

МОЛЕКУЛЯРНІ ІЗОФОРМИ ТА АКТИВНІСТЬ ЛАКТАТДЕГІДРОГЕНАЗИ У СУБСТРУКТУРАХ КЛІТИНИ ЗА ДІЇ ЕКЗОГЕННИХ ФАКТОРІВ

Л. Г. Калачнюк¹, І. М. Басараб², Д. О. Мельничук¹, С. Д. Мельничук¹, М. С. Калачнюк¹, О. В. Кошман¹, Г. І. Калачнюк¹

¹Національний університет біоресурсів і природокористування України

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

Показано різниці у спектрі молекулярних ізоформ і активностях лактатдегідрогенази (ЛДГ) цитозоль-мікросомальної і мітохондріальної фракцій гепатоцитів. Хоча ензим локалізується в цитоплазмі, сімейство його ізоформ змінює свої фізико-хімічні властивості, будову і каталітичну активність у зв'язку з наближенням до окремих субструктур клітини і передусім до мембран мітохондрій. За аліментарної діареї неонатальних телят у цитозоль-мікросомальній і мітохондріальній фракціях гепатоцитів вірогідно зростає активність ЛДГ переважно за рахунок збільшення молярного відсотку ізозиму ЛДГ₅. Застосування ліпосомальної форми біологічно активної добавки, що містить есенціальні фосфоліпіди молока (БАД LP FLP-MD) у поєднанні із традиційним лікуванням (ТЛ) вірогідно наближає до рівня контролю спектр множинних молекулярних ізоформ ЛДГ у субклітинних структурах та ензимну активність.

Ключові слова: МОЛЕКУЛЯРНІ ІЗОФОРМИ ТА АКТИВНІСТЬ ЛДГ, СУБКЛІТИННІ ФРАКЦІЇ, ГЕПАТОЦИТИ, ТЕЛЯТА, ДІАРЕЯ, ЛІПОСОМИ МОЛОКА.

У попередній роботі [1] наведено класичні методичні підходи до фундаментального вивчення особливостей окисно-відновних процесів у клітині печінки на стадії утворення й утилізації кінцевих продуктів гліколізу – пірувату й лактату за різних умов експериментальних досліджень. Виявлено чіткі зміни активності ЛДГ (КФ 1.1.1.27) у цитозоль-мікросомальній і мітохондріальній фракціях гепатоцитів неонатальних телят за умов діареї (Д), традиційного лікування та поєднання ТЛ із застосуванням біологічно активної добавки, що включає есенціальні фосфоліпідні компоненти молока у ліпосомальній формі. Показано вірогідно вищу активність ЛДГ у цитозоль-мікросомальній фракції клітини. Активність ензиму в обох субклітинних фракціях багатократно зростає за умов діареї. ТЛ і особливо ТЛ із використанням БАД LP FLP-MD наближають його активність до рівня контролю. При цьому за умов діареї в тканині печінки знижується вміст лактату і підвищується рівень пірувату, що пояснюється прискореним виходом у кров молочної кислоти і посиленням зворотної лактатдегідрогеназної реакції в бік утворення пірувату, обсяги утилізації якого зменшуються, очевидно, у зв'язку із гальмуванням процесів перетворень у циклі трикарбонових кислот (ЦТК) та глюконеогенезі.

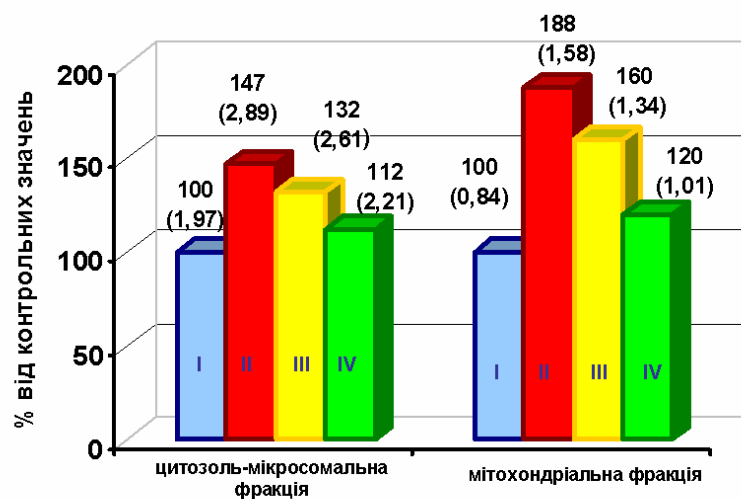
Поряд з наведеним ще слід зауважити, що ізоферменти ЛДГ із печінки, хоча каталізують одну й ту ж реакцію, між собою відрізняються у багатьох відношеннях за фізичними і хімічними властивостями. Загалом ізозими завжди виявляються у сироватці крові й тканинах усіх хребетних, у комах та в одноклітинних організмів. При цьому число множинних молекулярних форм та їх вміст можуть дуже змінюватися. У медицині особливий діагностичний інтерес до ізозимів з'явився тоді, коли було виявлено декілька форм ЛДГ, співвідношення яких між собою змінюється за певних патологічних станів. Зважаючи на вищевказане, метою наших наступних експериментів було дослідити спектр молекулярних ізоформ ЛДГ та ензиматичну активність у субструктурах клітин печінки неонатальних телят за умов аліментарної діареї та застосування традиційного лікування в поєднанні з використанням БАД LP FLP-MD у ліпосомальній формі.

Матеріали і методи

Для досліджень використовували 1–7-добових новонароджених телят, яких за принципом аналогів (рівнозначних за віком, породою, статтю, вагою) розділяли на чотири групи (n=5–7) 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 [1–9]. Субклітинні структури одержували диференційним центрифугуванням [10], а ізозими й активність ЛДГ досліджували за загальноприйнятими методами [11, 12].

Результати й обговорення

Одержані результати досліджень наведено на рисунку та в таблицях 1 і 2.



I, II, III, IV - групи тварин;

Цифрові значення: % від контролю

(активність ЛДГ, мкмоль НАДН/хв.мг білка)

Рис. Відносні (%) та (фактичні; мкмоль НАДН/хв.мг білка) зміни активності лактатдегідрогенази в субструктурах гепатоцитів неонатальних телят за умов норми (I; контроль), діареї (II), традиційного лікування (ТЛ; III) і поєднання ТЛ із застосуванням БАД LP FLP-MD (IV); ($M \pm m$; $n=5$).

Із наведених на рис. даних видно, що за умов діареї у цитозоль-мікросомальній фракції печінки активність ЛДГ зростає на 47 %. Традиційне лікування знижує активність ензиму на 13 %, але рівень активності у порівнянні з контролем залишається ще досить високим. Застосування БАД LP FLP-MD у комбінації з ТЛ вірогідно наближає цей біохімічний показник до норми. Аналогічна міжгруповою картина змін відмічається і при дослідженні активності ЛДГ у мітохондріальній фракції. Однак, у цій фракції фактична активність ензиму є майже у 2 рази нижчою, ніж у плазматичній частині клітини. Це свідчить, що основне місце лактатдегідрогенази зосереджене у цитоплазмі, але значна кількість її може знаходитись і на зовнішніх мембранах мітохондрій. Про паралельні зміни субстратів (лактату і пірувату) у вказаних субклітинних фракціях гепатоцитів було сказано раніше [1] і вони також свідчать про значну деструктивну дію порушень, викликаних діарейним станом в організмі новонароджених телят. Такі зміни розповсюджуються на мембрани клітин печінки і при традиційному лікуванні вказують на високу лікувальну здатність БАД LP FLP-MD.

Наведені дані узгоджуються із результатами інших експериментальних досліджень, які стосуються вивчення спектру множинних молекулярних форм ЛДГ у субструктурах гепатоцитів вищевказаних груп телят. Зокрема це видно з даних табл. 1 і 2.

Таблиця 1

Зміни спектру множинних молекулярних форм ЛДГ у цитозоль-мікросомальній фракції гепатоцитів неонатальних телят за дії екзогенних факторів (моль%, $M \pm m$; $n=5$)

Опис стану здоров'я телят і різниці	Множинні молекулярні форми ЛДГ				
	ЛДГ ₁	ЛДГ ₂	ЛДГ ₃	ЛДГ ₄	ЛДГ ₅
Норма (К)	10,01±0,25	9,97±0,21	26,35±1,19	43,65±1,48	10,02±0,78
Діарея	8,29±0,17	8,61±0,14	20,11±0,78	35,37±1,11	27,62±2,33
Факт.різниці до К	-1,72	-1,36	-6,24	-8,26	+17,60
Різниці в % до К	-17,18	-13,64	-23,7	-18,9	+176
P	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,001
Традиційне лікування	8,86±0,24	8,94±0,26	24,71±0,35	38,26±0,32	19,23±1,41
Факт.різниці до К	-1,15	-1,03	-1,64	-5,39	+9,21
Різниці в % до К	-11,5	-10,03	-6,22	-12,4	+91,9
P	<0,1	<0,1	<0,05	<0,05	<0,01
ТЛ+БАД LP FLP-MD	9,44±0,43	9,76±0,16	25,82±0,71	41,09±2,01	13,69±0,44
Факт.різниці до К	-0,37	-0,21	-0,53	-2,56	+3,67
Різниці в % до К	-3,7	-2,1	-2,0	-5,9	+36,6
P	>0,5	>0,5	>0,5	>0,5	<0,1

Зміни спектру множинних молекулярних форм ЛДГ у мітохондріальній фракції гепатоцитів неонатальних телят за дії екзогенних факторів (моль%, $M \pm m$; $n=5$)

Опис стану здоров'я телят і різниці	Множинні молекулярні форми ЛДГ				
	ЛДГ ₁	ЛДГ ₂	ЛДГ ₃	ЛДГ ₄	ЛДГ ₅
Норма (К)	11,66 $\pm$ 1,02	29,34 $\pm$ 0,64	38,21 $\pm$ 0,67	19,47 $\pm$ 0,38	1,32 $\pm$ 0,89
Діарея	12,58 $\pm$ 0,17	23,41 $\pm$ 0,14	33,12 $\pm$ 0,82	15,01 $\pm$ 0,61	15,88 $\pm$ 3,32
Факт.різниці до К	+0,92	-5,93	-5,09	-4,46	+14,56
Різниця в % до К	+7,9	-20,2	-13,3	-22,9	+1103
P	>0,5	<0,001	<0,05	<0,01	<0,001
Традиційне лікування	12,14 $\pm$ 1,44	26,33 $\pm$ 0,41	35,77 $\pm$ 1,62	18,37 $\pm$ 0,94	7,39 $\pm$ 2,38
Факт.різниці до К	+0,48	-3,01	-2,44	-1,1	+6,07
Різниця в % до К	+4,1	-10,25	-6,4	-5,7	+459
P	>0,5	<0,05	<0,1	<0,1	<0,001
ТЛ+БАД LP FLP-MD	11,74 $\pm$ 1,12	27,89 $\pm$ 1,35	37,13 $\pm$ 3,21	19,88 $\pm$ 1,24	3,36 $\pm$ 1,23
Факт.різниці до К	-0,08	-1,45	-1,08	+0,41	+2,04
Різниця в % до К	-0,7	-4,9	-2,8	+2,1	+154
P	>0,5	>0,5	>0,5	>0,5	<0,1

У цитозоль-мікросомальній фракції гепатоцитів телят за умов норми основні молярні відсотки приходяться на ЛДГ₃ (26,35) і ЛДГ₄ (43,65) (табл. 1). За умов діареї молярна частка усіх перших чотирьох ізоформ вірогідно знижується ($P<0,05$) і паралельно вірогідно зростає молярний відсоток ЛДГ₅ ($P<0,001$). Це вказує на значні пошкодження печінкових клітин і, передусім їхніх мембран, що дає змогу виходу більших обсягів ензиму в кров'яне русло. Традиційне лікування суттєво наближає до контролю (норми) всі ізоформи ЛДГ, але обсяги ЛДГ₅ у загальному спектрі цієї фракції залишаються досить високими. Застосування БАД LP FLP-MD у поєднанні з ТЛ повертає майже до норми співвідношення всіх множинних молекулярних форм лактатдегідрогенази. Подібні закономірності змін у спектрі ізоформ відмічено й у мітохондріальній фракції клітин печінки (табл. 2). Слід зазначити, що тут за умов діареї ще чіткіше збільшується молярний відсоток ЛДГ₅ ($P<0,001$). Це відбувається на тлі зниження обсягів ЛДГ₂, ЛДГ₃ і ЛДГ₄. Традиційне лікування позитивно впливає на перерозподіл спектру ізоформ. Однак, тільки у поєднанні його із застосуванням БАД LP FLP-MD співвідношення всіх молекулярних множинних форм ЛДГ вірогідно стає найбільш близьким до норми.

Виявлені різниці в спектрі множинних молекулярних форм ЛДГ та ензимної активності в субклітинних фракціях гепатоцитів вказує на те, що основним місцем розміщення ензиму є цитоплазма, але розташування його ближче мітохондрій і особливо на їхніх мембранах суттєво впливає на перебіг багатьох біохімічних реакцій, які каталізуються дегідрогеназами, очевидно для забезпечення функціонування метаболічних шляхів і передусім – гліколізу, ЦТК, глюконеогенезу та циклу Корі.

Висновки

Спектр множинних молекулярних форм і активність лактатдегідрогенази у цитозоль-мікросомальній та мітохондріальній фракціях гепатоцитів виявляються різними. Хоча цей ензим локалізується в цитоплазмі, його сімейство змінює фізико-хімічні властивості, будову і каталітичну активність у зв'язку з наближенням його до окремих субструктур клітини і передусім до мембран мітохондрій.

За умов аліментарної діареї неонатальних телят у цитозоль-мікросомальній і мітохондріальній фракціях гепатоцитів вірогідно зростає активність лактатдегідрогенази переважно за рахунок багатократного збільшення молярного відсотку ЛДГ₅.

Застосування комплексної біологічно активної добавки на основі есенціальних фосфоліпідів молока у ліпосомальній формі (БАД LP FLP-MD) у поєднанні із традиційним лікуванням дозволяє вірогідно наблизити до рівня контролю спектр множинних молекулярних форм ЛДГ та ензимну активність.

Перспективи подальших досліджень. У зв'язку з одержаними результатами значний інтерес мають дослідження метаболічних шляхів, спрямованих на використання лактату і пірувату в клітинах тканин з участю їхніх мембран за впливу ендо- і екзогенних чинників.

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

MOLECULAR ISOFORMS AND ACTIVITY OF LACTATE DEHYDROGENASE IN SUBSTRUCTURES OF CELL UNDER EFFECT OF EXOGENOUS FACTORS

S u m m a r y

It has been shown the differences of patterns of molecular isoforms and activities of lactate dehydrogenase in the cytosol-microsomal and mitochondrial fractions of hepatocytes. Although enzyme is localized in the cytoplasm, the family of its isoforms changes physical and chemical peculiarities of structure and catalytic activity because of the approach to individual cellular substructures, especially to membranes of mitochondria. Under conditions of

nutritional diarrhoea in neonatal calves, in the cytosol-microsomal and mitochondrial fractions of hepatocytes, lactate dehydrogenase activity is significantly increased mainly due to enhancement of molar percentage of LDH₅. The application of biologically active supplement LP FLP-MD in liposomal form in combination with traditional treatment approximates significantly the range of LDH multiple forms in the subcellular structures and enzymatic activity to the level of control group of animals.

Л. Г. Калачнюк, И. М. Басараб, Д. А. Мельничук, С. Д. Мельничук, М. С. Калачнюк, А. В. Кошман, Г. И. Калачнюк

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИЗОФОРМЫ И АКТИВНОСТЬ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В СУБСТРУКТУРАХ КЛЕТКИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЭКЗОГЕННЫХ ФАКТОРОВ

Аннотация

Показаны различия спектров молекулярных изоформ и активностей лактатдегидрогеназы цитозоль-микросомальной и митохондриальной фракций гепатоцитов. Хотя энзим локализуется в цитоплазме, семейство его изоформ изменяет свои физико-химические свойства строения и каталитическую активность в связи с приближением энзимов к отдельным субструктурам клетки и прежде всего к мембранам митохондрий. При алиментарной диаррее неонатальных телят в цитозоль-микросомальной и митохондриальной фракциях гепатоцитов достоверно возрастает активность ЛДГ преимущественно за счет увеличения молярного процента ЛДГ₅. Применение БАД LP FLP-MD в липосомальной форме в сочетании с традиционным лечением достоверно приближает к уровню контроля спектр множественных молекулярных форм ЛДГ и энзиматическую активность.

1. 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 ЛНУВМ та Б ім. С. З. Гжицького. – 2011. – Т. 13, №4 (50), Ч. 2. – С. 63–69.
2. Мельничук Д. О. Використання ліпосом на основі фосфоліпідів молока у гепатології : монографія / Д. О. Мельничук, В. А. Грищенко, В. А. Томчук та ін. ; під загальною редакцією академіка НАНУ та НААН України Д. О. Мельничука. – К.: НУБіПУ, 2010. – 400 с.
3. 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). / М. Калачнюк, І. Басараб, Г. Калачнюк. – Львів : ЛНУ імені І. Франка, 2011. – С. 50–51.
4. Калачнюк Г. И. Активность маркерных энзимов в гепатоцитах неонатальных телят с энтеропатологией и при использовании липосом на основе фосфолипидов молока / Г. И. Калачнюк, И. М. Басараб, Л. Г. Калачнюк // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии : приложение №37. – Т. XXI, № 1. – С. 249.
5. Калачнюк Л. Г. Структурно-функціональні зрушення в ліпідах гепатоцитів і крові неонатальних телят за діареї та лікувальної дії ліпосом на основі фосфоліпідів молока / Л. Г. Калачнюк, І. М. Басараб, Д. О. Мельничук, та ін. // Наук. вісник ЛНУВМтаБТ ім. С.З. Гжицького. – Львів, 2011. –Т.13, №2 (48), Ч.1. – С.383–390.
6. Калачнюк Л. Г. 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.
7. Кульман Я. Наглядная биохимия / Я. Кульман, К.-Г. Рём. – М.: Мир, БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 469 с.
8. Срога М. 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). / М. Срога, І. Басараб, Л. Калачнюк. – Львів, ЛНУ імені І. Франка, 2011. – С. 74–75.
9. Yakymchuk I. S. Plural spectrum of molecular isoforms of LDH in the hepatic cells of newborn calves with digestive disorders : зб. пр. Міжнар. науково-практ. конф. молодих вчених, асп. і студ. «Наукові здобутки молоді у вирішенні актуальних проблем виробництва та переробки сировини, стандартизації і безпеки продовольства». 20–22 квітня 2011 р. / I. S. Yakymchuk, I. M. Basarab, L. G. Kalachnyuk, G. I. Kalachnyuk. – Київ: НУБіП України. – С. 376.
10. 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.
11. Wiggert B. O. Multiply molecular forms of malic and lactic dehydrogenases during development / B. O. Wiggert, C. A. Vilee // J. Biol. Chem. – 1964. – Vol. 239, No. 2. – P. 444–451.
12. Whitaker J. R. The identification of intermediates in the reaction of pig heart lactate dehydrogenase with its substrates / J. R. Whitaker, D. W. Yates, N. G. Bennett, et al. // Biochem. J. – 1974. – Vol. 139. – P. 677–697.

Рецензент: завідувач лабораторії живлення овець і вівноутворення, доктор сільськогосподарських наук, с. н. с. Стапай П. В.