



УДК 577.152.241\*1.042

ИНГИБИРОВАНИЕ МЫШЕЧНОЙ ГЛИКОГЕНФОСФОРИЛАЗЫ *b*  
ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИМИ ВИТАМИНАМИ И КОФЕРМЕНТАМИ

*Клинова Н. И., Клинов С. В., Курганов Б. И.,  
Михно С. Д., Балякина М. В., Белозерова Е. В.,  
Рудакова И. П., Юркевич А. М., Гунар В. И.*

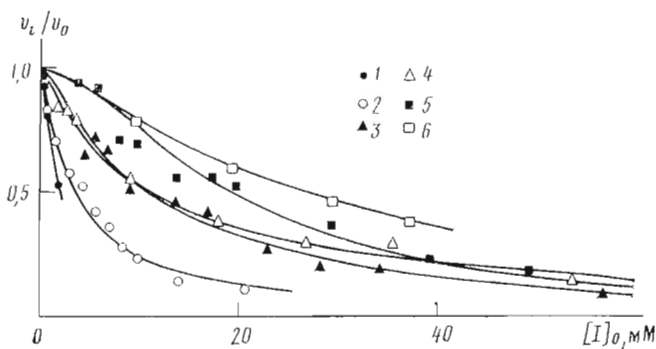
*Научно-производственное объединение «Витамины»,  
Москва*

Обнаружено ингибирование гликогенфосфорилазы *b* из скелетных мышц кролика биотином, пиридоксином, липоевой кислотой, тиаминовыми и кобаламиновыми витаминами и коферментами. Определены значения концентрации «полунасыщения» и коэффициентов Хилла для биотина (27 мМ; 1,3), пиридоксина (19 мМ; 1,7), 5'-дезоксинадениозилкобаламина (2,5 мМ; 1,5), липоевой кислоты (3,4 мМ; 1,1), тиамина (11 мМ; 1,3), тиаминдифосфата (11 мМ; 1,0). Проведено сопоставление эффективности ингибирования гликогенфосфорилазы *b* витаминами и коферментами, содержащими различные гетероциклические группировки. Сделано заключение, что наиболее эффективными ингибиторами являются рибофлавин и его коферментные формы.

Гликогенфосфорилаза (КФ 2.4.1.1) катализирует реакцию фосфорилиза гликогена, в результате которой от макромолекулы полисахарида отщепляется один глюкозильный остаток в форме  $\alpha$ -D-глюкозо-1-фосфата. Дефосфорилирующая форма фермента (гликогенфосфорилаза *b*) проявляет каталитическую активность только в присутствии АМР — аллостерического активатора, в то время как фосфорилированная форма (гликогенфосфорилаза *a*) активна и в отсутствие АМР [1]. Авторами работы [2] обнаружено, что рибофлавин, FMN, FAD а также фолиевая кислота являются ингибиторами мышечной гликогенфосфорилазы *a*. Присоединение FMN к гликогенфосфорилазе *a* приводит к образованию интеркалятивного комплекса флавина с аминокислотными остатками Tyr<sup>612</sup> и Phe<sup>285</sup> [3]. Рибофлавин, фолиевая и никотиновая кислоты и их коферментные формы являются также ингибиторами гликогенфосфорилазы *b* [4–8]. Физиологическое значение ингибирования гликогенфосфорилазы *b* природными гетероциклическими соединениями, по-видимому, состоит в регуляции фосфорилиза гликогена [5, 9, 10]. В связи с вышележащим казалось интересным изучение других представителей группы водорастворимых гетероциклических витаминов и коферментов в качестве потенциальных ингибиторов гликогенфосфорилазы *b*.

В настоящей работе впервые обнаружено ингибирование гликогенфосфорилазы *b* биотином, пиридоксидом, липоевой кислотой, тиаминном, тиаминдифосфатом, циано-, метил- и 5'-дезоксинадениозилкобаламинами. Для большей части изученных веществ зависимости скорости реакции, катализируемой гликогенфосфорилазой *b*, от концентрации ингибитора приведены на рисунке. Ингибирование является обратимым, поскольку предварительное смешивание раствора фермента с концентрированным раствором ингибитора не приводит к изменению степени ингибирования фермента по сравнению со смешиванием фермента с разбавленным раствором ингибитора (при условии равенства конечных концентраций фермента и ингибитора). Количественный анализ ингибирования гликогенфосфорилазы *b* гетероциклическими витаминами и коферментами проводили с использованием следующей формы уравнения Хилла (см. [11])

$$\lg \left( \frac{v_0}{v_i} - 1 \right) = n_H \lg [I]_0 - n_H \lg [I]_{0,5},$$



Зависимость относительной скорости реакции, катализируемой гликогенфосфорилазой *b* в присутствии 0,1 мМ АМР, от концентрации ингибитора: 1 — 5'-дезоксадезозилкобаламин, 2 — липовая кислота, 3 — тиамин, 4 — тиаминдифосфат, 5 — пиридоксин, 6 — биотин

где  $v_0$  и  $v_i$  — начальные скорости ферментативной реакции в отсутствие и в присутствии ингибитора соответственно;  $[I]_0$  — общая концентрация ингибитора;  $[I]_{0,5}$  — значение  $[I]_0$ , при котором  $v_i/v_0 = 1/2$ ;  $n_H$  — коэффициент Хилла. Параметры уравнения Хилла и стандартные ошибки параметров определяли с помощью метода наименьших квадратов. Полученные значения параметров уравнения Хилла, а также соответствующие величины для флавиновых, птериновых и никотинамидных витаминов и коферментов представлены в таблице. Значения коэффициентов Хилла для ингибирования гликогенфосфорилазы *b* гетероциклическими витаминами и коферментами изменяются от 1,01 в случае тиаминдифосфата до 1,75 в случае пиридоксина. Большая часть полученных значений  $n_H$  превышает единицу, что свидетельствует о существовании положительных кооперативных взаимодействий между центрами связывания гетероциклических соединений в димерной молекуле фермента.

Сравнение величин  $[I]_{0,5}$  для тиамина и тиаминдифосфата свидетельствует о том, что введение электроотрицательной дифосфатной группы в молекулу тиамина не приводит к изменению сродства ингибитора к ферменту. В то же время значения концентрации «полунасыщения» для соединений, содержащих насыщенные гетероциклы (биотин и липовая кислота), с одной стороны, значительно отличаются друг от друга, что свидетельствует о специфичности их взаимодействия с ферментом, а с другой — сопоставимы со значениями  $[I]_{0,5}$  для соединений, содержащих

Параметры уравнения Хилла для ингибирования гликогенфосфорилазы *b* гетероциклическими витаминами и коферментами

Соединения	$n_H$	$[I]_{0,5}$ , мМ
Тиамин	1,28±0,05	11±2
Тиаминдифосфат	1,01±0,02	11±2
Пиридоксин	1,75±0,04	19±2
5'-Дезоксадезозилкобаламин	1,50±0,07	2,5±0,8
Липовая кислота	1,08±0,03	3,4±0,4
Биотин	1,30±0,01	27±1
Рибофлавин [8]	1,09±0,03	0,018±0,002
FMN [4]	1,31±0,04	0,0135±0,0006
FAD [5]	1,37±0,02	0,0438±0,0004
Фолиевая кислота [6]	1,25±0,02	0,65±0,01
Фолиновая кислота [6]	1,31±0,02	3,70±0,05
Никотинамид [7]	1,22±0,01	4,4±0,1
Никотиновая кислота [7]	1,43±0,02	28±2
NAD [7]	1,20±0,02	4,4±0,3
NADH [7]	1,20±0,01	0,93±0,05

ароматические гетероциклы (пиридоксин, никотиновая кислота и др.). Таким образом, характер гетероцикла не играет решающей роли в комплексообразовании витаминов с гликогенфосфорилазой *b*. Можно было бы ожидать, что 5'-дезоксаденозилкобаламин, содержащий корриновый макроцикл, будет обладать высоким средством к ферменту, но оказалось, что значение  $[I]_{0,5}$  для 5'-дезоксаденозилкобаламина сопоставимо с соответствующими величинами для никотинамида, липоевой и фолиевой кислот. Это, по-видимому, обусловлено непланарной формой молекулы 5'-дезоксаденозилкобаламина, содержащего объемные  $\alpha$ - и  $\beta$ -лиганды по обе стороны плоскости корринового макроцикла. Следует отметить, что средство циано- и метилкобаламинов к гликогенфосфорилазе *b* мало отличается от соответствующей величины для 5'-дезоксаденозилкобаламина: степень ингибирования фермента составляет 37, 32 и 14% для 5'-дезоксаденозил-, метил- и цианокобаламинов соответственно (при концентрации кобаламина 1,7 мМ). Сопоставление величин  $[I]_{0,5}$  для ингибирования гликогенфосфорилазы *b* гетероциклическими витаминами и коферментами, полученных в настоящей работе и ранее, свидетельствует о том, что флавиновые соединения, образующие интеркалятивные комплексы с ферментом, обладают наиболее высоким средством к гликогенфосфорилазе *b* среди гетероциклических витаминов и коферментов.

### Экспериментальная часть

Гликогенфосфорилазу *b* выделяли из скелетных мышц кролика по методу, описанному в работе [12]. Четырехкратно перекристаллизованный препарат фермента использовали не более чем в течение двух недель после выделения. АМР удаляли из раствора фермента адсорбцией на активированном угле Norit A по методике, описанной в работе [12]; полученный препарат гликогенфосфорилазы *b* использовали в течение одного дня. Гликоген из печени свиньи производства Олайнского завода химических реактивов очищали по методике, описанной в работе [13]. Концентрацию фермента определяли спектрофотометрически при 280 нм, удельный коэффициент поглощения  $1,32 \text{ (г/л)}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  [14].

В работе использовали препараты тиаминхлорида, тиаминдифосфата тетрагидрата, DL-липовой кислоты, D(+)-биотина, пиридоксина гидрохлорида, метил-, циано- и 5'-дезоксаденозилкобаламинов отечественного производства. Концентрации ряда соединений определяли спектрофотометрически с использованием следующих величин молярного поглощения:  $\epsilon_{272,5} = 7,4 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  для тиаминдифосфата [15];  $\epsilon_{325} = 7,1 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  для пиридоксина [16];  $\epsilon_{519} = 8,7 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ ,  $\epsilon_{550} = 8,7 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  и  $\epsilon_{522} = 8,0 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  для метилкобаламина, цианокобаламина и 5'-дезоксаденозилкобаламина соответственно [17]. Концентрацию D(+)-биотина определяли поляриметрически с использованием величины оптического вращения  $[\alpha]_D^{22} = +92^\circ$  (с 0,1 М NaOH) [18]. В работе использовали натриевую соль аденозин-5'-монофосфорной кислоты и дикальневую соль глюкозо-1-фосфорной кислоты производства Reanal (Венгрия), остальные реактивы производства «Союзреактив» марки х.ч. и ч.д.а.

Ферментативную реакцию проводили в направлении синтеза гликогена в присутствии 4 мМ глюкозо-1-фосфата, 1,0 г/л гликогена при 30°C с использованием 0,5 М глицил-глицинового буфера, pH 6,8, содержащего 0,2 мМ EDTA и 0,3 М KCl; реакцию начинали, добавляя от 30 до 50 мкг гликогенфосфорилазы *b* к реакционной смеси (2,5 мл). Специально было показано, что порядок добавления компонентов не влияет на величину начальной скорости процесса. Активность гликогенфосфорилазы *b* определяли турбидиметрическим методом [19] с использованием спектрофотометра Cary-219 фирмы Varian. Ферментативную активность в присутствии гетероциклических витаминов и коферментов определяли при длине волны, соответствующей относительно небольшому значению оптического поглощения присутствующего гетероциклического соединения: 310 нм для биотина, 320 для тиаминдифосфата, 370 нм для тиаминдифосфата, 486 нм для липоевой кислоты, 650 нм для циано-, метил- и 5'-дезоксаденозилкобаламинов и 400 нм для пиридоксина. Относительная ошибка определения скорости ферментативной реакции составляла 3% во всех случаях, за исключением опытов при 650 нм, где ошибка составляла 5%.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Graves D. J., Wang J. H. // The Enzymes/Ed. Boyer P. D. New York: Academic Press, 1972. V. 7. P. 435-482.
2. Kasvinsky P. J., Shechovskiy S., Fletterick R. J. // J. Biol. Chem. 1978. V. 253. № 24. P. 9102-9106.
3. Sprang S., Fletterick R., Stern M., Yang D., Madsen N. B., Sturtevant J. // Biochemistry. 1982. V. 21. № 9. P. 2036-2048.

4. Клинов С. В., Чеботарева Н. А., Курганов Б. И., Литвак Ж. И., Жилина Т. А., Глебова Г. Д., Пекель Н. Д., Березовский В. М. // Биооргани. химия. 1984. Т. 10. № 9. С. 1161–1170.
5. Клинов С. В., Чеботарева Н. А., Курганов Б. И., Литвак Ж. И., Жилина Т. А., Пекель Н. Д., Березовский В. М. // Биооргани. химия. 1985. Т. 11. № 2. С. 196–204.
6. Клинов С. В., Чеботарева Н. А., Шейман Б. М., Бирицберг Е. М., Курганов Б. И., Рудакова И. П. // Биооргани. химия. 1987. Т. 13. № 7. С. 908–914.
7. Клинова Н. П., Чеботарева Н. А., Клинов С. В., Курганов Б. И., Буланова Л. Н., Копелевич В. М., Гунар В. И. // Биооргани. химия. 1987. Т. 13. № 10. С. 1228–1343.
8. Клинов С. В., Клинова Н. П., Горелик Е. Ш.-Б., Бирицберг Е. М., Пекель Н. Д., Курганов Б. И., Рудакова И. П. // Научные основы витаминного питания сельскохозяйственных животных. Рига: Зинатне, 1987. С. 102–103.
9. Morgan H. E., Parmeggiani A. // J. Biol. Chem. 1964. V. 239. № 8. P. 2440–2445.
10. Kasvinsky P. J., Madsen N. B., Sygusch J., Fletterick R. J. // J. Biol. Chem. 1978. V. 253. № 9. P. 3343–3351.
11. Курганов Б. И. Аллостерические ферменты. М.: Наука. 1978. С. 43.
12. Fischer E. H., Krebs E. G. // J. Biol. Chem. 1958. V. 231. № 1. P. 65–71.
13. Sutherland E. W., Wosilait W. D. // J. Biol. Chem. 1965. V. 248. № 1. P. 459–468.
14. Вис М. Н., Ulmann A., Goldberg M., Вис. Н. // Biochemie. 1971. В. 53. S. 283–289.
15. Островский Ю. М. Активные центры и группировки в молекуле тиамина. Минск: Наука и техника, 1975. С. 14–23.
16. Peterson E. A., Sober H. A. // J. Am. Chem. Soc. 1954. V. 76. № 1. P. 169–175.
17. Hogenkamp H. P. C. // Cobalamin. Biochemistry and Pathophysiology/Ed. Babor V. M. N. Y.: John Wiley & Sons, 1975. P. 21–73.
18. Березовский В. М. Химия витаминов. М.: Пищ. пром-сть. 1973. С. 433–458.
19. Сугрובה Н. П., Лисовская Н. П., Курганов Б. И. // Биохимия. 1982. Т. 47. № 11. С. 1883–1888.

Поступила в редакцию  
26.IV.1988

#### INHIBITION OF MUSCLE GLYCOGEN PHOSPHORYLASE *b* BY HETEROCYCLIC VITAMINS AND COENZYMES

KLINOVA N. I., KLINOV S. V., KURGANOV B. I., MIKHNO S. D.,  
BALYAKINA M. V., BELOZEROVA E. V., RUDAKOVA I. P., YURKEVICH A. M.,  
GUNAR V. I.

*All-Union Institute for Vitamin Research, Moscow*

Inhibition of rabbit skeletal muscle glycogen phosphorylase *b* by biotin, pyridoxine, lipoic acid, as well as by thiamine and cobalamin vitamins and coenzymes has been found. The values of «half-saturation» concentration and Hill coefficients are determined for biotin (27 mM, 1.3), pyridoxine (19 mM, 1.7), 5'-deoxyadenosylcobalamin (2.5 mM, 1.5), lipoic acid (3.4 mM, 1.1), thiamine (11 mM, 1.3), thiamine diphosphate (11 mM, 1.0). Effectiveness of the enzyme inhibition by vitamins and coenzymes containing different heterocyclic groups is analysed; riboflavin and its cozymic forms are suggested to be the most effective inhibitors.