

9. Комиссаренко В.П. Спленин. — К.: Госмедиздат, 1961. — 144 с.
10. Костандинов Д.Н., Фукс Б.Б. Обнаружение и изучение фактора, стимулирующего ДНК в тимocyтaх in vitro // Вестн. АМН СССР. — 1973. — № 5. — С. 88—94.
11. Нечаева Е.Б. Изучение химического состава и биологической активности препарата «спленин»: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — М., 1978. — 20 с.
12. Олейник Б.В., Комиссаренко В.П., Безвершенико И.А. Небелковый фактор спленина // Докл. АН УССР. — Сер. Б. — 1985. — № 6. — С. 70—72.
13. Фердман Д.Л., Сопин Е.Ф. Практикум по биологической химии. — М.: Сов. наука, 1957. — 292 с.
14. Goldstein A.L., Slater H., White A. Preparation, assay and partial purification of a thymic lymphocytopoietic factor (thymosin) // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1966. — 54. — P. 1010—1017.
15. Metcalf D. The thymic origin of the plasma lymphocytosis stimulating factor // Brit. J. Cancer. — 1956. — 10. — P. 442—457.
16. Metcalf D. The thymus lymphocytosis stimulating factor // New York. Acad. Sci. — 1958. — 73. — P. 113—119.

Київ. наук.-дослід. ін-т
ендокринології та обміну речовин
М-ва охорони здоров'я України

Матеріал надійшов
до редакції 10.12.92

УДК 577.164.11:577.15

С.А.Петров, А.И.Хотько

Влияние тиамина и его метаболитов на активность тканевой и очищенной пируватдегидрогеназы

Досліджували вплив метаболітів тіаміну на активність тканинної та очищеної піруватдегідрогенази. Показано, що тіохром пригнічує активність цього ферменту.

Введение

Изучению взаимоотношений тиамина и пируватдегидрогеназного комплекса в организме посвящено значительное число работ [1, 11, 12]. Однако большинство исследований касается влияния тиаминапирофосфата — кофермента тиамина на активность указанного фермента [3, 14]. Возросший в последние годы интерес к некоферментным метаболитам тиамина проявился и в изучении действия этих соединений на активность пируватдегидрогеназы. Таким действием обладает прежде всего сам тиамин, введение которого животным, получавшим после голодания высокоуглеводный рацион, снижало активность пируватдегидрогеназы в ткани печени [7]. Аналогичным эффектом обладают тиазоловый компонент тиамина и различные его производные [2], в том числе тиазолпирофосфат. Несмотря на широко распространенную точку зрения о биологической инертности тиахрома [10], в литературе все же имеются сведения об ингибировании активности пируватдегидрогеназы оксидигидротиахромом и его пирофосфатом [4], тиахромфосфатом [15] и тиахромтрифосфатом [6]. Тиахром в этом плане до нашей работы исследован не был.

В связи с этим целью нашего исследования было изучение характера действия основных метаболитов тиамина на тканевую и очищенную пируватдегидрогеназу.

© С.А.ПЕТРОВ, А.И.ХОТЬКО, 1994

Методика

Исследования выполнены на мышах массой 18—23 г. Тиамин и его метаболиты (3 нмоль/г), приготовленные на физиологическом растворе вводили внутримышечно. Контрольным животным вводили только физиологический раствор. Через 15, 30, 60, 120, 240 мин и 24 ч после введения соответствующего раствора мышей забивали. Гомогенаты органов готовили на сахарозе (0,25 моль/л) из расчета 1 г ткани на 9 мл раствора сахарозы. Активность пируватдегидрогеназы определяли феррицианидным методом [12].

Для выделения пируватдегидрогеназы из ткани печени использовали метод Roche и Kate [14], позволяющий получить препарат, содержащий до 90 % активной формы фермента. Выделенный препарат характеризовался 95 %-ной чистотой, содержал 0,2 моль тиаминпирофосфат (ТПФ) на 1 моль пируватдекарбоксиаза. Активность комплекса определяли спектрофотометрически по восстановлению НАД при длине волны 340 нм. Результаты обрабатывали статистически [5].

Результаты и их обсуждение

Прежде всего мы исследовали влияние инъекций тиамина на активность пируватдегидрогеназы в тканях мышей (табл. 1). Показаны существенные колебания активности пируватдегидрогеназы в контроле через различные промежутки времени после введения физиологического раствора. Механизм действия ионов на пируватдегидрогеназный комплекс (ПДК) изучен недостаточно. Однако известно, что ионы натрия способны активировать комплекс за счет увеличения $V_{\max}$, а ионы хлора ингибируют действие фермента за счет уменьшения сродства пирувата к нему [13]. По-видимому, различия скорости транспорта ионов натрия и хлора в разные ткани и из них определяют колебания активности ПДК после введения физиологического раствора. При инъекции тиамина во всех исследованных органах в ранние сроки (до 30 мин) наблюдалось снижение активности фермента, тогда как в более поздние (через 120 мин и позднее) — отмечено ее повышение.

В следующей серии экспериментов мы изучали влияние инъекций основной коферментной формы тиамина — ТПФ — на активность пируватдегидрогеназы в тканях мышей. Как видно из результатов, представленных в табл. 1, при введении ТПФ не наблюдалось статистически достоверного изменения активности пируватдегидрогеназы во всех исследованных органах в течение 15—60 мин включительно. Начиная со 120 мин после введения ТПФ, активность фермента была повышенной по сравнению с контролем.

При исследовании влияния тиохрома (см. табл. 1) на активность тканевой пируватдегидрогеназы установлено, что в пределах 120 мин после инъекции тиохром снижает активность пируватдегидрогеназы в большинстве исследованных органов. В более поздние сроки статистически достоверных изменений не установлено.

Инъекция 4-метил-5 β -оксиэтилтиазола (см. табл. 1) приводила к продолжительному снижению активности пируватдегидрогеназы в тонкой кишке (в течение 240 мин) и печени (в течение 120 мин). В головном мозгу во все сроки исследования за исключением 30 мин указанного эффекта не было.

Таким образом, эта часть работы продемонстрировала следующие закономерности: при введении кофермента тиамина — ТПФ — наблюдается активация пируватдегидрогеназы во всех исследованных тканях. Однако этот эффект возникал не ранее, чем через 120 мин после введения, что, вероятно, связано с медленным транспортом его через гистогематический барьер [11].

Таблица 1. Влияние инъекций тиамин и его метаболитов на активность пируватдегид-

Ткань	Срок после			
	15 мин		30 мин	
	Физиоло- гический раствор	Препарат	Физиоло- гический раствор	Препарат
Тиамин				
Печень	14,4±1,6	3,0±0,3 P<0,01	10,4±1,0	3,6±0,3 P<0,01
Тонкая кишка	14,6±1,5	4,4±0,6 P<0,01	8,8±0,9	7,7±1,0 P>0,05
Головной мозг	12,2±1,1	3,6±0,4 P<0,01	13,0±1,4	6,6±0,8 P<0,01
Тиаминпирофосфат				
Печень	14,8±1,6	12,3±1,4 P>0,05	10,8±1,1	11,4±1,2 P>0,05
Тонкая кишка	13,7±1,5	11,8±1,2 P>0,05	9,2±0,9	9,8±0,9 P>0,05
Головной мозг	12,7±1,4	11,4±1,3 P>0,05	113,2±1,5	12,8±1,4 P>0,05
Тиохром				
Печень	14,9±1,6	6,1±0,3 P<0,01	10,4±1,0	9,7±0,4 P>0,05
Тонкая кишка	13,9±1,5	7,6±0,8 P<0,01	8,8±0,9	3,8±0,4 P<0,05
Головной мозг	12,8±1,4	4,0±0,4 P<0,01	13,0±1,4	6,1±0,6 P<0,01
4-Метил-5β-оксиэтилтиазол				
Печень	14,9±1,6	16,2±1,0 P>0,05	10,4±1,0	4,0±0,8 P<0,01
Тонкая кишка	13,9±1,5	6,0±0,7 P<0,01	8,8±0,9	4,6±0,5 P<0,01
Головной мозг	12,8±1,4	10,4±1,1 P>0,05	13,0±1,4	8,5±0,9 P<0,05

Введение основных катаболитов тиамин — тиохрома и 4-метил-5β-оксиэтилтиазола — приводило к обратному эффекту: снижению активности пируватдегидрогеназы. Однако, если тиохром оказывал воздействие в основном в течение 30—120 мин после введения, то 4-метил-5β-оксиэтилтиазол — более продолжительное время, что может быть связано с различиями способности этих соединений проникать через биомембраны [9].

Указанные особенности действия ТПФ и тиохрома на активность тканевой пируватдегидрогеназы дают возможность объяснить различия, наблюдаемые в характере действия тиамин на фермент в ранние и поздние сроки после введения (см. табл. 1). В ранее проведенном нами исследовании [8] было показано, что в начальные сроки после введения тиамин определенная его часть катаболизируется до тиохрома.

Количество образующегося ТПФ в тканях в эти начальные сроки еще невелико. Через 120 мин и позже содержание ТПФ в тканях становится значительным, а тиохром почти полностью исчезает. Таким образом, обнаруженное снижение активности ПДК в начальные сроки после введения ти-

рогеназы в тканях мышей, мкмоль восстановленного феррицианида/г ткани (n = 8—10)

введения препарата							
60 мин		120 мин		240 мин		24 ч	
Физиологический раствор	Препарат	Физиологический раствор	Препарат	Физиологический раствор	Препарат	Физиологический раствор	Препарат
Тиамин							
5,7±0,6	5,9±0,6 P>0,05	16,6±1,8	18,0±2,0 P>0,05	17,7±1,9	29,2±3,0 P<0,01	11,7±1,2	18,2±1,9 P<0,05
10,1±1,1	10,4±0,6 P>0,05	6,1±2,8	27,5±1,1 P<0,01	10,3±3,8	35,8±1,8 P<0,01	16,6±1,8	28,0±2,9 P<0,01
6,8±0,7	7,2±0,6 P>0,05	6,3±0,9	17,6±1,9 P<0,01	7,7±0,9	23,2±2,6 P<0,01	14,3±1,6	30,3±3,0 P<0,01
Тиаминпирофосфат							
6,1±0,7	6,5±0,8 P>0,05	17,1±2,7	25,8±2,9 P<0,01	17,5±1,8	34,2±3,6 P<0,01	14,2±1,6	26,3±2,7 P<0,01
9,6±1,0	10,1±1,1 P>0,05	6,7±0,7	12,5±1,3 P<0,01	11,4±1,2	24,1±2,6 P<0,01	14,3±1,5	19,4±1,8 P<0,01
8,2±0,9	8,9±0,9 P>0,05	7,6±0,8	18,1±2,0 P<0,01	8,4±0,9	21,4±2,2 P<0,01	12,5±1,4	19,1±1,9 P<0,05
Тиохром							
5,7±0,6	6,2±0,3 P>0,05	16,6±1,8	4,7±0,5 P<0,01	17,7±1,9	15,0±1,5 P>0,05	11,7±1,2	12,8±2,4 P>0,05
10,1±1,0	8,0±0,8 P>0,05	6,1±0,6	3,9±1,1 P<0,01	10,3±1,4	12,4±1,4 P>0,05	16,6±1,8	17,8±1,9 P>0,05
6,8±0,7	4,8±0,5 P<0,05	6,3±0,6	7,9±0,9 P>0,05	7,7±1,2	5,3±1,6 P>0,05	10,3±1,6	10,0±1,7 P>0,05
4-Метил-5β-оксиэтилтиазол							
5,7±0,6	2,6±0,3 P<0,01	16,6±1,8	17,2±1,8 P<0,01	16,6±1,8	18,5±1,9 P>0,05	11,7±1,2	11,7±1,3 P>0,05
10,1±1,0	2,8±0,3 P<0,01	6,1±0,6	4,1±0,9 P<0,01	10,3±1,1	4,3±0,4 P<0,01	16,6±1,8	35,7±3,8 P<0,01
6,8±0,7	6,9±0,7 P>0,05	6,3±0,7	5,4±0,6 P>0,05	7,7±0,9	7,8±0,9 P>0,05	10,3±1,4	12,9±1,4 P>0,05

амин следует отнести на счет тиохрома, интенсивно образующегося в этот период. Активация пируватдегидрогеназы, начиная со 120 мин после введения тиамина, очевидно, определяется превращением витамина в ТПФ, который активирует фермент.

Угнетающим действием на тканевую пируватдегидрогеназу кроме тиохрома обладал и 4-метил-5β-оксиэтилтиазол. Однако сопоставление динамики ингибирования фермента в начальные сроки тиамином и выраженности ингибиторного эффекта с аналогичными показателями для тиохрома и 4-метил-5β-оксиэтилтиазола свидетельствует о значительно большем сходстве действия тиамина и тиохрома, чем тиамина и 4-метил-5β-оксиэтилтиазола.

Для уточнения характера действия отдельных метаболитов тиамина на активность пируватдегидрогеназы мы провели серию исследований на очищенном ферменте, полученном из ткани печени (табл. 2), в которых показаны снижение активности пируватдегидрогеназы в присутствии тиохрома, отсутствие влияния 4-метил-5β-оксиэтилтиазола и активация ТПФ.

Таблица 2. Влияние тиамина и его метаболитов на активность очищенной пируватдегидрогеназы, мкмоль НАДН · г⁻¹ белка · мин⁻¹ (n = 7)

Вариант опыта	Активность пируватдегидрогеназы (M±m)	Достоверность различий (P)
Физиологический раствор	45±5	—
Тиамин	45±5	>0,05
Тиаминмонофосфат	45±3	>0,05
Тиаминпирофосфат	65±3	<0,01
Тиохром	31±3	<0,01
4-Метил-5β-оксиэтилтиазол	44±5	>0,05

Таким образом, действие тиамина на активность пируватдегидрогеназы неоднозначно и зависит от направленности его метаболизма. Фосфорилирование витамина, сопровождаемое образованием ТПФ, приводит к стимуляции фермента. Окисление тиамина в тканях с образованием тиохрома приводит к угнетению активности пируватдегидрогеназы. Аналогичный эффект тиохрома обнаружен и в исследованиях на очищенном ферменте. Снижение активности пируватдегидрогеназы в тканях после введения 4-метил-5β-оксиэтилтиазола, очевидно, носит опосредованный характер, так как это соединение не оказывает непосредственного действия на фермент.

S.A.Petrov, A.I.Khotko

EFFECT OF THIAMIN AND ITS METABOLITES ON ACTIVITY OF TISSUE AND PURIFIED PYRUVATE DEHYDROGENASE

Thiochrome is able to suppress pyruvate dehydrogenase activity. This effect is observed after injection of thiochrome to an organism and in experiments on a purified enzyme.

I.I.Mechnikov Odessa State University,
Ministry of Education of Ukraine

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Вовк Л.И., Муравьева И.В., Ясников А.А. Каталитическое действие тиазолиевых солей в реакции окисления альдегидов хинонами. Новая модель пируватдегидрогеназного комплекса // Журн. общей химии. — 1985. — 55, № 7. — С. 1574—1579.
2. Вовк Л.И., Хрипко С.С. Инактивация дрожжевой акопируватдекарбоксилазы линофильными н-алкиламещенными солями тиазола // Укр. биохим. журн. — 1990. — 62, № 5. — С. 48—54.
3. Ву Ван Ань, Розанов А.Я., Петров С.А. Взаимодействие коферментов пируватдегидрогеназного комплекса при окислении пирувата и связывания ТДФ-S³⁵ митохондриями печени крыс // Там же. — 1973. — 45, № 3. — С. 338—339.
4. Зиматкина Т.И., Черникевич И.П., Забродская С.В. и др. Особенности ингибирования тиаминдифосфатзависимых ферментов оксидигидротиахромом и его фосфорилированными производными // Там же. — 1991. — 63, № 2. — С. 59—65.
5. Математический энциклопедический словарь // Под ред. Прохорова Ю.И. и др. — Сов. энциклопедия. — 1988. — 847 с.
6. Островский Ю.М., Забродская С.В., Зиматкина Т.И., Опарин Д.А. Избирательное ингибирование пируватдегидрогеназы трифосфорными эфирами и тетрагидротиамином в опытах на животных // Биохимия. — 1983. — 48, № 6. — С. 928—931.
7. Пархоменко Ю.М., Вовк А.И., Протасова З.С. и др. Влияние тиамина на активность пируватдегидрогеназного комплекса печени крыс при интенсификации липогеназа // Укр. биохим. журн. — 1983. — 55, № 4. — С. 408—414.
8. Петров С.А. Вивчення метаболізму тіаміну в органах і тканинах мишей // Физиол. журн. — 1992. — 38, № 2. — С. 79—85.
9. Петров С.А., Федорко Н.Л., Семарюкова И.А. Изучение связывания тиамина и его метаболитов клетками крови и митохондриями печени белых крыс // Укр. биохим. журн. — 1991. — 63, № 3. — С. 45—49.