

УДК: 547.472.3:636.082.35

Ковалів Л.М., к.б.н., старший науковий співробітник ©*Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З.Гжицького*

ІЗОФЕРМЕНТНИЙ СПЕКТР ЛАКТАТ- І МАЛАТДЕГІДРОГЕНАЗИ В ЦИТОПЛАЗМІ ТКАНИН НОВОНАРОДЖЕНИХ ТЕЛЯТ ЗА ВПЛИВУ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН

У статті показано, що зимозан введений окремо і в комплексі із естрогенами, андрогенами і вітамінами, впливає на активність та ізоферментний спектр у клітинах тканин телят. Ефективність застосування комплексного препарату у підвищенні життєздатності і збереженості новонароджених телят становила 4-4,5 %.

Ключові слова: розчинні білки, ЛДГ, МДГ.

Вступ. Молекулярні форми ЛДГ формуються із двох субодиниць (М, Н), утворюючи множинні форми, які відрізняються за амінокислотним складом, імуннохімічними і функціональними властивостями [1,2,10]. Синтез цих форм контролюється двома неаллельними генами [3]. Їх дія має видову і тканинну специфічність, яка може змінюватися на різних стадіях раннього індивідуального розвитку і під впливом різних факторів.

Молекулярні форми МДГ, в основному, утворюють 2 форми (МДГ₁, МДГ₂), які гальмуються надлишком субстрату (МДГ₁ є чутлива до надлишку малату, а МДГ₂ - оксалоацетату). Форми МДГ відіграють важливу роль в енергетиці метаболічних реакцій у мітохондріях, оскільки в них гальмується відновлення оксалоацетату, а в надосадковій фракції – окислення малату). Їх роль полягає у повному використанні енергії біологічного окиснення і передачі разом з малатом електронів у мітохондрії з наступною участю в синтезі АТФ [9].

Регуляторні механізми організму новонароджених телят, зокрема гормональної, ферментної, імунної та інших систем знаходяться в стані становлення. В цьому зв'язку для підвищення резистентності телят раннього віку ми взяли для дослідження препарат полісахаридної природи – зимозан, який є добрим імуномодулятором.

Мета дослідження — встановити вплив антигенного препарату зимозану полісахаридної природи при введенні його окремо і в комплексі з естрогенами, андрогенами і вітамінами на загальну активність та ізоферментний спектр ЛДГ і МДГ в цитоплазмі тканин телят раннього віку та їх життєздатність.

Матеріали і методи досліджень. Дослідження виконані на 4-х групах новонароджених телят, по 4 голови в кожній, згідно наступної схеми.

Телята 1-ї групи були контрольними, без введення препарату.

Телятам 2-ї групи щоденно від народження протягом 6-ти днів вводили внутрішньом'язово суспензію зимозана Галінського хімфармзаводу в дозі 0,03 мг на кг живої маси (препарат зимозан - складний полісахаридний полімер, який одержаний із оболонки дріжджових клітин) [6]. До його складу входять приблизно 88-95% вуглеводів, 1,5-1,9% азоту і 0,24-0,4% фосфору. Має властивість зв'язуватись з пропердином крові і стимулювати як неспецифічні фактори захисту, так і імунологічну реактивність.

Телятам 3-ї групи вводили 1 мл дрібнодисперсної емульсії, яка вміщала 0,03 мг на кг живої маси зимозану, 0,875 мг тестостерону, 11250 МО вітаміну А, 1500 МО вітаміну Д₃ і 7,5 мг вітаміну Е.

Телятам 4-ї групи вводили 1 мл дрібнодисперсної емульсії, аналогічно як для 3-ї групи, але вже на фоні впоювання їм мінерально-вітамінної добавки "нуклеостимол" в кількості 20 г щоденно [7].

При забої телят у 8-10-добовому віці брали проби тканин печінки, тимуса, селезінки, мезентеріальних лімфовузлів і слизової оболонки тонкого кишечника і відразу охолоджували 0,85 % розчином NaCl. Після проби тканин гомогенізували в буферному розчині (0,25М сахароза, 0,025М KCl, 0,005М MgCl₂, 0,035 М трис-HCl, рН 7,4). Гомогенати центрифугували при 20000 g протягом 60 хв. Одержану прозору рідину використовували для дослідження. Обробку тканин проводили в холодній кімнаті при 0-4°C.

Лактатдегідрогеназну активність визначали спектрофотометричним методом при 340 нм і температурі 18-20°C. Множинні форми лактатдегідрогенази досліджували за допомогою електрофорезу на поліакриламідному гелі. Проявлення ізоферментів проводили в темноті при 37°C протягом 1 години в інкубаційному субстраті, який вміщав 5 мл 1М L-лактат натрію в трис-HCl-буфері (рН 7,4), 20 мг NAD, 4 мг тетразолію нітросинього, 1 мг ФМС, доведених до об'єму 50 мл 0,2М трис-HCl-буфером (рН 7,4) [4, 8].

Інкубаційний субстрат для проявлення форм МДГ вміщав 15 мл 1М малату натрію в трис-HCl-буфері (рН 8,1), 20 мг NADP, 15 мг тетразолію нітросинього, 5 мг ФМС, 0,5 мл 0,25М MnCl₂, доведених до об'єму 50 мл 0,1М трис-HCl-буфером (рН 8,1) [5,8].

Процентне співвідношення ізоферментного спектру ЛДГ і МДГ визначали ваговим методом.

Одержані дані опрацьовані статистично.

Власні дослідження. Дослідженнями встановлено, що внутрішньом'язове введення телятам зимозану підвищує вміст цитоплазматичних білків у тканинах тимуса, селезінки і лімфовузлів (1-а дослідна група), а введення зимозану в комбінації з естрогенами, андрогенами і вітамінами сприяло синтезу білка у всіх досліджуваних тканинах (2-а дослідна група), особливо на фоні згодовування телятам мінерально-вітамінного преміксу (3-я дослідна група) (табл.1).

Таблиця 1

Концентрація розчинних білків у тканинах новонароджених телят, n=4, %

Тканини	Контрольна	1-а дослідна	2-а дослідна	3-а дослідна
	M±m	M±m	M±m	M±m
Сироватка крові	6,55±0,21	6,82±0,37	8,08±0,61	8,36±0,77*
Тімус	5,58±0,33	6,58±0,12****	8,52±0,11****	10,87±0,76****
Печінка	4,95±0,17	5,04±0,34	6,56±0,114****	8,09±0,29****
Селезінка	4,80±0,17	6,74±0,19****	9,05±0,75****	10,65±0,88****
Кишечник	4,32±0,36	4,31±0,97	5,66±0,80	10,65±0,88****
Лімфовузли	4,89±0,16	6,13±0,25***	6,82±0,44***	9,42±0,87***

- *** = ступінь вірогідності різниць у досліджуваних показниках між контрольною і дослідною групами телят.

Виявлені характерні зміни активності лактат- (ЛДГ) і малатдегідрогеназ (МДГ) та їх спектру (рис. 1-12). ЛДГ активність у досліджуваних тканинах дослідних телят порівняно до контрольних підвищувалась.

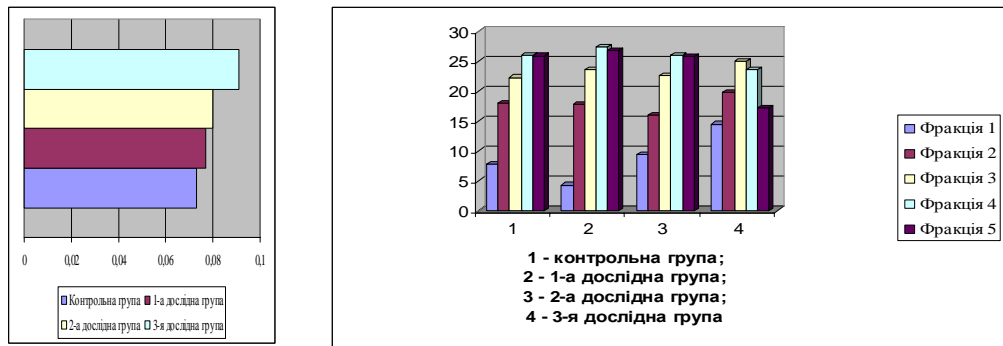


Рис.1. Активність (мкм/мг білка) та процентне співвідношення ізоферментного спектру ЛДГ у сироватці крові новонароджених телят, n=4

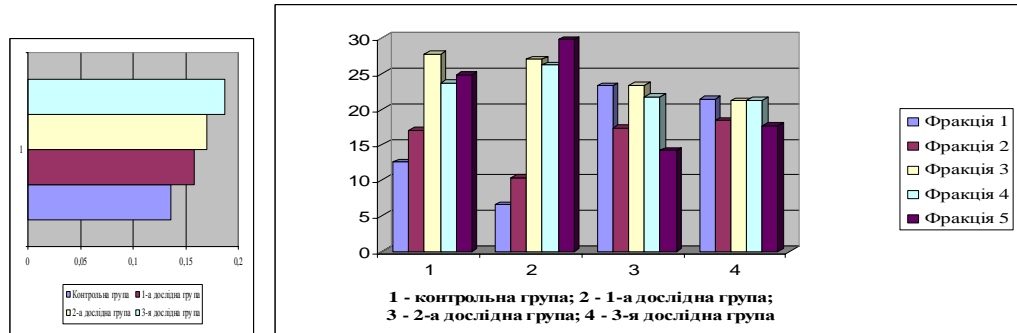


Рис.2. Активність (мкм/мг білка) та процентне співвідношення ізоферментного спектру ЛДГ у тканині зобної залози новонароджених телят, n=4

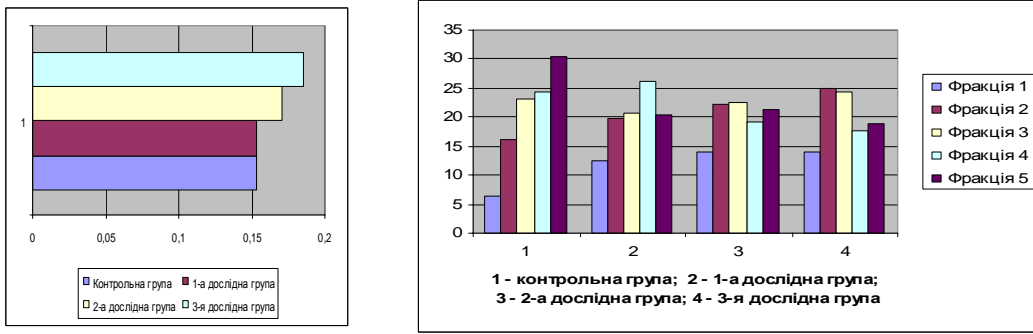


Рис.3. Активність (мкм/мг білка) та процентне співвідношення ізоферментного спектру ЛДГ у тканині печінки новонароджених телят, n=4
 Ферментативні спектри ЛДГ, представлені у вигляді 5 молекулярних форм, які характеризуються однаковою субстратною специфічністю, але

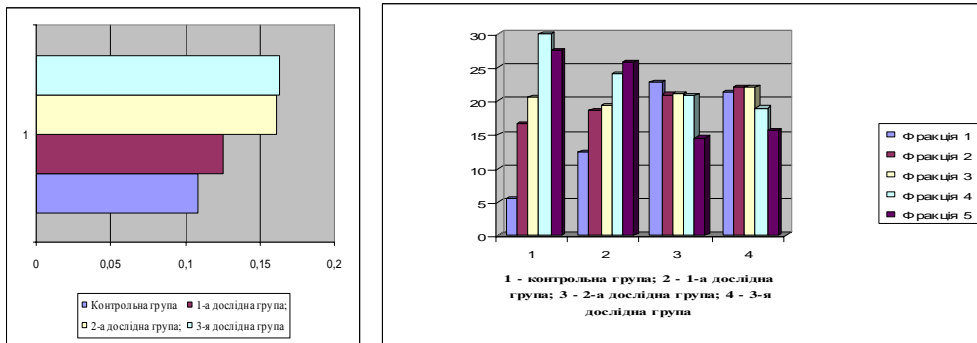


Рис.4. Активність (мкм/мг білка) та процентне співвідношення ізоферментного спектру ЛДГ у тканині селезінки новонароджених телят, n=4

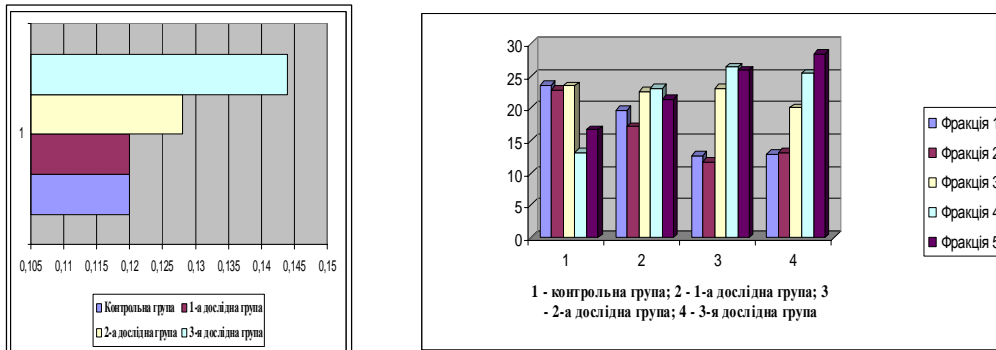


Рис.5. Активність (мкм/мг білка) та процентне співвідношення ізоферментного спектру ЛДГ у слизовій оболонці кишечника новонароджених телят, n=4

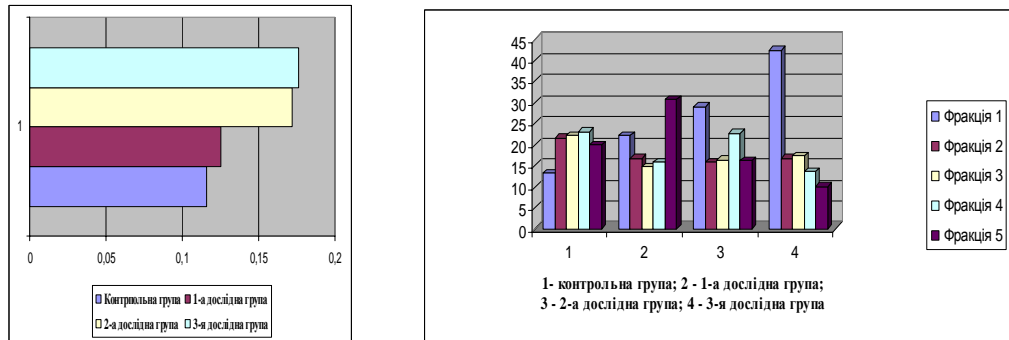


Рис.6. Активність (мкм/мг білка) та процентне співвідношення ізоферментного спектру ЛДГ у тканині лімфовузлів новонароджених телят, n=4

різною відносною електрофоретичною рухливістю і вказані нами в порядку найменшої рухливості до аноду. Множинні форми ЛДГ (ЛДГ₁, ЛДГ₂, ЛДГ₄, ЛДГ₅)

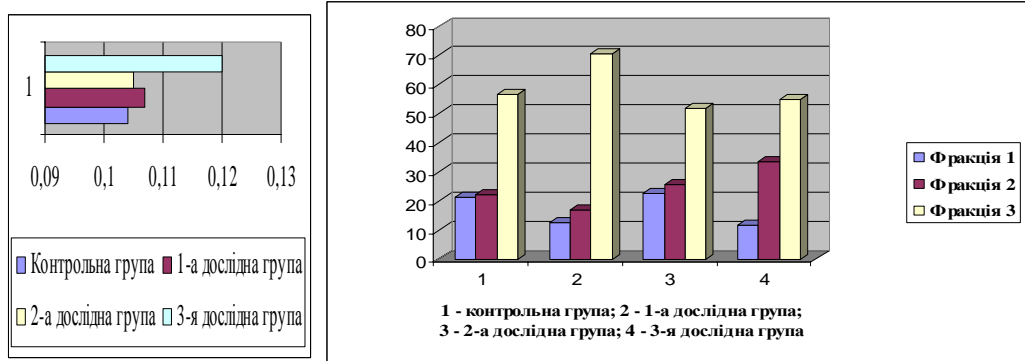


Рис.7. Активність (мкм/мг білка) і % співвідношення ізоферментного спектру МДГ в сироватці крові новонароджених телят, n=4

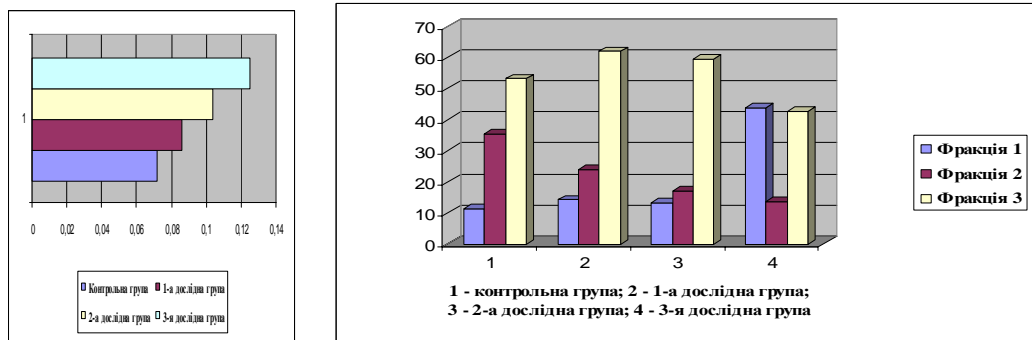


Рис.8. Активність (мкм/мг білка) і % співвідношення ізоферментного спектру МДГ у тканині зобної залози новонароджених телят, n=4

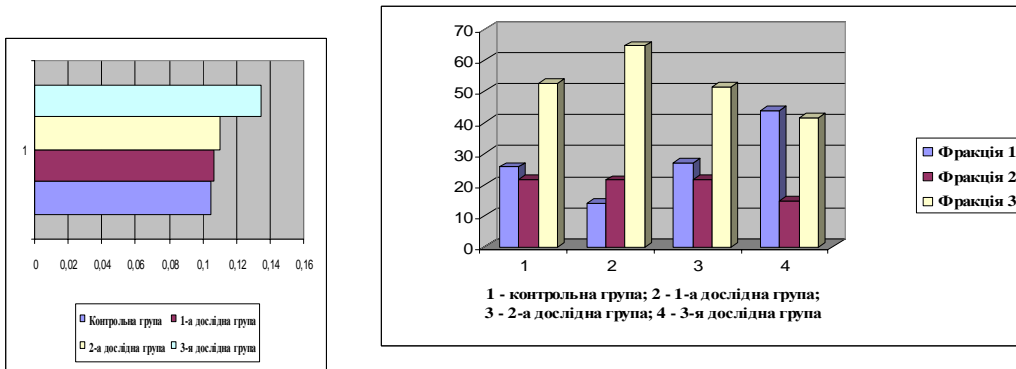


Рис.9. Активність (мкм/мг білка) і % співвідношення ізоферментного спектру МДГ у тканині печінки новонароджених телят, n=4 підлягають істотним кількісним змінам у більшості досліджуваних тканин, що, очевидно, являється наслідком дії досліджуваних факторів. Істотно не змінювалася тільки ізоферментна фракція ЛДГз.

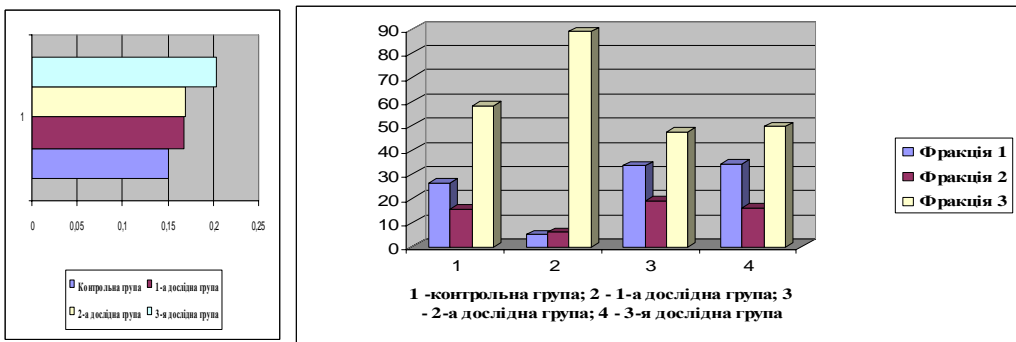


Рис.10. Активність (мкм/мг білка) і % співвідношення ізоферментного спектру МДГ у тканині селезінки новонароджених телят, n=4

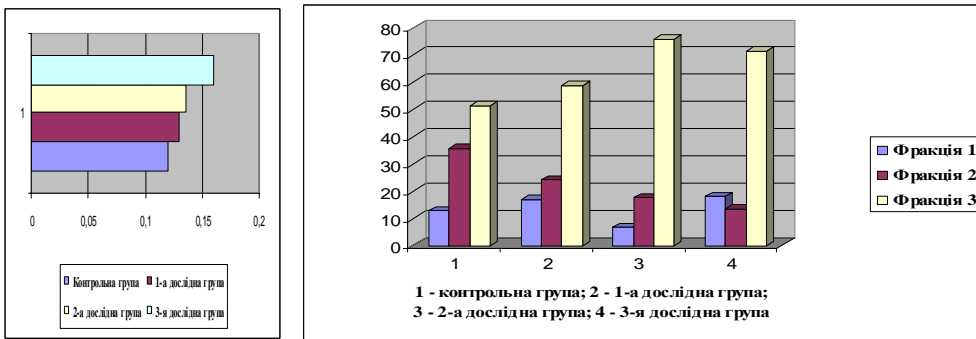


Рис.11. Активність (мкм/мг білка) і % співвідношення ізоферментного спектру МДГ у слизовій оболонці кишечника новонароджених телят, n=4

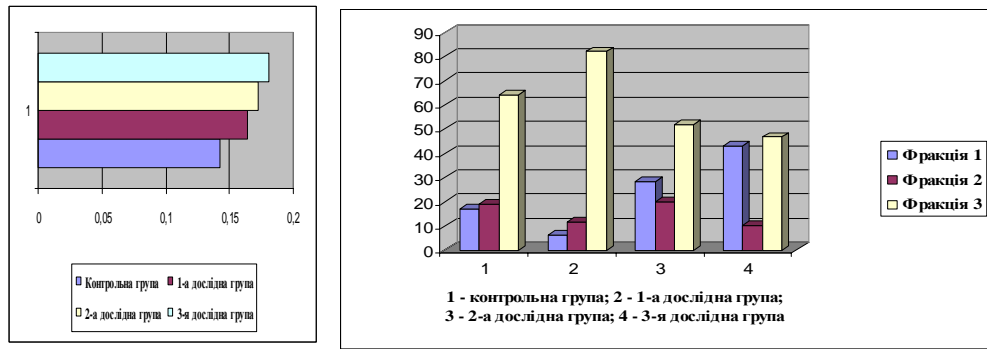


Рис.12. Активність (мкм/мг білка) і % співвідношення ізоферментного спектру МДГ у тканині лімфовузлів новонароджених телят, n=4

Протягом постнатального розвитку тварин, а також під впливом різних факторів на тканини організму, можуть спостерігатися зміни в активності ЛДГ і співвідношення її субодиниць (збільшується кількість А- або В-поліпептидів). Це має важливе метаболічне значення, оскільки відновлення пірувату, утвореного в фосфоенолпіруваткіназній реакції гліколізу, в лактат каталізується ЛДГ₁ і істотно гальмується вже малими концентраціями пірувату. Виходячи з цього, у тканинах, які вміщують велику кількість даного ізоферменту, не відбувається швидкого збільшення концентрації лактату, і можна очікувати повного окиснення глюкози через цикл лимонної кислоти. Таким чином, М-субодиниця ЛДГ каталізує більш кінцевий етап анаеробного перетворення вуглеводів, а Н-субодиниця - аеробне окиснення, а саме початкові етапи аеробного перетворення вуглеводів (6).

Дослідженнями у тканинах телят НАД-залежної МДГ виявлено по 3 ізоферменти, у співвідношенні яких між групами тварин відзначено кількісні зміни. Відомо, що цитоплазматичні форми МДГ₁₋₃ беруть участь в транспорті іонів водню із цитоплазми в мітохондрії (малатний човниковий механізм), тому їх зміни в тканинах можуть вказувати на інтенсивність перебігу окисно-відновних процесів.

Результатами встановлено підвищення концентрації МДГ₃ в сироватці крові усіх дослідних груп і пониження МДГ_{1,2} (1-а дослідна) та МДГ₁ (2-а дослідна група). В тимусі пониження кількості МДГ₂ призводило до підвищення - МДГ_{1,3}, а в печінці зменшення вмісту МДГ₁ збільшувало рівень МДГ₃. Особливістю екстракту гомогенатів селезінки являлося те, що під впливом зимозану знижувався вміст МДГ_{1,2} і підвищувався процент МДГ₃, а вже при введенні зимозану з гормонами, а також на фоні мінерально-вітамінного преміксу (2,3-дослідні групи), навпаки, підвищувався рівень МДГ₁ і знижувався процент МДГ₃. В еритроцитах зменшувалась кількість МДГ₂ (1-а дослідна група), МДГ_{1,2} (2-а дослідна група) і МДГ₂ (3-я дослідна група). Ізоферментний спектр МДГ в цитоплазмі клітин лімфовузлів характерний до описаного нами в тканині селезінки.

Гормонально-вітамінний препарат, очевидно посилює його дію, оскільки відзначено підвищений біосинтез білків не тільки в лімфоїдних органах, але і в печінці та незначно в кишечнику (3-я група).

Виробничі дослідження ефективності досліджуваних препаратів в умовах ферм показали, що вони підвищують життєздатність і збереженість новонароджених телят на 4-4,5 %.

Висновки. На основі вищевикладеного, можна сказати, що досліджувані препарати застосовані новонародженим телятам впливають на кількісні і, очевидно, якісні зміни ММФ, дають можливість стверджувати, що досліджуваним тканинам характерний специфічний набір ММФ ферментів, які перебувають в значній залежності від факторного впливу.

Література

1. Cahn R. D. e. a. Nature and Development Zactic Dehydrogenases. The two mayor types of -this enzyme form molecular hybrids which change in makeup during development — Sci., 1962.-V.136. -N.3520.
2. Goldstein A.L., Slanter F.D. and Wheite A. Preparation, assay and purification of the a thymic lymphopoetic factor (Thymosin). Proc. Nat. Acad. Sci. US., 1966.-V.56. -P.1010-1017.
3. Markert C. Z. Epigenetic control of specific proteis syntesis in differentiating cells.— In: Macromolecnlar synthezis and catodifferestiotion.— N.G. Acad. Press.,1963.
4. Shaw C. R., Barto £. Genetik evidence for the gubunik structure of lactate dehydrogenase isozymes.— Proc. Nat. Acad Sci USA, 1963.-V.50.-N.2.
5. Shaw C., Prasad R. Starch gel electrophoresie of enzymes.— A. compilation of recipes.—Biochem Genet., 1970.-V.4.-N.2.
6. Басс-Шабхан Х.Ф. Зимозан. Рига. “Зинатне”, 1970, 313 с.
7. Ковалив Л. И., Розгони И.И. Премикс нуклеостимол и развитие телят.— Тваринництво України.— Киев: Урожай, 1981.-№ 4.-С.
8. Корочкин Л.И., Серов О.Л. и др. Генетика изоферментов. М., «Наука». -1977.- 273 с.
9. Петрунь Н.М., Громашевская Л.Л., Фетисова Т.В. и др. Изоферменты в медицине. К., «Здоровье». -1982.-245 с.
10. Познахиркина Я. Л., Серов О. Л. Очистка и свойства изофермента I лактатдегидрогеназы из сердечной мышцы крысы.— Биохимия, 1974, -Т.39.- В.4.

Рецензент – д.с.-г.н., професор, чл-кор. НААН України Кирилів Я.І.