

УКРАЇНСЬКА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ І БІОХІМІЇ ТВАРИН

На правах рукопису

БУЦЯК Василь Іванович

УДК 577.150.2:577,158.

**ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ ОКРЕМИХ МЕТАБОЛІТІВ
НА РЕГУЛЯЦІЮ ЛАНОК ОБМІНУ ВУГЛЕВОДІВ
У КЛІТИНАХ КРОВІ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ**

03.00.04 — біохімія

**Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук**

Львів — 1995

Дисертацією є рукопис.

ЛННБ України ім. В. Стефаника



00779132 (Т)

Робота виконана на кафедрі біохімії і біотехнології Львівської академії рної медицини ім. С. З. ГЖИЦЬКОГО.

й керівник

— доктор біологічних наук, дійсний член НТШ,
професор **ГОЛОВАЦЬКИЙ І. Д.**

іні опоненти:

— доктор біологічних наук **ПУПІН І. Г.**
— доктор біологічних наук, професор **СОЛО-
ГУБ Л. І.**

Провідна установа

— Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН
України.

Захист відбудеться « 20 » 06 1995 р. о « 13 » год. на засі-
данні спеціалізованої вченої ради Д. 04. 14. 01. при Інституті фізіології і біо-
хімії тварин УААН за адресою: 290034, м. Львів-34, вул. В. Стуса, 38.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці інституту.

Автореферат розісланий « 17 » травня 1995 р.

ЛННБ ім. В. Стефаника
АН України

Вчений секретар
спеціалізованої ради,
доктор с.-г. наук

Я. І. КИРИЛІВ

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Відомо, що вуглеводам належить важлива роль у загальному обміні речовин, оскільки вони забезпечують енергетичні потреби організму, а також входять в склад багатьох біологічно-активних сполук. На вуглеводній основі синтезуються нуклеотиди, а з останніх утворюється нуклеїнові кислоти. Із усіх обмінів речовин, вуглеводний найбільш лабільний, він швидко реагує на зміни зовнішнього і внутрішнього середовища.

Загально визнаним є факт, що зв'язує ланков між гліколізом і пентозофосфатним шляхом є тріозофосфати /І. Головацький, 1963, 1970/, які як і гексозофосфати є спільними продуктами обох шляхів. Вони можуть вклучатися в перший або другий шлях, але метаболіти цих шляхів по-різному впливають на активність ферментів.

Так, було встановлено гальмівний вплив підвищеної концентрації 6-фосфоглюконату на фосфогексозоізомеразу /С. Farr, 1956/ та фосфоглекомутазну реакції / J. Bot, 1958, І. Головацький, 1973/. При фізіологічній концентрації 6-фосфоглюконат активує фосфофруктокіназу /М. Sarag-Nagar, R. Laguna, 1973/ і як регулятор має протилежний до фруктозо-2,6-дифосфату вплив на переключення гліколіз-глікогенезу / J. Sommerscorn, R. Freedlang, 1984/.

Недавно, /І. Головацький, 1990/ було виявлено, що під дією 6-фосфоглюконату інгібується утворення лактату з фруктозо-5-фосфату в клітинах гепатомы Зейделя. 3-фосфогліперат внесення разом із 6-фосфоглюконатом, знімає цей гальмівний ефект і при цьому сам істотно не використовується.

Виходячи з вище приведеного і враховуючи, що в еритроцитах інтенсивно протікає пентозофосфатний шлях обміну вуглеводів, а також те, що в них знаходиться значна кількість фосфогліператів стає доцільним дослідити взаємодію між метаболітами гліколізу і пентозофосфатного шляху обміну вуглеводів в еритроцитах в порівнянні з лейкоцитами.

Мета і завдання досліджень. Метою дослідження було вивчити взаємодію деяких продуктів гліколізу і пентозофосфатного шляху обміну вуглеводів в гемолізатах еритроцитів та лізатах лейкоцитів великої рогатої худоби. Для в'ясування цього питання, а також щоб виключити ланку гексозофосфатізомеразної реакції, яка інгібується 6-фосфоглюконатом, в наших дослідженнях використаний субстрат - фруктозо-1,6-дифосфат.

Були проведено дослідження:

- використання фруктозо-І,6-дифосфату гемолізатами еритроцитів та лізатами лейкоцитів;
- впливу продуктів пентозофосфатного шляху - 6-фосфоглюконату або δ -глюконолактону на перетворення фруктозо-І,6-дифосфату і фруктозо-І-фосфату.
- дії 3-фосфогліцерату та НАД на інгібуючий вплив 6-фосфоглюконату при перетворенні фруктозо-І,6-дифосфату;
- впливу нуклеозиду /інозину/ на перетворення фруктозодифосфату клітинами крові.

Наукова новизна. Вперше на клітинах крові великої рогатої худоби досліджен вплив 6-фосфоглюконату та δ -глюконолактону на окремі реакції використання фруктозо-І,6-дифосфату. Виявлено, що метаболіти пентозофосфатного шляху - 6-фосфоглюконат або δ -глюконолактон інгібують перетворення фруктозо-І,6-дифосфату до лактату. Внесення 3-фосфогліцерату розгальмовує дане інгібування. Екзогенний НАД дещо стимулює гліколітичне перетворення фруктозодифосфату, але при цьому в загальному зберігається інгібування 6-фосфоглюконатом продукції лактату. Встановлено, що нуклеозид /інозин/ гальмує використання фруктозодифосфату та утворення лактату.

Практичне значення роботи. Проведеними дослідженнями доповнено дані про взаємозв'язок між продуктами гліколізу та пентозофосфатним шляхом обміну вуглеводів. Встановлено, можливість впливу на досліджувані процеси в організмі шляхом введення екзогенних сполук.

Апробація роботи і публікації. Основні положення роботи заслухані та обговорені на 49-тій науково-виробничій конференції /1992 р/ та 50-ій науково-практичній конференції /1994 р/ Львівської академії ветеринарної медицини, п'ятій та шостій наукових сесіях наукового товариства ім. Т. Шевченка /Львів, 1994, 1996/. Засіданні кафедри біохімії і біотехнології Львівської академії ветеринарної медицини /1995 р/.

Матеріали дисертації виклачені в семи роботах, в тому числі у трьох опублікованих.

Особиста участь автора в одержанні результатів. Дисертаційна робота виконана самостійно із застосуванням сучасних біохімічних

методів дослідження.

Об'єм і структура дисертації. Робота є фрагментом загальнонауково-фахової теми. Дисертація написана на 122 сторінках машинописного тексту, ілюстрована 15 малюнками і 10 таблицями.

Робота включає такі розділи: вступ, огляд літератури, матеріал і методика дослідження, власні дослідження, обговорення результатів досліджень, висновки, список літератури, який містить 258 джерел з них 193 - іноземними мовами.

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження проводили на еритроцитах та лейкоцитах крові великої рогатої худоби в лабораторії кафедри на протязі 1992 - 1994 років.

Піддослідними тваринами були бички місцевої чорнорябої породи віком 1,5 - 2,0 роки. Пробі крові брали на Львівському м'ясокомбінаті зразу після механічного оглушення тварин, які витримувались перед забоем на голодній дієті 12 годин. Для запобігання зсвівання крові використовували насичений розчин оксалату калію. В окремих випадках використовували 2,5% розчин трьохзаміщеного цитрату натрію, а також видаляли фібрин.

Еритроцити одержували шляхом центрифугування 15 хв при 1500g з наступним триразовим відмиванням їх фізіологічним розчином NaCl та центрифугуванням. Гемоліз викликали додаванням рівного об'єму дистильованої води.

Лейкоцити отримували, із дефібринованої крові, центрифугуванням 10 хв при 700g та відсмоктуванням утвореної плівки лейкоцитів з поверхні еритроцитів і відмиванням їх фізіологічним розчином NaCl. Відмивання лейкоцитів проводили три рази з наступним центрифугуванням. Лізис білокрівців проводили шляхом заморожування та швидкого відтавання при температурі 37°C з мікроскопічним контролем повноти лізису.

Інкубаційна проба містила: 14 мкмоль тріс-HCl буфер, рН-7,4, у відповідних дослідках фруктозо-1,6-дифосфат, фруктозо-1-фосфат, 6-фосфоглеконат або δ -глюконолактон в кількості 2,42 мкмоль на мля проби. Для встановлення вихідних даних були проведені дослідження в яких використовували фруктозо-1,6-дифосфат та 6-фосфоглеконат у концентраціях 0,5, 1,0, 2,42, 4,84 мкмоль на мля проби.

В дослідженнях в яких вивчали вплив на використання фруктозо-І, 6-дифосфату, 3-фосфогліцерату або НАД, вносили їх в інкубаційне середовище відповідно по 2,0 мкмоль та 0,5 мкмоль на мл інкубаційної проби.

В кожну інкубаційну пробу вносили по 1,0 мл гемолізату еритроцитів або 0,4 лізованих лейкоцитів. Об'єм проб відповідно складав 2,8 та 1,5 мл. Інкубація тривала 60 хв при температурі 37⁰С. Для відпрацювання часу інкубації було досліджено зміни за 20 і 40 хв.

Білки проб осаджували внесенням холодної хлорної кислоти до кінцевої концентрації 6%. В контрольних пробах білки осаджували зразу. Після осадження /через 10 хв/ центрифугували, злитий надосад нейтралізували карбонатом калію. Перхлорат калію видаляли центрифугуванням на холоді. Для повноти осадження перхлорату калію нейтралізовані проби витримували 30 хв в холодильнику при температурі 4⁰С.

В нейтралізованому надосаді визначали ензиматично, на спектрофотометрі "СБ-16", вміст лактату та пірувату за Bergmeyer, 1970, 1974/. На фотоселектрокольориметрі "ФЕК-56м" визначали фруктозу за методом В. Kulka /1956/, пентози і глюкозу за методиком І. Головацького /1961/, неорганічний фосфор за методиком С. Fiske, У. Subbarow /1925/ з використанням, як відновника аскорбінової кислоти. В окремих дослідженнях проводили осадження неорганічного фосфору за методом описаним Н. Мешковим і С. Северином /1960/.

Для досліджень використовували реактиви: фруктозо-І, 6-дифосфат, фруктозо-І-фосфат, 6-фосфогліконат, 3-фосфогліцерат, інозин, тріс, лактатдегідрогеназу, НАД, НАДН фірми "Reanal", δ -глюконокактон виробництва США. Інші реактиви вітчизняного виробництва класифікації "чда" і "хч".

Статистичну обробку результатів проводили за Ст'юдентом. В кожній серії досліджу було по чотири-шість повторностей. Всі розрахунки проводили на міні ЕОМ "СМ-3" з використанням готових програм розроблених І. Мукаловим та І. Коритним /1987/.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

І. Перетворення фруктозо-І, 6-дифосфату в еритроцитах крові.

В початкових дослідженнях були вивчені перетворення фруктозо-І, 6-дифосфату еритроцитами крові великої рогатої худоби, в за-

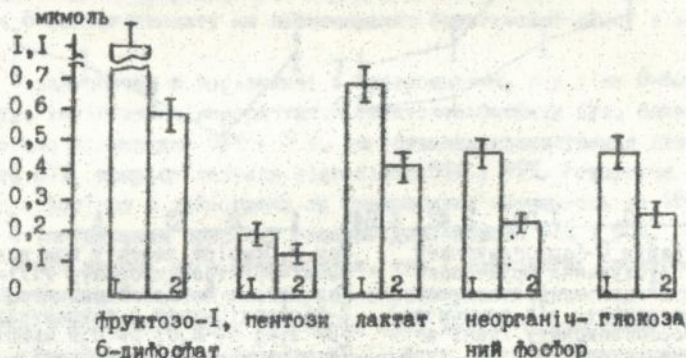
ляжності від його концентрації /0,5, 1,0, 2,42 та 4,84 мкмоль на мл проби/ та часу інкубації /20, 40, 60 хв/.

Результати цих досліджень послужили основою для дальших досліджень використання фруктозо-1,6-дифосфату гемолізатами еритроцитів.

Виходячи з цих досліджень, в нашій роботі використовували концентрації фруктозо-1,6-дифосфату 2,42 мкмоль та час інкубації 60 хв

2. Вплив метаболіту пентозофосфатного шляху - 6-фосфогляконату на окремі ланки перетворення фруктозо-1,6-дифосфату в еритроцитах та лейкоцитах крові великої рогатої худоби.

В дослідженнях при внесенні до інкубаційної проби одночасно з фруктозо-1,6-дифосфатом 6-фосфогляконату /мал. I/ відмічено значний інгібувальний вплив останнього на перетворення фруктозо-1,6-дифосфату гемолізатами еритроцитів. Зменшується використання фруктозодифосфату на 50%, утворення лактату на 49%, розколування ендогенних пентоз на 60%. Приріст неорганічного фосфору і глюкози зменшується відповідно на 19 і 65%.



Мал. I. Вплив 6-фосфогляконату на перетворення фруктозо-1,6-дифосфату гемолізатами еритроцитів /дані в мкмоль на мл еритроцитів, $M \pm m$, $P = 5\%$.

I - інкубація з фруктозо-1,6-дифосфатом;

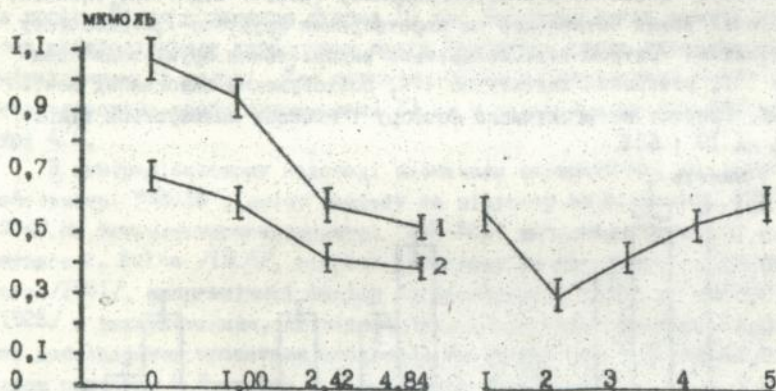
2. - інкубація з фруктозо-1,6-дифосфатом та 6-фосфогляконатом.

Приведені на мал. I дані вказують на виражений інгібувальний вплив 6-фосфогляконату на ряд процесів перетворення фруктозодифосфату. Зменшення утворення лактату свідчить про помітне інгібування

перетворення тріозофосфатів, а зменшення приросту глюкози на інгібування перетворення фруктозо-6-фосфату у гексозофосфатізомеразній реакції, а також зменшується дефосфорилування фруктозодифосфату, що вказує зменшення приросту неорганічного фосфору. Під дією 6-фосфоглюконату зменшується розходження пентоз. Вище приведене вказує на складний вплив даного метаболіту на перетворення фруктозодифосфату в еритроцитах.

Після виявлення вище приведеного впливу, було довіджено залежність даного ефекту від концентрації 6-фосфоглюконату.

З приведених на мал.2 даних видно, що інгібування використання фруктозо-1,6-дифосфату та приросту лактату залежить від концентрації 6-фосфоглюконату. /мал.2/



Мал.2. Розходження фруктозодифосфату /1/ та приріст лактату /2/ в залежності від концентрації 6-фосфоглюконату /дані в мкмоль на мл еритроцитів, $\bar{m} \pm m$, $n = 4$ /

Мал.3. Приріст лактату при розщепленні фруктозодифосфату /1/ інкубованого з 6-фосфоглюконатом і 3-фосфогліцерату в концентрації /3- 1,0, 4- 2,0, 5- 3,0 мкмоль/ в мкмоль на мл еритроцитів, $\bar{m} \pm m$, $n = 4$ /

Залежність інгібування гліколізу від концентрації 6-фосфоглюконату зростає до концентрації його 2,42 мкмоль на мл, а далі збільшення мало впливає на процеси гліколізу. Повного інгібування розходження фруктозо-1,6-дифосфату не наступає тому в дальших дослідженнях ми використовували 6-фосфоглюконат в концентрації 2,42 мкмоль на мл проб.

В цих дослідженнях, при підвищенні концентрації 6-фосфоглюко-

нату, дальше зменшується приріст неорганічного фосфору і різко зменшується приріст глюкози, що підтверджує вище приведені дані про опосередкований в данкх умовах вплив 6-фосфоглюконату на утворення фруктозо-6-фосфату і його перетворення в гекозофосфатізоме-разній реакції.

Дальші дослідження, впливу 6-фосфоглюконату, було проведено на лізатах лейкоцитів крові великої рогатої худоби.

Ці дослідження показали, що розходування фруктозо-1,6-дифосфату лізатами лейкоцитів в загальному подібне до відповідних показників еритроцитів. Співвідношення при цьому між фруктозою, лактатом, пентозами та глюкозою в лейкоцитах та еритроцитах відповідно дорівнювали: 1,00; 1,21; 1,02; 0,35 та 1,00; 1,32; 1,02; 0,29. В лейкоцитах розходування фруктозо-1,6-дифосфату та пентоз дорівнює 38% та 11%, приріст лактату та глюкози відповідно складає 28 і 62%.

У порівняльних дослідженнях віі 6-фосфоглюконату, що проводились паралельно на лейкоцитах та еритроцитах отриманих з крові тої ж піддослідної тварини, було також відмічено значний гальмівний вплив 6-фосфоглюконату на перетворення фруктозодифосфату в лейкоцитах.

В лейкоцитах в порівнянні з еритроцитами, під дією 6-фосфоглюконату, інгібування використання фруктозодифосфату було близьке і становило відповідно 52% і 50%, інгібування розходування пентоз - 70% та 60%, приріст лактату відповідно 56% і 49%. Утворення неорганічного фосфору в лейкоцитах та еритроцитах зменшилось на 16% та 19%, а інгібування приросту глюкози дорівнювало 58% і 65%.

Таким чином, як в еритроцитах, так і лейкоцитах проявляється інгібуєча дія 6-фосфоглюконату на перетворення фруктозодифосфату. При цьому виявилась його дія на ще одну ланку - розщеплення фруктозо-1,6-дифосфату до фруктозо-6-фосфату, що заслуговує на окреме дослідження.

3. Дія 3-фосфогліцерату на інгібування 6-фосфоглюконатом гліколізу в еритроцитах та лейкоцитах.

Було досліджено вплив 3-фосфогліцерату на інгібування перетворення фруктозо-1,6-дифосфату 6-фосфоглюконатом в еритроцитах і лейкоцитах. В еритроцитах різних видів тварин, як відомо, є значна концентрація фосфогліцератів, які здатні виключати інгібування 6-фосфоглюконатом. Але, як видно з попередніх досліджень 6-фосфо-

глюконат в концентрації 1,00, 1 2,42, 4,64 мкмоль інгібує утворення лактату гемолізатами еритроцитів. Отже, в наших умовах вплив запобігачий інгібування не проявляється, очевидно, не зв'язано з розбавленням фосфогліцератів, яке мало місце при виготовленні гемолізату, внаслідок чого зменшується їх концентрація.

Розбавлення еритроцитів було в 5,6 рази, що відповідно зменшило концентрацію фосфогліцератів і вона, за нашими підрахунками, була в межах 0,2 - 0,4 мкмоль.

Приведені підрахунки підтвердились, внесений в інкубаційну пробу 3-фосфогліцерат в концентрації 2 мкмоль, знімає гальмівну дію 6-фосфоглюконату.

Дані вивчення впливу 3-фосфогліцерату приведені на мал. 3. Низькі концентрації 3-фосфогліцерату /1 мкмоль/ істотно не впливають на інгібування 6-фосфоглюконатом утворення лактату з фруктозо-1, 6-дифосфату /мал. 3/, але внесений 3-фосфогліцерат в концентрації 2 мкмоль і більше знімає інгібуєчий вплив 6-фосфоглюконату, і проби 4 та 5 мало відрізняються від проби 1, де 6-фосфоглюконат є відсутній.

З одержаних даних видно, що 3-фосфогліцерат знімає інгібуєчу дію 6-фосфоглюконату на перетворення фруктозо-1,6-дифосфату до лактату гемолізатами еритроцитів.

В дослідженнях перетворення самого 3-фосфогліцерату в інкубаційній системі, при відсутності фруктозодифосфату /табл. I/ практично не утворюється лактат, це свідчить, що 3-фосфогліцерат в даних умовах не перетворюється до нього.

Таблиця I

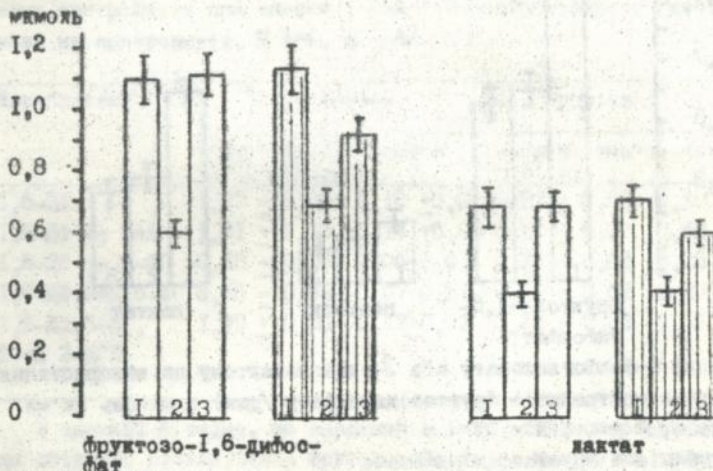
Динаміка показників при інкубації гемолізатів еритроцитів із 3-фосфогліцератом/ дані в мкмоль на мл еритроцитів, $M \pm m, n = 5/.$

Метаболіти	фруктоза	лактат	піруват
До інкубації	$0,58 \pm 0,06$	$1,60 \pm 0,12$	$0,15 \pm 0,02$
Після інкубації	$0,48 \pm 0,04$	$1,64 \pm 0,16$	$0,48 \pm 0,08$

З приведенних досліджень видно, що під впливом 3-фосфогліцерату, який запобігає інгібування перетворення фруктозо-1,6-дифосфату

до лактату, до останнього перетворюється лише така кількість фосфогліцератів, яка утвориться з гексозофосфатів через гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназну реакцію, тобто тоді, коли утвориться еквімолярна кількість відновленого НАД, який повністю використовується для утворення лактату в лактатдегідрогеназній реакції. Це видно з останніх досліджень /табл. I/, в яких показано, що лактат не утворюється, а піруват зростає в три рази. З даних результатів видно, що утворений піруват не перетворюється во лактату, в зв'язку з відсутністю відновленого НАДН.

Отже, як в еритроцитах так і лейкоцитах, 3-фосфогліцерат знімає інгібувальну дію 6-фосфогліконату на перетворення фруктозодифосфату до лактату. Дещо менша його дія в лейкоцитах, можливо, це зв'язано з наявністю певної кількості 3-фосфогліцератів в еритроцитах /табл. 4/



Маб.4. Вплив 3-фосфогліцерату на інгібування 6-фосфогліконатом перетворення фруктозодифосфату до лактату гемолізатами еритроцитів та лізатами лейкоцитів , дані в мкмоль на мл еритроцитів, $M \pm m$, $n = 5$.

Інкубація: 1. - з фруктозо-1,6-дифосфатом;

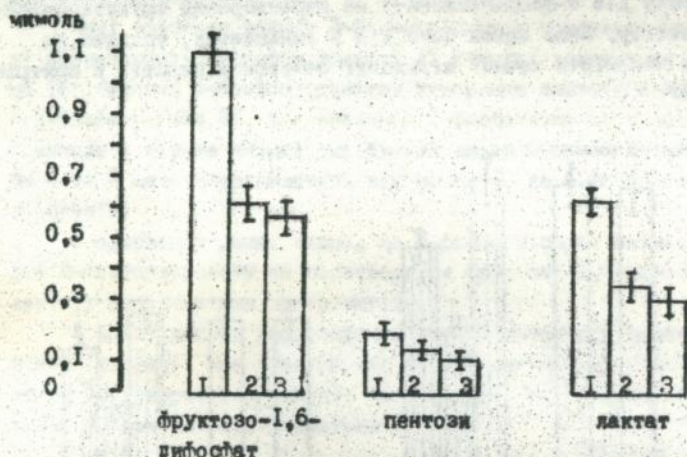
2. - з фруктозо-1,6-дифосфатом та 6-фосфогліконатом;

3. - з фруктозодифосфатом, 6-фосфогліконатом та 3-фосфогліцератом.

Внесення в інкубаційне середовище 3-фосфогліцерат, повністю знімає інгібувальний вплив 6-фосфоглюконату на утворення лактату з фруктозо-1,6-дифосфату в еритроцитах і на 89% розходування фруктозодифосфату та 70% приросту лактату в лейкоцитах. Розходування ендогенних пентоз гемолізатами еритроцитів, при внесенні 3-фосфогліцерату, повністю відновлюється, тоді як в лейкоцитах тільки на 88% при однакових кількостях внесенного 3-фосфогліцерату.

Кількість глюкози в цих умовах досліджу, при внесенні 3-фосфогліцерату, зростає в еритроцитах на 50%, а в лейкоцитах на 18%.

Дальше було досліджено діє δ-глюконолактону в порівнянні з 6-фосфоглюконатом /маг. у/.



Мал. 5. Вплив 6-фосфоглюконату або δ-глюконолактону на використання гемолізатами еритроцитів фруктозодифосфату /дані в мкмоль на мл еритроцитів, $M \pm m$, $n = 5$ /

1. - інкубація з фруктозодифосфатом;
2. - інкубація з фруктозодифосфатом та 6-фосфоглюконатом;
3. - інкубація з фруктозодифосфатом та δ-глюконолактоном.

Ці дослідження показали, що перетворення фруктозодифосфату, при інкубації його з 6-фосфоглюконатом або δ-глюконолактоном були близькими. Співвідношення між компонентами: фруктозою, лактатом, глюкозою і пентозами при інкубації лише з субстратом були: 1,00: 1,32: 0,29: 1,02, а при внесенні в інкубаційне середовище δ-глюконолактону співвідношення між цими компонентами дорівню-

вало: 1,00: 0,74: 0,06: 0,78, тобто були подібними до проб інкубованих з 6-фосфоглюконатом та фруктозо-1,6-дифосфатом.

Отже, 8-глюконолактон, як і 6-фосфоглюкон однаково впливають на перетворення фруктозодифосфату до лактату. Це важливо тому, що 8-глюконолактон на відміну від 6-фосфоглюконату може проникати через мембрани цілих клітин і впливати на перебіг гліколізу в умовах *in vivo*.

Як відомо, процеси гліколізу проходять тільки при забезпеченні окисдації відновленого НАД, що утворюється при окисленні 1,3-дифосфогліцеринового альдегіду. Щоб виключити можливий дефіцит НАД для гліколітичних перетворень фруктозо-1,6-дифосфату, в умовах наших дослідів, в інкубаційне середовище вносили НАД 0,5 мкмоль на пробу /табл. 2/

Таблиця 2

Вплив 6-фосфоглюконату на перетворення фруктозодифосфату гемолізатами еритроцитів при внесенні НАД і 3-фосфогліцерату /дані в мкмоль на еритроцитів, $M \pm m$, $n = 4$ /.

Метаболіти	Розходження		Приріст	
	фруктозо-1,6-дифосфату	пентоз	неорганічного фосфору	лактату
Ф-1,6-ДФ	1,07 ± 0,09	0,12 ± 0,02	0,37 ± 0,08	0,57 ± 0,07
Ф-1,6-ДФ та НАД	1,21 ± 0,12	0,14 ± 0,03	0,32 ± 0,07	0,68 ± 0,09
Ф-1,6-ДФ та 6-ФГ	0,58 ± 0,08	0,06 ± 0,01	0,26 ± 0,02	0,28 ± 0,04
Ф-1,6-ДФ, НАД, 6-ФГ	0,66 ± 0,09	0,07 ± 0,01	0,18 ± 0,02	0,37 ± 0,04
Ф-1,6-ДФ, 6-ФГ, НАД та 3-ФГЛ	1,09 ± 0,120	0,13 ± 0,03	0,28 ± 0,06	0,56 ± 0,06

З таблиці 2 видно, що внесений в інкубаційне середовище НАД дещо збільшує розходження фруктозодифосфату, пентоз та приросту лактату, а приріст неорганічного фосфору зменшився. При одночасному внесенні в інкубаційне середовище НАД та 6-фосфоглюконату спостерігається збільшення використання фруктозодифосфату та ендогенних пентоз, при загальному збереженні інгібування утворення лактату.

З цих досліджень видно, що внесений НАД дещо впливає на забезпечення процесів перетворення фруктозо-1,6-дифосфату, але він не

знімає інгібіторну дію 6-фосфоглюконату. Внесений в це ж інкубаційне середовище 3-фосфогліцерат повністю відновлює використання фруктозодифосфату та приросту лактату, що відповідає вище приведеним даним /табл. 4/.

4. Вплив інозину, 3-фосфогліцерату та 6-фосфоглюконату на перетворення фруктозо-1,6-дифосфату.

Під впливом інозину /табл. 3/ зменшується використання фруктозо-1,6-дифосфату на 24% та приріст лактату 11%, розходування пентоз зросло в два рази, що вказує на вилучення рибозного компоненту інозину в метаболізм.

Приріст неорганічного фосфору зменшився на 41%, в порівнянні з інкубаційними пробами де містився лише фруктозо-1,6-дифосфат. Очевидно, неорганічний фосфор використовується для фосфоролітичного розщеплення інозину до гіпоксантину та рибозофосфату.

Таблиця 3

Вплив інозину та 6-фосфоглюконату на перетворення фруктозо-1,6-дифосфату гемолізатами еритроцитів /дані в мкмоль на мл еритроцитів, $M \pm m$, $n = 4$ /

Метаболіти	розходування		приріст	
	фруктозо-1,6-дифосфату	пентоз	лактату	неорганічного фосфору
Ф-1,6-ДФ	1,04±0,08	0,16±0,01	0,58±0,04	0,42±0,03
Ф-1,6-ДФ та 6-ДФ	0,56±0,06	0,08±0,01	0,28±0,03	0,32±0,02
Ф-1,6-ДФ та інозин	0,78±0,06	0,36±0,06	0,50±0,04	0,26±0,03
Ф-1,6-ДФ, інозин і 6-ДФ	0,42±0,05	0,19±0,03	0,24±0,03	0,24±0,03
Ф-1,6-ДФ, інозин, 6-ДФ та 3-ДФГ	0,93±0,08	0,26±0,07	0,53±0,04	0,21±0,02

Утворений в реакції рибозо-1-фосфат, в свою чергу включається в пентозофосфатний шлях, внаслідок чого зменшується загальна кількість пентозофосфатів.

Внесення в інкубаційне середовище поряд з фруктозодифосфатом та інозином, 6-фосфоглюконату зменшує використання фруктозо-1,6-дифосфату на 62%, розходування пентоз на 48% та приріст лактату

на 59%, а внесенний 3-фосфогліцерат до вище згаданих інкубаційних проб, відновлює використання фруктозодифосфату на 85% та утворення молочної кислоти на 82%. В інкубаційних пробах в іншому, де не використовувалася 6-фосфогліконат, 3-фосфогліцерат повністю відновлює розховування фруктозо-1,6-дифосфату до лактату.

Результати досліджень дають представлення про те, що гемоді-зати еритроцитів мають високоактивну ферментну систему, яка забезпе-печує взаємозв'язок між обміном нуклеотидів, пентозофосфатним шля-хом та гліколізом. Єдність цих процесів дуже важлива, вона забезпе-чує автономність енергетичних і пластичних процесів.

Дані дослідження дають можливість з'ясувати деякі особливості перетворення фруктозо-1,6-дифосфату та вплив на нього 6-фосфогліко-нату, 3-фосфогліцерату та інозину, що доповнює існуючі дані про ме-таболічну регуляцію обміну вуглеводів в клітинах крові.

ВИСНОВКИ

1. В еритроцитах та лейкоцитах крові великої рогатої худоби перетворення фруктозо-1,6-дифосфату до лактату інгібується 6-фосфо-гліконатом.

2. Виявлено нові точки взаємодії метаболітів гліколізу та пентозофосфатного шляху. Встановлено, що 6-фосфогліконат інгібує не тільки гексозофосфатізомеразну реакцію, але також перетворення триозофосфатів в еритроцитах і лейкоцитах та дефосфорильовання фрук-тозо-1,6-дифосфату.

3. Подібний до 6-фосфогліконату інгібіторний вплив на перетво-рення фруктозодифосфату проявляє δ -гліконолактон.

4. 3-фосфогліцерат знімає інгібуєчий ефект 6-фосфогліконату або δ -гліконолактону, при цьому сам не метаболізується до молоч-ної кислоти.

5. Внесений НАД дещо стимулює утворення лактату з фруктозо-1, 6-дифосфату, але він не запобігає інгібуванню 6-фосфогліконатом.

6. Внесений інозин зменшує розховування фруктозодифосфату на 24% та приросту лактату на 11%, які відновлюються 3-фосфоглі-цератом.

7. Виявлено взаємозв'язок між 6-фосфогліконатом, 3-фосфоглі-цератом та інозином при перетворенні фруктозо-1,6-дифосфату в

еритроцитах та лейкоцитах.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ РОБІТ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Головацький І.Д., Буцяк В.І. Вплив 6-фосфоглюконату та δ -глюконолактону на гліколітичне перетворення фруктозо-1,6-дифосфату в еритроцитах великої рогатої худоби // Науково-технічний бюлетень інституту фізіології і біохімії тварин. - Львів, 1994-16, І-С. 36-40.

2. Буцяк В.І. Вплив 6-фосфоглюконату на гліколітичне перетворення фруктозо-1,6-дифосфату в еритроцитах великої рогатої худоби // Тези доповідей 49-тої науково-виробничої конференції ЛАВМ. - Львів, 1992. С. 168.

3. Головацький І.Д., Буцяк В.І., Левкут О.О. При впливі 6-фосфоглюконату та інших метаболітів на регуляцію обміну вуглеводних структур // Тези доповідей. Всеукраїнська конференція з фізіології і біохімії тварин. - УААН Інститут фізіології і біохімії тварин. - Львів, 1994. С. 44-45.

Буцяк В.И. Изучение влияния отдельных метаболитов на регуляцию звеньев обмена углеводов у клетках крови крупного рогатого скота

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук, по специальности 03.00.04 - биохимия.

Институт физиологии и биохимии животных, Львов - 1995 г.

Защищается 3 научных исследовательских работ, которые содержат данные о влиянии отдельных метаболитов на регуляцию процессов обмена углеводов у животных. Установлено, что метаболиты пентозофосфатного пути 6-фосфоглюконат и δ -глюконолактон ингибируют образование лактата из фруктозо-1,6-дифосфата в эритроцитах и лейкоцитах крупного рогатого скота. 3-фосфоглицерат, внесенный вместе с 6-фосфоглюконатом или δ -глюконолактоном, снимает этот ингибиторный эффект

Добавленный НАД не снимает ингибирование 6-фосфоглюконатом.

Butsak V.I. The study of the influence of individual metabolites on the regulation of carbohydrates exchange in blood cells of cattle.

A dissertation to achieve the scientific level of a candidate of biological specializing in O3.00.04 - biochemistry.

The institute of physiology and biochemistry of animals.

There are 3 supporting scientific works, in which, experimentally is shown the influence of individual metabolites on the regulation of carbohydrates exchange in blood cells of cattle. It is proved that the metabolites of the pentozophosphate pathway - 6 - phosphogluconate with gluconolactone inhibit the formation of lactate from fructose-1,6-biphosphate, in erythrocytes and leukocytes in cattle large horned livestock. 3-phosphoglycerate with 6-phosphogluconate or gluconolactone removes its inhibiting effect, but itself is not utilized. The addition of NAD does not change this inhibition.

Ключеві слова: обмін вуглеводів, інгібування, фруктозо-1,6-дифосфат, 6-фосфоглюконат, 3-фосфогліцерат, δ -глюконолактон, інозин.





Підписано до друку 3.05.95 Формат 60x84/16 Друк.офсет. Папір офсет.
Умов.друк.арк. 0,94 Умов.фарб.відб. 1,06. Обл.-вид.арк. 1,00 Тираж
100 прим.. Зам. 2379.

Львівська обласна книжкова друкарня, м. Львів, 290000, вул. Стефаника, 11

AB 32.505