

2. Медведева, Е. Окислительный стресс и воспаление у больных атеросклерозом / Е. Медведева, Ю. Щукин, Е. Селезнев. – Saarbrücken, LAP LAMBERT Acad. Publishing, 2013. – 65 с.
3. Современные проблемы биохимии. Методы исследования / Е. В. Барковский [и др.]; под общ. ред. Е. В. Барковского – Мн., Выш. школа, 2013. – 491 с.
4. Comparison of spectrophotometric and HPLC methods for determination of lipid peroxidation products in rat brain tissues / M. Durfinova [et al.] // Chem. Pap. – 2007. – Vol. 61, № 4. – P. 321–325.
5. Erel, O. A novel automated direct measurement for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation / O. Erel // Clin. Biochem. – 2004. – Vol. 37, № 4. – P. 277–285.
6. Menon, D. A fluorometric method to quantify protein glutathionylation using glutathione derivatization with 2,3-naphthalenedicarboxaldehyde / D. Menon, P. G. Board // Anal. Biochem. – 2013. – Vol. 433. – P. 132–136.
7. Patsoukis, N. Determination of the thiol redox state of organisms: new oxidative stress indicators / N. Patsoukis, C. D. Georgiou // Anal. Bioanal. Chem. – 2004. – Vol. 378. – P. 1783–1792.
8. Tsuchiya, Y. Methods for measuring CoA and CoA derivatives in biological samples / Y. Tsuchiya, U. Pham, I. Gout // Biochem. Soc. Trans. – 2014. – Vol. 42. – P. 1107–1111.

## **ФУНКЦИОНАЛЬНО ЗНАЧИМЫЕ АМИНОКИСЛОТНЫЕ ОСТАТКИ АКТИВНОГО ЦЕНТРА ТИАМИНДИФОСФАТКИНАЗЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА, ОТВЕТСТВЕННЫЕ ЗА БИОСИНТЕЗ ТРИФОСФОРНОГО ЭФИРА ТИАМИНА**

**Костеневич Н.Н., Черникевич И.П., Барановская Е.А.**

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

**Актуальность.** Тиаминтрифосфату отводится важная роль в генерировании и распространении нервного импульса, активации  $\text{Na}^{+}$ -,  $\text{Ca}^{2+}$ - и макси -  $\text{Cl}^{-}$ - каналов, координации и регуляции энергетического обмена клетки [1-3], обуславливая тем самым повышенный интерес к ферментной системе его биосинтеза.

**Цель.** Выяснение природы аминокислотных остатков, ответственных за связывание и катализ трифосфорного эфира.

**Материалы и методы исследования.** Тиаминдифосфаткиназу (EC 2.7.4.15, ThDP-киназа) из митохондрий головного мозга свиньи выделяли по описанной ранее методике [4]. Чистоту ферментного препарата контролировали методом диск-электрофореза в 7%-ном полиакриламидном геле при рН 8,9. Активность фермента определяли по количеству образовавшегося трифосфорного эфира тиамин (ThPP) с применением [ $^{14}\text{C}$ ]-тиаминдифосфата ([ $^{14}\text{C}$ ]-ThDP) в качестве одного из субстратов [4]. Радиоактивность измеряли на

сцинтилляционном счётчике «Mark-2» (США) в течение 1 мин. Концентрацию [ $^{14}\text{C}$ ]-ThPP находили исходя из удельной радиоактивности [ $^{14}\text{C}$ ]-ThDP. Содержание белка оценивали по методу Лоури и спектрофотометрически по Варбургу и Кристиану.

При исследовании pH-зависимостей использовали 25 мМ трис-малеатный pH 7.0, 50 мМ трис-HCl pH 7.5– 9.0 и 50 мМ глициновый pH 9.5 – 10.5 буферы. Влияние модифицирующих агентов (пиридоксаль 5' – фосфата и N-этилмалеимида на активность ThDP-киназы контролировали инкубируя фермент с указанными соединениями в 25 мМ трис-HCl буфере при 25°C в течение 30 мин [2], определяя после этого скорость процесса в стандартной реакционной смеси. Концентрация ThDP-киназы во всех случаях составляла 0,1 мкг · мл<sup>-1</sup>.

**Результаты и обсуждение.** Изучение системы трансфосфорилирования ThDP свободной ThDP-киназой головного мозга свидетельствует, что рK<sub>a</sub> аминокислотного остатка в связывающем участке активного центра фермента, найденное из pH-зависимости K<sub>m</sub> для ThDP, равно 9,0 и может соответствовать константе ионизации ε-аминогруппы лизина [1]. Находясь преимущественно в протонированной форме при pH < 9.0, данная группа способна легко взаимодействовать с отрицательным фосфатным радикалом ThDP посредством электростатического притяжения, что, вероятно, служит первой стадией образования фермент-субстратного комплекса. Сравнение K<sub>i</sub> для нуклеозидфосфатов, содержащих различное количество фосфатных остатков и ингибирующих ферментативный синтез, говорит о присутствии не менее двух аминокислотных остатков лизина в активном центре ThDP-киназы.

Использование аналогов тиамина и ThDP с замещениями пиримидинового и тиазолового циклов позволило выявить конкретные группы субстрата участвующие во взаимодействии с каталитическим участком активного центра фермента, ведущие к правильной ориентации ThDP и формированию функционально активного субстратного комплекса с энзимом. Согласно полученным данным важная роль в связывании с каталитическим участком принадлежит аминокислотной группе пиримидинового кольца молекулы ThDP и гидрофобным силам, в то время как взаимодействие четвертичного азота тиазола с соответствующей группой активного центра фермента приводит к непосредственному контакту терминального фосфата АТФ и ThDP.

pH аминокислотных остатков активного центра, состояние ионизации которых важно для синтеза ThTP, равны 7,6 и 9,8 и могут соответствовать α-аминогруппе и гидроксилу тирозина. Снижение активности ThDP-киназы, наблюдающееся при сдвиге pH от оптимума 9,0 в кислую сторону, в таком случае объясняется протонированием вышеназванной аминокислотной группы, в результате чего приобретённый ею положительный заряд в значительной мере препятствует образованию водородной связи между одной из близлежащих карбонильных групп пептидной связи и –NH<sub>2</sub> группой пиримидина молекулы ThDP. Протонирование α-аминогруппы ослабит и гидрофобные контакты, следствием чего является нарушение правильной фиксации субстрата. Можно также полагать, что снижение активности в сильно щелочной области –

результат ионизации –ОН группы тирозина. Находясь при рН ниже 9,8 преимущественно в –ОН форме [1], вышеназванная группа несёт частичный положительный заряд на атоме водорода. Силы отталкивания между этим зарядом и положительно заряженным азотом тиазола, вероятно, и приводят к окончательной деформации ThDP и нарушению взаимодействия с  $\gamma$ -атомами фосфора АТР. Действительно, восстановление четвертичного азота ThDP (потеря положительного заряда – тиохром – и тетрагидротиаминдифосфат) делает невозможным осуществление катализа. Меньше сказывается диссоциация протона гидроксила тирозина в активном центре ThDP-киназы (появление отрицательного заряда).

Поскольку для ферментативного синтеза ThDP абсолютно необходимо присутствие ионов  $Mg^{2+}$ , комплексированных с АТР, такой комплекс может рассматриваться как субстрат ответственный за катализ. Зависимость начальной скорости ThDP-киназной реакции от концентрации ThDP, при различных фиксированных концентрациях комплекса в координатах Лайнуивера-Берка, представляет собой серию прямых, пересекающихся на оси абсцисс. Аналогичная картина наблюдается и для зависимости скорости синтеза от  $Mg^{2+}$ . АТР в условиях фиксированных концентраций ThDP. Пересечение прямых в обоих случаях на оси абсцисс предполагает неупорядоченный механизм биосинтеза с образованием тройного комплекса и полностью независимым присоединением субстратов.

#### **Выводы:**

1. Важная роль в образовании активного комплекса с ThDP-киназой принадлежит гидрофобным силам, аминогруппе пиримидинового кольца, четвертичному азоту тиазола и аминокислотным остаткам лизина;
2. Процесс катализа осуществляется при непосредственном участии  $\alpha$ -аминогруппы и гидроксила тирозина;
3. Реакция, катализируемая ThDP-киназой, протекает с образованием тройного фермент-субстратного комплекса с неупорядоченным присоединением субстратов.

#### **ЛИТЕРАТУРА**

1. Диксон, М. Ферменты / М.Диксон, Э.Уэбб. – Москва: Мир. – 1982. – Т. 1. – С.234.
2. Исследование роли ионогенных аминокислотных остатков в каталитической активности тиаминтрифосфатазы из почек быка методом химической модификации / А.Ф.Макарчиков, Т.А.Лучко, Л.Беттендорфф, Б.Лакае, П.Винс // Новости медико-биологических наук. – 2002. – № 3. – С. 66-70.
3. Макарчиков, А.Ф. Тиаминтрифосфат: новый взгляд на некоферментную функцию витамина В<sub>1</sub>: монография / А.М.Макарчиков. – Минск: Белорусская наука, 2008. – 433 с.
4. Черникевич, И.П. Выделение и радиометрический метод определения активности АТР: тиаминдифосфатфосфотрансферазы из митохондрий

## НОВЫЕ МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К РАЗРАБОТКЕ НЕЙРОТРОПНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Кравченко Е.В.<sup>1</sup>, Бизунок Н.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии НАН Беларуси;

<sup>2</sup>УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь

**Актуальность.** Приоритетной задачей современной медицины является создание лекарственных средств анксиолитического и ноотропного действия. Нами предложено несколько методических подходов, позволяющих усовершенствовать процесс разработки потенциального нейротропного средства.

*Мнестические нарушения, моделирующие локальную дисфункцию глутамат- и дофаминергической нейротрансмиттерных систем, в тесте габитуации.* Габитуация или привыкание – феномен снижения реакции после продолжительного ряда повторений стимула. Габитуация исследовательской активности предложена в качестве скринингового теста для изучения ноотропов [3]. Целесообразно расширение возможностей указанной методики, что может достигаться посредством использования амнезирующих агентов, в числе которых – канальный блокатор NMDA-рецепторов глутаматергической нейромедиаторной системы МК-801.

*Использование инбредных крыс SHR в качестве животной модели в тесте экстраполяционного избавления (ТЭИ).* В научно-методической литературе описана методика нарушений адаптивного поведения в ТЭИ [4] с применением L-ДОФА (леводопа) [2]. В ТЭИ оценивается способность крыс осуществлять реакцию подныривания, являющуюся единственно возможным способом избавления из «острой» стресс-ситуации (животное находится внутри цилиндра, частично погруженного в воду) [4]. Поведение избавления полностью нарушается, заменяясь стереотипной гиперактивностью в форме безуспешных попыток избегания (прыжки и карабкание на стенки цилиндра) у крыс, получивших L-ДОФА [2]. Поскольку инбредные крысы SHR характеризуются генетически обусловленными нарушениями поведения вследствие дисфункции дофаминергической (ДА) нейротрансмиссии [5], перспективно проведение ТЭИ с участием грызунов этой линии для поиска корректоров соответствующего патологического состояния. В качестве аггравирующих факторов могут рассматриваться ювенильный возраст SHR и депривация парадоксальной фазы сна (ДПФС), вызывающая изменения центральных дофаминергических (ДА) процессов, направленных в сторону усиления ДА-регуляции [1].

*Использование стресс-индуцированных нарушений ультрадианных и циркадианных биологических ритмов активности для поиска анксиолитиков.*