

УДК 581.5+577.15.016

БИОХИМИЯ

В. В. КОВАЛЬСКИЙ, И. Е. ВОРОТНИЦКАЯ, Г. Г. ЦОЙ

СВОЙСТВА КСАНТИНОКСИДАЗЫ МОЛОКА И ЕЕ ИЗОФЕРМЕНТОВ ПРИ РАЗЛИЧНОМ СОДЕРЖАНИИ МОЛИБДЕНА И МЕДИ В РАЦИОНЕ

(Представлено академиком А. А. Баевым 28 XII 1972)

Для доказательства возможности индукции медной ксантиноксидазы в животном организме ⁽¹⁾ необходимо было определить изменения в очищенном ферменте относительного содержания меди и молибдена при алиментарном воздействии этих металлов. Для решения вопроса исследовалась ксантиноксидаза коровьего молока, так как это позволяло при высокой молочной продуктивности на одних и тех же животных наблюдать действие меди и молибдена.

Первоначальная очистка фермента производилась по методу ⁽²⁾ в модификации А. И. Козаченко, Л. С. Вартанян, Э. М. Гоникберг ⁽³⁾, окончательная — методом гель-фильтрации на сефадексе Г-200. Чистота фермента определялась отношением поглощения при 280 мμ к поглощению при 450 мμ, которое для чистых препаратов было равно 5,0—5,2. Активность ксантиноксидазы определялась на СФ-4 по скорости образования мочевой кислоты при 295 мμ по методу ⁽⁴⁾. В очищенном ферменте производилось определение ФАД флуорометрическим методом ⁽⁵⁾, молибдена — Zn-дитиолом ⁽⁶⁾, меди — дифенилкарбазоном ⁽⁷⁾, железа — дифенилфенантралином ⁽⁸⁾.

Содержание перечисленных компонентов ксантиноксидазы, выделенной из молока коров, находящихся в условиях Подмосквья на обычном пищевом рационе (норма), приведено в табл. 1. Из таблицы видно, что содержание ФАД и металлов в простетической группе ксантиноксидазы находится в зависимости от сезона года (физиологическое состояние организма и состав рациона). Соотношение ФАД:Fe:Mo, выраженное в мол.:ат.:ат., зимой и летом одинаково и составляет 2:8:4, а весной это соотношение равно 2:8:2. Увеличение содержания ФАД и некоторое уменьшение молибдена в молекуле ксантиноксидазы в весенний пе-

Таблица 1

Сезонные изменения содержания и соотношения ФАД и металлов в ксантиноксидазе, выделенной из молока коров

Сезоны года	Содержание в суточном рационе Mo и Cu, мг	№ коровы	Удельная активность, ед/мг	ФАД				ФАД: Fe : Mo : Cu (весовые соотношения)	Σ ФАД: Fe : Mo : Cu, мол. : ат. : ат. : ат.
				Fe	Mo	Cu	μг на 1 мг белка		
Зима (22 XI 1971— 7 II 1972)	Cu 51,8	1	3,9	0,7	0,27	0,2	Не обн.	3:1:1	2:8:4
	Mo 12,6	2	4,8	0,6	0,27	0,2	» »	3:1:1	2:8:4
	Cu/Mo 4,1	3	8,0	1,2	0,4	0,4	» »	3:1:1	2:8:4
Весна (22 III— 13 IV 1971)	Cu 54,6	4	5,2	1,2	0,5	0,16	» »	2,5:1:0,5	2:8:2
	Mo 12,2	5	9,8	1,1	0,4	0,25	» »	3:1:0,5	2:8:2
	Cu/Mo 4,5	6	7,5	1,0	0,7	0,2	» »	2:1:0,5	2:8:2
Лето (6 VII — 24 VIII 1971)	Cu 72,0	7	9,4	1,2	0,4	0,4	0,02	3,3:1:1:0,03	2:8:4:0,25
	Mo 13,8	8	7,2	1,5	0,5	0,4	0,01	3:1:1:0,03	2:8:4:0,25
	Cu/Mo 5,2	9	6,5	1,4	0,4	0,3	0,02	3,4:1:1:0,04	2:8:4:0,25

Таблица 2

Влияние Cu и Mo пищевого рациона на содержание их в очищенной молочной ксантинооксидазе (22 ноября 1971 — 7 февраля 1972)

Суточные подкормки Cu и Mo, мг	№ коровы	Удельная актив- ность ед/мг	Fe	Mo	Cu	Fe : Mo : Cu (весо- вые соотношения)	Fe:Mo:Cu мол. : ат. : : ат.
			мг на 1 мг белка				
Контроль	3	5,8	0,24	0,28	Не обн.	1 : 1	8 : 4
Cu 153,6 через 26 дн.		4,5	0,1	0,11	0,01	0,5 : 0,5 : 0,05	8 : 4 : 1
Контроль через 2 недели после прекращения под- кормки Cu		3,8		0,1	Не обн.		
Mo 100 через 27 дн.	4	8,7	0,2	0,2	» »	1 : 1	8 : 4
Контроль		3,1	0,2	0,2	» »	1 : 1	8 : 4
Cu 307,2 через 26 дней		4,3	0,1	0,09	0,03	0,5 : 0,5 : 0,25	8 : 4 : 2
Контроль через 2 неде- ли после прекращения подкормки Cu		2,5		0,06	Не обн.		
Mo 200 через 27 дней		9,6	0,25	0,2	» »	1 : 1	8 : 4

П р и м е ч а н и е. Московская обл., содержание в сснсвсм рационе Cu : 51,8 мг, Mo 12,6 мг
еутки на 1 голову.

риод вызывают увеличение отношения ФАД/Mo. При содержании жи-
вотных на пастбищных кормах (летний период) в ксантинооксидазе мо-
лока нами обнаружена медь. Авторы ⁽⁹⁾ также наблюдали сезонную из-
менчивость отношения ФАД/Mo в молочной ксантинооксидазе, но в их
исследованиях весной это отношение уменьшалось. Они не исследовали в
ксантинооксидазе содержание меди. Наличие меди в простетической груп-
пе очищенного фермента ксантинооксидазы молока малоизвестный факт,
об этом сообщается лишь в работе ⁽¹⁰⁾. Сопоставление ранее полученных
данных с наблюдениями ⁽¹⁰⁾ позволяет предположить, что наличие меди
в ксантинооксидазе молока коров является адаптивной реакцией на содер-
жание меди в рационе (табл. 1).

В длительных опытах с содержанием коров на пищевом рационе, обо-
гащенном медью, нами наблюдалось в ксантинооксидазе молока появление
меди и уменьшение содержания молибдена. При подкормке коров молиб-
деном была получена ксантинооксидаза, относительно обогащенная мо-
либденом и не содержащая меди. Данные о влиянии подкормок медью и
молибденом на содержание этих металлов в очищенном ферменте приве-
дены в табл. 2. Увеличение содержания молибдена в молекуле ксантино-
оксидазы наблюдалось только после длительного скормливания его живот-
ным (27 дней). В этих опытах показаны ферментные адаптации, связан-
ные с изменением содержания в ферменте металлов или даже заменой
одного металла другим.

В исследованиях различных авторов и наших в молочной ксантино-
оксидазе показана изменчивость соотношения между железом, молибденом
и медью (табл. 3). В наших работах активность ксантинооксидазы сохра-
нялась в случаях отсутствия в ферменте молибдена или меди. Было оп-
ределено ⁽¹⁴⁾, что активность не нарушалась при искусственном удале-
нии из фермента железа. На основании этих данных можно считать,
что основным фактором активности ксантинооксидазы является ФАД. Толь-
ко его удаление ведет к потере ферментом окислительных свойств и к пре-
вращению ксантинооксидазы в ксантиндегидрогеназу. Показана также воз-
можность сохранения свойств ксантинооксидазы путем замены ФАД на
ФМН ⁽¹⁵⁾.

Содержание металлов железа, молибдена и меди в ксантинооксидазе
влияет на ее активность. При увеличении в ксантинооксидазе ФАД и желе-
за активность фермента повышается, но заметнее при одновременном уве-

личении также содержания молибдена или появлении в ферменте меди (табл. 1). При подкормке животных избыточным количеством молибдена активность фермента увеличивается в случаях повышения содержания в нем железа и молибдена. При подкормке животных медью и при снижении при этом в ферменте железа и молибдена активность фермента держится на среднем уровне. Возможно, что на активность ксантиноксидазы влияет также резерв металлов в тканях ⁽¹⁾. Так, при повышении содержания молибдена или меди в рационе вместе с нарастанием содержания этих металлов в тканях увеличивается активность фермента.

Наряду с функциональными адаптивными изменениями свойств молочной ксантиноксидазы возможно существование ее различных форм в тканях различных животных. Такими формами являются, вероятно, ксантиноксидаза печени цыпленка с соотношением ФАД : Fe : Mo, равным 1 : 8 : 1 ⁽¹⁶⁾, или слизистой оболочки кишечника теленка, где на 1 моль ФАД приходится 17,4 г-ат. Fe, 4,2 г-ат. Cu при отсутствии молибдена ⁽¹⁷⁾. Вопрос о возможном участии металлов в регуляции активности и существовании различных форм ксантиноксидазы можно решать путем разделения очищенной ксантиноксидазы на изоферменты, выделения их, определения их удельной активности и содержания в них металлов.

Ксантиноксидаза разделялась нами методом дискового электрофореза в полиакриламидном геле (7,5%) при использовании трис-глицинового буфера pH 8,2, сила тока на одну трубку первые 15 мин. 2 ма, остальные 60 мин. 5 ма. Для проявления электрофореграмм гель окрашивался

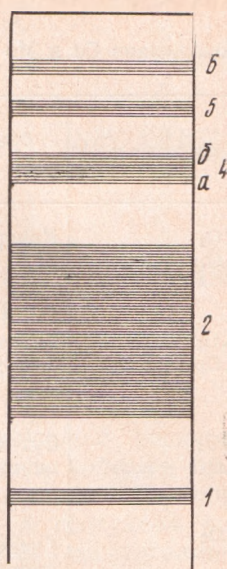


Рис. 1. Электрофореграмма ксантиноксидазы молока коров (полиакриламидный гель)

Таблица 3

Соотношение ФАД, Fe, Mo, Cu в молекуле молочной ксантиноксидазы

ФАД, мол.	Fe, ат.	Mo, ат.	Cu, ат.	Условия получения фермента	ФАД, мол.	Fe, ат.	Mo, ат.	Cu, ат.	Условия получения фермента
2	8	4	Не обн.	Зима	2	8	4	0,25	Пастбище, лето
2	8	2	—	⁽¹¹⁾	2	8	4	1	Подкормка Cu
2	8	2	—	⁽¹²⁾	2	8	2	1	» »
2	8	1	—	⁽¹³⁾	2	8	4	2	» »
2	8	2	Не обн.	Весна	2	8	4	Не обн.	Подкормка Mo

тетразольным синим. Методом электрофореза было выявлено 6 изоформ ксантиноксидазы молока холмогорских коров Подмосковья (рис. 1). Электрофоретическая подвижность (относительно подвижности ФАД) равна для КО₁ 0,40; КО₂ 0,337; КО_{4а} 0,10 КО_{4б} 0,075; КО₅ 0,050; КО₆ 0,025. Препаративно удалось выделить КО₂ и КО_{4а} + КО_{4б}, остальные изоферменты ксантиноксидазы не были выделены из-за их малого содержания. Для определения меди и молибдена в изоферментах из окрашенных колонок геля вырезались соответствующие диски изоферментов (минимальное количество белка для определения меди 0,5 мг, молибдена 1,0 мг). При нормальном содержании в рационе молибдена и меди КО₂ оказалась молибденовой изоформой ксантиноксидазы с удельной активностью, равной 5,0 ед. на 1 мг белка, а КО_{4а} + КО_{4б} — медными изоформами с удельной активностью в сумме около 1,0. Применение медной подкормки приводило к уменьшению содержания или к потере молибдена изоферментом КО₂, что не влияло на его удельную активность, и к по-

Таблица 4

Содержание Си и Мо в изоферментах ксантиноксидазы молока коров (22 ноября 1971 — 7 февраля 1972)

Изоферменты	Содержание Си или Мо в рационе, мг	№ коровы	Удельная активность, ед/мг	Мо, $\mu\text{г}/\text{мг}$	Си, $\mu\text{г}/\text{мг}$
KO ₂ KO _{4a} + KO _{4b}	Контроль Си 51,8 Мо 21,6	1	5,0	0,30	Не обн.
		2	5,1	0,30	» »
		1	1,0	Не обн.	0,2
		2	1,3	» »	0,2
KO ₂ KO _{4a} + KO _{4b}	Суточные добавки к рациону Си 154	3	5,0	» »	Не обн.
		4	5,0	0,05	» »
		3	2,0	Не обн.	1,7
		4	1,6	» »	0,5
KO ₂ KO _{4a} + KO _{4b}	Суточные добавки к рациону Си 307	3	5,7	» »	Не обн.
		4	5,0	» »	» »
		3	2,0	» »	0,5
		4	2,0	» »	1,1
KO ₂	Суточные добавки к рациону Мо 100	3	5,0	0,4	Не обн.
		4	6,5	0,3	» »
KO ₂	Суточные добавки к рациону Мо 200	3	15,0	0,37	» »
		4	0,0	0,3	» »

вышению содержания меди в сумме изоферментов KO_{4a} и KO_{4b}, что приводило к повышению их удельной активности. Молибденовая подкормка приводила к обогащению KO₂ молибденом и, в некоторых случаях, к значительному повышению его удельной активности, а также к уменьшению содержания меди или ее потере изоферментами KO_{4a} + KO_{4b} (в одном случае к замещению в нем меди молибденом). Результаты исследований приведены в табл. 4, изофермент KO₂ (молибденовый) во всех случаях был активнее изоферментов KO_{4a} + KO_{4b} (медных). Очевидно, активность ксантиноксидазы определяется соотношением в ферменте молибден- или медьсодержащих изоферментов, концентрацией и соотношением в них металлов. Впервые показана возможность изменения содержания в ксантиноксидазе и ее изоферментах молибдена и меди или их частичной обмениваемости под влиянием содержания этих металлов в рационе.

Институт геохимии и аналитической химии
им. В. И. Вернадского
Академии наук СССР
Москва

Поступило
26 XII 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. В. Ковальский, И. Е. Воротницкая, ДАН, 187, № 6 (1969). ² D. A. Gilbert, F. Bergel, Biochem. J., 90 (1964). ³ А. И. Розаченко, Л. С. Вартанян, Э. М. Гоникберг, Биохимия, 36, в. 1 (1971). ⁴ P. G. Avis, F. Bergel, R. C. Bray, J. Chem. Soc., 1955, 1100. ⁵ H. B. Burch, Methods in Enzymology, 1957. ⁶ N. G. Marshall, Econ. Geol., 59, № 1, 142 (1964). ⁷ Л. Н. Лапин, М. А. Рипш, Тр. Таджикск. учительск. инст., 4 (1957). ⁸ Ph. E. Brumby, V. Massey, Methods in Enzymology, 10, 463 (1967). ⁹ L. I. Hart, M. A. McGartoll et al., Biochem. J., 116, 851 (1970). ¹⁰ G. G. Roussos, B. H. Morrow, Arch. Biochem. and Biophys., 114, № 3, 599 (1966). ¹¹ M. Uozumi, R. Hayaschikava, Z. H. Piette, Arch. Biochem. and Biophys., 119, 288 (1967). ¹² L. Hart, R. C. Bray, Biochim. et biophys. acta, 146, № 2, 611 (1967). ¹³ D. A. Richert, W. W. Westerfeld, J. Biol. Chem., 209, 179 (1954). ¹⁴ E. Bayer, W. Voelter, Biochim. et biophys. acta, 113, 632 (1966). ¹⁵ H. Komai, V. Massey, G. Palmer, J. Biol. Chem., 244, 1692 (1966). ¹⁶ C. Remy, D. Richert, J. Biol. Chem., 217, 293 (1955). ¹⁷ G. G. Roussos, Methods in Enzymology, 12, Nucleic Acids, Part A, 1967, p. 5.