

УДК 577.152.3

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ И ИССЛЕДОВАНИЕ  
СВОЙСТВ ФЕРМЕНТА, КАТАЛИЗИРУЮЩЕГО  
ГИДРОЛИЗ АДЕНИЛИРОВАННОГО ТИАМИНТРИФОСФАТА  
В ПЕЧЕНИ КРЫСЫ**

**Клюка Т.В.<sup>1</sup>, Макарович А.Ф.<sup>2</sup>, Кудырко Т.Г.<sup>2</sup>, Лучко Т.А.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> – УО «Гродненский государственный университет им. Я. Купалы»  
г. Гродно, Республика Беларусь

– УО «Гродненский государственный аграрный университет»  
г. Гродно, Республика Беларусь

<sup>3</sup> – Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси  
г. Гродно, Республика Беларусь

Аденилированный тиаминтрифосфат (АТТФ) является одним из компонентов системы обмена витамина В<sub>1</sub> в клетках различных видов организмов. В настоящее время биологическая роль АТТФ неизвестна. У бактерий биосинтез данного соединения осуществляется из тиаминдифосфата (ТДФ) и аденозиндифосфата (АДФ) или аденозинтрифосфата растворимым ферментом, который был выделен и частично очищен из *E. coli*. Бактериальная ТДФ: аденилтрансфераза представляет собой белок с молекулярной массой 355 кДа, проявляющий максимальную активность при pH 6,5–7,0. Фермент характеризуется строгой субстратной специфичностью и зависим от присутствия катионов Mg<sup>2+</sup> или Mn<sup>2+</sup>. В расщеплении АТТФ в бактериальных клетках, по-видимому, участвует мембранно-связанная гидролаза [1].

В литературе нет сведений о ферментах метаболизма АТТФ у других видов организмов, в т. ч. в клетках млекопитающих. Цель настоящей работы заключалась в создании тест-системы для определения активности АТТФ-гидролазы и исследовании некоторых свойств фермента из печени крысы.

Предварительные эксперименты по гидролизу АТТФ гомогенатом печени крысы, в которых для регистрации ферментативной активности применялась высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) [2], показали, что продуктами реакции являются ТДФ и аденозинмонофосфат. На основании этого нами разработан метод опреде-

ления активности АТТФ-гидролазы по количеству образующегося в реакции ТДФ, основанный на использовании апоформы пируватдекарбоксилазы (ПДК).

Выделение ПДК из дрожжей *Saccharomyces carlsbergensis* и получение апофермента осуществляли, как описано в работе [3]. Реакционная смесь для определения активности АТТФ-гидролазы объемом 200 мкл включала буфер, ионы  $Mg^{2+}$ , субстрат и аликвоту гомогената печени. Реакцию проводили 30 мин при 37 °С, смесь кипятили в течение 1 мин, и помещали в ледяную баню. Затем реакционную смесь разбавляли 800 мкл 20 мМ Na-фосфатного буфера, рН 6.8, центрифугировали 5 мин, при 5000 об/мин, и отбирали аликвоты супернатанта по 50 мкл для рекомбинации образовавшегося в реакции ТДФ с апо-ПДК. Рекомбинацию осуществляли при 25 °С в течение 1 ч. Для этого к анализируемым аликвотам добавляли по 50 мкл 100 мМ  $MgCl_2$ , 50 мкл апофермента и 250 мкл 20 мМ Na-фосфатного буфера, рН 6.8. По истечении времени инкубации в каждую пробу вносили по 1 мл 150 мМ Na-цитратного буфера, рН 6.0, и 50 мкл алкогольдегидрогеназы. Затем в анализируемую пробу добавляли 50 мкл 200 мМ пирувата Na, 50 мкл 5 мМ НАДН и регистрировали изменение оптической плотности при 340 нм в течение 5 мин. Количество ТДФ находили по калибровочному графику. За единицу активности (Е) АТТФ-гидролазы принимали количество, катализирующее образование 1 мкмоль ТДФ за 1 мин.

Исследования зависимости гидролиза АТТФ в гомогенатах печени крысы от концентрации ионов водорода показали, что АТТФ-гидролаза имеет рН-оптимум 8.0. Фермент проявлял активность в отсутствие катионов двухвалентных металлов. Внесение в реакционную смесь ионов  $Mg^{2+}$  или  $Ca^{2+}$  приводило к активации фермента соответственно в 1.8 и 1.4 раза. При рН 8.0 в присутствии 5 мМ  $Mg^{2+}$  содержание АТТФ-гидролазной активности в печени крысы составляет ( $M \pm m$ )  $0.17 \pm 0.01$  Е/г сырой ткани ( $n = 4$ ). После центрифугирования гомогената (60 мин., 19000 г) АТТФ-гидролазная активность обнаруживалась исключительно в осадке.

Таким образом, нами разработана тест-система, позволяющая определять скорость гидролиза АТТФ в биологических образцах без применения ВЭЖХ. Полученные результаты свидетельствуют о том, что гидролиз АТТФ в печени крысы осуществляется ферментом, локализованным в клеточных мембранах.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Макариков А.Ф. Тиаминтрифосфат: новый взгляд на некоферментную функцию витамина В<sub>1</sub>. – Минск: Белорусская наука, 2008. – 433 с.
2. Bettendorff L., Peeters M., Jouan C., Wins P., Schoffeniels E. Determination of thiamin and its phosphate esters in cultured neurons and astrocytes using an ion-pair reversed-phase high-

performance liquid chromatographic method // *Anal. Biochem.* – 1991. – Vol. 198. – P. 52–59.

3. Черникович И.П., Гриценко Э.А., Макариков А.Ф., Власкобов А.И. Ферментативный микрометод количественного определения тиаминдифосфата в биологических жидкостях // *Прикл. биохим. микробиол.* – 1991. – Т. 27, вып. 5. – С.762–771.