

РЕГУЛЯЦІЯ АКТИВНОСТІ 2-ОКСОГЛУТАРАТДЕГІДРОГЕНАЗИ З ПЕЧІНКИ ЩУРІВ КОФЕРМЕНТАМИ І МЕТАБОЛІТАМИ ТІАМІНУ

Н. Федорко, О. Устянська, С. Петров

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65066, Україна
e-mail: ustjansky_olga@ukr.net

Досліджено механізми регуляції метаболітами тіаміну та коферментами мультіензимного 2-оксоглутаратдегідрогеназного комплексу. Показана стимулююча дія ліпоєвої кислоти і суміші всіх п'яти коферментів на частково очищений 2-оксоглутаратдегідрогеназний комплекс. Катаболіт тіаміну тіохром пригнічував активність ферменту.

Ключові слова: 2-оксоглутаратдегідрогеназа, коферменти, тіамін, мультіензимний комплекс.

Багато дослідників приділяли увагу розкриттю будови, функціонування та регуляції активності дегідрогеназ 2-оксокислот. Серед різноманітних механізмів регуляції активності поліферментних комплексів особливу увагу надають вітаміно-коферментній регуляції. Важлива роль у цій регуляції належить тіамініпірофосфату (ТПФ) у зв'язку з його участю в першій реакції, яку каталізує цей комплекс [2, 3, 6, 7, 14].

Інші коферменти дегідрогеназ 2-оксокислот виконують свої функції на рівні компонентів, які не обмежують швидкість сумарної реакції, але увага до них останнім часом зростає, особливо у зв'язку з тим, що 2-оксоглутаратдегідрогеназний комплекс (2-ОГДК) не має механізму регулювання активності шляхом фосфорилування / дефосфорилування [1, 2, 13, 14].

У попередніх дослідженнях було показано, що введення тваринам окремих вітамінів, їх суміші, а також додавання *in vitro* відповідних коферментів активувало піруватдегідрогеназний комплекс (ПДК) і 2-ОГДК. Найбільший активуючий ефект давали ліпоат, пантотеат і тіамін, трохи менший вплив спостерігався при додаванні рибофлавіну й нікотинату [4, 7, 8]. Найбільш ефективними з коферментів були ліпоєва кислота (ЛК) і кофермент ацелювання (КоА) [4, 7, 14].

У попередніх дослідженнях було показано, що введення ¹⁴C-тіаміну сприяло зростанню мічених його метаболітів, а також активності ПДК і 2-ОГДК у тканинах і мітохондріях тварин [9, 10].

У зв'язку з цим ми поставили завдання вивчити активність 2-оксоглутаратдегідрогенази на рівні частково очищеного ферменту за наявності *in vitro* тіаміну, його метаболітів, окремих коферментів, які входять до складу 2-ОГДК та їх суміші.

Матеріали та методи

Дослідження виконано на статевозрілих щурах-самцях лінії Вістар, вагою 180-200 г. У попередніх дослідженнях нами було встановлено, що через 2 години після введення тіаміну спостерігався максимум його накопичення в печінці [8–10]. Тому через 2 години після введення ¹⁴C-тіаміну у дозі 1,5 мкМ/кг проводили виділення й очищення 2-оксоглутаратдегідрогеназного комплексу за методом Роше і Кейт [19]. Активність

очищеного ферменту визначали методом Варбурга [5]. Вміст білка визначали за методом Лоурі [18]. Підрахунок радіоактивності здійснювали на радіаційному лічильнику «Протока». Тіамін і його метаболіти: тіохром, 4-метил-5β-оксіетилгіазол, тіамініпрофосфат додавали в інкубаційне середовище в кінцевій концентрації 1 мкМ.

Мілімолярні співвідношення коферментів були такими: ТПФ – 0,015; нікотинаміддинуклеотид (НАД⁺) – 0,6; КоА – 0,375; ЛК – 0,225; флавінмононуклеотид (ФМН) – 0,075.

Статистичну обробку результатів здійснювали за загальноприйнятим методом Стьюдента – Фішера [11]. Розрахунки проводили з використанням пакету Microsoft® EXCEL. Результати вважали вірогідними при $P < 0,05$.

Результати дослідження і їх обговорення

Після виділення ферментного комплексу із мітохондрій печінки щурів визначали його активність і вміст у ньому мічених метаболітів тіаміну на окремих етапах очищення.

Активність 2-ОГДК після введення тваринам ¹⁴C-тіаміну збільшувалася по мірі його очищення. Так порівняно з мітохондріальною фракцією у субкомплексі (ПДК + 2-ОГДК) спостерігалось зростання активності у два рази, а в очищеному 2-ОГДК – більш ніж у три рази (рис.1).

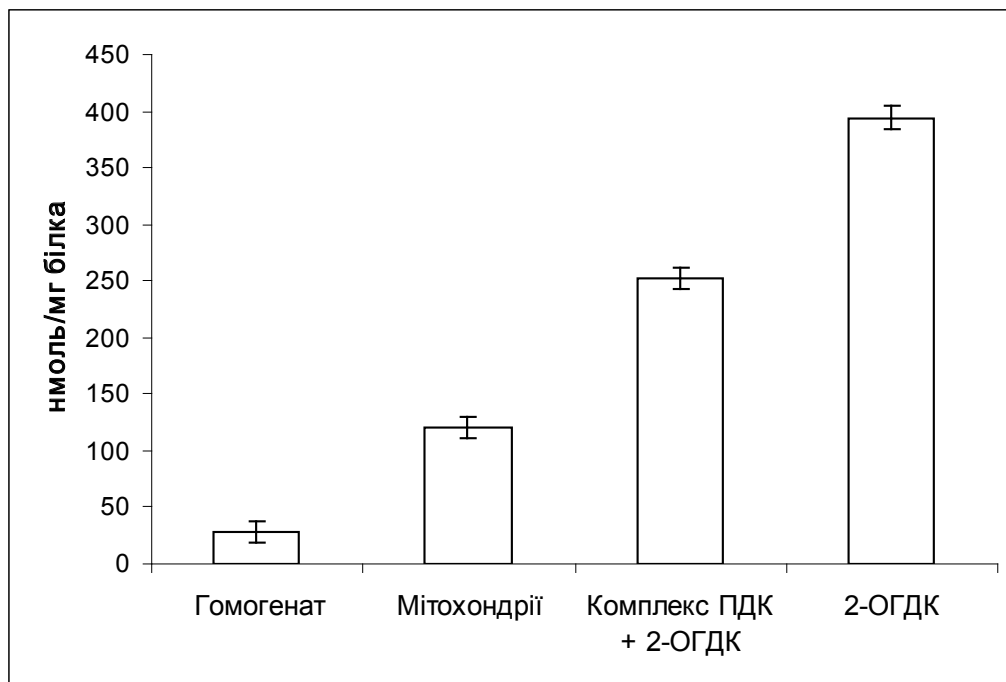


Рис. 1. Активність 2-ОГДК на різних етапах виділення ферменту після внутрішньом'язового введення щурам ¹⁴C-тіаміну в дозі 1,5 мкМ/кг.

Вміст мічених метаболітів тіаміну був удвічі більшим, а в очищеному 2-ОГДК у 2,5 рази більшим порівняно з мітохондріальною фракцією в розрахунку на 1 мг білка (рис.2).

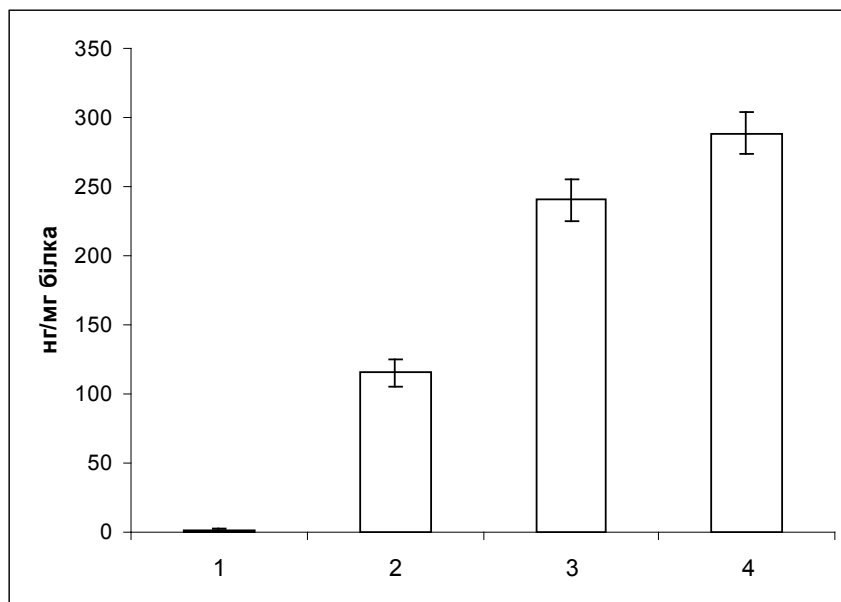


Рис. 2. Вміст мічених метаболітів тіаміну в мітохондріях і частково очищеному 2-ОГДК після внутрішньом'язового введення щурам ^{14}C -тіаміну в дозі 1,5 мкМ/кг: 1 – гомогенат; 2 – мітохондрії; 3 – комплекс ПДК + 2-ОГДК; 4 – 2-ОГДК.

Внесення в інкубаційне середовище метаболітів тіаміну: ТМФ, ТПФ, тіохрому, 4-метил-5 β -оксіетилтіазолу сприяло пригніченню активності ферменту, і найбільшою мірою це явище спостерігалось при внесенні тіохрому (рис. 3).

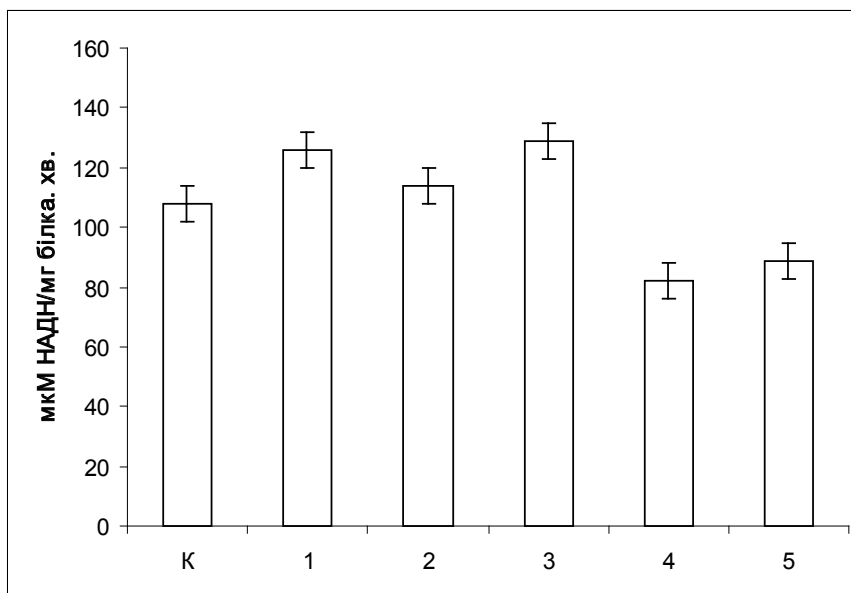


Рис. 3. Вплив тіаміну та його метаболітів на активність очищеного препарату 2-ОГДК: К – контроль; 1 – тіамін; 2 – ТМФ; 3 – ТПФ; 4 – тіохром; 5 – 4-метил-5 β -оксіетилтіазол.

Це можна пояснити тим, що в метаболітах тіаміну існують гетероцикли, подібні до гетероциклів у коферментах 2-ОГДК. Тому додавання у середовище інкубації фосфорних ефірів тіаміну, тіохрому і 4-метил-5β-оксіетилгіазолу, можливо, впливало на ефективність зв'язування інших коферментів.

Додання *in vitro* окремих коферментів у середовище інкубації призводило до помітного збільшення ферментативної активності тільки у випадку ЛК (в 1,5 разу), а ТПФ, НАД і ФМН навіть пригнічували активність ферменту (рис.4).

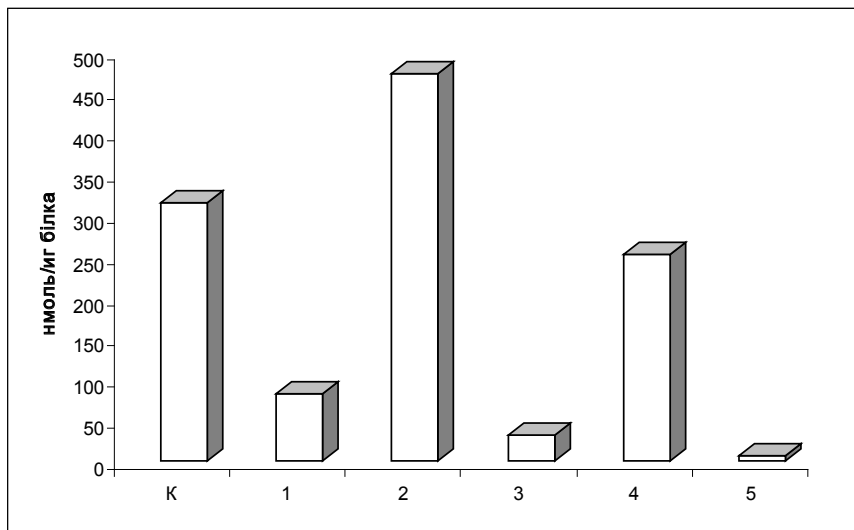


Рис. 4. Активність 2-ОГДК при додаванні коферментів в інкубаційне середовище, n = 3: К – контроль; 1 – ТПФ; 2 – ЛК; 3 – НАД; 4 – КоА; 5 – ФМН.

При внесенні в середовище інкубації коферментів попарно у різних варіантах найбільш ефективними комбінаціями були: КоА + ТПФ, КоА + ЛК, КоА + НАД (рис. 5).

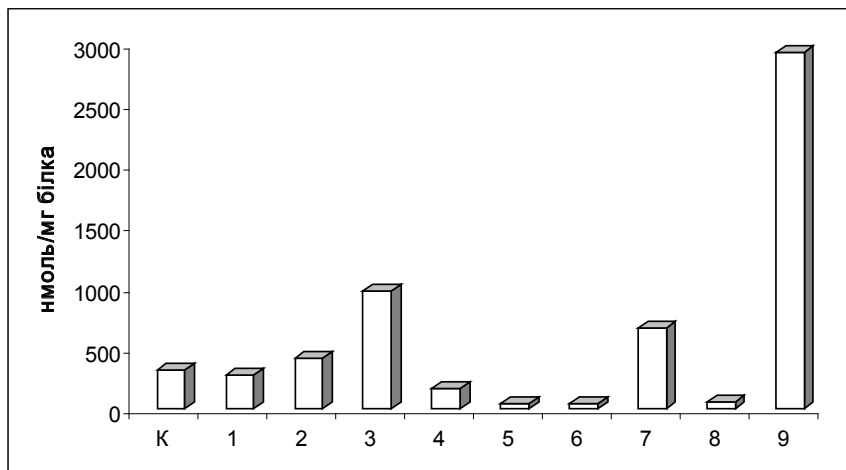


Рис. 5. Активність 2-ОГДК після додавання поєднань коферментів і загальної суміші *in vitro*, n = 3: К – контроль; 1 – ТПФ + ЛК; 2 – КоА + НАД; 3 – КоА + ТПФ; 4 – КоА + ФМН; 5 – ЛК + ФМН; 6 – ЛК + НАД; 7 – ЛК + КоА; 8 – ФМН + НАД; 9 – суміш коферментів.

Активність ферменту в цих випадках збільшилась у 3,2 та 1,3 рази відповідно щодо контролю. Суміш коферментів, доданих у співвідношенні, властивому для дегідрогеназ 2-оксокислот, збільшувала активність 2-ОГДК більш ніж у десять разів.

Отримані дані вказують на різноспрямованість дії окремих метаболітів тіаміну та коферментів, які входять до складу 2-ОГДК на активність очищеного ферментного комплексу і можуть свідчити про часткову їх втрату при виділенні ферментного комплексу. ТПФ, НАД і ФАД міцно зв'язані зі субодиницями ферментного комплексу, і додаткове додавання їх до комплексу призводить до дисбалансу коферментної регуляції та, як наслідок, до зниження активності 2-ОГДК.

Особливої уваги заслуговує ЛК, стимулюючий ефект якої не можна пояснити тільки з позиції втрати коферменту при виділенні ферментного комплексу. Внаслідок специфічного розташування і функціонування ЛК у трансцетилазному компоненті комплексу визначається її найважливіша роль у коферментній регуляції цього мультиензиму.

Це також підтверджується при додаванні в середовище інкубації коферментів у поєднанні (ЛК + КоА) і (КоА + ТПФ), що призводить до найбільшого ефекту стимуляції активності цього ферменту.

Отримані дані не тільки відображають коферментну регуляцію мультиензимного комплексу, але і свідчать про можливість реасоціації субодиниць цього мультиензиму.

Встановлено, що тіамін і його метаболіти знижують активність 2-ОГДК на рівні декарбоксилазного компонента. Ліпоева кислота виявляє стимулюючу дію на рівні трансцетилазного компонента.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Гомазкова В. С.* Очистка, разделение и некоторые свойства α -кетоглутаратдегидрогеназы из грудной мышцы голубя: Автореф. дис... канд. биол. наук.: 03.00.04. М. 1972. 25 с.
2. *Глемжа А. А., Зильбер Л. С., Северин С. Е.* Выделение и очистка 3-х компонентов мышечной пируватдегидрогеназы // Биохимия. 1966. № 5. С. 1035-1040.
3. *Глемжа А. А.* Пируватдегидрогеназа: механизм действия и структура // Успехи биол. химии. 1969. № 10. С. 89-118.
4. *Карпов Л. М., Полесья Т. Л.* Действие функционально связанных витаминов и их коферментных форм на активность дегидрогеназ 2-оксокислот в органах мышей // Укр. біохім. журн. 1989. Т. 61. № 4. С. 82-87.
5. *Островский Ю. М.* Экспериментальная витаминология. Минск: Наука и техника, 1979.- С. 176-233.
6. *Пархоменко Ю. М., Черныш И. Ю., Чурилова Т. Я. и др.* Влияние тиа-минфосфатов на активность регуляторных ферментов пируватдегидрогеназного комплекса // Укр. биол. журнал. 1987. 59. № 5. С. 49-54.
7. *Петров С. А.* Особенности взаимодействия функционально связанных витаминов в организме мидий, кефали и крыс: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.04 / Белорусский государственный университет. Минск. 1979. 23 с.
8. *Розанов А. Я.* Фазовая динамика метаболизма в печени коферментных витаминов, ее механизмы и биологическое значение // Витамины. 1976. Вып. 9. С. 34-42.
9. *Розанов А. Я., Карпов Л. М.* Возрастные особенности динамики поступления в ткани крыс парэнтерально введенных ^{35}S -тиамина и его фосфорных эфиров // Укр. биол. журн. 1981. № 6. Т. 53. С. 58-64.

10. Розанов А. Я., Федорко Н. А., Петров С. А. Отногенетические особенности накопления и обновления тиамин в органах пищеварительной системы белых крыс // Физиол. журн. 1989. Т. 35. № 1. С. 68-71.
11. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. Минск: Вышэйшая школа. 1973. 320 с.
12. Струмило С., Островцова С., Киселевский Ю. и др. Кинетическая характеристика пируват- и оксоглутаратдегидрогеназного комплексов из сердца человека. М., 1990. 10 с. Деп. в ВИНТИ 17.01.90. № 341 – В.
13. Струмило С. А. Регуляция активности полиферментного пируватдегидрогеназного комплекса тканей млекопитающих // Успехи совр. биол. 1988. Т. 106. Вып. I (4). С. 54-68.
14. Федорко Н. Л. Вікові особливості вітамінної і коферментної регуляції 2-оксоглутарат-дегідрогеназного комплексу в печінці і дванадцятипалій кишці шурів. Автореф. дис ... канд. біол. наук.: 03.00.04. Харків. 2006. 20 с.
15. Formation of functional heterodimers by isozymes 1 and 2 of pyruvate dehydrogenase kinase / Bulatnikov I., Popov K. M. // Biochem. Biophys. Acta. 2003. V. 1645. № 2. P. 183-192.
16. Jonson D., Lardy H. Methods in enzymology // New York. 1977. V. 167. № 10. P. 94-102.
17. Kiessling K. H. Lundquist C. G. Thiamin diphosphate in growing tissues. III. Pyruvate oxidation in liver mitochondria from young an from thiamin di phosphate defficient adult rats // Experim. Cell. Res. 1962. V. 26. № 1. P. 189-197.
18. Lowry O. H., Rosenbrough N. I., Fan A. Z. at al. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265-275.
19. Roche I. E., Cate R. J. Purification of porcine liver pyruvate dehydrogenase complex and characterization of its catalitic and regulatory properties // Arch. of Biochem. and Biophys. 1977. V. 183. P. 664-667.

Стаття: надійшла до редакції 28.12.10

доопрацьована 04.03.11

прийнята до друку 11.05.11

RAT LIVER 2-OXOGLUTARATE DEHYDROGENASE ACTIVITY REGULATION BY THIAMINE AND ITS METABOLITES AND CO-ENZYMES

N. Fedorko, O. Ustjansky, S. Petrov

*Mechnikov National University of Odessa
2, Dvoryanska St., Odessa 65066, Ukraine
e-mail: ustjansky_olga@ukr.net*

Regulation effects are in-process investigational by coferments and метаболітами thiamine of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex. At the level of the partly cleared enzyme the oppressive operating of thiaminepyrophosphate and thiochrome is shown on activity of 2-oxoglutarate dehydrogenase. It is been established that thiamine and its metabolites suppress of 2-oxoglutarate dehydrogenase activity at the level of decarboxylases componenty. Lipois acid causes a stimulanting effect at the level of the transacetylase componenty, which is necessary for regulation of activity of polienzyme complex at the variou conditions of in tissues.

Keywords: 2-oxoglutarate dehydrogenase, co-enzymes, thiamine, multienzyme complex.

**РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ 2-ОКСОГЛУТАРАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ
ИЗ ПЕЧЕНИ КРЫС КОФЕРМЕНТАМИ И МЕТАБОЛИТАМИ ТИАМИНА****Н. Федорко, О. Устянская, С. Петров***Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова
ул. Дворянская, 2, Одесса 65066, Украина
e-mail: ustjansky_olga@ukr.net*

В работе исследованы эффекты регуляции коферментами и метаболитами тиамин 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплекса. На уровне частично очищенного фермента показано угнетающее действие ТПФ и тиохрома на активность 2-ОГДК. Установлено, что тиамин и его метаболиты угнетают активность 2-ОГДК на уровне декарбоксилазного компонента, а липоевая кислота оказывает стимулирующее действие на уровне трансацетилазного компонента, что необходимо для регуляции активности полиферментного комплекса при различных состояниях ткани.

Ключевые слова: 2-оксоглутаратдегидрогеназа, коферменты, тиамин, мультиэнзимный комплекс.