

КОФЕРМЕНТНАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ И ИЗОФЕРМЕНТНЫЙ СПЕКТР ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В РАЗЛИЧНЫХ ТКАНЯХ КУР В ОНТОГЕНЕЗЕ

Г. Г. БАТІКЯՆ, А. А. СИМОНЯՆ

Изучались активность, изоферментный состав и коферментная специфичность лактатдегидрогеназы в различных тканях кур в онтогенезе. Выявлена определенная закономерность в коферментной избирательности фермента в отдельные периоды онтогенетического развития как у эмбрионов, так и у годовалых кур. Во всех изученных органах (кроме миокарда) он целиком состоит из субъединиц М-типа.

Ключевые слова: лактатдегидрогеназа, изоферменты, никотинамидадениндинуклеотид.

1

В литературе имеется обширный экспериментальный материал по дегидрогеназам и, в частности, по различным лактатдегидрогеназам (ЛДГ). Этот фермент занимает стержневую позицию в углеводном обмене и обнаружен во всех органах и тканях позвоночных животных и многих беспозвоночных. Гетерогенность его была впервые установлена работами Нейландса [24]. В большинстве органов и тканей млекопитающих ЛДГ фигурирует в виде пяти изоферментов, представляющих собой комбинации двух различных типов субъединиц (Н- и М-типов), объединенных в тетрамерную структуру [8, 9, 13, 20, 26, 27]. Одни изоферменты (ЛДГ₁ и ЛДГ₅) сконструированы из Н- либо из М-субъединиц, а остальные (ЛДГ₂, ЛДГ₃, ЛДГ₄) являются гибридами и содержат оба мономера [8].

Данные об активности и изменении изоферментного набора ЛДГ в различных тканях по ходу эмбрионального развития животных скудны и противоречивы. Имеются сведения о том, что активность ЛДГ в коре мозга мышей относительно постоянна до 12-го дня постнатальной жизни, затем она увеличивается в три раза и к 19-му дню стабилизируется [17]. Из коры больших полушарий мышей и морских свинок было выделено 4 изофермента ЛДГ, различающихся между собой по способности к восстановлению НАД. Данные об онтогенетических изменениях спектра изоферментов ЛДГ в мозге крыс, мышей и человека приводят и другие авторы [16, 21].

Учитывая сказанное, мы исследовали интенсивность активности ЛДГ и характер распределения ее изоферментов в тканях развивающегося куриного эмбриона. Одновременно изучали коферментное сродство отдельных изоформ ЛДГ к данному ферменту в целом.

Материал и методика. Опыты проводили на мозге, печени, сердце, легких, селезенке, семенниках, белсы, красной и скелетной мышце 15- и 20-дневных эмбрионов, 5-дневных цыплят и годовалых кур белой русской породы. После декапитации извлекали необходимую ткань и переносили в стакан с охлажденным раствором 0,25 М сахарозы, измельчали и гомогенизировали. Для получения гиалоплазмы гомогенат центрифугировали при 70000 g на рефрижераторной центрифуге VAC-601. Дифференциальное центрифугирование проводили по методу Броди и Бейна [7] в модификации Палладина и Кирсенко [6]. Ядерную фракцию осаждали при 900—1000 g, митохондриальную—при 18000—20000 g (мозг) или 10000—12000 g (печень и сердце). Митохондрии промывали средой выделения, затем замораживали, а после медленного оттаивания центрифугировали при 70000 g для получения супернатанта.

Разделение изоферментов проводили методом диск-электрофореза на полиакриламидном геле на приборе фирмы «Реанал», модель 69. Способ приготовления полиакриламидного геля приведен в нашей предыдущей работе [1]. В качестве электролитного буфера использовали трис-глицериновый, pH 8,3 [10], время электрофореза—1 ч. 50 мин. Обнаруживающий раствор содержал 1 мл 1 М раствора лактата Na, 1 мл НАД (10 мг/мл), 1 мл 0,1 М NaCl, 1 мл 0,005 М MgCl₂, 2,5 мл 0,1 М К-фосфатного буфера (pH 7,4), 2,5 мл интросинего тетразолия (1 мг/мл), 0,25 мл феназинметасульфата (1 мг/мл), [4].

В отдельных опытах добавляли дезамино-НАД (Д-НАД) в эквимолярном относительно НАД количестве (0,015 М). Инкубацию смеси проводили при 37° в течение одного часа. Спектрофотометрировали на спектроде типа UVIS при длине волны 560 мк [4]. Для изучения общей активности ЛДГ при обратной реакции реакционная смесь содержала 0,1 мл 0,004 М раствора НАДН, 0,1 мл 0,01 М пирувата, 0,1 мл гиалоплазмы. Конечный объем доводили до 2 мл 0,1 М К-фосфатным буфером. Прямую реакцию ЛДГ определяли в следующей смеси: 0,1 мл 0,002 М раствора НАД, 0,1 мл 0,5 М лактата, 0,1 мл гиалоплазмы. Конечный объем—2 мл (до нужного объема доводили раствором 0,1 М глицинового буфера, pH 10) [3]. Д-НАД и Д-НАДН применяли в эквимолярных количествах относительно НАД и НАДН. Активность рассчитывали в единицах Вроблевского на мг белка [28], белок определяли по Лоури и сотр. [19].

Результаты и обсуждение. Данные, приведенные в табл. 1, показывают, что процесс дегидрирования лактата по мере развития куриного эмбриона, начиная с плодного периода развития, в гиалоплазме мозга неуклонно повышается, достигая максимума после вылупления, у 5-дневных цыплят. В этих опытах НАД значительно эффективнее в процессе образования пирувата, чем Д-НАД. А при обратной реакции, т. е. в процессе образования лактата из пирувата, в различные периоды эмбрионального развития Д-НАДН намного эффективнее по сравнению с НАДН. Аналогичным изменениям активность фермента по ходу развития цыпленка подвергается в изолированных митохондриях ткани мозга. Из данных, приведенных в табл. 1, явствует, что удельная общая активность ЛДГ в печени несколько выше, чем в мозге. При этом в процессе дегидрирования лактата в гиалоплазме как печени, так и миокарда действие НАД также эффективнее по сравнению с Д-НАД. В обратной реакции, наоборот, сильнее действует Д-НАД.

Мы изучали также активность ЛДГ в различных тканях годовалых кур (табл. 2). Полученные результаты показывают, что по активности фермента в гиалоплазме отдельные ткани кур располагаются в следующем убывающем порядке: селезенка, семенники, сердце, скелетная мышца, красная мышца, легкие и белая мышца. В этих опытах влияние

НАД более выражено, чем Д-НАД. В обратной реакции каталитическая активность фермента повышается в присутствии Д-НАДН.

Несомненно интересно, что в гиалоплазме мозга и сердца образуются пирувата из лактата в эмбриональный период значительно пре-

Таблица 1
Изменение удельной активности ЛДГ и изофермента ЛДГ₅ в различных тканях кур в эмбриогенезе

Дни развития эмбрионов	Источник фермента	Коферменты	Удельная общая активность ЛДГ, Н-моль пиридиннуклеотида/мг белка			Условная удельная активность		
			мозг	печень	сердце	мозг	печень	сердце
15-дневные эмбрионы	гиалоплазма	НАД	390,3	3229,4	1394,9	0,63	1,91	1,11
		НАДН	201,4	6091,8	889,8	—	—	—
		ДНАД	230,2	2039,6	1190,4	0,57	1,08	0,82
	митохондрии	ДНАДН	604,4	7820,0	1394,9	—	—	—
		НАД	619,5	913,7	494,0	0,45	0,82	0,55
		НАДН	712,5	1411,1	148,2	—	—	—
20-дневные эмбрионы	гиалоплазма	ДНАД	402,9	355,3	296,4	0,74	0,67	0,87
		ДНАДН	1115,2	2421,3	592,8	—	—	—
		НАД	560,1	1959,7	6971,4	0,63	1,90	1,34
	митохондрии	НАДН	442,2	3173,2	2914,2	—	—	—
		ДНАД	397,9	1623,4	3714,2	0,67	1,93	0,87
		ДНАДН	913,9	3395,3	3085,7	—	—	—
5-дневные цыплята	гиалоплазма	НАД	796,6	551,5	371,7	0,43	1,23	0,21
		НАДН	796,6	1403,5	232,3	—	—	—
		ДНАД	749,7	403,5	154,8	0,49	0,88	0,05
	митохондрии	ДНАДН	890,3	2273,5	557,6	—	—	—
		НАД	683,4	1603,5	4187,3	0,55	2,81	1,24
		НАДН	788,9	2161,6	851,6	—	—	—
Легкие	гиалоплазма	ДНАД	315,4	884,1	3229,2	0,79	2,25	1,40
		ДНАДН	1971,6	2311,0	1064,5	—	—	—
		НАД	552,0	259,3	1422,7	0,43	1,17	0,82
	Белая мышца	НАДН	630,9	581,5	1219,5	—	—	—
		ДНАД	262,8	223,9	1203,0	0,72	0,69	0,58
		ДНАДН	1209,2	931,2	1422,7	—	—	—

Таблица 3
Удельная активность ЛДГ и изофермента ЛДГ₅ в различных тканях половозрелых петухов

Ткани	Источник фермента	Условная общая активность ЛДГ, Н-моль пиридиннуклеотида/мг белка/мин				Условная удельная активность	
		НАД	НАДН	ДНАД	ДНАДН	НАД	ДНАД
Легкие	гиалоплазма	121,8	84,6	41,6	141,1	1,78	1,18
Белая мышца	гиалоплазма	54,8	34,7	29,2	87,7	1,28	0,89
Красная мышца	гиалоплазма	246,8	207,3	128,3	324,7	1,61	1,49
Скелетная мышца	гиалоплазма	308,9	498,3	139,5	501,6	2,17	1,78
Селезенка	гиалоплазма	561,8	283,2	294,5	306,0	1,47	1,12
Семенники	гиалоплазма	323,4	208,2	103,0	215,6	1,46	1,21
Сердце	гиалоплазма	314,6	194,5	238,3	254,2	1,47	1,41
	митохондрии	250,7	125,4	200,7	129,0	1,31	1,05

валирует над обратным процессом (табл. 1). Однако после вылупления в мозге 5-дневных цыплят несколько усиливается процесс образования лактата. В печеночной же ткани во все периоды развития цыпленка он превалирует над синтезом пирувата. Аналогичную картину активности фермента наблюдали и в изолированных митохондриях печени. В тканях годовалых кур (кроме скелетной мышцы), в отличие от млекопитающих [11, 12, 14], каталитическая активность также намного выше при неогенезе пирувата, чем синтезе лактата (табл. 2).

Удельная активность ЛДГ₅ (табл. 1 и 2, рис. 1), выявленная диск-электрофорезом на акриламидном геле и выражаемая в условных единицах, почти полностью совпадает с общей удельной активностью предварительно необработанного фермента ЛДГ в присутствии изучаемых нами пиридиннуклеотидов.

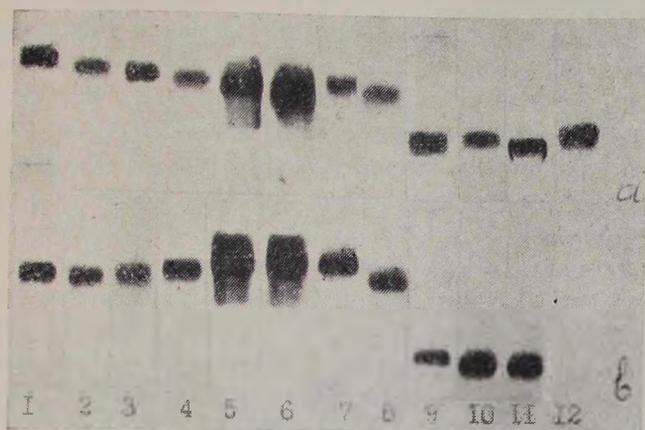


Рис. 1. Зимограммы ЛДГ различных тканей 15-дневных эмбрионов (а) и 5-дневных цыплят (в). 1. НАД—супернатант (мозг), 2. Д-НАД—супернатант (мозг), 3. НАД—митохондрии (мозг), 4. Д-НАД—митохондрии (мозг), 5. НАД—супернатант (печень), 6. Д-НАД—супернатант (печень), 7. НАД—митохондрии (печень), 8. Д-НАД—митохондрии (печень), 9. НАД—супернатант (сердце), 10. Д-НАД—супернатант (сердце), 11. НАД—митохондрии (сердце), 12. Д-НАД—митохондрии (сердце).

Полученные нами результаты показали, что ЛДГ в изучаемых тканях (кроме сердца) куриного эмбриона и годовалых кур как в гиалоплазме, так и в изолированных митохондриях состоит только из М-субъединиц и фигурирует в виде тетрамера ЛДГ₅. В миокарде цыплят и кур она целиком состоит из Н-мономеров и имеет тетраэдрическое строение, присущее изоферменту ЛДГ₁. В этом отношении полученные нами результаты совпадают с имеющимися в литературе данными [5]. Аналогичные результаты получены Маркертом на эмбриональных тканях мышей [22]. Однако у некоторых других видов, в том числе у птиц и человека, в эмбриональных тканях преобладают другие изоферменты [8]. Некоторое расхождение между нашими и полученными рядом ав-

торов [2, 12, 14] данными заключается в отсутствии гибридных форм ЛДГ в тканях кур в наших экспериментах. Этим авторам удалось обнаружить (правда, в относительно низком процентном содержании), наряду с ЛДГ₁, ЛДГ₂ и ЛДГ₃, а в другом случае—наряду с ЛДГ₅, ЛДГ₄ и ЛДГ₂. Однако трудно представить образование тетрамерной структуры гибридного изофермента при отсутствии полного набора мономеров изоферментов ЛДГ (Н- и М-субъединиц) или при незначительном их содержании.

Для подтверждения достоверности полученных нами данных и сравнения в условиях нашего опыта мы изучали также общую удельную активность и распределение изоферментов в отдельных тканях (мозг, сердце, печень и почки) половозрелых и 8-дневных крыс и морских свинок. Полученные нами результаты выявили у них все пять номеров изоферментов ЛДГ (Н- и М-субъединицы). Сопоставляя полученные нами результаты исследования, можно заключить, что ЛДГ в отдельных тканях кур (кроме сердца) в различные периоды онтогенетического развития состоит только из изофермента ЛДГ₅. В сердце обнаруживается ЛДГ₁ (Н-форма). Эти изоферменты с неодинаковой активностью вступают в реакцию с НАД, Д-НАД и их редуцированными формами. В процессе образования пирувата из лактата ЛДГ сравнительно большее сродство проявляет к НАД, чем к Д-НАД. В обратном процессе эффективнее Д-НАДН по сравнению с НАДН.

Распределение изоферментов в эмбриональных тканях или тканях новорожденных не всегда идентично таковому в тканях взрослой особи того же вида. Маркером с соавт. [23] в сердце эмбриона свиньи обнаружено большее число компонентов, чем в тканях взрослых животных. Как полагают эти авторы, распределение изоферментов в тканях служит характеристикой состояния дифференцировки ее клеток. К аналогичному заключению пришли Филип и Веселл [25], которые провели сравнительное исследование распределения изоферментов в тканях зародыша кур в различные периоды его развития методом электрофореза на крахмальном геле. По данным этих авторов, на ранних стадиях развития в скелетной мышце, печени и сердце преобладает только ЛДГ₁. Однако в процессе развития активность анодных изоферментов постепенно возрастает. У половозрелых особей как в печени, так и в скелетной мышце обнаруживается значительное количество ЛДГ₅. Одновременно этими же авторами отмечаются лишь незначительные изменения в характере распределения изоферментов ЛДГ в миокарде развивающегося цыпленка. Аналогичные результаты о характере действия ЛДГ и ее изоферментов в эмбриональный период развития получены и другими авторами [15, 18]. Особенно значительные различия были обнаружены между ЛДГ мозга и печени взрослых и новорожденных мышей и морских свинок. В наших исследованиях были показаны некоторые различия в каталитическом действии ЛДГ в тканях эмбрионов и годовалых кур. Сопоставляя настоящие и предыдущие данные [1], не трудно заметить, что по сравнению со взрослыми особями у эмбрионов ак-

тивность фермента как в гиалоплазме, так и в изолированных митохондриях печени и сердца намного выше. С возрастом она у цыпленка снижается, до минимума у годовалых кур. С возрастом заметные сдвиги обнаруживаются также в коферментной специфичности ЛДГ. В гиалоплазме мозга и печени взрослых кур, по сравнению с эмбрионами, процесс расщепления лактата намного интенсивнее, чем его синтез, причем в печени процесс образования пирувата даже несколько превалирует над расщеплением лактата. Однако при добавлении Д-НАД каталитическая активность ЛДГ в ткани эмбриона при расщеплении лактата значительно ниже, чем при его синтезе в присутствии Д-НАДН. В тех же реакциях у годовалых особей обнаруживается обратная картина.

Приведенные нами результаты исследований показывают функциональную гетерогенность ЛДГ и ее изоферментов в ходе онтогенетического развития животных.

Институт биохимии АН АрмССР

Поступило 27.XIII 1979 г.

ԼԱԿՏԱՏԻԵԶԻԻՐՈՂԵՆԱԶԱՅԻ ԿՈՖԵՐՄԵՆՏԱՅԻՆ ՇԵՏԵՐՈՂԵ-
ՆՈՒԹՅՈՒՆԸ ԵՎ ԻԶՈՖԵՐՄԵՆՏԱՅԻՆ ՍՊԵԿՏՐԸ ՀԱՎԵՐԻ
ՏԱՐՔԵՐ ՀՅՈՒՍՎԱԾՔՆԵՐՈՒՄ ՕՆՏՈԳԵՆԵԶՈՒՄ

Գ. Հ. ԲԱՏԻԿՅԱՆ, Ա. Ա. ՍԻՄՈՆՅԱՆ

Ուսումնասիրվել են լակտատդեհիդրոգենազայի (ԼԴՀ) ակտիվության փոփոխությունները, կոֆերմենտային խնամակցությունը և իզոֆերմենտների տարածման փոփոխությունները 15 և 20 օրական սաղմերի, 5 օրական ճտերի և սեռահասուն հավերի տարբեր հյուսվածքներից (ուղեղ, լյարդ, սիրտ և այլն), անջատված հիալոպլազմայում և միտոքոնդրիաներում: Ցույց է տրվել, որ դարձագման ընթացքում կաթնաթթվի դեհիդրատացման պրոցեսն ուղեղի հիալոպլազմայում ակտիվանում է՝ իր առավելագույն շափին հասնելով 5 օրական ճտերի մոտ: Այդ դեպքում նԱԴ-ը ավելի արդյունավետ է ազդում, քան դեհամինո-նԱԴ-ը (Դ-նԱԴ): Կաթնաթթվի նեոգենեզի պրոցեսում Դ-նԱԴ-ի ազդեցությունը անհամեմատ մեծ է, քան՝ նԱԴԻ-ինը: Ստացված արդյունքները ցույց են տալիս, որ ուսումնասիրված հյուսվածքներում (բացի միոկարդ, դից) ինչպես սաղմերի, այնպես էլ հասուն հավերի մոտ ԼԴՀ կազմված է միայն Մ-էնթամիավորներից և հանդես է գալիս ԼԴՀ₅ տեսրամերի ձևով: Միոկարդում ԼԴՀ-ն կազմված է H-մոնոմերներից և ունի տեսրահղրիկ կառուցվածք, որը բնորոշ է ԼԴՀ₁-ին:

COENZYMATIC HETEROGENITY AND ISOENZYMATIC SPECTOR
OF LACTATEDEHYDROGENASE OF DIFFERENT TISSUES
OF HENS IN ONTOGENESIS

G. G. BATIKIAN, A. A. SIMONIAN

The activity, isoenzymatic content and coenzymatic specificity of lactatedehydrogenase in different tissues of hens in ontogenesis have been

studied. A definite regularity in coenzymatic specificity of the enzyme at different periods of ontogenetic development as of embryo as well as of one year old hens has been found. In all studied organs lactatdehydrogenase consists entirely of M-type subunits (excluding myocardium).

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Батикян Г. Г., Мовсесян С. Г. Биолог. ж. Армении, 19, 12, 26, 1976.
2. Карапетян А. М. Канд. дисс., Ереван, 1971.
3. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии, М., 1971.
4. Мовсесян Н. О., Хумарян Н. А., Мовсесян С. Г. Лаб. дело, 7, 445, 1976.
5. Мовсесян С. Г., Мовсесян Н. О. Вопросы биохимии мозга. 10, 75, Ереван, 1975.
6. Палладин А. В., Курсенко О. В. Биохимия, 26, 385, 1961.
7. Brody T. M., Baim J. A. J. Biol. Chem., 195, 585, 1952.
8. Cahn R. D., Kaplan N. O., Levine L., Zwilling E. Science, 136, 962, 1962.
9. Dawson D. M., Goodfriend T. L., Kaplan N. O. J. Biol. Chem., 239, 130, 1964.
10. Davis B. J. Ann N. Y. Acad. Sci. (Wash.), 45, 753, 1961.
11. Diets A. A., Lubrano T. Anal. Biochem., 20, 246, 1967.
12. Everse J., Berger R. L., Kaplan N. O. Structure and function of oxidation of regulation enzymes (New York), 691, 1972.
13. Fine J. H., Kaplan N. O., Kiffines D. Biochemistry, 2, 1, 116, 1963.
14. Fondy T. P., Kaplan N. O. Ann. New York Acad., 119, 888, 1965.
15. Flexner L. B., Flexner J. B., Roberts R. B., De La Haba G. Develop. biol., 2, 313, 1960.
16. Gerhardt W., Clausen J., Andersen H. Acta. neurol. Scand., 31, 39, 1963.
17. Hamburg M., Flexner L. B. J. Neurochem., 1, 279, 1957.
18. Kaplan N. O., Ciotti M. M. Ann. N. Y. Acad. Sci., 94, 701, 1961.
19. Lowry O. H., Rosebrogh N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., 19, 265, 1951.
20. Markert C. L., Appella E. Ann. N. Y. Acad. Sci., 10, 915, 1963.
21. Markert C. L., Ursprung H. Develop. Biol., 362, 1962.
22. Markert C. L. Citodifferential and macromolecular synthesis, New York, Academic Press, 65, 1963.
23. Markert C. L., Muller F. Proc. nat. Acad. Sci. Wash., 45, 753, 1959.
24. Neilands J. B. Biol. Chem., 199, 373, 1952.
25. Philip J., Vesell E. S. Proc. Soc. exp. Biol., 110, 582, N. Y., 1962.
26. Wieland T., Pflüderer G. Biochem. J., 329, 112, 1957.
27. Wilson A. C., Kaplane N. O., Levin L., Pesce A., Rechlin M., Allison W. S. Federation Proc., 23, 1258, 1954.
28. Wroblewski F., La Dus J. S. Proc. soc. Exp. Biol. Med., 90, 210, 1955.