного использовали трис-глициновый буфер (0,025 М Трис-НСl – 0,192 М глицин), pH 8,3 с 0,01% бромфеноловым синим (масса/объем). На один карман пластинки геля подавали постоянный электрический ток 1,5-2,5 мА [10]. Все процедуры проводили при 4°C. Специфическое проявление фермента осуществляли при помощи тетразолиевого метода в среде следующего состава: 50 мМ Трис-НСl буфер (pH 7,8), 0,1 М лактат натрия, 3 мМ NAD<sup>+</sup>; 1 мМ MgCl<sub>2</sub>; 0,01 М феназинметасульфат и 0,01 М нитросиний тетразолий. В карман геля вносили 5 мкг белка исследуемой фракции. Электрофоретическая подвижность ( $R_f$ ) — это скорость движения заряженной молекулы (см/ч) в электрическом поле с напряженностью 1 В/см. В нашей работе данный показатель определяли как отношение длины, пройденной белковой полосой ( $L_1$ ), к длине, пройденной фронтом красителя ( $L_2$ ):  $R_f = L_1 / L_2$ .

### Дифференциальное центрифугирование

Определение субклеточной локализации проводили путём дифференциального центрифугирования. Для этого образец печени растирали в ступке со средой

выделения (300 мМ сахароза; 40 мМ Трис-НСl (pH 7,8); 5 мМ EDTA, 10 мМ KCl; 1 мМ MgCl<sub>2</sub>; 0,1% БСА (масса/объем); 0,05% цистеин), фильтровали через 4 слоя марли и центрифугировали при 3000 g 5 мин при 4°C. Полученный надосадок центрифугировали при 12000 g 30 мин на центрифуге Eppendorf Centrifuge 5804 (“Eppendorf”, Германия) (температура 4°C) для получения фракции цитозоля (супернатант) и митохондрий (осадок). Митохондрии суспендировали в среде выделения в соотношении 1:1, а затем разрушали осмотическим шоком в 50 мМ Трис-НСl буфере, pH 7,8. Перекрёстное загрязнение определяли по активности маркерных ферментов цитоплазмы (алкогольдегидрогеназа [11]) и митохондрий (сукцинатдегидрогеназа [12]).

### Выделение РНК

Суммарную клеточную РНК выделяли с помощью метода гуанидин изотиоционат-фенол-хлороформной экстракции с использованием в качестве осадителя LiCl [13]. Для визуализации и анализа качества выделенной РНК применяли электрофорез в 1% агарозном геле (масса/объем). Окрашивание геля осуществляли 0,1% спиртовым раствором бромистого этидия. Обратную транскрипцию мРНК проводили с использованием фермента M-MuLV обратной транскриптазы и праймерами олиго(dT) (“СибФермент”, Россия) для синтеза первой цепи кДНК согласно инструкции производителя.

### Подбор праймеров

Специфические праймеры подбирали с использованием нуклеотидных последовательностей *ldha* и *ldhb* крысы, взятых из международной базы данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genes/>), с помощью программы Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Полученные олигонуклеотидные последовательности прошли проверку на специфичность к исследуемым генам в программе BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/blast/>) [14] и на образование сшивок и других вторичных структур в программе Clustal Omega [15]. На основании проанализированных последовательностей были подобраны специфические праймеры для *ldha* и *ldhb* генов ЛДГ крысы (таблица).

### Проведение ПЦР в реальном времени

Полимеразную цепную реакцию проводили на ПЦР анализаторе Bio-Rad DNA Engine Thermal Cycler Chromo 4 (“Bio-Rad”, США), в качестве реактивов были использованы наборы Экстра-микс для ПЦР HS-Taq PCR (“Диаэм”, Россия) и краситель SYBR Green I (“Евроген”, Россия). Параметры амплификации: предварительная денатурация 95°C — 5 мин, затем цикл: 95°C — 20 с, 60°C — 30 с, 72°C — 40 с (детекция), финальная элонгация 72°C — 10 мин. Количество кДНК контролировали с использованием параллельной амплификации фактора элонгации *ef-1α* и

## ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗА В ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ДИАБЕТЕ

Таблица. Специфические праймеры для *ldha* и *ldhb* генов ЛДГ крысы

Ген	Праймер	Нуклеотидная последовательность	Температура отжига, °C	Теор. размер продукта, п.н
<i>ldh a</i>	прямой	CTCAGCGTCCCATGTATCCT	59	258
	обратный	TGAGATTTCCTCCAGACCAC		
<i>ldh b</i>	прямой	CTGGATTCTGCTCGGTTTCG	59	286
	обратный	TGAGGTCAGCCACACTTAGG		

разработанными нами ген-специфичными праймерами (таблица). Отрицательным контролем служила суммарная РНК, не подвергшаяся обратной транскрипции. Относительный уровень экспрессии исследуемых генов определяли при помощи 2<sup>-ΔΔCt</sup>-метода и программного обеспечения Opticon Monitor™ Software (“Bio-Rad”).

Опыты осуществляли в трёхкратной аналитической и пятикратной биологической повторностях. Для проведения статистического анализа использовали коммерческую программу StatTech v. 1.2.0 (“Статтех”, Россия). Если количество исследуемых показателей не превышало 50, соответствие нормальному распределению рассчитывали с использованием критерия Шапиро-Уилка; в случае большего числа исследуемых (>50) применяли критерий Колмогорова-Смирнова. Для описания количественных показателей, нормальное распределение которых было подтверждено, пользовались расчётом среднего арифметического (М) и стандартного отклонения (СО), а также определяли границы 95-процентного доверительного интервала (95% ДИ). Сравнение трёх и более групп по количественному показателю, имеющему нормальное распределение, выполняли с помощью однофакторного дисперсионного анализа, апостериорные сравнения проводили с помощью критерия Тьюки (при условии равенства дисперсий). Различия считали статистически достоверными при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Индукция экспериментального диабета

К началу эксперимента концентрация глюкозы в плазме крови крыс находилась в пределах нормы ( $5,1 \pm 0,16$  ммоль/л). Через 14 дней после инъекции аллоксана подопытным крысам концентрация глюкозы в их крови повышалась до  $24,8 \pm 0,20$  ммоль/л. У контрольных животных концентрация глюкозы находилась в пределах нормы и составляла  $5,5 \pm 0,07$  ммоль/л (рис. 1).

### Активность ЛДГ в крови

Анализ активности ЛДГ в крови контрольных животных и крыс с экспериментальным аллоксановым диабетом показал, что в контрольной группе данный показатель был примерно в 3 раза ниже, чем у животных с патологией ( $365 \pm 20$  Е/л и  $1000 \pm 123$  Е/л соответственно) (рис. 2). Полученные нами данные согласуются с результатами проведённых ранее исследований, выявивших взаимосвязи между показателями ЛДГ и глюкозы

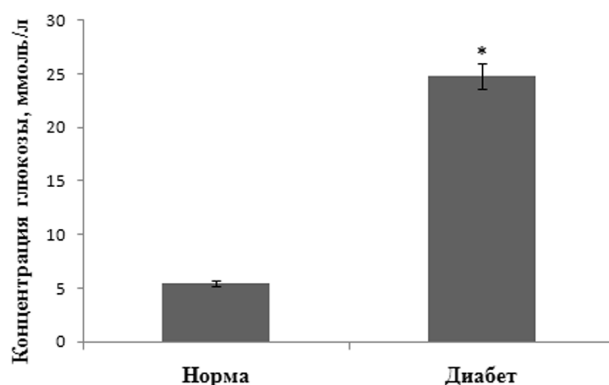


Рисунок 1. Концентрация глюкозы в крови. Норма — контрольная группа крыс; Диабет — животные с аллоксановым диабетом. Значимость различий: \* —  $p = 0,007$ .

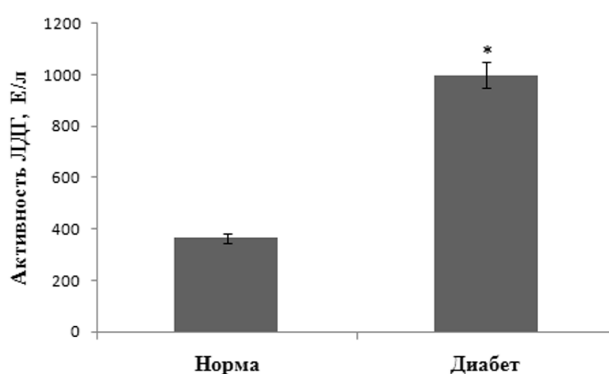


Рисунок 2. Активность ЛДГ в крови крыс в норме (Норма) и при аллоксановом диабете (Диабет). Значимость различий: \* —  $p < 0,01$ .

у мужчин с сахарным диабетом второго типа [16]. Сообщается, что диабет оказывает неблагоприятное воздействие за счёт повышения уровня активности ЛДГ в крови [17].

Анализ данных литературы показал, что при любом повреждении клеток у пациентов всех возрастных групп наблюдается повышение активности ЛДГ в крови, следовательно данный показатель можно расценивать как неспецифический маркер патологии [17], а, как известно, введение крысам аллоксана приводит не только к разрушению β-клеток поджелудочной железы, но и к окислительным поражениям печени в острый период аллоксанового диабета. Аллоксан, схожий по своему строению с молекулой глюкозы, способен проникать внутрь клеток островков Лангерганса при помощи белка-транспортера глюкозы GLUT2, накапливаться в β-клетках поджелудочной железы и повреждать их.

В связи с тем, что GLUT2 обнаруживается не только в поджелудочной железе, но и почках, и печени большинства организмов, аллоксан с его помощью может поступать и в эти органы, генерируя там АФК, приводящие к поражению гепатоцитов и клеток почечных канальцев [11]. Таким образом, повышение активности ЛДГ в крови также может быть следствием повреждения клеток.

#### Активность ЛДГ в цитоплазме и митохондриях печени

Довольно долгое время ЛДГ считали маркерным ферментом цитоплазмы [18]. Однако накапливается всё больше данных о том, что лактат может поступать в митохондрии и пероксисомы при помощи так называемых монокарбоксилатных переносчиков (monocarboxylate transporters — MCTs) [19]. Поступивший в митохондрии лактат затем окисляется, а образовавшийся NADH включается в процесс окислительного фосфорилирования [20]. Это окисление лактата осуществляется митохондриальным лактат-окисляющим комплексом (мЛОК) [21]. Данный комплекс включает ЛДГ, локализованную на наружной стороне внутренней митохондриальной мембраны, цитохромоксидазу, белок-транспортер лактата (MCT-1) и его шаперон OX-47 (CD-147). В связи с этим интересно было проанализировать активность ЛДГ в цитоплазме и митохондриях печени крыс. Результаты, представленные на рисунке 3, показывают, что активность цитоплазматической формы в норме примерно в 1,5 раза больше данного показателя в группе животных с диабетом. Данный факт можно объяснить тем, что в процессе развития сахарного диабета наблюдается нарушение проницаемости клеточных мембран, вследствие чего они перестают быть доступными для глюкозы [22]. Дефицит глюкозы в клетке приводит к снижению скорости гликолиза и, как следствие, концентрация пирувата (субстрата ЛДГ) также падает.

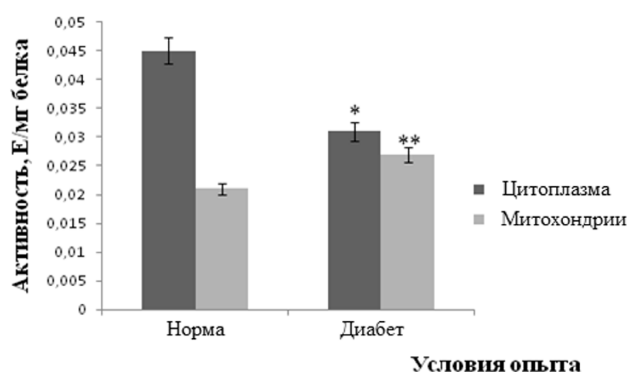
Анализ активности фермента в митохондриях подобной зависимости не выявил; напротив,

у опытной группы крыс наблюдалось незначительное увеличение данного показателя, находящееся в пределах погрешности. Следует отметить, что перекрёстное загрязнение маркерных ферментов находилось в пределах 12-15%, что позволяет сделать заключение об эффективном проведении дифференциального центрифугирования.

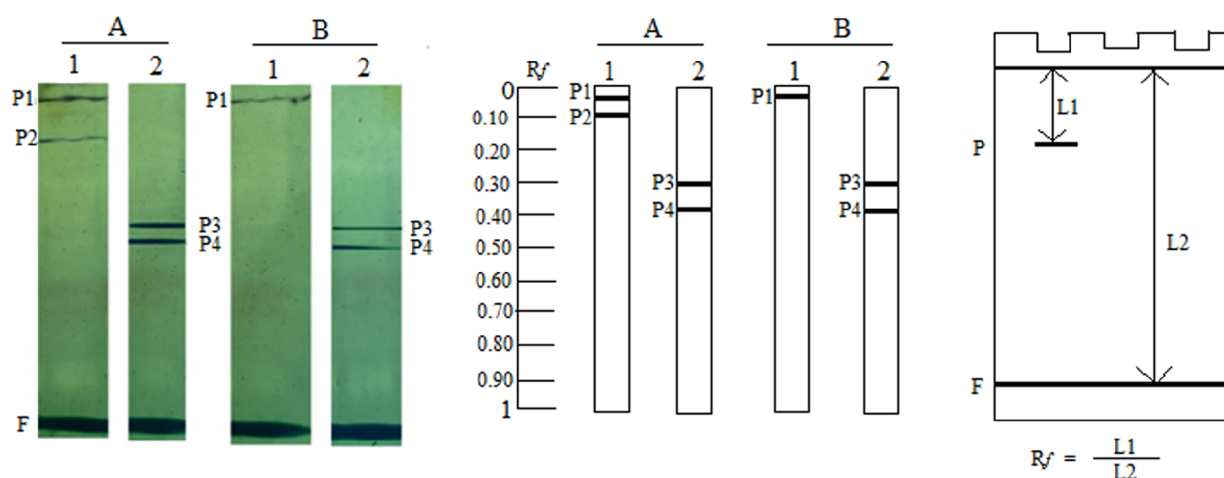
#### Исследование изоферментного состава ЛДГ

Изменение скорости функционирования ЛДГ может быть связано с различными факторами (более медленной интенсивностью активности имеющихся изоферментов или инактивацией какой-либо из данных форм ЛДГ), в связи с чем были проведены исследования изоферментного состава ЛДГ в контрольной и опытной группах животных.

Проведённые электрофоретические исследования цитоплазматической и митохондриальной фракций печени контрольной и опытной групп крыс с последующим окрашиванием геля на активность ЛДГ показали, что в цитоплазме здоровых крыс присутствуют две изоформы фермента с электрофоретической подвижностью 0,04 и 0,1



**Рисунок 3.** Удельная активность ЛДГ в цитоплазме и митохондриях гепатоцитов крыс. Норма — здоровые крысы, Диабет — животные с аллоксановым диабетом. Значимость различий: \* —  $p < 0,001$ ; \*\* —  $p = 0,047$ .



**Рисунок 4.** Распределение форм ЛДГ в цитоплазматической (1) и митохондриальной (2) фракциях гепатоцитов *Rattus norvegicus* L. А — здоровые животные (Норма); Б — крысы с аллоксановым диабетом (Диабет); P1, P2, P3 и P4 — белковые полосы, обладающие лактатдегидрогеназной активностью ( $R_f$  — 0,04; 0,10; 0,30 и 0,39 соответственно); F — фронт красителя.

(рис. 4). В цитозоле диабетических крыс обнаружена только одна медленно движущаяся белковая полоса с  $R_f$  0,04. Данный факт согласуется с показателями активности ЛДГ в норме и при аллоксановом диабете. Интересно, что в митохондриях крыс изоферментный состав не меняется: у здоровых крыс и у животных с аллоксановым диабетом присутствовали по две изоформы с электрофоретической подвижностью 0,30 и 0,39. Вероятно, незначительное увеличение активности митохондриальной ЛДГ связано с усилением работы уже имеющихся форм фермента, а не с синтезом дополнительных молекул этого белка.

#### Анализ экспрессии генов ЛДГ

В тканях человека имеется пять активных изоферментов ЛДГ, каждый из которых представляет собой гомо- или гетеротетрамерный метаболический фермент, состоящий из двух основных субъединиц М и Н (формально А и В), кодируемых генами *ldha* и *ldhb* соответственно. Субъединица М преобладает в скелетных мышцах, тогда как субъединица Н преобладает в сердечной мышце [23]. ЛДГ обнаруживается практически во всех органах и тканях организма, при этом распределение изоферментов ЛДГ органоспецифично [23].

Для анализа скорости экспрессии генов ЛДГ-системы, которые могут вызывать изменения активности и изоферментного состава ЛДГ при диабете, были подобраны специфические праймеры к генам *ldha* и *ldhb* ЛДГ крыс.

Для того чтобы выделить тотальную РНК практически без деформации, использовали гуанидинтиоцианат. Выделенную РНК использовали для получения кДНК с помощью метода обратной транскрипции. Для оценки скорости экспрессии генов, кодирующих субъединицы А и В ЛДГ, была проведена ПЦР в реальном времени, результаты которой показаны на рисунке 5.

Анализ полученных данных свидетельствует, что в печени здоровых крыс активно транскрибируются

оба гена. В печени животных с экспериментальным диабетом наблюдается снижение уровня их транскриптов. Причём экспрессия гена *ldha* была снижена почти в 9 раз, тогда как скорость функционирования гена *ldhb* уменьшалась всего в 1,25 раза. Полученные результаты позволяют заключить, что активность ЛДГ в печени обеих групп животных зависит от скорости транскрипции генов, кодирующих субъединицы А и В ЛДГ. Вероятно, значительное уменьшение активности исследуемого фермента связано, в первую очередь, с работой гена *ldha*, так как ген *ldhb* в печени группы здоровых крыс и животных с аллоксановым диабетом функционировал приблизительно на одном уровне (наблюдаемые изменения находятся в пределах погрешности).

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Уменьшение активности ЛДГ в гепатоцитах печени крыс с экспериментальным аллоксановым диабетом обусловлено перестройкой метаболических потоков внутри клеток и, по-видимому, связано с исчезновением одной из форм фермента и более медленной скоростью экспрессии генов, кодирующих субъединицы А и В ЛДГ. Известно, что при сахарном диабете наблюдаются нарушения углеводного обмена, выражающиеся в уменьшении утилизации глюкозы клетками. Вероятно, снижение активности ЛДГ связано с понижением интенсивности поглощения глюкозы клетками и торможением гликолиза. Пируват (субстрат ЛДГ) образуется в меньшей концентрации, исчезает одна из цитоплазматических изоформ исследуемого фермента и, как следствие, активность ЛДГ падает. Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о важной роли ЛДГ в адаптивной реакции клеточного метаболизма при развитии сахарного диабета I типа.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят компанию “Евроген” за синтез используемых в исследовании олигонуклеотидов.

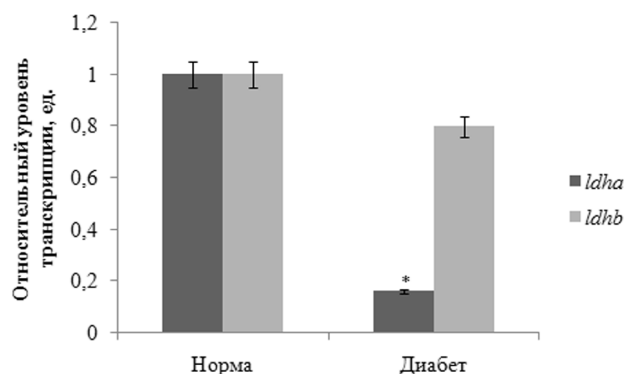
#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (проект № 20-04-00296).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры эксперимента соответствовали требованиям международных правил гуманного отношения к животным, отражённых в санитарных правилах по отбору и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ



**Рисунок 5.** Относительный уровень транскрипции генов *ldha* и *ldhb* в печени здоровых крыс (Норма) и животных с аллоксановым диабетом (Диабет). Значимость различий: \* —  $p < 0,001$ .

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Mayfield J. (1998) Diagnosis and classification of diabetes mellitus: new criteria. *Am. Fam. Physician*, **58**(6), 1355-1362.
2. Kono N., Kuwajima M., Tarui S. (1981) Alteration of glycolytic intermediary metabolism in erythrocytes during diabetic ketoacidosis and its recovery phase. *Diabetes*, **30**(4), 346-353.
3. Mali A.V., Bhise S.S., Hegde M.V., Katyare S.S. (2016) Altered Erythrocyte Glycolytic Enzyme Activities in Type-II Diabetes. *Indian J. Clin. Biochem.*, **31**(3), 321-325. DOI: 10.1007/s12291-015-0529-6
4. Епринцева А.Т., Селиванова Н.В., Моисеенко А.В. (2021) Влияние экстракта топинамбура на функционирование малатдегидрогеназы в печени крыс при аллоксановом диабете. *Биомедицинская химия*, **67**(2), 144-149. [Eprintsev A.T., Selivanova N.V., Moiseenko A.V. (2021) Effect of jerusalem artichoke extract on the functioning of malate dehydrogenase in the liver of rats with alloxan diabetes. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **67**(2), 144-149.] DOI: 10.18097/PBMC20216702144
5. Аль Дайни С. (2012) Влияние водного экстракта Оливы европейской (*Olea europaea*) на функционирование ферментов гликоксилатного цикла у крыс в условиях экспериментального диабета. Автореферат дис. кандидата биологических наук, Воронеж. гос. ун-т, Воронеж. [Al' Dajni S. (2012) Vliyanie vodnogo ekstrakta Olivы evropejskoj (*Olea europaea*) na funkcionirovanie fermentov glioksilatnogo cikla u krysv v usloviyah eksperimental'nogo diabeta. Avtoreferat dis. kandidata biologicheskikh nauk, Voronezh. gos. un-t, Voronezh.]
6. Avezov K., Reznick A.Z., Aizenbud D. (2014) LDH enzyme activity in human saliva: the effect of exposure to cigarette smoke and its different components. *Arch. Oral Biol.*, **59**(2), 142-148. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2013.11.003
7. Mali A.V., Bhise S.S., Katyare S.S., Hegde M.V. (2018) Altered kinetics properties of erythrocyte lactate dehydrogenase in type II diabetic patients and its implications for lactic acidosis. *Indian J. Clin. Biochem.*, **33**(1), 38-45. DOI: 10.1007/s12291-017-0637-6
8. Lenzen S. (2008) The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, **51**(2), 216-226. DOI: 10.1007/s00125-007-0886-7
9. Pollock N.L., Rai M., Simond K.S., Hesketh S.J., Teo A.C.K., Parmar M., Sridhar P., Collins R., Lee S.C., Stroud Z.N., Bakker S.E., Muench S.P., Barton C.H., Hurlbut G., Roper D.I., Smith C.J.I., Knowles T.J., Spickett C.M., East J.M., Postis V., Dafforn T.R. (2019) SMA-PAGE: A new method to examine complexes of membrane proteins using SMALP nano-encapsulation and native gel electrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, **1861**(8), 1437-1445. DOI: 10.1016/j.bbamem.2019.05.011
10. Harper S., Speicher D.W. (2019) Comparing complex protein samples using two-dimensional polyacrylamide gels. *Curr. Protoc. Protein Sci.*, **96**(1), e87. DOI: 10.1002/cpps.87
11. Jelski W., Laniewska-Dunaj M., Orywal K., Kochanowicz J., Rutkowski R., Szmitkowski M. (2014) The activity of alcohol dehydrogenase (ADH) isoenzymes and aldehyde dehydrogenase (ALDH) in the sera of patients with brain cancer. *Neurochem. Res.*, **39**, 2313-2318. DOI: 10.1007/s11064-014-1402-3
12. Епринцева А.Т., Федорин Д.Н., Селиванова Н.В., Ву Т.Л., Махмуд А.С., Попов В.Н. (2012) Роль метилирования промоторов в регуляции генов сукцинатдегидрогеназы в проростках кукурузы. *Физиол. Раст.*, **59**(3), 332-340. [Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Selivanova N.V., Vu T.L., Mahmud A.S., Popov V.N. (2012) The role of promoter methylation in the regulation of genes encoding succinate dehydrogenase in maize seedlings. *Russian Journal of Plant Physiology*, **59**(3), 299-306.]
13. Moss D., Harbison S.A., Saul D.J. (2003) An easily automated, closed-tube forensic DNA extraction procedure using a thermostable proteinase. *Int. J. Legal Med.*, **117**, 340-349. DOI: 10.1007/s00414-003-0400-9.
14. Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden Th.L. (2012) Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, **13**(1), 134. DOI: 10.1186/1471-2105-13-134
15. Sievers F., Higgins D.G. (2014) Clustal omega. *Curr. Protoc. Bioinform.*, **48**(3.13), 1-16. DOI: 10.1002/0471250953.bi0313s48
16. Матвеева С.А., Матвеева И.В. (2016) Лактатдегидрогеназа и глюкоза крови: особенности взаимосвязей у мужчин с ишемической болезнью сердца и сахарным диабетом 2 типа. *Евразийский кардиологический журнал*, **3**, 102-103. [Matveeva S.A., Matveeva I.V. (2016) Laktatdegidrogenaza i glyukoza krvi: osobennosti vzaimosvyazey u muzhchin s ishemicheskoy boleznyu serdca i saharnym diabetom 2 tipa. *Evrasijskij kardiologicheskij zhurnal*, **3**, 102-103.]
17. Dmour H.H., Khreisat E.F., Khreisat A.F., Hasan Sh.A., Atoom O., Alkhatib A.J. (2020) Assessment of lactate dehydrogenase levels among diabetic patients treated in the outpatient clinics at King Hussein Medical Center, Royal Medical Services, Jordan. *Med. Arch.*, **74**(5), 384-386. DOI: 10.5455/medarch.2020.74.384-386
18. Feng Y., Xiong Y., Qiao T., Li X., Jia L., Han Y. (2018) Lactate dehydrogenase A: a key player in carcinogenesis and potential target in cancer therapy. *Cancer Med.*, **7**(12), 6124-6136. DOI: 10.1002/cam4.1820
19. Elsner M., Tiedge M., Guldbakke B., Munday R., Lenzen S. (2002) Importance of the GLUT2 glucose transporter for pancreatic beta cell toxicity of alloxan. *Diabetologia*, **45**(11), 1542-1549. DOI: 10.1007/s00125-002-0955-x
20. Hertz L., Dienel G.A. (2002) Energy metabolism in the brain. *Int. Rev. Neurobiol.*, **51**, 1-102. DOI: 10.1016/s0074-7742(02)51003-5
21. Hashimoto T., Brooks G.A. (2008) Mitochondrial lactate oxidation complex and an adaptive role for lactate production. *Med. Sci. Sports Exerc.*, **40**(3), 486-494. DOI: 10.1249/MSS.0b013e31815fcb04
22. Chandran S., Yap F., Hussain K. (2014) Molecular mechanisms of protein induced hyperinsulinaemic hypoglycaemia. *World J. Diabetes*, **5**(5), 666-677. DOI: 10.4239/wjd.v5.i5.666
23. Ždravlević M., Brand A., di Ianni L., Dettmer K., Reinders J., Singer K., Peter K., Schnell A., Bruss C., Decking S.M., Koehl G., Felipe-Abrio B., Durivault J., Bayer P., Evangelista M., O'Brien T., Oefner P.J., Renner K., Pouyssegur J., Kreutz M. (2018) Double genetic disruption of lactate dehydrogenases A and B is required to ablate the "Warburg effect" restricting tumor growth to oxidative metabolism. *J. Biol. Chem.*, **293**(41), 15947-15961. DOI: 10.1074/jbc.RA118.004180

Поступила в редакцию: 22. 11. 2021.

После доработки: 23. 01. 2022.

Принята к печати: 31. 01. 2022.

EXPRESSION LEVELS AND ACTIVITY OF RAT LIVER  
LACTATE DEHYDROGENASE ISOENZYMES IN ALLOXAN DIABETES

*A.T. Eprintsev\*, I.R. Bondareva, N.V. Selivanova*

Voronezh State University,  
1 Universitetskaya sq., Voronezh, 394006 Russia; \*e-mail: bc366@bio.vsu.ru

A significant decrease in the activity of lactate dehydrogenase (LDH, EC 1.1.1.27) in liver cells of rats with alloxan diabetes was found due to a decrease in the expression of the corresponding genes. The decrease in the activity of the enzyme under study in experimental type I diabetes was associated with inactivation of the cytoplasmic isoform of LDH. It was found that the level of *ldha* and *ldhb* gene transcripts in the liver of healthy rats was higher than in animals with alloxan diabetes. The *ldha* gene expression demonstrated almost 9-fold decrease, while a decrease in the *ldhb* gene expression was less pronounced (just 1.25-fold). Probably, the decrease in the rate of functioning of the enzyme under study is associated with a decrease in the intensity of glucose uptake by cells, which leads to inhibition of glycolysis and intensification of all stages of gluconeogenesis, particularly, reversed glycolysis reactions. Thus, the data obtained by us indicate an important role of LDH in the adaptive response of cellular metabolism in the development of type I diabetes mellitus.

**Key words:** lactate dehydrogenase; diabetes; alloxan; activity; expression; gene; isoenzyme

**Funding.** The study was supported by Russian Foundation for Basic Research (project no. 20-04-00296).

Received: 22.11.2021, revised: 23.01.2022, accepted: 31.01.2022.