

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені І. І. МЕЧНИКОВА

На правах рукопису

АНИСІМОВ ВОЛОДИМИР ЮРІЙОВИЧ

УДК 577.122.5:182:152.3

ЕНЕРГЕТИЧНІ МЕХАНІЗМИ ВЗАЄМОДІЇ ВІТАМІНІВ ГРУПИ «В» ЯК
ФАКТОРА РЕАЛІЗАЦІЇ ЇХ ФУНКЦІЙ

03.00.04 – Біохімія

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Науковий керівник:
Карпов Леонід Михайлович,
доктор біологічних наук, професор

Одеса – 2010

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	5
ВСТУП	6
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	10
1.1. Взаємовідносини функціонально пов'язаних вітамінів групи В в організмі тварин	10
1.1.1. Основні біохімічні функції вітамінів В ₁ , В ₂ , В ₃ , В ₆ , РР і ліпоєвої кислоти	10
1.1.2. Типи міжвітамінних взаємовідносин та їх механізми	16
1.1.3. Взаємодія вітамінів групи В у процесах депонування та обміну	17
1.1.4. Взаємодія деяких вітамінів групи В у реалізації їх біологічних та лікувальних функцій в організмі	19
1.2. Основні ензиматичні функції функціонально пов'язаних вітамінів	22
1.2.1. Будова, функції та регуляція активності піруватдегідрогеназного комплексу	22
1.3. Будова та функції Na⁺, K⁺-АТФази	25
1.3.1. Структура фермента	25
1.3.2. Регуляція активності фермента	27
1.3.3. Вплив біологічно активних речовин на активність Na ⁺ , K ⁺ -АТФази	28
1.3.4. Основні функції Na ⁺ , K ⁺ -АТФази	29
2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	31
2.1. Матеріали дослідження	31
2.2. Методи дослідження	32
2.2.1. Визначення концентрації вітамінів у тканинах тварин	32
2.2.2. Визначення активності піруватдегідрогеназного комплексу	37
2.2.3. Вимірювання концентрації макроергічних фосфатів в органах тварин	37
2.2.4. Дослідження Na ⁺ , K ⁺ -АТФази	39
2.3. Методи статистичної обробки отриманих даних	41

3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ І ОБГОВОРЕННЯ	42
3.1. Взаємодія деяких вітамінів групи В у біосинтезі їх коферментних форм в органах тварин	42
3.1.1. Вплив вітамінів групи В на біосинтез нікотинамідних коферментів у тканинах	42
3.1.2. Взаємодія вітамінів В ₁ і В ₂ у біосинтезі їх коферментних форм	48
3.1.3. Біосинтез коферментних форм вітамінів В ₁ і В ₂ при введенні їх щурам у складі полівітамінних сумішей	52
3.2. Вплив ін'єкцій вітамінів групи В та їх сумішей на активність піруватдегідрогеназного комплексу в органах щурів	56
3.2.1. Динаміка дії препаратів	56
3.2.2. Вікові особливості дії ін'єкцій вітамінної суміші	60
3.3. Рівень макроергічних фосфатів в органах щурів після введення вітамінних препаратів	62
3.3.1. Динаміка вмісту макроергічних фосфатів в органах щурів після введення їм вітамінних сумішей	62
3.3.2. Вплив пригнічення біосинтезу білка в організмі щурів на ефективність дії вітамінної суміші на рівень макроергічних фосфатів в їх органах	72
3.3.3. Дія вітамінної суміші на рівень загальних макроергічних фосфатів в умовах ішемії мозку	75
3.4. Зв'язок між Na⁺, K⁺-АТФазною активністю і вітамінами групи В	76
3.4.1. Порівняльна динаміка загальної АТФазної активності в органах щурів після різних способів введення їм вітамінної суміші	76
3.4.2. Вплив суміші вітамінів групи В на активність Na ⁺ , K ⁺ -АТФази в органах щурів в умовах інгібування біосинтезу білку	79
3.4.3. Активність Na ⁺ , K ⁺ -АТФази в органах щурів за ішемії і її корекції вітамінвміщуючими сумішами	81
3.4.4. Вплив введення щурам суміші вітамінів групи В на активність Na ⁺ , K ⁺ -АТФази, виділеної із їх тканин	83

	4
4. АНАЛІЗ ДАНИХ ТА ЇХ УЗАГАЛЬНЕННЯ	89
ВИСНОВКИ	102
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ЛІТЕРАТУРИ	104

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АЛТ – аланінамінотрансфераза

АМ – актиномицин

АСТ – аспартатамінотрансфераза

ВС – вітамінна суміш

ЗМФ – загальні макроергічні фосфати

ЛК – ліпоєва кислота

МНФ – макроергічні нуклеотидні фосфати

НА – нікотинамід

НАД(Ф) – нікотинамідаденіндинуклеотид (фосфат) окиснений

НАД(Ф)Н – нікотинамідаденіндинуклеотид (фосфат) відновлений

ПАЛФ – піридоксаль-5-фосфат

ПГ – пантогам

ПДК – піруватдегідрогеназний комплекс

ПМ – пікамілон

СоА – кофермент ацилювання

ТДФ – тіаміндифосфат

ФАД – рибофлавінаденіндинуклеотид

ФЕТ – фосфорні ефіри тіаміну

ФМН – рибофлавінмононуклеотид

ФПК – 4-фосфопантетеїн

ФР – фізіологічний розчин

ХА – хлорамфенікол

ВСТУП

Актуальність теми. Надходження кожного із вітамінів в організм людини чи тварини і реалізація їх біохімічних функцій забезпечується багатьма різноманітними механізмами, кожний з яких має власні системи регуляції і контролю. Найголовніші з них – транспорт через мембрани і депонування в організмі, біосинтез коферментних форм і відповідних білків – апоферментів, участь в процесах біокаталізу та деякі інші. На всіх цих етапах реалізації функцій, певну роль (більшу чи меншу, в залежності від обставин) відіграє взаємодія вітамінів. Ця взаємодія відбувається і тоді, коли якийсь із вітамінів потрапляє в організм індивідуально: в цьому випадку даний вітамін взаємодіє з тими, що вже є в організмі. Вивчення ролі взаємовідносин вітамінів за реалізації їх функцій становить значний інтерес – як теоретичний, так і практичний. Теоретичний полягає в тому, що більшість із сполук цієї групи в організмі проходять певний, іноді дуже значний, шлях енергозалежних перетворень, щоб уже у вигляді коферментів увійти до складу ферментів або навіть їх сумішей, наприклад дегідрогеназ 2-оксокислот. На цьому шляху характер взаємовідносин може суттєво змінюватись в залежності від багатьох обставин (хімічна будова окремих вітамінів, співвідношення їх концентрацій, загальний стан клітин організму тощо) – від синергізму до конкуренції і навіть антагонізму [1]. Відомо також, що вітаміни групи В відіграють важливу роль в регуляції мітохондріальних ферментів. Ці вітаміни через їх активні метаболіти чинять безпосередній вплив на мітохондріальні аеробні процеси та виробництво енергії [2]. Проте і до теперішнього часу конкретні механізми реалізації сумісного впливу вітамінів даної групи на енергопродукуючі процеси у більшості випадків залишаються не повністю з'ясованими. Це питання є актуальним, бо порушення механізмів внутріклітинного метаболізму одного з вітамінів призводить до порушень функцій і обміну інших вітамінів та їх функціонального взаємозв'язку, а також порушенню загального балансу внутріклітинного обміну. Очевидно й практичне значення результатів таких досліджень: без відповідних теоретичних розробок

неможливе створення оптимального складу полівітамінних препаратів і їх раціональне використання [3].

Таким чином, вивчення регуляторних та енергетичних механізмів взаємодії вітамінів на різних етапах їх перетворень в організмі є актуальним як з точки зору теоретичної біохімії, так і практичної вітамінології.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу провадили згідно з планом держбюджетних тем кафедри: «Дослідження механізмів обміну нікотинамідних коферментів за різних станів організму» (0103U003801) та «Особливості дії факторів різної природи на фізіолого-біохімічні системи організму за різних станів» (0106U001680). Здобувач був співвиконавцем цих тем.

Мета і задачі дослідження. Метою роботи було: встановити значення взаємодії деяких вітамінів групи В у реалізації їх функцій та зв'язок цих взаємодій з енергетичними процесами.

Для реалізації цієї мети вирішували наступні завдання:

1. Вивчити взаємний вплив вітамінів В₁, В₂ і РР (нікотинамїду) на утворення коферментних форм кожного з них і ефективність окремих біокаталітичних процесів у клітині.
2. Дослідити особливості і динаміку взаємодій вітамінів групи В при реалізації їх коферментних функцій на прикладі піруватдегідрогеназного комплексу в органах тварин різного віку.
3. Вивчити окремий і сумісний вплив вітамінів групи В на рівень макроергічних сполук в органах тварин.
4. Визначити закономірності сумісного впливу різних співвідношень вітамінів на активність Na⁺, K⁺-АТФази органів тварин.
5. Вивчити вплив вітамінів на вміст макроергічних фосфатів і активність Na⁺, K⁺-АТФази в залежності від стану білоксинтезуючої системи.
6. Дослідити вплив вітамінів групи В на вміст макроергічних фосфатів і активність Na⁺, K⁺-АТФази за ішемії головного мозку.

7. Виділити препарати Na^+ , K^+ -АТФази з деяких тканин щурів, яким попередньо вводили суміш вітамінів, і визначити її вплив на активність цього ферменту.

Об'єкт дослідження. Механізми взаємодії вітамінів групи В в організмі тварин.

Предмет дослідження. Сумісні ефекти вітамінів групи В на енергетичні, транспортні, каталітичні та інші біохімічні процеси у щурів і мишей.

Методи дослідження. Біохімічні (визначення вмісту коферментних форм вітамінів B_1 , B_2 і РР, макроергічних фосфатів та активності піруватдегідрогеназного комплексу і Na^+ , K^+ -АТФази), статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше безпосередньо у кількісній формі показана роль і особливості взаємодії вітамінів групи В в утворенні їх коферментних форм, залежність від них біосинтезу і балансу макроергічних фосфатів, а також вплив інтенсивності білкового синтезу на ефективність реалізації їх функцій.

Вперше встановлено, що характер взаємовідносин між цими вітамінами, який суттєво залежить від їх концентрацій, співвідношення між ними та інших умов, має визначальне значення для всіх досліджених етапів на шляху до реалізації їх специфічної активності.

Показано, що встановлюване організмом певне співвідношення між вітамінами групи В не лише кінцева мета для економізації процесів біосинтезу їх коферментних форм, а також і інструмент оптимізації енергетики організму.

Доказано, що досліджені вітаміни можуть не лише регулювати активність Na^+ , K^+ -АТФази, але і залежати від неї у процесах біосинтезу відповідних коферментів.

Кількісно показано, що енергетичні фактори можуть виступати у ролі лімітуючих у встановленні ефективних концентрацій вітамінів і співвідношень між ними в організмі, особливо у формі коферментів.

Показано, що існують механізми саморегуляції в досягненні оптимального стану в системі вітаміни – коферменти – енергетика (синтез і використання

макроергичних сполук), причому регуляторними властивостями володіють і самі вітаміни в залежності від концентрацій і співвідношень.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані дані свідчать, що існують умови, за яких можливе досягнення максимальної ефективності при сумісному введенні декількох вітамінів, а також показано, як уникнути небажаних наслідків їх взаємовідносин і які при цьому задіяні механізми. Розроблені принципи створення оптимального складу полівітамінних препаратів і їх раціонального використання за різних станів організму.

Особистий внесок здобувача. Здобувач самостійно здійснив аналіз літератури, провів усі експериментальні дослідження та статистичну обробку отриманих даних. Аналіз результатів та висновки роботи зроблені разом з науковим керівником.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертації апробовані на міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених «Вчені майбутнього» у м. Одесі (2007), II з'їзді фізіологів СНД у м. Кишинів (2008), на XII конференції молодих вчених та студентів-хіміків південного регіону України у м. Одесі (2009), на науковій конференції професорсько-викладацького складу та наукових співробітників Одеського національного університету імені І. І. Мечникова (2008 і 2009 роки).

Публікації. Основні положення дисертаційної роботи висвітлені в 11 статтях, опублікованих у фахових виданнях, та 3 тезах доповідей.

РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Взаємовідносини функціонально пов'язаних вітамінів групи В в організмі тварин

Обмін речовин в організмі людини і тварин являє собою нерозривний ланцюг взаємозалежних реакцій перетворення життєво необхідних сполук: головним чином білків, вуглеводів і жирів. Процеси обміну речовин знаходяться під контролем складного метаболічного механізму, у дії якого важливу роль відіграють вітаміни, зокрема, вітаміни В₁, В₂, В₃, РР, В₆ і ліпоєва кислота. Участь цих вітамінів у метаболізмі пов'язана, насамперед, з їх коферментною функцією. У той же час значним фактором збереження гомеостазу є і некоферментний вплив цих вітамінів на стан життєво важливих систем організму.

Характер міжвітамінних взаємин визначається біологічною активністю окремих вітамінів. Тому при оцінці змін фізіологічного стану організму людини і тварин після введення окремих вітамінів або їхніх сумішей, необхідно враховувати метаболічну дію кожного з вітамінів [4, 5].

1.1.1. Основні біохімічні функції вітамінів В₁, В₂, В₃, В₆, РР і ліпоєвої кислоти

Біологічна активність вітаміну В₁ (тіаміну) пов'язана з його участю в процесах метаболізму головним чином вуглеводів, а також проявом некоферментної активності. Відомо близько 25 реакцій, що протікають за участі фосфорильованої форми вітаміну – ТДФ.

ТДФ є кофактором таких найважливіших ферментів енергетичного метаболізму, як піруватдегідрогеназа та α -кетоглутаратдегідрогеназа. Під дією піруватдегідрогенази відбувається окисне декарбоксілювання пірувату, який

утворюється з глюкози в циклі Ембдена-Меєрхофа. ТДФ також є кофактором транскетолази, ключового ферменту пентозофосфатного циклу [6].

ТДФ є учасником процесів синтезу азотистих основ нуклеїнових кислот, каталізуючи декарбоксілювання гліоксилової кислоти [7, 8].

Крім ТДФ у тканинах організму завжди присутні некоферментні похідні тіаміну. Частки тіаміну та його фосфорних ефірів звичайно наступні: тіамін – 10 – 12, ТМФ – 10 – 15, ТДФ – 70 – 75, ТТФ – 2 – 3% [9]. У тканинах тварин і людини крім фосфатів тіаміну постійно присутні тіаміндисульфід і тіохром [10].

Тіамін та його похідні мають важливе значення для нормального функціонування нервової системи [1, 11, 12, 13, 14]. Біологічна активність тіаміну виявлена при вивченні його впливу на серцево-судинну, ендокринну системи, функцію печінки, щитовидної та надниркової залоз [6, 15, 16, 17, 18].

Останнім часом поряд із з'ясуванням механізмів основних реакцій, у яких каталітичну роль відіграє ТДФ, почали накопичуватися дані про високу біологічну активність некоферментних метаболітів тіаміну. Нещодавно показано, що тіольна форма тіаміну вивільняє зі складу S-нітрозоглутатіону оксид азоту, що викликає релаксацію судин [19].

Тіамін зменшує ушкодження нейронів при окисному стресі [20]. Крім того, тіамін (особливо бенфотіамін) запобігає ушкодженню судин при цукровому діабеті, попереджає розвиток нефропатій, знижує рівень токсичних продуктів неензиматичного глікозилювання білків [21].

Захисні властивості тіаміну не можна пояснити тільки його коферментними властивостями, впливом на метаболізм α -кетокислот, карбонільних сполук. Дійсно, тіамін, його фосфорні ефіри інгібують утворення кінцевих продуктів глікозилювання білків також у дослідах *in vitro*. У цьому випадку інгібування неензиматичного глікозилювання білків тіаміном відбувається під час відсутності ферментів [22].

Одним з можливих механізмів захисної дії тіаміну є його взаємодія з пероксинітридом. Пероксинітрид дуже ефективно нітрує залишки тирозину в різних ферментах і в такий спосіб інактивує їх. Тіамін взаємодіє з

пероксинітритом та руйнує його, що приводить до інгібування реакції нітрування тирозильних залишків білків [22, 23].

Також було показано, що оксоферильні форми гемоглобіну і тирозильні радикали окиснюють тіамін, а також його фосфорні ефіри з утворенням тіохрому, оксодигідротіохрому і тіаміндисульфиду та їхніх фосфорних ефірів [24]. У такий спосіб можна припустити, що при окисному стресі зменшується вміст тіаміну внаслідок трансформації його в неактивні сполуки.

Важливою ланкою обміну лабільного пула тіаміну та його фосфатів є тіамінзв'язуючий білок (ТЗБ), локалізований у плазматичній мембрані нервових клітин [25], а також тіамінкіназа, яка здійснює перше фосфорилування тіаміну з утворенням ТДФ.

Метаболічна роль вітаміну В₂ (рибофлавіну) реалізується участю його активних фосфорильованих форм – ФМН і ФАД – в окисно-відновних реакціях в організмі. ФМН і ФАД є коферментами флавінових ферментів, що відносяться до класу оксидоредуктаз, каталізуючих процеси біологічного окиснення. Рибофлавін, як і тіамін і нікотинова кислота, є частиною комплексної ферментативної системи, що здійснює окисне декарбоксилування 2-оксокислот [26, 27].

Добре відома і некоферментна роль рибофлавіну. Так введення його в організм тварин викликає зниження збудливості нервових центрів, незалежно від дози вітаміну [1]. Рибофлавін при внутрішньовенному введенні знижує артеріальний тиск, викликає урідження пульсу, збільшує добовий діурез [16].

Властивості вітаміну В₃ (пантотенової кислоти). Цей вітамін широко розповсюджений у біооб'єктах і переважно у формі СоА приймає участь у численних реакціях переносу ацилів, здійсненні ключових енергетичних циклів у мітохондріях. На відміну від ряду інших коферментів (наприклад рибофлавінових) каталітичні функції СоА-SH реалізуються вільною (непротейдизованою) формою коферменту, яка присутня у всіх біологічних об'єктах, наприклад, у тканинах ссавців у концентрації 20 – 140 нмоль/г вологої тканини. Сумарний вміст фракцій СоА, включаючи СоА-SH, ацетил-СоА, інші

ацил-СоА, дисульфідні похідні, складають величину, що перевищує зазначену в 2,5 – 3,0 рази. Інтенсивна біотрансформація пантотенової кислоти, етапи біосинтезу СоА й акумулювання незміненого вітаміну здійснюється в цитозолі клітин печінки [28].

Як відомо, зміна структури внутрішньоклітинного фонду СоА або, інакше кажучи, співвідношення детектованих фракцій СоА (СоА-SH/ацетил-СоА, ацил-СоА/загальний СоА та ін.) є важливим регуляторним фактором метаболізму вуглеводів і ліпідів. Наприклад піруватдегідрогеназа інгібується високим відношенням ацетил-СоА/СоА, тоді як піруваткарбоксилаза активується надлишком ацетил-СоА [29].

Крім того, пантотенова кислота входить до складу фосфопантотеїнпротеїнів, які беруть участь у деяких складних циклічних процесах біосинтезу жирних кислот, антибіотиків, каталізованих мультиферментними комплексами, зокрема синтетазою жирних кислот [30].

Біохімічна роль вітаміну РР (нікотинової кислоти та її амідну). Вітамін РР у вигляді НАД і НАДФ бере участь у процесах біологічної оксидоредукції у складі численних дегідрогеназ [31]. Нікотинамідні коферменти відіграють також важливу роль як алостеричні регулятори ферментів ключових шляхів метаболізму та факторів їхньої інтеграції завдяки здатності впливати на швидкість та спрямованість окисно-відновних процесів.

Вітамін РР та нікотинамідні динуклеотиди проявляють також некоферментні функції, які полягають у посттрансляційній модифікації білків (моно- та полі-АДФ-рибозилуванні), регуляції генетичної активності, кальцієвого гомеостазу та Ca^{2+} -сигналізації, а також у модуляції синаптичної передачі нервового імпульсу [32].

Введення вітаміну РР викликає зміну активності ряду ферментів, а також вмісту біологічно важливих сполук в організмі людини і тварин [33, 34].

Після введення нікотинової кислоти відзначається розширення капілярів і посилення кровотоку, частішання пульсу і подиху [34, 35]. Встановлено

позитивний ефект при застосуванні вітаміну РР на функціонування центральної нервової системи [10, 36].

Роль вітаміну В₆ (піридоксину). В організмі тварин і людини цей вітамін перетворюється в піридоксалеві коферменти, що реалізують основну його функцію в клітині [37, 38, 39, 40].

О. Є. Браунштейном зі співробітниками була виявлена ключова роль ПАЛФ в обміні амінокислот [41]. Пізніше було встановлено, що ПАЛФ є необхідним коферментом або простетичною групою ряду декарбоксилаз амінокислот, каталізуючих утворення амінів з амінокислот. Вітамін В₆ бере участь в обміні триптофану, у результаті якого утворюється нікотинова кислота. Виявлено участь ПАЛФ у процесі синтезу гема в еритроцитах на стадії конденсації гліцину і «активного сукцинату» [6, 42]. В останні роки активно вивчається роль ПАЛФ у дії фосфорилази [37, 43, 44]. Фосфорильовані похідні вітаміну В₆ беруть активну участь в обміні біологічно активних сполук у мозку людини і тварин [1, 45, 46].

Ліпоєва кислота (ЛК) являє собою внутрішньомолекулярний дисульфід. Ліпоаміддегідрогеназою мітохондрій вона легко і швидко відновлюється в 1,2-дигідроліпоєву кислоту (ДЛК) [47], утворюючи разом з нею тіолдисульфідну систему. Відновлення ЛК у ДЛК стимулюється в присутності НАДН, АТФ і пірувату [48]. ЛК існує у виді R- і S-енантіомерів (стереоізомерів), з яких R-ізомер біологічно більш активний [49] – ліпоаміддегідрогеназа відновлює R-енантіомер у 28 разів швидше, ніж S-ізомер [47]. Відновлення ЛК у ДЛК у тканинах і рідинах організму здійснюється звичайно разом з відновленням дегідроаскорбінової кислоти в аскорбінову [48]. Тіоредоксинредуктаза також ефективно відновлює ЛК і, трохи слабкіше, ліпоамід у НАДН-залежній реакції [50]. Ще одна біологічно важлива форма ЛК – ліпоамід, *in vitro* виступає у якості необхідного кофактора, простетичної групи (внаслідок тісного ковалентного зв'язку з редоксензимами в їхніх активних центрах) у складі поліферментних комплексів, що здійснюють декарбоксилювання α -кетокислот [51, 52] і розщеплення гліцину. ЛК та ліпоамід вступають у зв'язок (ліпоїлювання) з білками, взаємодіючи з залишками лізину

[51, 53]. ЛК у нормі *in vivo* взаємодіє з великою кількістю білків, здійснюючи їхню ковалентну модифікацію.

ЛК здійснює антиоксидантний захист від окисних стресів різної природи разом зі своєю відновленою, дитіольною формою ДЛК [54, 55]. Поряд із прямим антиоксидантним перехопленням активних форм кисню, ЛК і ДЛК здійснюють наступний непрямий антиоксидантний захист клітин і тканин:

1) шляхом залежного від концентрації хелатованих іонів металів з перемінною валентністю – Cu^{2+} , Fe^{2+} та ін. [55, 56, 57]; обидві форми, окиснена і відновлена, у цьому механізмі однаково ефективні. Попереднє перетворення ЛК у ДЛК не є необхідним, тому що ЛК – активний хелатор. R-енантіомер і рацемічна суміш ЛК більш ефективні, ніж S-енантіомер [57];

2) ЛК зберігає, заощаджує і підвищує активність інших біоантиоксидантів: G-SH [55, 58], аскорбінової кислоти [58, 59], убіхінону, відновлюючи його (двухелектронне відновлення), і убісеміхінону (одноелектронне відновлення) – в убіхінол [59]. Редокс-потенціал ДЛК/ЛК складає – 0,32 В, що дозволяє ЛК виступати в якості реактиватора G-SH з G-S-S-G (редокс-потенціал – 0,84 В [60]), аскорбінової кислоти з дегідроаскорбата; синергетику глутатіону, аскорбату, тролоксу, оксикоричних кислот та інших біоантиоксидантів [61]. У підсумку ЛК виступає як синергіст вітамінів А, С, Е, частково замінюючи їх при їхній недостатності [62, 63]. ЛК стимулює синтез G-SH *de novo*, зокрема, шляхом оптимізації надходження і засвоєння його попередника цистеїну [62, 64], підвищуючи внутрішньоклітинний рівень G-SH на 50 – 70% і тим самим збільшуючи радіорезистентність у деяких тварин з 35% до 90% [62];

3) ЛК відіграє також роль синергіста антиоксидантних ферментів, зокрема, глутатіонових пероксидаз, каталази [65], реактиватора безлічі тілових ферментів. Однак НАДН-цитохром P₄₅₀-редуктазу вона інгібує, переводячи фермент у дисульфідну форму [66].

ЛК внутріклітинно відновлюється в ДЛК, яка експортується в позаклітинне середовище [67]. Таким чином антиоксидантна система ЛК-ДЛК функціонує як усередині, так і поза клітиною. Однак у фізіологічних умовах ЛК і ДЛК містяться

в тканинах у зв'язаному стані [60], а «вільна» ЛК (ДЛК) присутня у настільки низьких концентраціях (1 – 50 нг/мл) [63, 68], що це обмежує її фізіологічну антиоксидантну активність.

ЛК також здатна відновлювати активність гліколітичних ферментів (гексокінази, фосфоглюкоізомерази, альдолази, лактатдегідрогенази), трансмембранних ферментів (Na^+ , K^+ -АТФази, Ca^{2+} -АТФази, Mg^{2+} -АТФази), лужної фосфатази, ферментів циклу трикарбонових кислот (ізоцитрат-, сукцинат- і малатдегідрогенази), знижену після ін'єкції гентаміцину [69], характеризує в основному антитоксичну та антиоксидантну активність ЛК [63, 70].

1.1.2. Типи міжвітамінних взаємовідносин та їх механізми

Раніше відзначалося, що вітаміни, беручи участь у процесах обміну речовин, вступають у взаємодію один з одним. Як виявилось, взаємовідносини вітамінів можуть бути як синергетичними, так і антагоністичними.

Можна виділити декілька найбільш характерних механізмів міжвітамінних відносин на біохімічному рівні:

1. Участь одного з вітамінів в обміні іншого. Найбільш вивчені типові приклади такого роду відносин: а) залежність біосинтезу ніотинової кислоти з триптофану від тіаміну, рибофлавіну і піридоксину, б) кон'югація птеридина і ПАБК при біосинтезі фолієвої кислоти;

2. Конкурентні відносини в кіназних реакціях за використання лімітованого нуклеотидтрифосфатного фонду при утворенні коферментних форм вітамінів (тіамін, піридоксин, ніотинова кислота);

3. Конкуренція фосфорильованих форм вітамінів при протейдизації (тіаміндифосфат, піридоксальфосфат);

4. Співдружна протейдизація вітамінів при побудові мультиферментних комплексів (тіаміндифосфат, ліпоат, ФАД, СоА і НАД) у дегідрогеназах α -кетокислот [1, 71, 72, 73, 74, 75].

5. Неспецифічний вплив вітамінів, їхніх похідних або метаболітів на обмін іншого вітаміну: а) гальмування тіаміндифосфатом НАД-азної реакції, б) тіолди-сульфідні взаємодії похідних пантотенату, ліпоату і тіаміну, в) амідопіридиновий компонент тіаміну як інгібітор обміну піридоксину, г) мобілізація депонованих форм тіаміну аскорбіновою кислотою, д) тіохром – як аналог ізоаллоксазинового компонента рибофлавіну.

6. Взаємодія вітамінзалежних ферментів у реакціях, що протікають за участю тих самих субстратів (піридоксалеві, нікотинамідні і тіамінові ферменти) в обміні α -кетокислот [1].

1.1.3. Взаємодія вітамінів групи В у процесах депонування та обміну

У роботах, присвячених проблемі міжвітамінних відносин, в основному описані випадки впливу недостатності якого-небудь одного вітаміну або введення його в різних дозах людині та експериментальним тваринам на статус і обмін інших вітамінів в організмі.

Так, було виявлено, що введення великих доз тіаміну викликає посилення виведення рибофлавіну із сечею. Погіршення використання рибофлавіну при надлишковому змісті в тканинах тіаміну може бути пов'язане з тим, що тіамін пригнічує один із флавінових ферментів – оксидазу L-амінокислот, а також з тим, що тіамін може порушувати процеси фосфорилування рибофлавіну [4, 76].

Введення терапевтичних доз тіаміну впливає на обмін піридоксину, що виявляється в зменшенні виведення 4-піридоксилової кислоти і збільшенні екскреції ксантуренової кислоти. Продукт обміну тіаміну – токсопіримідин є структурним аналогом вітаміну В₆ і пригнічує ПАЛФ-залежні ферменти. При введенні токсичних доз тіаміну спостерігається гальмування активності трансаміназ. У цьому випадку можна припустити наявність антагонізму між вітамінами В₁ і В₆ на рівні загальних субстратів: пірувату і кетоглутарату. Не виключено, що надлишок одного з вітамінів індукує наднормативний синтез

відповідних апоферментних білків для одного коферменту на шкоду іншому [77, 78, 79].

Тривале введення тіаміну (14 днів) приводить до зростання вмісту НАД у паренхіматозних органах [80]. Рівень нікотинамідних коферментів, а також ТДФ залежить від активності НАД-пірофосфатази і фосфатаз, що можуть розщеплювати обидва коферменти. Ці ферменти під впливом тіаміну і його фосфорильованих похідних можуть інгібуватись, що захищає від розпаду нікотинамідні коферменти [81, 82].

Недостатність тіаміну супроводжується зниженням синтезу ліпоєвої кислоти, зв'язаної з білком [83].

Виявлено, що тривале навантаження рибофлавіном збільшує швидкість перетворення піридоксину в піридоксальфосфат в еритроцитах здорових людей [84, 85]. Рибофлавін бере участь в обміні активних форм вітаміну В₆, активуючи піридоксин(піридоксамін)-5'-фосфатредуктазу [86]. При недостатності рибофлавіну в печінці щурів знижується активність піридоксальфосфатзалежних ферментів [87], розвивається В₆-гіповітаміноз [88].

Використання нікотинової кислоти і нікотинаміду в комплексній терапії туберкульозу легень у дітей зменшує ниркову екскрецію тіаміну і поліпшує забезпеченість організму цим вітаміном [89].

Додавання нікотинаміду до В₁-дефіцитного раціону знижує смертність, помітно збільшує ріст і затримує наступ поліневричних кризів у В₁-авітамінозних щурів [90].

Введення нікотинової кислоти викликає збільшення вмісту ТДФ у печінці щурів [15, 91].

Лікування нікотиновою кислотою хворих розсіяним склерозом приводить до збільшення вмісту в крові вільного і загального тіаміну та підвищенню активності транскетолази [92].

Після однократного підшкірного введення піридоксину щурам спостерігається збільшення виділення тіаміну із сечею, зниження вмісту ТДФ у

крові і загального тіаміну в тканинах [93]. При цьому тканини щурів збіднюються і ніотиною кислотою [94].

Застосування вітаміну В₆ у комплексній терапії хворих туберкульозом легень поліпшує утилізацію рибофлавіну і забезпеченість організму ніотиною кислотою [95].

Наведені дані про деякі сторони взаємодії вітамінів свідчать про те, що рівень вмісту будь-якого вітаміну впливає на статус інших вітамінів аж до розвитку вітамінної недостатності. Варто підкреслити, що порушення обміну вітамінів спостерігається і при багатьох захворюваннях [96, 97].

Усе це обумовлює необхідність комбінованого введення вітамінів для корекції процесів метаболізму в організмі.

1.1.4. Взаємодія деяких вітамінів групи В у реалізації їх біологічних та лікувальних функцій в організмі

Успішне застосування деяких полівітамінних препаратів у комплексній терапії різних захворювань висувують перед дослідниками питання про механізм взаємодії вітамінів на рівні каталізу біохімічних реакцій в організмі.

На теперішній час накопичено значне число даних про характер взаємодії вітамінів при їхньому спільному введенні в організм людини та експериментальних тварин.

Так, спостерігалось взаємне посилення всмоктування тіаміну і ліпоєвої кислоти через фістулу Тірі тонкого кишківника собак при спільному введенні цих вітамінів [98]. Одночасне введення тіаміну і ніотиною кислоти збільшує вміст ТДФ і НАД у крові щурів [80], швидкість транспорту ТДФ у мітохондрії помітно підвищується в присутності ніотинаміду [99, 100].

Підвищення зв'язування тіаміну тканинами щурів спостерігалось при його спільному введенні з вітамінами В₃ і РР [72, 101].

Дослідження взаємодії функціонально зв'язаних вітамінів, коферментних дегідрогеназам α -кетокислот (В₁, В₂, В₃, РР і ліпоєва кислота), в організмі

експериментальних тварин проводились на кафедрі біохімії Одеського національного університету протягом ряду років під керівництвом професора Розанова А. Я. Було вивчено багато аспектів процесів взаємодії вітамінів: вплив різних доз і співвідношень вітамінів на активність дегідрогеназ α -кетокислот, роль біомембран у цих процесах, а також відносини між вітамінами при зв'язуванні їх тканинами, мітохондріями печінки і клітинами крові [71, 74, 75, 102, 103, 104, 105].

Комплекс функціонально зв'язаних вітамінів стимулює поглинання клітинами крові тіаміну, ліпоєвої і нікотинової кислот з інкубаційного середовища [106, 107, 108, 109, 110]. Введення комплексу вітамінів ($B_1 + B_2 + B_3 + PP$) або ($B_1 + B_3 + PP +$ ліпоєва кислота) тваринам різних філогенетичних рівнів (риби, земноводні, безхребетні і ссавці) підвищує зв'язування ліпоату і рибофлавіну тканинами в період від 15 хв до 8 годин спостереження [111, 112].

У літературі є велика кількість даних про результати комплексного застосування в клініці вітамінів і лікарських препаратів, тому ми обмежилися лише випадками, що представляють для нас інтерес з погляду використання досліджуваних нами вітамінів і, особливо, їхніх сумішей.

У щурів одночасне внутрішньочеревинне введення суміші вітамінів і коферментів: B_1 , нікотинамід, ФМН, ПАЛФ приводить до нормалізації активності триптофанпіролази печінки, зниженої при хронічному споживанні етанолу (8 днів; 3, 5 і 10% розчин) [113]. Комплексне застосування нікотинової, ліпоєвої, пантотенової кислот, фітину і кокарбоксілази (відповідно в дозах 200, 50, 200, 40 і 50 мг) виявляє значний ліпотропний ефект у хворих ішемічною хворобою серця [114].

Багаторазове введення хворим туберкульозом дітям комплексу вітамінів: B_2 , B_6 , пантотенової кислоти, PP, біотину і ліпоінозиту викликає відновлення забезпеченості організму вітамінами, які вводились, зниження майже до норми ниркової екскреції пірвіноградної кислоти й ефективне усунення або пом'якшення негативних реакцій при призначенні цим хворим туберкулостатичних препаратів [115].

Призначення вітамінів групи В (B_1 , B_6 , B_{12}) у комплексному лікуванні ревматизму сприяє підвищенню рівня альбумінів у сироватці крові, зниженню вмісту α_1 - і α_2 -глобулінів [116].

Полівітамінний комплекс «Геротон», до складу якого входять тіамін, рибофлавін, пантотенова кислота і піридоксин, при введенні щурам підвищує андрогенну і глюкокортикостероїдну функцію кори надниркових залоз у старих тварин і сприяє посиленню глюкокортикостероїдної функції цієї залози у молодих, викликає підвищення вмісту калію як загального, так і внутрішньоклітинного, знижене у старих щурів [117, 118].

Використання препарату «Декамевіт» у комплексній терапії цукрового діабету середньої ваги приводило до позитивних результатів. Такою же дією володіє і препарат «Ундевіт» [119]. Застосування комплексу вітамінів B_1 , B_2 , РР, B_6 і С з препаратами заліза виявилось більш ефективним у порівнянні зі звичайною феротерапією при лікуванні анемії [120].

Комплексна вітамінотерапія широко застосовується для лікування багатьох серцево-судинних захворювань [121].

Додаткове навантаження тіаміном у сполученні з рибофлавіном і піридоксином дещо збільшує вміст цих вітамінів в організмі старих щурів, знижений в результаті вікових змін метаболічних процесів [122].

Наведені у даному розділі дані літератури про біологічну активність окремих вітамінів та ефекти їхнього спільного введення показують, що їх комбіноване введення викликає дію, яка не є сумациєю ефектів окремих вітамінів.

Одним з механізмів синергізму, що спостерігається при одночасному введенні вітамінів B_1 , B_2 , РР і B_6 є спільна участь їх у діяльності складних ферментних систем, що не тільки функціонально, але і структурно об'єднані в клітині в багатокомпонентні ферментні ансамблі.

Так, групою авторів висунута ідея існування в мітохондріальному матриксі поліферментного комплексу циклу трикарбонових кислот, який вони назвали метаболоном [123, 124]. Ключову роль у формуванні метаболона відіграє α -

кетоглутаратдегідрогеназний комплекс (КГДК – КФ 1.2.4.2), до складу якого входять коферментні форми вітамінів В₁, В₂, РР.

Крім КГДК метаболон містить інші ферменти ЦТК, а також аспартат-амінотрансферазу (ПАЛФ-вміщуючий фермент) і нуклеозиддифосфокіназу. Сукцинатдегідрогеназа – інтегральний білок внутрішньої мембрани, що забезпечує зборку комплексу ферментів ЦТК на мембрані.

У функціональній єдності з описаним поліферментним комплексом знаходиться піруватдегідрогеназний комплекс (ПДК – КФ 1.2.4.1). ПДК структурно подібний КГДК і містить ті ж самі коферментні форми вітамінів. Каталізуючи процес перетворення пірувату в ацетил-СоА, ПДК регулює одну з ключових ділянок обміну вуглеводів, ліпідів і білків.

1.2. Основні ензиматичні функції функціонально пов'язаних вітамінів

1.2.1. Будова, функції та регуляція активності піруватдегідрогеназного комплексу

ПДК поділяють на три компоненти. Одним з них є декарбоксилаза, яку власно називають дегідрогеназою. Дисоціюючим кофактором дегідрогенази є ТДФ [125, 126]. Другим компонентом ПДК є флавопротеїд дигідроліпоїл-дегідрогеназа (кофактор – ФАД), а третім – дигідроліпоїлтрансациетилаза, що містить ліпоєву кислоту [6, 110].

Дигідроліпоїлтрансациетилаза (КФ 2.3.1.12) – «серцевинний фермент» – із ПДК *E. coli* має молекулярну масу приблизно $1,7 \times 10^6$ і складається з 24 ідентичних субодиниць з молекулярною масою 70 000 Да. Кожна субодиниця містить зв'язаний з білком ліпоїльний залишок. З дигідроліпоїлтрансациетилазою зв'язані приблизно 12 димерних субодиниць дегідрогенази (КФ 1.2.4.1) з молекулярною масою 192 000 Да і 6 молекул димерного флавопротеїду (КФ 1.6.4.3) з молекулярною масою 112 000 Да. 12 димерів дегідрогенази симетрично розташовані по дванадцятьох ребрах трансациетилазного кубу, а 6 димерів

флавопротеїду – по шести його площинах. Така близькість між ферментами збільшує сумарну швидкість процесів і зводить до мінімуму побічні реакції [127, 128, 129].

Кофактор дигідроліпоїлтрансациетилази – ліпоєва кислота міцно зв'язана з апоферментом через ϵ -аміногрупу лізину, що створює гнучкий важіль довжиною 14 Å, який сприяє взаємодії ліпоїльної частини трансациетилазної субодиниці з тіаміндіфосфатним компонентом сусідньої дегідрогеназної субодиниці і флавіновим компонентом ліпоїлдегідрогенази [128, 130].

Крім ТДФ, ФАД і ліпоєвої кислоти у функціонуванні ПДК та інших дегідрогеназних комплексів особисту участь приймають похідні вітамінів B_3 і РР (CoA і НАД⁺). CoA, приєднуючи ацильну групу, перетворюється в ацетил-CoA, який постачає цю групу в ЦТК або для реакцій синтезу. НАД⁺ реокиснює кофактор дигідроліпоїлдегідрогенази.

Послідовність реакцій окиснення α -кетокислот, зокрема піровиноградної, що каталізуються дегідрогеназами цих кислот, добре вивчена багатьма вченими [126, 128, 131, 132, 133, 134].

Регуляція активності ПДК здійснюється за допомогою різних механізмів в залежності від стану процесів метаболізму в організмі. Піруватдегідрогеназний компонент ПДК може існувати в активній і неактивній формах. Перевага тієї або іншої форми зв'язана з процесами фосфорилування і дефосфорилування ферменту. Ферменти, які каталізують ці процеси (піруватдегідрокіназа і піруватдегідроліпоїлдегідрогеназа), входять до складу ПДК.

Піруватдегідрокіназа шляхом фосфорилування піруватдегідрогенази гальмує початковий етап, тобто декарбоксілювання пірувату. Усякий раз, коли рівень АТФ у клітині перевищує визначений вміст, ПДК відразу ж виключається [132, 135, 136, 137]. На противагу дії кінази піруватдегідроліпоїлдегідрогенази шляхом дефосфорилування реактивує ПДК (рис. 1.1).

Активність ПДК, природно, змінюється відповідно зміні вмісту коферментів. Так званий «стабілізуючий» вплив ТДФ на ПДК пов'язують з тим, що крім коферментної, він відіграє і регулюючу роль у функціонуванні цього

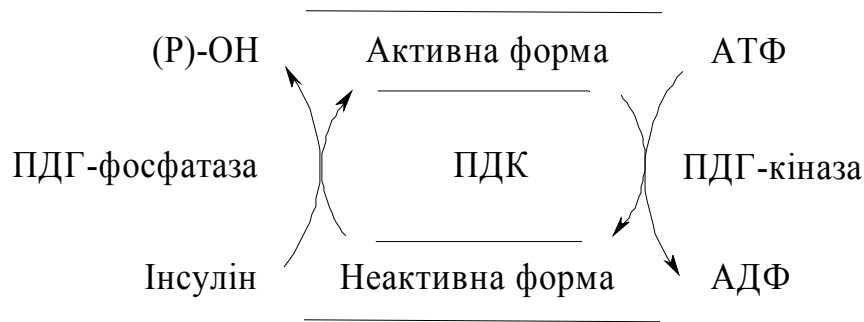


Рис. 1.1. Регуляція активності ПДК фосфорилуванням – дефосфорилуванням його піруватдегідрогеназного компоненту [71, 138, 139, 140]

комплексу [141]. Було показано, що ТДФ за певних умов може пригнічувати активність ПДК, як припускають, за рахунок збільшення синтезу ацетоїну, який в свою чергу, є активатором кінази ПДГ-компоненту ПДК [142].

Введення ліпосвої кислоти щурам-пухлиноносіям відновлює знижену активність ПДК до норми [143]. Обертання ліпоїльної групи всередині комплексу може служити для утворення та руйнування активного стану комплексу в залежності від того, знаходиться чи ні ця група поблизу активного центру [144].

Істотним фактором регуляції активності ПДК є співвідношення НАД⁺/НАДН. НАД⁺ конкурує з НАДН за дигідроліпоамідний компонент комплексу. Крім того, НАДН інгібує піруват- і дигідроліпоїлдегідрогеназу за алостеричним механізмом [145, 146].

СоА і ацетил-СоА, та їхнє співвідношення (СоА/ацетил-СоА), впливають на активність ПДК по типу зворотного зв'язку [147, 148]. Активність протеїнкінази і фосфопропротеїнкінази залежить від концентрації компонентів, які беруть участь в реакції [141, 149]. Важливу роль в активації дегідрогеназних комплексів відіграють іони Ca²⁺ [150, 151, 152, 153].

Інсулін активує фосфатазу і відновлює активність усього ПДК [42, 154]. Крім інсуліну в активації дегідрогеназ α -кетокислот беруть участь і інші гормони: вазопресин [155], адреналін, активуюча дія якого опосередкована іонами Ca²⁺ [156, 157, 158]. Пригнічення активності окисного декарбоксілювання α -кетокислот спостерігається в умовах гіпоксії [120, 159, 160, 161].

1.3. Будова та функції Na^+ , K^+ -АТФази

Na^+ , K^+ -АТФаза (КФ 3.6.1.37) вперше відкрита Скоу в гомогенатах нервової тканини у 1957 р. являє собою вбудований у плазматичну мембрану фермент, який здійснює гідроліз АТФ і сполучений з ним перенос іонів Na^+ і K^+ через мембрану проти електрохімічного градієнту у відповідності з наступним рівнянням:



де $\text{Na}_{\text{вн}}^+$ і $\text{K}_{\text{вн}}^+$ – являють собою внутрішньоклітинні, а $\text{Na}_{\text{зов}}^+$ і $\text{K}_{\text{зов}}^+$ – іони, що знаходяться з зовнішньої сторони клітини. Таким чином, Na^+ , K^+ -АТФаза, присутня у всіх клітинах тварин, здійснює електрогенний обмін внутрішньоклітинного Na^+ на позаклітинний K^+ за схемою Олберса-Поста [162].

1.3.1. Структура фермента

Na^+ , K^+ -АТФаза складається з поліпептидних ланцюгів двох типів: α -субодиниці, яка виконує каталітичну функцію, і β -субодиниці, яка являє собою глікопротеїд, який безпосередньо не бере участь у каталізі. Молекулярні маси α - і β -субодиниць складають близько 110 та 55 кДа відповідно. На теперішній час у хребетних виявлені чотири ізоформи α -субодиниці ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ і $\alpha 4$) [163, 164, 165, 166, 167] та три ізоформи β -субодиниці ($\beta 1$, $\beta 2$ і $\beta 3$) Na^+ , K^+ -АТФази [168, 169, 170, 171], які кодуються різними генами. Ці субодиниці можуть з'єднуватися в $\alpha\beta$ -димер у різних сполученнях. Ізоферменти, які утворюються, характеризуються різними кінетичними властивостями [172] і по-різному розподілені в різних тканинах, а також в одній тканині в процесі онтогенезу [173].

Поліпептидний ланцюг α -субодиниці Na^+ , K^+ -АТФази занурений у ліпідний подвійний шар мембрани таким чином, що формує 10 трансмембранних фрагментів, які мають вид α -спіралей, а N- і С-кінцеві фрагменти ланцюга розташовуються в цитозолі [174]. Велика частина амінокислотних залишків ланцюга знаходиться в цитоплазмі, утворюючи великий цитоплазматичний

домен, значно менша частина розташована з зовнішньої сторони мембрани (рис. 1.2). Усередині мембрани трансмембранні фрагменти розташовуються досить близько один до одного [175]. Очевидно, трансмембранні фрагменти беруть участь у формуванні каналу, по якому відбувається переміщення катіонів.

Рентгеноструктурний аналіз Na^+ , K^+ -АТФази з великим розрішенням до теперішнього часу не зроблено, однак недавно виконана робота з рентгеноструктурного аналізу Ca^{2+} -АТФази саркоплазматичного ретикулу [177]. Фермент являє собою білок, родинний α -субодиниці Na^+ , K^+ -АТФази, (гомологія в амінокислотній послідовності цих білків складає близько 20%, але їхні профілі гідрофобності дуже схожі) і дає уявлення про можливий зовнішній вигляд α -субодиниці та її розташування в мембрані (рис. 1.3).

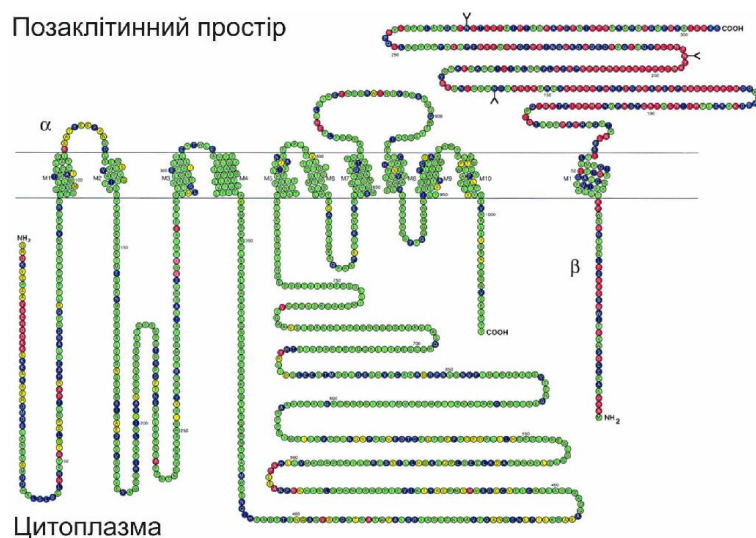


Рис. 1.2 Розташування поліпептидних ланцюгів α - і β -субодиниць Na^+ , K^+ -АТФази в мембрані [176]

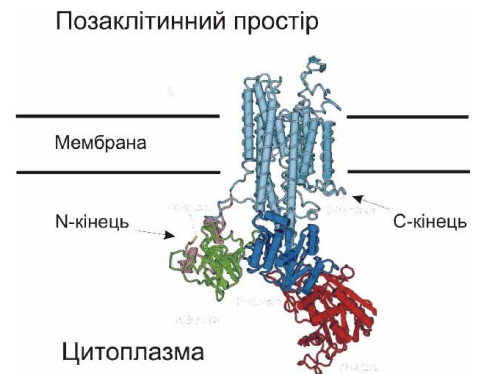


Рис. 1.3 Просторова будова молекули Ca^{2+} -АТФази, за даними рентгеноструктурного аналізу [177]

Поліпептидний ланцюг β -субодиниці перетинає мембрану один раз [178], невеликий N-кінцевий фрагмент ланцюга розташовується в цитоплазмі, велика частина субодиниці знаходиться поза клітиною (рис. 1.2) [179]. На тій частині β -субодиниці, що розташована з позаклітинної сторони мембрани, формуються три дисульфідні зв'язки [178] та знаходяться три ділянки N-глікозилювання, до яких прикріплені розгалужені вуглеводні фрагменти [180] (маса вуглеводів складає

приблизно третю частину молекулярної маси β -субодиниці). В асоціації β -субодиниці з α -субодиницею беруть участь, очевидно, амінокислотні залишки, розташовані з зовнішньої сторони мембрани поблизу від С-кінцевого фрагмента β -субодиниці [181] та її трансмембранний фрагмент, взаємодіючий з 9- і 10-м трансмембранними сегментами α -субодиниці [175].

Показано, що мембранна Na^+, K^+ -АТФаза являє собою олігомер, який складається з 4 $\alpha\beta$ -протомерів як з негативними [182], так і з позитивними кооперативними взаємодіями між протомерами [179]. Утворення олігомерних комплексів Na^+, K^+ -АТФази відбувається за рахунок взаємодії між α -субодиницями ферменту [183, 184].

1.3.2. Регуляція активності фермента

Na^+, K^+ -АТФаза, як високодинамічна структура, оперативно реагує на зміну внутрішньо- та позаклітинної концентрації іонів Na^+ і K^+ , які транспортуються нею, тим самим надійно забезпечуючи підтримку трансмембранного градієнту цих катіонів і потенціалу спокою на мембрані, необхідних для реалізації ряду найважливіших процесів клітинної фізіології, зокрема генерації нервового імпульсу, ініціації м'язового скорочення, секреторної діяльності, підтримки осмотичної рівноваги, транспорту цукрів і амінокислот [185].

Na^+, K^+ -АТФаза дуже чутлива до змін концентрацій АТФ і Mg^{2+} -есенціальних лігандів, необхідних для прояву її каталітичної та транспортної активності, та які є алостеричними регуляторами ферменту [186, 187].

Специфічними інгібіторами Na^+, K^+ -АТФази є серцеві глікозиди [188]. Ділянка зв'язування серцевих глікозидів розташована в основному на α -субодиниці Na^+, K^+ -АТФази з позаклітинної сторони мембрани [189].

На теперішній час дигіталіс-подібні фактори виявлені в гіпоталамусі та надниркових залозах тварин [190]. Дигіталіс-подібний фактор з гіпоталамуса ідентифікований: він являє собою ізомер уабаїну [191]. Виявилося також, що їхня

концентрація в крові збільшується при розвитку різних захворювань, наприклад, гіпертонічної хвороби [192, 193] і катаракти [194], а можливо, і деяких інших.

Регуляція активності Na^+ , K^+ -АТФази може відбуватися за рахунок передачі на фермент сигналу від мембранних рецепторів гормонів. У багатьох випадках цей сигнал передається шляхом фосфорилування білку-мішені різними протеїнкіназами.

Встановлено, що $\alpha 1$ – ізоформа Na^+ , K^+ -АТФази, яка є домінуючою ізоформою у нирках [195], де необхідна особливо тонка регуляція активності Na^+ , K^+ -АТФази, та є присутня також в інших тканинах, включаючи серце, скелетний м'яз і нервову тканину; вона здатна фосфорилуватись під дією сАМФ-залежної (РкА) [196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204] і сGMP-залежної протеїнкінази (РкG) [205], а також Са-фосфоліпід-залежної протеїнкінази (РкС) [196, 197, 198, 199, 201, 206, 207, 208, 209, 210, 211] та тирозинової протеїнкінази [212]. Також було показано, що при фосфорилуванні Na^+ , K^+ -АТФази протеїнкіназами зниження активності ферменту здійснюється пропорційно включенню фосфату в α -субодиницю [213]. Це дозволяє вважати, що дія протеїнкіназ приводить до вимикання молекули Na^+ , K^+ -АТФази, та її наступна реактивація може бути здійснена при участі протеїнфосфатази.

1.3.3. Вплив біологічно активних речовин на активність Na^+ , K^+ -АТФази

Той факт, що крім зазначених вище механізмів, у регуляції активності ферменту також можуть брати участь і інші біологічно активні сполуки залишається незаперечним.

Так, було встановлено, що пірітіамін (антиметаболіт тіаміну) специфічно інгібує убаїн-залежну Na^+ , K^+ -АТФазу отриману з різних тканин, яка містить переважно $\alpha 2, \alpha 3$ ізоформи [214].

Виявлено специфічне інгібування Na^+ , K^+ -АТФази глутаматом та його агоністом N-метил-D-аспартатом (NMDA) [215]. Відомо, що активація глутаматергічних нейронів мозжечку специфічними лігандами супроводжується

ростом внутрішньоклітинного рівня активних форм кисню (АФК) за рахунок активації метаболічних реакцій [216, 217, 218, 219]. Припускають, що убаїн-резистентна Na^+ , K^+ -АТФаза в клітинах нейронів контролює утворення АФК, які у свою чергу виступають як інгібітори убаїн-чутливих ізоформ Na^+ , K^+ -АТФази.

Дослідження впливу L-аргініну на активність Na^+ , K^+ -АТФази ендотелію аорти щурів показують, що дія високих концентрацій L-аргініну викликає інгібування Na^+ -насосу, яке пов'язано з активацією ендогенного синтезу NO [220].

1.3.4. Основні функції Na^+ , K^+ -АТФази

Na^+ , K^+ -АТФаза відіграє істотну та різну роль у функціонуванні різних тканин. Робота Na^+ , K^+ -АТФази приводить до створення градієнта концентрацій іонів Na^+ і K^+ , що у різних тканинах може бути використаний по-різному. У зв'язку з цим істотно розрізняється щільність Na^+ , K^+ -АТФази в клітинах: від декількох молекул на квадратний мікромметр мембрани в еритроциті [221] до декількох тисяч молекул на тій же площі в епітелії нефрону [222] або в збудливих тканинах. Звичайно, у всіх клітинах тварин Na^+ , K^+ -АТФаза бере участь у створенні та підтримці потенціалу спокою, а також у регуляції клітинного об'єму [223]. Однак у Na^+ , K^+ -АТФази є і спеціалізовані функції, характерні для визначеного типу тканин.

Важлива роль Na^+ , K^+ -АТФази полягає в підтримці іонної провідності в збудливих тканинах (нервовій і м'язовій). У момент проведення збудження в нервових та м'язових клітинах відкриваються потенціал-чуттєві іонні канали (спочатку Na^+ -, а потім K^+ -канали), що приводить до переміщення цих катіонів по градієнту концентрації і внаслідок цього до деполяризації мембрани, яке приводить до появи та поширенню потенціалу дії. Відразу після проходження потенціалу дії зміни в концентраціях іонів Na^+ і K^+ у клітині, викликані їм, компенсуються за рахунок роботи Na^+ , K^+ -АТФази [188].

У багатьох клітинах натрієвий градієнт використовується при функціонуванні різних іонообмінних транспортних систем. Підвищення

концентрації внутрішньоклітинного Na^+ приводить до активації $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника [224]. Важливу роль у регуляції рН у серцевому м'язі [225], а також в епітелії нефрону [226] та інших клітинах відіграє Na^+/H^+ обмінник, який забезпечує обмін внутрішньоклітинного H^+ на позаклітинний Na^+ .

Na^+ , K^+ -АТФаза розташована в базолатеральній мембрані епітелію ниркових каналців забезпечує підтримку низької внутрішньоклітинної концентрації Na^+ , що у свою чергу дозволяє нормально функціонувати системам транспорту Na^+ , розташованим в апікальній мембрані [227].

В інших тканинах градієнт іонів Na^+ використовується не тільки для забезпечення роботи вищевказаних іонообмінників, але також і для транспорту в клітину деяких метаболітів: цукрів, амінокислот [228].

Таким чином, крім створення градієнту концентрацій іонів Na^+ та K^+ , Na^+ , K^+ -АТФаза в різних тканинах виконує різноманітні фізіологічні функції.

Приведений нами огляд літератури дає виразне уявлення про значення вітамінів та продуктів їхнього обміну в регуляції процесів метаболізму в організмі.

Дані літератури показують, що для реалізації біологічної активності того або іншого вітаміну визначене значення мають взаємовідносини вітамінів між собою. Багатьма дослідженнями було встановлено, що в процесі взаємодії між вітамінами спостерігається як синергізм і взаємопосилення дії кожного з вітамінів, так і антагонізм із розвитком дефіциту в організмі того або іншого вітаміну. Показано також, що при багатьох патологічних процесах та фізичній або психічній напрузі організму для стабілізації і нормалізації обміну речовин необхідно вводити комплекс різних вітамінів.

У зв'язку з цим, метою нашого дослідження стало встановлення особливості регуляції надходження і перетворень у тканинах тварин деяких вітамінів групи В (B_1 , B_2 , B_3 , РР, B_6) та ліпоевої кислоти на різних етапах їх просування на шляху до реалізації коферментних функцій.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Матеріали дослідження

Експерименти проводили на статевозрілих мишах F₁ (СВА x Black) масою близько 18 – 20 г, безпородних білих щурах та щурах лінії Вістар масою 160 – 180 г, загальною кількістю не менше 700 тварин. У ряді досліджень використовували щурів трьох вікових груп: молоді (2 – 3 тижні), дорослих (3 – 4 тижні), старих (24 – 26 місяців).

Дослідження на тваринах проводились з дотриманням положень Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицину (від 04.04.1997) і постанови Кабінету Міністрів України від 24.08.2002 № 1256. Тварин утримували на стандартному раціоні [229] в умовах експериментально-біологічної клініки, за добу до досліду їх припиняли годувати, але продовжували поїти водою. Виведення тварин з експерименту проводили шляхом декапітації у стані ефірного наркозу.

Вивчення дії вітамінів, їх сумішей та похідних, а також інших сполук на біохімічні процеси та показники проводили *in vivo* (внутрішньом'язові ін'єкції та внутрішньошлункове введення) в крові та гомогенатах печінки, нирок, мозку, серця.

В роботі були використані субстанції вітамінів та їх похідних Російського виробництва: тіаміну хлорид (В₁), рибофлавіну мононуклеотид (ФМН), нікотинова кислота (НК), нікотинамід (НА), ліпоєва кислота (ЛК), пантотенат кальцію (В₃), піридоксину гідрохлорид (В₆) – Белгородський фармацевтичний завод; пікамілон – Уфімський вітамінний завод; пантогам – «Акрихин», м. Москва. Вітамінні суміші готувались у вигляді водних розчинів субстанцій відповідних вітамінів. Серед інших препаратів: тіопентал натрію – Київський завод медпрепаратів, Україна; актиноміцин (АМ) і хлорамфенікол (ХА) – виробництва фірми "Reanal", Угорщина.

Основна частина використаних реактивів відповідає високим вимогам чистоти (фірми "Calbochem", "Ferak", "Serva", "Sigma", "Реахим") з характеристикою не нижче «х. ч.», які за необхідністю додатково очищували.

2.2. Методи дослідження

2.2.1. Визначення концентрації вітамінів у тканинах тварин

Тіамін і його фосфорні ефіри. Для визначення різних фракцій вітаміну В₁ (загальний тіамін, вільний тіамін, фосфорні ефіри тіаміну). Нами була використана методика Єлісеєвої Г. Д., описана в [230].

Метод базується на окисненні тіаміну в тіохром, екстракції останнього в органічний розчинник і вимірюванні інтенсивності флуоресценції.

Реактиви: Стандартний розчин тіаміну (1 мг/мл), стійкий у темряві і на холоді до місяця. Робочий розчин готували розведенням у 1 000 разів (1 мкг/мл); 2% $K_3[Fe(CN)_6]$, свіжевикотвлений; 30% NaOH; ізобутиловий (аміловий) спирт, насичений водою; етиловий спирт 96%; 0,25 N HCl; 20% Na_2CO_3 ; 20% трихлороцтова кислота (ТХО). Джерело фосфатаз: 1-5 одиниць активності кислоти фосфатази (комерційний препарат фірми "Sigma") розчиняли у 10 мл ацетатного буфера рН 5,0 і залишали на холоді на 3 – 4 години, періодично перемішуючи. Зберігали на холоді не більше 24 годин. Універсальний індикатор.

Визначення вільного тіаміну. Наважку тканини 0,4 – 0,5 г подрібнювали у гомогенізаторі на холоді, додаючи 5 мл 0,25 N HCl. Гомогенат переносили у широку пробірку з міткою на 20 мл, гомогенізатор ополіскували 10 мл 0,25 N HCl, після чого промивну рідину переносили у ту ж пробірку. Вміст пробірки нагрівали протягом 15 хв на киплячій водяній бані. Теплу рідину, не відокремлюючи осад, доводили до рН 5,2, додаючи по краплях 20% розчин Na_2CO_3 (перевіряли по універсальному індикатору). При цьому велика частина білків коагулювала. Після охолодження об'єм доводили до 20 мл і центрифугували при 3 000 g протягом 10 хв. Відбирали 10 мл центрифугату для

визначення вільного тіаміну (у 10 мл, що залишились, потім визначали загальний тіамін). До цього об'єму додавали 2 мл 20% ТХО для осадження інших білків і поміщали у водяну баню з температурою 40 – 50 °С на 10 хв. Осад відокремлювали центрифугуванням при 3 000 g протягом 10 хв. Весь безбілковий центрифугат поміщали у ділильну лійку, додавали 10 мл ізобутилового спирту і, помірно перемішуючи рідину, екстрагували протягом 2 хв для витягу флуоресціюючих домішок, які заважали визначенню. Тіамін, що утримувався в нижньому водному шарі (весь отриманий об'єм), переносили в іншу ділильну лійку, додавали 0,2 – 0,3 мл 2% розчину $K_3[Fe(CN)_6]$, 4 мл 30% NaOH і 9 мл ізобутанолу. Екстрагували протягом 2 хв. Нижній водний шар після розподілу зливали, а до верхнього ізобутилового екстракту додавали приблизно 10 мл дистильованої води, перемішували і після відстоювання зливали нижній водний шар у два прийоми. Ізобутиловий екстракт із ділильної лійки зливали у суху мірну пробірку на 10 мл, у яку попередньо був доданий 1 мл етилового спирту. Якщо отриманий об'єм був менше 10 мл, то його доводили ізобутиловим спиртом до мітки.

Паралельно обробляли контрольну пробу аналогічно дослідній, яка замість екстракту тканини містила 15 мл 0,25 N HCl. Інтенсивність флуоресценції вимірювали проти стандартного розчину тіаміну (1 мкг/мл), окисленого до тіохрому аналогічно дослідній пробі.

Визначення загального тіаміну. До 10 мл центрифугату (разом з осадом), що залишився після відбору проби для визначення вільного тіаміну, додавали 2,5 мл препарату фосфатази і 2 краплі толуолу або хлороформу, прикривали пробірку скляною пробкою і поміщали у термостат з температурою 37 °С на 18 – 20 годин. Після інкубації вміст пробірки нагрівали протягом 3 хв на киплячій водяній бані, охолоджували, додавали 2 мл 20% ТХО, поміщали у водяну баню з температурою 40 – 50 °С на 10 хв; після осадження білків центрифугували, після чого 13 мл безбілкового фільтрату використовували для визначення загального тіаміну, як було зазначено вище.

Паралельно в такий же спосіб обробляли контрольну пробу, яка не містила екстракту тканини. Калібровальну криву для флуориметру (збудження 360 – 375 нм, емісія 420 – 440 нм) будували по показникам екстинкції, які відповідають розчину тіаміну інтервалові 0,1 – 1,0 мкг. Проби обробляли, як описано вище для вільного тіаміну. При розрахунку вмісту вітаміну враховували кількість тканини взяту для дослідження, еквівалентну об'єму центрифугату (мкг/г).

Нікотинамідні коферменти. Для визначення окиснених та відновлених форм нікотинамідних коферментів використовували метод, модифікований Коденцовою [231]. Принцип його полягає у вимірюванні флуоресценції нікотинамідних коферментів, яка виникає після додавання ацетону до кислотних та лужних екстрактів з досліджуваних тканин. Усі реактиви готували на бідистильованій воді безпосередньо перед дослідом і зберігали в холодильнику.

Приготування кислих екстрактів. Відразу після декапітування у тварини виділяли дослідні органи і клали їх на лід. З кожного органу брали по дві наважки по 0,5 г. Одну з них ретельно розтирали в ступці, додаючи заздалегідь приготовлений і охолоджений 2,5% розчин (10 мл) трихлороцтової кислоти. Вміст ступок виливали в центрифужні пробірки і залишали для кращого екстрагування окиснених нікотинамідних коферментів на 10 – 15 хв при періодичному перемішуванні. Після центрифугування (15 – 20 хв) при 3 000 g екстракт зливали. Аліквоти його обробляли для флуориметричного визначення суми НАД⁺ і НАДФ⁺.

Приготування лужних екстрактів. Інші наважки тканин (0,5 г) кип'ятили в пробірці в присутності 5 мл 0,1 N NaOH протягом 1 хв для запобігання руйнування НАД(Ф)Н+Н⁺, після чого тканини розтирали в ступці зі скляним товкачиком. Вміст ступки кількісно переносили в центрифужну пробірку, в яку додавали по 1 мл 0,1 M фосфатного буфера (рН 7,2) і 4 мл води. Доводили рН розчину до 8 – 8,5, додаючи 2 – 3 краплі 6 N HCl. Вміст пробірки перемішували протягом 15 хв, а потім центрифугували і аліквоти брали для флуориметричного визначення суми НАД(Ф)Н+Н⁺.

Обробка екстрактів для флуориметричного визначення. Джерелом окиснених нікотинамідних коферментів служили кислі, а відновлених – лужні екстракти. З огляду на різну концентрацію в них нікотинамідних коферментів, брали певні об'єми кислих і лужних екстрактів. Для печінки і серця брали по 0,2 мл екстракту, для мозку – 0,5 мл. У кожній пробірці об'єм екстракту доводили водою до 1 мл. Туди ж додавали по 0,5 мл перегнаного нефлуоресціюючого ацетону і відразу – по 0,2 мл 6 N NaOH. Проби залишали на 5 хв, періодично ретельно перемішуючи. Потім у пробірки додавали по 0,3 мл 6 N HCl, закривали скляними ковпачками і витримували на киплячій водяній бані протягом 2 хв. Після охолодження в кожну пробірку доливали по 0,5 мл 20% розчину KH_2PO_4 і 7,5 мл води. Таким чином, кінцевий об'єм проби складав 10 мл, а рН середовища при цьому знаходився в межах рН 2 – 4. Проби стійких сполук конденсації нікотинамідних коферментів з ацетоном флуориметрували проти стандарту на флуориметрі ЭФ-ЗМА. Вимір проводили проти стандарту, що містив 5 мкг N_1 -метил-нікотинаміду (зовнішній стандарт). Відповідно до рекомендацій Коденцової, для більш точного визначення нікотинамідних коферментів використовували внутрішній стандарт (додавали N_1 -метил-нікотинамід до гомогенату), контроль (що містив екстракти і не містив ацетону) і контроль до зовнішнього стандарту (що не містив екстракту).

Вміст нікотинамідних коферментів (X , мкг/г тканини) розраховували за формулою:

$$X = \frac{5E \times 2,5}{E_{\text{ст}} \times R} \text{ (мкг/г тканини),}$$

де E – показник флуоресценції проби у розрахунку на 1 мкг N_1 -метил-нікотинаміду; 2,5 – коефіцієнт, що враховує розходження в ступені флуоресценції N_1 -метил-нікотинаміду і нікотинамідних коферментів; $E_{\text{ст}}$ – флуоресценція стандарту; R – маса наважки в екстракті (г).

Вміст нікотинамідних коферментів у кислих екстрактах відповідає сумі НАД^+ і НАДФ^+ , а в лужних екстрактах – сумі НАДН і НАДФН .

Флавінові коферменти. Вміст загальних флавінів (ЗФ) та флавінаденіндинуклеотиду (ФАД) вимірювали за методикою, що описана Юденфрендом [232].

Весь аналіз, за винятком гідролізу, проводили на холоді, при температурі 0 – 4°C. Свіжу тканину гомогенізували у воді (10 мл води на 1 г тканини); 0,3 мл гомогенату переносили у пробірку, що містила 3 мл 11% трихлороцтової кислоти, перемішували і через 15 хв центрифугували. Одну аліквотну пробу (A_1), що містила 0,2 мл, переносили в іншу пробірку з 1 мл 0,2 М розчину K_2HPO_4 ; після перемішування рН розчину складало 6,8. Цю суміш витримували у темряві протягом ночі. Іншу аліквотну пробу (A_2), що також містила 0,2 мл звільненого від білка екстракту, переносили у таку ж пробірку і зберігали протягом ночі в темряві при 38 °С для того, щоб відбувся гідроліз ФАД; після цього до суміші додавали 1 мл 1 М розчину K_2HPO_4 . Після нейтралізації флавіни дуже чуттєві до світла, і тому до вимірів їх зберігали в темряві.

Стандартні проби готували, використовуючи замість гомогенату 0,3 мл розчину рибофлавіну (0,03 – 2,0 мкг). Для приготування контролю замість гомогенату брали 0,3 мл дистильованої води. Максимум спектру збудження знаходиться при 450 нм, а максимум спектра флуоресценції – при 535 нм. Після вимірів флавіни відновлювали, додаючи 10 мкл 10 % розчину $NaHSO_3$ у 5% $NaHCO_3$. Залишкова нефлавінова флуоресценція звичайно з'являється малою, і її віднімають від отриманих величин. Концентрація ФАД у кожній пробірці дорівнює $C = (A_2 - A_1)/0,85$. Коефіцієнт 0,85 використовується тому, що інтенсивність флуоресценції ФАД складає всього 15% інтенсивності флуоресценції рибофлавіну. Порівняння з аналогічно обробленим стандартом рибофлавіну дає вміст ФАД по рибофлавіну. A_2 являє собою, звичайно, еквівалент загальної кількості флавінів.

2.2.2. Визначення активності піруватдегідрогеназного комплексу

Вибір визначення активності піруватдегідрогенази пояснюється, по-перше, залежністю піруватдегідрогеназного комплексу від вітамінів, використаних нами у ВК, по-друге, його важливою роллю в енергетичному обміні. Піруватдегідрогеназну активність визначали загальноприйнятим феріціанідним методом [233]. Метод базується на спектрофотометричному вимірюванні зменшення екстинкції (E) феріціаніду в інкубаційному середовищі, що містить 1 / 15 М фосфатний буфер (рН 7,4), 0,25 М сахарозу, 0,2 М MgSO₄, 0,2 М Na₂EDTA, 0,02 М Na₂АТФ, 6,66 мМ феріціанід калію і 1 мМ піруват натрію. Реакцію починали з моменту внесення в пробу 0,4 мл гомогенату тканини (10% на 0,25 М сахарозі). Для виміру убування феріціаніду одночасно з досліджуваною пробкою (1) готували контрольну пробу (2), у яку замість субстрату вносили 0,1 мл 0,25 М сахарози. Піруватдегідрогеназну активність розраховували по різниці екстинкцій проб 1 і 2, тобто $\Delta E = E_2 - E_1$. Стандартна проба на феріціанід містила усі перераховані компоненти, за винятком субстрату і гомогенату, замість яких додавали 0,5 мл 0,25 М сахарози. Після внесення гомогенату тканин усі проби перемішували скляною паличкою і інкубували при 25 °С протягом 30 хв. Реакцію зупиняли додаванням у проби по 0,3 мл 50% ТХО. Осад видаляли центрифугуванням при 3 – 5 000 g протягом 10 хв.

Надосадову рідину спектрофотометрували на СФ-46 при 417 нм у кварцових кюветах з товщиною шару 1 см.

Активність ферментів виражали в мікромолях (мкмоль) відновленого феріціаніду на 1 г тканини за 30 хв інкубації.

2.2.3. Вимірювання концентрації макроергічних фосфатів в органах тварин

Визначення в тканинах загального неорганічного, загального лабільного та нуклеотидного фосфатів проводили за методом Лекоко та Інеші [234]. В основу методу покладена реакція неорганічного фосфату з молібдованадним реактивом,

що приводить до утворення фосфомолібдованадатного комплексу, забарвленого в жовтий колір, який колориметрують при синьому світлофільтрі.

Реактиви: I. До 100 г молібдату амонію додавали 10 мл концентрованого розчину амоніаку і доводили обсяг розчину до 1 л дистильованою водою; II. У 400 мл гарячої води розчиняли 2,35 г ванадату амонію і охолоджували. Додавали суміш, що містить 14 мл води і 6,16 мл концентрованої HNO_3 . Потім доводили об'єм розчину до 1 л дистильованою водою; III. 500 мл водного розчину містить 150,5 г ТХО і по 100 мл реактивів I і II.

Загальний неорганічний фосфат. У центрифужні пробірки з 2 мл дистильованої води і 1 мл 10% ТХО вносили по 1 мл крові або гомогенату тканин. Потім додавали по 3 мл реактиву III і центрифугували при 4 000 g протягом 5 хв. Фотоколориметрували на ФЕК-56М при синьому світлофільтрі проти контролю (1 мл фізіологічного розчину замість проби крові або гомогенату тканини).

Загальний лабільний фосфат. У центрифужні пробірки з 1 мл дистильованої води і 1 мл 10% ТХО вносили по 1 мл крові або гомогенату тканин. Через 3 – 5 хв центрифугували при 4 000 g протягом 5 хв. 1 мл супернатанту переносили у скляну пробірку, додавали 1 мл 1 N HCl і нагрівали на киплячій водянній бані протягом 10 хв. Після охолодження додавали по 3 мл реактиву III і фотоколориметрували при синьому світлофільтрі проти контролю.

Визначення нуклеотидного фосфату. У мірну центрифужну пробірку поміщали 2 мл фільтрату, що отримували при осадженні білків з 4 мл гомогенату (як зазначено у методиці визначення загального лабільного фосфату). До фільтрату додавали 0,5 мл 20 % розчину оцтової кислоти ртуті. Добре перемішували та через 15 хв центрифугували. Осад розчиняли в 3 мл 0,1 N HCl, та відбирали 1 мл для визначення неорганічного фосфату (як зазначено у методиці визначення загального неорганічного фосфату).

Розрахунок вмісту фосфатів (X, мкг/г тканини) проводили за формулами:

$$X_H = a \times 6, \quad X_L = \frac{a \times 30}{4 - X_H}, \quad X_{\text{гук}} = \frac{a \times 90}{8},$$

де X_n – вміст загального неорганічного фосфату; X_d – вміст загального лабільного фосфату; $X_{\text{Нук}}$ – вміст нуклеотидного фосфату; a – кількість K_2HPO_4 , знайдене по каліброваній кривій; 6, 30, 4, 90 – розведення; 8 – об'єм, з якого отримано осад.

2.2.4. Дослідження Na^+ , K^+ -АТФази

Вимірювання активності Na^+ , K^+ -АТФази. Визначення загальної АТФазної активності та активності Na^+ , K^+ -АТФази проводили за методикою, яка описана в [235]. В основу метода покладено кількісне визначення неорганічного фосфату, який утворюється при інкубації АТФази препаратів тканин в середовищі, яке містить АТФ. Визначення неорганічного фосфату проводили за методом Лекоко і Інеші [234].

Загальну АТФазну активність, яка складається з активностей Mg^{2+} -АТФази і Na^+ , K^+ -АТФази визначали в інкубаційному середовищі (рН 7,4) наступного складу: трис – 25 мМ, NaCl – 100 мМ, KCl – 10 мМ, MgCl_2 – 6 мМ. Реакцію починали додаванням Na_2ATP до концентрації 2 мМ. До 0,1 мл гомогенату тканин миттєво приливали 1 мл інкубаційного середовища, після чого інкубували 15 хв при 37 °С. Потім також миттєво додавали 3 мл реактиву Ш, приготування якого описано у розділі 2.2.3., і 2 мл дистильованої води та центрифугували протягом 5 хв при 3 000 g. Супернатант використовували для визначення оптичної щільності на ФЕК-56М при синьому світлофільтрі.

Активність Mg^{2+} -АТФази визначали так саме, як і при визначенні загальної АТФазної активності, але інкубаційне середовище додатково містило 1 мМ уабаїну для пригнічення активності Na^+ , K^+ -АТФази.

Na^+ , K^+ -АТФазну активність (уабаїн-чутливу) розраховували по різниці між активностями загальної та Mg^{2+} -АТФази. Активність АТФаз виражали у мкмоль неорганічного фосфату (Φ_n) в розрахунку на 1 мг білку за 1 годину (мкмоль Φ_n /мг год). Визначення білку проводили за методом Лоурі і співавторами [236].

Розрахунок активності АТФаз (A , мкмоль Φ_n /мг год) проводили за формулами:

$$A_1 = \frac{[\Phi_{H1}]}{[P] \times 0,25}, A_2 = \frac{[\Phi_{H2}]}{[P] \times 0,25}, A_3 = A_1 - A_2,$$

де A_1 – загальна АТФазна активність; A_2 – активність Mg^{2+} -АТФази; A_3 – активність Na^+, K^+ -АТФази; $[\Phi_{H1}]$ – концентрація Φ_H при визначенні загальної АТФазної активності (мкмоль/мл); $[\Phi_{H2}]$ – концентрація Φ_H при визначенні активності Mg^{2+} -АТФази (мкмоль/мл); $[P]$ – концентрація білку в пробі (мг/мл); 0,25 – перерахунок у години.

Виділення і очищення ферменту. Виділення препаратів Na^+, K^+ -АТФази з сірої речовини мозку та зовнішніх медул нирок щурів проводили за методом Йоргенсена [237].

До 5 г сірої речовини мозку або зовнішніх медул нирок щурів додавали 25 мл буферу (рН 7,4), який містив 0,25 М сахарози, 5 мМ гістидину, 30 мМ імідазолу та подрібнювали у гомогенізаторі на крижаній бані. Гомогенат центрифугували при 17 000 g 20 хв. Супернатант відкидали, а осад знову суспензували у 50 мл буферу, додавали дезоксихолат натрію до кінцевої концентрації 0,25% (співвідношення детергент / білок повинне бути 0,08 – 0,12%). Після інкубації протягом 30 хв при 0 – 4 °С суспензію знову піддавали центрифугуванню у тому ж режимі. Супернатант зливали і зберігали на холоді, а осад гомогенізували у буфері і знову центрифугували 20 хв при 17 000 g. Отримані супернатанти об'єднували.

Наступна стадія виділення була пов'язана з вибірковою інактивацією АТФаз за допомогою хаотропного агенту NaSCN. За даних умов лише Na^+, K^+ -АТФаза зберігає свою активність. NaSCN у вигляді порошку додавали при перемішуванні до кінцевої концентрації 1 М, після чого суспензію витримували при кімнатній температурі протягом 30 – 120 хв. Потім суспензію розбавляли водою в два рази для зменшення щільності і центрифугували 1 годину при 90 000 g. Супернатант зливали, а осад промивали від надлишку Na^+ . Промивання здійснювали, поступово гомогенізуючи осад у буфері і центрифугуючи у тому ж режимі.

Ідентифікацію та чистоту отриманих препаратів Na^+ , K^+ -АТФази визначали методом електрофорезу. Електрофоретичне розділення білків проводили за методом Вебера – Осборн [238] у градієнтному (4 – 15%) поліакриламідному гелі в системі з додецилсульфатом натрію. Присутні в гелі білки після їх розподілу забарвлювали Кумасі G-250.

2.3. Методи статистичної обробки отриманих даних

Статистичну обробку результатів проводили за загальноприйнятою схемою за Ст'юдентом [239]. Розрахунок робили з використанням пакета Microsoft ©EXCEL.

Розрахунок m (середньоквадратичне відхилення) проводили за формулою (2.1)

$$m = \frac{\sqrt{\frac{\sum (a_i - M)^2}{n-1}}}{\sqrt{n}}. \quad (2.1)$$

Розрахунок t (коефіцієнт Ст'юдента) проводили за формулою (2.2)

$$t = \frac{|M_1 - M_2|}{\sqrt{m_1^2 + m_2^2}}. \quad (2.2)$$

Використовуючи таблицю Ст'юдента та значення t , визначали рівень значимості p . Різницю між середніми значеннями вважали достовірними при $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ І ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Взаємодія деяких вітамінів групи В у біосинтезі їх коферментних форм в органах тварин

3.1.1. Вплив вітамінів групи В на біосинтез нікотинамідних коферментів у тканинах

Досліди виконані на статевозрілих мишах лінії F₁ (СВА х Black) масою 18 – 20 г. Вітаміни та їх суміші вводили тваринам внутрішньом'язово в об'ємі 0,2 мл водного розчину.

Дане дослідження складалось із двох частин. У першій мишам вводили нікотинамід (НА) разом з вітаміном В₁. При цьому було використано 2 варіанти. У першому нікотинамід вводили у дозі 20 мг/кг маси тварин разом з різними дозами (від 1 до 24 мг/кг) тіаміну (В₁). У другому варіанті доза НА була більшою – 80 мг, більшими були і дози тіаміну – від 8 до 96 мг/кг. Через 3 години мишей брали у дослід і в їх печінці вимірювали концентрації окиснених форм нікотинамідних коферментів – суму (НАД + НАДФ), та відновлених – суму (НАДН + НАДФН).

У другій частині досліджень тваринам вводили як сам НА, так і його комбінацію з іншими вітамінами групи В у вигляді 3-, 4-, 5-, і 6-компонентних сумішей. Причому у ролі контролів були інтактні тварини, з внутрішньом'язовими ін'єкціями розчинів СаСl₂, пантотенової кислоти (ПК) та 4-фосфопантетеїну (ФПК). Такий вибір пояснюється тим, що препарати ПК і ФПК були кальцієвими солями. Було також цікаво порівняти ПК і ФПК, оскільки останній є попередником більш близьким до коферменту ацилювання (СоА), а за деякими даними і транспортною формою вітаміну В₃ (ПК), яка перерозподіляється з печінки в інші органи і тканини. Вітаміни у всіх варіантах вводили у таких дозах: В₁ – 6 мг/кг, рибофлавінмононуклеотид (ФМН) – 2 мг/кг,

НА – 20 мг/кг, пантотенова кислота (ПК) – 25 мг/кг, піридоксин (В₆) – 5 мг/кг, ліпоєва кислота (ЛК) – 2 мг/кг маси тварин. Доза ФПК була еквімолярною до ПК (тобто 34,25 мг/кг). Доза CaCl₂ дорівнювала половині еквімолярної (тобто 7,03 мг/кг), оскільки пантотенова кислота одновалентна, а кальцій – двовалентний. Причому внутрішньом'язове введення 0,07% розчину CaCl₂ у такій дозі не викликало будь-яких побічних ефектів. Початкові дози препаратів та їх співвідношення були рекомендовані раніше [235] і вони відповідають таким, що характерні для печінки, а нашою задачею було їх уточнення. Інші варіанти (загальноприйняті терапевтичні, співвідношення у крові, «піруватдегідрогеназна», тобто таке, як у складі ПДК) виявились менш ефективними. Мишей брали у дослід через 0,5, 3 та 24 години після ін'єкцій. В їх печінці і крові вимірювали вміст окиснених форм нікотинамідних коферментів – суму (НАД + НАДФ), та відновлених – суму (НАДН + НАДФН).

Результати, представлені на рисунку 3.1, свідчать, що тіамін і при індивідуальному введенні тваринам стимулює утворення нікотинамідних коферментів, особливо відновлених, з ендогенних некоферментних ресурсів вітаміну РР. Причому ефект цей помітно зростає при підвищенні дози В₁ від 2 до 8 мг/кг. Вітамін В₁ ще більше підсилює також і здатність НА підвищувати рівень коферментних форм нікотинової кислоти у разі сумісного введення цих вітамінів. Проте результат був максимальним при певних співвідношеннях між НА і В₁, а саме 10 : 2 при дозі НА 20 мг/кг і 10 : 4 – при більш високій дозі у 80 мг/кг. При подальшому зростанні дози В₁ ефект значно слабшав, або навіть міняв знак, тобто інтенсивність утворення коферментних форм вітаміну РР ставала меншою, чим навіть зовсім без В₁ (на рис. 3.1 – доза В₁ дорівнює нулю).

Таким чином, перша серія дослідів (НА + різні дози тіаміну) показала, що пошук оптимальних співвідношень між вітамінами становить досить непросту задачу. Продовження таких досліджень відносно інших вітамінів та їх комбінацій було виконано нами вже у динаміці. Між вітамінними препаратами НА і В₁ було встановлено співвідношення середнє із приведених за даними рисунка 3.1, тобто 20 і 6 мг/кг (або 10 : 3).

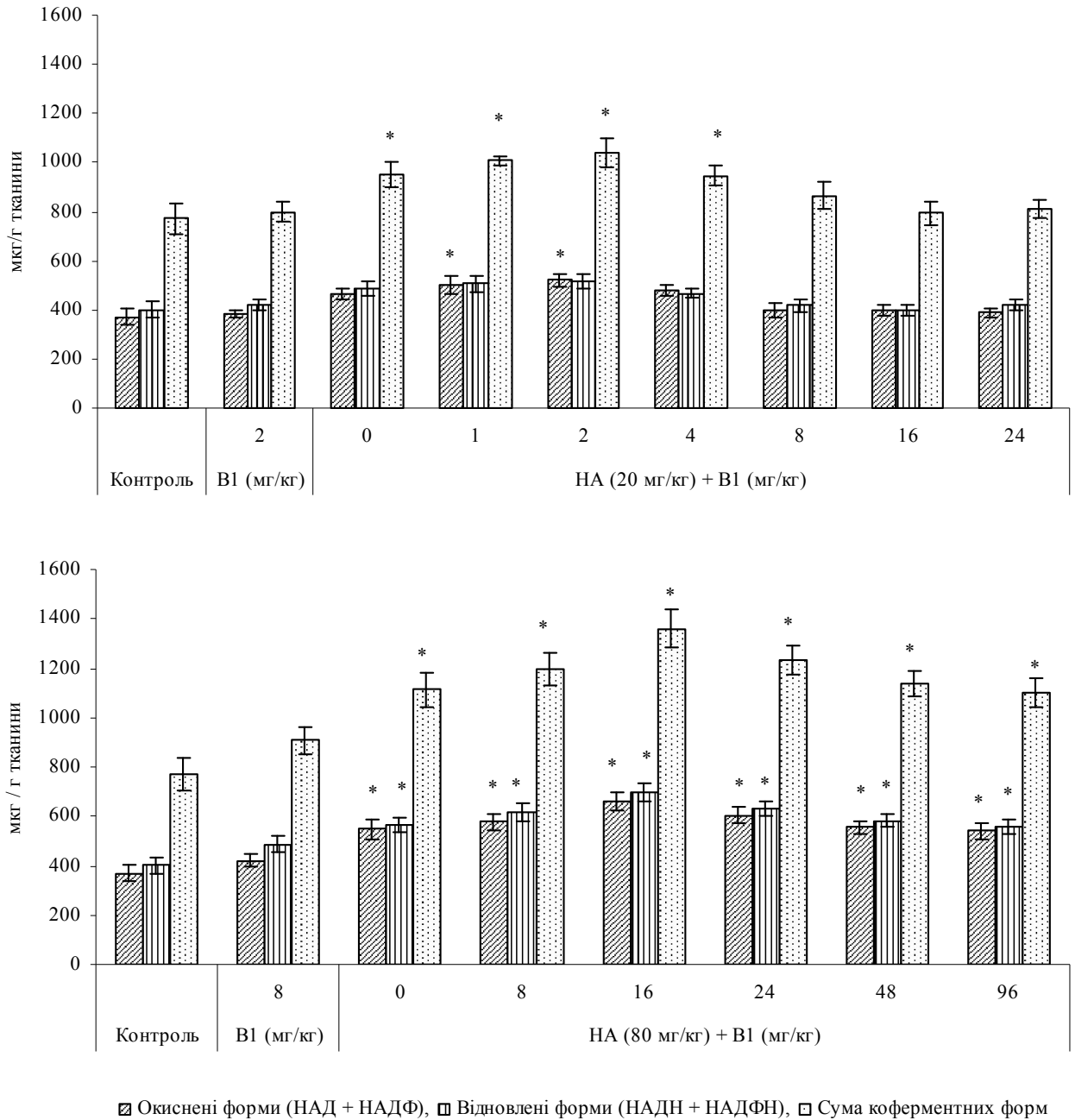


Рис. 3.1. Вміст різних форм нікотинамідних коферментів (мкг/г тканини) у печінці мишей через 3 години після ін'єкції їм по 20 і 80 мг/кг нікотинамідну у сполученні з різними дозами вітаміна В₁ (n = 8). Примітка. * – різниця з контролем достовірна (p < 0,05)

Як бачимо із даних таблиць 3.1 та 3.2, ін'єкції CaCl₂ незначно і недостовірно підвищували вміст обох форм нікотинамідних коферментів і у крові, і в печінці. У крові тварин не викликав помітних змін обох показників і пантотенат (ПК); лише через 3 години достовірно (на 18,5%) збільшувався

порівняно з контролем вміст окиснених коферментів. Така ж дія спостерігалась і для ФПК, але вона була помітно сильнішою, особливо через 3 години (концентрація окиснених форми зросла на 31,3%, а відновлених – на 32,4%). Зрозуміло, що дія ПК і ФПК при їх індивідуальному введенні на рівень нікотинамідних коферментів базується на тому, що вони взаємодіють з вільним вітаміном РР, який вже є в організмі, тобто мобілізують його ендogenous ресурси.

Таблиця 3.1

Вміст різних форм нікотинамідних коферментів (мкг/г тканини) у печінці мишей через різний час після ін'єкції їм вітамінних та полівітамінних препаратів (n = 7)

	Час (год)	Окиснені форми (НАД + НАДФ)	Відновлені форми (НАДН + НАДФН)	Сума коферментних форм
Контроль I (інтактні)	0,5	374 ± 15	405 ± 17	779 ± 46
	3	376 ± 17	407 ± 23	783 ± 54
	24	377 ± 18	404 ± 29	781 ± 30
Контроль II (CaCl ₂)	0,5	380 ± 16	421 ± 26	801 ± 55
	3	394 ± 11	431 ± 39	825 ± 66
	24	377 ± 17	408 ± 22	785 ± 49
ПК	0,5	390 ± 29	420 ± 31	810 ± 44
	3	383 ± 31	390 ± 30	773 ± 30
	24	380 ± 23	400 ± 29	780 ± 22
ФПК	0,5	415 ± 34	482 ± 33	897 ± 34
	3	437 ± 31	501 ± 27*	918 ± 41
	24	385 ± 21	417 ± 28	802 ± 29
НА	0,5	426 ± 21	495 ± 27*	921 ± 69
	3	466 ± 27*	497 ± 39	963 ± 47*
	24	414 ± 20	420 ± 31	834 ± 48
В ₁ +ФМН +НА	0,5	396 ± 14	504 ± 31*	900 ± 42
	3	482 ± 29*	555 ± 35*	1037 ± 70*
	24	439 ± 26	462 ± 27	901 ± 55
В ₁ +ФМН +НА+В ₆	0,5	420 ± 21	537 ± 31*	857 ± 36
	3	503 ± 33*	596 ± 24*	1099 ± 42*
	24	430 ± 27	450 ± 29	820 ± 39
ПК+В ₁ +ФМН +НА+ЛК	0,5	438 ± 26	602 ± 47*	1040 ± 49*
	3	518 ± 37*	679 ± 44*	1197 ± 54*
	24	451 ± 39	473 ± 33	924 ± 32*

	Час (год)	Окиснені форми (НАД + НАДФ)	Відновлені форми (НАДН + НАДФН)	Сума коферментних форм
ПК+В ₁ + ФМН+НА +В ₆ +ЛК	0,5	429 ± 33*	603 ± 31*	1032 ± 39*
	3	532 ± 33*	691 ± 47*	1223 ± 54*
	24	467 ± 30	510 ± 45	977 ± 40*

Примітка. * – різниця з контролем і достовірна ($p < 0,05$)

Ін'єкції тваринам НА викликали суттєве (особливо через 3 і 24 години) підвищення рівня окиснених і дещо менше – відновлених форм нікотинамідних коферментів як у крові, так і в печінці. При цьому ефект був найбільшим через 3 години. Ще більшою дією володіли і полівітамінні суміші, причому ефект поступово зростав по мірі збільшення кількості вітамінів в них: у печінці збільшення сягало через 3 години 40% для окиснених і 50% – для відновлених форм. У крові закономірності були приблизно такими ж. Але необхідно зазначити, ступінь цього приросту показників при збільшенні кількості компонентів зменшувалась, так що різниця у дії між п'яти і шестикомпонентними сумішами вже зникла, або ставала недостовірною. Але все ж характерною особливістю дії полівітамінних сумішей була більша тривалість ефекту.

Зазначимо також, що у печінці (табл. 3.2) на відміну від крові, дещо більш високим був вміст відновлених форм коферментів і саме він у більшій мірі зростав після введення НА і полівітамінних препаратів. При цьому ступінь дії усіх препаратів, що вивчались, і їх сумішей була не набагато вищою у цьому органі, ніж у крові.

В цілому, за даними наших досліджень можна зазначити, що при поєднанні вітаміну РР (у нас нікотинамід) з іншими вітамінами даної групи можна підвищити його здатність стимулювати приріст вмісту коферментних форм (особливо окиснених у крові і відновлених у печінці) майже у 2 рази. При цьому використані дози 6-компонентного препарату вже близькі до межі цих можливостей.

Таблиця 3.2

Вміст різних форм нікотинамідних коферментів (мкг/мл) у крові мишей через різний час після ін'єкції їм вітамінних та полівітамінних препаратів (n = 7)

	Час (год)	Окиснені форми (НАД + НАДФ)	Відновлені форми (НАДН + НАДФН)	Сума коферментних форм
Контроль I (інтактні)	0,5	52,9 ± 2,5	32,3 ± 0,9	85,2 ± 3,7
	3	51,7 ± 3,3	32,4 ± 1,7	84,1 ± 3,6
	24	52,2 ± 5,1	31,7 ± 1,6	83,9 ± 3,2
Контроль II (CaCl ₂)	0,5	55,2 ± 3,1	34,2 ± 3,8	89,4 ± 4,0
	3	58,2 ± 4,3	37,2 ± 1,6	95,4 ± 4,1
	24	52,1 ± 2,7	34,5 ± 1,9	86,6 ± 3,9
ПК	0,5	47,7 ± 2,3	31,1 ± 1,1	88,8 ± 3,7
	3	61,3 ± 3,7*	34,4 ± 2,1	95,7 ± 4,1
	24	54,4 ± 2,7	29,3 ± 0,9	83,7 ± 3,8
ФПК	0,5	57,2 ± 2,8	38,2 ± 2,2	95,4 ± 4,4
	3	67,9 ± 3,1*	42,9 ± 3,1	111 ± 5*
	24	55,7 ± 3,3	35,7 ± 2,0	91,4 ± 4,5
НА	0,5	61,2 ± 2,5	40,3 ± 2,6	101 ± 5*
	3	72,9 ± 5,3*	43,4 ± 2,1*	116 ± 6*
	24	58,4 ± 3,9	37,0 ± 1,4	95,4 ± 5,0
В ₁ +ФМН+НА	0,5	70,9 ± 4,4*	41,7 ± 2,6	113 ± 5*
	3	75,7 ± 4,2*	45,9 ± 2,9	122 ± 6*
	24	79,5 ± 3,7*	40,0 ± 2,3	111 ± 5*
В ₁ +ФМН+НА+В ₆	0,5	73,0 ± 2,9*	40,6 ± 1,6	117 ± 5*
	3	78,1 ± 3,3*	48,3 ± 1,9	126 ± 5*
	24	68,1 ± 2,5*	41,1 ± 1,8	109 ± 4*
ПК+В ₁ +ФМН+НА+ЛК	0,5	75,2 ± 5,5*	47,6 ± 2,1	123 ± 6*
	3	86,5 ± 7,1*	55,9 ± 2,3	142 ± 6*
	24	72,0 ± 4,9*	46,7 ± 2,0	109 ± 6*
ПК+В ₁ +ФМН+НА+В ₆ +ЛК	0,5	79,5 ± 6,6*	49,4 ± 2,3	129 ± 7*
	3	91,4 ± 6,3*	58,2 ± 2,2	150 ± 7*
	24	77,2 ± 4,7*	48,0 ± 2,5	115 ± 6*

Примітка. * – різниця з контролем I достовірна (p < 0,05)

Таким чином, взаємодія між вітамінами становить дуже цікаву, хоча і складну для досліджень, проблему. Раніше, на прикладі комбінації різних доз вітамінів В₁ і ліпоєвої кислоти було показано існування оптимальних

співвідношень між ними для всмоктування кожного з них у шлунково-кишковому тракті собак [98]. Було вказано також і на один з можливих механізмів такої взаємодії (вплив на активність Na^+ , K^+ -АТФази слизових оболонок тонкого кишківника) [240]. Можна зробити припущення, що в організмі існує декілька рівнів контролю (всмоктування, проникнення через біомембрани, транспорт, депонування, біосинтез коферментних форм, взаємодія з апоферментами, метаболізм, виведення з організму і т. ін.), які покликані встановлювати і підтримувати оптимальне співвідношення між вмістом коферментів при різній забезпеченості вітамінами. Це здається досить ймовірним, оскільки мова йде про речовини досить значної біологічної активності і значення.

3.1.2. Взаємодія вітамінів B_1 і B_2 у біосинтезі їх коферментних форм

Дослідження виконані на білих щурах лінії Вістар (статевозрілих, масою 160 – 180 г). Експерименти склалися із двох частин. У першій частині тваринам внутрішньом'язово вводили рибофлавін (вітамін B_2) у дозі 2 мг/кг маси – окремо, або одночасно з різними дозами тіаміну (B_1): 6, 12, 24, 48 мг/кг. Через 3 години в їх печінці вимірювали вміст загальних флавінів (ЗФ) і флавінаденіндинуклеотиду (ФАД), а по різниці між ними вираховували фракцію (вільний рибофлавін + флавінмононуклеотид).

У другій частині роботи у такій же постановці щурам вводили вітамін B_1 у постійній дозі 12 мг/кг самостійно, або у сполученні із зростаючими дозами B_2 : 2, 4, 8, 16 мг/кг. У печінці тварин вимірювали різні фракції вітаміну B_1 : загальний тіамін, вільний тіамін і за різницею вираховували вміст фосфорних ефірів тіаміну (ФЕТ).

Результати першої частини досліджень наведені в таблиці 3.3. Із неї видно, що у групи контрольних тварин рівень ФАД у загальному вмісті флавінів (ЗФ) складає трохи більше половини – 55%. Ін'єкції цим тваринам вітаміну B_2 у дозі 2 мг/кг викликало суттєве підвищення вмісту ЗФ (на 25 – 30%), яке реалізувалось повністю за рахунок зростання фракції ФАД (на 53,8%). Це свідчить про

правильність вибору дози вітаміну В₂. Якби доза його була вищою, то слід було б чекати, що її дія більшою мірою збільшувала фракцію «вільний РФ + ФМН». Важливо, що введення самого В₁ теж підвищувало вміст ФАД, що очевидно пов'язано з деякою мобілізацією ресурсу некоферментних форм вітаміну В₂.

Таблиця 3.3

Вміст загальних флавінів, ФАД і фракції «РФ вільний + ФМН» в печінці щурів у перерахунку на РФ через 3 години після введення їм вітаміну В₂ (по 2 мг/кг) у сполученні зі зростаючими дозами вітаміну В₁, (n = 9)

№ п/п	Варіант досліджу	Фракції вітаміну В ₂ , мкг/г			Частка ФАД, %	Співвідношення ФАД / (РФ + ФМН)
		Загальні флавіни (ЗФ)	ФАД	РФ + ФМН		
1	Контроль	42,7 ± 3,1	23,5 ± 0,7	19,2 ± 0,5	55,0	1,22
2	В ₂ (2 мг/кг)	54,1 ± 3,5*	35,2 ± 2,1*	18,9 ± 1,1	65,1	1,86
3	В ₁ (6 мг/кг)	42,5 ± 2,8	27,3 ± 2,6	15,2 ± 1,5	64,2	1,79
3'	+ В ₂ (2 мг/кг)	50,1 ± 2,7	32,0 ± 1,7*	18,1 ± 1,3	63,9	1,75
4	В ₁ (12 мг/кг)	48,1 ± 3,7	32,3 ± 2,2*	15,9 ± 1,1*	67,2	2,03
4'	+ В ₂ (2 мг/кг)	73,9 ± 3,4*	54,7 ± 3,9*	19,3 ± 2,0	74,0	2,85
5	В ₁ (24 мг/кг)	42,4 ± 2,3	27,4 ± 2,3	15,0 ± 0,8*	64,6	1,82
5'	+ В ₂ (2 мг/кг)	47,3 ± 3,7	29,1 ± 2,2	18,3 ± 0,8	61,5	1,59
6	В ₁ (48 мг/кг)	34,1 ± 1,8	21,0 ± 1,2	13,1 ± 0,3*	61,6	1,61
6'	+ В ₂ (2 мг/кг)	44,1 ± 3,3	25,3 ± 1,7	18,8 ± 0,8	57,4	1,34

Примітка. * – різниця з контролем достовірна (p < 0,05)

Сполучення вітаміну В₂ у постійній дозі 2 мг/кг із зростаючими до 12 мг/кг дозами В₁ (варіанти 2, 3', 4', 5', 6') призводило до поступового зростання фракцій ЗФ і особливо ФАД, що свідчить про покращення використання наявної кількості вітаміну В₂ для біосинтезу його головної коферментної форми – ФАД. Зрозуміло, що в основному це може реалізуватись за рахунок активізації відповідної ферментної системи, хоча можливий внесок в цей процес може робити і

інгібування ферментів розщеплення ФАД. На таку можливість вказують результати дослідів М. Ф. Леуса, хоча і відносно рівня нікотинамідних коферментів під впливом тіаміну [96]. При дозі V_1 у 12 мг/кг за сумісного введення з V_2 досягається максимальний ефект: рівень ФАД зростає більш ніж удвічі (на 134%), за рахунок чого збільшувалась і фракція ЗФ (на 73%) при незмінному вмісті фракції (вільний РФ + ФМН). Подальше збільшення дози V_1 призводило до зменшення ефекту. Про це ж свідчать і такі показники, як співвідношення ФАД/(вільний РФ + ФМН), який досягає у варіанті 4' значення 2,85, і доля ФАД від ЗФ, що становить при цьому 74%, тобто найбільших величин із усіх інших варіантів.

У першій частині експерименту досліджувалась також дія індивідуальних ін'єкцій самого лише вітаміну V_1 у зростаючих дозах на показники вмісту різних фракцій вітаміну V_2 в печінці щурів (табл. 3.3) – варіанти 3, 4, 5, 6. Встановлено, що вітамін V_1 в дозах 6, 12 та 24 мг/кг був здатен більш помірно, чим у комбінації з V_2 , підвищувати рівень ФАД, а при дозі 12 мг/кг – і ЗФ, шляхом перерозподілу за рахунок фракції (РФ + ФМН), а можливо і інших органів і тканин. А доза у 48 мг/кг вже демонструє типовий антагонізм між вітамінами: зменшення вмісту всіх фракцій вітаміну V_2 , очевидно шляхом прискороного розпаду коферментних форм і їх витіснення з організму у вигляді РФ.

Завершуючи розгляд першої частини експерименту зазначимо, що масове співвідношення при оптимальних концентраціях V_1 і V_2 дорівнює $12 : 2 = 6 : 1$. Те ж саме у перерахунку на молярні концентрації становить приблизно $5 : 1$. Тобто, характер впливу вітаміну V_1 на вміст і обмін вітаміну V_2 залежить від співвідношення між їхніми дозами, введеними в організм, і може змінюватись від синергізму до антагонізму в їх перетворенні в коферментні форми. Це твердження належить перевірити шляхом вивчення впливу вітаміну V_2 на біосинтез фосфорних ефірів тіаміну.

Саме таке дослідження ми і виконали у другому розділі нашого експерименту (табл. 3.4). При цьому нами була вибрана одна доза вітаміну V_1 – 12 мг/кг, а доза V_2 зростала: 0, 1, 2, 4, 8, 16 мг/кг. Крім того, зазначимо, що крім цих

варіантів був і такий, коли вітамін В₂ вводили індивідуально, без В₁. А дози В₁ і В₂ були вибрані, виходячи із результатів, представлених вище.

Таблиця 3.4

Вміст загального і вільного тіаміну, а також його фосфорних ефірів (ФЕТ) у печінці щурів через 3 години після внутрішньом'язового введення їм вітаміну В₁ (по 12 мг/кг) у сполученні зі зростаючими дозами вітаміну В₂, (n = 9)

№ п/п	Варіант досліджу	Фракції вітаміну В ₁ , мкг %			Частка ФЕТ, %	Співвідношення ФЕТ / Вільний тіамін
		Загальний тіамін	ФЕТ	Вільний тіамін		
1	Контроль	522 ± 32	491 ± 28	31,6 ± 3,1	94,0	15,5
2	В ₂ (2 мг/кг)	422 ± 29*	399 ± 24*	25,4 ± 1,4	94,6	15,4
3	В ₁ (12 мг/кг)	796 ± 37*	744 ± 38*	52,2 ± 2,7*	93,4	14,3
4	+ В ₂ (1 мг/кг)	847 ± 31*	801 ± 29*	43,3 ± 2,1*	94,4	18,4
5	+ В ₂ (2 мг/кг)	904 ± 35*	860 ± 44*	44,7 ± 3,9*	95,1	19,2
6	+ В ₂ (4 мг/кг)	604 ± 21	555 ± 19	49,0 ± 1,8*	91,8	11,3
7	+ В ₂ (8 мг/кг)	526 ± 18	479 ± 27	46,7 ± 1,1*	91,0	10,3
8	+ В ₂ (16 мг/кг)	541 ± 18	490 ± 17	51,3 ± 1,3	90,5	9,6

Примітка. * – різниця з контролем достовірна (p < 0,05)

Таким чином, із таблиці 3.4 можна бачити, що індивідуальне введення самого лише вітаміну В₂ негативно впливає як на загальний вміст вітаміну В₁, так і його коферментних форм, знижуючи їх на 18 – 19%. Зазначимо, що за даними літератури [230] 85 – 90% ФЕТ представлені тіаміндіфосфатом. Введення щурам 12 мг/кг вітаміну В₁ суттєво підвищує усі його форми: загальний В₁ – на 19,2%, ФЕТ – на 18,7%, а вільний – навіть на 67,7%. Останнє не можна вважати позитивним фактом, як і деяке погіршення інших показників.

Введення разом з В₁ ще і різних доз В₂ значно підвищує здатність першого з них перетворюватись у коферментну форму. Особливо цей ефект виражений у разі використання дози В₂ у 2 мг/кг (варіант 5), коли зростання ФЕТ досягає

75,4%, проти 18,7% при введенні лише самого V_1 . Подальше збільшення дози V_2 до 8, а тим більше до 16 мг/кг, практично повертає показники ФЕТ і загального V_1 до вихідного рівня, хоча і з помітно гіршими значеннями таких показників як доля ФЕТ – 90,5% проти 94,0, і особливо співвідношення ФЕТ/(вільний тіамін) – до 9,6 проти 15,5. Тобто, для пари вітамінів V_1 - V_2 існує оптимальне співвідношення при введенні в організм по відношенню до обміну V_1 . Легко помітити, що це те ж саме співвідношення: вагове 6 : 1 і молярне 7 : 1.

Отримані дані підтверджують думку багатьох дослідників, що співвідношення вітамінів при їх надходженні в організм, особливо у вигляді комплексних полівітамінних препаратів, може мати вирішальне значення для ефективності реалізації ними їх специфічних функцій [1, 2, 235]. Проте, вирішення цієї проблеми дуже складне, коли мова йде вже не про суміші з двох-трьох компонентів, а з більшим їх числом. Очевидно, що для цього ще необхідно розробити адекватні методологічні підходи.

3.1.3. Біосинтез коферментних форм вітамінів V_1 і V_2 при введенні їх щурам у складі полівітамінних сумішей

Дослідження виконані на щурах лінії Вістар (статевозрілих, масою біля 200 г). З них було сформовано 7 груп по 7 тварин у кожній: 1) – контроль (інтактні); всім іншим внутрішньом'язово вводили препарати: 2) – V_1 ; 3) – V_2 ; 4) – рибофлавінмононуклеотид (ФМН); 5) – суміш (V_1 + ФМН + НА); 6) – (V_1 + ФМН + НА + V_3); 7) – (V_1 + ФМН + НА + V_3 + ЛК). Дози вітамінів як при індивідуальному введенні, так і в вигляді сумішей були частково обґрунтовані раніше [235] і в наших попередніх дослідженнях (розділ 3.1.1-2).

Через 3 години у крові і печінці тварин вимірювали вміст загальних флавінів (ЗФ) і флавінаденіндинуклеотиду (ФАД), а за різницею між ними вираховували фракцію (вільний рибофлавін + флавінмононуклеотид). У цих же тварин вимірювали вміст різних фракцій вітаміну V_1 : загальний тіамін (ЗТ), вільний тіамін (ВТ), а за їх різницею фосфорні ефіри тіаміну (ФЕТ).

Результати досліджень, що стосуються біосинтезу коферментних форм вітаміну В₁ (у даному разі це фракція ФЕТ, яка за даними різних авторів [241] на 90 – 95% складається з тіаміндифосфату), наведені на рисунку 3.2. Із нього видно, що через 3 години після ін'єкції тваринам самого лише В₁ незначно підвищується у крові вміст майже усіх форм цього вітаміну – і суттєво та достовірно лише вільного тіаміну (ВТ), хоча кількість його була незначною. На наш погляд це свідчить про те що доза вітаміну була близькою до фізіологічної, а це і дає надію виявити більш-менш тонкі деталі механізмів, що вивчаються. У той же час у печінці закономірності були чіткими, достовірними і однозначними для всіх фракцій: значне зростання, і в основному за рахунок ФЕТ – більше ніж у 1,5 рази. На відміну від цього, введення щурам самого ФМН майже не вплинуло на ці показники – відмічено лише незначне і недостовірне їх зниження.

Введення щурам тривітамінної суміші (В₁ + ФМН + НА) дало набагато кращій стосовно ФЕТ результат, порівняно з введенням самого В₁. І приріст цієї фракції збільшувався по мірі ускладнення сумішей. Паралельно зростали і два інших показника, у тому числі і вміст ВТ. Все це свідчить про те, що, хоча приріст ФЕТ при використанні більш складних сумішей у тому числі і 5-компонентної, був не дуже значним, порівняно з введенням трикомпонентної (В₁ + ФМН + НА), але і затримувався в організмі він краще (загальна сума всіх форм).

Додаткову інформацію можна отримати при розрахунках двох видів співвідношень: 1) співвідношення у печінці концентрацій ФЕТ/ВТ та 2) співвідношення вмісту ФЕТ – печінка/кров. Вони можуть стати особливо корисними при порушеннях системи біосинтезу коферменту. Але і в даному випадку можна говорити, що ін'єкції полівітамінних сумішей помітно покращують показники обміну цього вітаміну, на відміну від введення моновітамінного препарату ФМН.

За такою ж схемою вивчався і біосинтез коферментних форм вітаміну В₂ (рис. 3.3). Але тваринам для порівняння вводили сам вітамін В₂ (рибофлавін) і рибофлавінмононуклеотид (ФМН). Видно, що помітними перевагами перед рибофлавіном ФМН має лише при біосинтезі ФАД: його рівень в печінці після

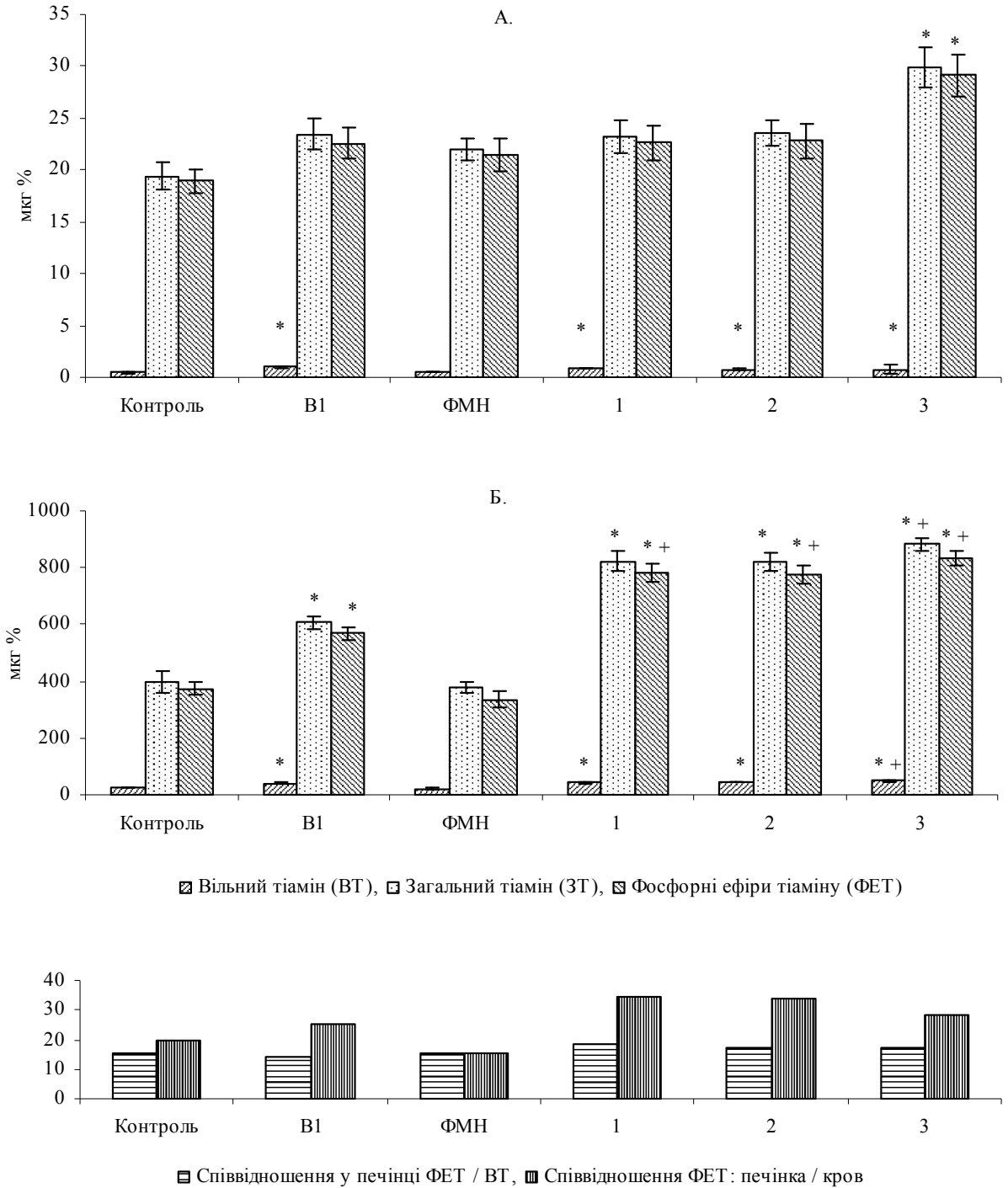


Рис. 3.2. Вміст різних форм вітаміну В₁ в мкг% в крові (А) та печінці (Б) щурів через 3 години після ін'єкції їм тіаміну та різних полівітамінних сумішей, до яких він входить (n = 7). Примітка: 1 – (В₁ + ФМН + НА), 2 – (В₁ + ФМН + НА + В₃), 3 – (В₁ + ФМН + НА + В₃ + ЛК), * – різниця з контролем достовірна (p < 0,05), + – різниця з введенням В₁ достовірна (p < 0,05).

введення першого зростає на 33%, а другого – на 54%. Крім того, ФМН має і інші переваги – наприклад вищу розчинність, що робить його більш придатним для

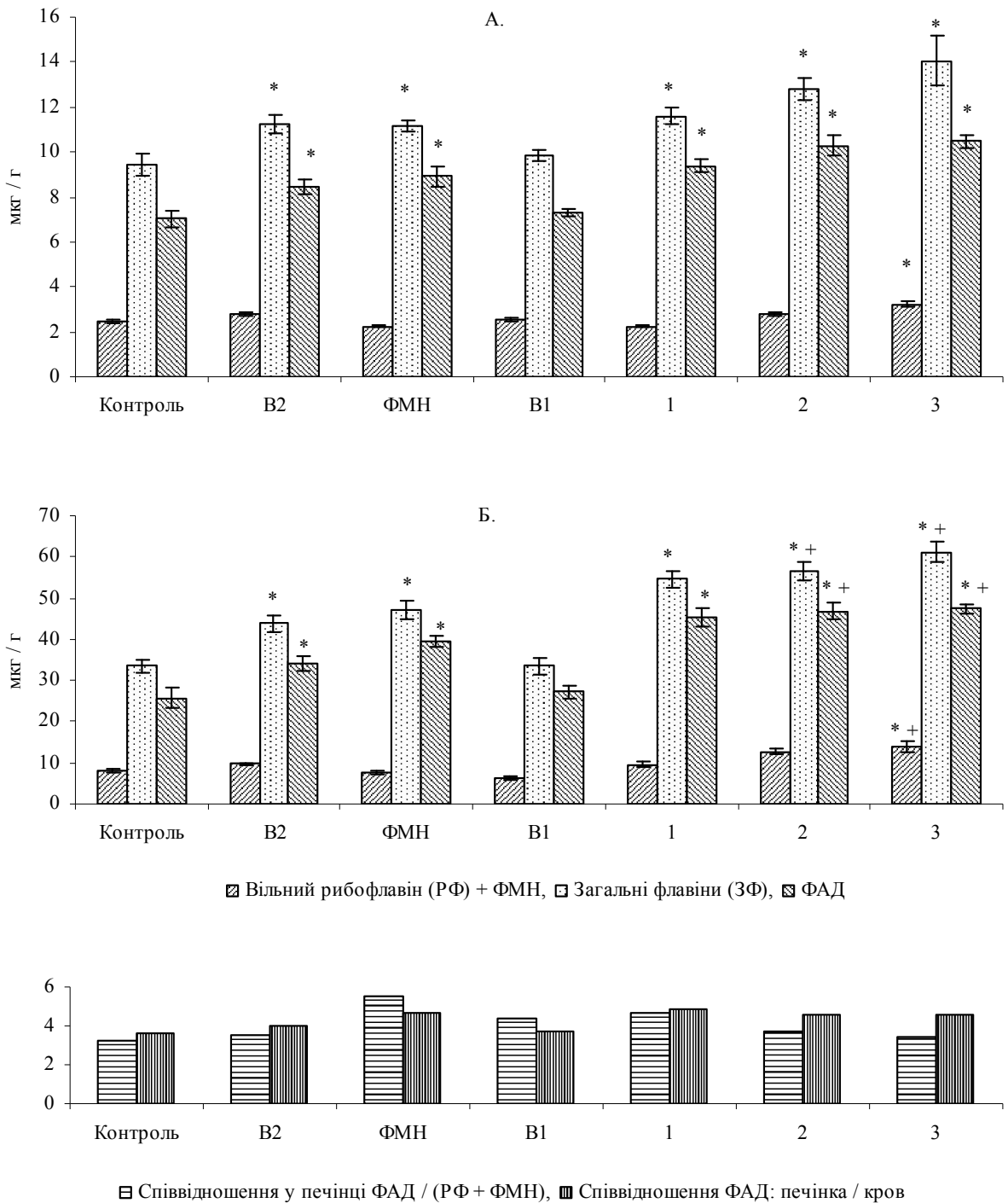


Рис. 3.3. Вміст різних форм вітаміну В₂ в мкг/г в крові (А) та печінці (Б) щурів через 3 години після ін'єкції їм рибофлавіну, ФМН та різних полівітамінних сумішей, до яких ФМН входить (n = 7). Примітка: 1 – (В₁ + ФМН + НА), 2 – (В₁ + ФМН + НА + В₃), 3 – (В₁ + ФМН + НА + В₃ + ЛК), * – різниця з контролем достовірна (p < 0,05), + – різниця з введенням ФМН достовірна (p < 0,05).

створення сумішей. Ін'єкції вітаміну В₁ дуже незначно вплинули на показники біосинтезу коферментних форм вітаміну В₂.

Ін'єкції тваринам ФМН у складі полівітамінних сумішей приводить до кількох наслідків. По-перше, інтенсивність його перетворення у ФАД хоч і помірно, але зростає: достовірно кращий результат порівняно з ним дають лише 4- і 5-компонентні препарати. По-друге, це досягається як за рахунок більш високої ефективності системи біосинтезу ФАД при введенні сумішей, порівняно з введенням B_2 (співвідношення ФАД/(РФ+ФМН)), так і шляхом кращого утримання всіх фракцій вітаміну в організмі (вміст усіх фракцій і значення співвідношення для ФАД: печінка/кров).

Таким чином, використання сумішей вітамінів має певні переваги не тільки тоді, коли відмічається дефіцит багатьох з них, але і при моногіповітамінозах, викликаних якимись специфічними факторами або умовами. Але при цьому збалансованість як набору, так і їх доз має велике значення. Проте використання якогось одного з вітамінів буде завжди загрожувати більшими побічними несприятливими наслідками, чим сумішей, особливо коли мова йде про парентеральний шлях введення, або використання значних доз.

3.2. Вплив ін'єкцій вітамінів групи В та їх сумішей на активність піруватдегідрогеназного комплексу в органах щурів

3.2.1. Динаміка дії препаратів

Дослідження виконані на білих безпородних щурах – самцях, масою 160 – 180 г. Тваринам внутрішньом'язово вводили водні розчини субстанцій вітамінів, або їх суміші: (B_1 + ФМН), (B_1 + ФМН + НА), (B_1 + ФМН + НА + B_3), (B_1 + ФМН + НА + B_3 + ЛК) з тими ж дозами що і раніше.

Тварин брали у дослід через 1, 3, 6 і 24 години. У гомогенатах з їх органів вимірювали активність піруватдегідрогеназного комплексу (ПДК). Отримані нами дані представлені у рисунках 3.4-6. З рисунків можна бачити, що дещо більшою із

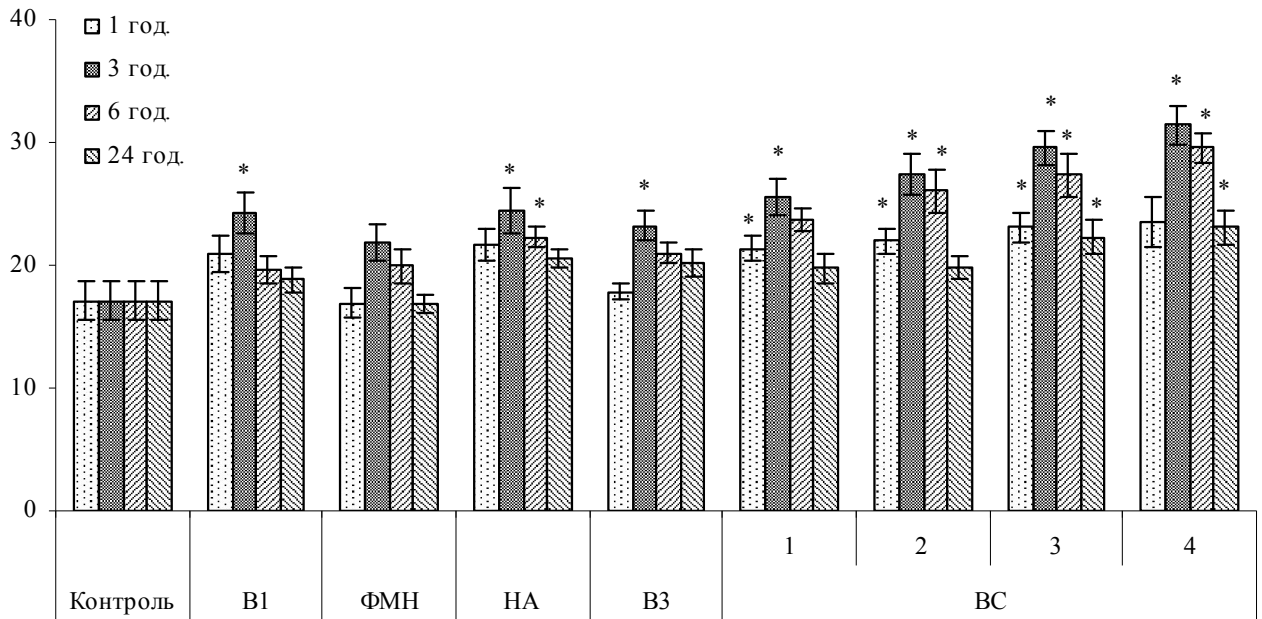


Рис. 3.4. Зміни активності ПДК в мозку щурів через різний час після введення вітамінів або їх сумішей, мкмоль відновленого фериціаніду на 1 г тканини за 30 хв ($n = 8$). Примітка: 1 – ($B_1 + \text{ФМН}$), 2 – ($B_1 + \text{ФМН} + \text{НА}$), 3 – ($B_1 + \text{ФМН} + \text{НА} + B_3$), 4 – ($B_1 + \text{ФМН} + \text{НА} + B_3 + \text{ЛК}$), * – різниця з контролем достовірна ($p < 0,05$).

органів, що вивчались, вона є у серці (вихідні рівні – відповідні контролю). Через 1 годину після введення моновітамінних препаратів у головному мозку тільки B_1 та НА дали помітний приріст активності ПДК (22,3% та 26,2%, відповідно) і в печінці – B_1 (38,7%), НА (13,0%) і B_3 (18,2%). У серцевому м'язі достовірних змін не відмічено.

Через 3 години ситуація кардинально змінилась. У всіх органах моновітамінні препарати викликали суттєвий і у більшості випадків достовірний ріст активності ПДК, причому найбільшим, як у абсолютному значенні, так і у відсотках приросту, він був у печінці. Слід зазначити, що у мозку, як і в печінці найбільший приріст давав B_1 .

Через 6, а тим більше через 24 години після введення, ефект дії моновітамінних препаратів практично зникає, хоча для дії B_3 в останній строк спостереження як правило відмічено невеликий підйом: для печінки – достовірний як порівняно з контролем, так із попереднім періодом (6 годин). Це може бути пов'язано з фазовим характером обміну самої пантотенової кислоти.

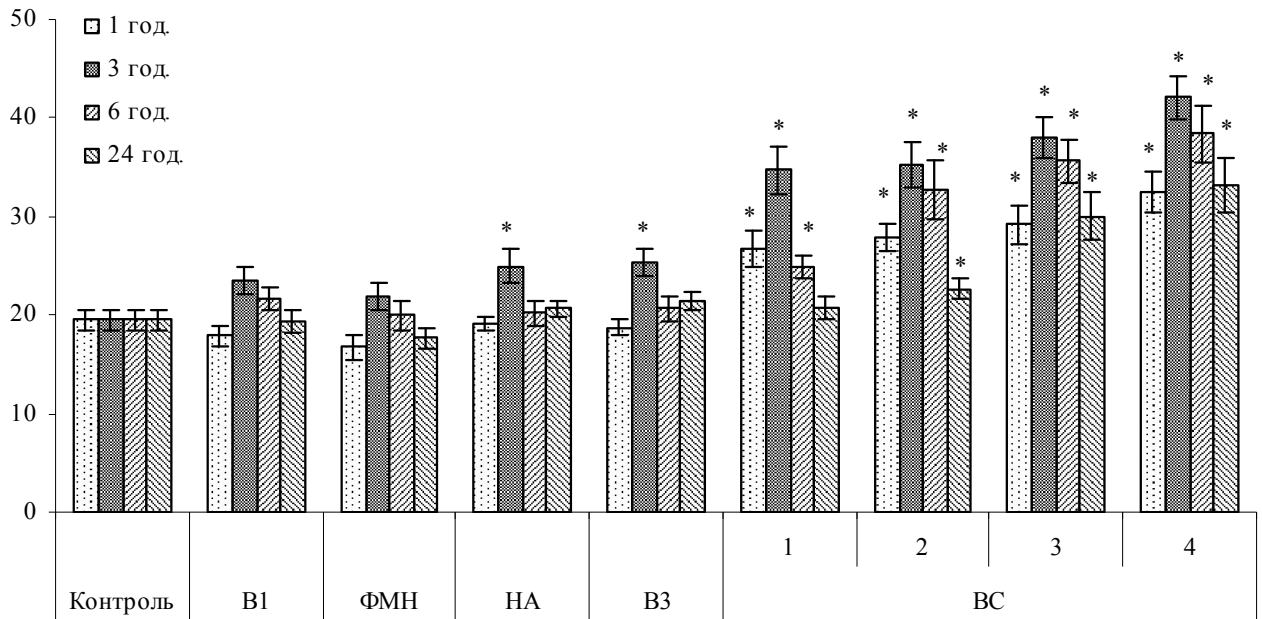


Рис. 3.5. Зміни активності ПДК в серці щурів через різний час після введення вітамінів або їх сумішей, мкмоль відновленого фериціаніду на 1 г тканини за 30 хв ($n = 8$). Примітка: 1 – ($B_1 + \text{ФМН}$), 2 – ($B_1 + \text{ФМН} + \text{НА}$), 3 – ($B_1 + \text{ФМН} + \text{НА} + B_3$), 4 – ($B_1 + \text{ФМН} + \text{НА} + B_3 + \text{ЛК}$), * – різниця з контролем достовірна ($p < 0,05$).

Що стосується полівітамінних композицій, то всі вони володіли помітно більшою стимулюючою дією на активність ПДК, ніж моновітаміни. Але для мозку це мало помітно через 1 годину після введення, коли всі полівітамінні суміші дають приблизно однаковий і невеликий приріст активності: від 24,6% для ($B_1 + \text{ФМН}$), до 37,2% – для 5-компонентної. Через 3 та 6 годин, а особливо для першого з цих строків, відмічено суттєве зростання активності ПДК. При цьому найбільший приріст її спостерігався при переході до більш складних сумішей. І хоча різниця між ними у їх дії була не дуже великою (і статистично не завжди достовірною), всі вони значно перевищували за своєю ефективністю будь-який із досліджених моновітамінів. Через 24 години ефект дії всіх препаратів і сумішей практично нівелювався і активність ПДК майже поверталась до вихідного рівня. І лише 4- та 5-компонентні суміші ще зберігали невеликий ефект, приблизно такий же, що спостерігався через 1 годину після ін'єкції – 25 – 30%.

У серці відмічені такі ж закономірності, що і у головному мозку, але вони були виражені більш яскраво. По-перше вже через 1 годину після ін'єкцій ефект

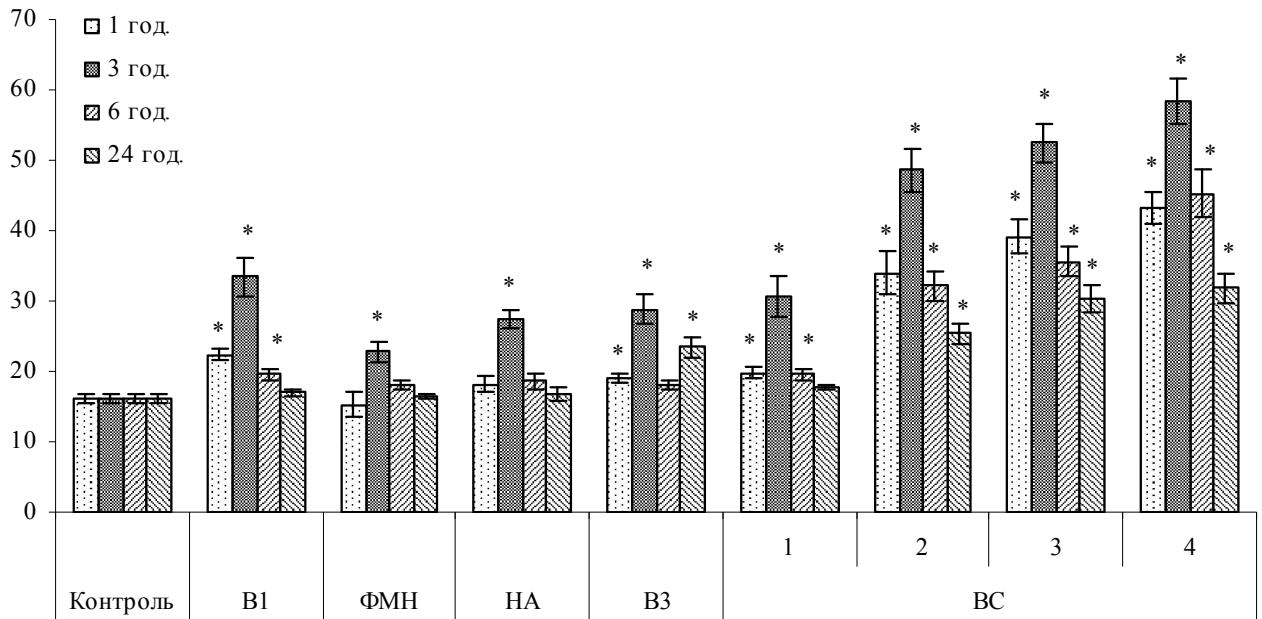


Рис. 3.6. Зміни активності ПДК в печінці щурів через різний час після введення вітамінів або їх сумішей, мкмоль відновленого фериціаніду на 1 г тканини за 30 хв ($n = 8$). Примітка: 1 – ($B_1 + \text{ФМН}$), 2 – ($B_1 + \text{ФМН} + \text{НА}$), 3 – ($B_1 + \text{ФМН} + \text{НА} + B_3$), 4 – ($B_1 + \text{ФМН} + \text{НА} + B_3 + \text{ЛК}$), * – різниця з контролем достовірна ($p < 0,05$).

дії полівітамінних сумішей був набагато вищим, ніж моновітамінів, він зростав від 2-компонентної до 5-компонентної від 36,7% до 65,8%. Через 3 години як стимулююча дія, так і різниця з моновітамінами зростали ще більше: активація зростала у такій же послідовності від 77,7% до 115,6%. У подальші строки ефект поволі знижувався, але стимулююча дія залишалась все ж досить значною і через 6 годин, а для 4- і 5-компонентної – навіть і через 24 години. Тобто, стимулююча дія цих двох останніх сумішей не лише досягає великих значень у період максимального ефекту, але і зберігається значною мірою у більш пізні періоди – від 6 до 24 год.

Найбільш яскраво вказані ефекти та закономірності їх розвитку у часі можна спостерігати у печінці. Суттєва активація ПДК в цьому органі встановлена вже через 1 годину після ін'єкції (рис. 3.6): приріст від 22,9% для ($B_1 + \text{ФМН}$) до 168,6% для 5-компонентної. Через 3 години він досягає максимальних значень не лише для моновітамінів, але і для сумішей з них: вказані значення зростають відповідно до 90,7% і 262,9%. Через 6 годин настає значне зниження величин

приросту. Відповідно позначенням сумішей (на рис. 3.2.1.1) маємо: ($B_1 + \text{ФМН}$) – 21,3; ($B_1 + \text{ФМН} + \text{НА}$) – 99,2; ($B_1 + \text{ФМН} + \text{НА} + B_3$) – 121,6; ($B_1 + \text{ФМН} + \text{НА} + B_3 + \text{ЛК}$) – 181,3%. Тобто і в цей період приріст все ж залишається значним. Через 24 години величина приросту продовжує падіння, але для сумішей ($B_1 + \text{ФМН} + \text{НА}$) – ($B_1 + \text{ФМН} + \text{НА} + B_3 + \text{ЛК}$) вона зберігається на досить високому рівні: 63,5; 88,4 і 98,9%, відповідно.

Таким чином, найбільш виражений стимулюючий ефект вітамінних препаратів, що вивчалися, а особливо полівітамінних сумішей спостерігався через 3 години після введення. Це пояснюється тим, що до цього строку відбувається повне перетворення вітамінів в їх коферментні форми, що і забезпечує підвищення активності залежних від них ферментів [242].

Більш високу активацію піруватдегідрогеназної реакції після введення полівітамінних сумішей і більшу тривалість її, особливо для 4- і 5-компонентних комбінацій, пояснюється не тільки сумісною участю їх вітамінних компонентів вже у формі коферментів у функціонуванні ПДК. Тут діє багато факторів, головні серед яких такі. Після введення вітамінних сумішей відбувається значне посилення тканевого дихання, що підвищує загальний рівень обмінних процесів, сприяє синтезу білків, у тому числі апоферментів ПДК [75, 146]. Важливу роль відіграє при цьому здатність вітамінних компонентів у сумішах підсилювати депонування один одного в тканинах і синтез з них відповідних коферментних форм [72, 75, 235].

3.2.2. Вікові особливості дії ін'єкцій вітамінної суміші

Експерименти провадили на щурах Вістар трьох вікових груп (2 тижні – молоді, 3 міс. – дорослі, 24 міс. – старі), які були стандартними для таких досліджень.

Кожну вікову групу тварин розподіляли на дві підгрупи, в яких тваринам внутрішньом'язово вводили фізіологічний розчин (ФР) або вітамінну суміш (ВС) – 0,2 мл на 100 г ваги. При цьому дози вітамінів, введених тваринам у складі ВС,

Таблиця 3.5

Вплив ін'єкцій ВС на активність ПДК в органах щурів різного віку, мкмоль відновленого фериціаніду на 1 г тканини за 30 хв (n = 8)

Органи	Типи активності ПДК	Молоді щури (2 тижні)		Дорослі щури (3 міс.)		Старі щури (24 міс.)	
		ФР	ВС	ФР	ВС	ФР	ВС
Печінка	I	17,6 ± 0,41	21,02 ± 0,52*	26,40 ± 0,63"	37,04 ± 0,92**	13,11 ± 0,36"	27,84 ± 0,72**
	II	38,15 ± 1,46	66,11 ± 1,41*	45,70 ± 0,73"	73,18 ± 1,71**	19,17 ± 0,44"	39,17 ± 0,96**
Нирки	I	26,85 ± 0,54	33,07 ± 0,36*	39,40 ± 0,96"	75,16 ± 1,71**	29,24 ± 0,59	38,17 ± 1,95**
	II	38,12 ± 1,26	42,21 ± 1,05	51,47 ± 1,02"	139,27 ± 4,80**	31,91 ± 1,07"	59,23 ± 3,81**
Мозок	I	14,01 ± 0,35	15,09 ± 0,39	46,93 ± 0,92"	75,47 ± 1,91**	15,99 ± 0,40	40,06 ± 1,60**
	II	24,05 ± 0,82	1,37 ± 0,81*	100,07 ± 3,90"	188,63 ± 4,31**	17,93 ± 0,45"	54,37 ± 1,36**
Серце	I	27,39 ± 0,78	35,16 ± 0,92*	69,76 ± 1,93"	97,36 ± 3,29**	52,61 ± 1,37"	82,15 ± 2,32**
	II	56,53 ± 1,86	93,38 ± 3,17*	75,46 ± 2,52"	221,80 ± 7,71**	47,73 ± 1,92"	156,93 ± 5,21**

Примітки: 1. * – зміни після ін'єкцій ВС достовірні (p<0,05);

2. " – зміни порівняно з групою молодих щурів достовірні (p<0,05);

3. I – «діюча» доля ПДК, II – повна активність ПДК.

розраховані на кг ваги тварин, були такими ж як описано раніше. Через 2 години після ін'єкцій тварин брали у дослід і визначали в їх органах активність піруватдегідрогеназного комплексу (ПДК) Для ПДК визначали дві форми активності: активну долю і повну активність. Активна доля (нефосфорильована), далі «діюча», виявляється у конкретних умовах метаболізму. Повна активність складається з «діючої» форми і «резервної» (фосфорильованої), яка реалізується при зменшенні у тканинах концентрації АТФ, співвідношення відновлених та окислених нікотинамідних коферментів і таке інше.

Результати досліджень представлені у таблиці 3.5. Встановлено, що обидві форми активності ПДК були найвищими у контрольних дорослих тварин (ін'єкції ФР). Співвідношення між повною активністю і «діючою» долею було найбільшим у дорослих і молодих тварин, а найменшим – у старих.

Після ін'єкцій ВС найбільший абсолютний приріст активності відзначається у дорослих тварин, а найбільший відносний – у старих. Це свідчить про те, що у молодих тварин активність ПДК лімітується біосинтезом білків-апоферментів, а у старих – синтезом коферментів.

Таким чином, з'ясовано, що активність піруватдегідрогеназного комплексу досягає максимального рівня в органах дорослих щурів, у яких найбільшим є і співвідношення між повною активністю ПДК і її «діючою» долею. Ін'єкції тваринам вітамінного суміші викликають найбільше зростання абсолютної активності ПДК у дорослих тварин, а найбільше відносне зростання – у старих.

3.3. Рівень макроергічних фосфатів в органах щурів після введення вітамінних препаратів

3.3.1. Динаміка вмісту макроергічних фосфатів в органах щурів після введення їм вітамінних сумішей

Різні способи введення вітамінів та їх сумішей. Дослідження провадили на статеві зрілих самцях щурів лінії Вістар, масою 180 – 200 г. Суміші вітамінів

різного складу вводили внутрішньом'язово або внутрішньошлунково (зондом) в об'ємі 0,5 мл за 1, 3, 24 години до декапітації.

Для дослідів були використані такі суміші: 1) ($B_1 + \text{ФМН}$); 2) ($B_1 + \text{ФМН} + \text{НА}$); 3) ($B_6 + \text{ФМН} + \text{НА}$); 4) ($B_1 + \text{ФМН} + \text{НА} + B_6$); 5) ($B_1 + \text{ФМН} + \text{НА} + B_3 + B_6 + \text{ліпоева кислота}$). Незалежно від складу сумішей індивідуальні дози вітамінів були такими ж як і раніше.

В гомогенатах, виготовлених на фізіологічному розчині, визначали вміст макроергічних нуклеотидних фосфатів. Аналіз отриманих результатів щодо макроергічних нуклеотидних фосфатів (МНФ) (табл. 3.6-7) показує, що як ін'єкції, так і внутрішньошлункове введення найменшої з сумішей ($B_1 + \text{ФМН}$) помітно підвищує їх вміст в органах і тканинах. При цьому він стає максимальним через 3 години і всюди його зростання досягає 30 – 40% для внутрішньом'язового введення. Що стосується внутрішньошлункового введення, то за такої ж динаміки у мозку і серці ефект дещо нижчий, а в печінці і відділах шлунково-кишкового тракту – вищий, хоча і незначно, і як правило через 3 години.

При використанні трьохкомпонентних сумішей приріст вмісту МНФ був більшим і вказані закономірності динаміки залишались, але суміш ($B_1 + \text{ФМН} + \text{НА}$) була помітно ефективніша за ($B_6 + \text{ФМН} + \text{НА}$).

Перехід від 3-компонентних препаратів до 4-компонентного дав незначний приріст у 7 – 10% порівняно з ($B_1 + \text{ФМН} + \text{НА}$). Це свідчить про те, що ресурс подальшого зростання вмісту МНФ вже практично вичерпаний. Такий висновок підтверджується при переході до використання 6-компонентного препарату. Для нього характерне падіння ефекту до рівня 3-компонентної суміші ($B_1 + \text{ФМН} + \text{НА}$), а в печінці і в слизових оболонках відділів шлунково-кишкового тракту – навіть до рівня двохкомпонентної.

Таким чином, отримані дані свідчать про те, що можливості стимуляції енергетичної системи організму (судячи по рівню макроергічних сполук) з допомогою вітамінних препаратів і сумішей досить обмежені. Для цього існує кілька причин. По-перше, вітаміни, що мають відношення до енергетики, самі

Таблиця 3.6

Вміст макроергічних нуклеотидних фосфатів в органах і слизових оболонках різних відділів шлунково-кишкового тракту щурів (в мкг Φ_n /г тканини) через різний час після введення їм внутрішньом'язово полівітамінних препаратів (n = 8)

Органи	Контроль	Час (год)	$B_1 + \Phi M H$	$B_1 + \Phi M H + H A$	$B_6 + \Phi M H + H A$	$B_1 + \Phi M H + H A + B_6$	$B_1 + \Phi M H + H A + B_3 + B_6 + J K$
Мозок	$48,5 \pm 2,5$	1	$57,3 \pm 3,3$	$69,7 \pm 4,8^*$	$63,7 \pm 5,5$	$77,4 \pm 3,9^*$	$66,1 \pm 4,3^*$
		3	$68,1 \pm 6,6^*$	$89,6 \pm 6,3^*$	$73,1 \pm 4,9^*$	$99,9 \pm 4,1^*$	$78,8 \pm 4,9^*$
		24	-	$59,9 \pm 5,1$	-	$66,6 \pm 2,6^*$	$57,4 \pm 3,6$
Серце	$60,2 \pm 3,5$	1	$85,9 \pm 5,7^*$	$98,4 \pm 6,8^*$	$84,0 \pm 3,9^*$	$108,0 \pm 6,6^*$	$88,6 \pm 5,3^*$
		3	$93,7 \pm 6,9^*$	$128,0 \pm 10,0^*$	$99,0 \pm 5,0^*$	$142,0 \pm 8,1^*$	$101,1 \pm 5,4^*$
		24	-	$72,2 \pm 4,7$	-	$79,9 \pm 5,9$	$69,9 \pm 4,4$
Печінка	$75,3 \pm 6,4$	1	$96,6 \pm 7,7^*$	$116,3 \pm 6,5^*$	$98,0 \pm 5,1^*$	$128,0 \pm 7,8^*$	$93,1 \pm 5,8$
		3	$109,0 \pm 10,1^*$	$152,0 \pm 6,0^*$	$119,0 \pm 5,0^*$	$179,0 \pm 7,7^*$	$125,4 \pm 6,7^*$
		24	$79,0 \pm 3,6$	$108,0 \pm 6,0^*$	$78,0 \pm 3,3$	$110,0 \pm 4,9^*$	$99,4 \pm 5,8^*$
Шлунок	$64,5 \pm 3,6$	1	$83,3 \pm 4,9^*$	$77,4 \pm 2,8^*$	$72,0 \pm 3,4$	$85,5 \pm 4,7^*$	$75,5 \pm 4,5$
		3	$89,7 \pm 6,6^*$	$108,0 \pm 3,0^*$	$79,0 \pm 3,6$	$120,0 \pm 7,3^*$	$92,2 \pm 5,6^*$
		24	-	$89,3 \pm 3,7^*$	-	$99,1 \pm 6,1^*$	$73,3 \pm 3,8$

Продовження табл. 3.6

Органи	Контроль	Час (год)	B ₁ +ФМН	B ₁ +ФМН+НА	B ₆ +ФМН+НА	B ₁ +ФМН+НА+B ₆	B ₁ +ФМН+НА+B ₃ +B ₆ +ЛК
12-пала кишка	106,1 ± 5,9	1	105,0 ± 10,0*	104,4 ± 7,6	107,0 ± 6,3	115,0 ± 5,4	107,3 ± 7,1
		3	141,0 ± 12,0*	173,0 ± 10,0*	149,0 ± 6,9*	192,0 ± 8,8*	140,0 ± 11,1*
		24	-	122,0 ± 7,0	-	135,0 ± 6,3*	119,1 ± 7,7
Тонкий кишківник	102,8 ± 5,5	1	104,0 ± 6,0	103,0 ± 7,0	105,0 ± 6,3	114,0 ± 5,0	107,7 ± 5,7
		3	133,0 ± 12,0*	163,0 ± 9,0*	137,0 ± 5,9*	181,0 ± 7,9*	146,6 ± 6,3*
		24	-	144,0 ± 6,0*	-	159,0 ± 6,8*	126,3 ± 5,8*

Примітка. * – різниця з контролем достовірна (p < 0,05)

Таблиця 3.7

Вміст макроергічних нуклеотидних фосфатів в органах і слизових оболонках різних відділів шлунково-кишкового тракту щурів (в мкг Φ_n /г тканини) через різний час після введення їм внутрішньошлунково полівітамінних препаратів (n = 8)

Органи	Контроль	Час (год)	$B_1 + \Phi M H$	$B_1 + \Phi M H + H A$	$B_6 + \Phi M H + H A$	$B_1 + \Phi M H + H A + B_6$	$B_1 + \Phi M H + H A + B_3 + B_6 + J K$
Мозок	$48,5 \pm 2,5$	1	$52,7 \pm 3,8$	$53,4 \pm 3,9$	$56,1 \pm 3,7$	$59,9 \pm 2,8$	$50,3 \pm 3,7$
		3	$62,9 \pm 4,9^*$	$77,6 \pm 7,3^*$	$67,4 \pm 4,4^*$	$85,6 \pm 3,9^*$	$63,3 \pm 3,4$
		24	-	$63,4 \pm 4,1^*$	-	$69,9 \pm 3,2^*$	$58,1 \pm 2,6$
Серце	$60,2 \pm 3,5$	1	$67,7 \pm 3,8$	$72,3 \pm 7,1^*$	$68,0 \pm 3,9$	$79,9 \pm 3,3^*$	$69,9 \pm 3,6$
		3	$86,3 \pm 8,8^*$	$111,0 \pm 9,0^*$	$89,0 \pm 2,7^*$	$93,0 \pm 5,9^*$	$76,6 \pm 3,9^*$
		24	-	$70,1 \pm 5,8$	-	$77,7 \pm 2,9$	$68,8 \pm 3,8$
Печінка	$75,3 \pm 6,4$	1	$84,4 \pm 7,6$	$91,6 \pm 3,5$	$86,0 \pm 3,9$	$102,0 \pm 6,3^*$	$84,4 \pm 4,7$
		3	$120,0 \pm 11,0^*$	$150,0 \pm 7,0^*$	$119,0 \pm 6,6^*$	$167,0 \pm 7,9^*$	$117,7 \pm 6,6^*$
		24	$81,0 \pm 4,6$	$86,4 \pm 5,1$	$88,0 \pm 5,1$	$125,5 \pm 5,5^*$	$99,1 \pm 4,8^*$
Шлунок	$64,5 \pm 3,6$	1	$71,1 \pm 3,9$	$75,3 \pm 3,6$	$62,0 \pm 4,1$	$83,3 \pm 5,3^*$	$72,2 \pm 3,9$
		3	$94,3 \pm 8,1^*$	$132,0 \pm 8,0^*$	$103,0 \pm 6,7^*$	$147,0 \pm 8,7^*$	$106,4 \pm 6,1^*$
		24	-	$85,9 \pm 4,7^*$	-	$95,5 \pm 5,1^*$	$74,8 \pm 5,2$

Продовження табл. 3.7

Органи	Контроль	Час (год)	$V_1 + \Phi MH$	$V_1 + \Phi MH + HA$	$V_6 + \Phi MH + HA$	$V_1 + \Phi MH + HA + V_6$	$V_1 + \Phi MH + HA + V_3 + V_6 + ЛК$
12-пала кишка	$106,1 \pm 5,9$	1	$117,0 \pm 8,0$	$129,0 \pm 3,1^*$	$122,0 \pm 7,7$	$143,0 \pm 8,1^*$	$125,5 \pm 6,2$
		3	$144,0 \pm 11,0^*$	$179,0 \pm 9,5^*$	$150,0 \pm 7,5^*$	$199,0 \pm 8,0^*$	$150,3 \pm 5,2^*$
		24	-	$140,0 \pm 6,4^*$	-	$150,0 \pm 7,3^*$	$125,6 \pm 4,9$
Тонкий кишківник	$102,8 \pm 5,5$	1	$110,0 \pm 10,0$	$117,0 \pm 5,1$	$113,0 \pm 6,6$	$129,0 \pm 6,0^*$	$115,5 \pm 6,3$
		3	$129,0 \pm 11,0$	$162,0 \pm 8,0^*$	$137,0 \pm 6,4^*$	$177,0 \pm 6,8^*$	$140,0 \pm 6,1^*$
		24	-	$98,4 \pm 5,7$	-	$141,0 \pm 6,9^*$	$120,1 \pm 5,9^*$

Примітка. * – різниця з контролем достовірна ($p < 0,05$)

потребують АТФ для синтезу коферментних форм. По-друге, на варті стабілізації рівня АТФ мабуть стоїть і система АТФаз, оскільки співвідношення АТФ/АДФ є одним із важливих регуляторів енергетичного метаболізму. Тому при значних і особливо надмірних надходженнях вітамінів в організм результат може бути негативним по різних показниках: неефективне використання вітамінів, зниження ресурсу швидкодоступних макроергічних сполук, дезорганізація механізмів регулювання енергетичних процесів і т. ін. Проте, це можливо лише у випадку неконтрольованого прийому людиною вітамінних препаратів медичного призначення.

Треба також зазначити, що вітаміни групи В і їх суміші здатні стимулювати утворення макроергічних фосфатів в організмі лише до певної межі. Збільшення і кількості і доз приводить до насичення ефекту, а потім – і до його зменшення.

Різні фракції і дози вітамінів. В експериментах використовували статевозрілих щурів лінії Вістар, масою 180 – 200 г. Їм за 1, 6 і 24 години до досліду внутрішньом'язово вводили окремо або у виді сумішей вітаміни групи В. Індивідуальні дози вітамінів були як і раніше. В органах тварин визначали загальний вміст макроергічних фосфатів, які представлені в основному нуклеотидфосфатами (здебільшого АТФ) і креатинфосфатом. Шляхом осадження оцтовокислою ртуттю нуклеотидної частини загальні макроергічні фосфати були розділені на дві фракції: нуклеотидні і нуклеотидні.

У першій серії досліджень, ми вивчали в порівняльному аспекті здатність тіаміну, ТДФ, НА, а також їх сумішей впливати на вміст різних фракцій макроергічних сполук у печінці щурів (рис. 3.7). Нами були підтверджені дані А. Я. Розанова і Т. М. Цитко [243], що ін'єкції ТДФ у більшому ступені чим тіамін підвищують вміст макроергічних сполук у тканинах тварин. Не уступає по цій здатності тіамінові і НА. Однак використання трьох- і чотирьохкомпонентних полівітамінних сумішей виявилось ще більш ефективним.

У дещо більш складному варіанті нами була вивчена дія на ці показники вже п'яти- і шестикомпонентних сумішей (табл. 3.8-9). Ці дослідження були вико-

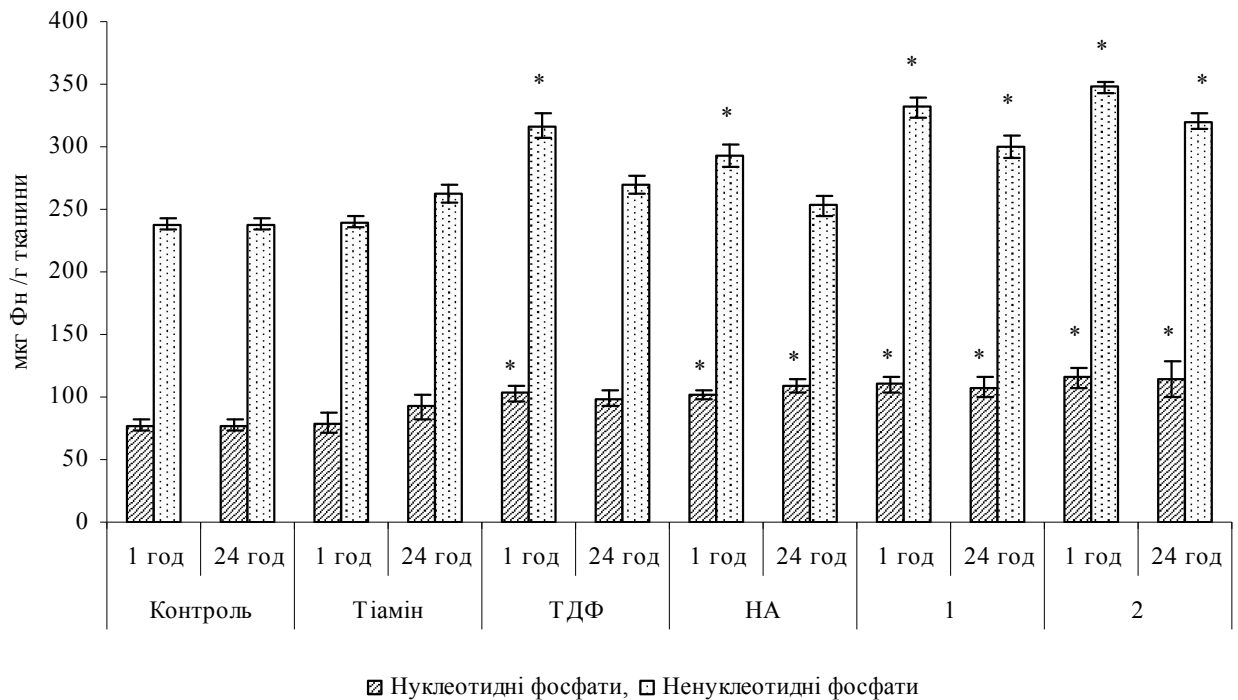


Рис. 3.7. Вміст ненуклеотидних і нуклеотидних фракцій макроергічних фосфатів (мкг Ф_н/г тканини) у печінці щурів через різний час після ін'єкції їм вітамінних препаратів (n = 10). Примітка: 1 – (В₁ + ФМН + НА), 2 – (В₁ + ФМН + НА + В₆), * – різниця з контролем достовірна (p < 0,05).

нані на щурах у більш широкій часовій динаміці. При цьому у якості другого контролю ми взяли варіант з ін'єкцією тваринам еквімолярної стосовно пантотенату дози CaCl₂, тому що нами використовувалися кальцієва сіль В₃. З цих дослідів видно, що найбільшою і практично однаковою ефективністю володіли 5- і 6-компонентні препарати. Їхня дія була максимальною через 6 годин після ін'єкції та у більшому ступені зберігалася і через 24 години. При цьому вміст нуклеотидних фосфатів був більш стабільним. У цілому ж, дія усіх вивчених вітамінів та їхніх комбінацій не була дуже велика (приріст не більш 15 – 30%). Відзначимо, що характер їхньої дії на рівень макроергічних фосфатів (але не ступінь) корелює з ефектами, які спостерігаються для активностей дегідрогеназ 2-оксокислот [235, 244], але виражений набагато слабкіше. Особливо цікавим є результат, отриманий при уведенні тваринам подвоєної дози 6-компонентного препарату. Тут ми бачимо виражене зниження вмісту нуклеотидної фракції,

особливо в перші 2 терміни спостереження (1 і 6 годин). Фракцію нуклеотидних фосфатів така дія препаратів торкалася в меншому ступені.

Таблиця 3.8

Вміст різних фракцій макроергічних фосфатів у головному мозку та у серцевому м'язі білих щурів (мкг Φ_n /г тканини) через різний час після ін'єкції їм вітамінних препаратів (n = 7)

Варіанти досліджу		Час (години)		
		0,5	6	24
		Мозок		
Контроль 1 (інтактні)	1	165 ± 14	164 ± 12	161 ± 8
	2	48,5 ± 2,5	46,3 ± 3,3	47,6 ± 3,9
Контроль 2 (CaCl ₂)	1	169 ± 12	173 ± 8	163 ± 9
	2	58,3 ± 1,6	54,1 ± 4,2	49,9 ± 2,3
B ₃	1	173 ± 11	181 ± 13	170 ± 10
	2	52,3 ± 2,7	53,4 ± 3,1	48,1 ± 2,6
B ₁ +ФМН+НА	1	178 ± 11	191 ± 13	167 ± 10
	2	56,0 ± 3,3	54,9 ± 2,9	47,6 ± 2,4
B ₁ +ФМН+НА+B ₃ +ЛК	1	185 ± 12	212 ± 13*	172 ± 8
	2	58,2 ± 2,5*	66,9 ± 3,3*	51,5 ± 2,8
B ₁ +ФМН+НА+B ₃ +ЛК+B ₆	1	185 ± 15	211 ± 9	176 ± 9
	2	58,5 ± 4,5	67,3 ± 5,9*	58,4 ± 3,3*
Подвоєна доза B ₁ +ФМН+НА+B ₃ +ЛК+B ₆	1	162 ± 10	170 ± 16	159 ± 12
	2	50,3 ± 3,7	52,4 ± 4,4	49,3 ± 3,1
		Серце		
Контроль 1 (інтактні)	1	206 ± 14	194 ± 15	211 ± 12
	2	60,2 ± 3,5	60,6 ± 4,6	62,8 ± 3,1
Контроль 2 (CaCl ₂)	1	219 ± 13	215 ± 16	218 ± 10
	2	66,8 ± 1,5	69,1 ± 1,5	64,9 ± 4,6
B ₃	1	220 ± 10	240 ± 11*	221 ± 11
	2	66,9 ± 2,6	72,4 ± 3,7	65,5 ± 2,5
B ₁ +ФМН+НА	1	240 ± 10	256 ± 11*	219 ± 10
	2	67,7 ± 5,3	73,4 ± 4,0	66,6 ± 3,6
B ₁ +ФМН+НА+B ₃ +ЛК	1	250 ± 9*	283 ± 15*	243 ± 16
	2	75,5 ± 2,8*	96,3 ± 2,9*	69,0 ± 3,7
B ₁ +ФМН+НА+B ₃ +ЛК+B ₆	1	254 ± 12*	291 ± 9*	251 ± 13*
	2	77,5 ± 3,1*	98,4 ± 3,2*	79,7 ± 7,1*

Варіанти досліду		Час (години)		
		0,5	6	24
		Серце		
Подвоєна доза В ₁ +ФМН+НА+В ₃ +ЛК+В ₆	1	209 ± 10	226 ± 17	220 ± 17
	2	66,4 ± 3,2	72,6 ± 4,4	60,3 ± 3,8

Примітки: 1. – нуклеотидні макроергічні фосфати; 2. – нуклеотидні макроергічні фосфати; * – різниця з контролем 1 достовірна (p < 0,05).

Таким чином, ін'єкції шурам вітамінів, ще в більшому ступені їхніх сумішей, здатні збільшувати в їхніх органах вміст усіх фракцій макроергічних

Таблиця 3.9

Вміст різних фракцій макроергічних фосфатів у печінці та нирках білих щурів (мкг Ф_н/г тканини) через різний час після ін'єкції їм вітамінних препаратів (n = 7)

Варіанти досліду		Час (години)		
		0,5	6	24
		Печінка		
Контроль 1 (інтактні)	1	243 ± 8	241 ± 6	239 ± 10
	2	71,4 ± 1,5	75,4 ± 4,5	75,6 ± 2,5
Контроль 2 (CaCl ₂)	1	254 ± 6	257 ± 9	257 ± 7
	2	75,4 ± 3,5	81,7 ± 4,5	77,7 ± 4,5
В ₃	1	258 ± 10	268 ± 12	260 ± 14
	2	79,6 ± 3,3	84,6 ± 3,6	77,9 ± 4,0
В ₁ +ФМН+НА	1	259 ± 12	277 ± 13*	260 ± 13
	2	80,1 ± 3,3	86,3 ± 4,0	79,4 ± 4,1
В ₁ +ФМН+НА+В ₃ +ЛК	1	273 ± 5*	289 ± 8*	263 ± 9
	2	93,9 ± 6,4	101 ± 4*	81,7 ± 3,4
В ₁ +ФМН+НА+В ₃ +ЛК+В ₆	1	270 ± 11	298 ± 12*	278 ± 11
	2	88,2 ± 2,8*	106 ± 6*	94,3 ± 2,8*
Подвоєна доза В ₁ +ФМН+НА+В ₃ +ЛК+В ₆	1	236 ± 19	263 ± 20	251 ± 19
	2	80,3 ± 3,1	82,1 ± 5,1	74,7 ± 4,8
		Нирки		
Контроль 1 (інтактні)	1	258 ± 10	259 ± 12	259 ± 8
	2	83,9 ± 4,5	81,9 ± 4,3	83,4 ± 4,9
Контроль 2 (CaCl ₂)	1	267 ± 12	267 ± 9	266 ± 7
	2	88,1 ± 4,9	82,9 ± 2,9	87,9 ± 5,9

Варіанти досліду		Час (години)		
		0,5	6	24
		Нирки		
В ₃	1	276 ± 14	286 ± 14	272 ± 13
	2	91,1 ± 3,6	91,5 ± 4,4	89,1 ± 3,7
В ₁ +ФМН+НА	1	280 ± 10	282 ± 13	277 ± 11
	2	99,3 ± 4,6*	104 ± 4*	90,1 ± 5,0
В ₁ +ФМН+НА+В ₃ +ЛК	1	286 ± 7	346 ± 9*	283 ± 10
	2	96,2 ± 3,8	124 ± 9*	96,1 ± 3,2
В ₁ +ФМН+НА+В ₃ +ЛК+В ₆	1	274 ± 11	344 ± 14*	282 ± 13
	2	102 ± 9*	114 ± 8*	101 ± 6
Подвоєна доза В ₁ +ФМН+НА+В ₃ +ЛК+В ₆	1	257 ± 23	251 ± 20	250 ± 24
	2	81,7 ± 9,3	88,4 ± 7,4	80,4 ± 6,6

Примітки: 1. – нуклеотидні макроергічні фосфати; 2. – нуклеотидні макроергічні фосфати; * – різниця з контролем 1 достовірна ($p < 0,05$).

фосфатів (нуклеотидних і нуклеотидних). Ефект зростає при збільшенні числа компонентів у вітамінній суміші, але вже для 5- і 6-компонентних стає однаковим. Підвищення дозування вітамінів у 6-компонентній суміші вдвічі приводить до протилежного результату – рівень обох фракцій макроергічних сполук, а особливо нуклеотидних, помітно падає, іноді навіть нижче вихідного (контроль 1) і особливо контролю 2 (ін'єкції CaCl₂).

Все сказане свідчить про наявність якогось контролюючого механізму, що стримує (оптимізує) рівень макроергічних сполук в тканинах, у якому ключову роль можуть відігравати АТФази.

3.3.2. Вплив пригнічення біосинтезу білка в організмі щурів на ефективність дії вітамінної суміші на рівень макроергічних фосфатів в їх органах

Дослідження провадили на щурах лінії Вістар (масою 150 – 200 г), яких утримували в умовах віварію. Суміш водорозчинних вітамінів (ВС) вводили внутрішньом'язово за 3 та за 24 години до внутрішньочеревинних ін'єкцій актиноміцину (АМ) і хлорамфеніколу (ХА). Дози вітамінів були такими ж як і

раніше. Дози антибіотиків становили: ХА – 80 мг/кг, АМ – 0,4 мг/кг. Їх вводили за 24 та 48 годин до декапітації.

Піддослідних щурів поділяли на 8 груп, яким відповідно вводили: 1) фізіологічний розчин (ФР) – контроль; 2) ВС; 3) ХА; 4) АМ; 5) (ХА + АМ); 6) (ВС + ХА); 7) (ВС + АМ); 8) (ВС + ХА + АМ).

Тварин брали в дослід через 24 години після другого введення дози антибіотиків. В гомогенатах, виготовлених на фізіологічному розчині (ФР), визначали вміст загальних макроергічних фосфатів.

Як видно з таблиці 3.10, дворазове ін'єкування щурам лише вітамінної суміші (ВС) суттєво, на 20-25%, підвищувало вміст загальних макроергічних фосфатів (ЗМФ) в органах і крові тварин порівняно з контролем. Іншій групі щурів вводили хлорамфенікол (ХА), і це не викликало суттєвих змін вмісту ЗМФ в крові, мозку та серці, в той час як у печінці спостерігалось його достовірне зниження (на 23%). Вітамінна суміш збільшувала зміни рівня ЗМФ, викликані хлорамфеніколом. Так, якщо в печінці при введенні ХА вміст його зменшувався на 23%, то за сумісного введення ВС і ХА – на 33%. Рівень макроергічних фосфатів у мозку при введенні ХА не змінювався. За попереднього введення ВС та ХА

Таблиця 3.10

Вплив антибіотиків та ВС на вміст загальних макроергічних фосфатів (мкмоль/г тканини) в органах і тканинах щурів (n = 7)

Варіанти	Кров	Печінка	Мозок	Серце
ФР (контроль)	2,52 ± 0,02	18,2 ± 0,8	13,2 ± 0,16	15,0 ± 0,7
ВС	2,91 ± 0,11	23,7 ± 0,6*	19,0 ± 0,7*	19,8 ± 0,6*
ХА	2,41 ± 0,05	13,9 ± 0,2*	14,3 ± 1,8	15,0 ± 0,8
ВС+ХА	2,24 ± 0,22	12,2 ± 0,4*	15,7 ± 1,0	15,0 ± 0,9
АМ	1,85 ± 0,14*	12,9 ± 0,4*	16,0 ± 1,3	16,0 ± 1,1
ВС+АМ	1,71 ± 0,11*	11,4 ± 0,9*	14,9 ± 0,6	17,8 ± 0,7
ХА+АМ	2,41 ± 0,12	16,1 ± 1,0	16,4 ± 2,2	16,4 ± 0,8
ВС+ХА+АМ	2,09 ± 0,06	12,0 ± 1,0*	13,6 ± 1,1	14,6 ± 1,3

Примітка. * – різниця з контролем достовірна (p < 0,05)

вміст загальних макроергічних фосфатів у мозку достовірно зріс на 19%. У серці після ін'єкції ХА та ВС не спостерігалось істотних змін рівня ЗМФ.

На відміну від ХА актиноміцин (АМ) викликав більш помітне і достовірне зменшення рівня ЗМФ у крові та печінці – на 27% та 29% відповідно, а у мозку і серці спостерігалась тенденція до збільшення концентрації ЗМФ. Після ін'єкції ВС сумісно з АМ вміст ЗМФ зменшувався у крові та печінці відповідно на 32% та 38%. В мозку і серці сумісне введення ВС та АМ змін рівня ЗМФ не викликало.

За одночасного введення ХА і АМ їх сумісна дія порівняно з окремими впливами кожного з антибіотиків у мозку і серці не зазнавала ніяких змін, а у крові і печінці навіть ставала менш виразною, отже сумарній ефектів цих антибіотиків на вміст ЗМФ не спостерігалось.

Попередня ін'єкція ВС не запобігала зниженню рівня ЗМФ у печінці під впливом ХА та АМ (він залишався нижчим контролю на 34%), але в інших органах і крові спостерігалось повернення цих показників до значень контролю.

Таким чином, з'ясовано, що за використання обох антибіотиків, які інгібують біосинтез білка в цитоплазмі (АМ) та мітохондріях (ХА), рівень ЗМФ достовірно знижувався лише у печінці, а у мозку та серці, навпаки, відбувалося помірне зростання вмісту ЗМФ. При сумісному введенні цих антибіотиків їх вплив на рівень ЗМФ порівняно з окремою дією кожного з них у мозку та серці не збільшується, а у крові та печінці навіть зменшується.

Попереднє введення тваринам ВС не призводить до істотного захисного ефекту проти дії вказаних антибіотиків на вміст ЗМФ у тканинах щурів, навіть за дворазового його введення у досить високих дозах. Це свідчить про суттєву залежність механізмів реалізації енергостимулюючої дії вітамінів групи В від стану білоксинтезуючої системи, яка повинна швидко реагувати на потреби організму у ферментах (чи апоферментах). Сюди треба віднести і можливий ефект індукції біосинтезу таких білків і тих, що задіяні в інших механізмах, які знаходяться в різних частинах клітини.

3.3.3. Дія вітамінної суміші на рівень загальних макроергічних фосфатів в умовах ішемії мозку

Для того, щоб зрозуміти, наскільки ефекти дії використаного суміші вітамінів здатні проявитись за умов гіпоксії (ішемії) нами і була проведена наступна серія досліджень.

Досліди провадили на щурах лінії Вістар (масою 180 – 200 г), яких за добу до експерименту позбавляли їжі, але не води. Ішемію мозку у наркотизованих тіопенталом (внутрішньочеревні ін'єкції у дозі 100 мг/кг, об'єм 0,2 мл) щурів викликали шляхом двобічної оклюзії сонних артерій. Щурам контрольної групи (контроль 1, удавано оперовані) робили тільки надріз на шиї. Через 60 хвилин після цього внутрішньом'язово вводили пікамилон (ПМ), пантогам (ПГ) та вітамінну суміш (ВС), а через наступні 60 хв тварин брали у дослід. Варіанти груп щурів і дози препаратів (мг/кг) були такими: 1) Контроль 1 (вводили фізіологічний розчин – ФР). Варіанти 2 – 6 – тварини з ішемією мозку: 2) Контроль 2 (ФР); 3) ПМ; 4) (ПМ + ВС); 5) ПГ; 6) (ПГ + ВС). Дози вітамінів у ВС були як і раніше [235].

Таблиця 3.11

Вплив ВС і ГАМК-кон'югатів на вміст загальних макроергічних фосфатів (мкг/г тканини) в органах і тканинах щурів за розвитку ішемії мозку (n = 7)

		Кров	Печінка	Мозок	Серце
	Контроль 1 (ФР, удавано оперовані)	85,7 ± 4,6*	429 ± 19	460 ± 20	441 ± 23*
Ішемія	Контроль 2 (ФР)	51,7 ± 2,9	393 ± 18	285 ± 12	257 ± 15
	ПМ	120 ± 5*	441 ± 21	468 ± 23*	313 ± 11*
	ПМ + ВС	122 ± 5*	421 ± 26	567 ± 28*	324 ± 17*
	ПГ	78,6 ± 3,3*	401 ± 20	437 ± 19*	419 ± 26*
	ПГ + ВС	129 ± 6,7*	412 ± 21	542 ± 25*	520 ± 27*

Примітка. * – різниця з контролем 2 достовірна (p < 0,05)

В органах тварин визначали вміст загальних макроергічних фосфатів (табл. 3.11) який за ішемічної гіпоксії суттєво зменшувався у крові, мозку та серці (в 1,6 – 1,7 рази). В печінці не було достовірних змін як за ішемії, так і після ін'єкцій всіх досліджених препаратів. Слід зазначити, що у крові, мозку та серці всі застосовані препарати призводили до зростання рівня цього показника. У крові і мозку більш потужну дію виявив пікамилон (ПМ), а у серці – пантогам (ПГ). Введення ВС майже в усіх варіантах досліджу сприяло зростанню рівня макроергічних фосфатів у тканинах за ішемії.

Таким чином, з'ясовано, що за використаної моделі ішемічної гіпоксії пригнічується енергетичний обмін не тільки в мозку, але і в інших органах і тканинах. Як ПМ, так і ПГ виявили здатність коригувати досліджений показник за ішемії, однак більш ефективним (особливо для мозку) виявився ПМ. Це можна пояснити високою проникаючою здатністю цієї сполуки і її потужною антигіпоксичною дією [245]. Застосована нами ВС сприяла позитивним впливам ПГ і ПМ на рівень ЗМФ за ішемії мозку, що пояснюється сумациєю дещо різних механізмів дії цих сполук. У цих досліджах, як і в попередніх (розділ 3.3.2) дія ВС мала той же ефект і спрямованість.

3.4. Зв'язок між Na^+ , K^+ -АТФазною активністю і вітамінами групи В

3.4.1. Порівняльна динаміка загальної АТФазної активності в органах щурів після різних способів введення їм вітамінної суміші

Дослідження провадили на статеві зрілих самцях щурів лінії Вістар, масою 180 – 200 г. Суміші вітамінів різного складу вводили внутрішньом'язово або внутрішньошлунково (зондом) в об'ємі 0,5 мл за 1, 3, 24 години до декапітації.

Для дослідів були використані такі суміші: 1) (B_1 + ФМН); 2) (B_1 + ФМН + НА); 3) (B_6 + ФМН + НА); 4) (B_1 + ФМН + НА + B_6); 5) (B_1 + ФМН + НА + B_3 + B_6 + ліпоева кислота). Незалежно від складу сумішей індивідуальні дози вітамінів були такими ж як і раніше. В експерименті вивчали динаміку змін АТФазної

активності в печінці і у слизових оболонках шлунково-кишкового тракту (ШКТ) (табл. 3.12-13). Встановлено, що ступінь її активації в печінці і слизовій оболонці шлунка була найбільшою через 1 годину, а в інших відділах ШКТ – через 1 – 3 год. Причому у печінці і шлунку різниці в результатах між способами введення

Таблиця 3.12

Загальна АТФазна активність печінки і слизових оболонок різних відділів шлунково-кишкового тракту щурів (в мкмоль Φ_H /мг білку за год) через різний час після введення їм внутрішньом'язово полівітамінних препаратів (n = 8)

	Час (год)	Печінка	Шлунок	12-пала кишка	Тонкий кишківник
Контроль	1	23,6 ± 1,1	22,5 ± 1,2	31,6 ± 1,3	27,0 ± 1,6
	3				
	24				
В ₁ +ФМН	1	32,2 ± 1,4*	29,1 ± 2,6	37,7 ± 2,1	34,4 ± 1,3*
	3	23,6 ± 1,1	27,7 ± 1,6	38,1 ± 2,1	31,5 ± 2,7
	24	24,8 ± 2,0	25,2 ± 2,1	29,2 ± 2,9	27,3 ± 2,7
В ₁ +ФМН+НА	1	32,6 ± 1,6*	30,2 ± 2,6*	38,9 ± 2,8	35,0 ± 2,7
	3	23,6 ± 1,9	26,6 ± 1,8	36,4 ± 1,3	32,6 ± 1,1
	24	26,1 ± 1,5	21,7 ± 1,2	31,8 ± 1,6	28,8 ± 3,0
В ₆ +ФМН+НА	1	29,5 ± 1,9*	28,1 ± 0,9*	35,5 ± 1,2	32,9 ± 2,1
	3	25,6 ± 1,9	27,0 ± 1,8	38,7 ± 0,9*	36,6 ± 2,3*
	24	28,0 ± 1,7	24,3 ± 1,6	31,1 ± 1,6	28,8 ± 1,9
В ₁ +ФМН+НА +В ₆	1	31,0 ± 2,0*	30,6 ± 3,2*	36,6 ± 1,7	39,8 ± 3,1*
	3	25,2 ± 1,3	26,5 ± 1,3	40,5 ± 1,4*	38,4 ± 1,5*
	24	25,1 ± 1,5	26,2 ± 2,9	39,1 ± 3,1	30,6 ± 1,4
В ₁ +ФМН+НА +В ₃ +В ₆ +ЛК	1	39,7 ± 2,4*	32,2 ± 3,1*	42,3 ± 3,3*	42,8 ± 2,8*
	3	34,6 ± 3,1*	30,0 ± 2,6*	44,6 ± 3,7*	42,0 ± 2,4*
	24	31,1 ± 2,8*	24,4 ± 2,4	39,4 ± 3,3	32,2 ± 2,6

Примітка. * – різниця з контролем достовірна (p < 0,05)

препаратів практично не відмічено, а в нижніх відділах ШКТ перевага була на боці внутрішньошлункового введення. При переході від 2-компонентної суміші (В₁ + ФМН), стимулюючий ефект якої складав 20 – 27%, до 3- і 4-компонентної активність АТФаз зростала незначно. І лише для 6-компонентної відмічено її помітний стрибок – до 45 – 65%. Динамічні закономірності при цьому майже не змінювались.

Таблиця 3.13

Загальна АТФазна активність печінки і слизових оболонок різних відділів шлунково-кишкового тракту щурів (в мкмоль Ф_н/мг білку за год) через різний час після введення їм внутрішньошлунково полівітамінних препаратів (n = 8)

	Час (год)	Печінка	Шлунок	12-пала кишка	Тонкий кишківник
Контроль	1	23,6 ± 1,1	22,5 ± 1,2	31,6 ± 1,3	27,0 ± 1,6
	3				
	24				
В ₁ +ФМН	1	28,2 ± 1,1*	31,3 ± 2,3*	39,2 ± 2,3	39,9 ± 1,7*
	3	23,3 ± 1,7	29,1 ± 1,9	36,7 ± 1,7	35,8 ± 2,4*
	24	23,4 ± 2,3	25,6 ± 2,2	28,4 ± 1,8	29,7 ± 1,7
В ₁ +ФМН+НА	1	28,1 ± 1,1*	30,6 ± 2,2*	40,7 ± 3,1*	37,4 ± 1,8*
	3	23,3 ± 2,1	27,3 ± 1,9	42,2 ± 2,2*	38,6 ± 2,5*
	24	27,6 ± 1,7	25,8 ± 1,4	33,3 ± 2,7	31,3 ± 2,2
В ₆ +ФМН+НА	1	30,6 ± 1,5*	33,2 ± 2,1*	41,9 ± 2,7*	39,6 ± 2,3*
	3	24,3 ± 1,4	26,3 ± 1,4	38,1 ± 2,1*	37,7 ± 1,7*
	24	25,9 ± 2,5	25,2 ± 1,8	33,3 ± 2,4	33,9 ± 1,3
В ₁ +ФМН+НА +В ₆	1	30,5 ± 2,1*	30,1 ± 2,5*	45,4 ± 3,4*	38,1 ± 2,3*
	3	25,7 ± 1,6	28,6 ± 1,7	39,9 ± 1,1*	43,3 ± 1,6*
	24	26,8 ± 2,7	25,1 ± 2,3	39,4 ± 2,8	32,8 ± 1,9

	Час (год)	Печінка	Шлунок	12-пала кишка	Тонкий кишківник
В ₁ +ФМН+НА +В ₃ +В ₆ +ЛК	1	36,6 ± 2,3*	33,3 ± 2,8	49,4 ± 3,8*	39,1 ± 2,6*
	3	33,3 ± 3,1*	33,0 ± 2,7*	45,5 ± 3,1*	49,6 ± 3,1*
	24	29,4 ± 2,7	26,9 ± 2,9	39,9 ± 3,6	37,7 ± 3,2*

Примітка. * – різниця з контролем достовірна ($p < 0,05$)

Таким чином, отримані дані свідчать про те, що введення тваринам вітамінних препаратів викликає дозозалежне зростання в їх органах загальної АТФазної активності. І нарешті зазначимо: між активністю Mg-активованої Na⁺, K⁺-АТФази і рівнем макроергічних фосфатів (див. розділ 3.3.1.) в організмі існує зв'язок: при малих дозах вітамінів прямий, а при великих – зворотній.

Тобто, Na⁺, K⁺-АТФаза відіграє роль стабілізатора (або оптимізатора) рівнів макроергічних сполук і пов'язаних з ними фосфорильованих коферментів.

3.4.2. Вплив суміші вітамінів групи В на активність Na⁺, K⁺-АТФази в органах щурів в умовах інгібування біосинтезу білка

Дослідження провадили на щурах лінії Вістар (масою 150 – 200 г), яких утримували в умовах віварію. Суміш водорозчинних вітамінів (ВС) вводили внутрішньом'язово за 3 та за 24 години до внутрішньочеревинних ін'єкцій актиноміцину (АМ) і хлорамфеніколу (ХА). Дози вітамінів були такими ж як і раніше. Дози антибіотиків становили: ХА – 80 мг/кг, АМ – 0,4 мг/кг. Їх вводили за 24 та 48 годин до декапітації.

Піддослідних щурів поділяли на 8 груп, яким відповідно вводили: 1) фізіологічний розчин (ФР) – контроль; 2) ВС; 3) ХА; 4) АМ; 5) (ХА + АМ); 6) (ВС + ХА); 7) (ВС + АМ); 8) (ВС + ХА + АМ).

Тварин брали в дослід через 24 години після другого введення дози антибіотиків. В гомогенатах, виготовлених на фізіологічному розчині (ФР), визначали активність Na^+ , K^+ -АТФази.

В таблиці 3.14 представлені дані про вплив внутрішньочеревинних ін'єкцій актиноміцину (АМ) і хлорамфеніколу (ХА) та внутрішньом'язового введення вітамінної суміші (ВС) на активність Na^+ , K^+ -АТФази у досліджуваних органах і крові.

Таблиця 3.14

Вплив вітамінної суміші та інгібіторів синтезу білка на активність Na^+ , K^+ -АТФази (мкмоль Φ_n /мг год) в тканинах щурів (n = 7)

	Кров	Печінка	Мозок	Серце
ФР	1,230 ± 0,097	9,63 ± 2,75	15,77 ± 0,42	44,39 ± 2,01
ВС	3,080 ± 0,218	13,25 ± 0,63	29,96 ± 1,17	62,15 ± 3,27
ХА	0,320 ± 0,133*	5,79 ± 1,85	3,20 ± 0,35*	19,25 ± 0,07*
АМ	1,090 ± 0,195	5,45 ± 2,23	3,20 ± 0,14*	17,86 ± 4,39*
ХА + АМ	0,040 ± 0,003	3,58 ± 2,62	1,80 ± 0,14*	1,42 ± 0,20*
ВС + ХА	0,110 ± 0,040	8,93 ± 0,52	6,68 ± 1,95	4,60 ± 0,07 ⁺
ВС + АМ	0,040 ± 0,002 ⁺	2,99 ± 0,03	4,59 ± 0,07	12,98 ± 0,69
ВС + ХА + АМ	0,110 ± 0,008 ⁺	5,79 ± 2,06	3,20 ± 0,07	1,11 ± 0,20

Примітки: 1. * – різниця з контролем достовірна (p < 0,05);

2. ⁺ – різниця у порівнянні відповідно з ХА і АМ та (ХА + АМ) достовірна (p < 0,05)

Перш за все необхідно відмітити, що введення тваринам лише самої ВС значно підвищило активність Na^+ , K^+ -АТФази у крові – в 2,5 рази, в печінці – в 1,37, у мозку – в 1,91 і серці – в 1,40. Слід визначити, що введення ХА та АМ, навпаки, викликало суттєве і достовірне зменшення активності Na^+ , K^+ -АТФази в усіх органах і тканинах. Так, при введенні ХА вона порівняно з контролем зменшувалась у крові на 74, печінці – на 40, мозку – на 80 та серці – на 57%. При цьому актиноміцин викликав зменшення активності цього ферменту у крові лише на 11%, а в органах майже таке ж, що і ХА: в печінці – на 43,5, мозку – на 80, серці – на 60%. Сумісне введення антибіотиків (АМ+ХА) ще більшою мірою

зменшило активність Na^+ , K^+ -АТФази: в крові – на 97, печінці – на 63, мозку – на 87 та серці – на 86%.

Попереднє введення вітамінної суміші та ХА викликало ще більше, порівняно з самим ХА, зменшення активності Na^+ , K^+ -АТФази в крові (на 91%) та серці (на 90%). Але в печінці і мозку ВС дещо зменшувала ефект ХА: до 67,5 та 58%, відповідно. Вітамінна суміш теж підсилювала інгібуючу дію АМ на активність Na^+ , K^+ -АТФази в крові (до 99), печінці (до 69), серці (до 71%), але не в мозку. Сумісне введення (ВС + ХА + АМ) викликало зменшення інгібуючої дії (АМ + ХА) на активність Na^+ , K^+ -АТФази в органах більше ніж у 1,5 рази, а у крові – в 2,5 рази.

Таким чином, обидва використані антибіотики суттєво, і майже в однаковій мірі, знижують активність Na^+ , K^+ -АТФази в органах щурів, хоча дія АМ носить більш широкий характер. ВС більш-менш ефективно протистоїть інгібуючій дії на Na^+ , K^+ -АТФазу ХА в печінці і мозку, а дії АМ – лише у мозку, і то неістотно. Із цього витікає, що токсичний ефекту АМ вищий, чим у ХА, і саме він визначає дію суміші (ХА + АМ). Отримані дані вказують на те, що при сумісному введенні цих антибіотиків спостерігається сумація їх інгібуючої дії, але ведучим можна вважати АМ. Попередні ін'єкції ВС дають певний і дещо різний захисний ефект проти дії антибіотиків на активність даного ферменту, але при введенні одразу двох антибіотиків він був не дуже великим. Тобто, реалізація дії ВС на дану АТФазу суттєво залежить від стану білоксинтезуючої системи, як і самий прояв їх специфічної (коферментної) активності.

3.4.3. Активність Na^+ , K^+ -АТФази в органах щурів за ішемії і її корекції вітамінвміщуючими сумішами

Досліди провадили на щурах лінії Вістар (масою 180 – 200 г), яких за добу до експерименту позбавляли їжі, але не води. Ішемію мозку у наркотизованих тіопенталом (внутрішньочеревні ін'єкції у дозі 100 мг/кг, об'єм 0,2 мл) щурів викликали шляхом двобічної оклюзії сонних артерій. Щурам контрольної групи

(контроль 1, удавано оперовані) робили тільки надріз на шії. Через 60 хвилин після цього внутрішньом'язово вводили пікамилон (ПМ), пантогам (ПГ) та вітамінну суміш (ВС), а через наступні 60 хв тварин брали у дослід. Варіанти груп щурів і дози препаратів (мг/кг) були такими: 1) Контроль 1 (вводили фізіологічний розчин – ФР). Варіанти 2 – 6 – тварини з ішемією мозку: 2) Контроль 2 (ФР); 3) ПМ; 4) (ПМ + ВС); 5) ПГ; 6) (ПГ + ВС). Дози вітамінів у ВС були як і раніше. В органах тварин визначали активність Na^+ , K^+ -АТФази.

Було встановлено, що ішемічна гіпоксія призводила до зниження активності Na^+ , K^+ -АТФази у крові, печінці, мозку і серці на 18 – 41% (табл. 3.15).

Коригуючий ефект застосованих нами ГАМК-кон'югатів на активність Na^+ , K^+ -АТФази практично в усіх випадках був безперечним, а вітамінна суміш (ВС) майже, завжди посилювала дію пікамилону (ПМ) і пантогаму (ПГ). Слід зазначити, що часто ефект препаратів був надто сильним. Так, після введення ПМ і ПМ + ВС спостерігалось перевищення контрольного рівня активності Na^+ , K^+ -АТФази в 1,4 – 1,5 рази у мозку. Вплив ПГ і ПГ + ВС у цьому органі був значно слабкішим, але все ж достатньо вираженим.

Таблиця 3.15

Вплив ВС і ГАМК-кон'югатів на активність Na^+ , K^+ -АТФази (мкмоль Φ_{H}/Γ хв) в органах і тканинах щурів за розвитку ішемії мозку (n = 7)

		Кров	Печінка	Мозок	Серце
	Контроль 1 (ФР, удавано оперовані)	$12,2 \pm 0,5^*$	$56,5 \pm 2,8^*$	$56,1 \pm 1,7^*$	$56,1 \pm 3,5^*$
Ішемія	Контроль 2 (ФР)	$10,0 \pm 0,3$	$34,6 \pm 2,8$	$38,4 \pm 0,8$	$33,2 \pm 1,5$
	ПМ	$12,7 \pm 0,6^*$	$46,3 \pm 3,6^*$	$78,7 \pm 2,8^*$	$54,3 \pm 5,6^*$
	ПМ + ВС	$13,4 \pm 0,9^*$	$49,3 \pm 2,4^*$	$85,5 \pm 1,3^*$	$82,2 \pm 5,4^*$
	ПГ	$13,5 \pm 0,6^*$	$56,7 \pm 2,4^*$	$50,8 \pm 1,1^*$	$41,3 \pm 1,9^*$
	ПГ + ВС	$14,0 \pm 1,0^*$	$66,8 \pm 3,9^*$	$64,7 \pm 2,6^*$	$39,0 \pm 2,8$

Примітка. * – різниця з контролем 2 достовірна ($p < 0,05$)

Зазначимо, що у крові та печінці більш високі значення цього показника спостерігалися після використання ПМ, а у мозку та серці – після введення ПГ.

Таким чином, з'ясовано, що за використаної моделі ішемічної гіпоксії пригнічується активність Na^+ , K^+ -АТФази не тільки в мозку, але і в інших органах і тканинах. Як ПМ, так і ПГ виявили здатність коригувати досліджений показник за ішемії, однак більш ефективним (особливо для мозку) виявився ПМ. При цьому ВС помітно посилювала їх дію на Na^+ , K^+ -АТФазу.

3.4.4. Вплив введення щурам суміші вітамінів групи В на активність Na^+ , K^+ -АТФази, виділеної із їх тканин

На перевірку раніше висунутих нами гіпотез про механізми впливу вітамінів на рівень макроергічних сполук і активність АТФаз ми провели наступні дослідження. В експерименті використовували 16 щурів лінії Вістар масою $160,0 \pm 5,0$ г. Щурів було поділено на дві групи. Першій групі (контрольна) вводили внутрішньом'язово фізіологічний розчин. Другій групі (дослідна) вводили у такий же спосіб вітамінну суміш (ВС) складу: тіамін (B_1), флавінмононуклеотид (ФМН), пантотенова кислота (B_3), нікотинамід (НА) та ліпоєва кислота. Дози вітамінів були як і раніше. Тварин брали в дослід через 2 години після введення фізіологічного розчину.

Ідентифікацію та чистоту отриманих препаратів Na^+ , K^+ -АТФази визначали методом електрофорезу. Отримані результати наведені у рисунку 3.8, з якого витікає, що нами були дійсно виділені і очищені препарати цього ферменту, точніше відповідних сумішей із узятих у дослід тканин щурів.

Результати виділення ферменту з органів тварин були такими. Як вказувалось вище, органи (мозок і нирки) з кожної з двох груп тварин (по 8) об'єднувались. Їх наважки були при цьому однакові для груп і виділення ферменту проводили одночасно і в однакових умовах. Проте загальна кількість виділеного ферменту була дещо вищою у тварин, яким вводили полівітамінний суміш (табл. 3.16).

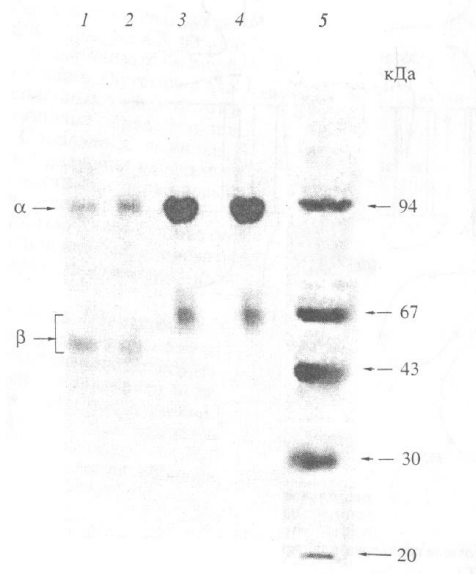


Рисунок 3.8. Електрофореграма препаратів Na^+ , K^+ -АТФази сірої речовини мозку (1, 2) та зовнішніх медул нирок (3, 4) щурів; (5) – стандартна білкова суміш. (1, 3) – препарати контрольної групи, (2, 4) – препарати дослідної групи. Праворуч показано положення білків – маркерів, ліворуч – положення α - та β - субодиниць Na^+ , K^+ -АТФази

При цьому для нирок приріст становив 31,6%, а для мозку – 28,8%, тобто майже в однаковій мірі. До того ж зазначимо, що з мозку його виділено більше майже у 4 рази чим з нирок. Це на наш погляд пояснюється тим, що мозок складається із збудливих тканин, де роль цього ферменту є особливо визначною.

Таблиця 3.16

Загальна кількість, ступінь очистки та повна активність ферментних препаратів Na^+ , K^+ -АТФази з органів двох груп тварин

Органи	Загальна кількість ферменту (мг білка)		Співвідношення активностей гомогенат/препарат		Повна активність виділених препаратів (мкмоль Φ_{H} / на весь білок за год)	
	Контроль	ВС	Контроль	ВС	Контроль	ВС
Мозок	22,20	28,60	973	952	1362 ± 910*	3461 ± 317*
Нирки	5,88	7,74	1083	959	1357 ± 122*	2038 ± 196*

Примітка. * – різниця з контролем достовірна ($p < 0,05$)

Що стосується ступеня очистки, то його можна досить просто вирахувати із даних, що наведені у таблиці 3.16. Для цього потрібно розділити питому активність очищеного препарату на активність у гомогенаті. Отримані дані свідчать про наступне. По-перше, ступінь очистки з обох органів досить високий і мало відрізняється. По-друге, ін'єкції ВС на цей показник практично не вплинули, тобто не змінився ні фізіологічний, ні біохімічний стан тканин.

Аналіз даних, представлених у таблиці 3.17, показує що у нормі (контроль) питома активність Na^+ , K^+ -АТФази у нирках набагато вища ніж у мозку, причому майже в однаковій мірі як для гомогенатів, так і очищених препаратів – у 3,4 та 3,8 разів, відповідно.

Після ін'єкцій ВС ця закономірність виражена менше: 2,15 та 2,17 разів. Тобто ВС у більшій мірі активує АТФазу мозку, чим нирок. Це просліджується як у гомогенатах, де активація становить для мозку 2,0, а для нирок – 1,29 разів, так і для очищених препаратів – 1,98 та 1,15 разів. При цьому вказана активація виразна і достовірна.

Таблиця 3.17

Активність Na^+ , K^+ -АТФази в гомогенатах і очищених ферментних препаратах із мозку та нирок щурів через 2 години після введення суміші вітамінів, мкмоль Φ_n /мг за год (n = 5)

Органи	Гомогенати органів		Очищений препарат Na^+ , K^+ -АТФази	
	Контроль	ВС	Контроль	ВС
Мозок	0,063 ± 0,005	0,127 ± 0,008*	61,3 ± 5,7	121 ± 15*
Нирки	0,213 ± 0,018	0,274 ± 0,021*	231 ± 18	263 ± 24

Примітка. * – різниця з контролем достовірна (p < 0,05)

Проте деякий інтерес викликає і величина всієї (повної) активності цього ферменту, що був виділений з органів тварин, тобто з урахуванням кількості його

у мг білку. Перемноження питомої активності очищеного ферменту (табл. 3.17) на вміст ферментного білку дає такі значення (табл. 3.16).

Із цих даних видно, що повна активність цього (виділеного) ферменту в органах контрольних тварин майже однакова. Ін'єкції ВС її підвищують ще більш суттєво і виразно, ніж питому активність (табл. 3.17). Із цього витікає, що після ін'єкції ВС зростає не тільки кількість самого ферменту в тканинах, але і його активність, тобто спостерігається не тільки збільшення кількості ферменту (можливо внаслідок індукції), але і активація вже наявних його молекулярних комплексів.

Таким чином було встановлено, що активність ферменту суттєво зростає після введення ВС як в гомогенатах, так і очищених препаратах Na^+ , K^+ -АТФази. Ін'єкції ВС збільшують як питому (на мг білку) так і ще в більшій мірі загальну (на всю фракцію) активність Na^+ , K^+ -АТФази. Отримані дані свідчать про те, що є дуже висока ймовірність існування як механізмів регуляції цієї ферментної системи вітамінами, так і їх впливу на утворення її *de novo*. З другого боку, Na^+ , K^+ -АТФаза у свою чергу бере участь у транспорті (або всмоктуванні) вітамінів і біосинтезі їх коферментних форм та підтриманні оптимального рівня ЗМФ і енергетичних механізмів. Такі зв'язки характерні для саморегульованої стаціонарної системи.

Результати досліджень надруковані у наступних виданнях:

1. Дія вітамінного комплексу на показники енергетики в тканинах щурів різного віку / Н. В. Полтавцева, Т. В. Васильєва, Л. М. Карпов, В. Ю. Анісімов, О. М. Єршова // Вісник Одеського державного університету імені І. І. Мечникова. – 2000. – Т. 5, № 1. – С. 30-34.
2. Полтавцева Н. В. Показники обміну енергії у щурів за ішемії головного мозку та їх корекція ГАМК – вміщуючими похідними вітамінів / Н. В. Полтавцева, В. Ю. Анісімов // Вісник Одеського національного університету імені І. І. Мечникова. Серія: біологія. – 2002. – Т. 7, № 1. – С. 228-234.

3. Анісімов В. Ю. Вміст загальних макроергічних фосфатів у тканинах щурів після введення вітамінної суміші та антибіотиків / В. Ю. Анісімов // Вісник Одеського національного університету імені І. І. Мечникова. Серія: біологія. – 2004. – Т. 9, № 5. – С. 7-10.
4. Карпов Л. М. Вплив комплексу вітамінів групи В на активність Na, К-АТФази в умовах інгибування біосинтезу білка в тканинах та органах щурів / Л. М. Карпов, В. Ю. Анісімов, О. В. Безп'ятих // Аграрний вісник Причорномор'я. Сільськогосподарські та біологічні науки. – 2005. – № 31. – С. 188-189.
5. Карпов Л. М. Порівняльна динаміка вмісту макроергічних фосфатів і загальної АТФазної активності в органах щурів після різних способів введення їм вітамінних комплексів / Л. М. Карпов, В. Ю. Анісімов, Н. В. Полтавцева // Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія: біологія. – 2008. – Вип. 7, № 814. – С. 13-17.
6. Карпов Л. М. Действие витаминов группы В и их комплексов на содержание различных фракций макроэргических фосфатов в органах крыс / Л. М. Карпов, В. Ю. Анісімов, Н. В. Полтавцева // Аграрний вісник Причорномор'я. Сільськогосподарські та біологічні науки. – 2008. – № 43. – С. 118-124.
7. Карпов Л. М. Вплив комплексу вітамінів групи В на активність Na⁺-, К⁺-АТФази у тканинах щурів / Л. М. Карпов, В. Ю. Анісімов // Досягнення біології та медицини. – 2009. – № 1. – С. 8-10.
8. Карпов Л. М. Вплив вітамінів групи В на біосинтез нікотинамідних коферментів в тканинах мишей / Л. М. Карпов, В. Ю. Анісімов // Одеський медичний журнал. – 2009. – № 5. – С. 7-10.
9. Карпов Л. М. Взаємодія вітамінів В₁ і В₂ у біосинтезі їх коферментних форм у щурів / Л. М. Карпов, В. Ю. Анісімов // Досягнення біології та медицини. – 2009. – № 2. – С. 11-14.
10. Карпов Л. М. Активність піруватдегідрогеназного комплексу в органах щурів через різні терміни після внутрішньом'язового введення вітамінів групи В та їх комплексів / Л. М. Карпов, В. Ю. Анісімов // Вісник Харківського національного

університету імені В. Н. Каразіна. Серія: біологія. – 2009. – Вип. 10, № 878. – С. 16-20.

11. Анісімов В. Ю. Утворення коферментних форм вітамінів В₁ і В₂ при введенні їх щурам у складі полівітамінних комплексів / В. Ю. Анісімов, Л. М. Карпов // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2010. – № 1. – С. 30-34.

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ ДАНИХ ТА ЇХ УЗАГАЛЬНЕННЯ

Шляхи перетворення багатьох вітамінів у діючі форми – коферменти – є досить складними та енергозатратними (наприклад B_1 , B_2 , B_3 , PP, B_6), включають етапи фосфорилування, або навіть діють у вигляді фосфатів, близьких до макроергічних сполук. Крім того, процес всмоктування і транспорту через біомембрани також у своїй більшості є для них енергозалежними, а у деяких випадках пов'язаними з активністю Na^+ , K^+ -АТФази [109, 100, 240].

Загальновідомим є також факт, що вітаміни в організмі взаємодіють один з одним [3, 235]. Причому це досить чітко простежується на самих різних рівнях – як на долі кожного з них (депонування, протеїдизація, біосинтез коферментних форм, обмін, виведення з організму), так і при виконанні ними специфічних функцій [4, 96, 235, 244].

Важливо відмітити, що характер цієї взаємодії може бути різним в залежності від величини введених в організм доз, їх співвідношення, способу введення, а також і стану організму [4, 146, 246, 247, 248]. Це може бути синергізм, конкуренція і навіть антагонізм. Проте і до теперішнього часу конкретні механізми цієї взаємодії у більшості випадків залишаються нез'ясованими. Крім того, ми вважаємо, що таких механізмів досить багато, діють вони всі одночасно, але внесок того, чи іншого, або кількох, у конкретних ситуаціях може стати найбільшим, чи навіть вирішальним. А інші механізми у таких випадках відходять на задній план і помічаються в меншій мірі.

Більшість із названих проблем досліджуються вже багато років, але все ж таки існує необхідність більш чітко і конкретно вивчити регуляцію процесів перетворення в організмі названих вітамінів у коферментні форми, а також і реалізації їх функцій, з урахуванням фактору взаємодії.

У зв'язку з цим у якості першої поставили перед собою задачу взаємодії вітамінів. На першому етапі ми досліджували вплив різних доз вітаміну B_1 та його комбінацій з іншими вітамінами групи В на біосинтез нікотинамідних

коферментів у деяких тканинах мишей. Результати таких досліджень свідчать, що тіамін і при індивідуальному введенні тваринам стимулює утворення нікотинамідних коферментів, особливо відновлених, з ендогенних ресурсів вітаміну РР. Причому ефект цей помітно зростає при підвищенні дози В₁ від 2 до 8 мг/кг. Вітамін В₁ ще більше підсилює також і здатність НА підвищувати рівень коферментних форм нікотинової кислоти у разі сумісного введення цих вітамінів. Результат був максимальним при певних співвідношеннях між НА і В₁, а саме 10 : 2 при дозі НА 20 мг/кг і 10 : 4 – при більш високій дозі у 80 мг/кг. При подальшому зростанні дози В₁ ефект значно слабшав, або навіть міняв знак, тобто інтенсивність утворення коферментних форм вітаміну РР ставала меншою, чим навіть зовсім без В₁. При співвідношенні між вітамінними препаратами НА і В₁ 20 і 6 мг/кг (або 10 : 3). ПК і ФПК збільшували вміст обох форм нікотинамідних коферментів через 3 години після введення. Їх дія на рівень нікотинамідних коферментів базується на тому, що вони взаємодіють з вітаміном РР, який вже є в організмі, тобто мобілізують його ендогенні ресурси. Ін'єкції тваринам НА викликали суттєве (особливо через 3 і 24 години) підвищення рівня окиснених і дещо менше – відновлених форм нікотинамідних коферментів як у крові, так і в печінці. При цьому ефект був найбільшим через 3 години. Ще більшою дією володіли і полівітамінні суміші, причому ефект поступово зростав по мірі збільшення кількості вітамінів в них: у печінці збільшення сягало через 3 години 40% для окиснених і 50% – для відновлених форм. Причому ступінь цього приросту показників при збільшенні кількості компонентів зменшувалась, так що різниця у дії між п'яти- і шестикомпонентними сумішами вже зникла, або ставала недостовірною. Але все ж характерною особливістю дії полівітамінних сумішей була більша тривалість ефекту. В цілому, за даними цих досліджень можна зазначити, що при поєднанні вітаміну РР (у нас нікотинамід) з іншими вітамінами даної групи можна підвищити його здатність підвищувати приріст вмісту коферментних форм. При цьому використані дози 6-компонентного препарату вже близькі до межі цих можливостей.

Далі вивчали дію різних доз вітамінів B_1 і B_2 на їх накопичення та біосинтез коферментних форм кожного з них в печінці щурів, де і відбуваються основні процеси метаболізму вітамінів. Встановили, що ін'єкції цим тваринам вітаміну B_2 у дозі 2 мг/кг викликало суттєве підвищення вмісту ЗФ (на 25 – 30%), яке реалізувалось повністю за рахунок зростання фракції ФАД (на 53,8%). Це свідчить про правильність вибору дози вітаміну B_2 . Якби доза його була вищою, то слід було б чекати, що її дія більшою мірою збільшувала фракцію (вільний РФ + ФМН). Сполучення вітаміну B_2 у постійній дозі 2 мг/кг із зростаючими до 12 мг/кг дозами B_1 призводило до поступового зростання фракцій ЗФ і особливо ФАД, що свідчить про покращення використання наявної кількості вітаміну B_2 для біосинтезу його головної коферментної форми – ФАД. Зрозуміло, що в основному це може реалізуватись за рахунок активізації відповідної ферментної системи, хоча можливий внесок в цей процес може робити і інгібування ферментів розщеплення ФАД. На таку можливість вказують результати дослідів М. Ф. Леуса, хоча і відносно рівня нікотинамідних коферментів під впливом тіаміну [96]. При дозі B_1 у 12 мг/кг за сумісного введення з B_2 досягається максимальний ефект: рівень ФАД зростав більш ніж у двічі (на 134%), за рахунок чого збільшувалась і фракція ЗФ (на 73%) при незмінному вмісті фракції (вільний РФ + ФМН). Подальше збільшення дози B_1 призводило до зменшення ефекту. При вивченні дії індивідуальних ін'єкцій самого лише вітаміну B_1 у зростаючих дозах на показники вмісту різних фракцій вітаміну B_2 в печінці щурів встановили, що вітамін B_1 в дозах 6, 12 та 24 мг/кг був здатен більш помірно, чим у комбінації з B_2 , підвищувати рівень ФАД, а при дозі 12 мг/кг – і ЗФ, шляхом перерозподілу за рахунок фракції (РФ + ФМН), а можливо і з інших органів і тканин. А доза у 48 мг/кг вже демонструє типовий антагонізм між вітамінами: зменшення вмісту всіх фракцій вітаміну B_2 , очевидно шляхом прискороного розпаду коферментних форм і їх витіснення з організму у вигляді РФ. При виборі однієї дози вітаміну B_1 – 12 мг/кг, і зростаючої дози B_2 (0, 1, 2, 4, 8, 16 мг/кг) введення самого лише вітаміну B_2 негативно впливає як на загальний вміст вітаміну B_1 , так і його коферментних форм, знижуючи їх на 18 – 19%. Введення щурам 12 мг/кг вітаміну B_1 суттєво

підвищує усі його форми: загальний V_1 – на 19,2%, ФЕТ – на 18,7%, а вільний – навіть на 67,7%. Останнє не можна вважати позитивним фактом, як і деяке погіршення інших показників. Введення разом з V_1 ще і різних доз V_2 значно підвищує здатність першого з них перетворюватись у коферментну форму. Особливо цей ефект виражений у разі використання дози V_2 у 2 мг/кг, коли зростання ФЕТ досягає 75,4%, проти 18,7% при введенні лише самого V_1 . Подальше збільшення дози V_2 до 8, а тим більше до 16 мг/кг, практично повертає показники ФЕТ і загального V_1 до вихідного рівня, хоча і з помітно гіршими значеннями таких показників як доля ФЕТ – 90,5% проти 94,0, і особливо співвідношення ФЕТ / (вільний тіамін) – до 9,6 проти 15,5. Тобто, для пари вітамінів V_1 - V_2 існує оптимальне співвідношення при введенні в організм по відношенню до обміну V_1 : вагове 6 : 1 і молярне 7 : 1. Отримані дані підтверджують думку багатьох дослідників, що співвідношення вітамінів при їх надходженні в організм, особливо у вигляді комплексних полівітамінних препаратів, може мати вирішальне значення для ефективності реалізації ними їх специфічних функцій [1, 2, 235]. Проте, вирішення цієї проблеми дуже складне, коли мова йде вже не про суміші з двох-трьох компонентів, а з більшим їх числом. Очевидно, що для цього ще необхідно розробити адекватні методологічні підходи.

Продовженням цих досліджень стало вивчення не тільки парної, а й колективної взаємодії вітамінів у їх сумішах різної складності по відношенню до двох з них – V_1 і V_2 , а саме – про ефективність біосинтезу їх коферментних форм. Було встановлено, що через 3 години після ін'єкції тваринам самого лише V_1 відбувається зростання ФЕТ – більше ніж у 1,5 рази. На відміну від цього, введення щурам самого ФМН майже не вплинуло на ці показники. Введення щурам тривітамінної суміші (V_1 + ФМН + НА) дало набагато кращій стосовно ФЕТ результат, порівняно з введенням самого V_1 . І приріст цієї фракції збільшувався по мірі ускладнення сумішей. Паралельно зростали і два інших показника, у тому числі і вміст ВТ. Все це свідчить про те, що, хоча приріст ФЕТ при використанні більш складних сумішей у тому числі і 5-компонентної, був не

дуже значним, порівняно з введенням трикомпонентної ($B_1 + \text{ФМН} + \text{НА}$), але і затримувався в організмі він краще (загальна сума всіх форм). При вивченні біосинтезу коферментних форм вітаміну B_2 тваринам для порівняння вводили сам вітамін B_2 (рибофлавін) і рибофлавінмононуклеотид (ФМН). Встановили, що помітними перевагами перед рибофлавіном ФМН має лише при біосинтезі ФАД: його рівень в печінці після введення першого зростав на 33%, а другого – на 54%. Ін'єкції одного вітаміну B_1 дуже незначно вплинули на показники біосинтезу коферментних форм вітаміну B_2 . Ін'єкції тваринам ФМН у складі полівітамінних сумішей приводить до кількох наслідків. По-перше, інтенсивність його перетворення у ФАД хоч і помірно, але зростає: достовірно кращий результат порівняно з ним дають лише 4- і 5-компонентні препарати. По-друге, це досягається як за рахунок більш високої ефективності системи біосинтезу ФАД при введенні сумішей, порівняно з введенням B_2 (співвідношення ФАД/(РФ+ФМН)), так і шляхом кращого утримання всіх фракцій вітаміну в організмі (вміст усіх фракцій і значення співвідношення для ФАД: печінка/кров).

У наступному етапі роботи вивчали роль і можливості вітамінних компонентів, що входять до їх комбінацій різної складності (від 2-х до 5-компонентного), впливати на активність піруватдегідрогеназного комплексу (ПДК) в органах щурів у динаміці – від 1 до 24 годин після введення. Така побудова дослідження пояснюється тим, що дана мультиензимна система відіграє одну із найбільш важливих ролей в енергетиці, а використані 5 вітамінів у своїх коферментних формах входять до її складу і певною мірою визначають активність. Інтерес до подібних досліджень пояснюється також тим, що на цей час відома виключно важлива роль обміну пірвіноградної кислоти для генерування енергетичного заряду в нервовій тканині, серцевому м'язі та клітинах печінки [146]. Метаболізм пірувата, що супроводжується продукцією енергії та акумуляцією її в молекулах АТФ, реалізується головним чином у процесі окислювального декарбоксілювання. Цей процес і каталізується поліферментним комплексом ПДК, у склад якого входять коферментні форми вітамінів, які нами вивчаються. А інтенсивність процесів метаболізму пірувату у нервових тканинах,

міокарді, печінці, у свою чергу, пов'язані з активністю обміну самих вітамінів, який є значною мірою енергозалежним [6, 146]. Цим в основному і пояснюється вибір органів для дослідження. Отримані нами дані показують, що через 3 години у всіх органах моновітамінні препарати викликали суттєвий і у більшості випадків достовірний ріст активності ПДК, причому найбільшим, як у абсолютному значенні, так і у відсотках приросту, він був у печінці. Слід зазначити, що у мозку, як і в печінці найбільший приріст давав В₁. Через 6, а тим більше через 24 години після введення, ефект дії моновітамінних препаратів практично зникає. Що стосується полівітамінних композицій, то всі вони володіли помітно більшою стимулюючою дією на активність ПДК, ніж моновітаміни. Через 3 та 6 годин, а особливо для першого з цих строків, відмічено суттєве зростання активності ПДГ. При цьому найбільший приріст її спостерігався при переході до більш складних сумішей. І хоча різниця між ними у їх дії була не дуже великою (і статистично не завжди достовірною), всі вони значно перевищували за своєю ефективністю будь-який із досліджених моновітамінів. Через 24 години ефект дії всіх препаратів і сумішей практично нівелювався і активність ПДК майже поверталась до вихідного рівня. І лише 4- та 5-компонентні суміші ще зберігали невеликий ефект. Тобто, стимулююча дія цих двох останніх сумішей не лише досягає великих значень у період максимального ефекту, але і зберігається значною мірою у більш пізні періоди – від 6 до 24 год. Таким чином, найбільш виражений стимулюючий ефект вітамінних препаратів, що вивчалися, а особливо полівітамінних сумішей спостерігався через 3 години після введення. Це пояснюється тим, що до цього строку відбувається повне перетворення вітамінів в їх коферментні форми, що і забезпечує підвищення активності залежних від них ферментів [242]. Більш високу активацію піруватдегідрогеназної реакції після введення полівітамінних сумішей і більшу тривалість її, особливо для 4- і 5-компонентних комбінацій, пояснюється не тільки сумісною участю їх вітамінних компонентів вже у формі коферментів у функціонуванні ПДК. Тут діє багато факторів, головні серед яких такі. Після введення вітамінних сумішей відбувається значне посилення тканевого дихання, що підвищує загальний рівень обмінних процесів, сприяє синтезу білків,

у тому числі апоферментів ПДК [75, 146]. Важливу роль відіграє при цьому здатність вітамінних компонентів у комплексах підсилювати депонування один одного в тканинах і синтез з них відповідних коферментних форм [72, 75, 146].

Цікаво також було дослідити вікові особливості різних форм активності ПДГ і їх співвідношень у процесі старіння тварин, оскільки при старінні в організмі людини та тварин порушуються обмін і баланс вітамінів [249], змінюються взаємовідносини між вітамінами-коферментами [250], розвиваються гіповітамінози [250, 251], що веде до зменшення активності багатьох ферментів, які мають відношення до енергетики і біосинтетичних процесів у клітині. Було встановлено, що обидві форми активності ПДК були найвищими у контрольних дорослих тварин (ін'єкції ФР). Співвідношення між повною активністю і «діючою» долею було найбільшим у дорослих і молодих тварин, а найменшим – у старих. Після ін'єкцій ВС найбільший абсолютний приріст активності відзначається у дорослих тварин, а найбільший відносний – у старих. Це свідчить про те, що у молодих тварин активність ПДК лімітується біосинтезом білків-апоферментів, а у старих – синтезом коферментів.

Цікаво було також вивчити залежність між рівнем макроергічних фосфатів в органах щурів і загальною АТФазною активністю при різних способах введення вітамінних сумішей зростаючої складності. Аналіз отриманих результатів щодо макроергічних нуклеотидних фосфатів (МНФ) показує, що як ін'єкції, так і внутрішньошлункове введення найменшої з сумішей ($B_1 + \text{ФМН}$) помітно підвищують їх вміст в органах і тканинах. При цьому він стає максимальним через 3 години і всюди його зростання досягає 30 – 40% для внутрішньом'язового введення. Що стосується внутрішньошлункового введення, то за такої ж динаміки у мозку і серці ефект дещо нижчий, а в печінці і відділах шлунково-кишкового тракту – вищий, хоча і незначно, і як правило через 3 години. АТФазна активність в печінці і слизовій оболонці шлунка була найбільшою через 1 годину, а в інших відділах ШКТ – через 1 – 3 год. Причому у печінці і шлунку різниці між способами введення препаратів практично не відмічено, а в нижніх відділах ШКТ перевага була на боці внутрішньошлункового введення. При використанні

трьохкомпонентних сумішей приріст вмісту МНФ був більшим і вказані закономірності динаміки залишались, але суміш ($B_1 + \text{ФМН} + \text{НА}$) була помітно ефективніша за ($B_6 + \text{ФМН} + \text{НА}$). Перехід від 3-компонентних препаратів до 4-компонентного дав незначний приріст у 7 – 10% порівняно з ($B_1 + \text{ФМН} + \text{НА}$). Це свідчить про те, що ресурс подальшого зростання вмісту МНФ вже практично вичерпаний. Такий висновок підтверджується при переході до використання 6-компонентного препарату. Для нього характерне падіння ефекту до рівня 3-компонентної суміші ($B_1 + \text{ФМН} + \text{НА}$), а в печінці і в слизових оболонках відділів шлунково-кишкового тракту – навіть до рівня двохкомпонентного. Активність АТФаз при переході від 2-компонентної суміші ($B_1 + \text{ФМН}$), стимулюючий ефект якої складав 20 – 27%, до 3- і 4-компонентної зростала незначно. І лише для 6-компонентної відмічено її помітний стрибок – до 45 – 65%. Динамічні закономірності при цьому майже не змінювались. Таким чином, отримані дані свідчать про те, що можливості стимуляції енергетичної системи організму (судячи по рівню макроергічних сполук) з допомогою вітамінних препаратів і сумішей досить обмежені. Для цього існує кілька причин. По-перше, вітаміни, що мають відношення до енергетики, самі потребують АТФ для синтезу коферментних форм. По-друге, на варті стабілізації рівня АТФ мабуть стоїть і система АТФаз, оскільки співвідношення АТФ/АДФ є одним із важливих регуляторів енергетичного метаболізму. Тому при значних і особливо надмірних надходженнях вітамінів в організм результат може бути негативним по різних показниках: неефективне використання вітамінів, зниження ресурсу швидкодоступних макроергічних сполук, дезорганізація механізмів регулювання енергетичних процесів і т. ін. Проте, це можливо лише у випадку неконтрольованого прийому людиною вітамінних препаратів медичного призначення. Але можна вважати, що цей механізм із включенням вказаних АТФаз діє постійно, згладжуючи стрибки і коливання у забезпеченні організму людини і тварин вітамінами.

Додаткову інформацію про вплив різних комбінацій і доз вітамінів на такий важливий показник організму як рівень макроергічних сполук у його органах ми

отримали з наступного дослідження. У першій серії досліджень вивчали в порівняльному аспекті здатність тіаміну, ТДФ, НА, а також їх сумішей впливати на вміст різних фракцій макроергічних сполук у печінці щурів. Були підтверджені дані А. Я. Розанова і Т. М. Цитко [243], що ін'єкції ТДФ у більшому ступені чим тіамін підвищують вміст макроергічних сполук у тканинах тварин. Не уступає по цій здатності тіамінові і НА. Однак використання трьох- і чотирьохкомпонентних полівітамінних сумішей виявилось ще більш ефективним. У трохи більш складному варіанті нами була вивчена дія на ці показники вже п'яти- і шестикомпонентних сумішей. Ці дослідження були виконані на щурах у більш широкій часовій динаміці. При цьому як другий контроль ми узяли варіант з ін'єкцією тваринам еквімолярної стосовно пантотенату дози CaCl_2 , тому що нами використовувалися кальцієва сіль B_3 . З цих дослідів видно, що найбільшою і практично однаковою ефективністю володіли 5- і 6-компонентні препарати. Їхня дія була максимальною через 6 годин після ін'єкції та у більшому ступені зберігалася і через 24 години. При цьому вміст нуклеотидних фосфатів був більш стабільним. У цілому ж, дія усіх вивчених вітамінів та їхніх комбінацій не була дуже велика (приріст не більш 15 – 30%). Особливо цікавим є результат, отриманий при уведенні тваринам подвоєної дози 6-компонентного препарату. Тут ми бачимо виражене зниження вмісту нуклеотидної фракції, особливо в перші 2 терміни спостереження (1 і 6 годин). Фракцію ненуклеотидних фосфатів така дія препаратів торкалася в меншому ступені. Це може бути обумовлено конкурентними відносинами за використання лімітованого фонду АТФ при біосинтезі коферментних форм вітамінів.

Метою наступного дослідження стало вивчення впливу вітамінів групи В, які мають пряме відношення до обміну енергії, на синтез макроергічних фосфатів і активність Na^+ , K^+ -АТФази за введення тваринам антибіотиків – АМ і ХА, що інгібують біосинтез білка у цитоплазмі та мітохондріях відповідно. Встановили, що дворазове ін'єкування щурам лише ВС суттєво підвищувало вміст загальних макроергічних фосфатів (ЗМФ) і підвищило активність Na^+ , K^+ -АТФази в органах і крові тварин порівняно з контролем. Іншій групі щурів вводили хлорамфенікол, і

це не викликало суттєвих змін вмісту ЗМФ в крові, мозку та серці, в той час як у печінці спостерігалось його достовірне зниження (на 23%). Введення ХА та АМ викликало суттєве і достовірне зменшення активності Na^+ , K^+ -АТФази в усіх органах і тканинах. Вітамінний суміш збільшував зміни рівня ЗМФ, викликані хлорамфеніколом. На відміну від ХА актиноміцин викликав більш помітне і достовірне зменшення рівня ЗМФ у крові та печінці – на 27% та 29% відповідно, а у мозку і серці спостерігалася тенденція до збільшення концентрації ЗМФ. Після ін'єкції ВС сумісно з АМ вміст ЗМФ зменшувався у крові та печінці, а в мозку і серці сумісне введення ВС та АМ змін рівня ЗМФ не викликало. За одночасного введення ХА і АМ їх сумісна дія порівняно з окремими впливами кожного з антибіотиків у мозку і серці не зазнавала ніяких змін, а у крові і печінці навіть ставала менш виразною, отже сумарні ефекти цих антибіотиків на вміст ЗМФ не спостерігалось. Сумісне введення антибіотиків (АМ + ХА) ще більшою мірою зменшувало активність Na^+ , K^+ -АТФази. Попередня ін'єкція ВС не запобігала зниженню рівня ЗМФ у печінці під впливом ХА та АМ, але в інших органах і крові спостерігалось повернення цих показників до значень контролю. Одночасно відбувалось зменшення активності Na^+ , K^+ -АТФази в крові та серці, але в печінці і мозку ВС дещо зменшувала ефект ХА: до 67,5 та 58%, відповідно. Таким чином, з'ясовано, що за використання обох антибіотиків, інгібуючих біосинтез білка в цитоплазмі та мітохондріях, рівень ЗМФ достовірно знижувався лише у печінці, а у мозку та серці, навпаки, відбувалось помірне зростання вмісту ЗМФ. При сумісному введенні цих антибіотиків їх вплив на рівень ЗМФ порівняно з окремою дією кожного з них у мозку та серці не збільшується, а у крові та печінці навіть зменшується. Обидва використані антибіотики суттєво, і майже в однаковій мірі, знижують активність Na^+ , K^+ -АТФази в органах щурів, хоча дія АМ носить більш широкий характер. Попереднє введення тваринам ВС не призводить до істотного захисного ефекту проти дії вказаних антибіотиків на вміст ЗМФ у тканинах щурів, навіть за дворазового його введення у досить високих дозах. А також дає певний і дещо різний захисний ефект проти дії антибіотиків на активність Na^+ , K^+ -АТФази, але при введенні одразу двох

антибіотиків він був не дуже великим. Це свідчить про суттєву залежність механізмів реалізації енергостимулюючої дії вітамінів групи В від стану білоксинтезуючої системи, яка повинна постачати необхідні для енергетичних процесів ферменти (або апоферменти).

У даній роботі ми з'ясували сумісну дію вітамінної суміші (ВС) та похідних ГАМК – пантогаму (ПГ) і пікамілону (ПК) – на вміст макроергічних фосфатів і активність Na^+ , K^+ -АТФази у щурів за ішемії головного мозку. Таке дослідження є цікавим, оскільки достовірно встановлено, що за гіпоксичних станів виникає і розвивається ендогенний дефіцит вітамінів, порушується біосинтез коферментів [120, 252]. Тому стійкість тварин і людини до гіпоксії значною мірою визначається стійкістю до цього стану тканини мозку, на яку можна впливати з допомогою біологічно активних сполук [253]. Ефективними в цьому відношенні є препарати, створені на основі вітамінів та ГАМК [254]. Результати роботи показали, що вміст загальних макроергічних фосфатів за ішемічної гіпоксії суттєво зменшувався у крові, мозку та серці (в 1,6 – 1,7 рази). В печінці не було достовірних змін як за ішемії, так і після ін'єкцій всіх досліджених препаратів. Слід зазначити, що у крові, мозку та серці всі застосовані препарати призводили до зростання рівня цього показника. У крові і мозку; більш потужну дію виявив ПМ, а у серці – ПГ. Введення ВС майже в усіх варіантах досліді сприяло зростанню рівня макроергічних фосфатів у тканинах за ішемії. Активність Na^+ , K^+ -АТФази за ішемії у крові, печінці, мозку і серці знижувалась на 18 – 41%. Коригуючий ефект застосованих нами ГАМК-кон'югатів на активність Na^+ , K^+ -АТФази практично в усіх випадках був безперечним, а ВС майже, завжди посилювала дію ПМ і ПГ. Слід зазначити, що часто ефект препаратів був надто сильним. Так, після введення ПМ і ПМ+ВС спостерігалось перевищення контрольного рівня активності Na^+ , K^+ -АТФази в 1,4 – 1,5 рази у мозку. Вплив ПГ і ПГ + ВС у цьому органі був значно слабкішим, але все ж достатньо вираженим. Таким чином було з'ясовано, що за використаної моделі ішемічної гіпоксії пригнічується енергетичний обмін не тільки в мозку, але і в інших органах і тканинах. Як ПМ, так і ПГ виявили здатність коригувати

досліджені показники за ішемії, однак більш ефективним (особливо для мозку) виявився ПМ. Це можна пояснити високою проникаючою здатністю цієї сполуки і її потужною антигіпоксичною дією [245]. Застосована нами ВС сприяла позитивним впливам ПГ і ПМ на вміст макроергічних фосфатів і активність Na^+ , K^+ -АТФази за ішемії мозку, що робить перспективним поєднання ВС з даними препаратами.

На завершення дослідили зміни активності препаратів Na^+ , K^+ -АТФази із сірої речовини кори мозку (переважно α_2 , α_3/β_1 – ізоформа) та зовнішніх медул нирок (α_1/β_1 – ізоформа) щурів після попереднього (за 2 години) введення їм тієї ж самої суміші вітамінів групи В. З нашої точки зору між ними повинен бути досить тісний зв'язок. Так, раніше були отримані дані про те, що вітаміни групи В впливають на активність Na^+ , K^+ -АТФази в органах тварин і від цього ферменту певною мірою залежить їх транспорт через біомембрани та всмоктування [235]. Аналіз даних показує, що у нормі (контроль) питома активність Na^+ , K^+ -АТФази у нирках набагато вища ніж у мозку, причому майже в однаковій мірі як для гомогенатів, так і очищених препаратів – у 3,4 та 3,8 разів, відповідно. Після ін'єкцій ВС ця закономірність виражена менше: 2,15 та 2,17 разів. Тобто ВС у більшій мірі активує АТФазу мозку, ніж нирок. Це просліджується як у гомогенатах, де активація становить для мозку 2,0, а для нирок – 1,29 разів, так і для очищених препаратів – 1,98 та 1,15 разів. При цьому вказана активація виразна і достовірна. Розрахунок всієї (повної) активності Na^+ , K^+ -АТФази показує, що повна активність цього (виділеного) ферменту в органах контрольних тварин майже однакова. Ін'єкції ВС її підвищують ще більш суттєво і виразно, ніж питому активність. Із цього витікає, що після ін'єкції ВС зростає не тільки кількість самого ферменту в тканинах, але і його активність, тобто спостерігається не тільки збільшення кількості ферменту (можливо внаслідок індукції), але і активація вже наявних його молекулярних комплексів.

Таким чином, отримані дані вказують на те, що в організмі існує певна ієрархія рівнів контролю, які забезпечують максимальну ефективність використання таких важливих для обміну речовин факторів як вітаміни.

Головними з цих рівнів є всмоктування у шлунково-кишковому тракті, проникнення через біомембрани, транспорт в організмі, депонування, біосинтез коферментних форм, забезпечення його енергетичними ресурсами і контроль за їх використанням, взаємодія з апоферментами і їх біосинтез, метаболізм, виведення з організму. Контролюється також і участь коферментів у складі ферментів, а тим більше поліферментних систем (наприклад дегідрогенази оксокислот).

Таким чином, ми вважаємо, що співвідношення між дослідженими нами вітамінами групи В, яке організм встановлює вже на перших етапах їх надходження в органи і тканини, відіграє у подальшому роль певного регулятора, спрямованого на досягнення оптимального використання як їх фонду (досить обмеженого), так і енергетичних ресурсів. Причому ці механізми демонструють чіткі ознаки саморегуляції, в яких задіяні як прямі, так і зворотні зв'язки, у тому числі активація та пригнічення дії.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено експериментальне обґрунтування і нове вирішення наукової задачі: з'ясувати значення взаємодії деяких вітамінів групи В для реалізації їх функцій та зв'язок цих взаємодій з енергетичними процесами.

1. Найбільш ефективно перетворення нікотинамід у його коферментні форми при надходженні в організм разом з вітаміном В₁ спостерігається за їх молярного співвідношення 14 : 1. Для вітамінів В₁ і В₂ оптимальне молярне співвідношення відносно утворення їх коферментних форм при їх сумісному надходженні в організм становить 7 : 1, якщо використовуються дози близькі до фізіологічних. Сумісне введення вітамінів В₁, В₂ і РР у складі полівітамінних сумішей у більшій мірі, ніж при індивідуальному введенні, призводить до збільшення рівня їх коферментних форм.

2. Активність піруватдегідрогеназного комплексу (ПДК) суттєво збільшується як при індивідуальному введенні вітамінів групи В (В₁, ФМН, нікотинамід, В₃), так і при їх введенні у складі полівітамінних сумішей у встановлених співвідношеннях. За своєю здатністю викликати приріст активності ПДК полівітамінні суміші, а особливо 4- і 5-компонентні, значно перевищують аналогічну дію моновітамінів. Найбільше абсолютне зростання активності ПДК за введення 6-компонентної вітамінної суміші спостерігається у дорослих тварин, а найбільше відносно – у старих.

3. Рівень макроергічних сполук в організмі значно підвищується за впливу вітамінів групи В, причому у складі полівітамінних сумішей їх дія набагато ефективніша, ніж при індивідуальному введенні. Збільшення концентрацій вітамінів у суміші призводить до насичення ефекту, а потім – і до його зменшення, що значною мірою пояснюється конкуренцією за енергетичні ресурси і активацією Na⁺, K⁺-АТФази.

4. Загальна АТФазна активність в органах тварин зростає за впливу полівітамінних сумішей у відповідності з компонентною останніх. Між активністю Na⁺, K⁺-АТФази і рівнем макроергічних фосфатів в організмі існує

зв'язок: при дозах вітамінів близьких до фізіологічних – прямий, а при більш великих – зворотний.

5. Енергостимулююча дія вітамінів групи В суттєво залежить від стану білоксинтезуючої системи. Введення хлорамфеніколу і актиноміцину призводить до суттєвого зниження рівня загальних макроергічних фосфатів і активності Na^+ , K^+ -АТФази.

6. Вміст загальних макроергічних фосфатів в органах тварин за ішемічної гіпоксії суттєво зменшується. Введення вітамінної суміші сприяє їх відновленню, особливо при сумісному використанні з препаратами пікамилон і пантогам.

7. Активність Na^+ , K^+ -АТФази як в гомогенатах, так і очищених препаратах з органів щурів суттєво зростає після введення полівітамінних препаратів.

8. Сумісний позитивний вплив досліджуваних вітамінів групи В на енергетичні процеси в клітині більш ефективний, ніж ефекти окремо взятих вітамінів. Зазначена перевага полівітамінів спостерігається як в дослідах на інтактних тваринах, так і за експериментальної ішемічної гіпоксії.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ЛІТЕРАТУРИ

1. Handbook of vitamins 4th ed. / J. Zempleni, R. B. Rucker, D. B. McCormick, J. W. Suttie. – NY: CRC Press, 2007. – 594 p.
2. Mitochondrial function and toxicity: role of the B vitamin family on mitochondrial energy metabolism / F. Depeint, W. R. Bruce, N. Shangari [et al.] // Chem. Biol. Interact. – 2006. – Vol. 163, N 1-2. – P. 94-112.
3. Рациональная витаминопрофилактика и витаминотерапия / М. А. Андрейчин, Ю. Г. Антипкин, Г. Л. Апанасенко и др.: Под ред. Г. В. Донченко, А. П. Викторова О. В. Курченко. – К. Здоров'я, 2008. – 408 с.
4. Терруан Т. Взаимодействие витаминов / Т. Терруан; пер. с франц. К. Л. Поволоцкой. – М.: Мир, 1969. – 245 с.
5. Максимович Я. Б. Прописывание, несовместимость и побочные действия лекарственных средств / Я. Б. Максимович. – К.: Здоровье, 1971. – 274 с.
6. The handbook of vitamins / R. B. Rucker, J. Suttie, D. McCormick, L. Macland. – NY: Dekker publishing NYC, 2001. – 600 p.
7. Stewart C. B. Thiamine deficiency and glyoxylic acid / C. B. Stewart, J. Grammer, R. W. Brosemer // Ann. Nutr. Metab. – 1981. – Vol. 25, N 5. – P. 289-298.
8. Reactivity at the substrate activation site of yeast pyruvate decarboxylase: inhibition by distortion of domain interactions / I. Baburina, G. Dikdan, F. Guo [et al.] / Biochemistry. – 1998. Vol. 37, N 5. – P. 1245-1255.
9. Lonsdale D. A review of the biochemistry, metabolism and clinical benefits of thiamin(e) and its derivatives / D. Lonsdale // EСAM. – 2006. – Vol. 3, N1. – P. 49-59.
10. Строение продукта трансформации тиохрома / Д. А. Опарин, И. И. Степуро, В. И. Кондаков [и др.] // Химия природных соединений. – 1985. – № 5. – С. 724-725.
11. Haas R. H. Thiamin and the brain / R. H. Haas // Annu. Rev. Nutr. – 1988. – Vol. 8. – P. 483-515.

12. Gibson G. E. Interactions of oxidative stress with thiamine homeostasis promote neurodegeneration / G. E. Gibson, H. Zhang // *Neurochem. Int.* – 2002. – Vol. 40, N 6. – P. 493-504.
13. Bâ A. Metabolic and structural role of thiamine in nervous tissues / A. Bâ // *Cell. Mol. Neurobiol.* – 2008. – Vol. 28, N 7. – P. 923-931.
14. Gibson G. E. Thiamine-dependent processes and treatment strategies in neurodegeneration / G. E. Gibson, J. P. Blass // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2007. – Vol. 9, N 10. – P. 1605-1620.
15. Thornalley P. J. The potential role of thiamine (vitamin B₁) in diabetic complications / P. J. Thornalley // *Curr. Diabetes Rev.* – 2005. – Vol. 1, N 3. – P. 287-298.
16. Ших Е. В. Выведение тиамин и рибофлавина с мочой при проведении диуретической терапии у пациентов с заболеваниями сердечно-сосудистой системы / Е. В. Ших // *Клиническая медицина.* – 2002. – № 7. – С. 39-42.
17. Янчий О. Р. Внутриклеточная локализация тиаминсвязывающих белков печени и почек крыс / О. Р. Янчий, Ю. М. Пархоменко, Г. В. Донченко // *Укр. біохім. журн.* – 2003. – Т. 75, № 6. – С 111-114.
18. Neher R. Pyruvate and thiamine phosphate potentiate cyclic nucleotide-induced steroidogenesis isolated rat adrenocortical cell / R. Neher, A. Milani // *J. Steroid. Biochem.* – 1983. – Vol. 18, N 1. – P. 1-6.
19. Степура А. И. Роль тиольной формы тиамин в обмене оксида азота / А. И. Степура, Т. П. Пилецкая, И. И. Степура // *Биохимия.* – 2005. – Т. 70, №3. – С. 416-429.
20. Butterworth increased brain endothelial nitric oxide synthase expression in thiamine deficiency: relationship to selective vulnerability / M. Kruse, D. Navarro, P. Desjardins [et al.] // *Neurochem. Int.* – 2004. – Vol. 45, N1. P. 49-56.
21. Booth A. A. Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration / A. A. Booth, R. G. Khalifah, B. G. Hudson // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1996. – Vol. 220, N1 – P. 113-119.

22. Stepuro I. I. Thiamine and vasculopathies / I. I. Stepuro // PLEFA. – 2005. – Vol. 72, N 2. – P. 115-127.
23. Ischiropoulos H. Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration / H. Ischiropoulos // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2003. – Vol. 305, N3 P. 776-783.
24. Тиамин ингибирует образование дитиозина, специфического маркера окислительного стресса, в реакциях, катализируемых оксоферрильными формами гемоглобина / А. И. Степура, Р. И. Адамчук, А. Ю. Опарин [и др.] // Биохимия. – 2008. – Т. 73, № 9. – С. 1281-1293.
25. Выделение и некоторые свойства тиаминсвязывающего белка синапсом головного мозга крыс / В. А. Постоенко, Ю. М. Пархоменко, А. И. Вовк [и др.] // Биохимия. – 1987. – Т. 52, № 11. – С. 1792-1797.
26. Riboflavin, in modern nutrition in health and disease, 8th ed. / D. B. McCormick, M. E. Shils, J. A. Olson, M. Shike. – Philadelphia: Lea and Febiger. – 1994. – 366 p.
27. Powers H. J. Riboflavin (vitamin B-2) and health / H. J. Powers // Am. J. Clin. Nutr. – 2003. – Vol. 77, N 9. – P. 1352-1360.
28. Subcellular localization and regulation of coenzyme A synthase / A. Zhyvoloup, I. Nemazanyu, G. Panasyuk [et al.] / J. Biol. Chem. – 2003. – Vol. 278, N 50. – P. 50316-50321.
29. Никотинамидные коферменты в регуляции клеточного метаболизма при разных типах диабета / Н. Н. Великий, И. Г. Обросова, А. С. Ефимов [и др.] // Вопр. мед. химии. – 1992. – Т. 38, № 4. – С. 45-52.
30. Coenzyme A: back in action / R. Leonardi, Y.-M. Zhang, C. O. Rock [et al.] / Prog. Lipid Res. – 2005. – Vol. 44, N 2-3. – P. 125-153.
31. Халмурадов А. Г. Мембранный транспорт коферментных витаминов и коферментов / А. Г. Халмурадов, В. Н. Тоцкий, Р. В. Чаговец. – К: Наукова думка, 1982. – 280 с.
32. Шиманський І. О. Некоферментна функція вітаміну РР та його біологічно активних похідних: сучасний стан проблеми / І. О. Шиманський, Т. М. Кучмеровська // Укр. біохім. журн. – 2007. – Т. 79, № 5. – С. 59-71.

33. Sauve A. A. NAD⁺ and vitamin B₃: from metabolism to therapies / A. A. Sauve // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2008. – Vol. 324, N 3 – P. 883-893.
34. Al-Mohaissen M. A. Niacin: from mechanisms of action to therapeutic uses / M. A. Al-Mohaissen, S. C. Pun, J. J. Frohlich // *Mini-Rev. Med. Chem.* – 2010. – Vol. 10, N 3. – P. 204-217.
35. Nicotinic acid: pharmacological effects and mechanisms of action / A. Gille, E. T. Bodor, K. Ahmed [et al.] // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2008. – Vol. 48. – P. 79-106.
36. Роль никотиновой кислоты и ее производных при нарушениях функций нервной системы / П. К. Пархомец, Т. М. Кучмеровская, Г. В. Донченко [и др.] // *Укр. биохим. журн.* – 1995. – Т 67, № 4. – С. 3-11.
37. McCormick D. B. Metabolism of vitamins in microbes and mammals / D. B. McCormick // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2003. – Vol. 312, N 1. – P. 97-101.
38. Eliot A. C. Pyridoxal phosphate enzymes: mechanistic, structural, and evolutionary considerations / A. C. Eliot, J. F. Kirsch // *Annu. Rev. Biochem.* – 2004. – Vol. 73. – P. 383-415.
39. Plasma vitamin B-6 forms and their relation to transsulfuration metabolites in a large, population-based study / O. Midttun, S. Hustad, J. Schneede [et al.] // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2007. – Vol. 86. – P. 131-138.
40. Hellmann H. Vitamin B₆: a molecule for human health? / H. Hellmann, S. Mooney // *Molecules.* – 2010. – Vol. 15, N 1. – P. 442-459.
41. Браунштейн А. Е. Функция витамина B₆ в процессах обмена аминокислот / А. Е. Браунштейн // *Успехи совр. биол.* – 1953. – № 1. – С. 27-37.
42. Комов В. П. Биохимия: учеб. для вузов / В. П. Комов, В. Н. Шведова. – М.: Дрофа, 2004. – 638 с.
43. Пиридоксаль-5-фосфат как каталитический и конформационный кофактор мышечной гликогенфосфорилазы b / Н. Б. Ливанова, Н. А. Чеботарева, Т. Б. Еронина [и др.] // *Биохимия.* – 2002. – Т. 67, №10. – С. 1317-1327.
44. Relationships between structure, function and stability for pyridoxal 5'-phosphate-dependent starch phosphorylase from *Corynebacterium callunae* as revealed by

- reversible cofactor dissociation studies / R. Griessler, B. Psik, A. Schwarz [et al.] // *Eur. J. Biochem.* – 2004. – Vol. 271, N 16. – P. 3319-3329.
45. Spector R. Vitamin transport and homeostasis in mammalian brain: focus on Vitamins B and E / R. Spector, C. E. Johanson // *J. Neurochem.* – 2007. – Vol. 103, N 2. – P. 425-438.
46. Yoshimura T. D-amino acids in the brain: structure and function of pyridoxal phosphate-dependent amino acid racemases / T. Yoshimura, M. Goto // *FEBS J.* – 2008. – Vol. 275, N 14. – P. 3527-3537.
47. Reduction of lipoic acid by lipoamide dehydrogenase / G. Ph. Biewenga, M. A. Dorstijn, J. Verhagen [et al.] // *Biochem. Pharmacol.* – 1996. – Vol. 51, N 3. – P. 233-238.
48. Xu D. P. α -Lipoic acid dependent regeneration of ascorbic acid from dehydroascorbic acid in rat liver mitochondria / D. P. Xu, W. Wells // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 1996. – Vol. 28, N 1. – P. 77-85.
49. Enantioselective pharmacokinetics and bioavailability of different racemic α -lipoic acid formulations in healthy volunteers / R. Hermann, G. Niebech, H. O. Borde [et al.] // *Eur. J. Pharm. Sci.* – 1996. – Vol. 4, N 3. – P. 167-174.
50. Arner E. S. J. Efficient reduction of lipoamide and lipoic acid by mammalian thioredoxin reductase / E. S. J. Arner, J. Nordberg, A. Holengren // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* – 1996. – Vol. 225, N 1. – P. 268-274.
51. Molecular mimicry in halothane hepatitis: Biochemical and structural characterization of lipoylated autoantigens / J. Gut, U. Christon, N. Frei [et al.] // *Toxicology.* – 1995. – Vol. 97, N 1-3. – P. 199-224.
52. The role of lipoic acid in product formation by *Enterococcus faecalis* NCTC 775 and reconstitution in vivo and in vitro of the pyruvate dehydrogenase complex / J. L. Snoep, M. van Bommel, F. Lubbers [et al.] // *J. Gen. Microbiol.* – 1993. – Vol. 139, N 6. – P. 1325-1329.
53. Characterization of the primary structure of H-protein from *Pisum sativum* and location of a lipoic acid residue by combined liquid chromatography/mass spectrometry

- and liquid chromatography/tandem mass spectrometry / V. Merand, E. Forest, J. Gagnon [et al.] // *Biol. Mass Spectrom.* – 1993. – Vol. 22, N 8. – P. 447-456.
54. Suzuki Y. T. Thiocctic acid and dihydrolipoic acid are novel antioxidants which interact with reactive oxygen species / Y. T. Suzuki, M. Tsuchia, L. Packer // *Free Rad. Res. Comm.* – 1991. – Vol. 15, N 5. – P. 255-263.
55. Lipoic and dihydrolipoic acids as antioxidants. A critical evaluation / B. C. Scott, O. I. Aruoma, P. J. Evans [et al.] // *Free Rad. Res. Comm.* – 1994. – Vol. 20, N 2. – P. 119-133.
56. Lodge J. K. Thiol chelation of Cu^{2+} by dihydrolipoic acid prevents human low density lipoprotein peroxidation / J. K. Lodge, M. G. Traber, L. Packer // *Free Rad. Biol. Med.* – 1998. – Vol. 25, N 3. – P. 287-297.
57. Ou P. Thiocctic (lipoic) acid: a therapeutic metal-chelating antioxidant? / P. Ou, H. J. Trischler, S. P. Wolff // *Biochem. Pharmacol.* – 1995. – Vol. 50, N 1. – P. 123-126.
58. Roy S. Redox regulation of cell functions by α -lipoate: biochemical and molecular aspects / S. Roy, L. Packer // *Biofactors.* – 1998. – Vol. 7, N 3. – P. 263-267.
59. Dihydrolipoic acid maintains ubiquinone in the antioxidant active form by two-electron reduction of ubiquinone and one-electron reduction of ubisemiquinone / A. V. Kozlov, L. Gille, K. Staniek [et al.] // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1999. – Vol. 363, N 1. – P. 148-154.
60. Trujillo M. Peroxynitrite reaction with the reduced and the oxidized forms of lipoic acid: New insights into the reaction of peroxynitrite with thiols / M. Trujillo, R. Radi // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2002. – Vol. 397, N 1. – P. 91-98.
61. α -Lipoic acid supplementation prevents symptoms of vitamin E deficiency / M. Podda, H. J. Tritschler, U. Ulrich [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* – 1994. – Vol. 204, №1. – P. 98-104.
62. Influence of alpha-lipoic acid on intracellular glutathione in vitro and in vivo / E. Busse, G. Zimmer, B. Schopohl [et al.] // *Arzneimittel-Forsch.* – 1992. – Vol. 42, N 6. – P. 829-830.
63. Halliwell B. Free radicals in biology and medicine / B. Halliwell, J. Gutteridge. – Oxford.: Oxford Univ. Press, 1999. – 194 p.

64. Lipoic acid increases de novo synthesis of cellular glutathione by improving cystine utilization / D. Han, G. Handelman, L. Marcocci [et al.] // *Biofactors*. – 1997. – Vol. 6, N 3. – P. 321-338.
65. Dihydrolipoic acid – a universal antioxidant both in the membrane and in the aqueous phase: Reduction of peroxy, ascorbyl and chromanoxyl radicals / V.E. Kagan, A. Shwedova, E. Sebinova [et al.] // *Biochem. Pharmacol.* – 1992. – Vol. 44, N 8. – P. 1637-1649.
66. Slepneva I. A. Reversible Inhibition of NADPH-cytochrome P450 reductase by α -lipoic acid / I. A. Slepneva, S. V. Sergeeva, V. V. Khramtsov // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* – 1995. – Vol. 214, N 3. – P. 1246-1253.
67. Packer L. α -Lipoic acid: a metabolic antioxidant which regulates NF-kappa B signal transduction and protects against oxidative injury / L. Packer // *Drug Metab. Rev.* – 1998. – Vol. 30, N 2. – P. 245-275.
68. Карпачев В. Тиоктовая кислота: проблемы и перспективы использования / В. Карпачев, А. Щербак // *Вісник фармакол. фармації*. – 2003. – №3 – С. 20-28.
69. Sandya P. Role of DL α -lipoic acid in gentamicin induced nephrotoxicity / P. Sandya, S. Mochandass, P. Varalakrishmi // *Mol. Cell Biochem.* – 1995. – Vol. 145, N 1. – P. 11-17.
70. Барабой В. А. Биоантиоксиданты / Барабой В. А. – К.: Книга плюс, 2003. – 455 с.
71. Онтогенетические особенности проникновения в митохондрии печени производных тиамин, пантотената, рибофлавина, никотината / А. Я. Розанов, Л. М. Карпов, В. Т. Коваль [и др.] // *Витамины*. – К.: Наукова думка, 1970. – С. 175-189.
72. Розанов А. Я. Вплив пантотенату, рибофлавіну і нікотинату на депонування ^{35}S -тіаміну в організмі білих щурів / А. Я. Розанов, Ву Ван Ань // *Укр. біохім. журн.* – 1970. – №1. – С. 8-11.
73. Розанов А. Я. Взаимодействие коферментов пируватдегидрогеназного комплекса при окислении пирувата и связывание ^{35}S -ТДФ митохондриями печени

крыс / А. Я. Розанов, С. А. Петров, Ву Ван Ань // Укр. біохім. журнал. – 1973. – №3. – С. 338-341.

74. Розанов А. Я. Влияние коферментов пируватдегидрогеназы и белков митохондрий на накопление в них ³⁵S-липоевой кислоты / А. Я. Розанов, Л. М. Карпов, С. А. Петров // Укр. біохім. журн. – 1985. – №3. – С. 71-74.

75. Bunik V. I. 2-Oxo acid dehydrogenase complexes in redox regulation / V. I. Bunik // Eur. J. Biochem. – 2003. – Vol. 270, N 6. – P. 1036-1042.

76. Bunik V. I. Metabolic control exerted by the 2-oxoglutarate dehydrogenase reaction: a cross-kingdom comparison of the crossroad between energy production and nitrogen assimilation / V. I. Bunik A. R. Fernie // Biochem. J. – 2009. – Vol. 422, N 3. – P. 405-421.

77. Величко М. Г. Соотношение активностей аланиновой трансаминазы и пируватдегидрогеназы в печени при введении тиамин или окситиамина / М. Г. Величко // Межвитаминные взаимоотношения: Мат. 3-го Гродненского симпозиума, 29-31 мая 1975 г.: тезисы докл. – Гродно, 1975. – С. 24.

78. Механизмы межвитаминных взаимоотношений (тиамин, пиридоксин, пантотеновая и никотиновая кислоты) / [Островский Ю. М., Мойсеенок А. Г., Мажуль А. Г., Михальцевич Г. Н.]. – Минск: Наука и техника, 1973. – 243 с.

79. Петров С. А. Влияние тиамин и его метаболитов на активность аспартат- и аланинаминотрансферазы в организме белых крыс и донорской крови / С. А. Петров, Е. В. Донеско // Физиол. журн. – 1989. – Т. 35, №4. – С. 94-96.

80. Shangari N. Hepatocyte susceptibility to glyoxal is dependent on cell thiamin content / N. Shangari, R. Mehta, P. J. O'Brien // Chem. Biol. Interact. – 2007. – Vol. 165, N 2. – P. 146-154.

81. Михальцевич Г. Н. Содержание никотинамидных коферментов при одновременном введении триптофана и витамина В₁, или его фосфорилированных производных крысам / Г. Н. Михальцевич // Межвитаминные взаимоотношения: Мат. 3-го Гродненского симпозиума, 29-31 мая 1975 г.: тезисы докл. – Гродно, 1975. – С. 105-107.

82. Enzymology of NAD⁺ homeostasis in man / G. Magni, A. Amici, M. Emanuelli [et al.] // *Cell. Mol. Life. Sci.* – 2004. – Vol. 61, N 1. – P. 19-34.
83. Reed L. J. From lipoic acid to multi-enzyme complexes / L. J. Reed // *Protein Sci.* – 1998. – Vol. 7, N 1. – P. 220-224.
84. Anderson B. B. Effect of riboflavine on red cell metabolism of vitamin B₆ / B. B. Anderson, M. Saary, J. E. Stephens // *Nature.* – 1976. – N 5576. – P. 574-575.
85. McCormick D. B. Two interconnected B vitamins: riboflavin and pyridoxine / D. B. McCormick // *Physiol. Rev.* – 1989. – Vol. 69, N 4. – P. 1170-1198.
86. Metabolism of vitamin B-6 by human liver / A. H. Merrill Jr, J. M. Henderson, E. Wang [et al.] // *J. Nutr.* – 1984. – Vol. 114, N 9. – P. 1664-1674.
87. Lakshmi A. V. Regulation of blood pyridoxal phosphate in riboflavin deficiency in man / A. V. Lakshmi, M. S. Bamji // *Nutr. Metab.* – 1976. – Vol. 20, N 4. – P. 228-233.
88. Lakshmi A. V. Riboflavin metabolism--relevance to human nutrition / A. V. Lakshmi // *Indian J. Med. Res.* – 1998. – Vol. 108, N 11. – P. 182-190.
89. Кирпичев М. П. Влияние пантотеновой кислоты, пиридоксина, никотиновой кислоты на ренальную экскрецию витаминов группы «В» у больных туберкулезом детей / М. П. Кирпичев, А. И. Одинцов // *Межвитаминовые взаимоотношения: Мат. 3-го Гродненского симпозиума, 29-31 мая 1975 г.: тезисы докл.* – Гродно, 1975. – С. 71.
90. Виноградов В. В. К вопросу о функциональном состоянии тиаминдифосфата в печени (влияние некоторых витаминных и гормональных факторов) / В. В. Виноградов // *Межвитаминовые взаимоотношения: Мат. 3-го Гродненского симпозиума, 29-31 мая 1975 г.: тезисы докл.* – Гродно, 1975. – С. 25-27.
91. Струмило С. А. К вопросу о влиянии никотиновой кислоты на обмен тиамин / С. А. Струмило // *Мат. 2-го Гродн. симп. Тиамин 2, 1972 г.: тезисы докл.* – Гродно, 1972. – С. 120.
92. Гордеев Я. Я. Влияние никотиновой кислоты на обеспеченность тиамином организма больных рассеянным склерозом / Я. Я. Гордеев // *Межвитаминовые взаимоотношения: Мат. 3-го Гродненского симпозиума, 29-31 мая 1975 г.: тезисы докл.* – Гродно, 1975. – С. 36.

93. Доста Г. А. Выделение с мочой ^{35}S -тиамина и ^{35}S -окситиамина при одновременном введении некоторых водорастворимых витаминов или их производных / Г. А. Доста, Ю. М. Островский, М. Н. Садовник // Межвитаминовые взаимоотношения: Мат. 3-го Гродненского симпозиума, 29-31 мая 1975 г.: тезисы докл. – Гродно, 1975. – С. 54.
94. Максимович Я. Б. Никотинамидные коферменты при избытке в организме витамина B_6 / Я. Б. Максимович // Мат. Всесоюз. симп. Биохимия синтеза и обмена коферментов и коферментных витаминов, 1972 г.: тезисы докл. – Киев, 1972. – С. 18-20.
95. Гельберг И. С. Влияние пиридоксина на обеспеченность витаминами группы В и аскорбиновой кислотой при туберкулезе / И. С. Гельберг, Ф. К. Цишкевич, М. М. Жаровина // Межвитаминовые взаимоотношения: Мат. 3-го Гродненского симпозиума, 29-31 мая 1975 г.: тезисы докл. – Гродно, 1975. – С. 32-35.
96. Леус Н. Ф. Обмен коферментных форм витаминов РР, B_1 и B_6 при моделировании патологических состояний и воздействия бальнеотерапевтических факторов: автореф. дисс. на получение науч. степени доктора мед. наук: спец. 03.00.04 "Биохимия" / Н. Ф. Леус. – К., 1986. – 36 с.
97. Обмен витаминов группы В при язвенной болезни двенадцатиперстной кишки, гипертонической болезни и ишемической болезни сердца / В. М. Коденцова, О. А. Вржесинская, Л. А. Харитончик [и др.] // Вопр. мед. химии. – 1994. – Т. 40, №2. – С. 41-45.
98. Взаимодействие липоевой кислоты и тиамина при всасывании в тонком кишечнике собак / Л. М. Карпов, А. Я. Розанов, Р. О. Файтельберг [и др.] // Физиол. журн. – 1985. – Т. 31, № 6 – С. 750-753.
99. Леус Н. Ф. О механизме взаимодействия тиамина с некоторыми коферментными витаминами (РР и B_6) / Н. Ф. Леус // Мат. 2-го Гродн. симп. Тиамин 2, 1972 г.: тезисы докл. – Гродно, 1972. – С. 62-65.
100. Леус Н. Ф. О взаимоотношении метаболизма и транспорта тиамина и никотинамидных коэнзимов в клетках печени / Н. Ф. Леус // Межвитаминовые

взаимоотношения: Мат. 3-го Гродненского симпозиума, 29-31 мая 1975 г.: тезисы докл. – Гродно, 1975, – С. 84-86.

101. Взаимоотношения между тиамином и никотиновой кислотой, а также их коферментными формами / Ю. М. Островский, Г. Н. Михальцевич, Э. А. Гриценко [и др.] // Биохимия синтеза и обмена коферментов и коферментных витаминов: Мат. 1-го Всесоюз. симп.: тезисы докл. – Киев, 1972. – С. 23-24.

102. Витаминные препараты: [справочник / отв. ред. М. Смирнов]. – М.: Медицина, 1969. – 112 с.

103. Дьяченко З. Ф. Онтогенетические особенности окисления пирувата митохондриями при витаминной и субстратно-гормональной индукции: Автореф. дис. на получение науч. степени канд. биол. наук: спец. 03.00.04 "Биохимия" / З.Ф. Дьяченко. – Одесса, 1968. – 22 с.

104. Карпов Л. М. Вплив вітамінів на депонування ^{35}S -ліпоату у тканинах мишей / Л. М. Карпов, А. Я. Розанов // Укр. біохім. журн. – 1973. – № 4. – С. 448-452.

105. Розанов А. Я. Влияние витаминов на проницаемость эритроцитов для ^{14}C -никотината в условиях действия на организм перегрузки / А. Я. Розанов, В. Н. Тоцкий, Б. З. Беккер // Укр. біохім. журнал. – 1972. – №4. – С. 509-514.

106. Слизовска К. С. Взаимодействие витаминов в организме, при связывании ^{35}S -липоата тканями, клетками и белками крови: автореф. дис. на получение науч. степени канд. биол. наук: спец. 03.00.04 "Биохимия" / К. С. Слизовска. – Одесса, 1976. – 20 с.

107. Тоцкий В. Н. О межвитаминовых взаимоотношениях при проникновении витаминов в клетки слизистой тонкого кишечника после гравитационной перегрузки белых крыс / В. Н. Тоцкий // Физиология и патология всасывания в желудочно-кишечном тракте: Мат. 2-го Всесоюз. симп. – Одесса, 1973. – С. 116-118.

108. Тоцкий В. Н. Межвитаминовые взаимодействия в процессах регуляции проницаемости мембран / В. Н. Тоцкий, В. А. Ольшанецкая // Межвитаминовые взаимоотношения: Мат. 3-го Гродненского симпозиума, 29-31 мая 1975 г.: тезисы докл. – Гродно, 1975. – С. 169-171.

109. Тоцкий В. Н. Мембранный транспорт некоторых коферментных витаминов: автореф. дисс. на получение науч. степени д-ра биол. наук: спец. 03.00.04 "Биохимия" / В. Н. Тоцкий. – Киев, 1980. – 41 с.
110. Acetylation stoichimetry of Esch. coli pyruvate dehydrogenase complex / D. C. Speckhard, B. H. Ikeda, S. S. Wong [et al.] // Biochem. and Biophys. Res. Communs. – 1977. – N 2. – P. 708-713.
111. Петров С. А. Особенности взаимодействия функционально связанных витаминов в организме мидий, кефалей и крыс: автореф. дис. на получение науч. степени канд. биол. наук: спец. 03.00.04 "Биохимия" / С. А. Петров. – Минск, 1979. – 20 с.
112. Петров С. А. Филогенетические особенности взаимодействия витаминов в организме и митохондриях печени / С. А. Петров, Нгуен Хоанг Уэн // Межвитаминные взаимоотношения: Мат. 3-го Гродненского симпозиума, 29-31 мая 1975 г.: тезисы докл. – Гродно, 1975. – С. 124-126.
113. Effect of high and low arterial blood oxygen content on cerebral energy metabolic levels during hypoxia with normothermia and hypothermia in the rat / M. M. Keykha, M. Hagerdal, F. A. Welsh [et al.] // Anesthesiology. – 1980. – N 6. – P. 492-495.
114. Борец В. М. Витамины и сердечно-сосудистые заболевания / Борец В. М. – Мн.: Беларусь, 1984. – 112 с.
115. Кирпичев М. П. Обмен витаминов группы В у больных туберкулезом детей при комплексной витаминизации / М. П. Кирпичев // Пробл. туберкулеза. – 1979. – № 5. – С. 48-53.
116. Шельгина Н. М. Влияние витамина Е и комплекса витаминов группы В на некоторые показатели метаболизма при ревматизме / Н. М. Шельгина // Межвитаминные взаимоотношения: Мат. 3-го Гродненского симпозиума, 29-31 мая 1975 г.: тезисы докл. – Гродно, 1975. – С. 192.
117. Лисицкая Р. Г. Влияние поливитаминно-микроэлементарного комплекса «Геротон» на функцию и структуру надпочечников животных разного возраста /

Р. Г. Лисицкая, Ч. М. Зимбалева, Н. А. Межиборская // Микроэлементы в медицине. – К., 1974. – С. 106-109.

118. Западнюк В. И. Сравнительное изучение влияния поливитаминных препаратов и отдельных витаминов на электролитный состав тканей молодых и старых крыс / В. И. Западнюк, Л. П. Купраш // Межвитаминные взаимоотношения: Мат. 3-го Гродненского симпозиума, 29-31 мая 1975 г.: тезисы докл. – Гродно, 1975. – С. 60.

119. Изучение обмена тиамин витамина В₁ и его коррекция у больных и угрожаемых по сахарному диабету / М. П. Павловский, Я. И. Томашевский, А. Я. Томашевская, А. И. Сергиенко. – Львов, 1982. – 56 с.

120. Подорожный А. П. Обеспеченность витаминами В₁, В₂, РР, В₆, С и обоснование их применения у больных железодефицитными анемиями: автореф. дис. на получение науч. степени канд. мед. наук: спец. 03.00.04 "Биохимия" / А. П. Подорожный – Киев, 1983. – 16 с.

121. Хмелевский Ю. В. Взаимоотношения между витаминами при гипоксических состояниях / Ю. В. Хмелевский // Межвитаминные взаимоотношения: Мат. 3-го Гродненского симпозиума, 29-31 мая 1975 г.: тезисы докл. – Гродно, 1975. – С. 184.

122. Leclere J. Thiamine, riboflavine et vitamine В₆ tissuelacres chez le rat age. Influence deune surcharge vitaminique dans l'cau de boisson / J. Leclere // Ann. metr. etalim. – 1977. – N 1. – P. 19-25.

123. Любарев А. Е. Надмолекулярная организация ферментов цикла трикарбоновых кислот / А. Е. Любарев, Б. И. Курганов // Молек. биология. – 1987. – Т. 21, № 5. – С. 1286-1296.

124. Розанов А. Я. Механизмы регуляции биокатализа: учебн. пособие / А. Я. Розанов. – Киев: Вища шк., 1989. – 240 с.

125. Исследование центров связывания тиаминпирофосфата α -апопируватдегидрогеназой спектральными методами / Л. Г. Корочкина; МГУ им. М. В. Ломоносова. – М., 1983. – 132 с. – Деп. в ВИНТИ 16.03.84, № 1506-84.

126. Хайлова Л. С. Новые аспекты тиамин и механизм действия тиаминдифосфата в реакциях окислительного и неокислительного декарбоксилирования α -кетокислот / Л. С. Хайлова, А. М. Юркевич, С. В. Северин // Коферменты / Под ред. В. А. Яковлева. – М.: Медицина, 1973. – С. 256-291.
127. Мецлер Д. Биохимия: в 3 т. / Д. Мецлер; пер. с англ. под ред. А. Е. Браунштэйна, Л. М. Гинодмана, Е. С. Северина. – М.: Мир, 1980. – Т. 2. – 1980. – 608 с.
128. Страйер Л. Биохимия: в 3 т. / Л. Страйер; пер. с англ. Р. Б. Капнер и А. М. Колчинского: под ред. С. Е. Северина. – М.: Мир, 1985 – Т. 2. – 1985. – 312 с.
129. Kresze G. B. Limited protolysis and structure of the dihydrolipoamide acetyltransferase component of bovine kidney pyruvate dehydrogenase complex / G. B. Kresze, H. Ronft // Hoppe. Scyler's Z Physiol. Chem. – 1980. – N 9. – P. 1308-1309.
130. Angelides K. J. Fluorescence studies of pyruvate dehydrogenase multienzyme complex from Esch. Coli / K. J. Angelides, G. G. Hammes // Biochem. – 1979. – N 7. – P. 1223-1229.
131. Стафеева О. А. Модификация аргениновых остатков α -кетоглутаратдегидрогеназы 2,3-бутандиолом / О. А. Стафеева, В. С. Гомазкова, С. Е. Северин // Докл. АН СССР. – 1980. – №2. – С 497-505.
132. Струмило С. А. Стационарная кинетика реакций, катализируемых пируватдегидрогеназным комплексом надпочечников быка / С. А. Струмило, С. В. Сенкевич, В. В. Виноградов // Биохимия. – 1980. – №8. – С. 1365-1370.
133. Ngo T. T. Kinetics studies of the flavoprotein component E3 of brain pyruvate dehydrogenase multienzyme complex / T. T. Ngo, A. Barbeau // Int. J. Biochem. – 1978. – N 9. – P. 681-684.
134. Ngo T. T. Study state kinetics of rat brain pyruvate dehydrogenase multienzyme complex / T. T. Ngo, A. Barbeau // J. Neurochem. – 1978. – Vol. 31, N 1. – P. 69-75.
135. Booth R. F. G. The control of pyruvate dehydrogenase in isolated brain mitochondria / R. F. G. Booth, J. B. Clark // J. Neurochem. – Vol. 67, 1978. – N 5. – P. 1003-1008.

136. Morgan D. G. Brain pyruvate dehydrogenase activity: regulation by phosphorylation-dephosphorylation / D. G. Morgan, A. Routtenberg // *Brain Res.* – 1982. – Vol. 251, N 2. – P. 391-394.
137. Rao K. P. Plant pyruvate dehydrogenase complex: inactivation and reactivation by phosphorylation and dephosphorylation / K. P. Rao, D. Randall // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1980. – Vol. 200, N 2. – P. 461-466.
138. Крю Ж. Биохимия. Медицинские и биологические аспекты / Ж. Крю; пер. с франц. Л. А. Остермана. – М.: Медицина, 1979. – 510 с.
139. Савицький І. В. Біологічна хімія: підручник / І. В. Савицький. – Київ: Вища шк., 1973. – 488 с.
140. Roche Th. E. Regulation of fat body pyruvate dehydrogenase complex in the tobacco hornworm *Manduca sexta* L Lepidoptera; sphingidae / Th. E. Roche, K. J. Kramer, D. W. Dyer // *Insect. Biochem.* – 1980. – N 5. – P. 577-582.
141. Влияние тиаминна на активність піруватдегідрогеназного комплексу печінки крис при інтенсифікації ліпогенезу / Ю. М. Пархоменко, А. І. Вовк, З. С. Протасова [и др.] // *Укр. біохім. журн.* – 1983. – №4. – С. 408-411.
142. Alkonj I. Demonstration of a lag period in the timecourse of the reaction catalyzed by pyruvate dehydrogenase complex / I. Alkonj, L. Gyoesi, B. Siimegi // *Acta biochem. et biophys. Acad. sci. hung.* – 1978. – N 4. – P. 253-258.
143. Распределение ³⁵S-липоевой кислоты и ее влияние на активность пируватдегидрогеназы крис с карциномой Уокера / Л. М. Карпов, Е. Д. Двужильная, В. И. Саввов [и др.] // *Вопр. Онкологии.* – 1977. – №10. – С. 87-90.
144. Fluorescence polarization and energy transfer studies on the pyruvate dehydrogenase complex of *Esch. coli* / W. H. Scouten, A. J. Visser, H. J. Grande [et al.] // *Eur. J. Biochem.* – 1980. – N 1. – P. 9-16.
145. Гомазкова В. С. Регуляція α-кетоглутаратдегідрогеназного комплексу із грудної м'язи голубя / В. С. Гомазкова, О. Э. Красовская // *Биохимия.* – 1979. – Т. 44, №6. – С. 1126-1136.
146. Розанов А. Я. Биохимическое обоснование комплексного применения витаминов, коферментных дегидрогеназам α-кетокислот / А. Я. Розанов, Л. М.

Карпов // Метаболические эффекты недостаточности функционально связанных В-витаминов / Ю.М. Островский. – Минск, 1987. – С. 248-255.

147. Hoes M. J. The significance of the serum levels of vitamine B₁, and magnesium in derilium thremens and alcoholism / M. J. Hoes // J. Clin. Psychiat. – 1979. – N 11. – P. 476-479.

148. Studies on regulation of pyruvate dehydrogenase in the isolated perfused rat heart / S. C. Dennis, A. Padma, M. A. De Buyere [et al.] // J. Biol. Chem. – 1977. – N 4. – P. 1252-1258.

149. Gubler C. J. Effects of conditions favoring enzyme phosphorylation and dephosphorylation on the activity of the α -ketoacid dehydrogenase with particular reference to the branched-chain α -ketoacid dehydrogenase activities / C. J. Gubler, R. L. Malquist // Biochem. and Biophys. Res. Commun. – 1979. – Vol. 86, N 3. – P. 855-861.

150. Струмило С. А. Участие Ca⁺⁺ в регуляции активности оксоглутаратдегидрогеназного комплекса из коры надпочечников быка / С. А. Струмило // Укр. біохім. журнал. – 1983. – №4. – С. 415-419.

151. Denton R. M. The role of calcium in the regulation of mitochondrial metabolism / R. M. Denton, J. McCormack // Biochem. Soc. Trans. – 1980. – N 3. – P. 266-268.

152. Kerbey A. L. Role of multi-site phosphorylation in regulation of pig heart pyruvate dehydrogenase phosphatase / A. L. Kerbey, P. Randle // FEBS Lett. – 1979. – Vol. 108, N 2. – P. 485-488.

153. McCormack J. G. Role of calcium ion in the regulation of intermitochondrial metabolism. Properties of the Ca²⁺ sensitive dehydrogenase within intact uncoupled mitochondria from white and brown adipose tissue of the rat / J. Mc Cormack, R. M. Denton // Biochem. J. – 1980. – Vol. 190, N 3. – P. 95-105.

154. Paetzke-Brunner I. Activation of the fat cell pyruvate dehydrogenase complex PDC by insulin and hypoperoxides / I. Paetzke-Brunner, G. Feit, O. H. Wieland // Diabetologia. – 1980. – N 3. – P. 304-310.

155. Hems D. A. Activation of pyruvate dehydrogenase in the perfused rat liver by vasopressin / D. A. Hems, J. G. Mc Cormack, R. M. Denton // Biochem. J. – 1978. – N 2. – P. 627-629.

156. Зобова К. В. Влияние катехоламинов на активность пируватдегидрогеназы печени мышей / К. В. Зобова // Регуляторные эффекты и обмен моноаминов и циклонуклеотидов: Всесоюз. симп.: тезисы докл. – Красноярск, 1979. – С. 33-36.
157. McCormack J. G. Evidence that fatty synthesis in the intercapsular brown adipose tissue of cold-adapted rats is increased in vivo by insulin by mechanisms involving parallel activation of pyruvate dehydrogenase and acetyl-coenzyme A carboxylase / J. G. McCormack, R. M. Denton // *Biochem. J.* – 1977. – Vol. 166, N 3. – P. 641-646.
158. McCormack J. G. Studies of heart pyruvate dehydrogenase activity. Effect of starvation and diabetes / J. G. McCormack, M. J. Edgel, P. M. Denton // *Biochem. J.* – 1982. – N 2. – P. 419-427.
159. Нарушение процессов карбоксилирования и декарбоксилирования в организме при гипоксии / Н. Г. Гандирук, С. А. Петров, Л. М. Карпов [и др.] // IV Укр. биохим. съезд, 1982 г.: тезисы докл. – Киев: Наук. Думка, 1982. – С. 212-213.
160. Подорожный П. Г. Клиническая витаминология / П. Г. Подорожный, Я. И. Томашевский. – Киев: Здоров'я, 1977. – 144 с.
161. Хмелевский Ю. В. Обмен тиамин и активность тиаминных ферментов в организме при некоторых гипоксических состояниях: автореф. дисс. на получение науч. степени д-ра мед. наук: спец. 03.00.04 "Биохимия" / Ю. В. Хмелевский. – Киев, 1967. – 42 с.
162. Flexibility of an active center in sodium-plus-potassium adenosine triphosphatase / R. L. Post, T. Kume, B. Tobin [et al.] // *J. Gen. Physiol.* – 1969. – Vol. 54, N 2. – P. 306S-326S.
163. Molecular cloning of rat brain Na,K-ATPase α -subunit cDNA / J. W. Schneider, R. W. Mercer, M. Caplan [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1985. – Vol. 82, N 9. – P. 6357-6361.
164. Shull G. E. Molecular cloning of three distinct forms of the Na⁺,K⁺-ATPase α -subunit from rat brain / G. E. Shull, J. Greeb, J. B. Lingrel // *Biochemistry.* – 1986. – Vol. 25, N 25. – P. 8125-8132.

165. The family of human Na⁺,K⁺-ATPase genes no less than five genes and/or pseudogenes related to the α -subunit / E. D. Sverdlov, G. S. Monastyrskaya, N. E. Broude [et al.] // FEBS Lett. – 1987. – Vol. 217, N 2. – P. 275-278.
166. Shamraj O. I. A putative fourth Na⁺,K⁺-ATPase α -subunit gene is expressed in testis / O. I. Shamraj, J. Lingrel // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1994. – Vol. 91, N 12. – P. 12952-12956.
167. Functional characterization of a testes-specific α -subunit isoform of the sodium/potassium adenosinetriphosphatase / G. Blanko, R. Melton, G. Sanchez [et al.] // Biochemistry. – 1999. – Vol. 38, N 41. – P. 13661-13669.
168. Identification of a putative isoform of the Na,K-ATPase beta subunit. Primary structure and tissue-specific expression / P. Martin-Vasallo, W. Dackowski, J. R. Emanuel [et al.] // J. Biol. Chem. – 1989. – Vol. 264, N 8. – P. 4613-4618.
169. The adhesion molecule on glia (AMOG) is a homologue of the beta subunit of the Na,K-ATPase / S. Gloor, H. Antonicek, K. J. Sweadner [et al.] // J. Cell. Biol. – 1990. – Vol. 110, N 1. – P. 165-174.
170. Identification of the mammalian Na, K-ATPase β_3 subunit / N. Malik, V. A. Canfield, M. C. Backers // J. Biol. Chem. – 1996. – Vol. 271, N 37. – P. 22754-22758.
171. Besirli C.G. Novel β_3 isoform of the Na, K-ATPase β subunit from mouse retina / C. G. Besirli, T. W. Gong, M. I. Lomax // Biochim. Biophys. Acta. – 1997. – Vol. 1350, N 1. – P. 21-26.
172. Kinetic properties of the $\alpha_2\beta_1$ and $\alpha_2\beta_2$ isoenzymes of the Na, K-ATPase / G. Blanko, J. C. Koster, G. Sanchez [et al.] // Biochemistry. – 1995. – Vol. 34, N 1. – P. 319-325.
173. Na⁺, K⁺-ATPase isozyme diversity; comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions / A. Mobasheri, J. Avila, I. Cozar-Castellano [et al.] // Biosci. Rep. – 2000. – Vol. 20, N 2. – P. 51-91.
174. Chapter 3 structural requirements for subunit assembly of the Na, K-ATPase / D. M. Fambrough, M. V. Lemas, K. Takeyasu [et al.] // Current Topics in Membranes. – 1994. – Vol. 41, N 1. – P. 45-69.

175. Sarvazyan N. A. Intersubunit and intrasubunit contact regions of Na^+ / K^+ -ATPase revealed by controlled proteolysis and chemical cross-linking / N. A. Sarvazyan, N. N. Modynov, A. Askari // *Biol. Chem.* – 1995. – Vol. 270, N 44. – P. 26528-26532.
176. Blanco G. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function / G. Blanco, R. Mercer // *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* – 1998. – №5. – P. F633-F650.
177. Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution / C. Toyoshima, M. Nakasako, H. Nomura [et al.] // *Nature.* – 2000. – Vol. 405, N 6787. – P. 647-655.
178. Kirley T. Determination of three disulfide bonds and one free sulfhydryl in the beta subunit of (Na, K)-ATPase / T. Kirley // *Biol. Chem.* – 1989. – Vol. 264, N 13. – P. 7185-7192.
179. Therein A. Mechanisms of sodium pump regulation / A. Therein, R. Bloshtein // *Am. J. Physiol.* – 2000. – Vol. 279, N 3. – P. C541-C566.
180. Schalzing G. Na^+ / K^+ -pump beta subunits: structure and functions / G. Schalzing, S. Gloor // *Cell Physiol. Biochem.* – 1994. – Vol. 4, N 3-4. – P. 96-114.
181. Hydrophobic C-terminal amino acids in the β -subunit are involved in assembly with the α -subunit of Na, K-ATPase / A. T. Beggah, P. Beguin, P. Jaunin [et al.] // *Biochemistry.* – 1993. - Vol. 32, N 51. – P. 14117-14124.
182. Askari A. Significance of protein-protein interactions to Na^+ / K^+ -ATPase functions // *Na / K-ATPase and related ATPases* / K. Taniguchi, S. Kaya. – Amsterdam: Elsevier Science, 2000. – P. 17-26.
183. Askari A. ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase: on the number of the ATP sites of the functional unit / A. Askari // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 1987. - Vol. 19, N 4. – P. 359-374.
184. Periyasamy S. M. Subunit associations of ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-dependent adenosine triphosphatase. Chemical cross-linking studies / S. M. Periyasamy, W. H. Huang, A. Askari // *J. Biol. Chem.* – 1983. - Vol. 258, N 16. – P. 9878-9885.
185. Dahl J. L. The sodium-potassium adenosinetriphosphatase / J. L. Dahl, L. Hokin // *Annu. Rev. Biochem.* – 1974. – Vol. 43. – P. 327-356.

186. Repke K. R. H. A model for allosteric regulation of Na^+ / K^+ -transporting ATPase / K. R. H. Repke // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1986. – Vol. 864, N 2. – P. 195-212.
187. Robinson J. D. The $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -activated ATPase enzymatic and transport properties / J. D. Robinson, M. Flashner // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1979. – Vol. 549, N 2. – P. 145-176.
188. Akera T. Digitalis sensitivity of Na^+, K^+ -ATPase, myocytes and the heart / T. Akera, Y.-C. Ng // *Life. Sci.* – 1991. - Vol. 48, N 2. – P. 97-106.
189. Structure-function studies of the Na, K-ATPase / J. B. Lingrel, J. van Huysse, W. O'Brien [et al.] // *Kidney Int. Suppl.* – 1994. – Vol. 45, N 4. – P. S32-S39.
190. Doris P. Regulation of Na, K-ATPase by endogenous ouabain-like materials / P. Doris // *PSEBM.* – 1994. – Vol. 205, N 3. – P. 202-212.
191. Buckalew V. M. Summary of a symposium on natriuretic and digitalis-like factors / V. M. Buckalew, H. Gonick // *Clin. Exp. Hypertens.* – 1998. – Vol. 20, N 5-6. – P. 481-488.
192. Существует ли связь между присутствием в сыворотке крови больных артериальной гипертензией белкового компонента с M_r 15 кД и ингибирующим действием сыворотки на Na, K-АТФазу? / Е. А. Рогаева, Н. В. Перова, А. А. Александров [и др.] // *Вопр. мед. химии.* – 1987. – Т. 33, № 4. – С. 34-39.
193. Haddy F. J. The role of a humoral Na^+, K^+ -ATPase inhibitor in regulating precapillary vessel tone / F. J. Haddy // *Cardiovasc. Pharmacol.* – 1984. – Vol. 6, N 2. – P. S439-S456.
194. Tao Q.-F. Sodium pump inhibition and regional expression of sodium pump α -isoforms in lens / Q.-F. Tao, N. K. Hollenberg, S. W. Graves // *Hypertension.* – 1999. – Vol. 34, N 5. – P. 1168-1174.
195. Are there several isoforms of Na, K-ATPase alpha subunit in the rabbit kidney? / C. Barlet-Bas, E. Arystarkhova, L. Cheval [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1993. – Vol. 268, N 16. – P. 11512-11515.
196. Phosphorylation of the catalytic subunit of Na^+, K^+ -ATPase inhibits the activity of the enzyme / A. M. Bertorello, A. Aperia, S. I. Walaas [et al.] // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1991. – Vol. 88, N 12. – P. 11359-11362.

197. Phosphorylation of Na, K-ATPase alpha-subunits in microsomes and in homogenates of *Xenopus* oocytes resulting from the stimulation of protein kinase A and protein kinase C / A. V. Chibalin, L. A. Vasilets, H. Hennekes [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1992. – Vol. 267, N 31. – P. 22378-22384.
198. Phosphorylation of the Na, K-ATPase by Ca, phospholipid-dependent and cAMP-dependent protein kinases. Mapping of the region phosphorylated by Ca, phospholipid-dependent protein kinase / A. V. Chibalin, O. D. Lopina, S. R. Petukhov [et al.] // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 1993. – Vol. 25, N 1. – P. 61-66.
199. Feschenko M. S. Conformation-dependent phosphorylation of Na, K-ATPase by protein kinase A and protein kinase C / M. S. Feschenko, K. J. Sweadner // *J. Biol. Chem.* – 1994. - Vol. 269, N 48. – P. 30436-30444.
200. Identification of the phosphorylation site for cAMP-dependent protein kinase on Na⁺, K(+) -ATPase and effects of site-directed mutagenesis / G. Fisone, S. X. Cheng, A.C. Nairn [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1994. – Vol. 269, N 12. – P. 9368-9373.
201. Phosphorylation of the Na, K-ATPase alpha-subunit by protein kinase A and C in vitro and in intact cells. Identification of a novel motif for PKC-mediated phosphorylation / P. Beguin, A. T. Beggah, A. V. Chibalin [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1994. – Vol. 269, N 39. – P. 24437-24445.
202. Cornelius F. Functional regulation of reconstituted Na, K-ATPase by protein kinase A phosphorylation / F. Cornelius, N. Logvinenko // *FEBS Lett.* – 1996. – Vol. 380, N 3. – P. 277-280.
203. Фосфорилирование α -субъединицы Na, K-АТФазы из солевых желез уток под действием сАМР-зависимой протеинкиназы ингибирует активность фермента / Д. А. Муртазина, С. П. Петухов, А. М. Рубцов [и др.] // *Биохимия.* – 2001. – Т. 66, № 8. – С. 1066-1077.
204. Kurihara K. Regulation of Na⁺-K⁺-ATPase by cAMP-dependent protein kinase anchored on membrane via its anchoring protein / K. Kurihara, N. Nakanishi, T. Ueha // *Am. J. Physiol.* – 2000. – Vol. 279, N 5. – P. C1516-C1527.
205. Fotis H. Phosphorylation of the α -subunits of the Na⁺ / K⁺-ATPase from mammalian kidneys and *Xenopus* oocytes by cGMP-dependent protein kinase results in

- stimulation of ATPase activity / H. Fotis, L. V. Tatjanenko, L. A. Vasilets // *Eur. J. Biochem.* – 1999. – Vol. 260, N 3. – P. 904-910.
206. Lowndes J. M. Kinetics of phosphorylation of Na⁺ / K⁺-ATPase by protein kinase C / J. M. Lowndes, M. Hokin-Neaverson, P. J. Bertics // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1990. – Vol. 1052, N 1. – P. 143-151.
207. Feschenko M. S. Structural basis for species-specific differences in the phosphorylation of Na, K-ATPase by protein kinase C / M. S. Feschenko, K. J. Sweadner // *J. Biol. Chem.* – 1995. – Vol. 270, N 23. – P. 14072-14077.
208. Feschenko M. S. Phosphorylation of Na, K-ATPase by protein kinase C at ser¹⁸ occurs in intact cells but does not result in direct inhibition of ATP hydrolysis / M. S. Feschenko, K. J. Sweadner // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272, N 28. – P. 17726-17733.
209. Dopamine-induced endocytosis of Na⁺, K⁺-ATPase is initiated by phosphorylation of ser-18 in the rat subunit and is responsible for the decreased activity in epithelial cells / A. V. Chibalin, G. Ogimoto, C. H. Pedemonte [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274, N 4. – P. 1920-1927.
210. Simultaneous phosphorylation of Ser11 and Ser18 in the α -subunit promotes the recruitment of Na⁺, K⁺-ATPase molecules to the plasma membrane / R. Efendiev, A. M. Bertorello, T. Pressley [et al.] // *Biochemistry.* – 2000. – Vol. 39, N 32. – P. 9884-9892.
211. Phosphoinositide-3 kinase binds to a proline-rich motif in the Na⁺, K⁺-ATPase α subunit and regulates its trafficking / G. A. Yudowski, R. Efendiev, C. H. Pedemonte [et al.] // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 2000. – Vol. 97, N 6. – P. 6556-6561.
212. Insulin-induced stimulation of Na⁺, K⁺-ATPase activity in kidney proximal tubule cells depends on phosphorylation of the α -subunit at tyr-10 / E. Feraille, M. L. Carranza, S. Gonin [et al.] // *Mol. Biol. Cell.* – 1999. – Vol. 10, N 9. – P. 2847-2859.
213. Feschenko M. S. Phosphorylation of Na, K-ATPase by protein kinases. Sites, susceptibility, and consequences / M. S. Feschenko, R. Wetzell, K. J. Sweadner // *Ann. NY Acad. Sci.* – 1997. – Vol. 834, N 3. – P. 479-488.

214. Matsuda T. Specific inactivation of $\alpha(+)$ molecular form of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ by pyrithiamin / T. Matsuda, H. Iwata, J. R. Cooper // *J. Biol. Chem.* – 1984. – Vol. 259, N 6. – P. 3858-3863.
215. Функциональная зависимость между Na / K -АТФазой и NMDA-рецепторами в гранулярных клетках мозжечка крыс / А. Болдырев, Е. Булыгина, О. Герасимова [и др.] // *Биохимия.* – 2004. – Т. 69, № 4. – С. 530-536.
216. Sources of reactive oxygen species production in excitotoxin-stimulated cerebellar granule cells / A. Boldyrev, D. Carpenter, M. Huentelman [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1999. – Vol. 256, N 2. – P. 320-324.
217. Neuronal cell death and reactive oxygen species / A. Boldyrev, R. Song, V. Dyatlov [et al.] // *Cell. Molec. Neurobiol.* – 2000. – Vol. 20, N 4. – P. 433-450.
218. A flow cytometric study of N-methyl-D-aspartate effects on dissociated cerebellar cells / F. Sureda, A. Camins, R. Trullas [et al.] // *Brain Res.* – 1996. – Vol. 723, N 1-2. – P. 110-114.
219. Flow-cytometric estimation on glutamate- and kainate-induced increases in intracellular Ca^{2+} of brain neurons: a technical aspect / Y. Oyama, D. Carpenter, L. Chikahisa [et al.] // *Brain Res.* – 1996. – Vol. 728, N 1. – P. 121-124.
220. Акопова О. В. Влияние L-аргинина на активность Na^+, K^+ -АТФазы эндотелия аорты крысы / О. В. Акопова, О. Н. Харламова, Г. Л. Вавилова // *Биохимия.* – 2002. – Т. 67, № 9. – С. 1277-1281.
221. Erdmann E. Quantitative aspects of ouabain binding to human erythrocyte and cardiac membranes / E. Erdmann, W. Hasse // *J. Physiol. (London).* – 1975. – Vol. 251, N 3. – P. 671-682.
222. Jorgensen P. L. Mechanism of the Na^+, K^+ pump protein structure and conformations of the pure $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ / P. L. Jorgensen // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1982. – Vol. 694, N 1. – P. 27-68.
223. Kabakov A. Yu. The resting potential equations incorporating ionic pumps and osmotic concentration / A. Yu. Kabakov // *J. Theor. Biol.* – 1994. – Vol. 169, N 1. P. 51-64.

224. Coupling of the $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ exchanger, Na^+ / K^+ pump and sarcoplasmic reticulum in smooth muscle / E. D. Moore, E. F. Etter, K. D. Philipson [et al.] // *Nature*. – 1993. – Vol. 365, N 6447. – P. 657-660.
225. Avkiran M. Regulation of cardiac sarcolemmal Na^+ / H^+ exchanger activity: potential pathophysiological significance of endogenous mediators and oxidant stress / M. Avkiran, A. Snabaitis // *J. Thromb. Thrombolysis*. – 1999. – Vol. 8, N 1. P. 25-32.
226. Greger R. Physiology of renal sodium transport / R. Greger // *Am. J. Med. Sci.* – 2000. – Vol. 319, N 1. – P. 51-62.
227. Nelson W. J. Ankyrin binding to $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ and implications for the organization of membrane domains in polarized cells / W. J. Nelson, P. Veshnock // *Nature*. – 1987. – Vol. 328, N 6130. – P. 533-537.
228. Shank B. B. Regulation of cellular growth by sodium pump activity / B. B. Shank, N. Smith // *J. Cell. Physiol.* – 1976. – Vol. 87, N 3. – P. 377-387.
229. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте: [учебное пособие] / И. П. Западнюк, В. И. Западнюк, Е. А. Захария, Б. В. Западнюк. – К.: Вища школа, 1983. – 383 с.
230. Островский Ю. М. Экспериментальная витаминология / Под. ред. Ю. М. Островского. – Минск: Наука и техника, 1979. – 551 с.
231. Определение N_1 -метилникотинамида и никотиновых коферментов в биологических средах флуоресцентным методом / О. А. Коденцова, А. А. Вражинская, Т. Г. Сокольников [и др.] // *Вопросы питания*. – 1992. – Т. 51, № 2. – С. 62-67.
232. Юденфренд С. Флуоресцентный анализ в биологии и медицине / С. Юденфренд; пер. с англ. В. Е. Барского. – М.: Мир. – 1965. – 484 с.
233. Kiessling K. Thiamine diphosphate in growing tissues: III. Pyruvate oxidation in liver mitochondria from young and from thiamine diphosphate deficient adult rats / K.-H. Kiessling, C. G. Lundquist // *Exp. Cell. Res.* – 1962. – Vol. 26, N 1. – P. 189-197.
234. Lecocq J. Determination of inorganic phosphate in the presence of adenosine triphosphate by the molybdovanadate method / J. Lecocq, G. Inesi // *Analyt. Biochem.* – 1966. – Vol. 15, N 1. – P. 160-163.

235. Карпов Л. М. Реалізація специфічної активності функціонально зв'язаних вітамінів групи В, їх похідних і комплексів за різних станів організму: дис. ... доктора біол. наук: 14.00.25 / Карпов Леонід Михайлович. – Одеса, 1994. – 505 с.
236. Protein measurement with the Folin phenolreagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr [et al.] // J. Biol. Chem. – 1951. – V. 193. – P. 265-275.
237. Jorgensen P. L. Purification of Na / K-ATPase: enzyme sources, preparative problems, and preparation from mammalian kidney / P. L. Jorgensen // Methods in enzymology. – 1988. – Vol. 156. – P. 29-43.
238. Weber K. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis / K. Weber, M. Osborn // J. Biol. Chem. – 1969. – Vol. 244. – P. 4406-4412.
239. Гланц С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц; пер. с англ. Ю. Данилова. – М.: Практика, 1999. – 459 с.
240. Карпов Л. М. Роль Na^+ -, K^+ -АТФазы во взаимоотношениях тиамин и липоевой кислоты при всасывании, происходящем в желудочно-кишечном тракте / Л. М. Карпов // Физиол. журн. – 1989. – Т.35, №2. – С. 51-57.
241. Островский Ю. М. Активные центры и группировки в молекуле тиамин / Ю. М. Островский. – Минск: Наука и техника, 1975. – 423 с.
242. Савицкий И. В. О корреляции обеспеченности организма предшественниками коферментов с активностью дегидрогеназ α -кетокислот / И. В. Савицкий, А. Г. Солынина, Э. С. Савченко // Межвитаминные взаимоотношения: Мат. 3-го Гродненского симпозиума, 29-31 мая 1975 г.: тезисы докл. – Гродно, 1975. – С. 139-142.
243. Розанов А. Я. Влияние тиамин на уровень лабильного фосфата, АТФ, АДФ и некоторых других соединений в тканях морских свинок / А. Я. Розанов, Т. Цитко // Укр. біохім. журн. – 1965. – № 3. – С. 386-390.
244. Дія вітамінного комплексу на показники енергетики в тканинах щурів різного віку / Н. В. Полтавцева, Т. В. Васильєва, Л. М. Карпов [та ін.] // Вісник Одеського державного університету ім. І. І. Мечникова. – 2000. –Т. 5, № 1. – С. 30-34.

245. Пикамилон – новый вазоактивный и ноотропный препарат / Р. П. Кругликова-Львова, М. А. Ковлер, Р. С. Мирзоян [и др.] // Хим.-фарм. журн. – 1989. – №2. – С. 252-255.
246. Оптимальные соотношения некоторых витаминов группы В при их введении в организм животных / Л. М. Карпов, Л. Г. Савлущинская, В. Г. Савчук [и др.] // Клиническая витаминология : Всесоюз. конф., 18-20 июля 1991 г.: тезисы докл. – М., 1991. – С. 286-287.
247. Влияние витаминно-антиоксидантных комплексов на содержание некоторых витаминов в различных органах крыс, подвергшихся рентгеновскому облучению / А. К. Будняк, А. В. Сорокин, Л. М. Карпов [и др.] // Медична реабілітація, курортологія, фізіотерапія. – 1999 г. – № 4. – С. 36-38.
248. К 20-летию Чернобыльской аварии. Изучение витаминного статуса и обеспеченности микро- и макроэлементами отдельных групп людей в различные периоды времени после аварии на ЧАЭС / В. Б. Спиричев, Г. В. Донченко, Н. В. Блажевич [и др.] // Укр. біохім. журн. – 2006. – Т.78, №2. – С. 5-26.
249. Хмелевский Ю. В. Витамины и возраст человека / Ю. В. Хмелевский, Н. Б. Поберезкина. – К.: Наук. Думка, 1990. – 165 с.
250. Оэриу С. Исследование отношений между витаминами-коэнзимами и соответствующими ферментами в зависимости от возраста животного и под действием некоторых веществ, свойственных организму / С. Оэриу // Биохимия. – 1963. – Т. 28, № 1. – С. 3-8.
251. Зелезинская Г. А. Биохимические аспекты влияния витаминов на процессы старения / Зелезинская Г. А., Никишин И. А., Пленин А. Е. – Минск: Наука и техника, 1979. – 128 с.
252. Розанов А. Я. Ферментативные процессы и их коррекция при экстремальных состояниях / А. Я. Розанов, А. И. Трещинский, Ю. В. Хмелевский. – Киев: Здоров'я, 1985. – 208 с.
253. Иванова И. А. Теоретические и экспериментальные основы фармакотерапии гипоксии мозга / И. А. Иванова, Ю. Г. Бобков, М. Д. Машковский //

Фармакологическая регуляция состояний дезадаптации / Под ред. Ю. Г. Бобкова. – М.: 1986. – С. 82-98.

254. Создание новых лекарственных препаратов на базе витаминов и ГАМК. Пикамилон, пантогам и родственные соединения / В. М. Копелевич, Л. Н. Буланова, Т. Д. Мариева [и др.] // Пикамилон в современной неврологической и психиатрической практике (клинико-экспериментальные исследования). – М.: НПО "Витамины", 1994. – С. 13-23.