

УДК 577.164.111

**ПОЛУЧЕНИЕ СУБСТРАТА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЙ  
ПУТЕЙ МЕТАБОЛИЗМА АДЕНИЛИРОВАННОГО  
ТИАМИНТРИФОСФАТА В ТКАНЯХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ**

**Макарчиков А.Ф., Кудырко Т.Г., Русина И.М., Гуринович В.А.**

УО «Гродненский государственный аграрный университет»

ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси»

г. Гродно, Республика Беларусь

Наряду с тиаминдифосфатом (ТДФ), выполняющим каталитическую функцию в составе дегидрогеназных комплексов  $\alpha$ -кетокислот и транскетолазы, в биологических объектах присутствует ряд других производных витамина В<sub>1</sub> – тиамин, тиаминмонофосфат (ТМФ), тиаминтрифосфат (ТТФ), аденилированные ТДФ и ТТФ, которые не обладают коферментной активностью. Роль этих соединений в процессах жизнедеятельности клетки остается неизвестной. В последнее время появились экспериментальные данные, указывающие на регуляторные функции ТТФ и АТТФ, связанные с процессами адаптации организма [1, 2].

Биосинтез АТТФ осуществляется из ТДФ и АДФ (АТФ) растворимым ферментом, который был выделен из *E. coli*, частично очищен и охарактеризо-

вап [3]. Так как его нет на рынке химической продукции, а для того чтобы установить пути деградации данного соединения в живых организмах, его необходимо, прежде всего, получить в чистом виде. В связи с этим целью настоящей работы состояла в химическом синтезе АТТФ, очистке синтезированного продукта, а также тестировании его в качестве субстрата гидролитических ферментов в клетках кипяченой палочки.

Синтез АТТФ проводили из равных количеств АМФ и ТДФ в водном пиридине в присутствии конденсирующего агента – дициклогексилкарбодимида. Синтезированное соединение очищали от примесей колоночной хроматографией. Эксперименты с бактериальными клетками показали, что фермент, катализирующий гидролиз АТТФ, локализован в мембране *E.coli*. Реакция гидролиза АТТФ протекает при нейтральных значениях рН в присутствии катионов  $Mg^{2+}$ , при этом в качестве продуктов образуются ТДФ и АМФ (идентифицированы с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии [4]). Этот фермент, по-видимому, тесно интегрирован в структуру мембраны: поскольку применение различных детергентов позволяет солубилизовать лишь 10–15% активности.

Таким образом, использование синтезированного нами АТТФ позволило установить, что гидролиз АТТФ осуществляется до ТДФ и АМФ мембранно-связанным ферментом. Это дает возможность при дальнейших исследованиях этого фермента в тканях млекопитающих регистрировать активность, определяя количество ТДФ с помощью метода, основанного на рекомбинации кофермента с анонриватдекарбоксилазой.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Макаричков А.Ф. Тиаминтрифосфат: новый взгляд на некоферментную функцию витамина В<sub>1</sub>. – Минск: Белорусская наука, 2008. – 433 с.
2. Tanaka T., Yamamoto D., Sato T., Tanaka S., Usui K., Manabe M., Aoki Y., Iwashima Y., Saito Y., Mino Y., Deguchi H. Adenosine thiamine triphosphate (AThTP) inhibits poly(ADP-ribose) Polymerase-1 (PARP-1) activity // *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* – 2011. – Vol. 57. – P. 192–196.
3. Makarchikov A.F., Brans A., Bettendorff L. Thiamine diphosphate adenylyl transferase from *E. coli*: functional characterization of the enzyme synthesizing adenosine thiamine triphosphate // *BMC Biochem.* – 2007. – Vol. 8:17.
4. 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.