

УДК 612.664:577.15:636.22/28

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ ЛАКТАТ-, МАЛАТ- и ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ И ИХ ИЗОФЕРМЕНТОВ В МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЕ КОРОВ КАВКАЗСКОЙ БУРОЙ ПОРОДЫ

С. Г. МОВСЕСЯН, Н. В. ОХИҚЯՆ, Н. О. МОВСЕСЯՆ, А. А. БԼՐԿՅԱՆ

Изучены общая активность, изоферментный спектр и активность изоформ некоторых окислительно-восстановительных ферментов (ЛДГ, МДГ и ГДГ) молочной железы коров кавказской бурой породы в зависимости от возраста и молочной продуктивности.

Установлено, что в молочной железе полновозрастных коров повышается активность ЛДГ и МДГ, в то время как активность ГДГ с возрастом не меняется.

Возрастному изменению морфологических признаков и функциональных свойств молочной железы коров посвящены многочисленные исследования [1—4]. Достаточно хорошо изучено микростроение вымени коров в зависимости от их возраста, периода лактации, продуктивности и ряда других факторов [5—7]. В настоящее время в литературе имеется обширный материал также по физиологии и биохимии молочной железы [8—11], однако интимные молекулярные механизмы лактогенеза и специфические стороны его регуляции по сей день во многих чертах остаются невыясненными. Недостаточно или же вовсе не изучен этот вопрос в возрастном и видовом аспекте.

В связи с этим мы задались целью изучить изменение активности некоторых ферментов окислительно-восстановительных процессов—лактатдегидрогеназы (ЛДГ), малатдегидрогеназы (МДГ) и глутаматдегидрогеназы (ГДГ)—и их изоформ в молочной железе коров кавказской бурой породы в возрастном аспекте во второй половине лактации. Изучение указанных ферментов необходимо, поскольку один из них—ГДГ—в результате интеграции углеводного и азотистого обмена выполняет важную роль в синтезе белков, а два других занимают ключевые позиции в энергетическом обмене. Изоферментный спектр указанных дегидрогеназ и процентное соотношение их отдельных фракций изучались с целью выявления тканевой специфичности молочной железы в возрастном и видовом аспекте и в связи с периодом лактации.

Материал и методика. Эксперименты проводили на коровах кавказской бурой породы. После убоя животного брали пробу из молочной железы, переносили в стакан с охлажденным раствором 0,25 М сахарозы, готовили кашину, растирая в ступ-

ке и гомогенизировали в соотношении 1:3. Использовался гомогенизатор с тефлоновым пестиком. Часть гомогената, предназначенную для исследования ГДГ и МДГ, подвергали замораживанию и оттаиванию. Гомогенаты центрифугировали при 70000 g на рефрижераторной центрифуге VAC-60. Супернатант, используемый для исследования ГДГ и МДГ, разбавляли в соотношении 1:3, для ЛДГ—1:5.

Разделение изоферментов ГДГ и МДГ проводили методом диск-электрофореза на 7,5%-ном, ЛДГ—на 5,5%-ном полиакриламидном геле на приборе фирмы «Реанал» (модель 69). Метод основан на приготовлении колонок из двух гелей различной плотности: верхнего—крупнопористого и нижнего—мелкопористого.

7,5%-ный гель готовился по следующему рецепту [12]: 0,1 N раствор HCl—48 мл, трис (гидроксиметиламинометан)—36,6 г, N, N, N', N'-тетраметилендиамин—0,23 мл; объем доводили дистиллированной водой до 100 мл, pH 8,9. 99%-ный акриламид—28 г, N, N'-метилен-бис-акриламид—0,735 г и дистиллированная вода—до 100 мл; персульфат аммония—0,140 г и дистиллированная вода—до 1000 мл.

Для получения 7,5%-го раствора полиакриламидного геля указанные растворы смешивали в следующих объемах: А:2В:4С:дистиллированная вода.

Крупнопористый гель готовили по следующему способу: 0,1 N раствор HCl—4,8 мл, трис (гидроксиметиламинометан)—5,97 г, N, N, N', N'-тетраметилендиамин—0,46 мл; объем доводили дистиллированной водой до 100 мл, pH 6,7. Акриламид—10 г, N, N'-метилен-бис-акриламид—2,5 г и дистиллированная вода—до 100 мл; рибофлавин—4,0 мг в 100 мл дистиллированной воды; сахара—40%-ная.

Для получения крупнопористого геля указанные растворы смешивали в следующих объемах: 1А:2В:1С:4Д.

5,5%-ный гель готовился из 7,5%-го, из расчета 11 мл на 4 мл дистиллированной воды. 5,5%-ный гель использовали как мелкопористый, а в качестве крупнопористого применялась 40%-ая сахара (при определении изоферментов ЛДГ).

В качестве электродного буфера использовали трис-глициновый буфер (трис—1,2 г, глицин—5,76 г на 2 л дистиллированной воды, pH 8,9), Сила тока на каждую трубку—2,5—5А. Для индикации конца электрофореза в качестве метки применяли 0,001%-ный раствор бромфенолового синего [13].

Реактивная смесь для окраски изоферментов имела следующий состав: для ЛДГ: 1 мл 0,1 М раствора лактата N_2 , 1 мл НАД (10 мг/мл), 1 мл 0,1 М раствора NaCl, 1 мл 0,005 М раствора $MgCl_2$, 2,5 мл 0,1 М раствора К-фосфатного буфера (pH 7,4), 2,4 мл нитросинего тетразолия (1 мг/мл), 0,25 мл раствора феназинметасульфата (1 мг/мл) [14].

Для МДГ: 0,5 М раствора малата (pH 7,0)—2 мл, НАД—6 мг в 0,4 мл дистиллированной воды, Д-НАД—в эквимолярном количестве относительно НАД; нитросиний тетразолий—4 мг в 0,4 мл дистиллированной воды, 0,05 М раствор NaCl в фосфатном буфере (pH 7,4)—0,7 мл, феназинметасульфат—1 мг в 0,4 мл дистиллированной воды, 0,1 М фосфатный буфер (pH 7,4)—10 мл [15].

Для ГДГ: 1 М раствор глутаминовой кислоты (pH 7,4)—1 мл, 10 мг/мл НАД—1 мл, феназинметасульфат—1 мг/мл—0,25 мл; нитросиний тетразолий 1 мг/мл—2,5 мл; 0,1 М—1 мл; К-фосфатный буфер (pH 7,4)—2,5 мл [16].

Инкубацию проводили в течение часа при 37°. Сканирование гелей проводили на приставке к спектроду типа UVvis при длине волны 560 мкм [17].

Определение общей активности ЛДГ: реакционная смесь, в которой определялась общая активность ЛДГ, при прямой реакции содержала 0,1 мл 0,2 М раствора пирувата, 0,1 мл 0,004 М раствора НАДН, 0,1 мл гомогената; конечный объем доводили до 2 мл 0,1 М К-фосфатным буфером. При обратной реакции смесь содержала 0,1 мл раствора 0,002 М НАД, 0,1 мл 0,5 М раствора лактата, 0,1 мл гомогената; конечный объем доводили до 2 мл раствором глицинового буфера (0,1 М, pH 10) [18].

МДГ:при прямой реакции—0,1 мл 0,004 М раствора НАДН₂, 0,1 мл 0,01 М раствора ЩУК, 0,1 мл экстракта; конечный объем доводили до 2 мл 0,1 М раствором К-фосфатного буфера (pH 7,4). При обратной—0,1 мл раствора 0,002 М НАД, 0,1 мл 0,5 М раствора малата, 0,1 мл экстракта; конечный объем доводили до 2 мл 0,1 М раствором глицинового буфера (pH 10) [18].

ГДГ: при прямой реакции—0,2 мл 0,002 М раствора НАД, 0,2 мл 0,5 М раствора ГК, 0,1 мл экстракта; конечный объем доводили до 2 мл раствором трис HCl буфера (рН 7,0). При обратной реакции—0,2 мл—0,002 М НАДН, 0,2 мл 5 М α -кетоглутановой кислоты (α -КГ)—0,1 мл экстракта; объем доводили до 2 мл трис HCl буфером (рН 7,8) [12].

Активность рассчитывали в единицах Вроблевского на мг белка [20]. Белок определяли по Лоури [21].

Результаты и обсуждение. Из данных, представленных в табл 1, видно, что у лактирующих (вторая половина) коров кавказской бурой породы с возрастом активность ЛДГ молочной железы претерпевает значительные изменения. В прямой реакции, т. е. при синтезе лактата из пирувата у полновозрастных коров (вторая группа) она значительно выше (примерно на 60%), чем у первотелок (первая группа). Удельная активность ЛДГ в первой группе составляет 325,8, а во второй—521,4 нмоль пиридиннуклеотида/мг белка в минуту. При обратной реакции, т. е. при распаде лактата, эта разница почти нивелируется. Аналогичные сдвиги наблюдаются и в случае с МДГ, с той лишь разницей, что реакция, катализируемая этим ферментом, у полновозрастных коров, по сравнению с первотелками, сильно ускоряется в обоих направлениях. Так, например, у коров первой группы в опытах с НАДН и НАД она составляет 360,2 и 168,5, а у животных второй группы—808,9 и 378,1 нмоль пиридиннуклеотида/мг белка соответственно, т. е. выше более чем в 2,2 раза.

Таблица 1

Удельная общая активность ЛДГ, МДГ и ГДГ в молочной железе коров,
Нмоль пиридиннуклеотида/мг белка мл
(Число опытов—8)

Фермент	Первая группа (коровы-первотелки)		Вторая группа (полновозрастные коровы)	
	НАДН	НАД	НАДН	НАД
ЛДГ	325,8	234,8	521,4	202,1
МДГ	360,2	168,5	808,9	378,1
ГДГ	4,59	0,73	4,59	0,7

Данные, приведенные в табл. 1, показывают также, что ГДГ в молочной железе обеих групп животных проявляет весьма слабую, следующую активность (как в прямой, так и в обратной реакция), без существенных различий в возрастном плане. Следует отметить, что большинство исследователей полностью отрицают наличие ГДГ в молочной железе. Однако существуют данные [11], свидетельствующие о наличии высокоактивного ГДГ, определенного монометрически в этой ткани. На наш взгляд, этот способ не пригоден для определения активности ГДГ, ибо трансаминазный путь окисления глутамата может имитировать его распад окислительным деаминированием. Тем не ме-

нее эти данные послужили основанием заново проштудировать этот вопрос.

Результаты наших опытов (табл. 1 и 2) по определению общей активности изоферментного набора ГДГ и удельной активности отдельных изоформ не оставляют сомнений в наличии, хотя и весьма слабой, активности ГДГ в молочной железе. Несмотря на это, роль и отношение этого фермента к механизму прямого синтеза аминокислот в молочной железе в связи с его слабой активностью во многих чертах остаются загадочными и подлежат дальнейшему изучению.

Таблица 2

Процентное содержание изоферментов ЛДГ, МДГ и ГДГ и их удельная активность в молочной железе коров. Нмоль пирдиннуклеотида/мг белка в мин

Фермент	Изофермент	Первая группа (коровы-первотелки)			Вторая группа (полновозрастные коровы)		
		%	НАДН	НАД	%	НАДН	НАД
ЛДГ	1	34,12	111,2	80,1	57,38	299,1	116,0
	2	29,91	97,4	70,2	24,10	125,7	48,7
	3	26,20	85,4	61,5	18,52	96,6	37,4
	4	9,77	31,8	22,9	—	—	—
	5	—	—	—	—	—	—
МДГ	1	18,11	65,2	30,5	28,75	232,6	108,7
	2	81,89	295,5	138,0	71,25	576,3	269,4
ГДГ	1	—	—	—	—	—	—
	2	18,60	0,853	0,135	22,59	1,036	0,158
	3	34,90	1,601	0,254	32,99	1,514	0,230
	4	48,50	2,226	0,354	44,42	2,038	0,310

Данные о спектре, процентном содержании и удельной активности изоферментов ЛДГ, МДГ и ГДГ приведены в табл. 2.

Полученные результаты показывают, что ЛДГ молочной железы молодых коров (первотелок) представлена 4-мя изоферментами. В ее составе отсутствует ЛДГ₅, состоящая исключительно из М-субъединиц. Основная активность приходится на первые три изофермента. Она распределяется следующим образом: ЛДГ₁—34,12%, ЛДГ₂—29,91% и ЛДГ₃—26,20%. Процентное содержание ЛДГ₄ составляет всего лишь 9,77%.

Интересно отметить, что у полновозрастных коров не только изменяется процентное содержание и, следовательно, удельная активность изоферментов ЛДГ молочной железы, но и происходят качественные изменения в спектре ее, выражающиеся в исчезновении 4-го изофермента—ЛДГ₄. Из табл. 2 видно, что у этой группы животных примерно на 70% возрастает содержание и более чем в 2,5 раза удельная активность ЛДГ₁, состоящей преимущественно из Н-субъединиц. Это происходит в результате снижения процентного содержания ЛДГ₂ и ЛДГ₃ и полного исчезновения изофермента ЛДГ₄. Но несмотря на снижение процентного содержания ЛДГ₂ и ЛДГ₃, их удельная активность заметно возрастает, за счет ЛДГ₄.

* 1135

Из полученных нами результатов видно также (табл. 2), что МДГ в молочной железе представлена 2-мя истинными изоферментами (МДГ₁ и МДГ₂), причем основная активность приходится на МДГ₂. У коров-первотелок МДГ₁ составляет 18,11%, а МДГ₂—81,89%. Согласно нашим данным, по мере развития животного происходит заметное изменение в соотношении изоферментов МДГ. У полновозрастных коров (вторая группа) значительно возрастает процентное содержание МДГ₁, что сопровождается снижением МДГ₂. С понижением общей активности МДГ у этой группы животных (табл. 1) резко возрастает удельная активность как МДГ₁, (3,5 раза), так и МДГ₂ (примерно в 2 раза).

Данные, касающиеся ГДГ, показывают, что как процентное содержание, так и детектируемый весьма низкий уровень удельной активности изоферментов ГДГ подопытных животных не претерпевают существенных изменений с возрастом. Как у молодых, так и у полновозрастных коров наиболее высоким процентным содержанием отличается ГДГ₄, затем следует ГДГ₃ и ГДГ₂. ГДГ₁, обнаруженная нами в печени и некоторых других органах (мозг, почки) [19, 22], в молочной железе отсутствует.

Подытоживая сказанное, можно заключить, что в лактирующей железе полновозрастных коров кавказской бурсой породы обменные процессы, в частности анаболические реакции, протекают со значительно большей скоростью, чем у молодых. Эти данные в основных чертах согласуются с литературными [8].

Наряду с биохимическими, нами определялись и некоторые показатели продуктивности у первотелок и полновозрастных коров.

Таблица 3

Средние показатели продуктивности коров

Группы	Живой вес, кг	Удой за 305 дней лактации, кг	Суточный удой перед убоем, кг
Первая (коровы-первотелки)	371,7±4,5	1716,6±53,7	3,23±0,13
Вторая (полновозрастные коровы)	468,3±6,1	2440,0±79,0	5,47±0,25

Примечание: молочную продуктивность коров определяли путем умножения фактического удоя за 7 и 8 месяцев лактации на соответствующие коэффициенты: 1,3 и 1,2.

Как свидетельствуют данные табл. 3, при разнице в живом весе между группами в 96,6 кг, различие в молочной продуктивности составляет 723,3 кг в пользу полновозрастных коров (II группа). Среднесуточный удой за 305 дней лактации у коров I и II групп соответственно составляет 5,5 и 8,0 кг.

Таким образом, из результатов наших экспериментов вытекает, что существует тесная взаимосвязь между усилением обменных процессов и возрастом, с одной стороны, и молочной продуктивностью—с другой.

Ереванский зооветеринарный институт,
Институт биохимии АН АрмССР

Поступило 13.II 1978 г.

**ԼԱԿՏԱՏ-, ՄԱԼԱՏ ԵՎ ԳԼՈՒՏԱՄԱՏԴԵՀԻԴՐՈԳԵՆԱԶԱՅԻ ՈՒ ՆՐԱՆՑ
ԻԶՈՑԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՀԱՍՏԱԿԱՅԻՆ ՓՈՓՈԽՈՒԹՅՈՒՆԸ
ԿՈՎԿԱՍՅԱՆ ԳՈՐԾ ՑԵՂԻ ԿՈՎԵՐԻ ՄՈՏ**

Ս. Գ. ՄՈՎՍԵՍՅԱՆ, Ն. Վ. ՕԽԻԿՅԱՆ, Ն. Մ. ՄՈՎՍԵՍՅԱՆ, Ա. Ա. ԲԼՐԶՅԱՆ

Ուսումնասիրություններից պարզվել է, որ լակտատդեհիդրոգենազայի (ԼԴՀ) ընդհանուր ակտիվությունը ուղղակի ռեակցիայում, այսինքն՝ կաթնաթթվի սինթեզի պրոցեսում, կովկասյան գորշ ցեղի լիատարիք կովերի մոտ (երկրորդ խումբ), աճում է 60%: Հետադարձ ռեակցիայում, այլ կերպ՝ կաթնաթթվի դեհիդրոգենացման պրոցեսում, էական փոփոխություններ չեն դիտվում: Ակտիվության փոփոխություն նկատվում է նաև մալատդեհիդրոգենազային (ՄԴՀ) ռեակցիայում: միայն այն տարբերությամբ, որ նշված խմբի կովերի մոտ միևնույն ինտենսիվությամբ ուժեղանում է ինչպես ուղղակի այնպես էլ հետադարձ ռեակցիայի արագությունը:

Ցույց է տրվել, որ առաջնածին կովերի (1 խումբ) ԼԴՀ-ն պարունակում է 4 իզոֆերմենտ: 5-րդ իզոֆերմենտը՝ ԼԴՀ բացակայում է: Լիատարիք կովերի ԼԴՀ-ն բաղկացած է 3 իզոֆերմենտներից՝ ԼԴՀ₁, ԼԴՀ₂ և ԼԴՀ₃: Ընդհանուր ԼԴՀ-ի կողմից ԼԴՀ₄ և ԼԴՀ₅-արտաանկման հետ մեկտեղ հասուն կովերի մոտ նշանակալից չափերով փոփոխվում է H-ենթամիավորներ պարունակող ԼԴՀ-ի իզոֆերմենտների պարունակությունը և տեսակարար ակտիվությունը:

Ապացուցվել է, որ ՄԴՀ-ն ուսումնասիրված կենդանիների մոտ հանդես է գալիս երկու իզոֆերմենտների ձևով:

Տոկոսային հարաբերությամբ գերակշռում է ՄԴՀ₂ (81, 89%): Սակայն լիատարիք կովերի մոտ նկատելի չափով իջնում է ՄԴՀ₂-ի և համապատասխանաբար աճում է ՄԴՀ₁-ի տոկոսային պարունակությունը:

Ուսումնասիրություններից պարզվել է, որ ինչպես գլուտամատդեհիդրոգենազայի (ԳԴՀ) ընդհանուր ակտիվությունը, որն ի դեպ բավական ցածր է, այնպես էլ նրա իզոֆերմենտների տոկոսային պարունակությունը և նրանց տեսակարար ակտիվությունը չեն ենթարկվում էական հասակային փոփոխությունների:

ACTIVITY CHANGES IN LACTAT-, MALAT- AND GLUTAMATDEHYDROGENASE AND THEIR ISOENZYMES IN THE LACTIC GLANDS RELATED WITH THE AGE OF THE CAUCASIAN COW BROWN BREED

S. G. MOVSESIAN, N. V. OKHIKIAN, N. O. MOVSESIAN, A. A. BLRTZIAN

In the lactic glands of cows the LDG and MDG activity increases with age, and GDG activity does not undergo any changes. In young cows 4 isoenzymes of LDG have been detected instead of 5. Their number decreases with the age down to 3 and LDG₄ disappears.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Богдашев Н. Ф., Елисеев А. П. Вымя коровы. М.—Л., 1951.
2. Арзуманян Е. А. Советская зоотехника, 1, 78, 95, 1952.
3. Мещанинов С. И. Канд. дисс., М., 1953.

4. Легошин Г. П. Автореф. канд. дисс., М., 1964.
5. Зеликовская Э. З. Сб. научн. тр. Львовск. зооветинститута, 8, 1956.
6. Тиняков Г. Г., Хвостоза А. ДАН СССР, 106, 6, 1956.
7. Казимирчук Н. С. Автореф. канд. дисс., М., 1971.
8. Фолли С. Физиология и биохимия лактации, М.—Л., 1962.
9. Folley S. J. Biol. Rev., 24, 316, 1949.
10. Campbell P. V., Work T. S. Biochem J., 52, 217, 1952.
11. Greenbaum A. U., Greenwood F. C. Biochem J., 56, 625, 1954.
12. Davis B. J. Ann N. Y. Acad Sci, 121, 404, 1964.
13. Dietz A. A., Lubrano T. Anal Biochem, 20, 246, 1967.
14. Markert C., U., Moller F. Proc. Nat. Acad Sci USA, 45, 5, 753, 1959.
15. Юрков Ю. А., Волкова Л. Д. Лаб. дело, 11, 646, 1973.
16. Van Der Helm H. J. J. Neurochemistry, 9, 325, 1962.
17. Мовсисян Н. О., Хумарян М. А., Мовсисян С. Г. Лаб. дело, 7, 445, 1976.
18. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии. М., 1971.
19. Аветисян С. Г., Мовсисян С. Г., Бунятян Г. Х. Вопросы биохимии мозга, 11, 5, Ереван, 1976.
20. Wroblewski F., La Due J. S. Proc. Soc. Exp. med, 90, 210, 1955.
21. Lowry O. H., Rosebough N. Y., Farr A. L., Ranadall R. J. Biol Chem., 19, 265, 1951.
22. Мовсисян С. Г., Аветисян С. Г., Карабабян Л. В., Урганджян М. Г., Экизян Н. Г. Мат-лы симп. по белкам, полипептидам и аминокислотам мозга, посвящ. 70-летию академика АН АрмССР Г. Х. Бунятыана, 1977 (в печати).