

ТРАНСКЕТОЛАЗА КАК РЕГУЛЯТОР СИНТЕЗА ФОСФОРИБОЗИЛПИРОФОСФАТА

Кубышин В. Л.¹, Зиматкина Т. И.²

¹ Кафедра химии

¹УО «Гродненский государственный аграрный университет»

² Кафедра лучевой диагностики и лучевой терапии

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

Гродно, Беларусь

Актуальность. Регуляция биосинтеза нуклеотидов и нуклеиновых кислот определяется внутриклеточной концентрацией фосфорибозилпирофосфата (ФРПФ), синтез которого зависит от обмена пентозофосфатов. Известно, что внутриклеточная концентрация фосфорилированных пентоз сохраняется на относительно низком уровне и является одним из малоизученных вопросов. Пентозофосфатный путь (ПФП) обмена углеводов является основной метаболитной системой реакций, формирующей клеточный фонд фосфопентоз, поток которых направлен на биосинтез нуклеотидов, нуклеиновых кислот, нуклеотидных коферментов и гликолитических превращений [1]. Сравнительно невысокая активность ключевого фермента неокислительного звена пентозного цикла транскетолазы (ТК) в большинстве тканей животных определяет скорость и направление потока фосфопентозы <----> фосфогексозы. В связи с этим достигаемое разными способами изменение активности ТК, дает возможность охарактеризовать регуляторную роль фермента в обмене фосфопентоз, а также синтезе нуклеотидов и нуклеиновых кислот.

Биосинтез внутриклеточных нуклеотидов осуществляется при участии гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы (ГГФРТ), аденинфосфорибозилтрансферазы (АФРТ), а также зависит от концентрации фосфорибозилпирофосфата (ФРПФ). Последний образуется из рибозо-5-фосфата (Р-5-Ф) и АТФ в ПРПФ-синтетазной реакции, активность которой считают регуляторным звеном формирования нуклеотидов путем *de novo* синтеза [2].

Другой важный фактор биосинтеза нуклеотидов – концентрация ФРПФ в тканях, которая зависит от доступности одного из предшественников Р-5-Ф, являющегося субстратом ФРПФ синтетазной реакции. Р-5-Ф синтезируется в тканях преимущественно окислительными и неокислительными реакциями ПФП. В эритроцитах человека на долю неокислительных реакций приходится до 80% [3]. Показано,

что недостаточность или полное отсутствие глюкозо-6-фосфатдегидрогеназной реакции в эритроцитах не влияет на стационарную концентрацию ФРПФ [4]. Эти данные характеризуют транскетолазно-трансальдолазную реакции как важное стабилизирующее звено в клеточном синтезе этого метаболита, а ТК для многих тканей является лимитирующим тиаминзависимым ферментом.

Цель. Исследовать роль ТК во внутриклеточном синтезе ФРПФ в эритроцитах и почках крыс, а также влияние некоторых метаболитов ПФП на биосинтез азотистых оснований.

Материалы и методы исследования. Для получения гемолизатов эритроцитов кровь белых беспородных крыс собирали в пробирки с гепарином. Эритроциты отделяли от плазмы путем центрифугирования и затем двукратно промывали физиологическим раствором. Затем, после отделения эритроцитарной массы, лизировали внесением двух объемов дистиллированной воды по отношению к объему упакованных эритроцитов. Гемолизированные эритроциты центрифугировали 30 минут на холоде при 1700g и сохраняли в холодильнике при -10°C для последующих экспериментов. После размораживания гемолизаты центрифугировали на холоде и полученный супернатант использовали как источник ферментов в синтезе ^{14}C -ИМФ.

Синтез ^{14}C -ИМФ лизированным препаратом эритроцитов осуществляли следующим образом. Реакционная смесь для определения активности ГГФРТ состояла из: 0,1 мл трис-НСI буферного раствора с рН 7,4, содержащего 5 мМ хлористого магния, ФРПФ в качестве субстрата, 0,1 мл ^{14}C -гипоксантина (0,08 МБк), 0,1 мл гемолизата, 0,005 мл 0,4 М калий-фосфатного буфера рН 7,4. При исследовании активности синтетазы ФРПФ применяли смесь для определения активности ГГФРТ, где вместо ФРПФ использовали Р-5-Ф или же пентозофосфатную смесь ПФ в разных концентрациях (которые указаны в подписях к рисункам). Разделение меченных субстратов и продуктов реакции проводили методом восходящей тонкослойной хроматографии на пластинках силуфол в течение 1,5 часа смесью, содержащей бутанол : метанол (25%) : аммиак : вода в соотношении 60 : 20 : 1 : 20 по объему. R_f для гипоксантина-0,36, для ИМФ-0,07. Измерение радиоактивности продуктов реакции, элюированных с хроматографической пластинки в течение 1 часа водой, проводили на жидкостном сцинтилляционном счетчике Нуклеар Чикаго.

В работе использовали: [^{14}C]-гипоксантин и ФРПФ фирмы «Серва», Р-5-Ф – фирмы «Реанал» (Венгрия), пентозофосфатную смесь (ПФ) синтезировали по методу [4]. ТК получали с помощью ионооб-

менной хроматографии на фосфоцеллюлозе и адсорбционной хроматографии на гидроксилapatите [5]. Чистоту ферментногопрепарата характеризовали по данным гель-электрофореза в 7% полиакриламидном геле и по удельной активности, которую определяли на спектрофотометре SPECORD UV VIS с использованием вспомогательных ферментов: α -глицерофосфатдегидрогеназы, триозофосфатизомеразы, изомеразы и эпимеразы пентозофосфатов. В качестве субстрата использовали Р-5-Ф.

Результаты и обсуждение. В экспериментах *in vitro* установлено, что поликомпонентная система гемолизатов эритроцитов интенсивно синтезирует ФРПФ из Р-5-Ф и АТФ и утилизируют его в реакции конденсации с азотистыми основаниями.

Используя Р-5-Ф или ФРПФ в качестве субстратов, проводили дифференциальное определение активности синтетазы ФРПФ и ГГФРТ, катализирующих данные реакции. Установлено, что скорость синтеза ^{14}C -ИМФ существенно различается в зависимости от использованного субстрата и указывает на то, что активность ГГФРТ значительно выше синтетазы ФРПФ. Учитывая это обстоятельство, характеризующее указанный объект как удобную биохимическую систему, проведено изучение регуляторных свойств различных внутриклеточных интермедиатов ПФП в отношении активности синтетазы ФРПФ.

Высокая чувствительность ФРПФ синтетазы к изменению концентрации Р-5-Ф показана в экспериментах, где варьировал уровень Р-5-Ф при фиксированной величине АТФ. Установлено, что при концентрации Р-5-Ф, равной 1 мМ, достигается субстратное насыщение, так как кажущееся значение K_m по субстрату составляет 0,18 мМ. Эта абсолютная величина сравнима с аналогичным параметром для очищенного фермента из печени крысы и шпината. Так как внутриклеточная концентрация Р-5-Ф в тканях животных существенно ниже величины K_m ФРПФ синтетазы по субстрату [6], это дает основание оценивать Р-5-Ф в качестве одного из возможных регуляторов во внутриклеточном синтезе ФРПФ и зависимых от него процессов.

В поликомпонентной системе гемолизатов эритроцитов экзогенный Р-5-Ф под действием неокислительных ферментов рибозо-5-фосфатизомеразы и рибулозо-5-фосфатэпимеразы превращается в равновесную смесь фосфорилированных пентоз, состоящую из рибозо-5-фосфата, ксилулозо-5-фосфата и рибулозо-5-фосфата. Соотношение пентозофосфатов в наших экспериментах составило, соответственно, 53, 27 и 17%. Для того чтобы охарактеризовать влияние пентозофосфатных превращений на синтез ФРПФ, сравнивали эффективность пентозофос-

фатов и Р-5-Ф в равных концентрациях. В экспериментах установлена их равнозначность как предшественников в синтезе ФРПФ.

Показано, что при высоких концентрациях как Р-5-Ф, так и АТФ, наблюдается эффект субстратного ингибирования ФРПФ-синтетазы. Значение K_m ФРПФ-синтетазной реакции для АТФ значительно ниже внутриклеточной концентрации нуклеотида и, следовательно, этот фактор оказывает менее существенное влияние на клеточный синтез ФРПФ.

Эндогенный уровень концентраций субстратов-предшественников ФРПФ обеспечивает относительно невысокие скорости его синтеза в эритроцитах. Лимитирование биосинтеза обуславливается пентозным компонентом, поскольку внесение Р-5-Ф или смеси фосфопентоз резко активизирует этот процесс. Существенная роль Р-5-Ф в обмене ФРПФ затрагивает вопрос о путях его внутриклеточной наработки и механизмах регуляции биосинтеза интермедиатов. Основным источником фосфопентоз в клетке являются окислительные и неокислительные реакции пентозного цикла, которые можно рассматривать как два независимых пути формирования Р-5-Ф. Окислительная ветвь характеризуется векторностью в синтезе фосфопентозы, тогда как неокислительными ТК-трансальдозазными превращениями углеводов осуществляется как синтез, так и утилизация фосфорилированных сахаров. Вклад неокислительных реакций в наработку фосфопентоз преобладает [1]. ТК можно рассматривать как фермент, занимающий ключевую позицию в переключении гликолитического метаболического потока на ПФП, поставляющий рибозный компонент для биосинтеза азотистых оснований, а роль обратимых ТК-реакций в сохранении гомеостатического баланса фосфорилированных сахаров в тканях остается предметом исследований.

Частичное или полное блокирование активности ТК в микроорганизмах сопровождается накоплением Р-5-Ф. Отмечается повышенное содержание пентозофосфатов в ткани печени тиаминдефицитных крыс, характеризующихся сниженной активностью ТК. Критерием, характеризующим ТК-реакцию как «лимитирующее звено» ПФП, являются данные по сравнительной оценке активности ферментов неокислительной ветви ПФП, что свидетельствует в пользу равновесной регуляции внутриклеточных метаболитов транскетолазой. Константа равновесия для ТК печени крысы, полученная *in vitro* с такими субстратами, как Р-5-Ф и К-5-Ф, равнялись 0,59. Константа равновесия, полученная теоретически из внутриклеточного содержания Р-5-Ф, седогептулозо-7-фосфата, К-5-Ф и глицеральдегид-3-фосфата, в печени крысы приближается к этому значению и составляет 0,5.

Полученные данные позволяют рассматривать ТК-реакцию как систему с равновесным контролем, где концентрации реагирующих субстратов и продуктов реакции являются факторами, определяющими направление метаболического потока «гексозофосфаты \longleftrightarrow пентозофосфаты». Снижение активности ТК-реакции можно рассматривать как регуляторное звено сохранения фонда Р-5-Ф. В экспериментах, где варьировала активность ТК в гемолизатах эритроцитов посредством внесения высокоочищенного фермента, наблюдалось существенное снижение синтеза ИМФ.

С увеличением активности вносимого препарата ТК это действие усиливалось. Следовательно, интенсивность ТК-реакций можно рассматривать как регуляторный фактор, контролирующий уровень концентрации Р-5-Ф – субстрата-предшественника ФРПФ. Так как ингибирование ФРПФС-синтетазы зависело от длительности инкубации гемолизатов с экзогенной ТК, есть основание предположить существование регуляторную роль продуктов ТК-трансальдозных реакций в изучаемом процессе.

Возможное влияние субстратов гликолиза – фосфорилированных гексоз – на синтез ФРПФ изучали в экспериментах, где установлено, что преинкубация гемолизатов эритроцитов крыс с глюкозо-6-фосфатом в разных концентрациях существенно влияет на синтез ФРПФ.

Следовательно, помимо эффекторного действия Р-5-Ф, синтез ФРПФ в клетке находится под контролем глюкозо-6-фосфата и, возможно, других фосфорилированных сахаров.

В серии экспериментов выявлено влияние на синтез ФРПФ P_n , действие которых, вероятно, имеет комплексный характер, проявляющийся в реализации не только аллостерического механизма активации ФРПФС, но и ингибирования ТК, активации гексокиназы, фосфофруктокиназы и усиления синтеза фосфопентоз. Установлено, что не только Р-5-Ф оказывает существенное влияние на скорость синтеза ФРПФ, но и внесение высокоочищенного препарата ТК. Следовательно, можно предположить, что высокая активность ТК обуславливает интенсивную утилизацию пентозофосфатов, тем самым снижая концентрацию субстрата синтетазы ФРПФ. Однако низкие значения K_m для ФРПФС-синтетазы по Р-5-Ф, а также константа равновесия легко обратимой ТК реакции, значение которой близко к 0,5, указывает на малую вероятность предполагаемого механизма. В эффекте ТК на биосинтез ФРПФ в гемолизатах эритроцитов, вероятно, решающее значение могут иметь продукты ТК реакции как возможные ингибиторы синтетазы ФРПФ. Это предположение кажется наиболее вероятным, учитывая влияние глюкозо-6-фосфата на данный процесс.

В независимом эксперименте по ингибированию ТК окситиамином установлено, что уровень ФРПФ в ткани почки опытного варианта был в 1,7-2 раза выше, чем в контроле. Соответственно, этот эффект наблюдался через 24 часа после действия антиметаболита, когда активность ТК ткани почки снизилась на 30-40%.

Более длительное воздействие антиметаболита в условиях насыщения вызывало снижение активности фермента до 60% по сравнению с величинами контрольных животных. Повышение концентрации ФРПФ объясняется торможением ферментативной активности ТК-реакции, за счет которой осуществляется утилизация фосфорилированных форм пентоз, в том числе Р-5-Ф, но также и снижением метаболизма ФРПФ по пути биосинтеза нуклеиновых кислот.

Выводы. В результате проведенных исследований установлено, что в ткани почек крыс ингибирование ТК антиметаболитом тиамин (окситиамином) приводит к изменению уровня внутриклеточной концентрации ФРПФ. Полученные данные полностью находят подтверждение в экспериментах с гемолизатами эритроцитов. Таким образом, результаты проведенных исследований позволяют сделать вывод о том, что ТК контролирует образование субстрата пластического обмена – ФРПФ, а также координирует направление потока фосфорилированных сахаров по гликолитическому пути либо по ПФП.

Обнаруженные метаболитные сдвиги на уровне пентозофосфатов и нуклеиновых кислот у животных при снижении активности ТК могут стать основой для формирования новой концепции о регуляторной роли фермента в обмене нуклеиновых кислот. Выявленные закономерности между активностью ТК и биосинтезом нуклеотидов и нуклеиновых кислот дают основание рассматривать ингибиторы ТК как перспективные лечебные средства при некоторых видах патологии.

Литература

1. Casazza, J. P. The content of pentose cycle intermediates in liver starved fed ad libitum and mealed rabs / J. P. Casazza, R.L. Veech // J. Biochem. – 1986. – Vol. 261. – № 2. – P. 690-698.
2. Sakuma, R. Phosphoribosylpyrophosphate syntetase in human erythrocytes: assay and kinetic stadies using high-performance liquid chromatography / R. Sakuma, T. Nishina, H. Yamanaka // Clin. Chim. Acta. – 1991. – № 16. – P. 143-152.
3. Becker, M. A. Synthesis of phosphoribosylpyrophosphate in mammalian cells / M. A. Becker, K. O. Raivio, J. E. Seegmiller // Adv. in enzymol. – 1979. – Vol. 49. – P. 281-306.
4. Кубышин, В. Л. Эффективный и доступный метод выделения неокислительных ферментов ПФП из печени крыс / В. Л. Кубышин, З. В. Горбач // Вести АН БССР. – 1992. – № 5-6. – С. 38-41.

5. Очистка и свойства транскетолазы печени крыс / З. В. Горбач [и др.] // Биохимия. – 1981. – Т. 46. – Вып. 11. – С. 1963-1969.

6. Krath, B. N. Implication of secondary structure prediction and amino acid sequence comparison of class I and class II phosphoribosyl diphosphate synthases on catalysis, regulation, and quaternary structure / B. N. Krath. // Protein Sci. – 2001. – № 10. – P. 2317-2324.

ЗНАЧЕНИЕ ДАННЫХ ОСТЕОСЦИНТИГРАФИИ И МУЛЬТИСПИРАЛЬНОЙ КОМПЬЮТЕРНОЙ ТОМОГРАФИИ В ДИАГНОСТИКЕ МЕТАСТАТИЧЕСКОГО ПОРАЖЕНИЯ КОСТНОЙ ТКАНИ ПРИ РАКЕ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

*Лукошко Е. С.¹, Овчинников В. А.¹,
Довнар О. С.², Жмакина Е. Д.²*

¹ Кафедра лучевой диагностики и лучевой терапии
УО «Гродненский государственный медицинский университет»,

² УЗ «Гродненская областная клиническая больница»
г. Гродно, Беларусь

Актуальность. За последнее время в Европе увеличилось число случаев заболеваемости раком предстательной железы (далее РПЖ). При этом в структуре онкологических заболеваний у мужчин РПЖ опережает рак легких [1]. В Республике Беларусь число случаев РПЖ за последние 10 лет увеличилось примерно на 14%.

Необходимо отметить, что наиболее частым путем метастазирования РПЖ является гематогенный путь, преимущественно в костную ткань (чаще всего поражаются кости таза и позвоночник). Подобные изменения наблюдаются в 54-85% случаев. Поэтому важное значение имеет своевременная диагностика и дифференциальная диагностика метастатического поражения скелета. Наиболее часто используемыми лучевыми методами исследования, необходимыми для выявления метастазов в костную ткань, являются: мультиспиральная компьютерная томография (далее МСКТ), чувствительность которой составляет до 85%, а также остеосцинтиграфия, позволяющая оценить метастатическое поражение всего скелета (чувствительность метода составляет около 95%).

Для выявления рецидива или метастазов при РПЖ наряду с лучевыми методами исследования используются и оценка концентрации простатспецифического антигена (ПСА).