

Г. Г. БАТИҚЯՆ, С. Г. ՄՈՎՏԵՏՅԱՆ

## ОБ ИЗОФЕРМЕНТНОМ НАБОРЕ И КОФЕРМЕНТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В РАЗЛИЧНЫХ ТКАНЯХ КУР

Исследовалась удельная общая активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в мозгу, печени и почках кур, ее изоферментный состав и коферментное сродство. Анализ и сопоставление полученных результатов показывают, что коферментная избирательность ЛДГ в органах кур, состоящая целиком из М-типа субъединиц, не особенно выражена.

Лактатдегидрогеназа в большинстве тканей и органов млекопитающих фигурирует в виде пяти изоферментов тетрамерного строения. Одни изоферменты (ЛДГ<sub>1</sub> и ЛДГ<sub>5</sub>) сконструированы из Н- или из М-субъединиц, а другие (ЛДГ<sub>2</sub>, ЛДГ<sub>3</sub> и ЛДГ<sub>4</sub>) являются гибридами и содержат оба мономера [1].

В настоящее время твердо установлено, что Н- и М-субъединицы кодируются различными генами, структурально не идентичны и имеют неодинаковое функциональное назначение [2]. Они резко отличаются рядом физико-химических свойств, в том числе и коферментной избирательностью.

Ранее нашей лабораторией было показано, что изоферменты тканей млекопитающих с высоким содержанием Н-мономеров в процессе синтеза лактата проявляют большую реакционноспособность к дезаминано-НАДН, нежели к НАДН [3]. Обратная картина наблюдается в случае преобладания М-типа субъединиц.

Изоферментный набор и индивидуальные особенности отдельных молекулярных форм ЛДГ у птиц недостаточно изучены, а имеющиеся литературные данные по этому вопросу порою неоднозначны [4—6]. Факт высокого содержания М-субъединиц в ЛДГ птиц (куры) предполагает, что она может служить удобным природным объектом для изучения физико-химических свойств, в том числе и коферментной специфичности указанного мономера.

Исходя из изложенного, в настоящей статье мы преследовали двоякую цель: с одной стороны, более обстоятельно изучить изоферментный спектр и характер распределения изоферментов ЛДГ в различных тканях (мозг, печень и почки), а с другой—коферментное сродство отдельных изоформ ЛДГ и данного фермента в целом.

*Материал и методика.* Эксперименты проводили на взрослых птицах (петухи), после декапитации которых быстро извлекали мозг, печень и почки, переносили их в стакан с охлажденным раствором 0,25 М сахарозы, готовили кашницу и гомогенизировали. Часть гомогената центрифугировали при 70.000 g на рефрижераторной центри-

фуге VAC-601 для удаления нерастворимых частей и получения гиалоплазмы. Дифференциальное центрифугирование проводили по методу Броди и Бейна [7] в модификации Палладина и Кирсенко [8]. Ядерную фракцию осаждали при 900—1060 g, митохондриальную—18.000—20.000 g (мозг), 12.000—15.000 g (печень и почки). Митохондрии промывали два раза 0,25 M раствором сахарозы, подвергали замораживанию и оттаиванию и центрифугировали при 70.000 g на VAC-601 для получения супернатанта.

Разделение изоферментов ЛДГ проводили методом диск-электрофореза на полиакриламидном геле на приборе фирмы «РЕАНАЛ», модель 69. Метод основан на приготвлении колонок из двух гелей различной плотности: верхнего—крупнопористого и нижнего—мелкопористого. На границе раздела гелей происходит концентрирование зон, что увеличивает разрешающую способность электрофореза. Но не во всех случаях применение двух гелей оправдано. Так, например, известно [9, 10], что разделение изоферментов ЛДГ человека в присутствии верхнего геля приводит к неблагоприятному наложению изоферментов  $M_4$  и  $M_3H$  [11].

Принимая во внимание недочеты прежних работ [12], мы использовали взамен крупнопористого геля 40% сахарозу, а мелкопористого—5,5% раствор полиакриламидного геля (из приготовленного extempore 7,5% раствора брали 11 мл и добавляли 4 мл дистиллированной воды).

7,5% гель pripravляли по следующему рецепту: А. 1,0 раствор HCl—48 мл, трис (гидроксиэтил-аминметан)—36,6 г, N, N, N, N'-тетраметилэтилендиамин—0,23 мл, дистиллированная вода—до 100 мл (pH 8,9); В. 99% акриламид—28 г, N, N'-метилен-бис-акриламид—0,735 г, дистиллированная вода—до 100 мл; С. персульфат аммония—0,140 г и дистиллированная вода—до 100 мл. Эти растворы смешивали в следующих объемах: 1А:2В:4С:1 (дистиллированная вода).

В качестве электродного буфера использовали трис-глициновый (трис—1,2 г, глицин—5,76 г на два литра, pH 8,3) [12]. Для индикации конца электрофореза в качестве метки использовали 0,001% раствор бромфенолового синего [9]. Длительность электрофореза 1 час 50 мин. Обнаруживающий раствор состоял из 1 мл 1,0 M раствора лактата Na, 1 мл НАД (10 мг/мл), 1 мл 0,1 M раствора NaCl, 1 мл 0,005 M раствора  $MgCl_2$ , 2,5 мл 0,1 M раствора К-фосфатного буфера (pH 7,4), 2,5 мл интросиногического тетразоля (1 мг/мл), 0,25 мл раствора фенолметасульфата (1 мг/мл) [13].

Дезамино-НАД (Д-НАД) добавляли в эквимолярном количестве относительно НАД, т. е. 0,015 M. Инкубацию проводили при 37°C 1 час. Скапирование окрашенных формазоновых колец геля проводили на приставке к спекорду типа UVVIS при длине волны 560 мкм [14]. Реакционная смесь, в которой определялась общая активность ЛДГ при обратной реакции, содержала 0,1 мл 0,004 M раствора НАДН, 0,1 мл 0,01 M раствора пирувата, 0,1 мл гиалоплазмы. Конечный объем доводили до 2 мл 0,1 M К-фосфатным буфером. Прямую реакцию ЛДГ определяли в смеси, содержащей 0,1 мл 0,002 M раствора НАД, 0,1 мл 0,5 M раствора лактата, 0,1 мл гиалоплазмы. Конечный объем доводили до 2 мл раствором 0,1 M глицинового буфера (pH 10) [15]; Д-НАД и Д-НАДН применяли в эквимолярных соотношениях относительно НАД и НАДН. Активность рассчитывали в единицах Вроблевского на мг белка [16], белок определяли по методу Лоури [17].

*Результаты и обсуждение.* Данные по удельной общей активности ЛДГ мозга, печени и почек, ее изоферментному составу и коферментному средству отдельных изоформ приведены в таблице, а соответствующие им зимограммы представлены на рис. Полученные результаты прежде всего показывают, что ЛДГ во всех изученных нами органах состоит исключительно из М-мономеров—изофермента ЛДГ<sub>5</sub>. Из таблицы видно, что как в мозгу, так и в печени (опыты на гиалоплазме), несмотря на общую низкую активность, НАД значительно эффективнее (на 30 и 35% соответственно) в процессе дегидрирования лактата, не-

жели Д-НАД. В обратной реакции, т. е. в синтезе лактата из пирувата, эта разница почти нивелируется или же реакционность Д-НАДН несколько превалирует по сравнению с НАДН.



I 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

Рис. НАД—супернатант (мозг), 2. Д-НАД—супернатант (мозг), 3. НАД—митохондрии (мозг), 4. Д-НАД—митохондрии (мозг), 5. НАД—супернатант (печень), 6. Д-НАД—супернатант (печень), 7. НАД—митохондрии (печень), 8. Д-НАД—митохондрии (печень), 9. НАД—супернатант (почки), 10. Д-НАД—супернатант (почки), 11. НАД—митохондрии (почки), 12. Д-НАД—митохондрии (почки).

Иная картина наблюдается в экспериментах с почечной тканью. В этом органе различие в действии НАД и Д-НАД при катализе распада лактата не особенно рельефно, между тем как в обратном процессе значительно большую активность ( $\approx 27\%$ ) проявляет Д-НАДН. В опытах с митохондриями (таблица) заметно сглаживается и порой наступает

Т а б л и ц а  
Удельная активность ЛДГ и ее изофермента ЛДГ<sub>5</sub> в различных тканях кур

Источник фермента	Коферменты	Удельная общая активность ЛДГ, Н-моль пиридиннуклеотида / мг/белка / мин			Условная удельная активность		
		мозг	печень	почки	мозг	печень	почки
Гналоплазма	НАД	599,8	783,9	978,4	1,48	2,46	1,67
	НАДН	91,1	204,2	249,4	—	—	—
	Д-НАД	423,7	507,2	884,3	1,29	1,86	1,59
	Д-НАДН	126,3	215,6	339,0	—	—	—
Митохондрии	НАД	486,5	315,9	431,0	1,42	2,05	0,51
	НАДН	77,2	332,0	295,1	—	—	—
	Д-НАД	415,1	352,2	327,1	0,94	1,51	0,46
	Д-НАДН	136,5	330,6	266,7	—	—	—

риверсия в реакционности исследованных нами пиридиннуклеотидов и их восстановленных форм в лактатдегидрогеназной реакции. Несмотря на это, во всех изученных тканях НАД, хотя и в значительно меньшей степени, более эффективен в расщеплении лактата, чем Д-

НАД. В мозгу, печени и почках эта разница составляет 15, 11 и 17% соответственно. В митохондриях мозга Д-НАДН со значительно большей скоростью (33%) включается в процесс неогенеза лактата, нежели НАДН. В указанных органах печени оба кофермента проявляют одинаковую активность. Однако в митохондриях почек наблюдается противоположная картина—эффективность Д-НАДН на 10% ниже по сравнению с НАДН.

Значительный интерес представляет тот факт, что у кур (опыты на гиалоплазме), в отличие от млекопитающих [5, 6, 9], как показали наши исследования, ЛДГ с заметно большей активностью катализирует реакцию дегидрирования лактата, нежели его синтез.

Данные по определению удельной активности (таблица) изолированной диск-электрофорезом ЛДГ<sub>5</sub>, выраженные в условных единицах, почти полностью совпадают с результатами вычисления общей удельной активности предварительно необработанного фермента—ЛДГ в присутствии изученных нами пиридиннуклеотидов.

Таким образом, из полученных нами результатов вытекает, что ЛДГ мозга, печени и почек кур гомогенна, состоит исключительно из М-субъединиц и фигурирует в виде тетрамера ЛДГ<sub>5</sub>. В противоположность этому, как показали наши исследования (неопубликованные данные), ЛДГ сердца кур состоит целиком из Н-мономеров и имеет тетраэдрическое строение, присущее изоферменту ЛДГ<sub>1</sub>. Следует отметить, что в отношении характера межорганного распределения Н- и М-типов субъединиц результаты наших наблюдений в основных чертах совпадают с литературными данными [3]. Однако в вопросе об абсолютной гетерогенности ЛДГ в указанных тканях имеются некоторые расхождения. Отдельным авторам [4—6] удалось показать наличие некоторых гибридных форм ЛДГ (с несравненно более низким процентным содержанием) в тканях, содержащих исключительно как Н-, так и М-субъединицы. В одном случае, наряду с ЛДГ<sub>1</sub>, были обнаружены ЛДГ<sub>2</sub> и ЛДГ<sub>3</sub>, а в другом—вместе с ЛДГ<sub>5</sub>—ЛДГ<sub>4</sub> и ЛДГ<sub>3</sub>. Однако трудно представить формирование тетрамерной структуры гибридного изофермента в условиях отсутствия полного набора мономеров изоферментов ЛДГ (Н- и М-субъединицы) или при ничтожном содержании одного из них.

Подытоживая полученные результаты, можно заключить, что ЛДГ мозга, печени и почек кур, состоящая исключительно из изофермента ЛДГ<sub>5</sub>, с неодинаковой активностью реагирует с НАД, Д-НАДН и их редуцированными формами. При дегидрировании лактата ЛДГ сравнительно большее сродство проявляет к НАД, нежели к Д-НАД. Обратная картина наблюдается при синтезе этой оксикислоты из пирувата с участием НАДН и Д-НАДН.

Однако анализ и сопоставление полученных результатов показывают, что коферментная избирательность ЛДГ органов кур, состоящая целиком из М-типа субъединиц, не особенно выражена, что согласуется с данными наших предыдущих исследований, проведенных на

ЛДГ и ее изоферментах различных органов и тканей млекопитающих [3].

Институт биохимии АН АрмССР

Поступило 6.IX 1976 г.

Գ. Հ. ԲԱՏԻԿՅԱՆ, Ս. Գ. ՄՈՎՍԵՍՅԱՆ

ՀԱՎԻ ՏԱՐՐԵՐ ՀՅՈՒՍՎԱԾՔՆԵՐԻ ԼԱԿՏԱՏԻԵԶԻԴՐՈՒԳԵՆԱԶԱՅԻ  
ԻԶՈՖԵՐՄԵՆՏԱՅԻՆ ԿԱԶՄԻ ԵՎ ԿՈՖԵՐՄԵՆՏԱՅԻՆ  
ԽՆԱՄԱԿՑՈՒԹՅԱՆ ՄԱՍԻՆ

Ա մ փ ո փ ու մ

Հավի ուղեղում, լյարդում և երիկամներում ուսումնասիրվել է լակտատդեհիդրոգենազայի (ԼԴՀ) տեսակարար ընդհանուր ակտիվությունը, նրա իզոֆերմենտային կազմը և կոֆերմենտային ընտրողականությունը: Ցույց է տրվել, որ ուսումնասիրված օրգանների ԼԴՀ-ն համասեռ է, ամբողջությամբ կազմված է M ենթամիավորներից և հանդես է գալիս ԼԴՀ, տետրամերի ձևով: Հավի նշված օրգանների ԼԴՀ-ն ոչ միանման ակտիվությամբ է առկայի մեջ մտնում նԱԴ-ի, Դեզամինա-նԱԴ-ի և նրանց վերականգնված ձևերի հետ: Կաթնաթթվի դիհիդրոդեհնացման պրոցեսում ԼԴՀ-ն համեմատաբար մեծ ակտիվություն է դրսևորում նԱԴ-ի, քան Դ-նԱԴ-ի նկատմամբ: Հակառակ պատկեր է դիտվում պիրոխաղողաթթվից նշված օքսիթթվի սինթեզում նԱԴԻ-ի և Դ-նԱԴԻ-ի մասնակցությամբ: Ստացված տվյալների անալիզը և համեմատությունը ցույց է տալիս, որ ամբողջությամբ M-տիպի ենթամիավորներից բաղկացած հավի օրգանների ԼԴՀ-ի կոֆերմենտային խնամակցությունը այնքան էլ ցայտուն չի արտահայտված, որը և համընկնում է կաթնասունների տարբեր հյուսվածքների ԼԴՀ-ի և նրա իզոֆերմենտների նախկինում կատարած ուսումնասիրությունների արդյունքների հետ [3]:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Cahn R. D., Kaplan N. O., Levin L. and Zwillling E. Science, 135, 1962.
2. Puck T. T., Wuthiel P., Jones C. and Kao F. T. Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S.), 68, 3102, 1971.
3. Мовсесян С. Г., Мовсесян Н. О. Вопросы биохимии мозга, Ереван, 10, 75, 1975.
4. Карапетян А. М. Қапд. дисс., Ереван, 1971.
5. Everse J., Berger R. L. and Kaplan N. O. Structure and function of oxidation of regulation enzymes (New York), 691, 1972.
6. Fondy T. P., Kaplan N. O. Ann. New York Acad. Sci., 119, 838, 1965.
7. Brody T. M., Bain J. A. J. Biol. Chem. 195, 585, 1952.
8. Палладин А. К., Курсенко О. В. Биохимия, 26, 385, 1961.
9. Dietz A. A., Lubrano T. Anal. Biochem., 20, 246, 1967.
10. Dietz A. A., Lubrano T. and Rubinstein H. Clin. Chem. Acta, 27, 225, 1970.
11. Мамаев В. Б., Малахово В. И. и Обухова Л. К. Вопр. мед. химии, 8, 6, 1972.
12. Davls B. J. Ann. New York Acad. Sci. (Wash), 45, 753, 1961.
13. Markert C. G., Moller F. Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash), 45, 753, 1961.
14. Мовсесян Н. О., Хумирян М. А. и Мовсесян С. Г. Лабораторное дело, 7, 445, 1976.
15. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии, М., 1971.
16. Wroblevski F., La Due J, S. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 90, 210, 1955.
17. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. and Randall R. J. J. Biol. Chem., 19, 265, 1951.