

<sup>2</sup>УДК 619:615:577.1:616-003.269:636**Калачнюк Л.Г.**<sup>1,2</sup> д.б.н., доцент;**Басараб І.М.**<sup>1-3</sup>, асистент;**Мельничук Д.О.**<sup>1</sup>, д.б.н., професор, академік НАНУ і НААНУ,**Мельничук С.Д.**<sup>1</sup>, д.б.н., професор, член-кор. НААНУ**Калачнюк М.С.**<sup>1</sup>, студент**Кошман О.В.**<sup>1</sup>, магістрант**Калачнюк Г.І.**<sup>1,2</sup>, д.б.н., професор<sup>1</sup>Національний університет біоресурсів і природокористування України<sup>2</sup>Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького<sup>3</sup> Інститут фізіології і генетики тварин Чеської АН, Прага, Чеська Республіка

### ОКИСНЕННЯ ЛАКТАТУ ТА ЛОКАЛІЗАЦІЯ ЛДГ У СУБСТРУКТУРАХ КЛІТИНИ ЗА УМОВ ДІЇ ЕКЗОГЕННИХ ФАКТОРІВ

Наведено класичні методичні підходи до фундаментального вивчення особливостей окисно-відновних процесів у клітині печінки на стадії утворення й утилізації кінцевих продуктів гліколізу – лактату і пірувату за різних умов проведення експериментальних досліджень.

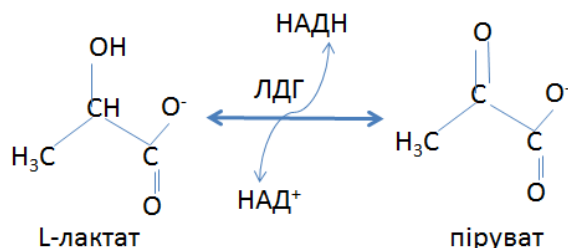
Показано чіткі зміни активності лактатдегідрогенази (ЛДГ) у цитозоль-мікросомальній і мітохондріальній фракціях гепатоцитів неонатальних телят за умов діареї (Д), традиційного лікування (ТЛ) та поєднання ТЛ із застосуванням біологічно активної добавки, що містить есенціальні фосфоліпиди молока у ліпосомальній формі (БАД LP FLP-MD). Виявлено, що реакції, які каталізуються ензимом, головним чином, локалізовані у цитозоль-мікросомальній фракції клітини печінки. За умов Д активність ЛДГ в обох субструктурах клітини вірогідно зростає. ТЛ суттєво знижує її каталітичну дію. Поєднання ТЛ із застосуванням БАД LP FLP-MD дозволяє майже наблизити до норми активність лактатдегідрогенази у досліджуваних компартментах гепатоцитів. При цьому за умов діареї відмічається зниження в 2 рази рівня лактату і настільки ж підвищення концентрації пірувату в тканині печінки. ТЛ та особливо поєднання його із застосуванням БАД LP FLP-MD вірогідно нормалізують вміст цих важливих метаболітів у клітині.

Загалом, стан процесів окиснення лактату в піруват та зворотна лактатдегідрогеназна реакція в субструктурах клітини печінки поразених діареєю неонатальних телят найшвидше наближаються до норми при поєднанні ТЛ із застосуванням БАД LP FLP-MD.

**Ключові слова:** лактат, піруват, лактатдегідрогеназа, цитозоль-мікросомальна і мітохондріальна фракції гепатоцитів, неонатальні телята, діарея, традиційне лікування, ліпосоми молока.

Відомо, що лактатдегідрогеназа (ЛДГ; КФ 1.1.1.27) каталізує процес перенесення двох електронів і одного іона  $H^+$  від лактату до  $НАД^+$  (рис. 1).

© Калачнюк Л., Басараб І., Мельничук Д., Мельничук С., Калачнюк М., Кошман О., Калачнюк Г., 2011

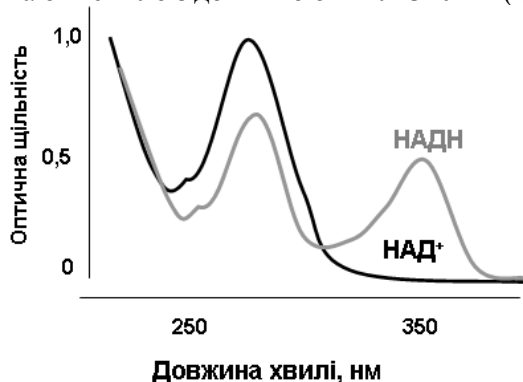


**Рис. 1.** Реакція, що каталізується ЛДГ.

Виходячи з того, що лактат під впливом ЛДГ у присутності  $\text{НАД}^+$  окислюється у піруват, а в присутності  $\text{НАДН}$ , навпаки, піруват – у лактат, то підвищення активності ензиму в клініагностиці використовується як один із важливих маркерів, що характеризує стан значних порушень внутрішньоклітинного метаболізму в тканинах і передусім у печінці. У зв'язку з цим в основну мету нашої експериментальної роботи входило дослідження змін активності ЛДГ у субклітинних фракціях та рівня лактату і пірувату у гепатоцитах новонароджених телят за умов діареї та застосування сучасних лікарських засобів.

**Матеріали і методи.** Для досліджень використовували 1 – 7 добових новонароджених телят, яких за принципом аналогів (тобто тварин рівнозначних за віком, породою, статтю, вагою і т.д.) розділяли на чотири групи ( $n=4-7$ ) з масою тіла 28 – 36 кг. Телята першої (I; контрольної) групи були клінічно здоровими, другої (II; дослідної) – хворими із важкими проявами діареї аліментарної природи, третьої (III) – піддавалися традиційному лікуванню (ТЛ) і четвертої (IV) – поєднанню ТЛ із застосуванням нової фосфоліпідвмісної біологічно активної добавки (ТЛ + БАД LP FLP-MD. Про склад згаданої добавки, умови і методи досліджень було описано детальніше у попередніх роботах [1 – 4] та нижче.

**Результати і обговорення.** При вимірюванні швидкості реакції, які відбуваються за участю  $\text{НАД}^+$  чи  $\text{НАДФ}^+$  (зазвичай такі реакції каталізуються дегідрогеназами) нами було враховано ті обставини, що  $\text{НАДН}$  і  $\text{НАДФН}$  (але не  $\text{НАД}^+$  і  $\text{НАДФ}^+$ ) поглинають світло з довжиною хвилі 340 нм (це показано на рис. 2).



**Рис. 2.** Спектри поглинання  $\text{НАД}^+$  і  $\text{НАДН}$  (концентрація розчинів 44 мг/л, довжина оптичного шляху 1 см. Такі ж спектри мають  $\text{НАДФ}^+$  і  $\text{НАДФН}$  відповідно).

Окиснення НАДН у НАД<sup>+</sup> (або зворотній процес) супроводжується зміною оптичної щільності  $D$  розчину при 340 нм. За певних умов швидкість зміни  $D$  виявляється пропорційною активності ензиму (рис. 3).

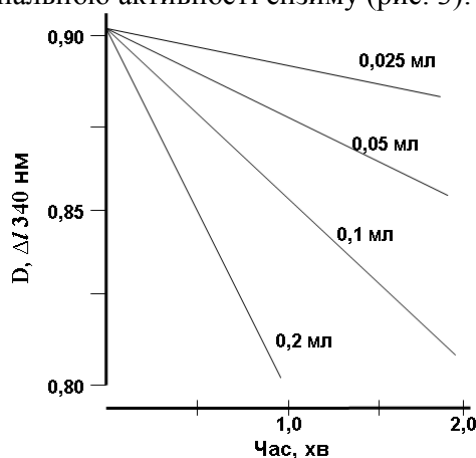


Рис. 3. Принцип вимірювання активності НАДН- або НАДФН-залежної дегідрогенази. Вимірювали швидкість і зміни оптичної щільності при 340 нм, зумовленої перетворенням відновленого коферменту в окиснену форму. У кювету додавали окиснений субстрат (S), відновлений коензим і буфер та реєстрували поглинання при  $\Delta l$  340 нм. Спочатку спостерігали високу оптичну щільність через сильне поглинання НАДН (чи НАДФН). При додаванні 0,025 ...0,2 мл стандартного розчину ензиму оптична щільність знижується.

Для отримання калібрувальної кривої (рис. 4) було побудовано графік залежності швидкості зміни оптичної щільності (нахилу прямих, що показані на рис. 3) від об'єму доданого ензимного препарату. Кількість ензиму, що знаходиться в досліджуваному розчині легко вимірюється за спостереженням швидкості зміни  $D$  при  $\Delta l$  340 (рис. 4).

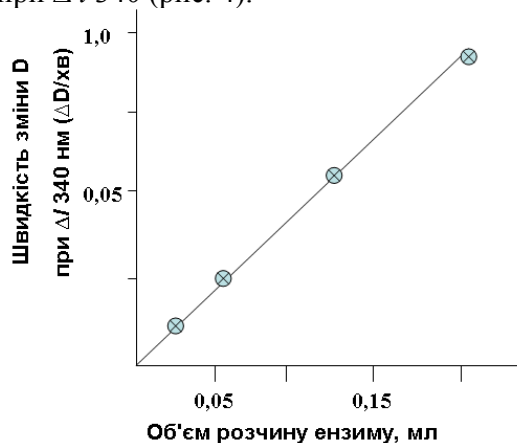


Рис. 4. Калібрувальна крива для визначення кількості ензиму. По осі ординат відкладено тангенс (tg) кута нахилу прямих, що наведені на рис. 3, по осі абсцис – кількість ензиму.

Звідси на конкретному прикладі методично показано оцінку ензимної активності, яка ґрунтується на вимірі швидкості утворення продукту (НАДН). Швидкість утворення продукту (або ж, рідше, швидкість витрачання субстрату S) можна з успіхом використовувати для визначення активності не тільки дегідрогеназ але й інших ензимів. Конкретний метод кількісної оцінки диктується завжди фізико-хімічними властивостями продукту чи субстрату. Тому у багатьох випадках піддають утворений продукт реакції дії тієї дегідрогенази, для якої цей продукт є субстратом.

Вищенаведений класичний методичний підхід дозволив визначити зміни активності ЛДГ у субклітинних фракціях гепатоцитів неонатальних телят за умов аліментарної диспепсії та застосування різних способів лікування.

Як вже згадувалось вище, що лактат під впливом ЛДГ у присутності НАД<sup>+</sup> окиснюється в піруват і тому при найвищій активності лактатдегідрогенази різко знижується рівень лактату та підвищується концентрація пірувату. На це вказують результати наших досліджень і зокрема зміни активності ензиму у компартментах гепатоцитів та рівня лактату й пірувату у тканині печінки, що наведені у таблицях 1 – 3.

Таблиця 1

**Активність ЛДГ у субструктурах гепатоцитів телят за умов норми (К), діареї (Д), традиційного лікування (ТЛ) та при застосуванні БАД LP FLP-MD (M±m; n=5)**

Одиниці активності та виміру різниць	Стан здоров'я телят			
	Норма; контроль (К)	Діарея (Д)	Способи лікування	
			ТЛ	ТЛ+LP FLP-MD
Цитозоль-мікросомальна фракція				
Мікромоль НАДН/хв·мг білка	1,97±0,10	2,89±0,20	2,61±0,11	2,21±0,23
Факт. Різниця до К	–	+0,92	+0,64	+0,24
Різниця у %	–	+46,7	+32,5	+12,2
p	–	<0,001	<0,05	<0,1
Мітохондріальна фракція				
Мікромоль НАДН/хв·мг білка	0,84±0,09	1,58±0,11	1,34±0,13	1,01±0,10
Факт. Різниця до К	–	+0,74	+0,50	+0,17
Різниця у %	–	+88,1	+59,5	+20,2
p	–	<0,001	<0,05	<0,1

Із наведених у табл.1 даних видно, що за умов діареї у цитозоль-мікросомальній фракції гепатоцитів телят другої групи вірогідно зростає активність ЛДГ (на 46,7 %). При традиційному лікуванні (ІІІ група) вона знижується, при додатковому до ТЛ застосуванні БАД суттєво наближається до норми, тобто до рівня, що у відмічається у тварин контрольної (І) групи. Аналогічні зміни відбуваються і у мітохондріальних фракціях клітин печінки телят усіх порівнюваних груп. Цікавим є той факт, що у цитозоль-мікросомальній фракції гепатоцитів здорових телят активність ЛДГ ~ у 2 рази є вищою, ніж у фракції мітохондрій. Це вказує на основне місце локалізації ензиму в клітині. У мітохондріальній фракції активність його очевидно проявляється головним чином за рахунок залишків ензиму, що знаходяться на поверхнях зовнішніх мембран.

Важливо й те, що дані табл. 1 сповна узгоджуються з висновками стосовно закономірностей змін концентрацій лактату й пірувату у тканині печінки телят згаданих груп (табл. 2 і 3). Рівень молочної кислоти в тканині печінки за умов діареї вірогідно знижується (на 48 %). Значне зростання лактату спостерігається при ТЛ. Однак, досягти контрольного рівня цим способом лікування не вдається і тому міжгрупові різниці тут залишаються ще вірогідними.

Таблиця 2

**Концентрація лактату в тканині печінки телят за умов діареї та різних способів лікування (M±m; n=5)**

Одиниці виміру та різниці	Стан здоров'я телят			
	Норма; контроль (К)	Діарея (Д)	Способи лікування	
			ТЛ	ТЛ+LP FLP-MD
Мікромоль /г сирової тканини	12,84±0,92	6,68±1,01	9,08±0,83	11,28±1,11
Факт. Різниці до К	–	–6,16	–3,76	–1,56
Різниці у %	–	–48	–29,3	–12,15
p	–	<0,001	<0,05	>0,5

Таблиця 3

**Концентрація пірувату в тканині печінки телят за умов діареї та різних способів лікування**

Одиниці виміру та різниці	Стан здоров'я телят			
	Норма; контроль (К)	Діарея (Д)	Способи лікування	
			ТЛ	ТЛ+LP FLP-MD
Мікромоль /г сирової тканини	0,28±0,01	0,63±0,09	0,42±0,03	0,34±0,09
Факт. Різниці до К	–	+0,35	+0,14	+0,06
Різниці у %	–	+125	+50	+21
p	–	<0,001	<0,05	>0,5

Слід зазначити, що використання БАД LP FLP-MD у поєднанні з ТЛ наближає концентрацію лактату в тканині печінки телят, які переохворіли діареєю, до рівня контролю. При цьому привертає до себе увагу зовсім інша картина, що спостерігається при визначенні концентрації піровиноградної кислоти в аналогічних варіантах досліджень (табл. 3). Концентрація цього метаболіту в тканині печінки здорових (контрольних) телят є ~ у 45 разів нижчою, ніж молочної кислоти, що вказує на дуже високу інтенсивність його використання порівняно з лактатом. У телят з ентеропатологією, очевидно, процеси утилізації пірувату загальмовуються і його концентрація в тканині печінки зростає на 125 %. ТЛ сприяє зменшенню на 66 % його концентрації порівняно з «діарейними» телятами. Поєднання ТЛ із застосуванням БАД LP FLP-MD майже повертає концентрацію пірувату в тканині до рівня здорових телят.

Наведені результати узгоджуються з даними попередніх досліджень [1 – 5, 7, 8], які свідчать, що пероральне введення упродовж 10 – 16 днів один раз на добу 1%-ого розчину ліпосомальної форми біологічно активної добавки LP FLP-MD у дозі 10 – 20 мг/кг живої маси тварини дозволяє на 75 – 95 % нормалізувати активність багатьох маркерних ензимів і загальний стан обміну речовин в організмі неонатальних телят з аліментарною діареєю. До наведеного доречно додати, що для більшості організмів при відсутності кисню деградація глюкози

до пірувату – це єдина можливість отримання енергії для синтезу АТФ. А для підтримки процесів гліколізу і синтезу АТФ утворений НАДН повинен постійно окиснюватися до НАД<sup>+</sup>. Ці процеси у клітинах еукаріотів завжди пов'язані з відновленням пірувату до лактату [6].

#### **Висновки:**

1. Виявлено чіткі зміни активності ЛДГ у субструктурах гепатоцитів неонатальних телят за умов діареї, традиційного лікування і поєднання останнього із застосуванням БАД LP FLP-MD.

2. Реакції, які каталізуються ЛДГ головним чином локалізовані у цитозоль-мікросомальній фракції клітин печінки.

3. За умов діареї активність ЛДГ вірогідно зростає в обох субструктурах. Традиційне лікування суттєво знижує її каталітичну дію. Комплексне застосування ТЛ із БАД LP FLP-MD дозволяє майже наблизити активність ЛДГ до норми.

4. За умов діареї в 2 рази знижується рівень лактату та на стільки ж підвищується концентрація пірувату в тканині. Традиційне лікування і особливо поєднання його із застосуванням БАД LP FLP-MD вірогідно нормалізують вміст вказаних метаболітів.

#### **Література**

1. Використання ліпосом на основі фосфоліпідів молока у гепатології / Д.О. Мельничук, В.А. Грищенко, В.А. Томчук, Л.Г. Калачнюк, Г.І. Калачнюк, С.В. Хижняк, В.М. Войцицький, С.П. Весельський, О.М. Литвиненко // Монографія. Під загальною редакцією академіка НАН та НААН України Д.О. Мельничука. – К.: НУБіПУ, 2010. – 400 с.

2. Калачнюк М., Басараб І., Калачнюк Г. 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: ЛНУ імені І. Франка – 2011. – С. 50 – 51.

3. Калачнюк Г.І., Басараб І.М., Калачнюк Л.Г. Активність маркерних ензимів в гепатоцитах неонатальних телят с ентеропатологией и при использовании липосом на основе фосфолипидов молока // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. Приложение №37. – Т. XXI, № 1. – С. 249.

4. Структурно-функціональні зрушення в ліпідах гепатоцитів і крові неонатальних телят за діареї та лікувальної дії ліпосом на основі фосфоліпідів молока / Калачнюк Л.Г., Басараб І.М., Мельничук Д.О., Мельничук С.Д., Калачнюк Г.І. // Наук. вісник ЛНУВМтаБТ ім. С.З. Гжицького, Львів, 2011. –Т.13, №2 (48), Ч.1. – С.383 – 390.

5. Калачнюк Л.Г., Мельничук Д.О., Калачнюк Г.І. Регуляція метаболізму жирних кислот та інших ліпідних сполук у жуйних тварин // Укр. біохім. журн. 2007. Т.79, №1. – С. 22 –45.

6. Кульман Я., Рём К.-Г. Наглядная биохимия. – М.: Мир; БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 469 с.

7. Срога М., Басараб І., Калачнюк Л. Корекція активності амінотрансфераз у компартментах клітин печінки неонатальних телят // Збірник тез. VII

Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (5-8 квітня 2011). Львів –ЛНУ імені І. Франка, 2011. – С. 74 – 75.

8. Yakymchuk I.S., Basarab I.M., Kalachnyuk L.G., Kalachnyuk G.I. Plural spectrum of molecular isoforms of LDH in the hepatic cells of newborn calves with digestive disorders // 36. пр. Міжнар. науково-практ. конф. молодих вчених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді у вирішенні актуальних проблем виробництва та переробки сировини, стандартизації і безпеки продовольства». 20 – 22 квітня 2011 р.. – Київ: НУБіП України. – С. 376.

#### Summary

**L. Kalachnyuk<sup>1</sup>, I. Basarab<sup>1,3</sup>, D. Mel'nychuk<sup>1</sup>, S. Mel'nychuk<sup>1</sup>,  
M. Kalachnyuk<sup>1</sup>, O. Koshman<sup>1</sup>, G. Kalachnyuk<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine,  
Heroyiv Oborony st. 15, Kyiv 03041, Ukraine

<sup>2</sup>L'viv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies named after S.Z. Gzhytskyi, Pekarska st. 50, L'viv 79010, Ukraine;

<sup>3</sup>Institute of Animal Physiology and Genetics, Czech Academy of Sciences, Prague,  
Czech Republic

#### **OXIDATION OF LACTATE AND LDH LOCALIZATION IN THE SUBSTRUCTURES OF CELL UNDER EFFECT OF EXOGENOUS FACTORS**

*It has been presented classic methodical techniques of fundamental study of peculiarities of oxido-reduction processes in the hepatic cell at stage of formation and utilization of the glycolysis end-products – lactate and pyruvate under the different conditions of experimental investigations.*

*It has been shown clear changes of lactate dehydrogenase (LDH) activity in cytosol-microsomal and mitochondrial fractions of hepatocytes of neonatal calves under conditions of diarrhea («Д»), reparative therapy of sick animals according 2 plans [(a) dyspepsia treatment plan (DTP) and (b) complex treatment plan: DTP + biologically active supplement, which is contained essential phospholipids of milk in liposomal form (LP FLP-MD)]. It was discovered that reactions, which are catalyzed by enzyme, mainly are localized in the cytosol-microsomal fraction of hepatic cell. Under conditions «Д», LDH activity is significantly increased. DTP decreases substantially its catalytic action. Complex treatment plan (DTP + LP FLP-MD) permits almost move nearer LDH activity to norm in the studied compartments of hepatocytes. Under conditions of diarrhea, in the hepatic tissue, it was observed decrease of lactate level in 2 times and increase of pyruvate concentration in 2 times. DTP and complex treatment plan normalize significantly content of these important metabolites in the cell.*

*Generally, state of processes of lactate oxidation into pyruvate and reversible reaction catalyzed by LDH in the substructures of hepatic cell in the neonatal calves with diarrhea are come to norm under conditions of complex treatment plan.*

**Key words:** *lactate, pyruvate, lactate dehydrogenase, cytosol-microsomal and mitochondrial fractions of hepatocytes, neonatal calves, diarrhea, dyspepsia treatment plan, milk liposomes.*

Рецензент – д.с.-г.н., проф., чл.-кор. НААНУ Кирилів Я.І.