

УДК 577.152.3

## **ИССЛЕДОВАНИЕ ГИДРОЛИЗА ТИАМИНДИФОСФАТА В ПЕЧЕНИ КУР**

**Колос И.К., Макавичков А.Ф.**

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

Нормальная обеспеченность организма витамином В<sub>1</sub> (тиамином) является непременным условием хорошего здоровья и высокой продуктивности сельскохозяйственных животных. Первостепенная роль витамина В<sub>1</sub> в жизнедеятельности организма обусловлена участием тиаминдифосфата (ТДФ) в качестве кофермента в реакциях энергетического и углеводного обмена, а также утилизации аминокислот с разветвленной цепью [1]. Скорость оборота ТДФ в клетке, в основном, определяется процессами его синтеза, протсидизации и гидролитического расщепления; кроме того, ТДФ служит биосинтетическим предшественником тиаминтрифосфата и недавно обнаруженного в биологических объектах аденилированного тиаминтрифосфата. Хорошо известно, что биосинтез ТДФ у животных, растений, дрожжей и большинства бактерий осуществляется специфическим ферментом – тиаминпирофосфокиназой (ТПК). ТПК выделена из нескольких биологических источников и охарактеризована на молекулярном уровне [2]. Часть синтезируемого *de novo* кофермента инкорпорируется в состав ТДФ-зависимых белков (протсидизированный ТДФ). Всего известно 29 ТДФ-зависимых ферментов; в клетках млекопитающих – это пируватдегидрогеназа, 2-кетоглутаратдегидрогеназа, дегидрогеназа 2-кетокислот с разветвленной цепью, транскетолаза и 2-гидроксицитанойл-КоА-лиаза. Другая часть образует быстрооборачиваемый свободный пул ТДФ, являющийся мишенью для действия гидролитических ферментов. Было показано, что ТДФ может служить субстратом кислой и щелочной фосфатаз, а также нуклеозиддифосфатаз L- и В-типов [3, 4], обнаруженных соответственно в печени и головном мозге крысы; специфичный фермент гидролиза ТДФ до настоящего времени в биологических объектах не идентифицирован. В литературе также практически нет сведений о метаболизме ТДФ у птиц. Цель данной работы заключалась в исследовании гидролиза ТДФ в печени кур.

Объектом изучения служила печень годовалого петуха породы леггорн, выращенного в условиях домашнего подворья. После убоя животного печень быстро извлекали, замораживали и хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Для приготовления гомогенатов образцы ткани растирали в стеклянном гомогенизаторе в 5-кратном объеме охлажденного до  $+4^{\circ}\text{C}$  50 мМ трис-НСl буфера, рН 7.3, содержащего 0.15 М КСl и 0.2 мМ трилон Б. ТДФазную активность измеряли при  $37^{\circ}\text{C}$  по скорости высвобождения неорганического фосфата (Pi). Стандартная реакционная смесь объемом 0.2 мл включала 50 мМ трис-малеатный буфер, 0.5 мМ ТДФ, 10 мМ MgCl<sub>2</sub> и 2 мкл гомогената. Реакцию проводили в течение 10-20 мин и останавливали, добавляя равный объем 10%-ной ТХУ; P<sub>i</sub> определяли методом Lanzetta et al. [5]. За единицу активности (Е) принимали количество, катализирующее образование 1 мкмоль P<sub>i</sub> за 1 мин. Эксперименты выполнялись в трех повторах, статистическая обработка данных включала расчет средних величин, ошибок репрезентативности средних и уравнений линейной регрессии методом наименьших квадратов.

Проведенные нами эксперименты показали, что ТДФазная активность в гомогенатах печени регистрируется в широком диапазоне значений рН – от 5.5 до 9.5. При этом на кривой зависимости ферментативной активности от рН наблюдались два выраженных максимума – в слабнокислой (рН 6.0) и щелочной (рН 9.0) среде. В условиях кислого рН-оптимума ТДФазная активность гомогенатов печени составила  $4.4 \pm 0.6$  Е/г ткани, а при рН 9.0 –  $3.2 \pm 0.2$  Е/г ткани.

Внесение в реакционную смесь 1 мМ левамизола – ингибитора щелочной фосфатазы – приводило к снижению ТДФазной активности при рН 9.0 на 22%. В щелочной среде скорость гидролиза ТДФ заметно возрастала в присутствии катионов двухвалентных металлов. Ионы Mn<sup>2+</sup> и Ca<sup>2+</sup> оказывают примерно одинаковый активирующий эффект, ускоряя реакцию соответственно в 2.7 и 2.6 раза. Под действием катионов Mg<sup>2+</sup> ТДФазная активность гомогенатов печени увеличивалась в 2.2 раза.

Реакция гидролиза ТДФ при рН 9.0 подчинялась гиперболической кинетике в исследованном диапазоне концентраций субстрата от 260 до 1900 мкМ, при этом константа Михаэлиса, рассчитанная в координатах Хейнса по уравнениям линейной регрессии, составила  $377 \pm 1$  мкМ ( $n = 2$ ). Линейная аппроксимация данных, полученных для зависимости  $v_0$  от [S] при рН 6.0, в тех же координатах дает значение K<sub>m</sub>  $229 \pm 39$  мкМ.

Таким образом, результаты настоящей работы свидетельствуют об экспрессии в печени кур нескольких (по крайней мере, двух) ферментов, способных катализировать гидролиз ТДФ. Дальнейшие исследе-

дования должны пролить свет на вопрос о существовании в печени специфичной ТДФазы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Metzler D.E. Biochemistry. The chemical reactions of living cells. – Harcourt/Academic Press, 2001. – Vol. 1,2 – 1973 p.
2. Makarchikov A.F. Vitamin B<sub>1</sub>: metabolism and functions // Biochemistry (Moscow). Suppl. Ser. B: Biomedical Chemistry. – 2009. – Vol. 3. – P. 116–128.
3. Sano S., Matsuda Y., Miyamoto S., Nakagawa H. Thiamine pyrophosphatase and nucleoside diphosphatase in rat brain // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1984. – Vol. 118. – P. 292–298.
4. Sano S., Matsuda Y., Nakagawa H. Type B nucleoside-diphosphatase of rat brain. Purification and properties of an enzyme with high thiamin pyrophosphatase activity // Eur. J. Biochem. – 1988. – Vol. 171. – P. 231–236.
5. Lanzetta P.A., Alvarez L.J., Reinach P.S., Candia O.A. An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate // Anal. Biochem. – 1979. – Vol. 100. – P. 95–97.