

Таким образом, результаты исследования указывают на эффективность применения ферроцина как в составе болюсов, так и включённого в комбикорм, что позволяет получать говядину с содержанием цезия-137 значительно ниже допустимых уровней.

УДК 577.152.3

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

Клюка Т.В.¹, Макарович А.Ф.², Кудырко Т.Г.², Лучко Т.А.³

¹ – УО «Гродненский государственный университет им. Я. Купалы»

г. Гродно, Республика Беларусь

– УО «Гродненский государственный аграрный университет»

г. Гродно, Республика Беларусь

³ – Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси

г. Гродно, Республика Беларусь

Аденилированный тиаминтрифосфат (АТТФ) является одним из компонентов системы обмена витамина В₁ 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: аденилилтрансфераза представляет собой белок с молекулярной массой 355 кДа, проявляющий максимальную активность при рН 6,5–7,0. Фермент характеризуется строгой субстратной специфичностью и зависит от присутствия катионов Mg²⁺ или Mn²⁺. 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. Макаричков А.Ф. Тиаминтрифосфат: новый взгляд на некоферментную функцию витамина В₁. – 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. Черникевич И.П., Гриценко Э.А., Макаричов А.Ф., Влскобоев А.И. Ферментативный микрометод количественного определения тиаминдифосфата в биологических жидкостях // Прикл. биохим. микробиол. – 1991. – Т. 27, вып. 5. – С.762–771.

УДК 577.152.3

ИССЛЕДОВАНИЕ ГИДРОЛИЗА ТИАМИНДИФОСФАТА В ПЕЧЕНИ КУР

Колос И.К., Макаричов А.Ф.

УО «Гродненский государственный аграрный университет»

г. Гродно, Республика Беларусь

Нормальная обеспеченность организма витамином В₁ (тиамином) является неперемным условием хорошего здоровья и высокой продуктивности сельскохозяйственных животных. Первостепенная роль витамина В₁ 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, протеидизации 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 (протеидизированный 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.