

РОЛЬ КІНЦЕВОЇ РЕАКЦІЇ АНАЕРОБНОГО ГЛІКОЛІЗУ В МОЛЕКУЛЯРНИХ МЕХАНІЗМАХ РЕГУЛЯЦІЇ ОБМІННИХ ПРОЦЕСІВ У ГЕПАТОЦИТАХ НЕОНАТАЛЬНИХ ТЕЛЯТ ЗА ДІАРЕЇ

М. С. Калачнюк¹, І. М. Басараб², Л. Г. Калачнюк¹, Д. О. Мельничук¹,
С. Д. Мельничук¹, Г. І. Калачнюк¹

¹Національний університет біоресурсів і природокористування України,

²Львівський національний університет ветеринарної медицини
та біотехнологій імені С. З. Гжицького

Показано, що в молекулярних механізмах регуляції обмінних процесів у гепатоцитах неонатальних телят за умов розвитку діареї аліментарного походження особливу роль відіграє анаеробний гліколіз і, зокрема, його одинадцята (кінцева) лактатдегідрогеназна реакція. За дії факторів діареї у тканині печінки неонатальних телят вірогідно знижується концентрація лактату і підвищується вміст пірувату. При цьому в цитозоль-мітросомальній та мітохондріальній фракціях гепатоцитів вірогідно зростає активність лактатдегідрогенази, а також суттєво змінюється її спектр множинних молекулярних ізоформ. Обсяги електрофоретично більш рухливих тетрамерів (H_4 — α_1 , H_3M_1 — α_2 , H_2M_2 — β і H_1M_3 — γ_1) знижуються за діареї на тлі багатократного збільшення молярного відсотку тетрамера M_4 — γ_2 . Наведені зміни пов'язуються із значними пошкодженнями структурно-функціонального стану гепатоцитів, особливо мембран.

Ключові слова: ГЛІКОЛІЗ, МЕТАБОЛІЗМ, ЛАКТАТДЕГІДРОГЕНАЗА, ІЗОЗИМИ, ПІРУВАТ, ЛАКТАТ, ГЕПАТОЦИТИ, ДІАРЕЯ, НОВОНАРОДЖЕНІ ТЕЛЯТА

Серед багаточисельних метаболітів найбільш важливими у клітинах печінки вважаються піруват, ацетил-КоА і гліцерин. Ці три сполуки тісно зв'язують обміни вуглеводів, білків і ліпідів. У перетворенні вуглеводів особливу роль відіграє гліколіз (рис. 1) [1–6].

В аеробних умовах молекула глюкози в гліколізі розпадається до 2 молекул пірувату при подальшому утворенні по 2 молекули АТФ і НАДН. В анаеробних умовах піруват проходить подальші перетворення, які забезпечують регенерацію $НАД^+$ та утворення продуктів бродіння — лактат або етанол. Саме в цих умовах гліколіз є єдиним способом одержання енергії для синтезу АТФ із АДФ та неорганічного фосфату. У цьому випадку термін гліколіз означає, головним чином, анаеробний розклад глюкози. Утворені кінцеві продукти гліколізу (піруват і лактат) у зворотному напрямі гліколітичних реакцій, за певних умов, можуть стати джерелом новоствореної глюкози. Такий зворотний шлях називають глюконеогенезом.

В анаеробному гліколізі (рис. 1) функціонують 11 реакцій, які каталізуються відповідними ензимами. Фізіологічно це є найбільш древній тип метаболізму глюкози. Він і до теперішнього часу вважається основним шляхом перетворення цієї гексози, як в анаеробних умовах, так і за наявності Оксигену в усіх живих організмах, що заселяють земні простори.

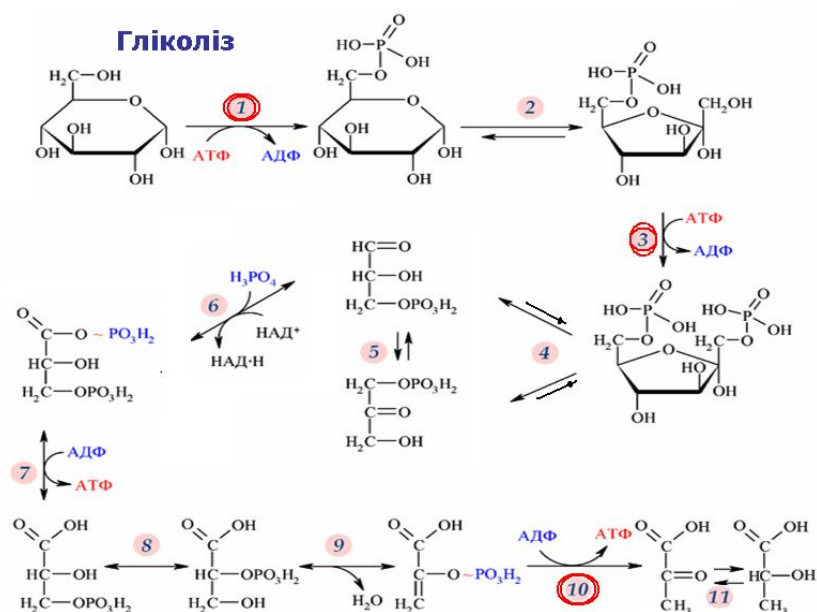


Рис. 1. Анаеробний гліколіз та його кінцева реакція з утворенням пірувату й лактату

Отже, крім енергетичного здобутку та утворення нових метаболітів в організмі, анаеробний гліколіз виступає зв'язуючою ланкою між різними метаболічними шляхами, що дуже важливо з погляду розробки молекулярних механізмів регуляції процесу утворення кінцевих продуктів анаеробного гліколізу в клітинах печінки за умов розвитку розладів травної системи. Пряма та зворотна лактатдегідрогеназна реакція, в якій піруват за наявності НАДН перетворюється в лактат, а за участі НАД⁺ лактат — у піруват, остаточно ще не вивчена у тканині печінки та у структурах гепатоцитів новонароджених телят з ознаками диспепсії. Тому основною метою нашої роботи було провести експериментальний аналіз поглиблених досліджень окремих важливих елементів молекулярних механізмів регуляції процесу утворення кінцевих продуктів анаеробного гліколізу в гепатоцитах неонатальних телят за умов розвитку диспепсії аліментарної природи. Фрагмент результатів проведених досліджень у згаданому напрямі наводиться нижче у цьому повідомленні.

Матеріали і методи

Для досліджень використовували 1–7-добових новонароджених телят, яких розділяли за принципом аналогів (рівнозначних за віком, породою, статтю, вагою) на дві групи з масою тіла 28–36 кг. Телята першої (I; контрольної) групи були клінічно здоровими, а другої (II; дослідної) — хворими із важкими проявами діареї аліментарної природи. Концентрацію лактату та пірувату у тканині печінки визначали за традиційними методами, відповідно Баркера і Саммерсона (адаптованим до гомогенату печінки) та Фреєдман і Хауген [7]. Субклітинні фракції гепатоцитів отримували диференційним центрифугуванням [8–10]. Концентрацію білка визначали за описом Лоурі і співавторів [11]. Для визначення активності лактатдегідрогенази (ЛДГ; КФ 1.1.1.27) у кювету додавали фосфатний буфер 0,1 моль/л, рН 7,4, с розчинами 0,165 ммоль/л НАДН і 1,03 ммоль/л натрію пірувату за 30 °С і відзначали поглинання за $\lambda=340$ нм [1, 2, 12]. Спектри молекулярних ізоформ ЛДГ досліджували електрофорезом в поліакриамідному гелі [1, 2, 12]. Загальна схема досліджень наведена на рисунку 2.

Одержані цифрові дані опрацювали статистично за допомогою програми Microcal Origin (Version: 5,0) з використанням критерію Ст'юдента t [12, 13].

Результати й обговорення

Одержані дані досліджень наведено на рисунках 3–6.

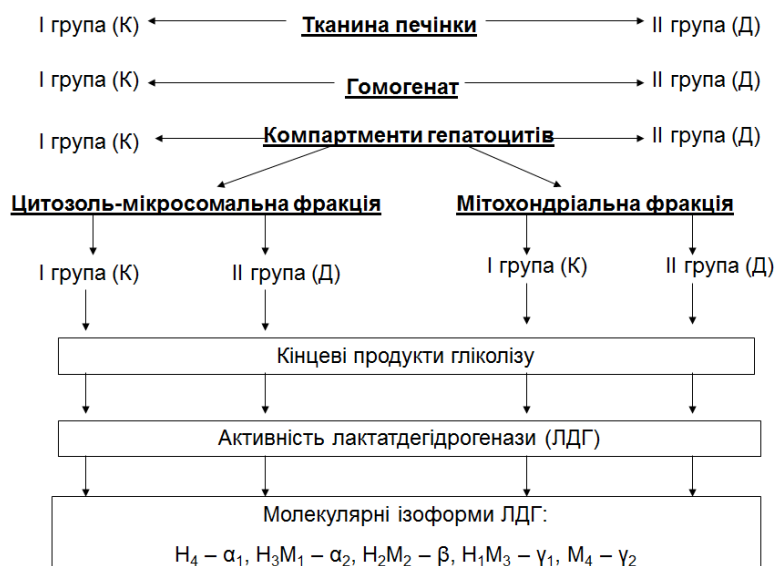


Рис. 2. Схема проведення фізіолого-біохімічних і молекулярно-біологічних досліджень тканини печінки новонароджених телят — клінічно здорових (I; К) та з ознаками діареї аліментарної природи (II; Д)

Із наведених на рисунку 3 даних видно, що у тканині печінки новонароджених телят під впливом факторів діареї знижуються майже у 2 рази концентрація лактату і підвищується більше, ніж у 2 рази вміст пірувату. При цьому у цитозоль-мікросомальній і мітохондріальній фракціях гепатоцитів активність лактатдегідрогенази вірогідно зростає (відповідно на 47 і 89 %), на що вказують дані рисунку 4, а також суттєво змінюється спектр множинних молекулярних ізоформ ЛДГ (рис. 5 і 6).

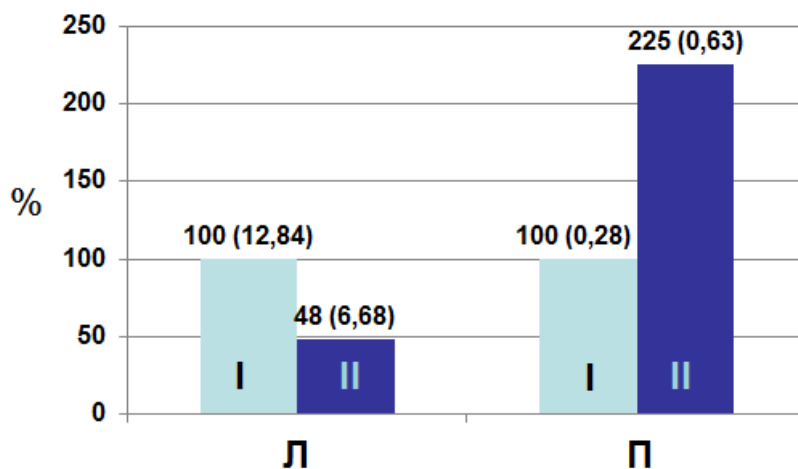


Рис. 3. Відносна (%) і фактична (ммоль/г сирової тканини) концентрація лактату (Л) і пірувату (П) в тканинах печінки новонароджених телят — клінічно здорових (I; К) та з ознаками діареї (II; Д) ($M \pm m$; $n=5$)

Якщо під впливом факторів діареї молярний відсоток перших чотирьох тетрамерів ензиму ($H_4 — \alpha_1$, $H_3M_1 — \alpha_2$, $H_2M_2 — \beta$, $H_1M_3 — \gamma_1$) знижується, то натомість, вірогідно зростає молярна частка п'ятого тетрамеру — $M_4 — \gamma_2$. Наведені зміни незаперечно вказують на значні пошкодження клітин печінки і, зокрема, їхніх мембран. Такі порушення, очевидно, створюють сприятливі умови для виходу із клітин у оточуюче середовище і кров більших обсягів різних молекулярних форм ізозимів ЛДГ і, передусім, п'ятого тетрамеру — $M_4 — \gamma_2$.

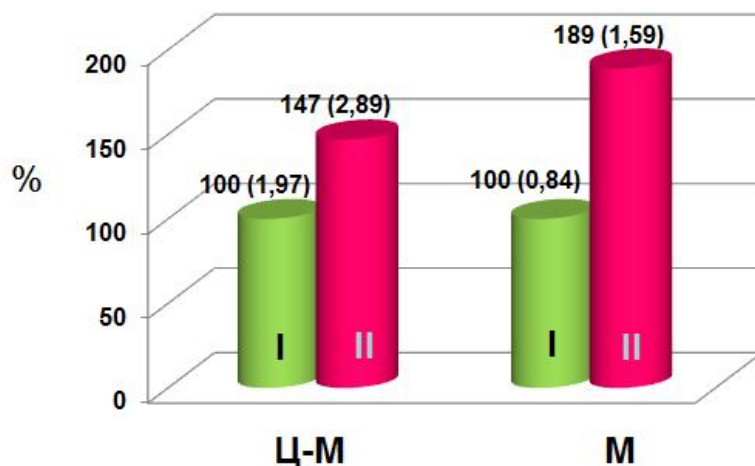


Рис. 4. Відносна (%) і фактична (мкмоль НАДН/хв·мг білка) активність ЛДГ у цитозоль-мітосомальній (Ц-М) і мітохондріальній (М) фракціях гепатоцитів новонароджених телят — клінічно здорових (I; К) та з ознаками діареї (II; Д, $M \pm m$; $n=5$)

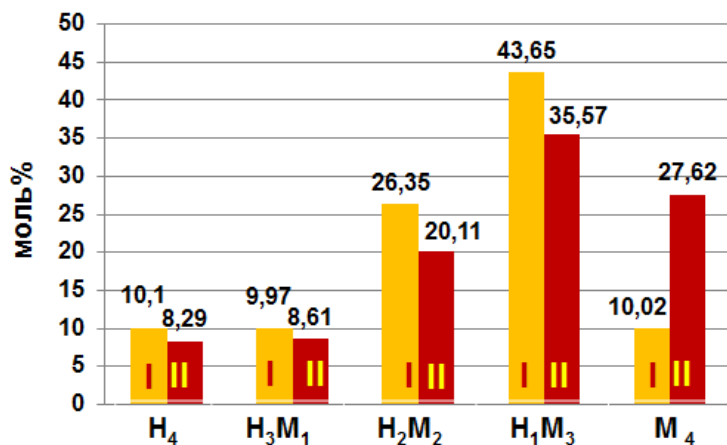


Рис. 5. Спектр молекулярних ізозимів ЛДГ (моль%) у цитозоль-мітосомальній (Ц-М) фракції гепатоцитів новонароджених телят — клінічно здорових (I; К) та з ознаками діареї (II; Д, $M \pm m$; $n=5$)

До цього слід додати, що внутрішня мітохондріальна мембрана є непроникною для $НАД^+$ і вона таким чином розділяє фонд $НАД^+$ цитоплазми від фонду $НАД^+$ мітохондрій. Мембрана містить спеціальну біосистему, яка дозволяє використовувати окиснення цитоплазматичного $НАД^+$ для генерування енергії і утворення АТФ у середині мітохондрій. Тому перенесення водню (відновлювального еквівалента) через мітохондріальну мембрану (тобто такий зв'язок між двома фондами $НАД^+$) здійснюється з метою регулювання процесів метаболізму і, передусім, гліколізу. Звідси впливає те, що при порушеннях структурно-функціонального стану мітохондріальних мембран відхиляються від норми і

метаболичні процеси у цитоплазмі (в тому числі — гліколіз) та у мітохондріях. Продукти гліколізу й інших метаболических шляхів використовуються для підтримання життєдіяльності клітин.

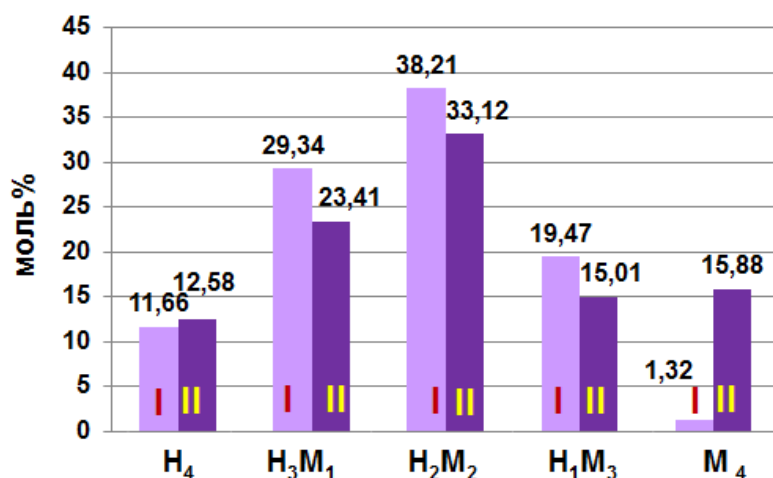


Рис. 6. Спектр молекулярних ізоформ ЛДГ у мітохондріальній (М) фракції гепатоцитів новонароджених телят – клінічно здорових (I; K) та з ознаками діареї (II; D; $M \pm m$; $n=5$)

За певних умов мембрани можуть складати до 80 % загальної маси сухих компонентів клітини. Зазвичай мембрани є товщиною 4–10 нм. Всі мембрани — полярні, тобто існує різниця в складі внутрішнього і зовнішнього шарів по відношенню до цитоплазми. Із шести основних функцій мембран, на наш погляд, за діареї у гепатоцитах втрачається контроль за транспортом метаболітів та іонів, що необхідні для підтримання внутрішньоклітинного гомеостазу; губиться сприйняття позаклітинних сигналів та їх надходження в середину клітини; порушується ензиматичний каталіз (адже в мембранах на межі між ліпідною і водною фазами локалізовані ензими і тут відбуваються реакції з неполярними субстратами, в тому числі — біосинтез ліпідів і метаболізм неполярних ксенобіотиків); інгібуються важливі реакції енергетичного обміну, в тому числі окиснюване фосфорилювання (дихальний ланцюг) тощо.

Висновки

У молекулярних механізмах регуляції обмінних процесів у гепатоцитах неонатальних телят за умов розвитку діареї аліментарного походження особливо важливу роль відіграє анаеробний гліколіз і, зокрема його лактатдегідрогеназна реакція.

Під впливом факторів діареї у тканині печінки неонатальних телят вірогідно знижується концентрація лактату і підвищується вміст пірувату. При цьому у цитозоль-мітросомальній і мітохондріальній фракціях гепатоцитів вірогідно зростає активність лактатдегідрогенази, а також суттєво змінюється її спектр множинних молекулярних ізоформ. Обсяги електрофоретично більш рухливих тетрамерів (H_4 — α_1 , H_3M_1 — α_2 , H_2M_2 — β , H_1M_3 — γ_1) знижуються за умов діареї на тлі багатократного зростання молярного відсотку тетрамеру — M_4 — γ_2 .

Наведені зміни пов'язуються із значними пошкодженнями структурно-функціонального стану гепатоцитів і, зокрема, мембран.

Перспективи подальших досліджень. У зв'язку з одержаними результатами значний інтерес можуть мати дослідження у напрямі розробки клінічних маркерів та

розробки антидіарейних засобів для неонатальних телят з ознаками диспепсії аліментарного походження.

*M. S. Kalachnyuk, I. M. Basarab, L. G. Kalachnyuk,
D. O. Mel'nychuk, S. D. Mel'nychuk, G. I. Kalachnyuk*

ROLE OF THE FINAL REACTION OF ANAEROBIC GLYCOLYSIS IN MOLECULAR MECHANISMS OF REGULATION OF METABOLIC PROCESSES IN HEPATOCYTES IN THE NEONATAL CALVES UNDER CONDITIONS OF DIARRHEA

S u m m a r y

It has been shown that in the molecular mechanisms of regulation of metabolic processes in hepatocytes in the neonatal calves with diarrhea of alimentary origin, the anaerobic glycolysis and especially its reaction catalyzed by lactate dehydrogenase play a special role. Under the effect of factors of diarrhea, the concentration of lactate is significantly reduced and the content of pyruvate is increased in the neonatal calves liver tissue. At the same time, in the cytosol, microsomal and mitochondrial fractions of hepatocytes, lactate dehydrogenase activity is significantly increased and its spectrum of multiple molecular isoforms is also changed significantly. Under conditions of diarrhea, capacities of more mobile tetramers (H_4 — α_1 , H_3M_1 — α_2 , H_2M_2 — β and H_1M_3 — γ_1) in electrophoresis are decreased at the shadow of multiple increase of the molar fraction of M_4 — γ_2 tetramer. These changes are associated with significant structural and functional damages of hepatocytes, especially membranes.

*M. С. Калачнюк, И. М. Басараб, Л. Г. Калачнюк,
Д. А. Мельничук, С. Д. Мельничук, Г. И. Калачнюк*

РОЛЬ КОНЕЧНОЙ РЕАКЦИИ АНАЭРОБНОГО ГЛИКОЛИЗА В МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМАХ РЕГУЛЯЦИИ ОБМЕННЫХ ПРОЦЕССОВ В ГЕПАТОЦИТАХ НЕОНАТАЛЬНЫХ ТЕЛЯТ ПРИ ДИАРРЕЕ

А н н о т а ц и я

Показано, что в молекулярных механизмах регуляции обменных процессов в гепатоцитах неонатальных телят в условиях развития диарреи алиментарного происхождения особую роль играет анаэробный гликолиз и, в частности, его одиннадцатая (конечная) лактатдегидрогеназная реакция. Под действием факторов диарреи в ткани печени неонатальных телят достоверно снижается концентрация лактата и повышается содержания пирувата. При этом в цитозоль-микросомальной и митохондриальной фракциях гепатоцитов достоверно возрастает активность лактатдегидрогеназы, а также существенно изменяется ее спектр множественных молекулярных изоформ. Количества электрофоретически более подвижных тетрамеров (H_4 — α_1 , H_3M_1 — α_2 , H_2M_2 — β и H_1M_3 — γ_1) снижаются при диарее на фоне многократного увеличения молярного процента тетрамера M_4 — γ_2 . Приведенные изменения ассоциируются со значительными повреждениями структурно-функционального состояния гепатоцитов, особенно мембран.

1. Калачнюк Л. Г. Молекулярні ізоформи та активність лактатдегідрогенази у субструктурах клітини за дії екзогенних факторів / Л. Г. Калачнюк, І. М. Басараб, Д. О. Мельничук та ін. // Біологія тварин. — 2011. — Т. 13, № 1–2. — С. 103–108.

2. Калачнюк Л. Г. Окиснення лактату та локалізація ЛДГ у субструктурах клітини за умов дії екзогенних факторів / Л. Г. Калачнюк, І. М. Басараб, Д. О. Мельничук та ін. // Наук. вісник ЛНУВМтаБТ ім. С. З. Ґжицького. — 2011. — Т. 13, № 4 (50), Ч. 2. — С. 80–86.
3. Калачнюк Л. Г. Ізозим ЛДГ₅ (М₄ – γ₂) — ключовий молекулярний маркер пошкоджень субструктур гепатоцитів у новонароджених телят за аліментарної діареї / Л. Г. Калачнюк, І. М. Басараб, Д. О. Мельничук та ін. // Наук. вісн. ЛНУВМтаБТ ім. С. З. Ґжицького. — 2012. — Т. 14, № 2 (52), Ч. 2. — С. 28–35.
4. Калачнюк М. Екзогенне інгібування активності лактатдегідрогенази у субструктурах гепатоцитів неонатальних телят при аліментарній діареї : збірник тез. VII Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (5–8 квітня 2011. Львів) / М. Калачнюк, І. Басараб, Г. Калачнюк. — Львів, 2011. — С. 50–51.
5. Марри Р. Биохимия человека (1 и 2 т.) / Р. Марри, Д. Греннер, П. Мейес, В. Родуэл — М. : Мир БИНОМ, Лаборатория знаний, 2009. — 796 с.
6. Berg J. M. Biochemistry / J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer. — New York : W H Freeman, 2002. — 1515 p.
7. Кондрахин И. П. Клиническая лабораторная диагностика в ветеринарии / И. П. Кондрахин, Н. В. Курилов, А. Г. Малахов и др. — М. : Агропромиздат, 1985. — 287 с.
8. Lodish H. Purification of Cells and Their Parts / H. Lodish, A. Berk, S. L. Zipursky et al. // Molecular Cell Biology. 4th edition. — New York : W.H. Freeman and Company, 2000. — 1184 p.
9. Wiggert B. O. Multiply molecular forms of malic and lactic dehydrogenases during development / B. O. Wiggert, C. A. Villee // J. Biol. Chem. — 1964. — Vol. 239, N. 2. — P. 444–451.
10. Мельничук С. Д. Біохімія тварин з основами фізичної та колоїдної хімії : робочий зошит для студентів факультету ветеринарної медицини ; 1 частина / С. Д. Мельничук, Л. Г. Калачнюк, Г. І. Калачнюк та ін. — Київ : НУБіПУ, 2012. — 112 с.
11. Lowry O. H. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosenbroudh, A. L. Farr, R. J. Randall // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193, № 1. — P. 265–275.
12. Лабораторные методы исследования в клинике : справочник / под ред. В. В. Меньшикова. — Москва : Медицина, 1987. — 368 с.
13. Кучеренко М. Є. Сучасні методи біохімічних досліджень / М. Є. Кучеренко, Ю. Д. Бабенюк, В. М. Войціцький. — К. : Фітосоціоцентр, 2001. — 424 с.

Рецензент: завідувач лабораторії живлення та біосинтезу продукції жуйних, доктор сільськогосподарських наук, с. н. с. Стапай П. В.