

# ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ РОБОТИ

УДК 577.112.3:612.39

## ВПЛИВ ФОРМІАТУ НА ВМІСТ ВІЛЬНИХ АМІНОКИСЛОТ У ТКАНИНАХ ТА ОРГАНАХ ЩУРІВ IN VITRO ТА IN VIVO

М. Ф. ГУЛИЙ, Н. В. СІЛОНОВА, Т. М. ПЕЧЕНОВА, Н. Ф. ШЕВЦОВА, Л. П. КЛИМЕНКО

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;  
e-mail: sylonova@biochem.kiev.ua

*В опытах in vitro и in vivo изучали влияние формиата на содержание свободных аминокислот в различных тканях и органах крыс. Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют о возможности протекания процесса формилирования аминокислот во всех исследованных тканях животных. Формилирование, возможно, является ферментативным, а его эффективность зависит от концентрации свободных аминокислот и формиата. Наиболее эффективно процесс формилирования происходит в органах с повышенной метаболической активностью.*

*К л ю ч е в ы е с л о в а:* формиат, свободные аминокислоты, формилирование, метаболизм.

В останні десятиріччя відбувається переоцінка наукових уявлень щодо біологічної ролі нормальних, високоефективних, низькомолекулярних метаболітів, які виявляють високу багатовекторну біологічну активність. В першу чергу це стосується формиату, що є одним із найсильніших природних біологічних відновників який бере участь у різних процесах обміну речовин [1]. Він містить у своїй структурі карбоксильну та альдегідну групу, і саме завдяки такому поєднанню властивостей забезпечується широкий спектр його дії: синтез аміно- та кетокислот [2], пуринових і піримідинових основ [3], ліпідів [4], ініціація білкового синтезу [5] тощо. У кількості 2 мг на 100 г маси тіла формиат значно збільшує включення мічених амінокислот у білки та <sup>14</sup>C-ацетату – в ліпіди [6].

Метою роботи було вивчення впливу формиату на вміст вільних амінокислот у тканинах та органах щурів in vitro та in vivo.

### Матеріали і методи

Для дослідів використовували статевозрілих щурів-самців з масою тіла 200–230 г. Процеси формілювання амінокислот in vitro досліджували на гомогенатах скелетних м'язів, серця, нирок, гонад, мозку, печінки, легенів та селезінки. Готували гомогенати на 0,1 М фосфатному буфері (рН 7,4) у співвідношенні 1 : 3. Інкубаційна суміш містила 1 мл того самого буфера та 1 мл гомогенату. В окремі проби додавали 2 мг амінокислоти (валіну) та 2 мг формиату натрію. Інкубація тривала протягом 30 хв при 37 °С. Білки осаджували рівним об'ємом 3%-ї сульфосаліцило-

вої кислоти. У безбілковому фільтраті визначали вміст амінокислот і формиату.

Частину фільтрату гідролізували при 105 °С в 2 н. НСІ протягом 45 хв. Умови гідролізу було підібрано в попередніх дослідах зі спеціально синтезованими формілгліцином, формілметіоніном та формілтирозином, за яких відбувається розщеплення форміламінокислоти [7]. Сумарний вміст амінокислот визначали нінгідриновим методом [8], вільні індивідуальні амінокислоти – методом рідинної хроматографії на амінокислотному аналізаторі Т-339, вміст формиату – за допомогою формиатдегідрогенази [9].

Досліди in vivo проводили на щурах з масою тіла 200–230 г. Контролем були інтактні тварини. Дослідним щурам у черевну порожнину вводили формиат натрію в дозі 10 мг/100 г маси тіла. Через 60 хв тварин декапітували під ефірним наркозом. Тканини (скелетні м'язи, серце, нирки, гонади, селезінка, мозок, печінка, легені) гомогенізували у 0,1 М фосфатному буфері (рН 7,4). Через 30 хв після екстракції білки осаджували рівним об'ємом 3%-ї сульфосаліцилової кислоти. У безбілковому фільтраті та у фільтраті після гідролізу (105 °С, 2 н. НСІ, 45 хв) визначали загальний вміст вільних амінокислот, а також рівень індивідуальних вільних амінокислот та формиату. Результати статистично обробляли і оцінювали за допомогою *t*-критерію Стьюдента [10].

### Результати та обговорення

В дослідах, проведених in vitro, визначали вплив формиату на загальний вміст вільних амі-

нокислот. За інкубації гомогенату з форміатом виявлено зниження кількості амінокислот в безбілкових фільтратах в усіх досліджуваних пробах — у м'язах, серці, нирках, гонадах, мозку, печінці, легенях, селезінці на 20, 11, 10, 34, 13, 21, 15, 15% відповідно (дані в таблицях не наведено). Аналогічні результати було одержано і щодо вмісту в них більшості індивідуальних амінокислот.

Приріст вмісту вільних амінокислот у безбілковому фільтраті після гідролізу і за інкубації гомогенату з форміатом та без нього і становить, відповідно, 44 та 24% для м'язів, 33 та 14% для легень (дані в таблиці не наведено). Подібні результати було одержано і для гонад (52 та 38%), мозку (47 та 38%) та печінки (35 та 26%). Це дозволяє нам припустити, що інкубація з форміатом призводить до утворення формільованих амінокислот, які, як і вільні амінокислоти, не визначаються, але розщеплюються у процесі гідролізу. Процес формільовання напевне має ензиматичний характер, оскільки витримування амінокислот з форміатом у вищезгаданих умовах, але без гомогенатів, не спричинює зміни у концентрації амінокислот.

Про можливість утворення форміламінокислот у наших дослідах *in vitro* свідчать і результати визначення змін вмісту форміату як до, так і після гідролізу (табл. 1). В усіх досліджуваних тканинах після гідролізу кількість форміату зростає. Внаслідок додавання форміату до гомогенатів різних тканин спостерігається підвищення його рівня в безбілковому фільтраті після гідролізу від 13 до 25%. За сумісного внесення до інкубаційного середовища форміату з валіном рівень форміату у пробі як до гідролізу, так і після нього нижчий відносно цього показника в разі внесення лише форміату, що свідчить про можливе зв'язування його з амінокислотою і утворенням форміламінокислоти. Збільшення кількості форміату після гідролізу підтверджує наше припущення про розщеплення раніше утворених форміламінокислот. Той факт, що після гідролізу спостерігається приріст форміату в гомогенатах переважної більшості досліджуваних тканин може означати, що в організмі відбувається формільовання, рівень якого дуже низький (не перевищує 6%). Подібні результати було одержано за використання в експериментах лейцину, гліцину, серину, аланіну та треоніну (дані в таблиці не наведено).

В попередніх дослідах було з'ясовано, що за фізіологічних величин рН створюються оптимальні умови для взаємодії форміату з вільними амінокислотами.

При вивченні впливу тривалості інкубації на інтенсивність утворення формільованих амі-

нокислот встановлено, що додавання до гомогенату форміату супроводжується зменшенням його вмісту на 17% за 15 хв (табл. 2). За присутності аланіну зниження його рівня досягало майже 30% ( $p \leq 0,001$ ). Після 15-хвилинної інкубації рівень форміату починає підвищуватися, можливо, внаслідок розщеплення, і через 30 хв повертається до вихідних величин.

Одержані дані дозволяють вважати, що під час інкубації гомогенатів із форміатом можуть відбуватись одночасно, але з різною інтенсивністю два процеси: зв'язування вільних амінокислот із форміатом і утворення формільованих похідних та вивільнення амінокислот унаслідок розщеплення утворених комплексів.

Результати, одержані в дослідах *in vivo* (табл. 3), свідчать про вірогідне зниження під впливом форміату вмісту вільних амінокислот у скелетних м'язах, нирках, гонадах та печінці, а також про тенденцію до його зниження в серці, селезінці та легенях. Після гідролізу безбілкових фільтратів з метою розщеплення форміат-амінокислотних комплексів, вміст вільних амінокислот зростає як у контрольних, так і в дослідних пробах скелетних м'язів, серця, селезінки, мозку, печінки та легень. При цьому *in vivo* зберігається вірогідне зниження вмісту вільних амінокислот у дослідних пробах порівняно з інтактними щурами в скелетних м'язах, нирках, гонадах, селезінці, печінці.

Ці результати підтверджують можливість того, що введення форміату призводить до утворення формільованих амінокислот у тканинах організму, та їхнє розщеплення.

За визначення вмісту форміату (табл. 4) в пробах різних органів контрольних тварин та в разі введення щурам форміату і після гідролізу безбілкових фільтратів з'ясовано, що в різних тканинах в інтактних щурів після гідролізу спостерігається зростання (до 30%) вмісту форміату, яке найбільш виражене в печінці та нирках. При введенні щурам форміату збільшення його кількості після гідролізу в різних тканинах було вищим, а у гонадах та мозку рівень його підвищувався до 42%. Порівняно з експериментами *in vitro* в дослідах *in vivo* одержані нами зміни більш виражені, і ця різниця може бути обумовлена тим, що ензиматичні системи поза клітиною функціонують без природного мікрооточення.

Результати визначення вмісту сумарних вільних амінокислот і форміату в печінці та гонадах щурів за введення тваринам *in vivo* форміату в різних дозах свідчать, що у печінці та гонадах найбільше зниження сумарних амінокислот спостерігається в разі введення 5 мг форміату. Після гідролізу безбілкового фільтрату найбільший

Таблиця 1. Вміст формиату (мкмоль/г тканини) в безбілковому фільтраті скелетних м'язів і тканин різних органів щурів ( $M \pm m$ ,  $n = 5$ )

Об'єкт дослідження	Умови досліджу	Гомогенат	Гомогенат + формиат	Гомогенат + формиат + валін
Скелетні м'язи	До гідролізу	0,255 ± 0,071	6,446 ± 0,342	5,502 ± 0,144
	Після гідролізу	0,273 ± 0,087	8,073 ± 0,348*	6,796 ± 0,297*
Серце	До гідролізу	0,579 ± 0,112	5,405 ± 0,340	4,842 ± 0,223
	Після гідролізу	0,540 ± 0,096	6,132 ± 0,266	5,669 ± 0,533
Нирки	До гідролізу	0,434 ± 0,069	5,811 ± 0,289	4,254 ± 0,261
	Після гідролізу	0,466 ± 0,094	6,995 ± 0,341*	4,866 ± 0,285
Сім'яники	До гідролізу	0,289 ± 0,053	5,970 ± 0,149	5,645 ± 0,436
	Після гідролізу	0,302 ± 0,049	7,006 ± 0,400	6,895 ± 0,198*
Селезінка	До гідролізу	0,390 ± 0,062	6,086 ± 0,245	5,535 ± 0,359
	Після гідролізу	0,370 ± 0,081	7,005 ± 0,381	6,271 ± 0,452
Мозок	До гідролізу	0,423 ± 0,054	6,934 ± 0,218	6,569 ± 0,224
	Після гідролізу	0,394 ± 0,037	8,197 ± 0,286*	7,840 ± 0,330*
Печінка	До гідролізу	0,376 ± 0,061	5,712 ± 0,388	4,871 ± 0,178
	Після гідролізу	0,399 ± 0,049	6,825 ± 0,384*	5,730 ± 0,218*
Легені	До гідролізу	0,266 ± 0,027	5,072 ± 0,404	4,850 ± 0,411
	Після гідролізу	0,278 ± 0,019	5,740 ± 0,361	5,364 ± 0,517

Тут і в табл. 2: \* дані вірогідні порівняно з пробами до гідролізу,  $p < 0,05$ .

Таблиця 2. Вплив тривалості інкубації на вміст форміату (мкмоль/г тканини) в гомогенатах печінки щурів ( $M \pm m, n = 7$ )

Час інкубації, хв	Гомогенат	Гомогенат + форміат	Гомогенат + форміат + аланін
5	0,653 ± 0,061	6,070 ± 0,333	5,523 ± 0,282
10	0,566 ± 0,063	6,045 ± 0,239	4,896 ± 0,248
15	0,563 ± 0,047	5,047 ± 0,289	3,886 ± 0,148*
20	0,548 ± 0,038	5,894 ± 0,329	5,726 ± 0,289
30	0,546 ± 0,046	5,889 ± 0,298	5,746 ± 0,306

\* Різниця по відношенню до проби з форміатом вірогідна,  $p < 0,05$ .

Таблиця 3. Вміст вільних амінокислот (мг/г сирової тканини) в скелетних м'язах і різних органах щурів за введення форміату щурам *in vivo* ( $n = 5; M \pm m$ )

Тканини/органи	Контроль		Форміат (10 мг/100 г маси тіла)	
	До гідролізу	Після гідролізу	До гідролізу	Після гідролізу
Скелетні м'язи	2,20 ± 0,18	2,80 ± 0,20**	1,14 ± 0,06*	1,43 ± 0,10**
Серце	2,54 ± 0,05	3,36 ± 0,11**	2,39 ± 0,08	2,94 ± 0,12**
Нирки	2,27 ± 0,14	2,71 ± 0,15**	1,62 ± 0,05*	2,16 ± 0,30
Гонади	1,60 ± 0,19	1,86 ± 0,10	0,72 ± 0,12*	0,96 ± 0,11
Селезінка	2,16 ± 0,08	3,26 ± 0,27**	1,71 ± 0,23	2,15 ± 0,20
Мозок	1,61 ± 0,27	2,19 ± 0,12	1,76 ± 0,05	2,30 ± 0,21**
Печінка	1,84 ± 0,05	2,54 ± 0,10**	1,24 ± 0,08*	1,66 ± 0,09**
Легені	1,18 ± 0,13	1,45 ± 0,10	1,18 ± 0,11	1,71 ± 0,20**

Тут і в табл. 4–6: \* різниця стосовно контролю вірогідна,  $p < 0,05$ ; \*\*різниця відносно проби до гідролізу вірогідна,  $p < 0,05$ .

приріст кількості амінокислот (табл. 5) спостерігається також у разі введення форміату у дозах 5 та 2 мг/100 мг маси тіла, які є оптимальними для печінки і гонад відповідно.

Вміст форміату в разі введення його в дозі 5 мг знижується на 13%, а 10 мг – на 11%, в той час як 2 мг форміату спричиняють підвищення його вмісту в печінці на 17% відносно контролю. Після гідролізу кількість форміату в контролі

(табл. 6) збільшується на 18 та 29%, у щурів дослідної групи рівень його також зростає на 6, 21 та 38% відповідно до контролю, причому збільшується із зростанням дози введенного форміату. Подібні результати було одержано під час вивчення впливу різних доз форміату на гонади. Одержані дані свідчать про більшу чутливість гонад до дії форміату.

Таким чином, результати проведених екс-

Таблиця 4. Вміст форміату (мкмоль/г тканини, 60 хв) в скелетних м'язах і різних органах у разі його введення щурам *in vivo* ( $M \pm m, n = 5$ )

Об'єкт дослідження	Контроль		Форміат (10 мг/100 г маси тіла)	
	До гідролізу	Після гідролізу	До гідролізу	Після гідролізу
Скелетні м'язи	0,396 ± 0,019	0,459 ± 0,006**	0,471 ± 0,040	0,473 ± 0,029
Серце	0,350 ± 0,065	0,404 ± 0,054	0,403 ± 0,021	0,465 ± 0,030
Нирки	0,358 ± 0,045	0,463 ± 0,061	0,419 ± 0,040	0,429 ± 0,022
Гонади	0,411 ± 0,049	0,455 ± 0,034	0,394 ± 0,040	0,558 ± 0,036**
Селезінка	0,379 ± 0,069	0,465 ± 0,042	0,392 ± 0,026	0,538 ± 0,059**
Мозок	0,393 ± 0,040	0,443 ± 0,041	0,319 ± 0,026	0,455 ± 0,041**
Печінка	0,385 ± 0,035	0,498 ± 0,044**	0,343 ± 0,017	0,476 ± 0,036**
Легені	0,472 ± 0,076	0,502 ± 0,027	0,393 ± 0,039	0,478 ± 0,063**

Таблиця 5. Вміст вільних амінокислот (мг/г сирової тканини) в печінці та гонадах за введення формиату щуром *in vivo* в різних дозах ( $M \pm m$ ,  $n = 5$ )

Дози формиату, мг/100 г маси тіла	До гідролізу		Після гідролізу	
	Контроль	Дослід	Контроль	Дослід
<i>Печінка</i>				
2	1,38 ± 0,03	1,29 ± 0,03	1,69 ± 0,05**	1,66 ± 0,11**
5	1,84 ± 0,05	1,09 ± 0,08*	2,54 ± 0,16**	1,64 ± 0,06**
10	1,84 ± 0,05	1,24 ± 0,08*	2,54 ± 0,16**	1,66 ± 0,09**
<i>Гонади</i>				
2	1,29 ± 0,04	1,05 ± 0,03	1,44 ± 1,10	1,43 ± 0,05**
5	1,60 ± 0,19	0,74 ± 0,05*	1,86 ± 1,10	1,00 ± 0,04**
10	1,60 ± 0,19	0,72 ± 0,12*	1,86 ± 1,10	0,96 ± 0,11

Таблиця 6. Вміст формиату (мкмоль/г сирової тканини) в печінці та гонадах за введення його щуром *in vivo* в різних дозах ( $M \pm m$ ,  $n = 5$ )

Дози формиату, мг/100 г маси тіла	До гідролізу		Після гідролізу	
	Контроль	Дослід	Контроль	Дослід
<i>Печінка</i>				
2	0,427 ± 0,028	0,501 ± 0,027	0,507 ± 0,059	0,535 ± 0,038
5	0,385 ± 0,035	0,296 ± 0,021*	0,498 ± 0,044**	0,358 ± 0,022**
10	0,385 ± 0,035	0,343 ± 0,017*	0,498 ± 0,044**	0,476 ± 0,036**
<i>Гонади</i>				
2	0,591 ± 0,069	0,560 ± 0,037	0,608 ± 0,062	0,695 ± 0,039**
5	0,411 ± 0,049	0,292 ± 0,011*	0,455 ± 0,034	0,389 ± 0,032**
10	0,411 ± 0,049	0,394 ± 0,040*	0,455 ± 0,034	0,558 ± 0,036

периментів *in vitro* дозволяють дійти висновку про можливість перебігу процесів формилювання амінокислот у всіх досліджуваних тканинах тварин. Процес є, напевне, ферментативним і оборотним, а його ефективність залежить від присутності формиату. Найефективніше процеси формилювання відбуваються в органах із підвищеною метаболічною активністю.

В дослідях *in vivo* введення щуром формиату призводить до зниження суми вільних амінокислот і вмісту індивідуальних амінокислот та формиату у більшості органів за рахунок формилювання. Різні тканини характеризуються своїм спектром амінокислот, що змінюються під впливом формиату. Найчутливішими до дії формиату *in vivo* є печінка, гонади та нирки, тобто органи з дуже інтенсивним обміном речовин.

#### INFLUENCE OF FORMIATE ON FREE AMINO ACIDS CONTENTS IN TISSUES AND ORGANS OF RATS IN VITRO AND IN VIVO

M. F. Guly, N. V. Silonova, T. M. Pechenova, N. F. Shevtzova, L. P. Klimenko

Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;  
e-mail: sylonova@biochem.kiev.ua

#### S u m m a r y

In experiments *in vitro* and *in vivo* influence of formiate on free amino acids contents of tissues and organs of rats has been studied

Results of experiments showed a possibility of amino acids formilation in all investigated tissues.

This process could be enzymatic. Its effectiveness depended on amino acids and formiate concentrations. The most effective processes took place in organs with high metabolic activity.

**К e y w o r d s:** formiate, amino acids, formilation, metabolism.

1. Гулий М. Ф. О некоторых проблемах биохимии. К.: Наук. думка. 1997. 171 с.
2. Гулий М. Ф., Сілонова Н. В., Печенова Т. М., та ін. // Укр. біохім журн. 2000. **72**, № 6. С. 27–30.
3. Гулий М. Ф., Сілонова Н. В., Мельничук Д. А. // Укр. біохим. журн. 1982. **54**, № 2. С. 163–166.
4. Sato T., Motokawa Y., Kochi Y. // Biophys. Res. Communs. 1976. **28**, № 4. P. 495–501.
5. Barker D. P., Ebel J. P., Bruton C. H. // Eur. J. Biochem. 1982. **127**, N 3. P. 449–457.
6. Сілонова Н. В., Мельничук Д. А., Гулий М. Ф. // Докл. АН УССР. Сер. Б. 1979. № 9. С. 92–96.
7. Дринштейн Дж., Виниц М. Химия аминокислот и пептидов. М.: Мир. 1965. 822 с.
8. Lee J. P., Takahashi T. // Anal. Biochem. 1966. **14**, N 1. P. 71–77.
9. Freibig G., Schaller K. H. // Clin. Chim. Acta. 1980. **108**, N 3. P. 355–360.
10. Кокунін В. А. // Укр. біохім. журн. 1975. **47**, № 6. С. 776–790.

Отримано 15.12.2004