

На правах рукопису

ПАРХОМЕНКО ЮЛІЯ МИХАЙЛІВНА

ДОСЛІДЖЕННЯ МЕХАНІЗМІВ РЕАЛІЗАЦІЇ НЕКОФЕРМЕНТНИХ
ФУНКЦІЙ ТІАМІНУ В ТКАНИНАХ ТВАРИН

03.00.04 - біохімія

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук

Київ - 1993

Робота виконана в відділі біохімії коферментів
Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна АН України

Офіційні опоненти: академік АН України,
доктор медичних наук,
професор ШУБА М.Ф.

доктор біологічних наук,
професор ВЕЛИКИЙ М.М.

доктор біологічних наук,
професор ХОЛОДОВА Ю.Д.

Провідна установа - Український державний
медичний університет
ім. О.О.Богомольця

Захист дисертації відбудеться 19 квітня 1993 р.
о 14 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради
Д 016.07.01 для захисту дисертацій в Інституті біохімії
ім. О.В. Палладіна АН України за адресою: 252601,
м. Київ-30, вул. Леонтовича, 9.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці
Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна АН України.

Автореферат розісланий 16 березня 1993 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук. *Вирсенко* Кирсенко О.В.

ЛНБ ім. В. Стефаніка
АН України

ЛНБ України ім.В.Стефаніка



00802925 (Q)

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Внаслідок багаторічних досліджень біохімічної ролі тіаміну (вітаміну В₁) у внутрішньоклітинному метаболізмі склалось враження, що вона не може бути зведена лише до участі дифосфорного ефіру тіаміну (ТДФ) як коферменту в функціонуванні декількох ферментів вуглеводного обміну. Підставою для вищесказаного стали такі спостереження: 1. Наявність у всіх тканинах і клітинах, окрім ТДФ, ряду некоферментних похідних тіаміну, у тому числі, двох інших його фосфорних ефірів - монофосфату (ТМФ) та трифосфату (ТТФ) і ферментів їх обміну. 2. Специфічна нейротропна дія тіаміну, яку неможливо пояснити, ґрунтуючись тільки на каталітичній ролі ТДФ у метаболізмі вуглеводів. 3. Виявлення патологій, зокрема генетичної етіології, обумовлених порушенням обміну тіаміну, яке не супроводжується зміною активності ТДФ-залежних ферментів. Аналіз приведених вище фактів вказує на існування певних специфічних функцій тіаміну в фізіологічних процесах, відмінних від коферментних функцій ТДФ, які умовно назвали некоферментними [Ostrowsky, 1968; Bergman & Fishman, 1975; Iwata H., 1982; Naas, 1988].

Вважається, що механізм каталітичної (коферментної) дії тіаміну був вивчений досить добре, проте, в зв'язку з удосконаленням методів, які застосовуються у біохімічних дослідженнях, з'являються нові деталі цього складного процесу. Зокрема, в клітинах мікроорганізмів [Kondo & Ishimoto, 1975] був виявлений новий незвичайний ТДФ-залежний фермент, який приймає участь в обміні сірковмісних сполук.

Більш складна ситуація складається при вивченні деяких некоферментних механізмів участі тіаміну в метаболізмі. Дослідники, які займаються біохімією тіаміну, в пошуках його некоферментних функцій використовують різноманітні підходи. Одні вивчають властивості поширених у всіх живих тканинах некоферментних форм тіаміну і шляхи їх взаємодії з іншими біологічно активними молекулами [Островський и др., 1971, 1975]. Інші, виходячи з припущення, що некоферментні біохімічні функції тіаміну повинні бути зв'язані виключно з його нейротропною фізіологічною функцією, шукають молекулярні механізми

участі тіаміну та його похідних в функціонуванні збудливих мембран або в регуляції обміну нейромедіаторів [Matsuda, Cooper, 1983, 1985; Schoffeniels, Marginetu, 1984]. Ці дослідження дали багато нових відомостей про обмін тіаміну і функціонування ТДФ-залежних ферментів, але до цього часу уява про некоферментні механізми участі тіаміну в обміні речовин досить розпливчата. Існують лише окремі свідчення, які не дають однозначних відповідей. Так було показано, що окрім каталітичної ролі, кофермент виявляє "стабілізуючу" дію на ферменти, молекулярні механізми якої не розшифровані [Рыбина и др., 1974]. З'явилися повідомлення про можливість індукції або репресії ТДФ-залежних ферментних білків тіаміном або його похідними [Reunauer et al., 1971]. Було відмічено [Pandit & Chakrabarti, 1972], що вже на перших етапах розвитку В₁-вітамінозу спостерігається прогресуюче зниження вмісту в тканинах відновленого глутатіону, що само по собі могло сприяти зниженню активності ТДФ-залежних дегідрогеназ, в активних і регуляторних центрах яких містяться SH-групи [Вунин и др., 1991] і чутливість яких до рівня відновленого глутатіону в тканинах була показана [Штутман и др., 1975]. Наступні роботи показали можливість участі тіамінфосфатів в регуляції активності ТДФ-залежних ферментів, зокрема піруватдегідрогеназного комплексу (ПДК) [Alkonyi et al., 1976; Roche & Cate, 1977] та кетоглутаратдегідрогеназного комплексу (КГДК) [Yusa, 1966], по механізмам, які не зв'язані з коферментною функцією ТДФ. На основі експериментальних даних висловлюється припущення про участь тіамінфосфатів у реакціях трансфосфорилування [Bettendorff & Schoffeniels, 1990] та окисного фосфорилування [Раузович, Карпуть, 1969].

Ідентифікація некоферментних функцій тіаміну у фізіологічних умовах - досить складна задача, тому що більшість його ефектів на ті або інші ділянки клітинного обміну опосередковані ланцюгом метаболічних перетворень. Останні беруть початок від субстратів або продуктів ТДФ-залежних ферментних реакцій, які, у більшості випадків, займають ключове положення в обміні. Серед декількох ферментів цієї групи в організмі тварин найбільш важливими у метаболічному аспекті є транскетолаза і вже згадувані ПДК та КГДК. Кетокислоти, які є субстратами для

окисного декарбокислювання, можуть зазнавати різноманітних перетворень в організмі тварин. Вони можуть декарбокислюватися та карбокислюватися, що у випадку пірувату забезпечує взаємозв'язок гліколізу та глюконеогенезу. Завдяки здатності до амінування з утворенням відповідних амінокислот α -кетокислоти відіграють роль зв'язуючої ланки між обміном вуглеводів та білків. Кінцевий продукт аеробного окислення глюкози - ацетил-КоА, який утворюється внаслідок піруватдегідрогеназної реакції, окислюється далі в ЦТК або використовується на побудову кетонів тил, ліпідів і, що особливо важливо в аспекті зв'язування нейротропної функції тіаміну, - нейромедіатора ацетилхоліна. В зв'язку з вищесказаним, першочерговим завданням при розшифруванні шляхів регуляторної дії тіаміну на клітинний метаболізм ми вважаємо вивчення молекулярних механізмів участі його біологічно активних похідних в регуляції функціонування ТДФ-залежних ферментів.

Актуальність досліджень, спрямованих на зв'язування нових аспектів участі тіаміну в клітинному метаболізмі, підтверджується зростаючим переліком патологій, пов'язаних з порушенням обміну тіаміну, які неможливо пояснити тільки коферментною функцією ТДФ. Результати таких досліджень будуть сприяти науково обгрунтованому використанню похідних тіаміну в медицині, зокрема - в створенні принципово нових форм нейроактивних лікарських препаратів.

Ціль і задачі досліджень. Ціль роботи полягала у зв'язуванні біологічної ролі і механізмів участі тіаміну та його похідних в регуляції функціонування ТДФ-залежних ферментних систем і внутрішньоклітинного обміну.

Вирішувались такі задачі:

- в умовах різної забезпеченості організму тварин тіаміном та різної інтенсивності його обміну простежити залежність між рівнем тіаміну і його фосфатів в тканинах та активністю ТДФ-залежних ферментів, в першу чергу - піруватдегідрогеназного комплексу (ПДК), який займає ключове положення у клітинному метаболізмі;

- провести дослідження механізмів некоферментної дії тіамінфосфатів на функціонування ПДК на ізольованих системах;

- зв'язувати можливість регуляторної дії тіаміну та тіамінфосфатів на функціонування ПДК і, відповідно, синтез аце-

тилхоліну в нервових клітинах;

- дослідити особливості обміну тіаміну та його зв'язок з обміном ацетилхоліну в нервових клітинах;

- на підставі одержаних результатів сформулювати уявлення про механізми дії тіаміну на функціонування ТДФ-залежних ферментів (на прикладі ПДК) в клітинах тканин тварин і провести експериментальну перевірку можливості функціонування цих механізмів *in vivo*;

- на основі аналізу сукупності всіх одержаних даних та даних літератури провести обміркування можливих механізмів нейротропної дії тіаміну.

Наукова значимість і новизна. В роботі використані принципово нові підходи для з'ясування некоферментних механізмів дії тіаміну на ТДФ-залежні дегідрогенази α -кетокислот: досліджена кореляційна залежність між рівнем індивідуальних тіамінфосфатів і активністю цих ферментів у печінці експериментальних тварин, які відрізняються по рівню забезпеченості тіаміном і по інтенсивності його використання, обумовленим різною направленістю метаболічних процесів. Встановлено, що в нормальних умовах в печінці тварин відсутня регуляція активності ТДФ-залежних дегідрогеназ по механізму асоціації-дисоціації коферменту та апоферменту. В той же час в умовах недостатності тіаміну важливим компонентом регуляції активності цих ферментів стає тіол-дисульфідна система тканин; виявлена пряма, не залежна від його коферментної функції, участь тіаміну в підтриманні рівноваги цієї системи. Пряма кореляція між рівнем коферменту і активністю ТДФ-залежного ферменту - КГДГ відмічена тільки при 10-кратному зниженні концентрації коферменту в порівнянні з контролем (умовна K_m визначена рівню $3,83 \pm 1,62$ мкМ). Показано, що при фізіологічних умовах ТДФ і ТТФ приймають участь в регуляції активності ПДК фосфорилуванням-дефосфорилуванням за механізмом, не залежним від коферментної функції ТДФ. ТДФ і ТТФ, зв'язуючись з ПДК, обидва інгібують активність ПДК-кінази, але діють різним чином на активність ПДК-фосфатази: ТДФ активує її при всіх випробуваних концентраціях, ТТФ виявляє нелінійне інгібування.

Показана принципова можливість участі тіамінфосфатів по вищевикладеному механізму в регуляції активності ПДК в нервових закінченнях мозку і, опосередковано через функціонування

ПДК, - в регуляції синтезу АХ. Проведено комплексне вивчення обміну тіаміну і його зв'язку з обміном АХ в нервових закінченнях.

Вперше був виділений і охарактеризований по біологічній активності тіамінзв'язуючий (ТЗВ) білок синапсомом, показана його причетність до обміну тіамінфосфатів та АХ.

На основі аналізу власних експериментальних даних та даних літератури сформульована оригінальна гіпотеза відносно механізмів реалізації нейротропної функції тіаміну, згідно якої тіамін кваліфікований як супутник нейромедіатора АХ.

Теоретичне і практичне значення роботи. Одержані дані про некоферментну регуляцію тіаміном активності ТДФ-залежних ферментів в тканинах тварин і сформульована по результатам цих досліджень гіпотеза про природу нейротропності тіаміну мають, перш за все, пріоритетне науково-теоретичне значення. Вони дозволяють з нових позицій оцінити роль тіаміну в клітинному метаболізмі і являються основою для розвитку нових напрямків в біохімії тіаміну.

Розроблено декілька нових біохімічних методів і модифікацій відомих методів для проведення досліджень в галузі біохімії тіаміну, в тому числі новий метод розділення тіамінфосфатів на катіонсобоїнному сефадексі, який був покладений в основу декількох аналогічних розробок у світі.

Результати даного дослідження можуть служити науково-теоретичним обґрунтуванням створення нових препаратів тіаміну та його похідних в комбінації з іншими біологічно активними сполуками для медицини і ветеринарії. Зокрема, автором розроблений препарат "Біометок", призначений для підвищення життєздатності тварин, який виявив високу ефективність при випробуваннях.

Апробація. Основні положення дисертації доложені на III (1977 р.), IV (1982 р.), V (1987 р.) та VI (1992 р.) Українських біохімічних з'їздах і III (1974 р.), IV (1979 р.) і V (1986 р.) Всесоюзних біохімічних з'їздах; на III (1975 р.), IV (1977 р.) і V (1983 р.) Гродненських сімпозіумах; Всесоюзних конференціях "Актуальні проблеми вітамінології" (Москва, 1978), "Біохімія, фармакологія і медичинське використання похідних вітамінів і інших попередників коферментів" (Іркутськ, 1983), "Наукові основи вітамінного харчування с/х тварин" (Рі-

га, 1987), "Клінічна вітамінологія" (Москва, 1991) та ін. (всього 10), на декількох республіканських конференціях; на шести Всесоюзних біохімічних симпозіумах (1982-1990 гг); на Проблемній комісії по вітамінології (Гродно, 1986), а також на міжнародних конференціях: "Молекулярна організація біологічних структур" (Москва, 1989) і "Біохімія і фізіологія ГДФ-залежних ферментів" (Блаубейрон, 1990).

Структура і обсяг дисертації. Дисертація складається з введення, огляду літератури (4 глави), експериментальної частини (власні дослідження - 5 глав), обміркування одержаних результатів, висновків, практичних рекомендацій, списку використаної літератури (473 джерела, в тому числі 88 вітчизняних і 385 іноземних авторів). Робота викладена на 260 сторінках машинописного тексту, включаючи 58 сторінок списку літератури. Текст дисертації проілюстрований 18 таблицями і 35 малюнками.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Експерименти з аліментарним B_1 -авітамінозом, викликаним агодовуванням тваринам тіаміндефіцитної дієти [Takahashi et al., 1971], поставлені на безпородних білих щурах з масою тіла 60-70 г з використанням парногодованого контролю. У відповідних дослідах на 100 г живої маси щурів вводили внутрішньом'язево тіаміну - 250 мкг, метіоніну - 40 мг, вітаміну E у вигляді ацетату α -токоферолу - 2 мг. В експериментах з гострим окситіаміновим авітамінозом використовували самців щурів лінії Вістар з масою тіла 80-120 г. Окситіамін вводили внутрішньом'язево в дозі 400 мг на 1 кг живої маси. Досліди з адаптивним гіперліпогенезом (годування вуглеводами після голодування) проводили на щурах самцях лінії Вістар масою 250-320 г. Синаптосоми та субсинаптосомальні фрагменти для проведення експериментів *in vitro* виділяли із мозку щурів самців масою 150-200 г. При вивченні взаємодії тіаміну та інших сполук [тіамінфосфатів, нейромедіаторів] із синаптосомами і субсинаптосомальними фракціями інкубацію проводили в бікарбонатному Кребс-Рінгеровському буфері (pH 7,4). В експериментах по вивченню взаємодії тіаміну з синаптосомами та їх фрагментами використовували [^{35}S]тіамін або [^{14}C]тіамін (Amersham).

Для фіксації змін в мембранному потенціалі синапсом використовували флуоресцентний зонд 3,3'-діпропілтіодикарбоціанін (dis-On(3)) в концентрації 1,22 мкМ [Sins Alon et al., 1974].

Мітохондрії печінки щурів, субклітинні і субсинаптосомальні фракції мозку щурів одержували за відомим методом диференціального центрифугування в градієнті щільності сахарози [Schnider et al., 1950; Henn et al., 1982] без істотних змін; фракцію синаптичних везикул додатково очищали від фрагментів плазматичних мембран синапсом [Лишко и др., 1986]. Очищення ПДК із мітохондріальних екстрактів проводили згідно описаному методу [Roche & Cate, 1977]. Остання стадія очистки полягала в ультрацентрифугуванні через шар 1,5 М сахарози в 0,05 М HEPES-буфері, який містив 0,1 мМ EGTA, що сприяло повному відокремленню фосфатази від комплексу. Середня питома активність препарату комплексу - 3 од. на 1 мг білку. ПДГ-фосфатазу ізольовали із об'єднаних супернатантів, одержаних після осаду ПДК поліетиленгліколем (ПЕГ) з послідовним центрифугуванням. додатково був введений етап концентрування розчину ферменту за допомогою ультрафільтрації. ТЗБ із синапсом мозку щурів виділяли згідно розробленому нами методу [Постенко и др., 1987], який включає хроматографію на афінному сорбенті і гельфільтрацію на колонці з сефадексом G-150 (2,2x50 см). Афінний сорбент - тіамін-N-4-азобензоіл-ε-амінокапроїл-гідразідсефароза 4В - був синтезований за методом Кляшицького з співавт. [Кляшицкий и др., 1980] з невеликою модифікацією. Вільшість досліджень з ТТФ проведено з синтезованим нами ТТФ, очистка якого проводилась за допомогою розробленого методу [Пархоменко, Климчук, 1982].

Активність ПДК в гомогенатах тканин визначали в спряженій системі з *p*-нітроаніліном і аріламінацетилтрансферазою [Wieland et al., 1972]. В окремих дослідженнях піруватдегідрогеназу і α-кетоглутаратдегідрогеназу активність визначали з ферриціанідом як штучним акцептором електронів, взявши за основу метод, описаний Gubler [Gubler, 1962] або модифікований метод [Kresze, 1979], в якому [1-¹⁴C]піруват служить субстратом. Для визначення здатності гомогенатів печінки синтезувати із пірувату ацетоїн використовували розроблений нами метод визначення ацетоїну безпосередньо в реакційному середовищі [Вовк, Пархоменко, 1982]. ПДГ-кіназу ак-

тивність ПДК оцінювали по швидкості інактивації комплексу при інкубації у спеціальному середовищі і по швидкості включення в комплекс міченого фосфату із $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Активність ПДГ-фосфатази вимірювали по початковій швидкості реактивації інактивованого фосфорилуванням комплексу або по початковій швидкості звільнення ^{32}P із препаратів комплексу, який був інактивований в присутності $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Активність транскетолази визначали по утворенню седогептулозо-7-фосфату за відомим методом. При визначенні активності тіаміндіфосфаткінази інкубацію препаратів проводили в середовищі, яке описано раніше [Воскобоев, Лучко, 1980] з використанням $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Синтезований $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{TTF}$ ідентифікували на смужках ацетату целюлози після електрофоретичного розділення продуктів реакції по розробленому нами методу. ТМЛазу, ТДФазу і ТТФазу активність визначали по утворенню неорганічного фосфору в малахітовим зеленим [Kwok-Ming et al., 1986]. В окремих експериментах, в тому числі в усіх дослідях з ТЗБ, аналіз ТТФ-азної активності проводили, вимірюючи ферментативним методом [Островский, 1979] швидкість утворення ТДФ. Ацетилхолінестеразу активність визначали з реактивом Еллмана, використовуючи як субстрат ацетилтіохолін [Trotter & Burton, 1969].

Включення міченого вуглецю із $[1\text{-}^{14}\text{C}]\text{піривату}$ як і міченого $[^{14}\text{C}]\text{холіну}$ в ацетилхолін (АХ) визначали після осадження АХ у вигляді періодату або рейнекату за допомогою описаного методу [Fonnum, 1975]. Тіамінзв'язуючу активність ТЗБ визначали за описаним методом [Nishimure, 1984] з використанням $[\text{тіазол-2-}^{14}\text{C}]\text{тіаміну}$ або $[\text{тіазол-}^{32}\text{S}]\text{тіаміну}$ в 0,05 М Рінгер-бікарбонатному буфері, рН 7,4, час інкубації - 20 хв. Незв'язаний ліганд відокремлювали фільтрацією на мембранних фільтрах Millipor або Watman GF/C з діаметром пор 0,45 мк після додавання до інкубаційного середовища γ -глобуліну і ПЕГ для осадження білку [Cuatrecasas, 1972].

Вміст індивідуальних тіамінфосфатів аналізували за допомогою розробленого нами методу [Parkhomenko et al., 1979], піривату - ферментативним методом [Асатиани, 1969], вільних жирних кислот - відомим калориметричним методом [Novak, 1965]. Вміст вільних відновлених SH-груп визначали за допомогою реактиву Еллмана [Sedlak & Lindsay, 1968] в гомогенатах

негайно після їх приготування та осадження білків етанолом. В залежності від об'єкту дослідження вміст білку визначали за допомогою методу Бредфорда, Лоурі або спектрофотометрично при 280 нм. Кінетичний аналіз даних по зв'язуванню і ферментативній активності, а також статистичну обробку даних проводили за допомогою спеціальних комп'ютерних програм.

ОСНОВНІ РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

1. Дослідження впливу тіамінового статусу організму щурів на функціонування ТДФ-залежних ферментів.

Зміна вмісту і направленості обміну тіаміну в тканинах забезпечувалась декількома методичними прийомами: виснаження ендогенного пулу вітаміну за рахунок утримання тварин на тіаміндефіцитному раціоні; введення на цьому фоні тіаміну; введення антагоністу тіаміну - окситіаміну нормальним тваринам з метою викликати B_1 -авітаміноз; інтенсифікація використання тіаміну в тканинах за рахунок згодовування тваринам високо-вуглеводного раціону (адаптивний гіперліпогенез) і додаткове введення на цьому фоні тіаміну.

В першій серії експериментів досліджувався взаємозв'язок між активністю ТДФ-залежних ферментів і рівнем тіаміну в печінці щурів в умовах дефіциту тіаміну і при додатковому його введенні. Перевірявся вплив на активність ферментів слідуєчих факторів: насичення ТДФ-ом апоферментних білків, індукція апоферментів тіаміном або синтезованим із нього ТДФ-ом, стан білкових SH-груп. Як свідчать дані, приведені в табл.1, внутрішньом'язове введення авітаміновим тваринам тіаміну, яке вже через 2 години приводить до максимального збільшення його вмісту в тканині печінки, супроводжується підвищенням рівня всіх аналізованих показників, в тому числі - істотним підвищенням активності дегідрогеназ α -кетокислот і відновленого глутатіону.

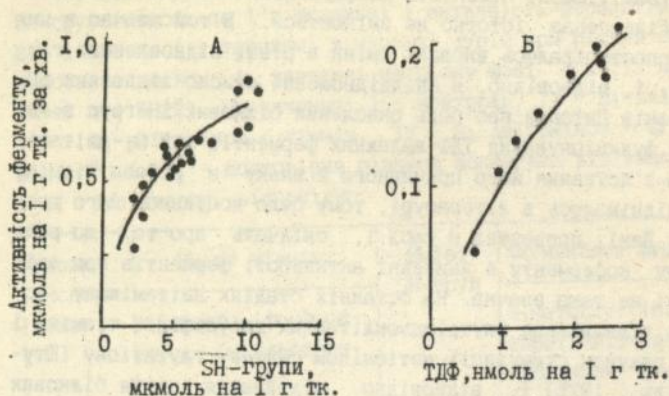
В жодній експериментальній точці ШПІ, інгібітор синтезу білків в цитоплазмі, практично не знижував активність ПДГ і КГДГ в розрахунку на 1 мг мітохондріального білку, а також величину ТДФ-ефекту для обох дегідрогеназ, по якій умовно можна судити про наявність вільного апоферменту. Отже, можна

Табл.1. Вміст тіаміну (нмоль на 1 г тканини), небілкових SH-груп (мкмоль на 1 г тканини) і активність ферментів (мкмоль за 1 хв. на 1 г тканини) в печінці щурів при різній забезпеченості тіаміном і введенні на цьому фоні ЦГІ і метіоніну ($M \pm m$, $n = 5-12$). Позначення: I - контроль, II - В₁-авітамінос, III - В₁-авітамінос + тіамін, IV - В₁-авітамінос + ЦГІ + тіамін; "а" і "б" - достовірна різниця показника від такого для I і II груп тварин, відповідно.

Умови експерименту	Вміст тіаміну		Вміст SH-груп	Активність ферментів	
	вільного	фосфорильованого		α -кетоглутаратдегідрогенази	піруватдегідрогенази
I	1,42	15,13	12,77	0,67	0,46
	$\pm 0,18$	$\pm 0,95$	$\pm 1,56$	$\pm 0,04$	$\pm 0,05$
II	0,92	1,25 ^а	6,24 ^а	0,41 ^а	0,19 ^а
	$\pm 0,12$	$\pm 0,21$	$\pm 1,32$	$\pm 0,04$	$\pm 0,02$
III:					
через	1,57	16,85 ^б	13,36	0,77	0,47 ^б
2 години	$\pm 0,44$	$\pm 0,56$	$\pm 2,65$	$\pm 0,15$	$\pm 0,06$
6 годин	1,66	16,50 ^б	9,92	0,57	0,58
	$\pm 0,33$	$\pm 4,45$	$\pm 2,62$	$\pm 0,10$	$\pm 0,18$
12 годин	1,31	12,08 ^б	7,30	0,33 ^а	0,40
	$\pm 0,22$	$\pm 1,51$	$\pm 1,59$	$\pm 0,03$	$\pm 0,16$
IV:					
через	3,99 ^{а, б}	23,17 ^{а, б}	15,1	0,86 ^б	0,83 ^б
2 години	$\pm 0,41$	$\pm 1,05$	$\pm 2,2$	$\pm 0,12$	$\pm 0,18$
6 годин	5,69 ^{а, б}	22,19 ^{а, б}	11,9	0,69 ^б	0,85 ^б
	$\pm 0,52$	$\pm 1,20$	$\pm 2,3$	$\pm 0,04$	$\pm 0,20$
12 годин	2,59 ^{а, б}	17,83 ^б	8,1	0,56	0,48 ^б
	$\pm 0,08$	$\pm 1,51$	$\pm 2,8$	$\pm 0,05$	$\pm 0,09$
I + метіонін	1,04	2,58 ^б	10,68 ^б	0,69 ^б	0,25 ^б
через	$\pm 0,30$	$\pm 0,38$	$\pm 1,43$	$\pm 0,08$	$\pm 0,04$
2 години					

зробити висновок, що при В₁-авітамінозі і дальшому введенні щурам тіаміну кількість апоферментних білків ТДФ-залежних дегідрогеназ істотно не змінюється. В той же час в цих умовах спостерігались виразні зміни в рівні відновленого глутатіону, і, відповідно, в співвідношенні окисно-відновних SH-груп білків. Питання про роль окислення білкових SH-груп в порушенні функціонування ТДФ-залежних ферментів при В₁-авітамінозі та з'ясування його причинного зв'язку з рівнем тіаміну ще не піднімалось в літературі, тому було доцільно його дослідити. Дані, приведені в табл.1, свідчать про те, що роль дефіциту коферменту в зниженні активності ферментів при авітамінозі не така значна. На останніх стадіях авітамінозу достатньо відновлення внутрішньоклітинних дисульфідів тіаміну і ТДФ за рахунок стимуляції метіоніном синтезу глутатіону [Штутман и др., 1975] і, відповідно, підвищення рівня білкових SH-груп для того, щоб збільшити активність ферментів майже до рівня норми.

Щоб відповісти на запитання, що перинно при розвитку В₁-авітамінозу - зниження активності ТДФ-залежних ферментів внаслідок дефіциту коферменту чи незалежно від нього порушення синтезу глутатіону, яке спричиняє зниження рівня вільних і білкових SH-груп в тканинах, був проведений кореляційний аналіз взаємозв'язку між інтересуючими нас показниками по всій сукупності експериментальних точок, одержаних в даній серії експериментів. Результати показали, що кореляцію можна спостерігати тільки між активністю КГДГ і рівнем SH-груп і, в меншій виборці - між активністю КГДГ і рівнем ТДФ (мал.1). Одержана сукупність експериментальних точок була проаналізована за допомогою комп'ютерної програми. В результаті такого аналізу концентрація SH-груп (або глутатіону), при якій активність ферменту складає 50% від максимальної, дорівнює $4,07 \pm 0,9$ мкмоль на 1 г тканини, що відповідає середньому фізіологічному рівню глутатіону [Кулинский, Колесниченко, 1990]. Залежність між КГДГ-активністю і вмістом ТДФ виявлена нами лише в групі тварин з дефіцитом тіаміну при майже десятикратному, в порівнянні з контролем, зниженні рівня коферменту (мал.1,В). При аналізі цих даних прийнято припущення, що визначаємий фосфорильований тіамін весь представлений ТДФ-ом і останній рів-



Мал.1. Залежність активності α -кетоглутаратдегідрогенази від рівня SH-груп (А) і вмісту ТДФ (Б) в печінці щурів з різною забезпеченістю тіаміном. Криві побудовані відповідно відомій методиці [Duggleby, 1981].

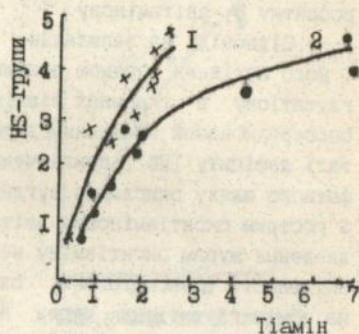
номірно розподілений в тканині печінки. Незважаючи на формальність і відносність зробленого аналізу, величина умовної K_m для ТДФ по відношенню до активності КГДГ ($3,83 \pm 1,62$ мкМ) виявляється близькою до K_m , яка була визначена для ТДФ в ізольованих системах з відповідним апоферментом [Butler et al., 1977; Roche & Reed, 1982]. Ця величина в 5-6 разів нижча, ніж концентрація ТДФ в печінці нормальних тварин (табл. 1), отже, при фізіологічних умовах ТДФ як кофермент не являється лімітуючим в функціонуванні залежних від нього дегідрогеназ. Форма кривої, яка представлена на мал. 1.1,Б, свідчить про те, що як незалежна змінна у даному випадку виступає вміст SH-груп, отже зміна активності ферменту є наслідком зміни вмісту відновленого глутатіону. Додатковим підтвердженням такого висновку можуть служити результати експериментів з введенням метіоніну тіаміндефіцитним тваринам (табл.1): в цих умовах підвищення рівня SH-груп за рахунок стимуляції синтезу глутатіону введенням метіоніном достатньо для нормалізації активності ТДФ-залежних ферментів. Результати

проведеного аналізу свідчать про те, що порушення обміну глутатіону швидше, ніж дефіцит коферменту, може бути первинною причиною зниження активності ТДФ-залежних дегідрогеназ при розвитку В₁-авітамінозу.

Відповідь на запитання, чи являється спад рівня тіаміну і його похідних прямою причиною зниження рівня відновленого глутатіону в тканинах тіаміндефіцитних тварин чи цей ефект опосередкований зниженням активності транскетолази в результаті дефіциту ТДФ і пригніченням внаслідок цього пентозофосфатного шляху окислення вуглеводів, одержаний в експериментах з гострим окситіаміновим авітамінозом. В перші 12 годин після введення шурам окситіаміну не спостерігалось помітних змін в активності транскетолази, отже, в цьому випадку дію тіаміну на обмін глутатіону через пентозофосфатний шлях з великою імовірністю можна виключити. В той же час в цих дослідях чітко прослідковувалась однонаправленість в зміні рівня SH-груп і вільного (не фосфорильованого) тіаміну в перші години після ін'єкції окситіаміну (мал.2). Комп'ютерний аналіз сукупності експериментальних точок, що відповідають вмісту SH-груп при конкретних значеннях вмісту тіаміну, показав, що вони розміщуються в певній послідовності, яка відрізняється для контрольних і піддослідних (з введенням окситіаміну) тварин. Одержані криві формально свідчать про залежність вмісту SH-груп від концентрації вільного тіаміну, проте молекулярні механізми такого зв'язку не з'ясовані.

Згідно даних, приведених в табл.1, активність ПДГ також як і КГДГ залежить від стану SH-груп, проте вираженої прямої кореляції між активністю цього ферменту і рівнем SH-груп чи тianeвої концентрації ТДФ не вдалося встановити. Пояснюється це тим, що регуляція ПДК в фізіологічних умовах набагато складніша і спряжена з ковалентною модифікацією однієї із суб'єдиниць ПДГ [Reed et all., 1975]. Оскільки в літературі існують окремі відомості про участь ТДФ в регуляції ПДК фосфорильованням-дефосфорильованням [Roche, Cate, 1977; Alkony et all., 1976], ми спробували детальніше дослідити це питання. Згідно з даними, що є в літературі [Пархоменко, Рыбина, 1978], багатфакторна регуляція ПДК проходить, переважно, на рівні його ТДФ-залежного першого компоненту, ПДГ, який у

Мал. 2. Вміст тіаміну (вісь абсцис, в нмолях на 1 г тканини) і СН-груп (в мкмольах на 1 г тканини) в печінці щурів в нормі (1) і після введення ОТ (2). Криві побудовані згідно відомій методиці [Duggleby, 1981]; $M \pm m$, $n=3-5$.



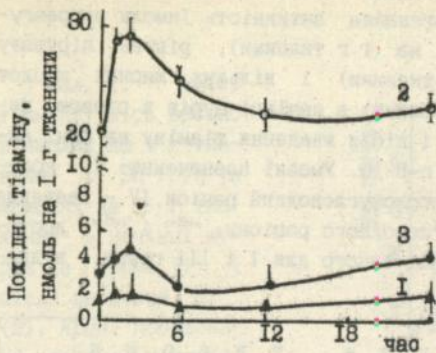
більшості випадків виявляється лімітуючим в функціонуванні всього комплексу в цілому. Проведене нами порівняльне дослідження зміни активності цілого комплексу і його першого компонента в печінці щурів з моделлю адаптивного гіперліпогенезу і введенні на цьому фоні тіаміну підтверджує лімітуючу роль піруватдегідрогеназного компонента в комплексі (табл.2). Проте, згідно даних, приведених в табл. 2, зміни вмісту ТДФ в фізіологічних межах, навіть підвищення цього рівня в печінці тварин IV групи в 1,5 раза в порівнянні з I і III групами, не виявляє прямої активуючої, коферментної, дії на активність залежного від нього ферменту - ПДГ і ПДК в цілому. Навпаки, при введенні тіаміну тваринам з адаптивним гіперліпогенезом спостерігається зворотна направлені зміни між вмістом ТДФ і активністю ферменту, що підтверджується відповідними змінами в тканинній концентрації його субстрату - пірувату і жирних кислот. Останні в даному випадку можна розглядати як кінцевий продукт метаболічного шляху перетворення пірувату через ПДК, так як є дані, що в цих умовах синтез жирних кислот прямо залежить від синтезу ацетил-КоА в повній реакції ПДК [Denton, 1975; Denton, Hugnes, 1987]. Результати дослідів з визначенням всіх показників в динаміці після одноразової ін'єкції тіаміну щурам з моделлю адаптивного гіперліпогенезу (мал. 3 і 4) підтверджує наявність в даних фізіологічних умо-

Табл. 2. Вміст похідних тіаміну (нмоль на 1 г свіжої тканини), піруватдегідрогеназна активність (нмоль прореагуваного пірувату за 1 хв. на 1 г тканини), рівень пірувату (нмоль на 1 г вологої тканини) і вільних жирних кислот (мкмоль на 1 г вологої тканини) в печінці щурів з різною метаболічною направленістю і після введення тіаміну на фоні активації ліпогенезу; $M \pm m$, $n=5-10$. Умовні позначення: I - контроль, II - голод, III - високовуглеводний раціон, IV - введення тіаміну на фоні високовуглеводного раціону; "а" і "б" - достовірна різниця показника від такого для I і III групи, відповідно.

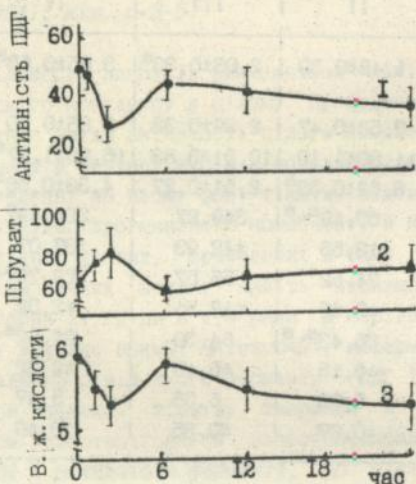
Показник	Г р у п а т в а р и н			
	I	II	III	IV
Вільний тіамін	1,27±0,15	1,48±0,30	2,05±0,33 ^а	3,05±0,63 ^а
ТМФ	2,85±0,80	3,58±0,47	2,99±0,33	3,85±0,50
ТДФ	10,97±1,54	11,80±1,10	10,61±0,83	16,96±1,27 ^б
ТТФ	2,88±0,50	3,62±0,38 ^а	2,61±0,27	4,33±0,68 ^б
Активність ПДК	243,90	60,49 ^{а, б}	349,27	220,49 ^б
Активність ПДГ	±62,40	±13,66	±42,93	±37,07
Піруват	49,72	24,62	55,67	23,76 ^{а, б}
В. жирні кислоти	±10,18	±7,62	±12,51	±2,02
	57,50	35,43 ^{а, б}	64,30	92,92 ^{а, б}
	±3,10	±6,15	±5,15	±9,32
	5,90	6,96	6,36	5,47
	±0,33	±0,37	±0,35	±0,40

вах оберненої кореляції між змінами в активності ПДК і концентрації тіамінфосфатів.

Перше припущення, яке виникає відносно механізму впливу тіаміну на активність ПДК, виходячи з існуючих відомостей про складність будови і регуляції цього ферментного комплексу в фізіологічних умовах, - прямий або опосередкований вплив тіамінфосфатів на регуляцію ПДК фосфорилуванням-дефосфорилуванням. Таке припущення підтверджується результатами експери-



Мал. 3. Вміст вільного та загального тіаміну і ПТФ (відповідно, 1, 2 і 3, в нмолях на 1 г тканини) в печінці шурів з адаптивним гіперліпогенезом в динаміці після одноразової ін'єкції тіаміну; $M \pm m, n=3-5$.



Мал. 4. Піруват-дегідрогеназна активність (1, нмоль окисленого пірувату за 1 хв. на 1 г тканини), вміст пірувату (2, нмоль на 1 г тканини) і вільних жирних кислот (3, мкмоль на 1 г тканини) в печінці шурів з адаптивним гіперліпогенезом в динаміці після одноразової ін'єкції тіаміну; $M \pm m, n=3-5$.

ментів, в яких в динаміці після одноразового введення тіаміну шурам з адаптивним гіперліпогенезом активність ПДГ вимірювалась до і після активації *in vitro* ендogenousю ПДГ-фосфатазою. Активація ферменту в присутності 10 мМ Mg^{2+} майже повністю знімала негативний ефект тіаміну.

Узагальнюючи дані, приведені в цій главі, можна вивести, що в нормі в фізіологічних умовах відсутня регуляція активно-

сті дегідрогеназних компонентів ПДК і КГДГ по принципу асоціації-дисоціації апоферменту і коферменту - ТДФ. Лише при жорсткому В₁-авітамінозі, коли загальний вміст тіаміну знижується на порядок в порівнянні з нормою, можна спостерігати залежне від втрати коферменту зниження активності КГДГ (мал. 1, В). Проте, зміна концентрації тіамінфосфатів в тканинах *in vivo*, також як і в ізольованих мітохондріях, в залежності від умов може виявляти різнонаправлений вплив на функціонування ПДК. Відомості, які є в літературі, про можливість ферментативного взаємоперетворення в парі ТДФ-ТТФ і про сувору структурованість цих реакцій на білках [Reunwonga & Cooper, 1977] дають підстави припустити, що взаємоперетворення тіамінфосфатів *in vivo* може бути спряжене з регуляцією активності ПДК, на першому ферментному білку якого показана наявність афінної до ТДФ регуляторної ділянки [Roche & Cate, 1977], відмінної від тої, що міститься в активному центрі цього білку.

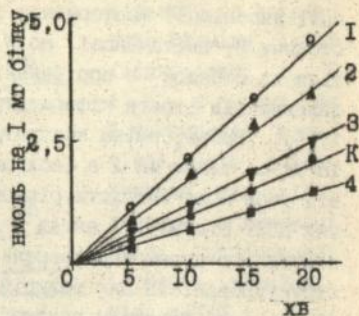
2. Дослідження молекулярних механізмів дії ТДФ і ТТФ на функціонування ПДК

Аналізуючи можливі молекулярні механізми участі тіамінфосфатів (ТДФ і ТТФ) в регуляції активності ПДК, ми зупинились на наступних: 1) тіамінфосфати, приймаючи участь в реакціях перефосфорилування з аденіловими нуклеотидами, збільшують вміст внутрішньомітохондріального АТР, активуючи таким чином ПДГ-кіназу реакцію; 2) ТТФ служить донором γ -фосфату в ПДГ-кіназній реакції; 3) ТТФ за якимсь іншим механізмом активує ПДГ-кіназу реакцію або інгібує ПДГ-фосфатазу реакцію.

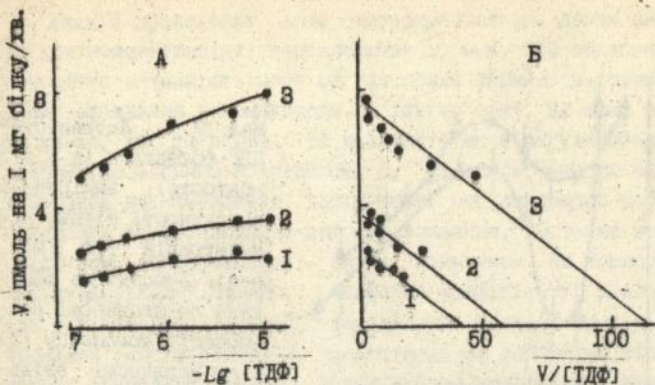
Функціонування першого механізму в умовах *in vivo* практично неможливе: фізіологічна концентрація тіамінфосфатів, принаймні, на три порядки нижча такої аденілових нуклеотидів. Припущення про участь ТТФ в ПДГ-кіназній реакції як донору фосфату не підтвердилось при експериментальній перевірці на препаратах ПДК різного ступеню очистки.

Можливість участі ТДФ і ТТФ в регуляції активності ПДГ-фосфатази перевірялась на грубоочищених препаратах комплексу з питомою активністю 0,5 од. при активації їх екзогенною фосфатазою. Як свідчать одержані результати (мал. 5), ТДФ сприяє активації комплексу, в той час як ТТФ гальмує її.

Мал. 5. Кінетика ацетилювання р-нітроаніліну в спряженій реакції з арил-амінацилтрансферазою грубоочищеними препаратами ПДК, які були попередньо проінкубовані в середовищі для активації ендогенної ПДГ-фосфатази без ефektorів (1) і з додаванням ТДФ (2), ТТФ (3) і АТР (4). К - активність у контрольній пробі.

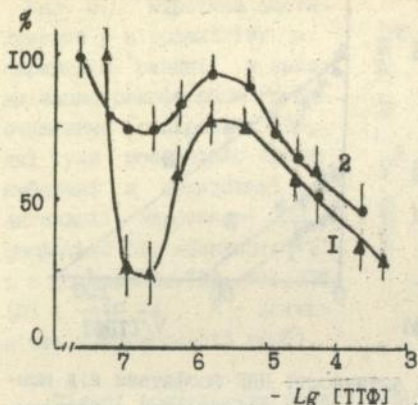


Дальші дослідження молекулярних механізмів дії тіамінфосфатів на функціонування регуляторних ферментів ПДК були проведені на очищених препаратах ПДК (з якими жорстко асоційована ПДГ-кіназа) і ПДГ-фосфатази. Відповідно до одержаних даних, ТДФ при усіх досліджуваних концентраціях є ефективним активатором фосфатази [мал. 6]. Аналіз кінетики активації був проведений графічним методом в координатах Еді-Хофсті (у нашому випадку - залежність V/A від V , де A - концентрація активатора; V - швидкість реактивації в присутності активатора) [Узоб, 1966]. Константу активації (K_a) визначали як величину, зворотно тангенсу кута нахилу прямої до осі V (мал. 6, B). Аналіз показав, що при зміні концентрації субстрату спорідненість активатора до ферменту не змінюється, K_a залишається рівною в середньому 65 нМ. ТТФ, на відміну від ТДФ, при усіх досліджених концентраціях знижує активність фосфатази (мал. 7). В інгібуванні можна прослідкувати дві зони: перша - в діапазоні концентрації ТТФ 10-100 нМ, друга - при концентрації вище 1 мкМ. Двухфазність в інгібуванні зберігається при використанні обох методів аналізу фосфатазної активності, однак інгібування низькими концентраціями ТТФ значно більш виражене при вимірюванні активності фосфатази по швидкості реактивації комплексу. Спостережену картину можна пояснити, припускаючи, що ТТФ при низьких концентраціях, близьких до концентрації самого комплексу, зв'язується з останнім, більш специфічно



Мал. 6. Залежність активності ПДГ-фосфатази від концентрації ТДФ (А) при різних концентраціях субстрату: 1, 2 і 3, відповідно, 30, 60 і 120 мкг білку ПДК, інактивованого з $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$; Б - те ж саме в координатах Еді-Хофсті. Активність ПДГ-фосфатази [V] визначена по звільненню ^{32}P із ПДК і виражена в пмолях фосфору на 1 мг білку за хв.

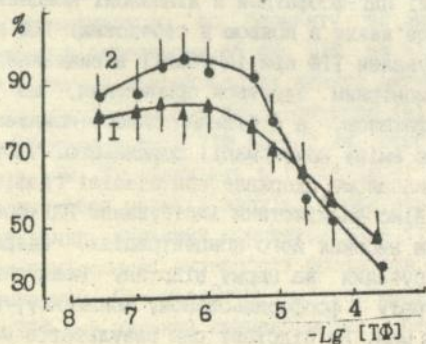
інгібує відщеплення фосфатазою саме того фосфатного залишку із трьох можливих [Kerbey et al., 1981], з якими зв'язана реактивація комплексу. Як видно, при високих концентраціях ТДФ така специфічність втрачається. Можна припустити, що тимчасове підвищення активності ПДГ-фосфатази в діапазоні концентрацій ТДФ 0,5-5,0 мМ пов'язане з появою в середовищі ТДФ внаслідок часткового руйнування ТДФ при інкубації в вищевказаних умовах. Однак більш імовірним здається припущення, що ТДФ взаємодіє не з ПДГ-фосфатазою, а з білками самого комплексу, і ця взаємодія викликає зміну конформації останнього. Часткове підтвердження вищесказаному одержане при аналізі графічним методом в координатах Діксона кінетики інгібування ПДГ-фосфатази ТДФ-ом при більш високих його концентраціях. Одержані дані свідчать, що інгібування на цьому відрізку конкурентне по відношенню до субстрату - фосфорильованому комплексу; відповідно, $K_i = 25,0 \pm 3,0$ мМ. На підставі цих результатів можна



Мал. 7. Активність ПДГ-фосфатази (в % від контролю), виміряна в присутності різних концентрацій ТТФ ($M \pm m$, $n=4$). Активність виміряна по швидкості реактивації комплексу (1) і по швидкості звільнення ^{32}P (2).

зробити висновок, що ТТФ інгібує активність ПДГ-фосфатази, перешкоджаючи її зв'язуванню з комплексом.

Результати досліджень впливу обох тіамінфосфатів на активність ПДГ-кінази показали (мал. 8), що ТДФ і ТТФ обидва виразно інгібують активність ПДГ-кінази при концентраціях, що перевищують 10 мкМ. Пригнічення ПДГ-кінази ТДФ-ом вже описано раніше [Roche & Reed, 1972], тоді як відомості відносно ТТФ отримані вперше.



Мал. 8. Вплив тіамінфосфатів (ТФ) на активність ПДГ-кінази (% від контролю): 1 - ТДФ, 2 - ТТФ.

Аналіз приведених вище експериментальних даних свідчить, що при концентраціях, перевищуючих 10 мкМ, ТТФ подібним чином пригнічує активність обох регуляторних ферментів, один з яких міцно зв'язаний з комплексом, а другий - ні. Це може вказувати на те, що, по-перше, ТТФ взаємодіє не з регуляторними ферментами, а з самим комплексом, а, по-друге, що ця взаємодія приводить до зменшення доступності регуляторного центру, що підлягає фосфорилюванню-дефосфорилюванню. Останнє може бути слідством конформаційної зміни комплексу. На користь цього свідчить також уявне значення коефіцієнту Хілла (0,48) для інгібування ТТФ-ом ПДГ-фосфатазної реакції на лінійному проміжку інгібування, що розраховане за допомогою різносного методу [Курганов, 1973]. В той же час коефіцієнт Хілла для активації фосфатази ТДФ-ом близький до 1,0, що можна розцінювати як факт, вказуючий на наявність у комплексі одного регуляторного центру, зв'язуючого ТДФ.

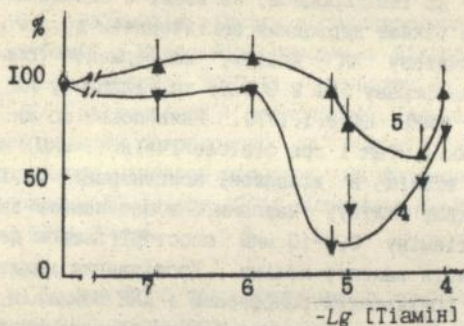
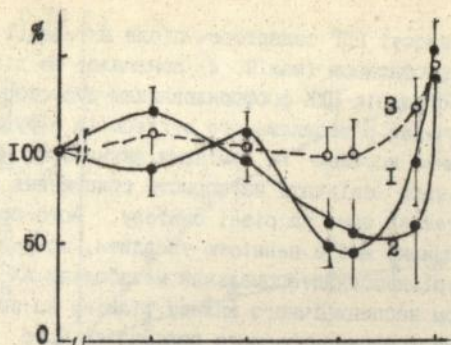
Приведені вище дані свідчать про те, що ТДФ як регулятор виявляє на ПДК тільки активуючу дію, в той час як ТТФ при всіх досліджуваних концентраціях гальмує активацію комплексу фосфатазою. В цілому та обставина, що дві такі близькі за будовою і здатні до взаємоперетворення сполуки, як ТДФ і ТТФ, чинять на ПДГ-фосфатазу протилежну дію, може мати певне фізіологічне значення, забезпечуючи додатковий високоспецифічний механізм регуляції активності комплексу. Навряд чи цей механізм може відігравати важливу роль в тканині печінки, де активність ПДК визначається, перш за все, станом метаболізму, і тільки комбінація таких факторів, як активація ліпогенезу після голодування і введення на цьому фоні тіаміну дозволила нам виявити пригнічуючу дію тіаміну на активність ПДК. В цьому плані більший інтерес становлять тканини, збагачені клітинами із збудливими мембранами, так як показано, що регуляція функціонування в них ПДК чітко спряжена із змінами мембранного потенціалу [Schaffer & Olson, 1980; Browning et al., 1981; Thashihiro A. et al., 1984]. Саме тому дослідження були продовжені на тканині мозку і синаптосомах.

3. Дослідження некоферментної ролі тіаміну в функціонуванні нервової клітини

Одна з перших гіпотез відносно нейротропної функції тіаміну (Peters, 1964) пояснює патологічні зміни в нервовій тканині при недостатності тіаміну порушенням в синтезі ацетил-КоА, попередника нейромедіатора АХ, який обумовлений зниженням активності ПДК внаслідок дефіциту його коферменту - ТДФ. Дальші дослідження показали, що далеко не завжди порушення функції нервової тканини, що пов'язані з дефіцитом тіаміну, супроводжуються зниженням ПДГ-активності в мозку (Naas, 1990) і ця гіпотеза на деякий час була забута. Проте цілий ряд експериментальних даних, одержаних дослідниками за останній час, спонукають повернутись до розгляду питання про можливість реалізації специфічної нейротропної функції тіаміну на рівні регуляції синтезу чи обміну АХ. В аспекті проблеми, яка розглядається, із цих даних найбільше значення мають наступні: 1) відкриття механізму регуляції ПДК фосфорилуванням-дефосфорилуванням (Reed, 1969), 2) експериментальні докази переважного використання пірувату для синтезу АХ [Lefresne et al., 1978; Perry et al., 1980], 3) докази чіткої спряженості регуляції ПДК по механізму фосфорилування з функціонуванням збудливої мембрани [Browning et al., 1981; Schaffer & Olson, 1980]. Виявлення участі тіамінфосфатів у регуляції ПДК з урахуванням вищеприведених фактів дозволяє повернутись до гіпотези, висловленої Peters, але з позиції іншого, некоферментного, механізму дії тіаміну.

Оскільки, по нашим спостереженням, ТДФ і ТТФ виявляють протилежно направлену дію на активність ПДГ-фосфатази і в цілому на активність ПДК, ми припустили, що легко протікаюча *in vivo* трансформація цих двох фосфорних ефірів тіаміну, спряжена із зміною мембранного потенціалу, може відігравати певну роль в регуляції активності ПДК і, відповідно, синтезу АХ.

Однак, щоб перевірити це припущення, треба було, перш за все, переконатись в тому, що, дійсно, зміни концентрації тіамінфосфатів в нервовій клітині будуть приводити до зміни синтезу АХ із пірувату і, відповідно, до зміни активності ПДК, і що концентрація фосфатів тіаміну в клітині змінюється синхронно із зміною потенціалу збудливої мембрани.

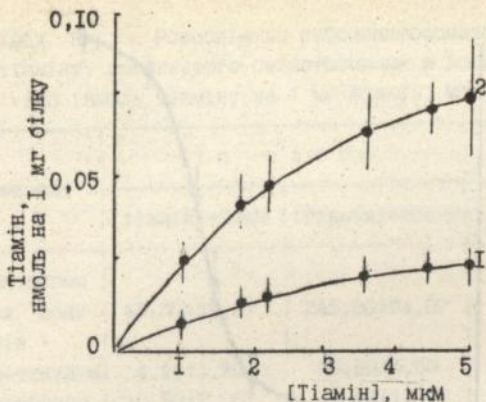


Мал. 9. Активність ПДК (1), ПДГ (2 і 3, відповідно, до і після активації ендогенною ПДГ-фосфатазою) і включення міченого вуглецю із $[2-^{14}\text{C}]$ пірувату в АХ (4) і CO_2 (5) в синаптосомах, інкубованих з тіаміном. Усі величини виражені в % від значення відповідного показника в контролі (інкубація без тіаміну).

Дослідження впливу тіаміну на синтез АХ із $[2-^{14}\text{C}]$ пірувату синаптосомами, проведене в експериментах *in vitro*, показало, що зростання концентрації тіаміну в інкубаційному середовищі від 1 до 50 мкМ приводить до нелінійного інгібування включення міченого вуглецю із $[2-^{14}\text{C}]$ пірувату в АХ (мал. 9). В цих же умовах повна активність ПДК, також як і активність першого ферментного білку комплексу, змінюється синхронно із зміною включення мітки з пірувату в АХ (мал. 9, 1 і 9, 2).

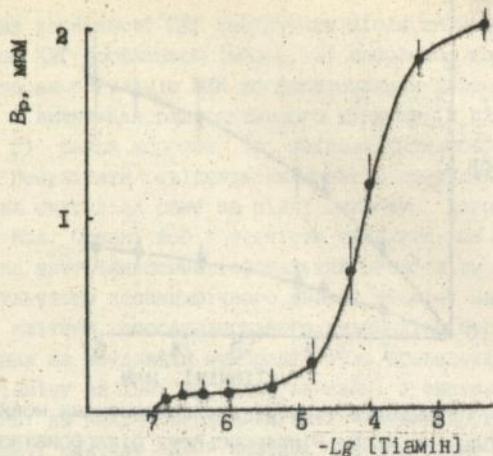
Визначення активності ПДГ синапсом після активації *in vitro* ендогенною ПДГ-фосфатазою (мал. 9, 4) показало, що дія тіаміну направлена на регуляцію ПДК фосфорилуванням-дефосфорилуванням. Зміна включення радіоактивного вуглецю із пірувату в CO_2 (мал. 9, 5) також корелює із змінами активності ПДК і ПДГ. Одержані результати свідчать на користь припущення про вплив тіаміну на синтез АХ саме на рівні синтезу його попередника - ацетил-КоА. Однак, щоб з певністю твердити, що цей шлях дії тіаміну на внутрішньосинаптосомальний метаболізм АХ єдиний і не є результатом неспецифічного впливу тіаміну на всі функції нервової клітини, опосередкованого взаємодією його з певними рецепторами на збудливій мембрані, було проведене дослідження впливу тіаміну на інші процеси, зв'язані з синтезом і обміном АХ, а саме: на захват нервовими закінченнями другого субстрату в реакції синтезу АХ - холіну, на ферменти синтезу АХ - холінацетилтрансферазу (КФ 2.3.1.6) та гідролізу АХ - ацетилхолінестеразу (АХЕ, КФ 3.1.1.7). Виявилось, що як при субстратній (100 мкМ), так і при фізіологічній (1 мкМ) концентраціях холіну, тіамін в діапазоні концентрації 0,1 мкМ-1 мМ не інгібує захват холіну. Навпаки, в останньому випадку при концентрації тіаміну 0,1-10 мкМ спостерігається деяка вірогідна стимуляція захвату холіну. Дослідження впливу тіаміну на активність холінацетилтрансферази і АХЕ показали, що і на ці реакції тіамін не впливає при фізіологічних концентраціях. Інгібування АХЕ-ої активності тіаміном характеризується K_i -0,2 мМ. Таким чином, проведені дослідження підтверджують припущення про вибірну дію тіаміну на синтез АХ на рівні регуляції ПДК.

При аналізі одержаних результатів неминуче виникає питання: наскільки фізіологічна ця дія тіаміну? Відповідно до даних літератури, тіамін звільнюється із нервово-м'язевих препаратів при збудженні [Minz, 1938; Itokawa & Cooper, 1970]. Отже, можливо чекати, що в пресинаптичній щілині *in vivo* періодично створюються певні концентрації екзогенного по відношенню до нервових закінчень тіаміну. В зв'язку з цим був досліджений характер взаємодії тіаміну з нервовими закінченнями в діапазоні його фізіологічних концентрацій (мал. 10). Виявилось, що K_d для специфічного зв'язування тіаміну з мембраною нервових



Мал. 10. Взаємодія тіаміну з синаптосомами мозку щурів при інкубації в Кребс-Рінгеровському бікарбонатному буфері при температурі 10°C (1 - переважно зв'язування) і 37°C (2 - зв'язування + транспорт). Кількість прореагуваного тіаміну розраховано по питомій радіоактивності використаного міченого тіаміну. За допомогою комп'ютерної програми [Duggleby, 1981] визначені $K_d=2,34 \pm 0,55$ мкМ і $K_m=3,92 \pm 1,3$ мкМ.

закінчень і K_m для його транспорту через мембрану мають один і той же порядок і дорівнюють, відповідно, $2,34 \pm 0,55$ мкМ і $3,92 \pm 1,3$ мкМ, що відповідає внутрішньоклітинній концентрації тіаміну. Результати, що одержані при дослідженні концентраційної залежності специфічного зв'язування тіаміну ізольованими плазматичними мембранами синаптосом (ПМС) (мал. 11) і фактично відображають характер взаємодії тіаміні з мембранами нервових закінчень, принципово нічим не відрізняються від даних, одержаних при вивченні взаємодії тіаміну з мембранами інших клітин, наприклад, слизової оболонки шлунку [Rindi & Ventura, 1972], гепатоцитів [Lumeng et al., 1979], клітин мікроорганізмів [Takashi, 1983] та ін., відповідно яким при низьких концентраціях тіаміну (від 0,01 до 10 мкМ) його взаємодія з біологічними мембранами є активним процесом, при більш високих - переважає пасивний транспорт. K_d для специфічного зв'язува-



Мал. 11. Концентраційна залежність зв'язування міченого тіаміну препаратами ПМС (інкубація в Кребс-Рінгеровському бікарбонатному буфері протягом 2,5 хв., 37 °С, 0,5 мг білку ПМС на 1 мл середовища); кожна точка - середнє із трьох дослідів; V_p - рівноважна концентрація зв'язаного тіаміну [Варфоломеев и др., 1985].

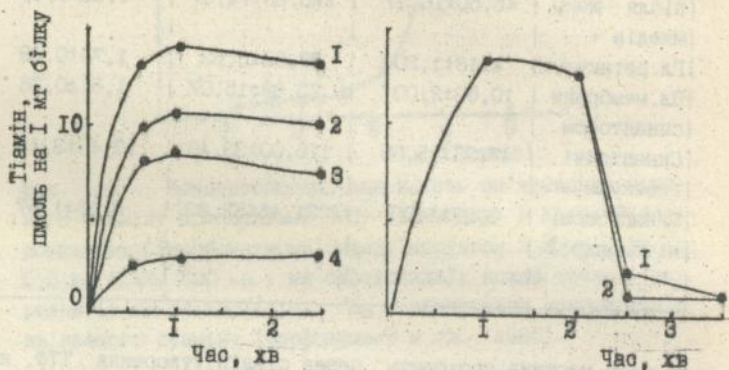
ння тіаміну з препаратами ПМС визначена рівною 3,1 мкМ. Захоплений синапсосомами мічений тіамін знаходиться у всіх субсинапсосомальних фракціях, причому в фізіологічних концентраціях його більша частина виявляється зв'язаною з фракцією мембран і синаптичних везикул (табл. 3). Уже через 2,5 хв. інкубації синапсосом з міченим тіаміном переважна частина захопленого ними тіаміну фосфорильована: тіамін, ТМФ, ТДФ і ТТФ складають, відповідно, 16,8; 21,5; 41,5 і 20,3% від загального вмісту міченого тіаміну (42,5 пмоль на 1 мг білку, середнє з трьох незалежних визначень). Слід відмітити, що при більш тривалій інкубації синапсосом в середовищі з тіаміном, частка ТТФ знижується до 5,9%, що наближається до середньостатистичного вмісту цього фосфату в тканині мозку [Bettendorff et al., 1985]. Одержані результати підтверджують літературні дані про те, що при надходженні тіаміну в клітини тварин знач-

Табл. 3. Розподіл по субсинаптосомальним фракціям [³⁵S]тіаміну, поглинутого синаптосомами в дослідях in vitro та in vivo (пмоль тіаміну на 1 мг білку), M±m, n=3.

Препарат	In vitro		In vivo
	[тіамін]-2мкМ	[тіамін]-20мкМ	[тіамін]-1,5мкМ
Синаптосоми			
після шоку	45,60±10,17	245,80±74,07	1,80±0,40
Миелін +			
Гл. ретикулум	4,18±1,20	28,80±5,63	1,74±0,38
Пл. мембрани	10,53±2,00	73,89±15,07	1,51±0,36
синаптосом			
Синаптичні	47,38±13,05	116,00±33,40	13,43±3,45
говікули			
Синаптосом.	3,27±1,00	231,46±52,83	5,16±1,67
мітохондрії			

на його частина проходить через стадію утворення ТТФ, який найбільш швидко обмінюється із фосфорильованих похідних тіаміну [Рыбина, 1959; Bergan & Fishman, 1975]. В той же час відносний вміст в синаптосомах інших тіамінфосфатів, які синтезуються із поглинутого ними міченого тіаміну, і через 15 хв. інкубації значно відрізняється від середньостатистичних показників для тканини мозку: ТДФ складає всього 41,2%, а частка ТМФ і вільного тіаміну набагато зростає. Ці результати свідчать, що поглинений тіамін не змішується з загальним пулом тіаміну в синаптосомах, основну частину якого в мозку, як і в інших тканинах, складає ТДФ [Matsuda & Cooper, 1981]. На основі цих даних було висловлено припущення про існування в нервових закінченнях рухомого пулу тіаміну, який відрізняється від метаболічного пулу, представленого в основному ТДФ, зв'язаним з білками залежних від нього ферментів. Детальне вивчення локалізації ферментів синтезу і деградації ТДФ і ТТФ в ізольованих синаптосомах показало, що, так як і в інших клітинах, синтез цих тіамінфосфатів в нервових закінченнях відбуваєть-

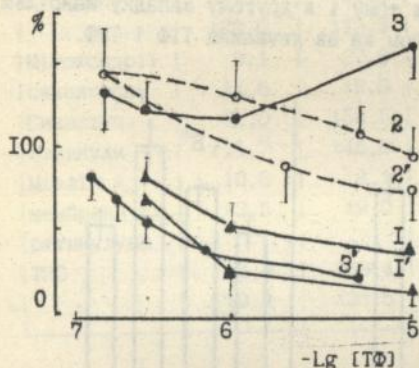
ся переважно в цитозолі, ТТФазна активність найбільш висока у фракції плазматичних мембран і синаптичних везикул, ТДФаза - в мітохондріях. Припущення про наявність лабільного пулу тіаміну в нервових закінченнях підтверджується результатами експериментів по вивченню впливу факторів, деполаризуючих мембрану синапсом, на зв'язування синапсами міченого тіаміну. Деполаризація мембрани не тільки перешкоджає зв'язуванню тіаміну синапсами, але й приводить до звільнення в навколишнє середовище уже захопленого раніше тіаміну (мал. 12).



Мал. 12. Зв'язування (А) і звільнення (Б) тіаміну синапсами при інкубації їх в Krebs-Рінгеровському бікарбонатному середовищі в KCL в концентрації 4,5 (1), 30 (2) та 60 (3) мМ і KCL (30 мМ) з валіноміцином (4).

Дослідження з використанням флуоресцентного зонду показали, що тіамін і його фосфати, добавлені в інкубаційне середовище, в свою чергу викликають деполаризацію синаптичних мембран: у Krebs-Рінгеровському середовищі тіамін, ТМФ, ТДФ викликають помітну деполаризацію мембрани, починаючи з 1-10 мкМ і вище, ТТФ - при більш низьких концентраціях - 0,1 мкМ. Оскільки присутність ТТФ в пресинаптичній щілині практично виключена (в мембрані міститься ТТФаза), а концентрації тіаміну і інших його фосфатів, що викликають деполаризацію, достатньо високі в порівнянні з можливою концентрацією їх *in vivo* в пресинаптичній щілині, ми вважаємо, що деполаризуюча дія цих

сполук на синаптичну мембрану зовні не фізіологічна. Однак, не виключено, що тіамінфосфати можуть чинити певний вплив на мембранний потенціал всередині клітини. Дійсно, дані, одержані при вивченні взаємодії тіаміну і його фосфатів з препаратами синапсом і ПМС, підтверджують висказане вище припущення. Виявилось, що тіамінфосфати не конкурують з [^{14}C]тіаміном за зв'язування з препаратами синапсом, але є ефективними конкурентами цьому ліганду при взаємодії його з препаратами ПМС. Найбільш показові результати в цьому плані отримані в експериментах з ТТФ-ом (мал. 13).

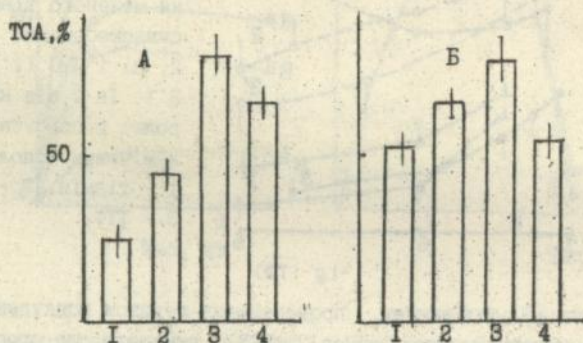


Мал. 13. Зв'язування міченого тіаміну синапсом (1, 2, 3) і ПМС (1', 2', 3') (в % від контролю) в присутності немічених сполук: 1 - тіамін, 2 - ТДФ, 3 - ТТФ.

Детальне дослідження, проведене за методом конкурентного аналізу [Варфоломеев, Зайцев, 1982], показало, що спорідненість ТТФ до препаратів ПМС порівнянна з такою самого тіаміну; розрахована для нього K_d дорівнює $1,0 \pm 0,3$ мкМ. Різниця в результатах, одержаних з препаратами синапсом і ПМС, можна пояснити тією обставиною, що у випадку синапсом ТДФ і ТТФ нездатні зв'язуватись з зовнішньою поверхнею мембрани, в препаратах же ПМС, де орієнтація мембранних везикул змішана (приблизно наполовину), для взаємодії стає доступна внутрішня поверхня ПМС, до якої спорідненість тіамінфосфатів вища.

Таким чином, можна припустити наявність певної детермінованості потоку тіаміну і його фосфатів між нервовим закінченням і пресинаптичною щільною, спряженого з функціональним станом збудливої мембрани: захват тіаміну при реполяризації мембрани, фосфорилування його до ТДФ та ТТФ в цитоплазмі, дефосфорилування всіх фосфатів до тіаміну і звільнення в преси-

наптичну щілину при деполаризації (збудженні). Мы припускаємо, що в цьому човниковому русі тіаміну через мембрану нервових закінчень певну участь приймає ізольований нами із синапсом тіаміназ'язуючий білок (ТЗВ). На таке припущення наводить однакова спорідненість тіаміну до ТЗВ і препаратів ПМС, що знайшло відображення в досить близьких значеннях K_d , які становлять, відповідно, 3,1 і 3,0 мкМ. Порівняльне дослідження взаємодії фосфорних ефірів тіаміну з ТЗВ і ПМС, проведене з використанням $[^{14}C]$ тіаміну за допомогою методу конкурентного аналізу також показало схожість цих характеристик для обох препаратів (мал. 14): і в тому і в другому випадку найбільш активно конкурують з тіаміном за зв'язування ТТФ і ТМФ.



Мал. 14. Тіаміназ'язуюча активність (в % від контролю) ТЗВ (А) і ПМС (В) при інкубації їх з 10-кратним надлишком неміченого тіаміну (1), ТМФ (2), ТДФ (3) і ТТФ (4).

На додаток до всього виявлена здатність ТЗВ в присутності іонів двувалентних металів вибірно гідролізувати фосфорні ефіри тіаміну, найбільш активно - ТТФ (табл. 4) і афінитет його до АХ, який характеризується $K_d=13,0 \pm 2,0$ мкМ. Константа Міхаеліса для реакції гідролізу ТТФ ТЗВ визначена рівною 17,7 мкМ. Ця величина декілька вища ніж можлива усереднена концентрація ТТФ в нервових закінченнях. Отже, можна припустити, що якщо білок і функціонує як ТТФаза *in vivo*, то тільки в чітко визначених умовах. Такий висновок підтверджується і ре-

Табл. 4. Здатність субсинаптосомальних фракцій і ТЗБ гідролізувати фосфорні ефіри тіаміну (в нмоль P_1 на 1 мг білку за 15 хв., $n = 3 - 5$).

Препарат	ТТФ + Mg^{2+}		ТДФ, рН 9,0		ТМФ + Mg^{2+} рН - 9,0
	рН - 9,0	рН - 7,6	+ Mg^{2+}	+ Ca^{2+}	
Синаптосоми	35,0	41,5	31,9	48,6	38,5
	±9,5	±10,6	±10,5	±6,0	±4,3
ПМС	99,3	61,5	88,2	71,0	53,0
	±28,0	±13,5	±25,6	±13,6	±13,5
Мітохондрії	8,1	27,8	72,4	317,0	27,9
синаптосом	±4,6	±2,0	±19,5	±15,4	±3,0
Синаптич.	92,0	156,5	70,1	91,9	151,1
везикули	±16,7	±46,0	±19,1	±4,0	±11,5
Мієлін +	10,0	19,1	54,3	78,4	24,0
мембрани гл.	±3,5	±9,0	±13,4	±29,0	±5,7
ретікулума					
ТЗБ	48,9	363,4	206,8	134,7	65,0
	±9,4	±38,5	±61,4	±33,8	±21,4

зультатами дослідження кінетики пригнічення ТТФаної активності тіаміном: виявилось, що тіамін пригнічує ТТФану активність ТЗБ при його фізіологічних концентраціях ($K_1 = 4,5$ мкМ). Це пригнічення, по нашим даним, має неконкурентний характер по відношенню до ТТФ, що може свідчити про зв'язування тіаміну і ТТФ різними ділянками білку. Встановлені факти привертають увагу до ТЗБ як можливої ланці в ланцюжку реакцій, що залучають тіамін в здійснення специфічних функцій нервової клітини.

На основі аналізу всієї сукупності одержаних нами даних і даних літератури була сформульована нова гіпотеза відносно механізмів нейротропної дії тіаміну, ключовими точками якої є: уявлення про існування в нервових закінченнях рухомого пулу тіаміну; потенціалзалежна циркуляція його між пресинаптичною щільною і внутрішньоклітинним простором синаптосом; спряження

обміну тіаміну (його рухомого пулу) з обміном АХ. По наших припущенням, може бути декілька ділянок такого спряження: на рівні регуляції синтезу ацетильного компоненту АХ (регуляція активності ПДК), перенос ацетильного компоненту через мітохондріальні мембрани, захват та звільнення АХ або продуктів його гідролізу нервовими закінченнями. Не виключена також можливість участі тіаміну в регуляції функціонування ацетилхолінового рецептору, про що вже є відомості в літературі [Doerge et all., 1979], а також можливість участі тіамінфосфатів, особливо ТТФ, в регуляції фосфорилуванням функціонально важливих білків нервових закінчень. Виявлення в мембранних структурах нервового закінчення функціонально-активного ТЗБ, який проявляє спорідненість як до тіаміну, так і до АХ, підтверджує справедливність вищевикладених припущень. В цілому вся сукупність одержаних даних свідчить про те, що нейроактивність тіаміну обумовлена не наявністю унікальної некоферментної функції тіаміну в нервових клітинах, а особливостями їх структурно-функціональної організації. Остання обумовлює надзвичайну важливість для нервових клітин окремих біохімічних реакцій, які відбуваються за участю тіаміну по некоферментному механізмі і мають універсальне розповсюдження у всіх тканинах.

В И С Н О В К И

1. В тканинах тварин регуляція активності першого компоненту дегідрогеназних комплексів α -кетокислот по принципу асоціації-дисоціації коферменту (ТДФ) і апоферменту реалізується тільки в умовах глибокого авітамінозу. Підтвердженням цього є визначена величина уявної K_m КГДГ для ТДФ в тканині печінки, яка дорівнює $3,8 \pm 1,6$ мкМ, що в 5-6 разів нижче фізіологічної концентрації ТДФ.

2. Виявлений прямий кореляційний зв'язок, який не залежить від коферментної функції ТДФ, між рівнем тіаміну у вільній формі і рівнем відновленого глутатіону в тканині печінки. Зміна рівня відновленого глутатіону під впливом тіаміну може бути одним із факторів його регуляторної дії на активність ТДФ-залежних дегідрогеназ.

3. ТДФ і ТТФ в фізіологічних концентраціях приймають участь в регуляції активності ПДК по механізмі фосфорилування

-дефосфорилювання. Обидва тіамінфосфати інгібують активність ПДГ-кінази (що приводить до активації ПДК) і діють протилежним чином на активність ПДГ-фосфатази. ТДФ активує її ($K_d=0,02$ мкМ), ТТФ справляє нелінійне пригнічення (і, таким чином, інгібує активність ПДК).

4. В нервових закінченнях тіамін опосередковано через регуляцію тіамінфосфатами активності ПДК по механізму фосфорилювання-дефосфорилювання приймає участь у регуляції синтезу АХ із пірувату.

5. На плазматичних мембранах синапсом (ПМС) існують ділянки, які специфічно зв'язують тіамін ($K_d=3,0$ мкМ). Тіамінфосфати конкурують з тіаміном за зв'язування з препаратами ПМС (ТТФ>ТМФ>ТДФ). Нездатність тіамінфосфатів конкурувати з тіаміном при взаємодії його з нативними синапсомами свідчить про локалізацію тіамінзв'язуючих ділянок на внутрішній поверхні ПМС.

6. Із синапсом вперше був ізольований тіамінзв'язуючий білок (ТЗБ), спорідненість якого до тіаміну ідентична до такої ПМС ($K_d=3,1$ мкМ). Ізольований ТЗБ проявляє здатність вибірково гідролізувати фосфорні ефіри тіаміну, найбільш активно - ТТФ, і зв'язувати ацетилхолін з $K_d=13,0\pm 2,0$ мкМ. Подібність вивчених характеристик в відношенні зв'язування тіаміну ізольованим ТЗБ і ПМС свідчить про імовірну локалізацію білку в збудливих мембранах і про участь його в реалізації нейротропної функції тіаміну.

7. Було досліджено розподіл ферментів синтезу та деградації тіамінфосфатів в нервових закінченнях. В нервових закінченнях, також як і в клітинах інших тканин, синтез ТДФ і ТТФ локалізований переважно в цитоплазмі, гідроліз ТДФ найбільш активно здійснюється мітохондріями, а ТТФ - ПМС і синаптичними везикулами.

8. Поглинутий синапсом екогенний тіамін фосфорилюється до ТМФ, ТДФ і ТТФ і включається у всі субсинапсомальні фракції. Розподіл по фракціям міченого тіаміну, який потрапляє в синапсоми в досліді *in vivo* та *in vitro* неоднаковий: у першому випадку більша частина мітки локалізована в мітохондріях, у другому - у фракції плазматичних мембран і синаптичних везикул. При деполяризації поглинутий *in vitro* мічений тіамін звільнюється із синапсом в оточуючий простір.

Постулюється існування в нервових закінченнях двох пулів тіаміну, один із яких (зв'язаний з ферментними білками) повільно обмінюється, а другий - швидко. Циркуляція останнього між поза- та внутрішньоклітинним простором нервового закінчення спряжена з функціональним станом плазматичних мембран.

9. На підставі аналізу власних експериментальних і літературних даних запропонована нова гіпотеза механізму реалізації нейротропної функції тіаміну, в основі якої лежить уявлення про взаємозв'язок обміну тіаміну і ацетилхоліну.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ПО МАТЕРІАЛАМ ДИСЕРТАЦІЇ:

1. Рибіна А.О., Пархоменко Ю.М., Польщак Р.В. Препаративне розділення тіамінди- і трифосфатів методом іонообмінної хроматографії // Укр. біохім. журн. - 1975. - 47, N 3. - С. 385 - 388.
2. Пархоменко Ю.М., Рибіна А.А., Польщак Р.В. Розділення фосфорних ефірів тіаміну на іонообмінному сефадексі // Укр. біохім. журн. - 1976. - 48, N 3. - С. 384 - 387.
3. Рибіна А.О., Пархоменко Ю.М., Польщак Р.В., Чаусовский Т.І. Регуляція тіаміндіфосфатом активності і синтезу апоферментів дегідрогеназ α -кетокислот // 3-й Український біохім з'їзд, тез. симп. доп., Донецьк, 1977. - С. 180 - 181.
4. Рыбина А.А., Пархоменко Ю.М., Польщак Р.В., Чаусовский Т.И. О коферментной регуляции активности ТДФ-содержащих ферментов // Витамины. - Киев: Наукова думка. - 1976, N 9. - С. 47 - 58.
5. Пархоменко Ю.М., Рыбина А.А. Регуляция активности дегидрогеназ α -кетокислот в организме животных // Биохимия животных и человека, вып. 2. Киев: Наукова думка. - 1978. - С. 58 - 71.
6. Пархоменко Ю.М., Рыбина А.А., Польщак Р.В., Чаусовский Т.И. Пируват- и α -кетоглутаратдегидрогеназная активность и их регуляция при различной обеспеченности крыс тиаминном // Материалы Всесоюз. симпозиума "Актуальные проблемы витаминологии". - Москва. - 1978. С. 153.
7. Хмелевский Ю.В., Рыбина А.А., Пархоменко Ю.М. и др. Влияние совместного введения метионина и витаминов В1 и Е белым крысам с экспериментальным инфарктом миокарда на не-

которые показатели углеводного обмена в мозге, сердце и печени // Депо ВИНТИ N 158-77 от 25.04.1977, 12 стр., РЖ "Биология". - 1977, N 8. - Реф. 8Н249.

8. Польщак Р.В., Рыбина А.А., Пархоменко Ю.М., Халмурадов А. Г. Исследования содержания тиамин, его коферментной формы и активности тиаминзависимых ферментов в онтогенезе крыс // Укр.біохім.журн.- 1978. - 50, N 2. - С. 226 - 229.
9. Пархоменко Ю.М., Халмурадов А.Г., Рыбина А.А., Польщак Р.В. Влияние метионина и витаминов В₁ и Е на активность тиаминдифосфатазависимых ферментов в сердечной мышце крыс с экспериментальным инфарктом миокарда // Материалы Всесоюзной конференции по биохимии мышц. Ленинград: Наука. - 1978. - С. 135 - 137.
10. Чаговец Р.В., Рыбина А.А., Пархоменко Ю.М. и др. Об обмене тиамин и его биологически активных производных // Тиамин. - Москва. Наука. - 1978. - С. 5 - 26.
11. Рыбина А.А., Пархоменко Ю.М., Польщак Р.В. Пируват- и α -кетоглутаратдегидрогеназная активность и их регуляция при различной обеспеченности крыс тиамином/ В кн.: Актуальные проблемы витаминологии: мат.Всесоюзного симп., 1978. - Москва. - С. 153.
12. Parkhomenko Yu.M., Rybina A.A., Khalmuradov A.G. Separation of thiamine phosphoric esters on sephadex cation exchanger// In book: Methods in Enzymology, v. 62: Vitamins and coenzymes, p. D/ ed. D.B.Mc Cormic & L.D.Wright. - N. Y. -London: Academic Press. - 1979. - P. 59 - 63.
13. Рыбина А.А., Халмурадов А.Г., Пархоменко Ю.М. Белки, специфически связывающие тиамин и их биологическая роль // Укр. биохим. журн. - 1980. - 52, N 5. - С. 652 - 667.
14. Пархоменко Ю.М., Рыбина А.А., Халмурадов А.Г. Вивчення ролі тіамінтрифосфату в клітинному метаболізі // Матер. Укр. біохім. з'їзду. - Київ: Наукова думка. - 1982. С. 113 - 114.
15. Пархоменко Ю.М., Климчук С.А. Препаративное получение тиаминтрифосфата с помощью катионообменных смол// Укр.биохим. журн. - 1982. - 54, N 5. - С. 551 - 553.
16. Вовк А.И., Пархоменко Ю.М., Бабицева Г.Ф., Черныш И.Ю. Простой метод определения ацетона в биологических средах// Укр.биохим.журн.- 1982, - 54, N 6. - С. 685 - 689.

17. Пархоменко Ю.М., Вовк А.И., Протасова З.С. и др. Влияние тиамин-фосфата на активность пируватдегидрогеназного комплекса печени крыс при интенсификации липогенеза // Укр. биохим. журн. - 1983. - 55, N 4. - С. 408 - 414.
18. Пархоменко Ю.М., Рыбина А.А., Климчук С.А., Халмурадов А.Г. Исследование взаимосвязи между содержанием тиамин-фосфатов и пируватдегидрогеназной активностью в печени крыс с интенсифицированным липогенезом // Укр. биохим. журн. - 1983. - 55, N 5. - С. 517 - 522.
19. Пархоменко Ю.М., Халмурадов А.Г. Авт. св-во СССР N 1053811, А 01К 61/62 от 25.08.1983, Бюлл. ИР N 42, 1983.
20. Пархоменко Ю.М., Протасова З.С., Халмурадов А.Г. Тиамин-фосфаты и регуляция активности пируватдегидрогеназного комплекса в митохондриях печени крыс // Укр. биохим. журн. - 1986. - 58, N 6. - С. 35 - 41.
21. Пархоменко Ю.М., Халмурадов А.Г., Черныш И.Ю., Чурилова Т.Я. Исследование специфического связывания [¹⁴C]тиамин-фосфата и тиамин-фосфатов с синаптическими мембранами // В кн.: мат. Всес. конф. по нейронаукам, Киев, 1986. - С. 102.
22. Халмурадов А.Г., Пархоменко Ю.М., Черныш И.Ю., Чурилова Т.Я. Особенности связывания тиамин-фосфата синаптическими мембранами мозга крыс // 5-й Всес. биохим. съезд: тез. докл. - Москва, 1986. - С. 460 - 461.
23. Рованов В.А., Пархоменко Ю.М. Пируват- и оксоглутаратдегидрогеназная активность различных отделов головного мозга // Укр. биохим. журн. - 1987. - 59, N 1. - С. 29 - 33.
24. Пархоменко Ю.М., Черныш И.Ю., Чурилова Т.Я., Халмурадов А.Г. Влияние тиамин-фосфатов на активность регуляторных ферментов пируватдегидрогеназного комплекса // Укр. биохим. журн. - 1987. - 59, N 6. - С. 49 - 54.
25. Пархоменко Ю.М., Черныш И.Ю., Протасова З.С., Постоенко В.А. Вивчення біохімічних механізмів нейротропності тіаміну // В кн.: Доп. V-го Укр. біохім. з'їзда, 1987. - С. 120 - 121.
26. Постоенко В.А., Пархоменко Ю.М., Вовк А.И., Халмурадов А.Г., Донченко Г.В. Выделение и некоторые свойства тиаминсвязывающего белка синапсом головного мозга крыс // Биохимия. - 1987. - 52, N 11. - С. 1792 - 1797.
27. Постоенко В.А., Пархоменко Ю.М., Донченко Г.В. Характе-

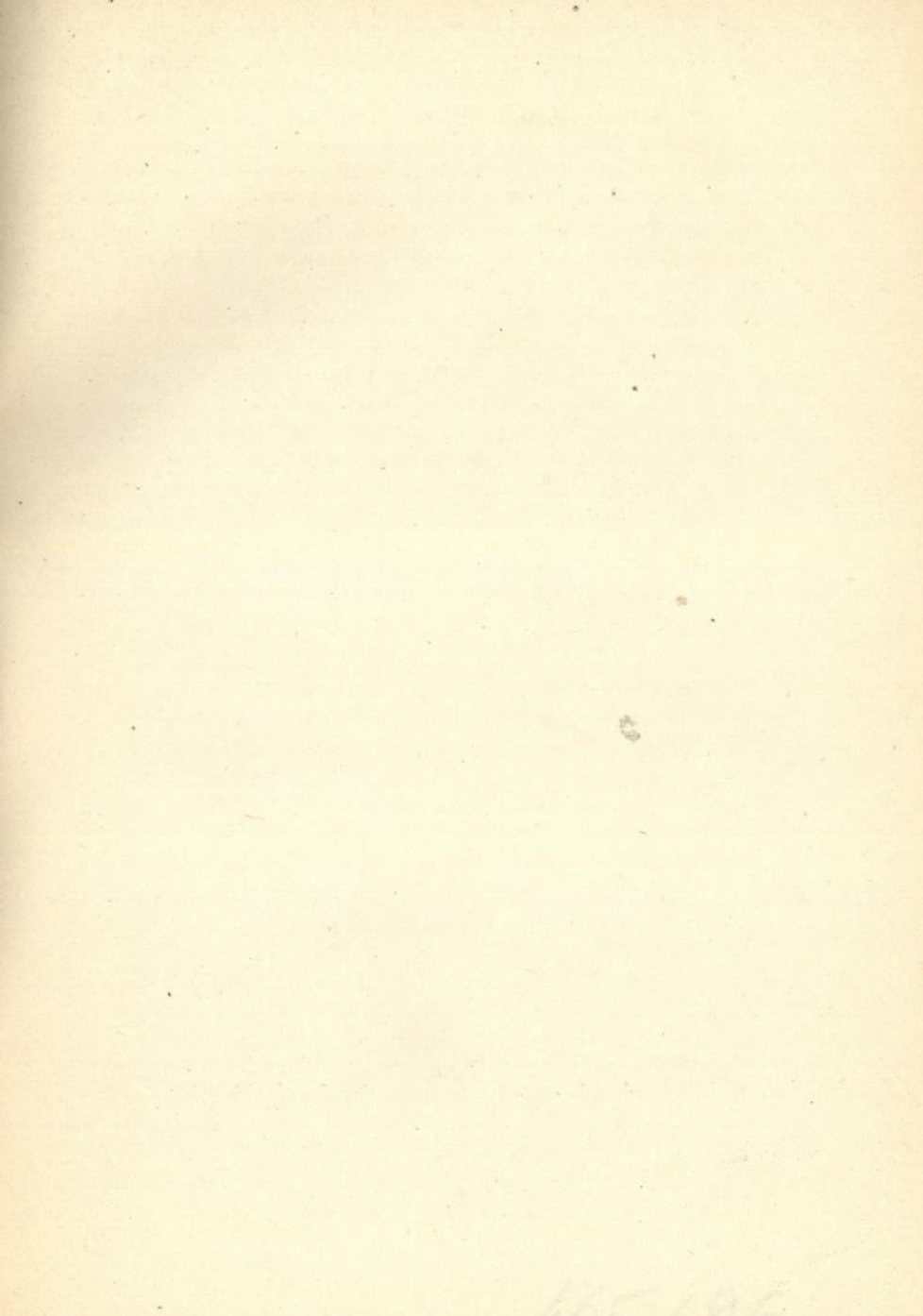
- ристика тиаминсвязывающего белка синапсом мозга крыс // Укр.биохим. журн. - 1987. - 59, N 6. - С. 9 - 14.
28. Пархоменко Ю.М., Протасова З.С., Постоенко В.А., Донченко Г.В. Локализация ферментов синтеза и деградации тиаминтрифосфата в синапсомозгах крыс // Докл. АН УССР, сер. В. - 1988. - N 8. - С. 73 - 76.
29. Пархоменко Ю.М., Черныш И.Ю., Донченко Г.В., Халмуратов А.Г. Введение витаминного премикса в рацион животных с интенсифицированным липогенезом // Вестник с/х науки. - 1988. - 388, N 2. - С. 63 - 67.
30. Давиденко Н.К., Букивская Г.Л., Пархоменко Ю.М. Устойчивость комплексов тиаминмонофосфата и тиаминдифосфата с ионами металлов // Координационная химия. 1989. - 15, N 6. - С. 1059 - 1062.
31. Parkhomenko Yu.M. The noncoenzyme mechanism of thiamine phosphates participation in regulation of the pyruvate dehydrogenase complex/ Molecular organization of biological structures: abstr.book.,v.1.- Moscow.- 1989. - P.143.
32. Протасова З.С., Пархоменко Ю.М., Донченко Г.В. Транспорт тиаминтрифосфата через плазматические мембраны синапсомозгов крыс // Механизмы регуляции клеточной активности: тез. докл. - Ташкент. - 1989. - С. 62 - 63.
33. Постоенко В.А., Пархоменко Ю.М., Донченко Г.В. Особенности физико-химического строения тиаминсвязывающего белка синапсомозгов крыс // Нейрохимия. - 1990. - 9, N 1. - С. 29 - 34.
34. Пархоменко Ю.М., Черныш И.Ю., Протасова З.С., Донченко Г.В. Исследование взаимосвязи между обеспеченностью тканей тиамином, активностью тиаминдифосфатазависимых ферментов и уровнем восстановленного глутатиона // Укр.биохим. журн.- 1990.- 62, N 6. - С. 63 - 69.
35. Пархоменко Ю.М., Донченко Г.В. Взаимосвязь обмена тиаминтрифосфата и ацетилхолина в нервных окончаниях мозга крыс/ В кн.: Клиническая витаминология: тез. Всес. конф., 1991. - С. 9 - 10.
36. Протасова З.С., Пхакадзе Е.Г., Черныш И.Ю., Пархоменко Ю.М. Исследование тиаминтрифосфатазной активности тиаминсвязывающего белка/ там же, С. 36.
37. Parkhomenko Yu.M., Protasova Z.S., Chernysh I.Yu., Phka-

kadze E.G., Donchenko G.V. Modification of acetylcholine synthesis in the rat brain synaptosomes by thiamine and its relation to the regulation of the pyruvate dehydrogenase complex activity / In book: Biochemistry and Physiology of ThDP-Dependent Enzymes. Proc. Int. meet., 1990/ed. H. Bisswanger & J. Ulirich. - Weinheim-New York-Basel-Cambridge: VCH. - 1991. - P. 375 - 380.

38. Пархоменко Ю.М., Яковенко Е.Я., Донченко Г.В. и др. Кормова добавка. Авт. св-во СССР N1669099, 1991.
39. Пархоменко Ю.М., Черныш И.Ю., Донченко Г.В. Повышение эффективности использования тиамин при введении его в организм совместно с метионином и витамином Е// Вопросы питания. - 1992. - N 1. - С. 45 - 48.
40. Пархоменко Ю.М., Протасова В.С., Черныш И.Ю., Донченко Г.В. Особливості обміну тіаміну в нервових закінченнях мозку щурів // VI Укр. біохім. з'їзд: тез. доп., ч. I. - Київ: Видавництво УСТА, 1992. - С. 134.

Підп. до друку 03.03.95 . Формат 60x84¹/₁₆.
Папір друк. № 3 . Спосіб друку офсетний. Умовн. друк. арк. 2,53 .
Умовн. фарбо-відб. 2,56 . Обл.-вид. арк. 2,0 .
Тираж 100 . Зам. № У-32 . Безплатно.

Фірма «ВІПОЛ»
252151, Київ, вул. Волинська, 60.



465496

Безплатно.

Av 2702
Av 27.026