

УДК 577.112:577.152.1:636.2:616.34

Калачнюк Л.Г., д.б.н., доцент

Національний університет біоресурсів і природокористування України

ВІДНОВЛЕННЯ АКТИВНОСТІ ЕНЗИМІВ ЦТК У ПОШКОДЖЕНИХ ГЕПАТОЦИТАХ

Проведено дослідження активності ензимів, відповідальних за початкову і завершальні стадії циклу три карбонових кислот (ЦТК) у гепатоцитах пошкоджених факторами порушення травної системи (ПТС) новонароджених телят за умов традиційного лікування (ТЛ) і додаткового застосування біологічно активної добавки у ліпосомальній формі (БАД FLP-MD). Показано, що під впливом споживання нової фосфоліпідвмісної добавки на тлі ТЛ вірогідно зростає активність першого ензиму початкової стадії функціонування ЦТК - цитратсинтази (CS) у клітинах печінки новонароджених телят з ПТС. Посилення активності CS, очевидно, дає позитивний поштовх до прискорення подій всього потоку перетворень проміжних сполук у ЦТК, що підтверджується значним зростанням активності ензиму його завершальної стадії - цитохром-с-оксидази (СОХ) та величини співвідношення СОХ: CS.

Встановлено, що за застосування БАД LP FLP-MD спостерігається відновлення активності ензимів ЦТК у пошкоджених гепатоцитах.

Ключові слова: цикл трикарбонових кислот, цитратсинтаза, цитохром-с-оксидаза, фосфоліпідвмісні комплекси, гепатоцити, неонатальні телята, система травлення..

Значні порушення у функціонуванні реакцій анаеробного гліколітичного шляху і, зокрема, на заключній його стадії при утворенні пірвіноградної і молочної кислот, були виявлені у гепатоцитах неонатальних телят за умов порушення травної системи. Подальші дослідження показали, що за цих же умов у клітинах печінки вірогідно знижується активність цитратсинтази (КФ 4.1.3.7), яка каталізує початкову стадію функціонування ЦТК, і, отже, змінює швидкість та обсяги утворення в ньому багатьох важливих інтермедіатів. За умов ПТС також вірогідно знижується і активність цитохром-с-оксидази (КФ 1.9.3.1), тобто інгібується ще заключна стадія окиснення-відновлення електронами молекулярного кисню. Отримані дані дають підстави пояснювати такі зміни у гліколітичному шляху та в ЦТК дефіцитом надходжень поживних речовин із шлунково-кишкового тракту, нестачою біологічно активних речовин (БАР) й будівельного матеріалу, передусім, для мембран клітин печінки та інших органів травної системи. Звідси впливає потреба у проведенні нових досліджень, у яких будуть використані екзогенні регулятори й необхідні джерела компонентів структурно-функціонального призначення. Окремий фрагмент таких досліджень наведено у цій статті.

Матеріали і методи. Для дослідження використовували 1-7-добових новонароджених телят, яких за принципом аналогів (рівнозначні за віком, породою, статтю, вагою) розділяли на дві групи (n=5) з масою тіла 28-36 кг. Телята першої (I, контрольної або К) групи були з порушеннями травної системи аліментарного походження і піддавалися традиційному лікуванню, а другої (II, дослідної або Д) - із такими ж ПТС та ТЛ, але додатково одержували *per os* фосфоліпідвмісну біологічно активну добавку в ліпосомальній формі - БАД LP FLP-MD у дозі 10-20 мг / кг живої маси упродовж 10-15 днів після народження тварин. Про склад і характеристику вказаної добавки було описано у попередніх роботах [1-9].

Активність CS і COX визначали за загальноприйнятими методами [11, 12]. Активність CS у оброблених ультразвуком гомогенатах печінки визначали шляхом вимірювання початкової швидкості (V_0) реакції при 412 нм за методом фіксації ДТНБ-5,5'-дитіобіс (2-нітробензоату) [11]. Реакційна суміш містила 0,2 мМ ДТНБ, 50 мкМ ацетил-КоА, 100 мМ тріс-НСІ (рН 8,1), 100 мкМ оксалоацетату, об'єм проби становив 1 мл. Реакцію проводили при 25 °С й ініціювали її додаванням оксалоацетату.

Активність COX вимірювали у заморожено-розморожених оброблених ультразвуком гомогенатах при 25 °С згідно з методикою [12] із 90 мкМ відновленого цитохрому с як субстрату і 50 мМ K_2HPO_4 (рН 7,4). Початкову швидкість обчислювали за формулою $V_0=k \cdot [S]$, у якій стала першого порядку k була визначена експериментально; концентрація субстрату [S] становила 90 мкМ. За одиницю активності CS і COX прийнято ту кількість ензиму, яка за умов експерименту каталізувала виділення 1 мкмоль коензиму А або окиснення 1 мкмоль цитохрому с відповідно за 1 хв при 25 °С. Питомі активності виражено в одиницях на 1 г тканини сирі маси (U/г сирі тканини).

Вміст білка визначали за Лоурі та ін. [10] з використанням у якості стандарту альбуміну сироватки крові бика. Статистичне опрацювання отриманих цифрових даних виконували за допомогою програми Microcal Origin (Version: 5,0) з використанням критерію Стюдента «t».

Результати і обговорення. Отримані результати наведено на рис. 1 -3.

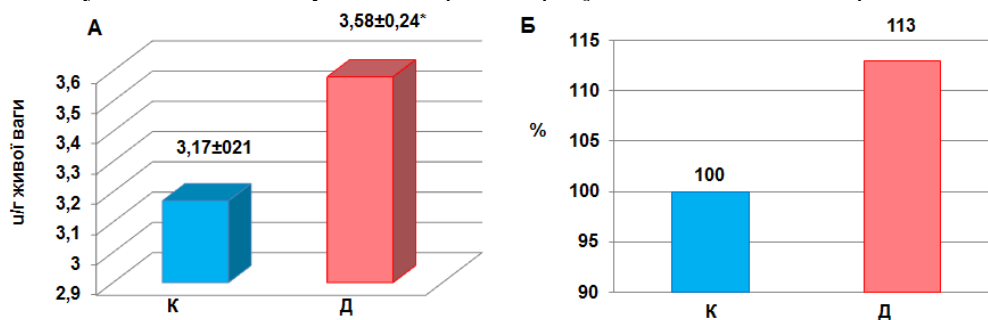


Рис. 1. Активність CS [U/г сирі тканини (А) і в % (Б)] у клітинах печінки новонароджених телят за умов ПТС і ТЛ (К), а також з додатковим використанням БАД LP FLP-MD (Д) ($M \pm m$; n=5); *P<0,05 вірогідність у порівнянні з К.

Із даних рис. 1 видно, що в новонароджених телят за умов ПТС при ТЛ та додатковому використанні БАД FLP-MD (Д) активність CS зростає на 0,41 у/г сирової тканини (А) або на 13 % (Б).

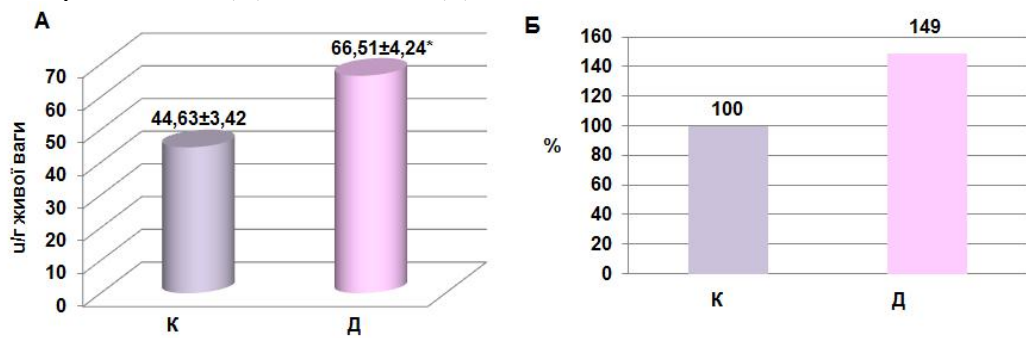


Рис. 2. Активність COX [у/г сирової тканини (А) і в % (Б)] у клітинах печінки новонароджених телят за умов ПТС і ТЛ (К), а також з додатковим використанням БАД LP FLP-MD (Д) ($M \pm m$; $n=5$); * $P < 0,001$ вірогідність у порівнянні з К.

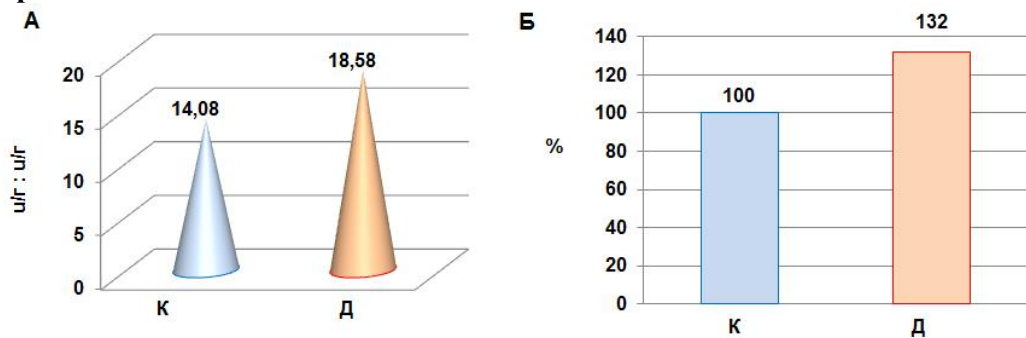


Рис. 3. Величини співвідношень активностей COX:CS [у/г сирової тканини (А) і в % (Б)] у клітинах печінки залежно від способу лікування новонароджених телят за умов ПТС і ТЛ, а також з додатковим використанням БАД FLP-MD (Д).

За вказаних умов активність COX (рис. 2) також зростає, але ще більше (майже на 50 %). Залежно від способу лікування суттєво змінюються і величини співвідношення активностей ензимів COX:CS (рис. 3). Виявлені зміни чітко вказують на значну стимулюючу дію біологічно активної добавки LP FLP-MD щодо активності ключових ензимів ЦТК. Передусім наведені результати свідчать про вірогідну активацію початкової реакції циклу, тобто про посилення процесу конденсації ацетил-КоА із щавлево-оцтовою кислотою. І це безумовно сприяє збільшенню продукції цитрату та утворенню наступних інтермедіатів. Такий висновок підтверджується вірогідним зростанням активності COX, що віддзеркалює посилення всього потоку перетворень у ЦТК. Адже цей ензим разом з O_2 є кінцевим пунктом доставки електронів, які надходять від окиснення поживних речовин. Він також спрямовує транспорт протонів через внутрішню мембрану. Отже, цей ензимний комплекс здійснює заключну стадію біологічного окиснення-відновлення електронами

молекулярного кисню. Взагалі функції ензимів циклу трикарбонових кислот залежать від багатьох факторів і, зокрема, від обсягів окиснення жирних кислот (ЖК) та цілісності внутрішніх і зовнішніх мембран гепатоцитів. Очевидно, використання екзогенних фосфоліпідвмісних комплексів і есенціальних ЖК та вітаміну Е, які є у їхньому складі, суттєво сприяє відновленню активності ензимів ЦТК пошкоджених клітин печінки новонароджених телят з виразними проявами ПТС.

Висновки:

1. Виявлено, що під впливом споживання БАД LP FLP-MD вірогідно зростає активність першого ензиму в функціонуванні ЦТК (цитратсинтази) у клітинах печінки новонароджених телят з порушеннями травної системи

2. Посилення активності CS, очевидно, дає позитивний поштовх до прискорення подій всього потоку перетворень у ЦТК, на що вказує значне зростання активності COX та величини співвідношення COX : CS.

3. Встановлено, що застосування БАД LP FLP-MD дозволяє відновлювати активність ензимів ЦТК у пошкоджених гепатоцитах.

Література

1. Активність мітохондріальних ензимів у разі порушень ліпідного метаболізму в гепатоцитах / Л. Калачнюк, Д. Мельничук, Г. Калачнюк // Вісник Львівського університету. Серія Біол. 2005. – Вип. 39. – С.40-46.

2. 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.

3. Роль кінцевої реакції анаеробного гліколізу в молекулярних механізмах регуляції обмінних процесів у гепатоцитах неонатальних телят за діареї / М.С. Калачнюк, І.М. Басараб, Л.Г. Калачнюк [та ін.] // Біологія тварин. – 2012. – Т.14, № 1-2. – С. 121-127.

4. Окиснення лактату та локалізація ЛДГ у субструктурах клітини за умов дії екзогенних факторів / Л.Г.Калачнюк, І.М. Басараб, Д.О. Мельничук [та ін.] // Науковий вісник ЛНУВМтаБТ ім. С.З. Гжицького, 2011. –Т.13, №4(50), Ч.2 – С.80–86.

5. Ізозим ЛДГ₅(M₄ – γ₂) – ключовий молекулярний маркер пошкодження субструктур гепатоцитів у новонароджених телят за аліментарної діареї / Л.Г.Калачнюк, І.М. Басараб, Д.О. Мельничук [та ін.] // Науковий вісник ЛНУВМтаБТ ім. С.З. Гжицького, 2012. Т. 14, № 2 (52), Ч. 2– С.39 – 44.

6. Biochemistry / J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer. - New York, W H Freeman Publ., 2002. - 1515 p.

7. Peculiarities of molecular-structural changes in lipid components of hepatocytes in neonatal calves with enteropatologies / L. Kalachnyuk, D. Mel'nychuk, G. Kalachnyuk // Abstract book, First (Inaugural) Ukrainian Congress for Cell Biology, Lviv, April 25-28, 2004. - P.271.

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

9. Використання ліпосом на основі фосфоліпідів молока у гепатології / Д.О. Мельничук, В.А. Грищенко, В.А. Томчук, Л.Г. Калачнюк, Г.І. Калачнюк

[та ін.] // Монографія. Під загальною редакцією академіка НАНУ та НААНУ Д.О. Мельничука. – К., 2010. – 428 с.

10. 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, no. 1. - P. 265-275.

11. Citrate synthase from rat liver / D. Shepherd, P.B. Garland // Meth. Enzymol. - 1969. - Vol. 13. - P. 11-13.

12. A study of the kinetics of the oxidation of cytochrome-c by cytochrome-c oxidase / L. Smith, H. Conrade // Arch. Biochem. Biophys. - 1956. - Vol. 63. - P. 403-413.

Summary

L. Kalachnyuk

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Heroyiv Oborony st. 15, Kyiv 03041, Ukraine

RECOVERY OF THE TCA CYCLE ENZYMES ACTIVITY IN DAMAGED HEPATOCYTES

It has been performed research of activity of the enzymes which are responsible for the initial and final stages of the tricarboxylic acid (TCA) cycle in hepatocytes damaged by factors of breach of the digestive system (BDS) in newborn calves under conditions of conventional treatment (CT) and the additional use of dietary supplements.

It has been shown that under the influence of consumption of the phospholipid-containing additives in liposomal form at the shadow of CT, activity of the first enzyme of the initial stage of functioning the TCA cycle - citrate synthase (CS) in the liver cells of newborn calves with BDS. Obviously, increase of CS activity gives a positive impetus to accelerate the flow of events of all transformations of intermediates in the TCA cycle, as evidenced by a significant increase in enzyme activity of its final stage - cytochrome-c oxidase (COX) and the value of the ratio of COX: CS.

Found that under conditions of the use of dietary supplements LP FLP-MD, it is observed restore of activity of enzymes of the TCA cycle in the damaged hepatocytes.

Key words: *the tricarboxylic acid cycle, citrate synthase, cytochrome-c oxidase, the phospholipid-containing additives, hepatocytes, newborn calves, the digestive system.*

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