

УДК 577.3 : 577.1

БИОХИМИЯ

Академик АН Армянской ССР С. К. Карапетян
Г. Г. Батикян, А. А. Симонян, З. А. Габриелян**Некоторые особенности регуляции активности
лактатдегидрогеназы в тканях кур ереванской породы, петухов
породы леггорн кросса 288 и их гибридов**

(Представлено 3/X 1980)

В промышленном птицеводстве при производстве яиц и мяса все еще широко используются гибридные несушки, получаемые от скрещивания сочетающихся линий мясо-яичных пород кур, при этом полученная гибридная птица отличается большей продуктивностью и жизнеспособностью. Исходя из этого, с 1957 г. на экспериментальной базе Института животноводства МСХ АрмССР и Института физиологии им. акад. Л. А. Орбели АН АрмССР (1-4), а также на ряде птицефабрик республики проводятся работы по межпородному скрещиванию и созданию промышленных гибридов с использованием отселекционированных линейных кур ереванской породы и ряда линий породы леггорн. Проводились опыты по скрещиванию кур линии 3996 ереванской породы (с черным оперением) с петухами линий «С» кросса 288 породы леггорн для получения гибридов с высокой яйценоскостью и приспособляемостью к местным природно-климатическим условиям Армении (5,6). В ряде работ (1-6) нами дана подробная характеристика хозяйственно-полезных признаков отмеченных родительских линий и гибридных форм. Полученные результаты показали, что гетерозис хозяйственно-полезных признаков у получаемых гибридных форм наблюдается с момента оплодотворения и в дальнейшем действует на выводимость и жизнеспособность птицы, что в конечном итоге приводит к повышению продуктивности. На основании того, что явление гетерозиса тесно связано с генотипом организма, а последний обусловлен рядом молекулярных и биохимических изменений, наблюдающихся в клетке, мы нашли целесообразным исследовать некоторые особенности регуляции активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в тканях кур ли-

нии 3996 ереванской породы черной разновидности (материнская форма), петухов линий «С» кросса 288 породы леггорн канадского происхождения (отцовская форма) и их гибридов.

Известно, что ЛДГ занимает стержневую позицию в углеводном обмене и обнаружен во всех органах и тканях позвоночных животных и у многих беспозвоночных. Биологическое назначение этого фермента заключается в регуляции взаимопревращения и соотношения пирувата и лактата. При этом ЛДГ выполняет триггерную функцию в гармоничной деятельности анаэробного и аэробного распада глюкозы, т. е. двух важнейших метаболических циклов—гликолиза и окислительного фосфорилирования.

Материал и методика. Опыты проводили на мозгу, печени, сердце, легких, почках и скелетной мышце половозрелых кур. После декапитации кур извлекали необходимую ткань и переносили в стакан с охлажденным раствором 0,25 М сахарозы, измельчали и гомогенизировали. Для получения гиалоплазмы гомогенат центрифугировали при 70 000 g на рефрижераторной центрифуге VAC—601. Дифференциальное центрифугирование проводили по методу Броди и Бейна (7) в модификации Палладина и Кирсенко (8). Ядерную фракцию различных тканей осаждали при 900—1000 g, митохондрии—при 18 000 g (мозг) или 9000 g (печень). Полученные митохондрии промывали средой выделения, затем замораживали, медленно оттаивали и центрифугировали при 70 000 g для получения супернатанта.

Разделение изоферментов проводили методом диск-электрофореза на полиакриламидном геле на приборе фирмы «Реанал», модель 69. Способ приготовления полиакриламидного геля, электродного буфера приведен в нашей предыдущей работе (9).

В отдельных опытах добавляли дезамино-НАД (Д-НАД) в эквимольном относительно НАД количестве (0,015 М). Инкубацию смеси проводили при 37°C в течение 1 ч. Спектрофотометрирование проводили на спекорде типа Uvis при длине волны 560 мк (10). 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 или митохондрий. Конечный объем 2 мл (11). Для изучения общей активности ЛДГ при обратной реакции инкубационная смесь содержала: 0,1 мл 0,004 М раствора НАДН, 0,1 мл 0,01 М пирувата, 0,1 мл гиалоплазмы или соответственно фракцию митохондрий. Конечный объем доводили до 2 мл 0,1 М К-фосфатным буфером. Активность фермента рассчитывали в единицах Вроблевского на миллиграмм белка (12), белок определяли по Лоури и сотр. (13).

Результаты и обсуждения. Полученные нами результаты исследований, приведенные в табл. 1, показывают, что удельная активность ЛДГ при дегидрировании лактата по сравнению с другими тканями наивысшая в гиалоплазме миокарда как у родительских, так и у гибридных форм. При этом в миокарде гибридных кур активность фермента занимает среднее положение по сравнению с родительскими форма-

ми (1,53 мкмоль пиридиннуклеотида/мг белка). В остальных исследованных тканях активность ЛДГ при прямой реакции колеблется от 0,22 до 3,59 мкмоль пиридиннуклеотида /мг белка/мин. В этих условиях ферментная активность в отдельных тканях гибридных особей в основном не превышает таковую родительских форм.

В процессе неогенеза лактата активность ЛДГ в гиалоплазме отдельных тканей отцовской формы линии «С» кросса 288 выражалась в следующем нисходящем порядке: сердце, почки, печень, мозг, мышцы, легкие. У особей ереванской породы этот процесс интенсивнее протекает в сердце, затем в почках, мышцах, печени и остальных органах. По сравнению с родительскими формами у гибридных птиц активность ЛДГ при неогенезе лактата в отдельных органах (сердце, мышцы, легкие) занимает среднее место. В других тканях наблюдается заметное понижение каталитической активности фермента (например в гиалоплазме и митохондриях мозга). Полученные результаты одновременно показывают, что как у родительских форм, так и у гибридных кур по сравнению с НАД Д-НАД менее эффективен при образовании пирувата из лактата. Однако в обратной реакции (при образовании лактата) ЛДГ активнее в присутствии Д-НАДН. Интересно отметить, что у гибридных кур этот процесс более выражен по сравнению с родительскими формами птиц.

Известно, что ЛДГ является гетерогенным ферментом. Впервые это было установлено работами Нейландса (14). Имеющиеся в литературе многочисленные данные свидетельствуют о том, что в большинстве органов и тканей млекопитающих ЛДГ фигурирует в виде пяти изоферментов, которые являются комбинациями двух различных типов субъединиц (Н- и М-типы), объединенных в тетрамерную структуру (15-20). Одни изоферменты (ЛДГ₁ и ЛДГ₅) сконструированы из Н-либо из М-субъединиц, а остальные являются гибридами и содержат оба мономера (15). В клетках, отличающихся высоким аэробным обменом, преобладает Н-форма, а клеткам с интенсивным анаэробным обменом присуща М-форма. Имеются существенные расхождения в литературных данных в отношении активности и изоферментного состава ЛДГ, полученной из одной и той же ткани. Эти расхождения частично обусловлены различиями в методиках определения ферментной активности.

Полученные нами результаты показали, что ЛДГ в изучаемых тканях (кроме сердца) как у линии 3996 ереванской породы и линий «С» кросса 288 породы леггорн, так и у полученного после их скрещивания гибрида состоит только из М-субъединиц и фигурирует в виде тетрамера ЛДГ₅ (табл. 2). В сердечной ткани ЛДГ состоит целиком из Н-мономера и имеет тетраэдрическое строение, присущее изоферменту ЛДГ₁. В этом вопросе некоторое расхождение между нашими и полученными другими авторами (21-23) данными объясняется отсутствием гибридных форм ЛДГ в тканях кур в наших экспериментах. Вышеприведенным авторам удалось обнаружить (правда, в относительно низком

Таблица 1

Общая активность ЛДГ в тканях кур линий «С» кросса 288 породы леггорн, линии 3996 ереванской породы и их гибридов (мкмоль пиридиннуклеотида/мг белка/мин)

Ткань	Источник фермента	Леггорн				Ереванская порода				Гибрид			
		НАД	НАДН	Д-НАД	Д-НАДН	НАД	НАДН	Д-НАД	Д-НАДН	НАД	НАДН	Д-НАД	Д-НАДН
Сердце	Гиалоплазма	3,59	42,28	0,84	100,34	0,94	26,69	0,70	49,52	1,53	17,25	0,95	51,59
Почки	Гиалоплазма	0,67	13,77	0,36	14,91	1,12	17,02	0,71	21,67	0,64	8,16	0,40	13,84
Печень	Гиалоплазма	0,37	10,30	0,33	13,28	0,36	9,37	0,28	11,86	0,31	14,76	0,29	14,90
	Митохондрии	0,33	3,81	0,31	8,88	0,58	10,91	0,39	12,59	0,50	6,20	0,38	11,84
Мозг	Гиалоплазма	0,63	8,26	0,48	9,75	0,86	9,15	0,59	15,61	0,44	4,63	0,42	14,06
	Митохондрии	1,04	10,29	0,79	13,33	1,04	9,21	0,81	14,52	1,00	8,38	0,86	14,63
Легкие Скелетные мышцы	Гиалоплазма	0,22	1,81	0,15	2,50	0,37	2,72	0,21	3,06	0,31	2,22	0,15	2,93
	Гиалоплазма	0,43	4,96	0,28	6,70	0,80	11,34	0,54	14,19	0,65	7,84	0,46	13,54

Средние данные 4 опытов.

процентном содержании) наряду с ЛДГ₁, ЛДГ₂ и ЛДГ₃, а в другом случае—вместе с ЛДГ₅, ЛДГ₄ и ЛДГ₃. Однако трудно представить образование тетрамерной структуры гибридного изофермента при отсутствии полного набора мономеров изоферментов ЛДГ (Н- и М-субъединиц) или при незначительном их содержании.

Результаты, касающиеся условной удельной активности отдельных изоферментов ЛДГ в различных тканях, приведены в табл. 2. Как

Таблица 2

Условная удельная активность изоферментов ЛДГ в тканях кур линий «С» кросса 288 породы леггорн, ереванской породы и их гибридов

Ткань	Источник фермента	Изофермент	Леггорн		Ереванская порода		Гибрид	
			НАД	Д-НАД	НАД	Д-НАД	НАД	Д-НАД
Сердце	Гиалоплазма	ЛДГ ₁	1,88	1,84	1,25	1,19	2,15	1,52
Почки	Гиалоплазма	ЛДГ ₅	1,93	1,64	0,80	0,59	1,71	1,44
Печень	Гиалоплазма	ЛДГ ₅	1,27	1,02	1,65	1,00	1,75	1,23
	Митохондрии	ЛДГ ₅	1,19	1,06	1,16	0,53	1,52	0,91
Мозг	Гиалоплазма	ЛДГ ₅	0,89	0,92	1,13	1,03	1,24	0,98
	Митохондрии	ЛДГ ₅	1,19	0,65	1,03	0,52	1,06	0,51
Легкие	Гиалоплазма	ЛДГ ₅	1,02	0,70	0,84	0,53	1,27	1,29
Скелетная мышца	Гиалоплазма	ЛДГ ₅	1,09	0,74	1,21	1,02	1,51	1,07

Средние данные 4 опытов.

показывают эти данные, условная удельная активность изоферментов во всех тканях кур при использовании НАД выше, чем при применении Д-НАД.

Таким образом, полученные нами результаты экспериментов показали, что в отдельных органах родительских форм кур (линии 3996 ереванской породы—материнская форма и линий «С» кросса 288 породы леггорн—отцовская форма) активность ЛДГ как в прямой, так и обратной реакции неодинакова и варьирует. В отдельных тканях гибридов, полученных после скрещивания вышеотмеченных форм, каталитическая активность фермента занимает как бы среднее положение по отношению к активности энзима в тканях родительских форм. В некоторых тканях активность фермента относительно низкая. При этом по сравнению с НАД Д-НАД менее эффективен при образовании пирувата из лактата. В обратной реакции фермент активнее в присутствии Д-НАДН. Полученные данные показывают, что ЛДГ во всех органах подопытных птиц (кроме миокарда) состоит только из М-субъединиц и проявляется в виде ЛДГ₅. В миокарде фермент состоит из изофермента ЛДГ₁ (Н-форма).

Институт биохимии Академии наук Армянской ССР

Институт физиологии им. акад. Л. А. Орбели

Академии наук Армянской ССР

Институт животноводства и ветеринарии МСХ Армянской ССР

Լակտատդեհիդրոգենազայի ակտիվության կանոնավորման մի ֆանի
առանձնահատկությունները երևանյան հավերի, լեզհորն ցեղի 288
կրոսի աֆաղաղների և դրանց հիբրիդների հյուսվածքներում

Ցույց է տրվել, որ հավերի երևանյան ցեղի սև տարատեսակի 3996 գծի (մայրական ձև), լեզհորն ցեղի 288 կրոսի «C» գծի (հայրական ձև) ու դրանցից ստացված հիբրիդների տարբեր հյուսվածքներում լակտատդեհիդրոգենազայի (ԼԴՀ) ակտիվությունը ինչպես ուղղակի, այնպես էլ հակադարձ. ոեակցիայում միանման չէ և փոփոխվում է: Մնողական ձևերի համեմատությամբ ֆերմենտի ակտիվությունը հիբրիդ հավերի առանձին հյուսվածքներում միջին տեղն է զբաղում: Նույն առանձնյակների այլ հյուսվածքներում ֆերմենտի ակտիվությունը համեմատաբար ցածր է: Այդ փորձերում նԱԴ-ի համեմատությամբ Դ-նԱԴ-ը քիչ արդյունավետ է կաթնաթթվից պիրուվատի առաջացման ոեակցիայում: Հակադարձ ոեակցիայում ֆերմենտի ակտիվությունը ավելի բարձր է Դ-նԱԴH-ի ներկայությամբ: Փորձի համար վերցված բոլոր հավերի օրգաններում (բացի սրտամկանից) ԼԴՀ-ն կազմված է եղել միայն M-ենթամիավորներից և հանդես է եկել ԼԴՀ₅-ի ձևով: Սրտամկանում ԼԴՀ-ն կազմված է եղել միայն H-ենթամիավորներից և հանդես է եկել ԼԴՀ₅-ի ձևով: Բերված տվյալները հաստատում են սուսական սպիտակ ցեղի հավերի տարբեր հյուսվածքներում ԼԴՀ-ի ակտիվության, իզոֆերմենտային կազմի և կոֆերմենտային խնամակցության վերաբերյալ նախկինում մեր կողմից ստացված արդյունքները:

ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- ¹ С. К. Карапетян, М. Н. Гукасян, С. А. Аракелян и др., Материалы науч. конф. по генетике и селекции с.-х. животных, 25—26 ноября, вып. 30 (1968). ² С. К. Карапетян, М. Н. Гукасян, Ереванская порода кур, М., 1976. ³ С. К. Карапетян, М. Н. Гукасян, А. А. Петросян, Биологический журн. Армении, т. 30, № 2 (1977). ⁴ С. Г. Саакян, С. К. Карапетян, Сб. работ молодых ученых, вып. 5 (1962). ⁵ С. К. Карапетян, А. А. Петросян, З. А. Габриелян, Изв. с.-х. наук МСХ АрмССР, № 6 (1980). ⁶ З. А. Габриелян, Биологический журн. Армении, т. 33, № 2 (1980). ⁷ T. M. Brody, J. A. Bain, J. Biol. Chem., vol. 195, 585 (1952). ⁸ А. В. Палладия, О. В. Курсенко, Биохимия, т. 26 (1961). ⁹ Г. Г. Батикян, А. А. Симонян, Биологический журнал Армении, т. 33, № 6 (1980). ¹⁰ Н. О. Мовсесян, М. А. Хумарян, С. Г. Мовсесян, Лабораторное дело, № 7, 1976. ¹¹ Г. А. Кочетов, Практическое руководство по энзимологии, М., 1971. ¹² F. Wroblewski, J. S. La Duc, Proc. soc. Exp. Biol. Med., vol. 90, 210 (1955). ¹³ O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall, J. Biol. Chem., vol. 19, 265 (1951). ¹⁴ J. B. Nellands, J. Biol. Chem., vol. 199, 373 (1952). ¹⁵ R. D. Cahn, N. O. Kaplan, L. Levin a. o., Science, vol. 136, 962 (1962). ¹⁶ T. Wleland, G. Pfleiderer, Biochem. Z., vol. 329, 112 (1957). ¹⁷ C. L. Markert, S. Appella, Ann. N. Y. Acad. Sci., vol. 103, 915 (1963). ¹⁸ A. C. Wilson, N. O. Kaplan, L. Levin a. o., Federation Proc., vol. 23, 1258 (1954). ¹⁹ J. H. Fine, N. O. Kaplan, D. L. Kuffines, Biochemistry, vol. 2, 1, 116 (1963). ²⁰ D. M. Dawson, T. L. Goodfriend, N. O. Kaplan, J. Biol. Chem., vol. 239, 130 (1964). ²¹ J. Everse, R. L. Berger, N. O. Kaplan, Structure and function of oxidation of regulation enzymes (New York), 691, 1972. ²² T. P. Fondy, N. O. Kaplan, Ann. N. Y. Acad. Sci., vol. 110, 888 (1965). ²³ А. М. Карапетян, Кана. дис., Ереван, 1971.