

6. Морфо-функциональное состояние эритроцитов, криоконсервированных с глицерином и поливинилпирролидоном, на протяжении 5 дней хранения при 4 ± 2 °C / М.М. Петров, О.В. Кушко, Л.Н. Блоцкая [и др.] // Криобиология и криомедицина. – 1980. – Вып. 6. – С. 50-53.
7. Bessis M. Living Blood cells and their Ultrastructure.- Berlin: Springer-1973.
8. Christopher M , Lee SE . Red cell morphologic alterations in cats with hepatic disease // Vet Clin Pathol. - 1994; 23 : P. 7–12.
9. Jaroszynski W. Effect of hydroxyethyl starch (HAES) on degree and kinetics of erythrocyte aggregation studied with dielectric spectroscopy method / Jaroszynski W., Keslinka E., Wujtewicz M. // Med Sei Monit. - 2002; 8 (7). - P.272-278.
10. Jay A. W. Geometry of the human erythrocyte. I. Effect of albumin on cell geometry // Biophys. J. – 1975, V. 15(3). - P. 205-222.
11. Kim H. A comparative study of the effects of glycerol and hydroxyethyl starch in canine red blood cell cryopreservation / Kim H., Tanaka S., Une S. Y. // J Vet Med Sci. 2004 Dec; 66(12):1543-1547.

MORFOLOGICAL CHANGES OF ERYTHROCYTES CATS AND DOGS ON THE STAGES CRYOPRESERVATION

Pervushina O.A.*, post graduate student, Zhegunov G. F.*, sc.D. professor,
Pashomova.U** candidate boil.science

*Kharkiv State Zooveterinary Academy, Kharkiv, Ukraine

**Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine

Summary. Morphological changes erythrocytes dogs and cats before and after freeze-thawing of cryoprotective solutions containing 10% DMSO, 17.5% of HES and 7.5% glycerol +12.5% HES has been studied by light microscopy. It was shown, that the dog erythrocytes after freezing-thawing under the influence of DMSO transformed into sferohinotsity and erythrocytes cats - in echinocytes. Solutions HES and 7.5% glycerol + 12.5% HES after thawed and washed cause erythrocytes formation of deformed cells of irregular shape.

Key words: red blood cells, hemolysis, dimethyl sulfoxide, hydroxyethyl starch, cryopreservation, morphology, transformation.

УДК: 636.52/. 58.087:612.74:577.124

КЛЮЧОВІ ФЕРМЕНТИ ГЛІКОЛІЗУ ТА РЕГУЛЯЦІЯ ЇХ АКТИВНОСТІ

Приходченко В.О., к.с.-г.н., доцент, vita.prihodchenko@mail.ru
Харківська державна зооветеринарна академія, м. Харків

Анотація. У статті наведені літературні данні про характеристики інтенсивності протікання гліколізу та його координація зі швидкостями інших метаболічних процесів, у першу чергу гліуконеогенезу та циклу трикарбонових кислот, а також значення анаеробного окиснення для продуктивності сільськогосподарських тварин.

Ключевые слова: гліколіз, фосфофруктокіназа, альдолаза.

Основним катаболітичним процесом деструкції глюкози в клітинах тварин та птиці є послідовність ряду реакцій її окиснення, у результаті яких в анаеробних умовах глюкоза перетворюється на лактат, а в аеробних – на кінцеві продукти CO_2 та воду. Біологічною значимістю окисних перетворень глюкози є виділення енергії, яка здатна трансформуватися в хімічну енергію молекул АТФ, у тому числі за анаеробних умов, а також утворення в процесі катаболізму глюкози проміжних метаболітів, які використовуються клітинами як структурні попередники для синтезу амінокислот, стероїдів, азотистих основ, ліпідів тощо [4, 7].

Гліколіз – це послідовність десяти ферментативних реакцій, за результатом яких в аеробних умовах глюкоза розпадається до двох молекул пірувату (аеробний гліколіз), а в анаеробних – до двох молекул лактату (анаеробний гліколіз).

Розділ на анаеробний та аеробний гліколіз є умовним, оскільки реакції гліколізу в присутності та відсутності кисню є однаковими. Різниця лише в їх швидкості та кінцевих продуктах. При нестачі кисню реокиснення НАДН, що утворився у ході гліколізу, відбувається шляхом спряження

з відновленням пірувату до лактату, проте в аеробних умовах НАДН окиснюється в ході оксигензалежного процесу окисного фосфорилування з утворенням великої кількості АТФ.

За анаеробних умов гліколіз – єдиний процес в організмі тварин і птиці, який призводить до утворення АТФ, тобто енергії для здійснення фізіологічних функцій організму [8, 10]. Гліколіз дозволяє підтримувати роботу скелетних м'язів в умовах гіпоксії. Інтенсивний гліколіз відбувається в скелетних м'язах, де використовується енергія для м'язових скорочень, а також у печінці, серці, мозку тварин і людини.

Процес гліколізу умовно можна розділити на два етапи. Перший етап, що протікає з затратою енергії у вигляді 2 молекул АТФ, полягає в розщепленні молекули глюкози на 2 молекули тріоз (гліцеральдегід-3-фосфату та діоксиацетонфосфату). На другому етапі відбувається НАД-залежне окиснення гліцеральдегіду, що супроводжується синтезом АТФ. Окисно-відновний цикл гліколізу закінчується відновленням пірувату. Ця кетокислота займає центральне місце у перетворенні вуглеводів та бере участь в обміні амінокислот в якості субстрату трансамінування [6].

У м'язовій тканині гліколітичний процес починається з фосфорилування глікогену і утворення глюкозо-1-фосфату, що називається глікогенолізом.

Швидкість гліколізу та його координація зі швидкостями інших метаболічних процесів, у першу чергу глюконеогенезу та циклу трикарбонних кислот, забезпечується дією різних регуляторних механізмів. Загальна швидкість гліколізу визначається доступністю субстрату, використанням АТФ та концентрацією ферментів гліколізу. Суттєву роль у регуляції швидкості гліколізу на рівні ферментів відіграють три практично незворотні реакції гліколізу. Найбільш важливим лімітуючим швидкість гліколізу ферментом є фосфофруктокіназа, активність якої інгібується АТФ, НАДН, цитратом та жирними кислотами, а стимулюється АДФ та АМФ. Інтенсивність перебігу фосфофруктокіназної реакції вирішальним чином позначається на всій пропускну здатності гліколізу, а стимуляція фосфофруктокінази вважається найважливішим етапом регуляції [7]. Активності гексокінази та піруваткінази також регулюються (по принципу зворотнього зв'язку) АДФ, АТФ, проміжними продуктами гліколізу та циклу трикарбонних кислот.

У тварин і птиці в регуляції гліколізу приймають участь гормони. Так, інсулін здійснює контроль за гліколізом на генетичному рівні і є індуктором утворення ключових ферментів гліколізу (гексокінази, фосфофруктокінази, піруваткінази) та репресором синтезу ферментів глюконеогенезу. Протилежну дію мають катехоламіни, глюкагон, адренкортикотропний гормон (у печінці) та паратгормон (у нирках).

В клітинах здійснюється тонка регуляція окисного і анаеробного обміну. Пригнічення гліколізу процесами тканинного дихання за наявності O_2 (ефект Пастера) забезпечує для клітини найбільш економний механізм утворення багатих енергією сполук. У тканинах, де такий ефект відсутній (в ембріональних і пухлинних), гліколіз відбувається дуже активно. В деяких тканинах з інтенсивним гліколізом спостерігається пригнічення тканинного дихання (ефект Крабтрі).

Висока активність ферментів гліколізу у молодих тварин свідчить про те, що на ранніх етапах онтогенезу в енергетиці печінки значне місце займає гліколіз, як джерело енергії та субстратів неосинтезу [1]. Зниження активності ферменту гліколізу лактатдегідрогенази від двотижневого до трьохмісячного віку у курчат яєчного напрямку продуктивності вказує на посилення в цьому віці ролі тканинного дихання, тоді як у віці двох тижнів домінує гліколіз [2, 5].

За даними Карпова Л. М. [3] при старінні організму знижується інтенсивність дихання багатьох тканин, при чому не тільки окиснення, але й фосфорилування, в клітинах зменшується кількість мітохондрій і це обмежує можливість клітини утворювати макроергічні сполуки. Поряд з пригніченням тканинного дихання у деяких тканинах підвищується інтенсивність гліколізу.

Фосфофруктокіназа – регулятор гліколізу. Фосфофруктокіназа (ФФК), систематична назва: Д-фруктозо-6-фосфат-1-фосфотрансфераза (КФ 2.7.1.11). Цей фермент каталізує перетворення фруктозо-6-фосфату у фруктозо-1,6-дифосфат. Ця реакція відбувається в присутності іонів Mg^{2+} , необхідних для утворення істинного субстрату, тобто $MgATP^{2-}$.

ФФК відноситься до алостеричних, або регуляторних ферментів. Вона має досить високу молекулярну масу (~360000). Це тетрамерний фермент, який існує в двох конформаційних станах, що знаходяться в рівновазі і по черзі переходять з одного в інший. У кожній із субодиниць ФФК існує по два центри зв'язування АТФ: субстратний центр і центр інгібування. Субстратний центр однаково здатний приєднувати АТФ за будь-якої конформації тетрамеру. Тоді як центр інгібування зв'язує АТФ виключно тоді, коли фермент знаходиться в конформаційному стані.

Активність ФФК регулюється декількома алостеричними модуляторами. У печінці основним регулятором ФФК є фруктозо-2,6-дифосфат. За його нормальної концентрації швидкість гліколізу висока, а глюконеогенез загальмований. В м'язах концентрація фруктозо-2,6-дифосфату низька, і тут він, як вважають, не відіграє головної регулюючої ролі. Концентрація фруктозо-2,6-дифосфату в

печінці при гіпоксії зменшується, і метаболізм гепатоцитів направлений, таким чином, у бік глюконеогенезу. Ця адаптивна реакція сприяє поглинанню та утилізації лактату в умовах, коли прискорюється його утворення поза печінкою. Скорочення м'язів активує розпад глікогену і продукцію молочної кислоти, але концентрація фруктозо-2,6-дифосфату при скороченні знижується. Це підтверджує точку зору про те, що активність ФФК і гліколіз у м'язах регулюються співвідношенням АТФ/АМФ, а не фруктозо-2,6-дифосфатом [7]. Збільшення співвідношення АТФ/АМФ призводить до пригнічення активності ФФК. Так, у м'язі, який не працює концентрація АТФ відносно висока і гліколіз загальмований. Під час праці АТФ витрачається і активність ФФК підвищується, отже, процес гліколізу активується.

Вікова динаміка показників енергетичного обміну, також як і зміни співвідношення між анаеробним та аеробним шляхами вивільнення енергії на різних етапах розвитку, пов'язана з онтогенетичними змінами активності та ізоферментного спектру багатьох форм ферментів, що приймають участь у процесах гліколізу та дихання [4, 9].

У ранній період постембріонального росту і розвитку м'ясних курчат [2], потреба кисню в клітинах печінки та грудних м'язів була максимальною, потім зменшувалась. У зрізах печінки зменшувалась потреба кисню на 41,3 % з 10 по 63 добу розвитку курчат. Максимальна гліколітична активність спостерігалася на 10 добу, причому загальний її рівень був нижчим, ніж у грудних м'язах. Таким чином, у печінці превалує, в основному, аеробний тип окиснення субстратів, у той час як для грудних м'язів є характерним аеробний і анаеробний шляхи окиснення.

Механізм дії гліколітичного ферменту – альдолази. Альдолаза (Д-фруктозо-1,6-дифосфат-Д-гліцераальдегід-3-фосфат-ліаза (КФ 4.1.2.7)) фермент класу ліаз, що каталізує розщеплення фруктозо-1,6-дифосфату на дві фосфотріози: диоксиацетонфосфат та гліцераальдегід-3-фосфат. Такий розпад молекули гексози називається дихотомією (dicho – розділ на двоє, tome – різати, грец.). Тому гліколіз ще називають дихотомічним шляхом обміну вуглеводів [4].

Фосфотріози можуть перетворюватися одна на одну за допомогою тріозофосфатізомерази. Хоча рівновага цієї реакції направлена в бік утворення диоксиацетонфосфату, у гліколітичному шляху окиснюється гліцераальдегід-3-фосфат, що дає змогу при подальшому обговоренні вважати результатом дихотомічного етапу гліколізу утворення двох молекул гліцераальдегід-3-фосфату.

Молекули альдолази класу I складаються з чотирьох субодиниць однакової молекулярної маси (по 30-40 тис.). Проявляють оптимальну каталітичну активність при рН 7,0-9,0; інактивуються NaN_4 . Для різних альдолаз визначена первинна структура. Найбільш вивчений і поширений представник – фруктозо-1,6-дифосфат-альдолаза, яка в одній із реакцій гліколізу каталізує розщеплення по однакової схемі фруктозо-1,6-дифосфату і фруктозо-1-фосфату.

У зворотній реакції фермент проявляє абсолютну специфічність тільки відносно дигідроксиацетонфосфату. На проміжній стадії субстрат утворює Шиффову основу з ϵ -аміногрупою лізину, що знаходиться в активному центрі. Альдолаза втрачає активність при модифікації не менше 11 залишків цистеїну з 32.

Альдолази класу I знаходяться в тканинах тварин, вищих рослин, а також у деяких видів бактерій (наприклад, *Pertococcus aegogenes*). Тканини ссавців містять три ізоферменти фруктозо-1,6-дифосфат-альдолази (відрізняються будовою молекули), характерних для скелетних м'язів, печінки або мозку. При злоякісному переродженні печінки в ній відбувається заміна власного ізоферменту на інший, що використовується для діагностичних цілей.

Молекули альдолази класу II складаються з двох субодиниць загальною молекулярною масою 65-80 тис. Для них характерна вузька область рН, в якій вони проявляють оптимальну каталітичну активність; оптимальне рН істотно залежить від того, з якого організму виділений фермент. Для прояву каталітичних властивостей необхідна присутність іонів Zn^{2+} , Ca^{2+} та Fe^{2+} . Іони K^+ активують, а етилендіамінтетраоцтова кислота інгібує активність цих ферментів. Альдолази класу II не каталізують розщеплення фруктозо-1-фосфату. Містяться в дріжджах, грибах, бактеріях і водоростях.

За відсутності в організмі певних типів альдолаз розвивається спадкове захворювання – непереносимість фруктози.

Вікові зміни реакцій окисної системи тварин і птиці характеризуються поступовим зменшенням активності ферментів гліколітичного шляху вивільнення енергії та посиленням процесів аеробного окиснення, як більш ефективного [3, 9].

Висновки

1. Інтенсивність окисних процесів анаеробного типу в м'язах птиці зростає залежно від віку.
2. Активність ключових ферментів гліколізу в білих м'язах вище, ніж у червоних, що обумовлено різною функціональною активністю м'язових волокон.

Література

1. Влияние биологически активных веществ на энергетический обмен у цыплят / В. А. Лукичева, Р. Х. Кармолиев, В. М. Севастьянова [и др.] // *Вопр. физ.-хим. биологии в ветеринарии*. – М., 1997. – С. 25–28.
2. Иванченко И. М. Активность некоторых ферментов тканевого дыхания и энергетические процессы в печени мясных кур и цыплят в связи с возрастом и факторами питания: дис.... канд. биол. наук : 03.00.04 / Ирина Михайловна Иванченко. – Х., 1994. – 175 с.
3. Карпов Л. М. Возрастные изменения энергетических показателей у крыс и их коррекция комплексом витаминов группы В / Л. М. Карпов, Н. В. Полтавцева, Л. Г. Савлучинская // *Биологические механизмы старения : VII международный симпозиум*. – Х. : Харк. нац. ун-т им. В. Н. Каразина, 2006. – С. 50.
4. Кнорре Д. Г. Биологическая химия / Д. Г. Кнорре, С. Д. Мызина. – М.: Высшая школа, 2003. – 478 с.
5. Коршунова Л. Г. Окислительное фосфорилирование митохондрий печени цыплят и кур / Л. Г. Коршунова, И. В. Журавлев // *Митохондрии*. – М.: Наука, 1981. – С. 65–66.
6. Коферментзависимые ферменты и старение / Л. М. Карпов, Л. Г. Савлучинская, Н. Л. Федоренко [и др.] // *Биологические механизмы старения: V международный симпозиум*. – Х.: Харк. нац. ун-т им. В. Н. Каразина, 2002. – С. 32.
7. Коэн Ф. Регуляция ферментативной активности / Коэн Ф. – М.: Мир, 1986. – 144 с.
8. Рябов Г. А. Гипоксия критических состояний / Рябов Г. А. – М.: Медицина. – 1992. – 288 с.
1. 9. Скулачев В. П. Эволюция биологических механизмов запасаения энергии / *Соросовский образовательный журнал*. – 1997. – №5. – С. 11–19.
9. Ткаченко В. П. Влияние различных видов денервации на трофику скелетной мышцы / В. П. Ткаченко, В. В. Колдунов // *Вопросы медицинской химии*. – 2001. – № 1. – С. 15.

КЛЮЧЕВЫЕ ФЕРМЕНТЫ ГЛИКОЛИЗ И РЕГУЛЯЦИЯ ИХ АКТИВНОСТИ

Приходченко В.А., к.с.-х.н., доцент, vita.prihodchenko@mail.ru

Харьковская государственная зооветеринарная академия, г. Харьков

Аннотация. В статье приведены литературные данные о характеристиках интенсивности протекания гликолиза и его координация со скоростями других метаболических процессов, в первую очередь глюконеогенеза и цикла трикарбоновых кислот, а также значение анаэробного окисления для продуктивности сельскохозяйственных животных.

Ключевые слова: гликолиз, фосфофруктокиназа, альдолаза.

THE MAINE ENZYMES OF GLYCOLYSIS AND REGULATION OF THEIR ACTIVITY

Prihodchenko V.O., vita.prihodchenko@mail.ru

Kharkov State Zooveterinary Academy, Kharkov

Summary. The article presents the literature data on the characteristics of the flow intensity of glycolysis and its coordination at speeds other metabolic processes, especially gluconeogenesis and tricarboxylic acid cycle and the importance of anaerobic oxidation performance for farm animals.

Key words: glycolis, aldolase, phosfofruktokinise.