

**Обзоры, проблемы**

УДК 636.08:636.018:577.12/.17

doi: 10.15389/agrobiologia.2018.2.223rus

**ГИПОТЕЗА О СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ВЗАИМОСВЯЗИ ПЕРОКСИСОМАЛЬНЫХ, МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ И ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В РЕГУЛЯЦИИ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ У ВЫСОКОПРОДУКТИВНЫХ ЖВАЧНЫХ****В.П. ГАЛОЧКИНА, А.В. АГАФОНОВА, В.А. ГАЛОЧКИН**

Авторы считают, что объяснение накопленных данных об обменных процессах у высокопродуктивных жвачных животных, которое пока что остается в рамках существующей физиолого-биохимической парадигмы, требует углубленной интерпретации на принципиально новой экспериментальной и концептуальной основе, предполагающей анализ комплексных взаимосвязей совокупности объектов и их функций, которые ранее не рассматривались. Во-первых, под иным углом зрения надлежит подходить к биохимизму внутриклеточной компартментализации, учитывая строгую взаимную комплементарность функционирования митохондриального цикла Кребса и цитоплазматических процессов гликолиза и глюконеогенеза с пероксисомальным глиоксилатным циклом. Принципиальную возможность функционирования цикла двууглеродных кислот (глиоксилатного цикла) у высокопродуктивных жвачных авторы впервые постулировали, получив экспериментальные данные о проявлении каталитической активности его ключевых ферментов — изоцитратлиазы (КФ 4.1.3.1) и малатсинтазы (КФ 4.1.3.2) (В.П. Галочкина с соавт., 2012). Наличие этих ферментов позволяет синтезировать дефицитную глюкозу из уксусной кислоты, поступающей в больших количествах из содержимого рубца. Жвачные считаются физиологически гипогликемичными животными. Филогенетически сложилось, что их основной корм — грубая растительная пища, увеличивающая долю ацетата в содержимом рубца. Легкогидролизуемые углеводы в содержимом рубца снижают процент ацетата и повышают долю пропионата и бутирата, что результируется в понижении pH (М. Ова с соавт., 2015). При перманентном дефиците глюкозы повышается соотношение соматотропина и инсулина, что свидетельствует об активизации метаболически неэффективного процесса глюконеогенеза. Одновременно в крови возрастает концентрация незтерифицированных жирных кислот, указывающая на рост липолиза в жировых депо. Отмечается низкое отношение количества инсулина и глюкагона при увеличении концентрации мочевины. Снижается жирность молока (F. Piccioli-Cappelli с соавт., 2014). Пероксисомы частично способны осуществлять  $\beta$ -окисление жирных кислот до 13-го углеродного атома, что снимает напряженность с цикла Кребса и потенцирует изменения его метаболической направленности. Авторы рассматривают глиоксилатный цикл в организме животного как возможность форсифицировать обмен веществ и продуктивность. Путь окисления двууглеродных кислот энергетически более экономичен и эффективен, чем окисление в цикле трикарбоновых кислот, поскольку глиоксилатный цикл представляет собой укороченный цикл трикарбоновых кислот, способный функционировать, исключая лимитирующие реакции с участием изоцитратдегидрогеназы и  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназы (В.П. Галочкина с соавт., 2011). Во-вторых, обязательному рассмотрению подлежат новые гипотетические положения прошли первичную валидацию в модельных экспериментах на интенсивно откармливаемых бычках с применением агониста  $\beta$ -адренэргических рецепторов кленбутерола.

Ключевые слова: регуляция метаболизма, пероксисомы, глиоксилатный цикл, оксидаза D-аминокислот, глиоксилат, цистеамин, инсулин, гидропероксид, кислород.

Большое количество органических кислот, образующихся в преджелудках высокопродуктивных жвачных и служащих основным источником метаболической энергии, многократно усиливает нагрузки на цикл Кребса и сказывается на специфике процессов производства и потребления энергии в организме. У большинства живых существ на Земле глиоксилатный цикл выполняет роль основного помощника главного метаболического цикла. У высокопродуктивных жвачных в силу выраженных биохимических особенностей метаболизма глиоксилатный цикл эволюционно выполняет функцию вспомогательного звена для обеспечения форсифицированного

обмена веществ и, следовательно, повышения продуктивности. Нужно четко понимать, что организм высокопродуктивного жвачного животного функционирует в особом режиме хронического напряжения обменных процессов и требует адекватного обеспечения особых метаболических потребностей для реализации потенциала высокой продуктивности. Отсюда следует постоянная необходимость обоснованной биологизации всех технологических аспектов кормления и содержания высокопродуктивных животных.

Высокопродуктивные животные не только дают больше продукции лучшего качества, но и затрачивают меньше питательных веществ на ее производство. Их обмен характеризуется иной скоростью и иной метаболической направленностью. Дойная корова с высокой продуктивностью должна обладать продуктивным долголетием при сохранении воспроизводительной функции. Корова с суточным удоем 30 кг молока выделяет в среднем 1200 г жира, 1000 г белка и 1400 г лактозы. При этом из глюкозы, образующейся в желудочно-кишечном тракте в результате гидролиза углеводов корма, в обмен веществ поступает не более 10 %. Остальная глюкоза, необходимая для синтеза компонентов молока и обеспечения всех метаболических потребностей организма, синтезируется *de novo* (1, 2).

В настоящее время в России во многих хозяйствах получают в год в среднем по стаду по 10000 кг молока на корову и более. Жвачные филогенетически приспособлены к потреблению грубой растительной пищи с большим количеством клетчатки, которая гидролизуется в содержимом рубца с преимущественным образованием ацетата. На практике же применяются высококонцентратные рационы, продукты гидролиза которых изменяют эволюционно сложившиеся процессы ферментации. В содержимом рубца уменьшается соотношение ацетата и пропионата, что приводит к снижению рН и общему нарушению кислотно-щелочного баланса (3), закислению тканей и уменьшению биосинтеза жира в молочной железе. В связи с этим во всем мире проблема синдрома низкой жирности молока актуальна и относится к так называемым болезням питания высокопродуктивных коров.

По нашему мнению, имеющиеся представления о метаболических процессах у высокопродуктивных коров не дают необходимого понимания того, как достигнуть высокой продуктивности при сохранении жирности молока. Принципиально новая физиолого-биохимическая основа для переосмысления этого должна включать знания о глиоксилатном цикле в пероксисомальных реакциях в сочетании с окислением D-аминокислот, гликолизом, глюконеогенезом, липолизом, липогенезом и биоэнергетическими процессами в цитоплазме и митохондриях (4, 5). Перед тем, как перейти к изложению существа предлагаемого концептуального подхода, рассмотрим роль некоторых важнейших субклеточных органелл, метаболических циклов и молекулярных соединений, участвующих в регуляторных процессах.

Пероксисома. Это древнейшая из внутриклеточных субъединиц и последняя из открытых в последние годы, рассматривается как ключевая органелла внутриклеточной, межклеточной и межорганной коммуникации, кооперации и регуляции биохимических процессов (6). Пероксисомы получили свое название благодаря тому, что в их составе всегда обнаруживаются ферменты, использующие молекулярный кислород для отщепления атомов водорода от органических субстратов в окислительных реакциях с образованием перекиси водорода (7). Наряду с митохондриями пероксисомы — главный центр утилизации кислорода в клетке (8). Пероксисомы, обладая метаболическими системами образования и разложения пероксида водорода, генерации и гашения супероксидных радикалов, способны влиять на многие процессы в клетке. Количество внутриклеточного

пероксида водорода определяет интенсивность морфогенетических и биохимических процессов, а пероксисомы служат регуляторами окислительно-восстановительных пероксид-зависимых реакций, контролирующих скорость как биосинтеза, так и биodeградации (9). В отличие от происходящего в митохондриях, при пероксисомальном окислении образуются не макроэргические соединения, а перекись водорода. По сути пероксисома, как и митохондрия, выполняет функцию биологического окисления, но в ней окисление не сопряжено с генерацией НАДН и АТФ (10). Если митохондриальный цикл Кребса общепризнан как главный метаболический и энергетический «котел», утилизирующий конечные продукты всех основных метаболических потоков организма и одновременно выполняющий функцию регуляторного центра этих процессов, то пероксисомы с их глиоксилатным циклом, по-видимому, должно рассматривать как антиоксидантный «реактор» и «диспетчерский узел» организма. Отметим, что в обоих важнейших компартментах клетки — митохондриях и пероксисомах одновременно протекают как про-, так и антиоксидантные реакции.

Нобелевский лауреат С. De Duve первым предположил, что именно пероксисомальный метаболизм сыграл существенную роль в возникновении новых путей биохимических превращений. Для этого пероксисомам было необходимо приобрести ферментные механизмы для осуществления метаболических реакций (в дополнение к системе переноса электронов), обеспечивающие кооперацию с митохондриями (11). Взаимодействие пероксисом и митондрий имеет следствием организацию потоков метаболитов, которые составляют целостную регулируемую структуру, специфичную для той или иной ткани, органа, организма (12).

Оксидаза D-аминокислот и производство реактивных форм кислорода. Пероксисомы — единственная субклеточная органелла, где локализованы оксидазы D-аминокислот (ДААО), которые потребляют кислород в осуществляемом ими каталитическом акте гидролиза правовращающих аминокислот и продуцируют гидропероксид (13). Кислород незаменим для всех аэробных организмов и играет первостепенную роль в генерации макроэргов при окислительном фосфорилировании. В этих реакциях образуются реактивные формы кислорода (РФК), включая супероксид-анион и  $H_2O_2$ , которые, наряду с прочим, необходимы для сигнальной трансдукции в метаболических путях, регулирующих клеточный рост и окислительно-восстановительный статус (14). Роль кислорода в организме двойственна. РФК, будучи естественными и абсолютно необходимыми метаболитами, вовлечены во множество естественных физиологических событий, в том числе в уничтожение микробов и вирусов. Однако в периоды стрессов любой этиологии концентрация РФК может драматически возрастать, становясь причиной множественных патологических состояний структур и функций клетки (15).

Низкая продукция  $H_2O_2$  в пероксисомах астроцитов защищает нейроны от окислительного стресса, в то время как высокая концентрация  $H_2O_2$  нейротоксична (16, 17). Ингибирование астроцитарного фермента оксидазы D-аминокислот защищает нейроны от оксидативной гибели, допуская вероятность механизмов нейропротекции, связанных с  $H_2O_2$  (18). Эти открытия демонстрируют причастность оксидазы D-аминокислот к контролю внутриклеточной концентрацией пероксида водорода во времени и в пространстве и представляют собой вариант расшифровки интереснейшего, не известного ранее механизма астроцит-зависимой нейропротекции. В развитие перечисленного высказывалось предположение, согласно которому нейроны для борьбы с окислительным стрессом связы-

ваются в метаболический комплекс с астроцитами. Аналогичное допущение было сделано относительно субстратов пероксисомальных оксидаз, которые могут быть не стабильными, а временными структурами — неустойчивыми неферментативно образующимися комплексами глиоксильной кислоты с различными нуклеофильными агентами, в том числе с D-аминокислотами (19). Перекиси водорода отводится существенное место в клеточной сигнальной системе, и она считается преимущественным кандидатом в медиаторы адаптивной реакции в астроцитах. Так, показано значение перекуиси водорода в поддержании астроцит-зависимой нейропротекции от окислительного стресса и роль  $H_2O_2$  в индукции астроцитарной активации специфического нейротропного транскрипционного ядерного фактора (Nrf-2). Эти результаты предполагают наличие для нервных клеток специфического регуляторного механизма с вовлечением перекуиси водорода (20). В организме постоянно возникает необходимость регулировать генерацию и нейтpализацию РФК, в чем участвует множество специальных и косвенно задействованных ферментов, включая DAAO, супероксиддисмутазы, ксантиноксидазы, глутатиопероксидазы, гемоксигеназы и др. (21).

Гипотеза о взаимосвязи глиоксилатного цикла, оксидазы D-аминокислот и инсулина в регуляции клеточного метаболизма. *Метаболическая функция цистеамина.* Цистеамин уже многие годы продолжает рассматриваться как классический антиоксидант и эталонный радиопротектор. Цистеамин — тиолсодержащий продукт декарбоксилирования цистеина с участием пантотеновой кислоты, которая служит исходным компонентом синтеза КоА. При недостатке в организме пантотената обработка инсулином приводит к резкому снижению синтеза КоА (22). Скорость деградации КоА и синтез цистеамина снижаются инсулином. Это вполне закономерно, так как КоА необходим для активации инсулином ацилирования ацетата и остатков других жирных кислот при синтезе жирных кислот с более длинной углеродной цепью (23). Цистеамин рассматривается как внутриклеточный отрицательный мессенджер инсулина. В связи с этим инсулин и цистеамин имеют диаметрально противоположные эффекты на ряд метаболических процессов. Например, инсулин стимулирует активность пируватдегидрогеназы, гликогенсинтетазы, гексокиназы, фосфорилазы фосфатазы. Цистеамин на эти ферменты оказывает ингибирующее действие (24). Инсулин ингибирует фруктозо-1,6-бис-фосфатазу, а цистеамин ее активирует. Снижение концентрации цистеамина позитивно влияет на процессы, происходящие под воздействием инсулина. Активируется цикл Кребса, гликолиз, липогенез, синтетические процессы (25).

Спонтанно образующийся нуклеофильный цистеамин-глиоксилатный комплекс служит хорошим субстратом для оксидазы-D-аминокислот. Образование этого комплекса происходит в физиологических условиях в присутствии кислорода (23). Реакция оксидазы с цистеамин-глиоксилатным комплексом протекает значительно быстрее, чем с комплексами глиоксилата с аминоэтанолом, путресцином, аминопропанолом, октапамином, этилендиамином и этиловым эфиром цистеина. Нормальные физиологические амины, включая гистамин, серотонин, адреналин, норадреналин, спермин, спермидин и кадаверин, практически не реагируют с глиоксилатом посредством оксидазы D-аминокислот (26, 27). Предполагается, что продукт реакции глиоксилата с цистеамином может быть метаболическим эффектором, который после образования ковалентной связи способен усиливать реактивность ферментов и модифицировать нуклеиновые кислоты (28).

*Роль глиоксильной кислоты.* Для организма животных глиоксилат — крайне токсичное внутриклеточное соединение (29). Он контролирует мно-

жество реакций: ингибирует митохондриальный транспорт фосфора, транспорт электронов по цитохромной цепи и перенос митохондриальных субстратов, подавляет активность ферментов цикла Кребса. Глиоксилат, ингибируя фосфатазу пируватдегидрогеназного комплекса (его регуляторную субъединицу), снижает поток пировиноградной кислоты через пируватдегидрогеназный комплекс. Организму жизненно необходимо немедленно нейтрализовать этот высокорективный вредоносный двухуглеродный промежуточный продукт пероксисомальных реакций. Как уже отмечалось, лучшими субстратами пероксисомальных оксидаз служат неустойчивые неферментативно образующиеся комплексы глиоксилата с различными нуклеофильными агентами, в том числе с D-аминокислотами (19, 20).

Ингибиторы оксидаз-D-аминокислот. Оксидазы D-аминокислот обнаружены только в пероксисомах. Они играют особую роль в центральной нервной системе в связи с участием в обеспечении когнитивных функций, которые у животных мы связываем с агрессивностью, темпераментом и адаптируемостью к условиям кормления и содержания. Многие исследования активации и ингибирования оксидаз D-аминокислот посвящены расшифровке механизмов взаимодействия этого класса ферментов со специфическими рецепторами именно в тканях головного мозга (27, 30, 31).

К сильным неспецифическим ингибиторам оксидаз, в том числе оксидазы D-аминокислот, можно отнести АДФ, АДФ-рибозу, НАД·Н, НАДФ·Н, дифосфоКоА (промежуточный продукт синтеза КоА, наиболее эффективный из этого типа ингибиторов), которые при физиологических концентрациях ингибируют по ФАД-конкурентному механизму. К слабым неспецифическим ингибиторам относятся также КоА, ацетил-КоА, АТФ и др. (32, 33). То, что АДФ — эффективный ингибитор, а АТФ — нет, однозначно указывает на влияние энергетического состояния клетки на активность оксидаз. Восстановленные никотинамидные формы коэнзимов ингибируют, а окисленные — активируют оксидазы. Следовательно, окислительно-восстановительные системы клетки, что чрезвычайно важно учитывать, подвержены преимущественному влиянию  $O_2$  (разумеется, наряду с другими субстратно-метаболическими и кофакторными воздействиями) (34, 35).

*Роль инсулина.* Инсулин — один из наиболее значимых полифункциональных и обстоятельно изученных анаболических гормонов. Активируя  $Na^+K^+$ -зависимую аденозинтрифосфатазу, он усиливает транспорт в клетку как глюкозы, так и аминокислот. Вместе с тем инсулин ответствен за биосинтез и деградацию белков, рост мышечной массы, депонирование и расход энергетического материала в виде липидов и гликогена (23). Как мы уже отмечали, цистеамин оказывает антиинсулиновый эффект на метаболизм. Инсулин можно считать причастным практически ко всем основным процессам в организме: он активно стимулирует пируватдегидрогеназу, повышает синтез гликогена, активирует гликолиз, протеосинтез и липогенез, в то же время подавляя гликогенолиз и глюконеогенез, снижая липолиз. Как это уже понятно из предшествующего раздела, на все перечисленные процессы цистеамин оказывает противоположное влияние (23).

Имеющиеся сведения по ингибированию оксидаз свидетельствуют о том, что реакции, катализируемые оксидазой D-аминокислот, вовлекаются в регуляторную систему инсулина в клетке. Ранее мы детально рассматривали возможность существования у жвачных специфических механизмов индукции и взаимосвязанного функционирования пероксисом и инсулина, отличающихся от таковых у моногастричных животных (36, 37). Мы считаем, что изучение функциональной активности инсулярного аппарата, его взаимосвязи с общим гормональным статусом, величиной и

оперативностью метаболической и продуктивной ответной реакции на практически любые воздействующие факторы, служит определяющим условием для описания механизмов регуляции обмена веществ в организме животных (36). Была изучена величина и динамика продукции инсулина и соматотропина в зависимости от качественного и количественного состава рационов (36). На основании этих работ сложилось аргументированное мнение о том, что при усилении гидролиза в рубце и кишечнике в крови меняется концентрация инсулина и соматотропина, причем у первого — повышается, а у второго — снижается. Иначе говоря, индуцированная кормлением повышенная секреция инсулина ингибирует биосинтез и секрецию гормона роста, продуцируемого аденогипофизом. Серьезное биохимическое объяснение парадокса о разнонаправленности изменения концентраций этих двух важнейших для организма анаболических гормонов («инсулино-соматотропиновые ножницы») до сих пор отсутствует. Нами было выдвинуто предположение, что повышенная концентрация инсулина после кормления приводит к его большей связанности, а инсулин в связанном состоянии не обладает протеолитической активностью и не в состоянии активировать соматотропный гормон, который для этих целей требует участия специфических протеаз. Как следствие, после приема корма большая часть соматотропина находится в неактивной форме и слабо выявляется. По всей вероятности, такой механизм может отчасти объяснить разнонаправленность действия этих анаболических гормонов. Инсулин и соматотропин по влиянию на соматомедин синергисты, а по влиянию на метаболизм глюкозы и жирных кислот — антагонисты. Эти взаимоотношения как раз и регулируются «инсулино-соматотропиновыми ножницами». После приема корма необходимо не только накопление пластического и энергетического вещества в виде мышечной массы, но также углеводов и жиров в виде гликогена и депонированных липидов. Соматотропин стимулирует липолиз и глюконеогенез, в том числе из аминокислот. Поэтому после приема корма инсулин, активируя синтез гликогена и липогенез, предотвращает активацию соматотропина. При этом инсулин активирует гликолиз для использования производимой им энергии в синтезе мышечных белков.

Опыты на бычках при разных режимах кормления и применении гормонов и агониста  $\beta$ -адренорецепторов кленбутерола. В серии комплексных исследований на откармливаемых бычках холмогорской породы мы сравнили метаболические процессы при разной интенсивности кормления, скармливании рационов с неодинаковым количеством нерасщепляемого в рубце протеина, лизина и метионина, при последовательном использовании андрогенных и эстрогенных препаратов и тиреостатика бетазина, при применении разных доз кленбутерола — агониста  $\beta$ -адренорецепторов (36). Полученные результаты были убедительными, но неожиданными. Так, использование синтетического анаболика кленбутерола, равно как и интенсивное кормление, вызывали угнетение инсулярного аппарата поджелудочной железы, надпочечников, щитовидной железы. После отмены препаратов наблюдалось компенсаторное усиление функции этих желез. Мы обратили внимание на тот парадоксальный и никем не объясненный факт, что концентрация инсулина в крови снижается, хотя именно этот гормон в первую очередь ответствен за рост мышечной массы и запасание источников энергии для поддержания роста.

Хорошо известно, что и кленбутерол, и инсулин стимулируют биосинтез мышечного белка и снижают его деградацию (36). Однако инсулин повышает липогенез и подавляет липолиз, а кленбутерол снижает отложение жира. В другом нашем модельном опыте при скармливании бычкам эк-

зогенных анаболических половых стероидов и бетазина в печени снизилась активность всех дегидрогеназ цитратного цикла с резким повышением активности пируваткарбоксилазы в сочетании с высокой интенсивностью роста и значительным уменьшением концентрации 11-оксикортикостероидов, инсулина и соматотропина в крови (37, 38). При этом наиболее интенсивный рост и лучшие результаты по выходу туши, дополнительной мякоти в туше, содержанию белка в мякоти были у бычков с самым низким базальным уровнем инсулина и тиреоидных гормонов в крови. Такая направленность метаболических процессов и формирования продуктивных качеств животных совершенно не укладывается в существующую биохимическую парадигму. По нашему мнению, подобные факты могут получить физиолого-биохимическое объяснение только с учетом процессов, происходящих в пероксисомах. В частности, мы полагаем, что в рассмотренных экспериментах важную роль играет способность этих структур дополнительно обеспечивать организм глюкозой, образуемой из ацетата, что приводит к повышению активности цикла Кребса, и одновременно участвовать в индукции синтеза и секреции инсулина (1, 4, 37).

В работе G.A. Hamilton (23) была показана способность пероксисомальных оксидаз катализировать образование  $H_2O_2$  с расходом молекулярного кислорода. Вместе с тем хорошо известно, что снижение внутриклеточного парциального давления кислорода приводит к ингибированию окислительно-восстановительных реакций. Активной формой субстратов оксидаз D-аминокислот служит цистеамин-глиоксилатный комплекс. Комплексы образуются спонтанно и присутствуют в физиологических условиях в концентрациях, ведущих к значительным увеличениям скоростей реакций, катализируемых оксидазами D-аминокислот. Сам глиоксилат рассматривается как ингибитор окислительного метаболизма и дыхания *in vitro*. Он реагирует неферментативно с оксалоацетатом и дает оксалоацетонат (кетозицитрат), являющийся одновременно ингибитором аконитазы, НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы и  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназы. Помимо этого ингибируются митохондриальный транспорт фосфора и транспорт электронов по цитохромной цепи. Как уже отмечалось, оксидаза D-аминокислот окисляет глиоксилат в виде его комплекса с цистеамином, а цистеамин служит негативным внутриклеточным мессенджером инсулина. В свою очередь, инсулин способен тормозить образование цистеамина через ингибирование метаболизма КоА, в процессе чего образуется цистеамин. Инсулин, связываясь со своими рецепторами на мембранах, увеличивает жесткость последних и замедляет доступ внутриклеточных метаболитов КоА и фосфопантотеина к соответствующим ферментам — нуклеотидной пиррофосфатазе и щелочной фосфатазе, расположенным на поверхности мембраны, обращенной к цитоплазме (23).

Вместе с тем известно, что у животных с дефицитом пантотената развивается гипогликемия и они значительно более чувствительны к инсулину, чем животные с достаточным поступлением этого витамина. Известно также, что концентрация КоА не претерпевает значительных изменений при дополнительных инъекциях инсулина. Однако скорость его биосинтеза из пантотеновой кислоты резко снижается (90 % ингибирования в перфузируемом сердце). Скорость деградации КоА и синтез цистеамина снижаются инсулином. Как отмечалось выше, инсулин стимулирует активность пируватдегидрогеназы, гликогенсинтетазы, гексокиназы, фосфорилазы и фосфатазы. Цистеамин на эти ферменты оказывает ингибирующее действие. В то же время инсулин ингибирует фруктозо-1,6-бисфосфатазу, а цистеамин ее активирует. Поскольку инсулин уменьшает

концентрацию внутриклеточного кислорода, он должен, по нашей версии, снижать активность пероксисомальных оксидаз, что ведет к накоплению глиоксилата. В то же время снижение парциального давления кислорода незамедлительно ингибирует активность ферментов цикла Кребса. Уменьшение активности пероксисомальных оксидаз увеличивает концентрацию глиоксилата, который тоже служит активным ингибитором ферментов цикла Кребса и ферментов цитохромной системы. Сформировавшееся в результате метаболическое состояние клетки, по нашему мнению, и должно приводить к активации глиоксилатного цикла в пероксисомах.

По мнению G.A. Hamilton (23),  $H_2O_2$ , свободно проникая через мембраны, может проявлять инсулиноподобные эффекты. Однако эта идея не была воспринята большинством научной общественности, несмотря на то, что уже было получено солидное экспериментальное подтверждение быстрого фосфорилирования рецепторов инсулина в жировой ткани в присутствии перекиси водорода. Сходный механизм подтвержден для инсулиноподобного фактора роста IGF. Примечательно, что в очищенных плазматических мембранах (в отличие от гомогенатов) перекись водорода не проявляет подобного эффекта. Предполагается, что показанный инсулиноподобный эффект  $H_2O_2$  может быть опосредован именно стимуляцией фосфорилирования рецепторов инсулина перекисью водорода. Это приводит к повышению жесткости мембран и активированию  $Na^+/K^+$ -АТФазы в тканях, в том числе в миоцитах, что влечет за собой стимуляцию биосинтеза мышечных белков и роста мышечной массы. Перечисленным подтверждается способность  $H_2O_2$  оказывать инсулиноподобные эффекты. При этом активация рецепторов перекисью водорода требует присутствия ряда клеточных компонентов (22, 39-41). Эти факты мы расцениваем как подтверждение нашей гипотезы, согласно которой у интенсивно откармливаемых бычков при низкой концентрации инсулина в крови и активации пероксисомальных реакций не только в адипоцитах, но и в других тканях, в том числе в мышечной, под влиянием  $H_2O_2$  могут протекать процессы, сходные с таковыми при стимуляции инсулином. К ним, в частности, можно отнести наблюдаемое нами усиление биосинтеза мышечных белков. Кроме того, даже если не подтвердится роль  $H_2O_2$  как внутриклеточного мессенджера для инсулина (подобную функцию выполняет цистеамин), ее способность проявлять инсулиноподобные эффекты уже продемонстрирована (23, 24).

Для жвачных животных в условиях, когда в рубце образуется большое количество уксусной кислоты при хроническом дефиците глюкозы метаболически важно использовать часть уксусной кислоты на синтез органических кислот, из которых впоследствии образуется глюкоза. Этим аргументируется необходимость функционирования у таких животных глиоксилатного цикла, что позволяет при содержании в рационе достаточного количества легкоусвояемой клетчатки достигать высокой продуктивности без нарушений обмена веществ в формах кетозов и ацидозов (4). В сложных взаимосвязях в эксперименте с кленбутеролом мы усматриваем проявление механизмов специфического взаимодействия инсулина с пероксисомами. По нашей концепции, следует допустить, что применение кленбутерола вызывает активацию глиоксилатного цикла с усилением пероксисомального  $\beta$ -окисления жирных кислот. При этом за один оборот глиоксилатного цикла используется две молекулы активированной уксусной кислоты с образованием по одной молекуле сукцината, малата и оксалоацетата (37).

Глиоксилатный цикл. Во всех учебных пособиях по биохимии указывается на отсутствие у высших животных глиоксилатного цикла. Однако мы показали, что наряду с дегидрогеназами цикла Кребса и пируват-



карбоксилазой (ключевой фермент глюконеогенеза) в ткани печени бычков, интенсивно выращиваемых на мясо, функционируют ключевые ферменты глиоксилатного цикла изоцитратлиаза (КФ 4.1.3.1) и малатсинтаза (КФ 4.1.3.2) (1, 37). Поэтому мы считаем возможным допустить, что в обмене веществ, обеспечивающем высокую продуктивность жвачных животных, глиоксилатный цикл не только функционирует, усиливая поток метаболитов через цикл трикарбоновых кислот в терминальную окислительную цепь, но и совместно с дегидрогеназами цикла Кребса оказывает регуляторное влияние на общую направленность потока метаболитов (2, 4). Два упомянутых цикла, исполняя внутриклеточную эндоэкологическую функцию, интегрируют углеводный и липидный обмен, регулируя глюконеогенез, цикл Кребса и глиоксилатный цикл, цепи транспорта электронов. Это свидетельствует о количественной сопряженности потоков углерода, процессов в различных субклеточных компартментах и гормональной, субстратной, кофакторной, ферментной регуляции таких процессов. По нашему мнению, глиоксилатный цикл и цикл Кребса — два взаимодополняющих, взаимозависимых, взаимозаменяемых, взаиморегулируемых процесса.

Работами отечественных ученых показано функционирование глиоксилатного цикла у лабораторных животных — новорожденных, голодающих, диабетических и находящихся в экстремальных условиях (стресс) (42–45). Для обоснования нашей гипотезы принципиально значимо то, что все четыре описанных состояния можно объединить общей закономерностью — метаболическим дефицитом глюкозы, характерным и для жвачных животных, у которых гипогликемия — физиологическая норма. Рассмотренные факты позволяют нам предположить, что в процессе эволюции у жвачных могла выработаться и филогенетически закрепиться ответная реакция организма на хронически пониженную концентрацию глюкозы в крови. Одна из предполагаемых адаптаций — функционирование глиоксилатного цикла, постоянно индуцируемое дефицитом глюкозы, для дополнительного обеспечения обмена веществ этим важнейшим метаболитом. Суммируя, следует заключить, что глиоксилатный цикл у жвачных животных, во-первых (в порядке очередности, но не значимости), имеет непосредственное отношение к эндоэкологии клетки, во-вторых, связан с повышением метаболической производительности цикла трикарбоновых кислот (при его взаимодействии с циклом двухуглеродных кислот) для улучшения субстратного обеспечения высокой продуктивности и, в-третьих, участвует в координации основных внутриклеточных, межклеточных и межорганых обменных процессов во времени и пространстве.

Завершая обсуждение, вновь обращаем внимание на потенциальную метаболическую роль оксидазы D-аминокислот у жвачных. Мы рассматривали способность этого фермента гидролизовать субстраты с использованием молекулярного кислорода и образованием перекиси водорода. Как отмечалось, снижение внутриклеточного парциального давления кислорода приводит к ингибированию окислительно-восстановительных реакций, а его повышение — к их активации. Следовательно, оксидаза D-аминокислот способна внести вклад во внутриклеточную регуляцию на двух уровнях: снижая концентрацию кислорода и повышая концентрацию  $H_2O_2$ .

Итак, нами предложена гипотеза о регуляции обмена веществ в организме высокопродуктивных жвачных животных с учетом роли прооксидантных систем, гормонов, клеточных компартментов, сопряженных циклов трикарбоновых и двухуглеродных кислот. Известные законы биохимической логики допускают существование изложенной гипотетической цепи метаболических превращений, а предлагаемый подход позволяет скорректировать

традиционную парадигму. Кроме того, он способен внести лепту в восприятие целого ряда полученных парадоксальных и пока что ожидающих интерпретации экспериментальных фактов, вскрытых нами и многими авторами при изучении специфики обмена веществ у высокопродуктивных жвачных животных. Объем накопленных знаний позволяет скорректировать имеющиеся физиолого-биохимические представления на принципиально новой концептуальной платформе. В ее основе заложено тонкое сплетение взаимосвязей митохондриального цикла Кребса, цитоплазматических процессов гликолиза и глюконеогенеза с пероксисомальным глиоксилатным циклом. Для понимания их ведущей роли в регуляции обмена веществ у высокопродуктивных жвачных необходимо учитывать комплекс многофакторных взаимосвязей между инсулином, пероксисомальными цистеамином, глиоксилатом, дегидрогеазами цикла Кребса, кислородом, гидропероксидом и оксидазами D-аминокислот. Естественно, предлагаемая гипотетическая концепция нуждается в дополнительном осмыслении, дальнейшей доработке и широкой экспериментальной верификации.

*ФГБНУ Всероссийский НИИ физиологии, биохимии и питания животных — филиал ФГБНУ ФНЦ животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста,*  
249013 Россия, Калужская обл., г. Боровск, пос. Институт,  
e-mail: bifip@kaluga.ru ✉, serna-sun@mail.ru

*Поступила в редакцию*  
*3 мая 2016 года*

*Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2018, V. 53, № 2, pp. 223-234*

## THE HYPOTHESIS OF A SPECIFIC RELATIONSHIP BETWEEN PEROXISOMAL, MITOCHONDRIAL, AND CYTOPLASMIC PROCESSES IN METABOLIC REGULATION OF HIGHLY PRODUCTIVE RUMINANTS

*V.P. Galochkina, A.V. Agafonova, V.A. Galochkin*

*All-Russian Research Institute of Animal Physiology, Biochemistry and Nutrition — Branch of Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, Federal Agency of Scientific Organizations, pos. Institut, Borovsk, 249013 Russia, e-mail bifip@kaluga.ru (✉ corresponding author V.A. Galochkin), serna-sun@mail.ru*

ORCID:

Galochkina V.P. [orcid.org/0000-0002-3121-7339](http://orcid.org/0000-0002-3121-7339)

Galochkin V.A. [orcid.org/0000-0002-5075-3647](http://orcid.org/0000-0002-5075-3647)

Agafonova A.V. [orcid.org/0000-0002-3749-4759](http://orcid.org/0000-0002-3749-4759)

The authors declare no conflict of interests

Received May 3, 2016

doi: 10.15389/agrobiol.2018.2.223eng

### Abstract

The authors believe that the explanation of the accumulated data on metabolic processes in highly productive ruminant animals, which for the time being remains within the framework of the existing physiological and biochemical paradigm, requires an in-depth interpretation on a fundamentally new experimental and conceptual basis, which assumes an analysis of the complex interconnections of the set of objects and their functions that were previously not considered. First, it is necessary to consider the biochemistry of intracellular compartmentalization from a different point of view based on the strict mutual complementarity of the mitochondrial Krebs cycle and the cytoplasmic glycolysis and gluconeogenesis with a peroxisomal glyoxylate cycle. The possibility of glyoxylate cycle functioning in highly productive ruminants was postulated by the authors for the first time following from experimental data on catalytic activity of isocitrate lyase (EC 4.1.3.1) and malate synthase (EC 4.1.3.2) (V.P. Galochkina et al., 2012). The presence of these enzymes allows the synthesis of glucose from acetic acid, which comes in large quantities from the contents of the rumen. Ruminants are physiologically hypoglycemic. Phylogenetically, they mainly eat coarse vegetable food which increases the proportion of acetate in the rumen content. Easily hydrolyzed carbohydrates in the rumen content reduce the percentage of acetate and increase the proportion of propionate and butyrate, which results in a decreased pH (M. Oba et al., 2015). Permanent glucose deficiency causes an increase in the somatotropin to insulin level indicating an increase in the metabolically ineffective gluconeogenesis. Simultaneously, the blood concentration of unesterified fatty acids increases, indicating an increase in lipolysis in fat depots. There is a low ratio of insulin to glucagon with an increase in urea concentration. Milk fat content reduces (F. Piccioli-Cappelli et al., 2014). Peroxisomes are partially capable of beta-oxidation of fatty acids to C 13, which facilitates Krebs cycle and allows changes

in its metabolic orientation. The authors consider the glyoxylate cycle as a chance which enables the animal to improve metabolism and intensify productivity. Bicarbon acid oxidation is energetically more effective compared to tricarboxylic acid cycle, since the glyoxylate cycle is a shortened of tricarboxylic acid cycle capable of functioning without limiting isocitrate dehydrogenase and alpha-ketoglutarate dehydrogenase reactions (V.P. Galochkina et al., 2011). Secondly, one must consider hypothetical provisions on the leading regulatory role of multifactorial interrelationships between mono- and multimolecular constellations of mono- and polymeric biologically active substances, hormones and enzymes, both temporarily formed and constant. This extensive group of specific agents includes insulin, peroxisomal cysteamine, glyoxylic acid, oxygen, hydroperoxide and D-amino acid oxidases. The theoretical positions stated in the article have passed primary validation in model experiments on intensively fattened bulls with the use of clenbuterol, the agonist of beta-adrenergic receptors.

Keywords: regulation of metabolism, peroxisomes, glyoxylate cycle, D-amino acid oxidase, glyoxylate, cysteamine, insulin, hydroperoxide, oxygen.

## REFERENCES

- Galochkina V.P., Solodkova A.V., Galochkin V.A. *Trudy regional'nogo konkursa proektov fundamental'nykh nauchnykh issledovaniy*, 2012, 17: 205-214 (in Russ.).
- Oba M., Mewis J.L., Zhining Z. Effects of ruminal doses of sucrose, lactose, and cornstarch on ruminal fermentation and expression of genes in ruminal epithelial cells. *J. Dairy Sci.*, 2015, 98(1): 586-594 (doi: 10.3168/jds.2014-8697).
- Piccioli-Cappelli F., Loor J.J., Seal C.J., Minuti A., Trevisi E. Effect of dietary starch level and high rumen-undegradable protein on endocrine-metabolic status, milk yield, and milk composition in dairy cows during early and late lactation. *J. Dairy Sci.*, 2014, 97(12): 7788-80 (doi: 0.3168/jds.2014-8336).
- Galochkina V.P., Solodkova A.V., Galochkin V.A. *Problemy biologii produktivnykh zivotnykh*, 2011, 4: 5-18 (in Russ.).
- Galochkin V.A., Agafonova A.V., Galochkina V.P., Cherepanov G.G. *Problemy biologii produktivnykh zivotnykh*, 2015, 1: 5-25 (in Russ.).
- Sandalio L.M., Romero-Puertas M.C. Peroxisomes sense and respond to environmental cues by regulating ROS and RNS signalling networks. *Ann. Bot.*, 2015, 116(4): 475-485 (doi: 10.1093/aob/mcv074).
- Pascual-Ahuir A., Manzanares-Estreder S., Proft M. Pro- and antioxidant functions of the peroxisome-mitochondria connection and its impact on aging and disease. *Oxid. Med. Cell Longev.*, 2017, 2017: 9860841 (doi: 10.1155/2017/9860841).
- Del Río L.A., López-Huertas E. ROS generation in peroxisomes and its role in cell signaling. *Subcell. Biochem.*, 2013, 69: 231-55 (doi: 10.1007/978-94-007-6889-5\_13).
- Santillo A., Falvo S., Chieffi P., Burrone L., Chieffi Baccari G., Longobardi S., Di Fiore M.M. D-aspartate affects NMDA receptor-extracellular signal-regulated kinase pathway and upregulates androgen receptor expression in the rat testis. *Theriogenology*, 2014, 81(5): 744-751 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.12.009).
- De Duve C., Baudhuin P. Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol. Rev.*, 1966, 46: 323-357 (doi: 10.1152/physrev.1966.46.2.323).
- Schrader M., Yoon Y. Mitochondria and peroxisomes: are the 'Big Brother' and the 'Little Sister' closer than assumed? *Bioassays*, 2007, 29: 1105-1114 (doi: 10.1002/bies.20659).
- Camos F., Bonekamp N.A., Delille H.K., Schrader M. Organelle dynamics and dysfunction: a closer link between peroxisomes and mitochondria. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 2009, 32: 163-180 (doi: 10.1007/s10545-008-1018-3).
- Ohide H., Miyoshi Y., Maruyama R., Hamase K., Konno R. D-Amino acid metabolism in mammals: biosynthesis, degradation and analytical aspects of the metabolic study. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 2011, 879(29): 3162-3168 (doi: 10.1016/j.jchromb.2011.06.028).
- He L., He T., Farrar S., Ji L., Liu T., Ma X. Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species. *Cell Physiol. Biochem.*, 2017, 44(2): 532-553 (doi: 10.1159/000485089).
- Tripathi D.N., Walker C.L. The peroxisome as a cell signaling organelle. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2016, 39: 109-12 (doi: 10.1016/j.ceb.2016.02.017).
- Trompier D., Vejux A., Gondcaille C., Geillon F., Nury T., Savary S., Lizard G. Brain peroxisomes. *Biochimie*, 2014, 98: 102-110 (doi: 10.1016/j.biochi.2013.09.009).
- Yamanaka M., Miyoshi Y., Ohide H., Hamase K., Konno R. D-Amino acids in the brain and mutant rodents lacking D-amino acid oxidase activity. *Amino Acids*, 2012, 43(5): 1811-1821 (doi: 10.1007/s00726-012-1384-x).
- Haruta N., Iizuka H., Ishii K., Yoshihara S., Ichiba H. Alteration in the plasma concentration of a DAAO inhibitor, 3-methylpyrazole-5-carboxylic acid, in the ketamine-treated rats and the influence on the pharmacokinetics of plasma D-tryptophan. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol.*

- Sci.*, 2011, 87(10): 641-648 (doi: 10.2183/pjab.87.641).
19. Sasabe J., Suzuki M., Imanishi N. Activity of D-amino acid oxidase is widespread in the human central nervous system. *Front. Synaptic Neurosci.*, 2014, 6: 14 (doi: 10.3389/fnsyn.2014.00014).
  20. Zhao W.J., Yin M. Advances in the study of D-amino acid oxidase in the central nervous system. *Sheng Li Ko Hsueh Chin Chan [Progress in physiological sciences]*, 2008, 39(1): 64-66 (in Chinese) (PMID: 18357693).
  21. Hayes G.R., Lockwood D.N. Role of insulin receptor phosphorylation in the insulinomimetic effects of hydrogen peroxide. *PNAS USA*, 1987, 84(22): 8115-8119 (doi: 10.1073/pnas.84.22.8115).
  22. Hamilton G.A. Peroxisomal oxidases and suggestions for the mechanism of action of insulin and other hormones. In: *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*. A. Meister (ed.). John Wiley & Sons, 1985, V. 57: 85-178 (doi: 10.1002/9780470123034.ch2).
  23. Hamilton G.A., Buckthal D.J., Mortensen R.M., Zerby K.W. Reactions of cysteamine and other amine metabolites with glyoxylate and oxygen catalyzed by mammalian D-amino acid oxidase. *PNAS USA*, 1979, 76(6): 2625-2629 (PMCID: PMC383660 PMID: 37501).
  24. Farias R.N. Insulin-membrane interaction and membrane fluidity changes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1987, 906(3): 459-468 (doi: 10.1016/0304-4157(87)90020-7).
  25. Nishina Y. Structure and reaction mechanism of D-amino acid oxidase. *SEIKAGAKU [Journal of Japanese Biochemical Society]*, 2008, 80(6): 569-578 (in Japanese) (PMID: 18634432).
  26. Haruta N., Iizuka H., Ishii K., Yoshihara S., Ichiba H., Fukushima T. Alteration in the plasma concentration of a DAAO inhibitor, 3-methylpyrazole-5-carboxylic acid, in the ketamine-treated rats and the influence on the pharmacokinetics of plasma D-tryptophan. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences*, 2011, 87(10): 641-648 (doi: 10.2183/pjab.87.641).
  27. Hawkins J., Mahony D., Maetschke S., Wakabayashi M., Teasdale R.D., Bodén M. Identifying novel peroxisomal proteins. *Proteins*, 2007, 69: 606-616 (doi: 10.1002/prot.21420).
  28. Salido E., Pey A.L., Rodriguez R., Lorenzo V. Primary hyperoxalurias: disorders of glyoxylate detoxification. *Biochim. Biophys. Acta*, 2012, 1822(9): 1453-1464 (doi: 10.1016/j.bbadis.2012.03.004).
  29. Lu J.M., Gong N., Wang Y.C., Wang Y.X. D-Amino acid oxidase-mediated increase in spinal hydrogen peroxide is mainly responsible for formalin-induced tonic pain. *Br. J. Pharmacol.*, 2012, 165(6): 1941-1955 (doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01680.x).
  30. Gustafson E.C., Morgans C.W., Tekmen M., Sullivan S.J., Esguerra M., Konno R., Miller R.F. Retinal NMDA receptor function and expression are altered in a mouse lacking D-amino acid oxidase. *J. Neurophysiol.*, 2013, 110(12): 2718-2726 (doi: 10.1152/jn.00310.2013).
  31. Khoronenkova S.V., Tishkov V.I. D-amino acid oxidase: physiological role and applications. *Biochemistry*, 2008, 73(13): 1511-1518 (doi: 10.1134/S0006297908130105).
  32. Kawazoe T., Park H.K., Iwana S., Tsuge H., Fukui K. Human D-amino acid oxidase: an update and review. *Chem. Rec.*, 2007, 7(5): 305-315 (doi:10.1002/tcr.20129).
  33. Bonekamp N.A., Volkl A., Fahimi H.D., Schrader M. Reactive oxygen species and peroxisomes: struggling for balance. *BioFactors*, 2009, 35: 346-355 (doi: 10.1002/biof.48).
  34. Saam J., Rosini E., Molla G., Schulten K., Pollegioni L., Ghisla S. O<sub>2</sub> reactivity of flavoproteins dynamic access of dioxygen to the active site and role of H<sup>+</sup> relay system in D-amino acid oxidase. *J. Biol. Chem.*, 2010, 285(32): 24439-24446 (doi: 10.1074/jbc.M110.131193).
  35. Galochkina V.P., Galochkin V.A. *Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh*, 2007, 2: 84-93 (in Russ.).
  36. Galochkina V.P., Galochkin V.A. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk*, 2009, 49(1): 66-76 (in Russ.).
  37. Fomichev Yu.P., Levantin D.L., Dzyuba N.F., Radchenkov V.P., Butrov E.V., Golenkevich E.K. *Vestnik sel'skokhozyaistvennoi nauki*, 1977, 2(245): 85-92 (in Russ.).
  38. Islinger M., Grille S., Fahimi D.H., Schrader M. The peroxisome: an update on mysteries. *Histochem. Cell Biol.*, 2012, 137(5): 547-574 (doi: 10.1007/s00418-012-0941-4).
  39. Yang T., Poovaiah B.W. Hydrogen peroxide homeostasis: activation of plant catalase by calcium/calmodulin. *PNAS USA*, 2002, 99(6): 4097-4102 (doi: 10.1073/pnas.052564899).
  40. Tsai S.C., Lu C.C., Lin C.S., Wang P.S. Antisteroidogenic actions of hydrogen peroxide on rat Leydig cells. *J. Cell. Biochem.*, 2003, 90: 1276-1286 (doi: 10.1002/jcb.10738).
  41. Volvenkin S.V., Popov V.N., Eprintsev A.T. *Biokhimiya*, 1999, 64(9): 1185-1191 (in Russ.).
  42. Popov V.N., Volvenkin S.V., Eprintsev A.T., Igamberdiev A.U. Glyoxylate cycle enzymes are present in liver peroxisomes of alloxan-treated rats. *FEBS Lett.*, 1998, 440(1-2): 55-58 (doi: 10.1016/S0014-5793(98)01422-7).
  43. Kondrashova M.N., Rodionova M.A. *Doklady AN SSSR*, 1971, 196(5): 1225-1227 (in Russ.).
  44. Popov V.N., Volvenkin S.V., Eprintsev A.T., Igamberdiev A.U. *Izvestiya RAN, Seriya biologicheskaya*, 2000, 6: 672-678 (in Russ.).