

УДК 577.158.4.

А. Л. Петросян, мол. наук. співроб., **А. Я. Розанов**, д-р мед. наук, проф., **О. В. Запорожченко**, канд. біол. наук, доц., **С. А. Петров**, д-р біол. наук, проф.

Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова, кафедра біохімії, вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна

КАТАБОЛІЗМ $[1-^{14}\text{C}]$ - α -КЕТОКИСЛОТ У ТРАВНІЙ СИСТЕМІ ЩУРІВ

$[1-^{14}\text{C}]$ - α -кетоглутарат у слизовій оболонці шлунково-кишкового тракту та печінки щурів декарбоксилюється до $^{14}\text{CO}_2$ з більшою інтенсивністю, ніж $[1-^{14}\text{C}]$ -піруват та $[1-^{14}\text{C}]$ - α -кетоізокапроат; зі збільшенням концентрації міченого субстрату швидкість цього процесу зростає.

Ключові слова: α -кетокислоти, катаболізм, травна система.

α -Кетокислоти, які утворилися в процесі дезамінування, трансдезамінування та інших процесів здатні у тканинах тварин до різних перетворень. Спершу α -кетокислоти можуть підлягати відновному амінуванню з утворенням відповідної амінокислоти. Крім того, існують глікогенні, кетогенні та окисні шляхи, які призводять до утворення глюкози, жирних кислот, ацетонових тіл та метаболітів ЦТК [1].

Гіпоксія призводить до короткочасного росту активності мультиензимних комплексів дегідрогеназ α -кетокислот, що супроводжується зниженням рівня пірувату та α -кетоглутарату, наслідком чого є тривале пригнічення піруват- і α -кетоглутаратдегідрогеназної активності. На цьому фоні відбуваються істотні зрушення у вмісті та метаболізмі амінокислот глутамінової групи, тісно пов'язаної з ЦТК [2, 3].

Метою нашої роботи було вивчення катаболізму $[1-^{14}\text{C}]$ - α -кетокислот у слизовій оболонці відділів тонких кишок та в печінці щурів.

Матеріали та методи дослідження

В експериментах *in vitro* досліджували катаболізм до $^{14}\text{CO}_2$ α -кетокислот, мічених по α -карбоксилу: $[1-^{14}\text{C}]$ - α -кетоглутарату, $[1-^{14}\text{C}]$ -пірувату та $[1-^{14}\text{C}]$ - α -кетоізокапроату. Аліквоту міченої амінокислоти розводили у тисячу разів 0,2 М розчином відповідної неміченої амінокислоти до питомої радіоактивності 2,16–2,18 МБк та вводили щурам підшкірно в об'ємі 1 мл на 100 г живої ваги за 2 хвилини до розміщення їх у камері. Вивчали катаболізм субстратів до $^{14}\text{CO}_2$ за методом Gubler et al [4]. Тварин декапітували, швидко виділяли відділи шлунково-кишкового тракту (слизову з дванадцятипалої кишки, інших тонких кишок та окремо пе-

чінку). Гомогенати тканин готували у тефлон-скляному гомогенізаторі у співвідношенні 1:4 на 0,06 М К, Na — фосфатному буфері (рН 7,2). Час отримання гомогенату складав не більше 4–5 хв, всі операції препарування тварин провадили на холоді. Аліквоту гомогенату вносили в інкубаційні посудини, після чого додавали мічені субстрати до кінцевих концентрацій від 0,05 до 0,80 мМ (в об'ємі 50–200 мкл). Загальний об'єм інкубаційного середовища складав 1,2 мл; об'єм герметичного посуду — 6 мл. Інкубаційні середовища герметизували та інкубували протягом 10 хв при 37°C за постійного перемішування. Реакцію зупиняли додаванням розчину трихлороцтової кислоти (ТХО) до кінцевої концентрації 7,5%, після чого проби знов інкубували 10 хв при 37°C за умов безперервного струшування для повного виділення $^{14}\text{CO}_2$ з розчину та поглинання його поглиначем фільтру. Фільтри висушували протягом 3–5 годин при кімнатній температурі. Радіоактивність поглинача (паперового фільтру стандартних розмірів, змоченого 1 N NaOH) після висушування визначали за допомогою газопотокового лічильника 2154-1-1M "Протока". При цьому зважали на ступінь поглинання β -випромінювання фільтрувальним папером (60–70%). Поглинання $^{14}\text{CO}_2$ визначали загальноприйнятими методами, вивільняючи з розчинів $^{14}\text{CO}_2$ сірчаною кислотою. Після цього визначали залишкову радіоактивність паперових фільтрів. Інтенсивність катаболізму розраховували у нмолях виділеного $^{14}\text{CO}_2$ на $\text{г}^{-1}\cdot\text{тканини}\cdot\text{хв}^{-1}$. Статистичну обробку отриманих даних провадили за загальноприйнятими методами [5, 6].

Результати досліджень

Катаболізм до $^{14}\text{CO}_2$ амінокислот, мічених по α -карбоксилу, може здійснюватися шляхом їх безпосереднього переамінування чи дезамінування або після декарбоксілювання до відповідних амінів.

У травній системі вивчення цих ферментативних процесів викликає значний інтерес. У зв'язку з цим доцільно було порівняти утворення $^{14}\text{CO}_2$ з мічених по карбоксилу α -кетокислот у слизовій оболонці шлунково-кишкового тракту та печінці.

Результати досліджень (табл. 1–3) продемонстрували, що [1- ^{14}C]- α -кетоглутарат у слизовій оболонці шлунково-кишкового тракту (ШКТ) та печінці шурів декарбоксілюється до $^{14}\text{CO}_2$ з більшою інтенсивністю, ніж інші субстрати, причому зі збільшенням концентрації міченого субстрату зростає швидкість цього процесу.

Декарбоксілювання [1- ^{14}C]-пірувату до $^{14}\text{CO}_2$ здійснюється з меншою інтенсивністю.

Декарбоксілювання [1- ^{14}C]-пірувату у малих концентраціях (0,05–0,2 мМ) гомогенатами слизової дванадцятипалої кишки здійснюється майже з такою ж інтенсивністю, як і α -кетоглутарату, а за кінцевої концентрації 0,8 мМ декарбоксілювання [1- ^{14}C]-пірувату на третину поступається утворенню $^{14}\text{CO}_2$ з [1- ^{14}C]- α -кетоглутарату (табл. 1).

Таблиця 1

**Катаболізм функціонально-пов'язаних [1-¹⁴C]- α -кетокислот
у гомогенатах слизової дванадцятипалої кишки щурів,
нмолі ¹⁴CO₂ · г⁻¹ тканини · хв⁻¹; n = 6–10**

Субстрати	Концентрація, мМ				
	0.05	0.10	0.20	0.40	0.80
[1- ¹⁴ C]- α -кетоглутарат	53.4 ± 5.28	96.4 ± 9.51	178.0 ± 17.55	344.3 ± 34.30	626.0 ± 62.40
[1- ¹⁴ C]-піруват	49.3 ± 4.88	91.7 ± 8.98	165.1 ± 16.44	305.0 ± 30.41	463.4 ± 46.28
[1- ¹⁴ C]- α -кетогізокапрокат	6.2 ± 0.54	8.3 ± 0.74	13.2 ± 1.21	16.2 ± 1.50	20.1 ± 1.88

У слизовій оболонці відділів ШКТ та печінці щурів утворення ¹⁴CO₂ з пірувату і α -кетоглутарату протікає на порядок більш інтенсивно, ніж декарбоксилювання [1-¹⁴C]- α -кетогізокапрокату, причому катаболізм α -кетогізокапрокату незначно зростає зі збільшенням його концентрації в інкубаційному середовищі від 0,2 до 0,8 мМ (табл. 2)

Таблиця 2

**Катаболізм функціонально-пов'язаних [1-¹⁴C]- α -кетокислот
у гомогенатах слизової оболонки тонкого кишечника щурів,
нмолі ¹⁴CO₂ · г⁻¹ тканини · хв⁻¹; n = 6–10**

Субстрати	Концентрація, мМ				
	0.05	0.10	0.20	0.40	0.80
[1- ¹⁴ C]- α -кетоглутарат	41.4 ± 3.98*	79.1 ± 7.64*	140.3 ± 13.80*	262.0 ± 25.84*	454.0 ± 44.38*
[1- ¹⁴ C]-піруват	35.6 ± 3.48*	61.2 ± 5.88*	109.7 ± 10.81*	184.6 ± 18.38*	290.0 ± 28.71*
[1- ¹⁴ C]- α -кетогізокапрокат	5.0 ± 0.44*	7.9 ± 0.67	12.9 ± 1.18	15.9 ± 1.47	19.7 ± 1.88

Примітка: * — достовірна різниця по відношенню до даних, отриманих на слизовій дванадцятипалої кишки, p < 0,05.

Наші дослідження показали, що відділи шлунково-кишкового тракту та печінка суттєво не розрізняються по інтенсивності утворення ¹⁴CO₂ з [1-¹⁴C]- α -кетогізокапрокату та істотно розрізняються по утворенню ¹⁴CO₂ з [1-¹⁴C]- α -кетоглутарату та [1-¹⁴C]-пірувату. У слизовій оболонці дванадцятипалої кишки утворення ¹⁴CO₂ з [1-¹⁴C]- α -кетоглутарату більш ефективно, ніж у слизовій тонких кишках при концентраціях субстрату 0,05–0,8 мМ.

У гомогенатах печінки (табл. 3) порівнянно зі слизовою оболонкою дванадцятипалої кишки спостерігається ще нижча інтенсивність утворення ¹⁴CO₂ з [1-¹⁴C]- α -кетоглутарату та [1-¹⁴C]-пірувату. У всьому діапазоні досліджених концентрацій отримана достовірна різниця у порівнянні зі слизовою оболонкою дванадцятиперстної кишки.

Таблиця 3

Катаболізм функціонально-пов'язаних [1-¹⁴C]-α-кетокислот у гомогенатах печінки щурів, нмолі ¹⁴CO₂ · г⁻¹ тканини · хв⁻¹; n = 6–10

Субстрати	Концентрація, мМ				
	0.05	0.10	0.20	0.40	0.80
[1- ¹⁴ C]-α-кетоглутарат	38.7 ± 3.74*	68.8 ± 6.79*	123.8 ± 12.29*	240.8 ± 23.80*	417.0 ± 40.65*
[1- ¹⁴ C]-піруват	31.1 ± 2.97*	57.1 ± 5.58*	80.2 ± 7.84*	160.4 ± 15.88*	260.6 ± 25.51*
[1- ¹⁴ C]-α-кетоізокапронат	4.8 ± 0.38*	8.1 ± 0.71	11.9 ± 1.10	15.2 ± 1.40	21.8 ± 2.09

Примітка: * — достовірна різниця по відношенню до даних, отриманих на слизовій дванадцятипалій кишки, $p < 0,05$.

Вивчені нами α-кетокислоти окиснюються *in vitro* гомогенатами з тканин слизової дванадцятипалій кишки, тонких кишок та печінки з неоднаковою інтенсивністю: [1-¹⁴C]-піруват та особливо [1-¹⁴C]-α-кетоглутарат декарбоксилуються до ¹⁴CO₂ в умовах нашого дослідження на порядок інтенсивніше, ніж [1-¹⁴C]-α-кетоізокапронат.

Результати наших попередніх досліджень [7, 8], а також літературні дані свідчать про перевагу методу радіоізотопної індикації утворення ¹⁴CO₂ з [1-¹⁴C]-α-кетокислот для кількісної характеристики окисного декарбоксилування відповідних α-кетокислот порівняно з урахуванням відновлення NAD⁺ або феріціаніду, коли спостерігаються на порядок більші величини. Цей факт ми пояснюємо подальшим окисненням досліджуваних субстратів у вигляді ацилів коензиму А у циклі трикарбонових кислот, а також відновленням NAD⁺ при окисненні інших ("ендогенних") субстратів у слизовій оболонці ШКТ та в печінці щурів *in vitro*.

Висновки

1. Відділи шлунково-кишкового тракту і печінка істотно не розрізняються по інтенсивності утворення ¹⁴CO₂ із [1-¹⁴C]-α-кетоізокапронату та істотно розрізняються по утворенню ¹⁴CO₂ з [1-¹⁴C]-α-кетоглутарату та [1-¹⁴C]-пірувату.

2. Утворення ¹⁴CO₂ з [1-¹⁴C]-α-кетоглутарату та [1-¹⁴C]-пірувату в слизовій дванадцятипалій кишки більш ефективно, ніж у слизовій оболонці тонких кишок та в печінці.

Література

1. Березов Т. Т., Коровкин Б. Ф. Биологическая химия. — М.: Медицина, 1983. — С. 458–482.
2. Соколова Н. А., Маслова М. В., Маклакова А. С., Ашмарин И. П. Пренатальный гипоксический стресс: физиологические и биохимические последствия, коррекция регуляторными пептидами. // Успехи физиологических наук. — 2002. — Т. 33. — № 2. — 56 с.

3. Розанов А. Я. Локалізація біосинтезу субодиниць дегідрогеназ кетокислот у гепатоцитах та пере-розподіл їх з коферментами в мітохондріях // Тез. допов. на V Укр. біохім. з'їзду. — К., 1987. — 135 с.
4. Gubler C. J., Adams B. L., Hammond et al. Effect of thiamine deprivation and thiamine antagonisms on the level of α-aminobutyric acid and on 2-oxoglutarate metabolism in rat brain // *J. Neurochem.* — 1974. — Vol. 22. — N 4. — P. 831-836.
5. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. — Минск: "Высшая школа". — 1973. — 320 с.
6. Вознесенский В. Л. Первичная обработка экспериментальных данных. — Л.: Наука, 1969. — С. 87-88.
7. Петросян А. Л., Розанов А. Я., Петров С. А. Вплив гіпоксії замкнутого простору на катаболізм амінокислот у системі травлення щурів // Вісник Одеського національного університету. — 2004. — Т. 9. — Вип. 5. — С. 46-52.
8. Carr S., Петросян А. Л., Акбарі М. Р. Катаболізм [1-¹⁴C]-L-глутамату, [1-¹⁴C]-L-аланіну, [1-¹⁴C]-L-лейцину до ¹⁴CO₂ у відділах головного мозку щурів за гіпоксії замкнутого простору // Вісник Одеського державного університету. — 2000. — Т. 5. — Вип. 1. — С. 35-40.

А. Л. Петросян, **А. Я. Розанов**, А. В. Запорожченко, С. А. Петров
Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова,
кафедра биохимии,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина

КАТАБОЛИЗМ [1-¹⁴C]-α-КЕТОКИСЛОТ В ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЕ У КРЫС

Резюме

[1-¹⁴C]-α-кетоглутарат в слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта и в печени у крыс декарбоксилируется до ¹⁴CO₂ с большей интенсивностью, чем [1-¹⁴C]-пируват и [1-¹⁴C]-α-кетоизокaproнат; с увеличением концентрации меченого субстрата скорость этого процесса еще более возрастает.

Ключевые слова: α-кетокислоты, катаболізм, пищеварительная система.

L. Petrosyan, **A. Ya. Rozanov**, A. V. Zaporozhchenko, S. A. Petrov
Odessa National I. I. Mechnikov University, Department of Biochemistry,
Dvoryanskaya St., 2, Odessa, 65026, Ukraine. Tel: (0482) 68-78-75

CATABOLISM OF [1-¹⁴C]-α-KETOACIDS IN THE DIGESTIVE SYSTEM OF RATS

Summary

[1-¹⁴C]-α-ketoglutarate decarboxylates to ¹⁴CO₂ is more intensive than [1-¹⁴C]-pyruvate and [1-¹⁴C]-α-ketoisocaproate in the mucous membrane of the digestive tract and in the liver of rats. The rate of this process increases with the increment of labeled substrate concentration.

Keywords: α-ketoacids, catabolism, digestive system.