

О.И. ГУБИЧ, М.В. ПЛЕВАКО

**РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ИЗОФЕРМЕНТОВ ПИРУВАТКИНАЗЫ
БИОФЛАВОНОИДАМИ И КУРКУМИНОМ *IN VITRO***

The ability of some bioflavonoids (quercetin, morin, hesperidin, khrisin) and curcumin in final concentration 10^{-7} - 10^{-9} M to inhibit the activity of L-, R-, M1- and M2-isoforms of rat pyruvate kinase was determined. Maximum inhibitory effect was shown in the presence of quercetin and morin. It's determined that 5 mM alanin can suppress the bioflavonoids and curcumin action.

Пируваткиназа (ПК, АТФ: пируват-фосфотрансфераза, КФ 2.7.1.40) – важнейший гликолитический фермент, участвующий в реакции субстратного фосфорилирования АДФ [1]. Установлено также участие ПК в таких фундаментальных процессах, как пролиферация и дифференциация клеток, образование опухолей и апоптоз [2].

В организме человека и высших млекопитающих фермент представлен четырьмя изоформами, различающимися по особенностям регуляции биокатализа, ферментативной активности и локализации в тканях. Выделяют L-ПК печени, M1-изоформу ПК мозга и скелетной мускулатуры, M2-изофермент легких, а также R-ПК, обнаруженную в эритроцитах [3, 4]. Недостаток ПК – одна из наиболее распространенных энзимопатий, наследуемая по аутосомно-рецессивному типу и характеризующаяся развитием гемолитической анемии. Снижение активности данного фермента регистрируется при различных патологиях печени и селезенки [5, 6].

Биофлавоноиды и куркуминоиды – полифенольные биологически активные соединения растений [7]. Общеизвестно, что данные соединения чрезвычайно важны для нормальной жизнедеятельности человека и высших животных. Так, флавоноиды способны проявлять антирадикальное, капилляроукрепляющее, противовоспалительное, нейропротекторное действие [7, 8]. Влияние куркумина на организм человека характеризуется выраженными противоопухолевыми, противоамелойдными, кардиопротекторными свойствами [7, 9]. Указанные свойства легли в основу применения куркумина и ряда флавоноидов в качестве лекарственных препаратов и биодобавок. Между тем тонкие молекулярно-биохимические механизмы реализации разноплановых эффектов данных соединений в настоящее время окончательно не установлены. В частности, в доступной литературе отсутствует информация о возможности регуляции ими энергетических процессов в клетке в норме и при патологии.

Таким образом, целью настоящей работы явилось изучение влияния ряда биофлавоноидов и куркумина на активность различных изоформ пируваткиназы *in vitro*.

Материалы и методы исследования

Работа проводилась на цитозольной фракции печени, легких, скелетной мускулатуры и эритроцитарной массы беспородных крыс-самцов массой 150÷200 г, находящихся на стандартном рационе питания вивария БГУ. Все эксперименты проводились в соответствии с этическими нормами обращения с животными, а также правилами проведения работ с использованием лабораторных животных в научных исследованиях на биологическом факультете БГУ, составленными на основании рекомендаций и требований «Всемирного общества защиты животных» и «Европейской конвенции по защите экспериментальных животных» (Страсбург, 1986).

Активность пируваткиназы определялась по методу [10]. Содержание белка в исследуемых образцах измерялось по методу Бенедикта [11]. Статистическая обработка результатов проводилась с помощью пакета программ Stadia 6.0.

Результаты и их обсуждение

Известно, что, помимо тканевой специфичности, изоферменты ПК отличаются своими регуляторными свойствами и особенностями биокатализа [1–4]. В связи с этим на первом этапе нами была проведена работа по сравнительной характеристике особенностей ферментативного катализа, обеспечиваемого исследуемыми изоформами ПК. Установлено различие M1-, M2-, L-, R-ПК по следующим параметрам: величине оптимума pH, величинам констант Михаэлиса (K_m) для АДФ и фосфоенолпирувата, величине IC_{50} для фенилаланина (самый известный природный аллостерический ингибитор ПК), величине pH, при которой проявляется аллостерическое ингибирование, а также по возможности его предотвращения 5 ммоль/л аланином (таблица).

Сравнительная характеристика основных параметров ферментативного катализа изоформами ПК

| Параметр | Изоформа ПК | | | |
|---|-------------|-------|-------|-------|
| | L | M1 | M2 | R |
| Оптимум pH катализируемой реакции | 6,5 | 7,5 | 7,0 | 6,5 |
| Km (по АДФ), ммоль/л | 1,3 | 2,2 | 4,2 | 0,25 |
| Km (по ФЕП), ммоль/л | 0,20 | 0,14 | 3,8 | 0,20 |
| pH проявления аллостерической регуляции | > 7,5 | ≥ 7,5 | ≥ 7,0 | ≤ 6,5 |
| IC ₅₀ фенилаланина, ммоль/л | 1,2 | 1,6 | 4,5 | 0,8 |
| Эффект 5 ммоль/л аланина | + | + | + | - |

На следующем этапе было исследовано влияние куркумина и природных флавоноидов: хризина, морина, гесперидина, кверцетина на различные изоформы фермента. Показано, что преобладающим эффектом данных соединений на исследуемые изоферменты является ингибирование (рис. 1). Максимальный эффект проявлялся при использовании флавоноидов в следующих концентрациях: хризин – 10⁻⁹ моль/л, кверцетин – 10⁻⁸ моль/л, морин, гесперидин, куркумин – 10⁻⁷ моль/л.

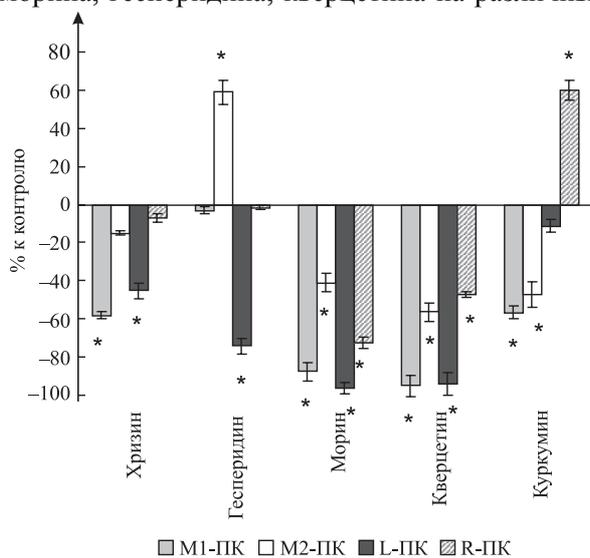


Рис. 1. Влияние природных биофлавоноидов и куркумина на активность различных изоферментов ПК крыс (здесь и на рис. 2: * – результаты, достоверные при p ≤ 0,05 (n = 5), флавоноиды и куркумин были использованы в максимально эффективных концентрациях)

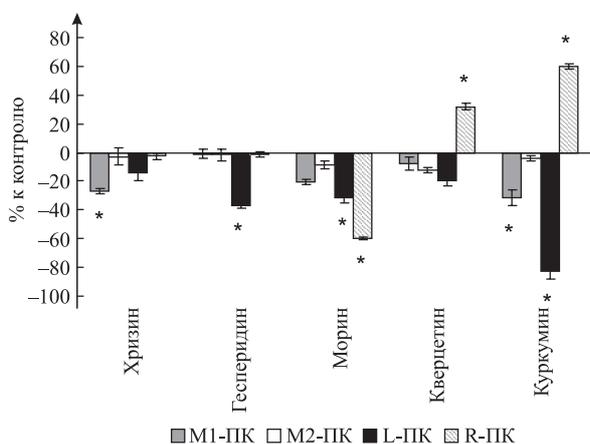


Рис. 2. Влияние природных биофлавоноидов и куркумина и 5 ммоль/л аланина на активность различных изоферментов ПК крыс

По силе ингибиторного действия природные полифенолы образуют следующий ряд эффективности (см. рис. 1):

M1-ПК: кверцетин > морин ≥ куркумин > хризин >> гесперидин = 0;

L-ПК: морин ≥ кверцетин > гесперидин > хризин > куркумин;

M2-ПК: кверцетин > морин >> куркумин > хризин > гесперидин = 0;

R-ПК: морин ≥ кверцетин = 0.

Интересно, что M1- и L-ПК проявляли практически одинаковое снижение активности в присутствии хризина, морина и кверцетина. Ингибирование R-ПК наблюдалось только в присутствии морина (10⁻⁷ моль/л) и кверцетина (10⁻⁸ моль/л), что связано, вероятно, с чрезвычайной важностью гликолитического пути для энергообеспечения эритроцитов, не способных ввиду отсутствия у них митохондрий к получению энергии путем окислительного фосфорилирования.

Примечательно, что в присутствии 5 ммоль/л аланина наблюдалось снижение ингибиторного эффекта флавоноидов, подобно тому, как это было показано для совместного действия фенилаланина и аланина (рис. 2).

В ходе проведенной работы установлена способность ряда флавоноидов (кверцетин, морин, хризин, гесперидин) и куркумина регулировать протекание гликолитического пути путем ингибирования пируваткиназной реакции.

Авторы выражают глубокую благодарность кандидату биологических наук, ведущему научному сотруднику НИЛ биохимии обмена веществ М.В. Шолуху за предоставленные реактивы.

1. Моисеева М. В. // Успехи биологической химии. 1974. Т. 17. С. 127.
2. Zanella A., Bianchi P., Fermo E. // Hepatol. J. 2007. Vol. 92. № 6. P. 721.
3. Cottam G.L., Hollenberg P.F., Coon M.J. // J. Biol. Chem. 1969. Vol. 244. № 6. P. 1481.
4. Friesen R.H., Castellani R.J., Lee J.C. // J. Biochem. 1998. Vol. 37. № 44. P. 15266.
5. Zanella A., Fermo E., Bianchi P. // Blood Rev. 2007. Vol. 21. P. 217.

6. Raphael M.F., Van Wijk R., Schweizer J.J. // Am. J. Hematol. 2007. Vol. 82. P. 1025.
7. Запрометов М.Н. Основы биохимии фенольных соединений. М., 1974.
8. Vauzour D., Vafeiadou K., Rodriguez-Mateos A. // Genes Nutr. 2008. № 4. P. 369.
9. Phan T.-T. // J. Trauma. 2001. № 12. P. 445.
10. Кауне F.J. // The Enzymes. 1973. Vol. 8. P. 353.
11. Практикум по биохимии / Под ред. С.Е. Северина, Г.А. Соловьевой. М., 1989.

Поступила в редакцию 10.01.11.

Оксана Игоревна Губич – кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии.

Мария Викторовна Плевако – студентка 5-го курса биологического факультета.