

УДК:577.158:636.52/58

ПРОЦЕСИ КЛІТИННОГО ДИХАННЯ У ТВАРИН: ЇХ РЕГУЛЯЦІЯ І МЕТОДИ ВИВЧЕННЯ

Костюк І. О., к. с.-г. н., доцент, inna_kostyuk@live.ru, Яковлев О. С., к. вет. н., доцент,
Ляхович Л. М., к. вет. н., доцент, Жукова І. О., д. вет. н., професор
Харківська державна зооветеринарна академія, м. Харків

Анотація. У статті подано відомості про клітинне дихання, що є джерелом енергозабезпечення життєдіяльності організму. Проведено огляд літератури щодо деяких відомих факторів регуляції цих процесів. Розглянуто традиційні і сучасні методи вивчення процесів клітинного дихання у тварин та перспективи їх застосування у фундаментальних і прикладних дослідженнях.

Ключові слова: клітинне дихання, мітохондрії, дихальний ланцюг, енергетичний обмін, полярографія, респірометрія, флуоресцентний зонд, методи дослідження.

Актуальність проблеми. Фізіологічний стан клітин, тканини, дихального апарату мітохондрій *in vivo* здатний змінюватися у відповідь на додавання в раціон тварини речовин, які активно перетворюються в мітохондріях. За умов патології, безліч процесів і реакцій, в першу чергу при ушкодженні клітин, супроводжується порушенням дихального ланцюга мітохондрій і енергетичним дефіцитом. Деякі хвороби людини відносять до так званих мітохондріальних хвороб, бо першопричиною їх виникнення є порушення генного апарату мітохондрій і реакцій клітинного дихання. Це такі патології як міопатії, енцефалопатії, кардіоміопатії, зорові нейропатії та ряд інших [1;2]. Можливості метаболічної корекції таких явищ, обмежені в першу чергу відсутністю ефективних методів діагностики і контролю порушень клітинного дихання в хворому організмі.

Завдання дослідження. Нашим завданням було провести аналіз доступної наукової літератури з питань механізмів клітинного дихання, його регуляції та сучасних методів вивчення клітинного дихання у фундаментальних дослідженнях і в прикладному аспекті.

У мітохондріях забезпечується зв'язок і координація між двома фундаментальними процесами – відтворенням клітинних структур і трансформацією енергії в клітині. Клітинне (тканинне) дихання – це ключова ланка метаболізму, яка поєднує процеси дисиміляції і асиміляції. Необхідними умовами клітинного дихання є: доставка кисню кров'ю, наявність субстратів окиснення, специфічних ферментів-переносників електронів, а також мембран, що забезпечують функціонування дихального ланцюга і перетворення енергії хімічних зв'язків у АТФ і тепло (рис 1.).

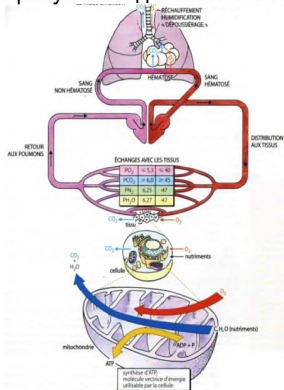


Рис.1. Взаємозв'язок зовнішнього і внутрішнього дихання. (La respiration - Terminale ST2S - 2012/2013).

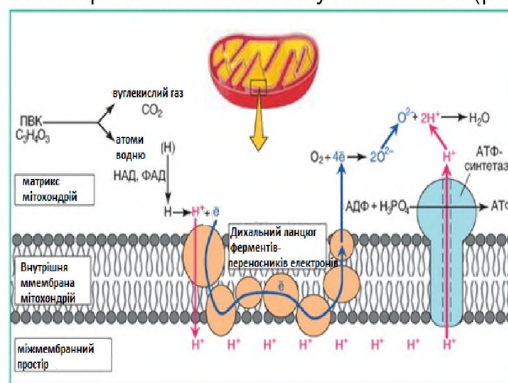


Рис.2 Схема дихального ланцюга мітохондрій тварин.

Дихальний ланцюг (ДЛ) мітохондрій складають більш ніж 20 переносників електронів і протонів, які розташовуються в певній послідовності (рис 2.). В структурі ДЛ внутрішньої мембрани

мітохондрій визначено чотири ферментні комплекси; три комплекси входять в НАДН-оксидазну систему, а сукцинатдегідрогеназний комплекс підключається до її середньої ділянки. НАДН-оксидазна система, що каталізує окиснення НАДН киснем, включає I комплекс: НАДН-КоQ-редуктазу (КФ 1.6.5.3), III комплекс: КоQH₂-цитохром c-редуктазу (КФ 1.10.2.2.) і IV комплекс: цитохромоксидазу (КФ 1.9.3.1.). До II комплексу відноситься сукцинатдегідрогеназа (КФ 1.3.5.1), яка переносить водень від сукцинату на КоQ без участі НАД⁺. Вивчення роботи ДЛ активно продовжується в зв'язку з ПОЛ та дослідженнями апоптозу [3; 4].

Регуляція тканинного дихання під дією різних факторів вивчалась у фізіологічних умовах і при патологічних процесах, в результаті – накопичений величезний експериментальний матеріал. Дослідження тканинного дихання проводили у віковому аспекті, при дії патогенетичних факторів на організм, при порушеннях роботи ендокринної системи в умовах нормального і незбалансованого живлення [5; 6; 2]. Цьому питанню присвячена величезна кількість робіт більш ніж за 60 років досліджень. Аналізуючи дані літератури, можна виділити декілька основних причин порушення тканинного дихання і окиснювального фосфорилування: 1) киснева недостатність; 2) структурні зміни ДЛ внаслідок порушення синтезу білка на рівні ядерного або мітохондріального генома; 3) дестабілізація мембран, зміни білково-ліпідних взаємодій в результаті посилення ПОЛ; 4) порушення метаболізму білків, ліпідів і вуглеводів в результаті неповноцінного живлення [6].

При пошкодженні мембрани підтримка градієнта протонів не можлива, тому дихальний контроль знижується, що призводить до порушення фосфорилування, посилення вільного дихання і розсіювання енергії у вигляді тепла. На основі хеміосмотичної гіпотези клітинного дихання (П. Мітчелла), можна зробити висновок: будь-який чинник, що призводить до підвищення протонної провідності мембрани, сприяє роз'єднанню дихання і фосфорилування, гальмує синтез АТФ і посилює вільне окиснення. Отже, дія будь-яких мембранотропних речовин, що надходять в організм або утворюються в ньому, відобразатиметься на процесах клітинного дихання. Існують три класи речовин, які перешкоджають процесам дихання і окиснювального фосфорилування в мітохондріях: 1) інгібітори дихального ланцюга (ціанід, антимицин та ін.); 2) роз'єднувачі дихання і фосфорилування (2,4-ДНФ); 3) інгібітори Н⁺-АТФ-ази, які перешкоджають перетворенню енергії окиснення в АТФ (олігоміцин та ін.).

Роз'єднання дихання і фосфорилування може бути біологічно раціональним і необхідним станом, наприклад, у новонароджених, а також у всіх тваринних організмів під час сну і при адаптації до холоду [6]. Природними роз'єднувачами окиснювального фосфорилування є ненасичені жирні кислоти і деякі гормони (наприклад, тироксин, адреналін). Впливають на реакції тканинного дихання вітаміни (філохинон, токоферол та ін.). Питання про регуляцію тканинного дихання і фосфорилування *in vivo*, залишається мало вивченим і вимагає подальших досліджень для розкриття механізмів деяких фізіологічних і патологічних процесів. У більшості клітин ссавців потенційні можливості до генерації енергії у вигляді АТФ набагато перевищують потреби цих клітин в енергії (Е. Рекер).

Процеси тканинного дихання змінюються у зв'язку з віком. Мітохондрії печінки новонароджених тварин окиснюють субстрати зі швидкістю приблизно в 2 рази більшою, ніж статевозрілих, але значно меншою, ніж в ембріональному періоді. Як відомо, одним з механізмів, що викликають структурні перебудови в мембранах, є перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ). Інтенсивність ПОЛ максимальна у молодих тварин, в середньому віці відбувається зниження, а при старінні – підвищення інтенсивності реакцій НАДФ-залежного ПОЛ. Процеси тканинного дихання і ПОЛ взаємозв'язані. В ході окиснювальних реакцій в ДЛ утворюється активна форма кисню, супероксидний аніон, і перекисні сполуки, які здатні індукувати вільнорадикальні процеси, зокрема ПОЛ. Вірогідні механізми взаємозв'язку перекисного окиснення і тканинного дихання – це генерація вільних радикалів кисню під час роботи I та III комплексу дихального ланцюга [3]. Отже, існує циклічна залежність ПОЛ і процесів дихання. Важливу роль у нормальному функціонуванні дихального ланцюга виконує антиоксидантна система клітини, яка стримує розвиток ПОЛ, знешкоджує вільні радикали кисню і перешкоджає їх надмірному утворенню. З іншого боку, ймовірно, що порушення в роботі дихального ланцюга призведуть до інтенсивної генерації активних форм кисню, накопичення вільних радикалів і посилення перекисного окиснення [4].

Мембранотропні речовини, зокрема вітаміни А і Е, що мають антиоксидантні властивості, спричиняють дозозалежний вплив на процеси дихання у мітохондріях печінки, що було показано у роботі [6]. Вікові зміни інтенсивності ПОЛ і клітинного дихання взаємопов'язані. У зв'язку з цим, існує необхідність дослідження клітинного дихання на різних етапах онтогенезу в сукупності з іншими ферментними системами [7] і, що діють підчас адаптації.

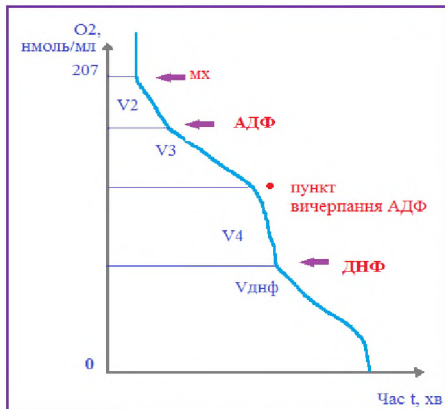


Рис. 3. Схематичний графік дихання мітохондрій.

Існує декілька методичних шляхів дослідження дихання клітини:

1. Традиційний полярографічний метод визначення поглинання кисню мітохондріями, які отримують із нативних клітин [11].
2. Респірометрія (метод визначення поглинання кисню мітохондріями) з використанням мікропланшетів і аналізатора Seahorse [9; 10].
3. Використання флуоресцентних зондів для вивчення клітинного дихання в культурах клітин і в інтактних мітохондріях [12].

Отже матеріалом як полярографічних, так і флуориметричних досліджень клітинного дихання можуть бути: виділені інтактні мітохондрії, зрізи тканин, культура клітин, біоптат тканини [8; 9; 13].

Показники дихання мітохондрій при полярографічних вимірюваннях (рис.3.):

- $V_2, V_3, V_4, V_{днф}$ – швидкості дихання в різних метаболічних станах мітохондрій; $[V] = \text{нмоль } O_2 \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$.
- коефіцієнт дихального контролю за Ларді – V_3/V_2 ; од.
- інтенсивність фосфорилювання – $I\Phi$; $[I\Phi] = \text{нмоль АДФ} \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$.
- ефективність фосфорилювання – $\text{АДФ}/O$; од.

У роботі [8] пропонується оцінювати стан енергетичного обміну за результатами цитохімічного аналізу ферментного статусу клітин у периферичній крові. Визначають активність лактатдегідрогенази, яка бере участь в окисленні L-лактату в піровиноградну кислоту, сукцинатдегідрогенази та інших ферментів, що є каталізаторами циклу трикарбонових кислот. Пояснюється, що стандартні методи оцінки внутрішньоклітинних процесів з проведенням біопсії, молекулярно-генетичного аналізу та ін. є технічно складними, інвазивними і дорогими, що обмежує їх використання.

Важливою проблемою вивчення процесів клітинного дихання є біоетичний аспект [14]: на даний час полярографічний метод визначення параметрів дихання є гострим дослідом. У результаті гине величезна кількість лабораторних тварин. В іншому разі, проведення біопсії органів є складною, травматичною процедурою, яка може бути використана в клінічних дослідженнях тільки при особливих показаннях (діагностика спадкових хвороб) або в фундаментальних дослідженнях як більш гуманний метод, направлений на збереження життя лабораторних тварин.

Застосування традиційних методів вивчення тканинного (клітинного) дихання на даний час проводять, якщо це має надактуальне значення, не суперечить вимогам з біоетики і моральному ставленню до цього питання експериментатора. Визнання моральної відповідальності за «необхідність» таких дослідів на лабораторних тваринах може бути серйозним аргументом проти їх проведення. Але теоретично можливий інший шлях у вивченні енергетики клітини. Організм – це мікросесвіт для науковців біохіміків, фізіологів і патологів. Деякі, здавалось би суто загальнопізнавальні, факти можуть стати початком розробки нових методів наукових досліджень клітинного

дихання. Так, встановлено, що хімічні реакції в клітинах людини і тварин можуть супроводжуватись надслабким світінням, яке називається хемілюмінесценцією. Це явище спостерігається в тому випадку, якщо відбувається виділення великої кількості енергії, наприклад в реакції взаємодії двох радикалів або в реакціях за участю перекисів. Власне надслабке світіння клітин і тканин людини і тварин обумовлено реакціями вільних радикалів ліпідів і кисню [15]. Можливо це природне явище в майбутньому може бути використане для визначення стану енергетичного апарату клітини, зокрема дихального ланцюга, що генерує в процесі роботи вільні радикали кисню.

Відомим є явище штучної флуоресценції. За даними досліджень проведених Eric C. Lipsky [16] у 2010, розроблено метод використання флуоресцентного зонду для виявлення злоякісних новоутворень. Відомо, що в ході канцерогенезу порушується енергетика пухлинних клітин, зокрема клітинне дихання. Зонд не тільки виступає в якості скринінгового пристрою, але і дозволяє лікарям розрізняти здорові і злоякісні клітини (рис.4.).

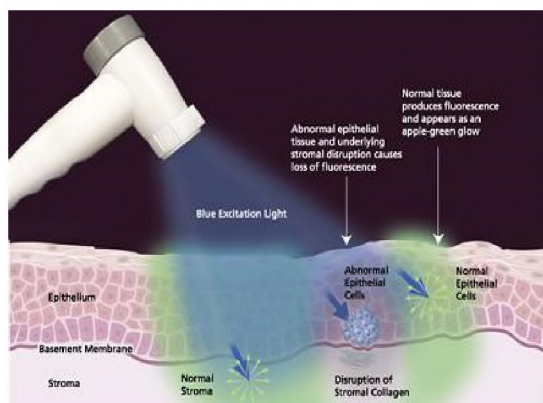


Рис. 4 Флуоресцентний зонд для виявлення пухлинних тканин (Eric C. Lipsky, 2010).

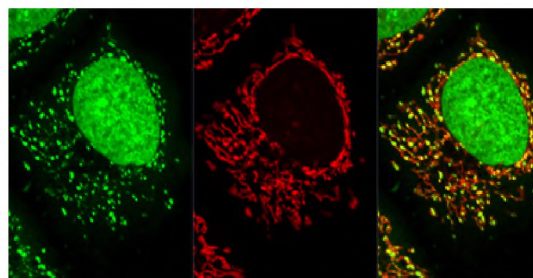


Рис. 5. Мітохондрії та ДНК епітеліальних клітин людини (Флуоресцентна мікроскопія, Tim Shutt, 2016).

Флуоресцентні зонди і мітки є зручним інструментом для дослідження біологічних мембран і мембранних ферментів (рис 5.). Дослідження в напрямку природньої хемілюмінесценції і використання штучних флуоресцентних речовин можуть бути перспективними для розробки методів вивчення енергетичного обміну *in vivo*.

Висновки

При вивченні клітинного дихання в умовах патології існує проблема моделювання на лабораторних тваринах, а також травматизації тканини хворого, якщо виконується біопсія. Основним стратегічним завданням будь-яких експериментів як в фундаментальних дослідженнях, так і в прикладних, є не просто визначення нормальних механізмів і функцій, а в кінцевому результаті – застосування отриманої інформації для захисту здоров'я людини і тварин. Для вирішення цієї проблеми в перспективі можна використати досягнення у сфері застосування флуоресцентних зондів в організмі людини і тварин. Розробка таких методів вивчення клітинного дихання дасть змогу вивчати енергетичний обмін при різних патологіях (гіпоксичних станах, ішеміях, інфарктах, локальних патпроцесах) у клінічних дослідженнях, а також під дією різноманітних чинників у модельних дослідах із збереженням життя лабораторних тварин.

Література

1. Mitochondrial quality control: Cell-type-dependent responses to pathological mutant mitochondrial DNA. / A. Malena, B. Pantic, D. Borgia et al. // *Autophagy*. – 2016. – Vol. 11. – P. 2098-2112. [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>]
2. Скулачев В. П. Биоэнергетика. Мембранные преобразователи энергии / В. П. Скулачев. – М.: Высшая школа, 1989. – 200 с.
3. Скулачев В. П. Явления запрограммированной смерти. Митохондрии, клетки и органы: роль активных форм кислорода // В. П. Скулачев – Соросовский образовательный журнал. – 2001. Т. 7, № 6. – С. 1-10.
4. Лю Б. Н. Кислородно-перекисная концепция апоптоза и возможные варианты его механизма / Б. Н. Лю. // *Успехи современной биологии*. – 2001. – Т. 121, № 5. – С. 488 - 501.
5. Flamment M. Metabolisme - energetique mitochondrial dansle developpement de la steatose hepaticue. / Melissa Flamment // *Biologie cellulaire*. – Francais. Universite d'Angers, 2009. – P. 7-8. [<https://tel.archives-ouvertes>].

6. Костюк І.О. Особливості біологічного окиснення в печінці курей різного віку при збагаченні їх раціону вітамінами А і Е: автореф. дис. канд. с.-г. наук: спец. 03.00.13. / І. О. Костюк. – Х., 2011. – 21 с.
7. Литвицкий П.Ф. Патолофизиология [Электронный ресурс] / П.Ф. Литвицкий. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. <http://www.rosmedlib.ru/book/ISBN9785970414798.html>
8. Энергетический обмен клетки в норме и патологии. Возможности его оценки. / Н.В. Нагорная, Н.А. Четверик, А.А. Федорова, Я.В. Куриленко. // [Электронный ресурс]. – М.: ДНМУ им. М. Горького. – Учебно-информационный медицинский сайт studentdoctorprofessor.com.ua (Дата звернення 12.04.2017).
9. Function of Mitochondrial Stat3 in Cellular Respiration. / J. Wegrzyn, R. Potla, Yong-Joon Chwaе et all. // Science. – 2009. – Vol. 323, Issue 5915. – P. 793-797.
10. Quantitative Microplate-Based Respirometry with Correction for Oxygen Diffusion. / Akos A. Gerencser, Andy Neilson, Sung W. Choi et all. // Anal Chem. – 2009. – vol. 81(16). – P. 6868 - 6878.
11. Критерии и методы контроля метаболизма в организме животных и птиц / И. А. Ионов, С. О. Шаповалов, Е. В. Руденко и др. – Харьков: Институт животноводства НААН, 2011. – 376 с.
12. Quantitative microplate-based respirometry with correction for oxygen diffusion. / A. A. Gerencser, A. Neilson, S. W. Choi, U. Edman et all. // Anal. Chem. – 2009., vol. 81. – P. 6868–6878. [PMC free article]
13. Современные проблемы биохимии. Методы исследований: учебн. Пособие / Е. В. Барковский [и др.]; под. Ред. Проф. А. А. Чиркина. – Минск: Выш. Шк., 2013. – 491 с.
14. Чадаев В. Е. Этические принципы при работе с лабораторными животными. / В. Е. Чадаев // Вісник проблем біології і медицини. – 2012. – вип. 2, Т.1 (92). – С. 113-115.
15. Владимиров Ю.А. Свечение, сопровождающее биохимические реакции. / Ю.А. Владимиров. // Соросовский журнал. – 1999. – № 6. [<http://www.pereplet.ru/cgi/soros/readdb.cgi?f=ST730>]
16. Липски Э. С. Флуоресцентный зонд для обнаружения злокачественных тканей полости рта. / Э. С. Липски // Медицинский центр Калифорнийского университета. [<http://ucdmc.ucdavis.edu/medicalcenter>]

ПРОЦЕССЫ КЛЕТОЧНОГО ДЫХАНИЯ У ЖИВОТНЫХ: ИХ РЕГУЛЯЦИЯ И МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ

Костюк И. А., к. с.-х. наук, доцент, inna_kostyuk@live.ru

Яковлев А.С., к. вет. наук, доцент

Ляхович Л. М., к. вет. наук, доцент

Жукова И. А. д. вет. наук, профессор

Харьковская государственная зооветеринарная академия, г. Харьков

Аннотация. В статье даются сведения о клеточном дыхании, что является источником энергообеспечения жизнедеятельности организма. Проведен обзор литературы по некоторым известным факторам регуляции этих процессов. Рассмотрены традиционные и современные методы изучения клеточного дыхания у животных и перспективы их применения в фундаментальных и прикладных исследованиях.

Ключевые слова: клеточное дыхание, митохондрии, дыхательная цепь, энергетический обмен, полярография, респирометрия, флуоресцентный зонд, методы исследования.

THE PROCESSES OF CELLULAR RESPIRATION IN ANIMALS: THEIR REGULATION AND METHODS OF STUDY

Kostiuk I. A., Candidate of agricultural science, associate Professor,

Yakovlev A. S., Candidate of veterinary science, associate Professor,

Liakhovych L. M., Candidate of veterinary science, associate Professor,

Zhukova I. A., Doctor of veterinary Science, Professor

inna_kostyuk@live.ru

Kharkiv state zooveterinary Academy, Kharkiv

Summary. The data on the cellular respiration that is the source of energy supply for organism have been presented in the article. The review of the literature concerning some of the known factors that regulate the above processes has been done. The traditional and modern methods to study the processes of cellular respiration in animals and prospects of their use in the fundamental and applied research have been considered. The regulation of tissue respiration under the action of different factors was studied in the physiological conditions and in pathological processes. There are several main causes of the disorder of the respiration and oxidative phosphorylation: 1) hypoxia; 2) structural changes of the respiratory chain

due to the disorder of the protein synthesis; 3) destabilization of membrane as a result of the POL strengthening; 4) metabolic disorders.

There are several methodological ways to study the respiration of a cell: a polarographic method to determine the oxygen uptake by mitochondria; respirometry with the use of microplates and the analyzer Seahorse; the use of fluorescent probes in vitro in the cell cultures and mitochondria.

The mitochondria and the tissue sections, biopsy and cell culture were the materials for both polarographic and fluorimetric studies of cellular respiration. An important problem of studying the processes of cell respiration is the bioethical aspect: the polarographic method for the determination of respiration parameters is a poignant experience. As a result, a great number of laboratory animals were killed. Biopsy of the organs is a challenging and traumatic procedure which can be used in the clinical trials only under special conditions. The main strategic task of any experiments in both fundamental and applied research is not only to determine the normal mechanisms and functions but to apply the results to protect human and animal health. Fluorescent probes and labels are a useful tool to study biological membranes and membrane enzymes. The studies in the field of natural chemiluminescence and the use of artificial fluorescent substances may be promising to develop the methods to study energy metabolism in vivo. It will provide an opportunity to study energy metabolism in different pathologies (hypoxic conditions, ischemia, infarction, general and local pathological processes) in clinical studies as well as under the influence of various factors in the model experiments with the preservation of the life of laboratory animals.

Key words: cell respiration, mitochondria, respiratory chain, energy metabolism, polarography, respirometry, fluorescent probe, methods of research.

УДК 636.085.1

ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ И ПРОДУКТИВНОСТЬ ТЕЛЯТ ПРИ СКАРМЛИВАНИИ БЕЛКОВОЙ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ

**Радчиков В. Ф., д. с.-х. н., профессор, Цай В. П., к. с.-х. н., доцент, Кот А. Н., к. с.-х. н.,
labkrs@mail.ru**

*РУП «Научно-практический центр национальной академии наук Беларуси по животноводству», г.
Жодино*

Трокоз В. А., Карповский В. И., д. с.-х. н., профессора
Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, г. Киев
Куртина В. Н., Ганущенко О. Ф., к. с.-х. н., доценты, rio_vsavm@tut.by
УО «Витебская государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск

Аннотация. Скармливание бычкам энерго-протеиновых добавок, содержащих рапс, горох, люпин, вику в количестве 15 % по массе в составе комбикормов взамен части подсолнечного шрота оказывает положительное влияние на морфо-биохимический состав крови и позволяет получить среднесуточные приросты животных 850-920 г, контроль – 835 г при затратах кормов 4,7-4,9 корм. ед. на 1 кг прироста.

Ключевые слова: телята, продуктивность, рапс, люпин, вика, рацион, кровь, переваримость

Актуальность проблемы. Для получения высокой продуктивности рационы животных должны быть обеспечены достаточным количеством усвояемой энергии и протеина, а также минеральных и биологически активных веществ [1-5].

Устранить дефицит протеина в рационах можно путём повышения объемов производства комбикормов и улучшения их качества. Однако серьёзным препятствием в этом деле является недостаток белкового сырья. Традиционно для этой цели в комбикорма вводят подсолнечный шрот, который импортируется к нам в республику и является довольно дорогим компонентом.

В последние годы возделываются новые сорта рапса, люпина, гороха и вики с минимальным количеством антипитательных веществ, что позволяет заменить в существующих добавках дорогостоящие компоненты (подсолнечный и соевый шрот) более дешевыми источниками белка, энергии и минерально-витаминного сырья [6, 7, 8].