ДОПОВІДІ
НАЦІОНАЛЬНОЇ
АКАДЕМІЇ НАУК
УКРАЇНИ

3 • 2007

БІОХІМІЯ

УДК 577.112.3:612.39

© 2007

Академік НАН України **М. Ф. Гулий, Н. В. Сілонова, Т. М. Печенова, Н. Ф. Шевцова**

Про можливість зворотного формілування амінокислот в тканинах щурів у дослідах in vivo та in vitro

On the in vitro and in vivo systems of different rat tissues, the reversibility of the processes of enzymatic interaction between free amino acids and formate is demonstrated. Their dependence on the intracellular localization, duration of the interaction, and concentrations of formate and amino acids is studied.

З'ясування біологічної ролі ряду біогенних низькомолекулярних сполук [1–4] відкриває нові можливості щодо регуляції метаболічних процесів в організмі, корекції їх патологічних відхилень та спрямування у певному напрямі. На особливу увагу у зв'язку з цим заслуговує вивчення метаболічних процесів із залученням форміату [5, 6]. У попередніх дослідженнях нами встановлено, що додавання форміату до інкубаційного середовища або введення його в організм супроводжується зниженням вмісту вільних амінокислот та форміату в усіх досліджуваних органах і тканинах. Підвищення рівня форміату та вільних амінокислот після гідролізу, можливо, пов'язане з утворенням комплексів форміату з амінокислотами — формілованих амінокислот [7].

Такий вплив форміату на пул вільних амінокислот печінки — органу, де біосинтез білка відбувається дуже інтенсивно, змушує надалі ретельно вивчити можливу роль формілованих амінокислот як депо вільних амінокислот для синтезу нових пептидних молекул, особливо враховуючи нещодавно відкрите явище каналування, тобто просторово спрямованого транспорту амінокислот від місця їх утворення до місця синтезу білків [8].

Раніше нами вже досліджувався вплив CO_2 та гліцину на дані показники [9], тож особливий інтерес становить вивчення зміни пулу вільних амінокислот сироватки крові при введенні in vivo їх метаболічного попередника. Вибір саме пулу сироватки крові був зумовлений також і тією обставиною, що зміни вмісту вільних амінокислот сироватки крові відображають відповідні зміни в інших тканинах та органах, хоч і не є тотожними їм. Також було встановлено, що за наявності форміату знижується вміст вільних амінокислот у різних органах і тканинах як у дослідах як vitro, так і in vivo, що, за припущенням академіка М. Ф. Гулого, зумовлено утворенням формілованих амінокислот [7].

Метою проведеного дослідження було з'ясувати можливість утворення та розпаду форміламінокислотних комплексів у дослідах in vitro та in vivo в різних органах та сироватці крові щурів.

Матеріали і методи. Досліди проводили на статевозрілих щурах-самцях масою тіла 180–200 г. Утворення форміламінокислот in vitro досліджували в гомогенатах печінки, які готували на 0,1 М фосфатному буфері, pH 7,4, у співвідношенні 1 : 3. Інкубаційна суміш містила 1 мл буфера, 1 мл гомогенату, в окремі проби додавали 30 мкмоль амінокислоти (аланіну, валіну) та 30 мкмоль форміату натрію. Інкубація тривала 30 хв при 37 °С. Білки осаджували рівним об'ємом 3% сульфосаліцилової кислоти. У безбілковому фільтраті визначали вміст вільних амінокислот та форміату. Частину фільтрату гідролізували при 105 °С в 2N HCl протягом 45 хв. Визначали сумарний та індивідуальний вміст амінокислот і форміату [10, 11]. Для встановлення умов гідролізу провели дослідження на стандартних препаратах формілованих амінокислот — гліцил-форміаті, метіоніл-форміаті та тирозил-форміаті. Згідно з одержаними результатами, за вибраних нами експериментальних умов розщеплювалися в основному формільовані амінокислоти (83–89%), тоді як пептидні сполуки — лише на 11–17%. Це дало нам змогу застосовувати гідроліз в 2 N HCl протягом 45–60 хв, тобто в умовах, за яких формільовані амінокислоти розщеплюються майже повністю.

У дослідах in vivo щурам одноразово внутрішньоочеревинно вводили 147 мкмоль форміату/100 г маси тіла. Через 30 та 60 хв тварин декапітували. У сироватці крові та печінці визначали вміст вільних амінокислот та форміату до гідролізу та після нього.

Для вивчення впливу тривалого надходження різних доз форміату на інтенсивність утворення формілованих амінокислот щурам масою 180–200 г маси тіла на початку досліду згодовували щоденно форміат у кількості 15 мг, 30 мг та 45 мг на 100 г маси тіла протягом 1,5 місяця. Потім тварин декапітували під ефірним наркозом і за вмістом вільних амінокислот та форміату в умовах гідролізу та без гідролізу визначали інтенсивність формілування в ядрах, мітохондріях, мікросомах і цитозолі печінки [12].

Результати досліджень статистично опрацьовані [13].

Результати та обговорення. На першому етапі експериментів при дослідженні впливу форміату на пул вільних амінокислот сироватки крові in vivo було показано, що за введення 147 мкмоль форміату на 100 г маси тіла при 30-хвилинній експозиції зниження загальної суми досягає 18%, а окремих амінокислот — від 7 до 36%. При 60-хвилинній експозиції зниження загальної суми вільних амінокислот дорівнює 23% і є вірогідним, а окремих амінокислот — від 8 до 41%, знижується також співвідношення замінних амінокислот до незамінних від 0,91 у нормі до 0,79 при 60-хвилинній експозиції з форміатом [14, 15].

Поступове посилення ефекту форміату із збільшенням часу експозиції може розглядатися як опосередковане свідчення на користь ензиматичного механізму дії даної сполуки.

Враховуючи виняткову роль, яку відіграє печінка в організмі для підтримання нормального перебігу в ньому найважливіших метаболічних процесів, нами в першу чергу вивчався in vivo вплив форміату на пул вільних амінокислот печінки. Для збереження порівнюваності результатів з попередніми експериментами були вибрані аналогічні часові і дозові характеристики. За даних умов сума вільних амінокислот у печінці в дослідних пробах знижувалась на 39%, при цьому вірогідно знижувалась кількість Про, Ала, Ілей, Лей та спостерігалась тенденція до зниження більшості амінокислот. При застосуванні гідролізу загальна сума вільних амінокислот в гідролізаті безбілкового фільтрату підвищувалася: в контрольних пробах на 15%, у дослідних — на 26%. Отже, одержані нами результати

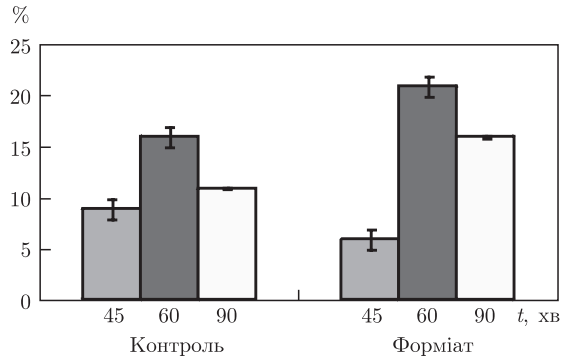

Рис. 1. Приріст форміату за одноразового його введення та різної тривалості досліду (t)

також можна розглядати як доказ того, що у печінці щурів, яким вводили форміат відбувається перетворення амінокислот у форміловані похідні, які як вільні амінокислоти не визначаються.

Звертає на себе увагу подібність змін у пулі вільних амінокислот печінки та сироватки крові, що дозволяє припустити аналогічність і механізмів спостережуваних змін.

При дослідженні вмісту форміату за таких самих умов in vivo залежно від тривалості експозиції встановлено, що у тварин дослідної групи найбільший приріст форміату після гідролізу відбувається через 60 хв (рис. 1), що може пояснюватися утворенням формілованих амінокислот. Через 90 хв відмічається його зниження, що може бути пов'язано з розщепленням утворених форміламінокислот. Подібна, але менш виражена залежність спостерігається і в печінці контрольної групи тварин. Одержані дані дають підставу вважати, що в організмі тварин одночасно відбуваються два процеси — формілування та деформілування амінокислот.

Для подальшого дослідження можливості утворення формілованих похідних амінокислот важливо було вивчити вплив тривалості інкубації на вміст форміату в гомогенатах печінки щурів. Виявилося, що при додаванні до гомогенату форміату його кількість зменшується на 17% через 15 хв інкубації, а через 30 хв інкубації зростає, повертаючись до вихідних значень. У присутності аланіну рівень форміату за 15 хв зменшується на 20% і через 30 хв поступово повертається до початкового рівня. Додавання форміату до гомогенатів різних тканин викликає зростання його рівня після гідролізу від 13 до 25%, що свідчить про утворення формілованих амінокислот за рахунок ендогенних амінокислот гомогенату.

За сумісної інкубації амінокислот з форміатом зростання вмісту форміату після гідролізу свідчить про утворення форміламінокислот в умовах досліду в усіх досліджуваних тканинах (рис. 2). При розрахунку співвідношення вмісту форміату в гомогенаті та в гомогенаті з валіном, а також форміату до форміату з валіном, яке може відображати використання форміату за даних умов, виявилося, що в контролі співвідношення гомогенат/гомогенат + + амінокислота найнижче через 30 хв, найвище через 15 хв, співвідношення форміат/форміат+амінокислота найвище через 5 хв, найнижче через 15 хв. Такі зміни співвідношень, на нашу думку, можуть бути обумовлені використанням форміату в процесах формілування амінокислот та розщепленням утворених форміламінокислот як за присутності форміату, так і без нього. Одержані дані дають підставу припускати, що має місце утворення та розщеплення формілованих амінокислот у тканинах тварин, а додавання форміату впливає на інтенсивність цього процесу.

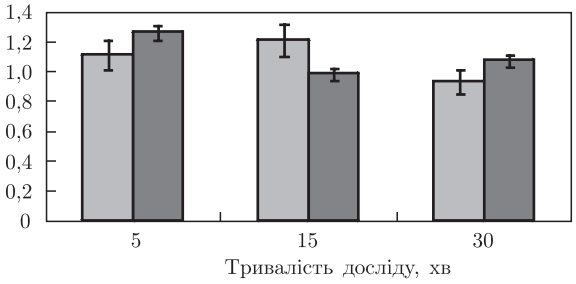

Рис. 2. Співвідношення гомогенат/гомогенат + амінокислота (□) та форміат/форміат + амінокислота (■) в печінці тварин за різної тривалості досліду

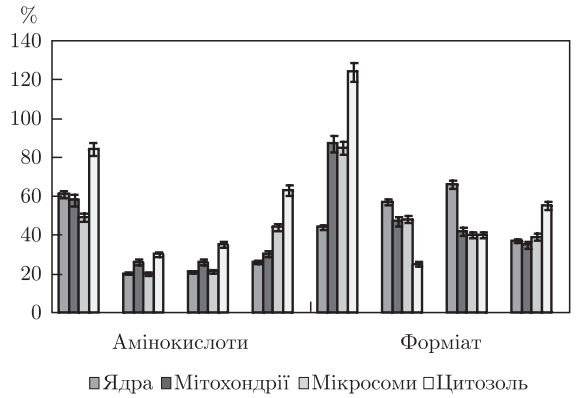

Рис. 3. Приріст амінокислот та форміату після гідролізу за тривалого згодовування щурам різної кількості форміату

У попередніх дослідженнях in vivo та in vitro вивчався короткотривалий вплив форміату на кількість сумарних амінокислот у пулах різних органів і тканин, тому важливо було перевірити дію тривалого його надходження до організму. Вивчали процес формілування в ядрах, мітохондріях, мікросомах та цитозолі (рис. 3). Встановлено, що зв'язування амінокислот з форміатом спостерігається у всіх досліджуваних фракціях. Це є свідченням важливості реакцій формілування для нормального перебігу процесів обміну амінокислот, пептидів та білків у окремих клітинних органелах та в клітині в цілому.

Вивчення процесів формілування на субклітинному рівні дало змогу одержати перше приблизне уявлення про локалізацію даних процесів у клітині.

Одержані на цьому етапі результати підтверджують наші попередні припущення про те, що в субклітинних фракціях тканин організму відбуваються процеси як формілування, так і деформілування амінокислот. Особливий інтерес становить факт наявності процесів формілування в цитозолі, бо він не лише може свідчити про присутність там не зв'язаного з мембранними структурами ферменту, але і дає надію на можливість відносно доступного способу його виділення. Значної різниці між ефектами різних доз форміату на органели і цитозоль клітин печінки не виявлено. У інтактних тварин цей процес відбувається дещо інтенсивніше.

Таким чином, у результаті проведених експериментів на in vitro та in vivo моделях показана можливість зворотності процесів взаємодії вільних амінокислот і форміату та досліджена їх залежність від субклітинної локалізації, часу взаємодії концентрації форміату та амінокислот. Відсутність специфічної локалізації чинників, що здійснюють процеси фор-

мілування в клітинах, може свідчити про велику значущість даних перетворень для нормальної життєдіяльності клітини в цілому. Ці дослідження потребують продовження як у напрямку виділення ферментів, задіяних у процесах формілування, так і у наступному пошуку можливих індукторів та інгібіторів даних перетворень.

1. *Гулый М. Ф., Мельничук Д. А.* Метаболическое значение углекислоты у гетеротрофных организмов // Успехи биол. химии. – 1980. – **21**. – С. 185–218.
2. *Гулый М. Ф., Мельничук Д. А.* Роль углекислоты в регуляции обмена веществ у гетеротрофных организмов. – Киев: Наук. думка, 1978. – 239 с.
3. *Реутов В. П., Сорокина Е. Г., Охотин В. Е., Косицын Н. С.* Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. – Москва: Наука, 1997. – 156 с.
4. *Серая* И. П., Нарциссов Я. Р., Современные представления о биологической роли оксида азота // Успехи соврем. биол. – 2002. – **122**, № 3. – С. 249–258.
5. *Гулый М. Ф. Силонова Н. В., Мельничук Д. А.* Влияние формиата на включение ^{14}C из различных предшественников в белки и липиды печени крыс // Укр. биохим. журн. – 1982. – **54**, № 2. – С. 163–166.
6. *Силонова Н. В., Мельничук Д. А., Гулый М. Ф.* Формиат, как субстрат при биосинтезе белков и липидов в тканях животных // Докл. АН УССР. Сер. Б. – 1979. – № 9. – С. 92–96.
7. *Гулий М. Ф., Сілонова Н. В., Печенова Т. М., Шевцова Н. Ф. та ін.* Вплив форміату на вміст вільних амінокислот тканин і органів щурів in vitro та in vivo // Укр. біохім. журн. – 2005. – № 1. – С. 41–47.
8. *Негруцький Б. С., Єльська Г. В.* Біосинтез білка у вищих еукаріотів і особливості його структурно-функціональної організації // Укр. біохім. журн. – 2002. – **74**, № 4б. – С. 11.
9. *Гулий М. Ф., Мельничук Д. О.* Вплив авідину на інтенсивність включення C^{14} з гліцину-C_{14} і $NaHC^{14}O_3$ в білки і ліпіди гомогенатів печінки щурів // Укр. біохім. журн. – 1970. – **42**, № 3. – С. 322–324.
10. *Lee J. P., Takahashi T.* An improved colorimetric determination of amino acids with the use of ninhidrin // Anal. Biochem. – 1966. – **14**, No 1. – P. 71–77.
11. *Freibig G., Schaller K. H.* A simple reliable enzymatic assay for the determination of formic acid in urine // Clin. chim. acta. – 1990. – **108**, No 3. – P. 355–360.
12. *Уильямс Б., Уилсон К.* Методы практической биохимии. – Москва: Мир, 1978. – 268 с.
13. *Урбах В. Ю.* Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. – Москва: Наука, 1975. – 126 с.
14. *Гулий М. Ф., Печенова Т. М., Сілонова Н. В., Шевцова Н. Ф., Клименко Л. П.* Про можливість утворення ацилованих амінокислот в сироватці крові щурів // Доп. НАН України. – 2004. – № 12. – С. 160–164.
15. *Гулий М. Ф., Сілонова Н. В., Печенова Т. М., Сушкова В. В., Шевцова Н. Ф. та ін.* Вплив форміату на вміст вільних амінокислот тканин і органів щурів in vitro // Доп. НАН України. – 2005. – № 1. – С. 163–166.

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ

Надійшло до редакції 25.07.2006