

# МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ

УДК 547.458,587.52.057.

## СИНТЕЗ $\beta$ -МАЛЬТОЗИДОВ, ПРОИЗВОДНЫХ П-НИТРОФЕНОЛА, 2-ХЛОР-4-НИТРОФЕНОЛА И 4-МЕТИЛУМБЕЛЛИФЕРОНА, И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В КАЧЕСТВЕ СУБСТРАТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ $\alpha$ -ГЛЮКОЗИДАЗЫ

Я.В.ВОЗНЫЙ<sup>1</sup>, И.С.ЛУКОМСКАЯ<sup>2</sup>, И.М.ЛАНСКАЯ<sup>3</sup>, Е.И.ПОДКИДЫШЕВА<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Институт органической химии РАН им. Н.Д. Зелинского, Ленинский пр., 47, 117913 Москва, <sup>2</sup>Институт биомедицинской химии РАМН, Погодинская ул. 10, 119832 Москва, <sup>3</sup>Научный центр хирургии РАМН, Абрикосовский пер. 2, 119874 Москва

Описан метод синтеза  $\beta$ -мальтозидов, п-нитрофенил- $\beta$ -D-мальтозида и 4-метилумбеллиферил- $\beta$ -D-мальтозида, основанный на взаимодействии  $\beta$ -гептаацетилмальтозилфторида с соответствующими триметилсилиловыми эфирами п-нитрофенола и 4-метилумбеллиферона.

2-Хлор-4-нитрофенил- $\beta$ -D-мальтозид был синтезирован путем взаимодействия 2-хлор-4-нитрофенола с  $\beta$ -гептаацетилмальтозилбромидом в двухфазной системе с использованием катализатора фазового переноса.

Предлагается метод определения активности  $\alpha$ -глюкозидазы (нейтральная  $\alpha$ -глюкозидаза почек и мочи человека) с использованием синтезированных  $\beta$ -мальтозидов в качестве субстратов и  $\beta$ -глюкозидазы, как вспомогательного фермента. Метод прост и на порядок более чувствителен, чем определение активности  $\alpha$ -глюкозидазы с соответствующими  $\alpha$ -глюкозидами: п-нитрофенил- $\alpha$ -D-глюкозидом и 4-метилумбеллиферил- $\alpha$ -D-глюкозидом. Модификация метода была применена для определения активности  $\alpha$ -глюкозидазы в микроплатах с использованием фотометрического ридера.

**Ключевые слова:** субстраты  $\beta$ -мальтозиды, нейтральная  $\alpha$ -глюкозидаза, почки, моча.

**Введение.** Для определения активности  $\alpha$ -глюкозидазы в качестве субстрата обычно используют синтетические  $\alpha$ -глюкозиды: п-нитрофенил- $\alpha$ -D-глюкозид (НФ- $\alpha$ -D-глюкозид), 4-метилумбеллиферил- $\alpha$ -D-глюкозид (МУ- $\alpha$ -D-глюкозид) и другие. Об активности фермента судят по количеству отщепившегося агликона. Это наиболее удобный и простой метод определения активности  $\alpha$ -глюкозидазы. Однако синтетические  $\alpha$ -глюкозиды значительно медленнее гидролизуются  $\alpha$ -глюкозидазой, чем природный субстрат мальтоза, что существенно снижает чувствительность метода. Нами предлагается метод определения активности  $\alpha$ -глюкозидазы с использованием в качестве субстратов  $\beta$ -производных мальтозы: п-нитрофенил- $\beta$ -D-мальтозид (НФ- $\beta$ -D-мальтозид), 2-хлор-4-нитрофенил- $\beta$ -D-мальтозид (ХНФ- $\beta$ -D-мальтозид) и 4-метилумбеллиферил- $\beta$ -D-мальтозид (МУ- $\beta$ -D-мальтозид), и  $\beta$ -глюкозидазы, как вспомогательного фермента.

Синтезы НФ- $\beta$ -D-мальтозида [1] и МУ- $\beta$ -D-мальтозида [2] с небольшим выходом синтезируемого продукта ранее были описаны в литературе. В настоящей работе описывается метод синтеза этих  $\beta$ -мальтозидов, основанный на взаимодействии  $\beta$ -гептаацетилмальтозилфторида с триметилсилиловыми эфирами п-нитрофенола и 4-метилумбеллиферона, позволяющий значительно улучшить выход НФ- $\beta$ -D-мальтозида и МУ- $\beta$ -D-мальтозида. Ранее этот метод был успешно использован для синтеза арилгликозидов олиго- и моносахаридов [3]. 2-Хлор-4-нитрофенил- $\beta$ -D-мальтозид (ХНФ- $\beta$ -D-мальтозид) был синтезирован путем взаимодействия 2-хлор-4-нитрофенола с гептаацетилмальтозилбромидом в двухфазной системе с использованием катализатора фазового переноса.

Синтезированные  $\beta$ -мальтозиды (в сочетании с  $\beta$ -глюкозидазой) были применены для определения активности нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы щеточной каймы почек и мочи человека. Нейтральная  $\alpha$ -глюкозидаза мочи имеет почечное происхождение [4-6] и определение ее активности в моче людей служит одним из лучших ферментных тестов на поражение почек и эффективность проводимой терапии [6-8]. Одновременное определение активностей нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы и N-ацетил- $\beta$ -D-гексоамини-

дазы в моче больных после трансплантации почки позволяет осуществлять дифференциальную диагностику нефротоксичности и криза отторжения [9]. Однако широкому использованию в клинике метода определения активности нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы в целях диагностики повреждения почек до настоящего времени препятствовало отсутствие достаточно удобного и доступного метода определения активности фермента в моче.

Метод определения активности  $\alpha$ -глюкозидазы с использованием  $\beta$ -мальтозидов в качестве субстратов прост в обращении, стабилен и на порядок более чувствителен, чем определение активности  $\alpha$ -глюкозидазы с соответствующими  $\alpha$ -глюкозидами: НФ- $\alpha$ -D-глюкозидом и МУ- $\alpha$ -D-глюкозидом. Метод может быть использован для определения активности  $\alpha$ -глюкозидазы в микроплатах с последующим измерением освобождающегося агликона соответственно фотометрическим или флуориметрическим ридерами.

Предлагаемый метод был применен нами для определения активности нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы в моче больных после пересадки почки. Активность фермента определялась с субстратом НФ- $\alpha$ -D-мальтозидом в микроплатах с последующим измерением с помощью фотометрического ридера.

**Методика. РЕАКТИВЫ.** В работе были использованы следующие реактивы: тритон X-100 (Loba Chemi, Австрия), мальтоза (BDH, Англия), п-нитрофенил- $\alpha$ -D-глюкозид, 4-метилумбеллиферил- $\alpha$ -D-глюкозид и  $\beta$ -глюкозидаза (активность около 1000 единиц на мг) (Koch-Light Laboratories Ltd., Англия), п-нитрофенол производства РЕАХИМ, Россия, 2-хлор-4-нитрофенол был получен хлорированием п-нитрофенола [10], 4-метилумбеллиферон (РЕАХИМ, Россия), очищенный кристаллизацией из этанола, сорбент Silperl (Kavalier, Чехия), пластины для ТСХ Silufol UV-254 (Kavalier, Чехия). Триметилсилиловые эфиры п-нитрофенола и 4-метилумбеллиферона были синтезированы, как описано ранее [11].

**ХРОМАТОГРАФИЯ.** Хроматографию на колонке с сорбентом Silpearl проводили в системе растворителей эфир-бензол, подобранной таким образом, чтобы  $R_f$  выделяемого соединения составлял 0,25-0,35 по ТСХ. Об элюции соединения судили по данным тонкослойной хроматографии на пластинах Silufol UV-254. Соединения выявляли на ТСХ с помощью отечественных ламп ДБ-15 и ДРУФЗ 125-1.

**ПОЛУЧЕНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ.** Нейтральная  $\alpha$ -глюкозидаза из мембран щеточной каймы (микроворсинки) почек человека. Микроворсинки щеточной каймы почек человека (материал аутопсии спустя 2-3 часа после смерти) выделяли по методу Буса и Кенни [12], как описано ранее [13]. Препарат микроворсинок суспендировали в 2 мМ Na-фосфатном буфере, pH 6,5, добавляли 20% тритон X-100 до конечной концентрации 2%, перемешивали в течение часа при комнатной температуре на магнитной мешалке и центрифугировали при 16.000 x g 30 минут, 4°C. Надосадочную жидкость разводили 50 мМ Na-фосфатным буфером, pH 6,5 до нужной концентрации и использовали в качестве препарата нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы щеточной каймы почек человека.

Нейтральная  $\alpha$ -глюкозидаза из мочи человека. Мочу здоровых людей, собранную натощак с 7 до 10 часов утра, объединяли и центрифугировали при 20.000 x g 1 час при 15°C. Надосадочную жидкость сгущали на мембране ХМ-50 (Amicon), диализовали на холоду в течение 20 часов против 2 мМ Na-фосфатного буфера, pH 6,5, дважды меняя раствор для диализа. Полученный таким образом препарат нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы из мочи использовали для определения кинетических констант.

Для определения активности нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы в моче больных после пересадки почки мочу (4 мл), собранную от 7 до 10 утра, диализовали против 1 мМ ЭДТА, содержащего 25 мМ NaCl, pH 6,7, в течение 3 часов при 4°C.

$\beta$ -Глюкозидаза. В экспериментах использовали раствор  $\beta$ -глюкозидазы 1,5 мг/мл 50 мМ Na-фосфатного буфера, pH 6,5 или 1,5 мг/мл 200 мМ К-фосфатного буфера, pH 6,5.

**АНАЛИТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ.** Определение активности нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы почек и мочи человека в отношении различных субстратов.

1. Инкубационная смесь (250 мкл) состояла из 50 мкл фермента (или 30 мкл фермента и 20 мкл 50 мМ Na-фосфатного буфера, pH 6,5, содержащего или не содержащего  $\beta$ -глюкозидазу) и 200 мкл 50 мМ Na-фосфатного буфера, pH 6,5, содержащего соответствующее количество субстрата. Пробы инкубировали 30 минут при 37°C. Реак-

цию останавливали кипячением в течение 3 минут. Об активности фермента судили по количеству образовавшейся глюкозы, которую определяли глюкозооксидазным методом [13].

2. Инкубационная смесь (250 мкл) содержала 30 мкл фермента, 20 мкл раствора  $\beta$ -глюкозидазы (1,5 мг/мл) и 200 мкл 50 мМ Na-фосфатного буфера, pH 6,5, содержащего соответствующее количество НФ- $\beta$ -D-мальтозида. После инкубации 30 минут при 37°C реакцию останавливали добавлением 3 мл 0,1 М  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Об активности судили по количеству образовавшегося п-нитрофенола, который измеряли при 405 нм.

Определение активности нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы в моче больных после трансплантации почки с использованием микроплат и ELISA ридера.

Реакционная смесь в ячейке (150 мкл) содержала 100 мкл диализованной мочи, 40 мкл 0,2 М К-фосфатного буфера, pH 6,5, содержащего 7,5 мМ НФ- $\beta$ -D-мальтозид, и 10 мкл раствора  $\beta$ -глюкозидазы (1,5 мг/мл 0,2 М К-фосфатного буфера, pH 6,5). Микроплата инкубировали 30 или 45 минут на водяной бане при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 200 мкл 0,2 М  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  в каждую ячейку. Оптическую плотность образовавшегося п-нитрофенола измеряли на ELISA ридере при 405 нм.

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ КИНЕТИЧЕСКИХ КОНСТАНТ.** Кинетические константы для нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы определяли методом нелинейной регрессии, используя компьютерную программу GPIR для IBM PC.

#### **Результаты и обсуждение.**

Синтез  $\beta$ -мальтозидов.

Гепта-0-ацетил- $\alpha$ -D-мальтозилбромид и гепта-0-ацетил- $\beta$ -D-мальтозилфторид. К смеси 5 мл пиридина и 10 мл уксусного ангидрида прибавляли 2,5 г мальтозы, перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Прозрачный раствор разбавляли 50 мл хлороформа, выливали в 1 л ледяной воды. Органический слой отделяли, промывали водой, водным гидрокарбонатом натрия, снова водой. После упаривания растворяли в 30 мл хлористого метилена, обрабатывали раствором  $\text{HBr}/\text{AcOH}$  (30 мл) и выдерживали 3 часа при комнатной температуре. После разбавления хлороформом (50 мл), промывания водой (3x100 мл), водным бикарбонатом натрия (2x100 мл), водой (2x100 мл) и упаривания досуха получали мальтозилбромид, пригодный для синтеза ХНФ- $\beta$ -D-мальтозида. Для получения мальтозилфторида весь полученный остаток растворяли в 5 мл нитрометана и прикапывали к кипящей смеси 5,0 г гидрофторида 2,4,6-коллина и 0,2 г бромной ртути в 10 мл нитрометана. После окончания прибавления продолжали кипячение еще в течение 5 минут. Реакционную смесь охлаждали, разбавляли хлороформом (50 мл), промывали водой (3x100 мл), упаривали до сиропа и очищали хроматографией на колонке с Silpearl. Получено 2,5 г мальтозилфторида, т. пл. 134-135°C,  $[\alpha]_D + 74^\circ$  (с 0,6 хлороформ).

п-Нитрофенил-гепта-О-ацетил- $\beta$ -D-мальтозид. К раствору 0,64 г мальтозилфторида, 0,43 г триметилсилилового эфира п-нитрофенола в 3 мл бензола прибавляли 0,13 мл эфирата трехфтористого бора в 1 мл абсолютного бензола. Через 4 часа смесь разбавляли 30 мл хлороформа, промывали водой (3x50 мл), упаривали досуха. Хроматографией остатка на колонке с Silpearl в системе бензол-этиацетат 2:1 выделяли 0,47 г (62%) гептаацетата, т. пл. 176-177°C,  $[\alpha]_D + 36^\circ$  (с 0,6, хлороформ). (Литературные данные: т. пл. 175-176°C,  $[\alpha]_D + 33,8^\circ$ , хлороформ [1]).

п-Нитрофенил- $\beta$ -D-мальтозид. (Рис. 1А). К 0,62 г п-нитрофенил-гепта-О-ацетил- $\beta$ -D-мальтозида прибавляли 15 мл абсолютного метанола и 8 капель 1 М раствора метилата натрия в метаноле. Через 2 часа нейтрализовали катионитом КРС-2п, фильтровали и упаривали. Кристаллизацией остатка из этанола получали 0,30 г (76%) п-нитрофенил- $\beta$ -D-мальтозида, т. пл. 260-261°C,  $[\alpha]_D + 8,1^\circ$  (с 0,4, метанол). (Литературные данные: т. пл. 221°C,  $[\alpha]_D + 6,0^\circ$ , метанол [1]).

4-Метилумбеллиферил-гепта-О-ацетил- $\beta$ -D-мальтозид. К раствору 0,64 г мальтозилфторида и 0,27 г 4-метил-7-триметилсилилоксикумарина в 5 мл абсолютного бензола прибавляли 0,13 мл эфирата трехфтористого бора в 1 мл абсолютного бензола. Смесь перемешивали в течение 4 часов, разбавляли 30 мл хлороформа, промывали водой (3x30 мл), сушили безводным сульфатом натрия и упаривали досуха. После хроматографии на колонке с Silpearl в системе растворителей бензол-ацетон: 10:1 и кристаллизации из этанола получено 0,37 г (47%) гептаацетата, т. пл. 177-178°C,  $[\alpha]_D + 28^\circ$  (с 0,7, хлороформ). (Литературные данные: т. пл. 176-177°C,  $[\alpha]_D + 26,2^\circ$ , хлороформ [2]).

4-Метилумбеллиферил-β-D-мальтозид. (Рис. 1В). К 20 мг метилумбеллиферил-гептаацетата прибавляли 5 мл абсолютного метанола и 1 каплю 1 М раствора метилата натрия в метаноле. Через 1 час смесь нейтрализовали катионитом КРС-2п. Катионит отделяли фильтрованием, а оставшийся раствор упаривали досуха. Получили 11 мг 4-метилумбеллиферил-β-D-мальтозида. После перекристаллизации из этанола т. пл. 230°C (разл.),  $[\alpha]_D^{20} + 6,4^\circ$  (с 0,6, пиридин). (Литературные данные: т. пл. 230°C,  $[\alpha]_D^{20} + 6,5^\circ$ , пиридин [2]).

2-Хлор-4-нитрофенил-гепта-О-ацетил-β-D-мальтозид. К раствору гепта-О-ацетил-мальтозилбромид (полученному из 3,6 г октаацетата мальтозы по вышеприведенной методике) в 20 мл хлороформа прибавляли 1,8 г 2-хлор-4-нитрофенола, 2,9 г триэтилбензиламмоний хлорида и 10,5 мл 1,25 М раствора едкого натрия. Перемешивали 2,5 часа, после чего хлороформный раствор промывали водой и пропускали через небольшой слой силикагеля. Фильтрат упаривали и кристаллизацией остатка из этанола выделяли 2,0 г (50%) гептаацетата, т. пл. 163-164°C,  $[\alpha]_D^{20} + 12,0^\circ$  (с 0,8, хлороформ).

2-Хлор-4-нитрофенил-β-D-мальтозид. (Рис. 1Б). К 0,20 г 2-хлор-4-нитрофенил-гепта-О-ацетил-β-D-мальтозида прибавляли 10 мл абсолютного метанола и 0,1 мл 1 М раствора метилата натрия в метаноле. Через 0,5 часа смесь нейтрализовали катионитом КРС-2п, фильтровали и упаривали. Перекристаллизацией остатка из этанола с добавлением эфира получили 0,05 г 2-хлор-4-нитрофенил-β-D-мальтозида, т. пл. 152-154°C,  $[\alpha]_D^{20} + 27^\circ$  (с 1,0, пиридин).

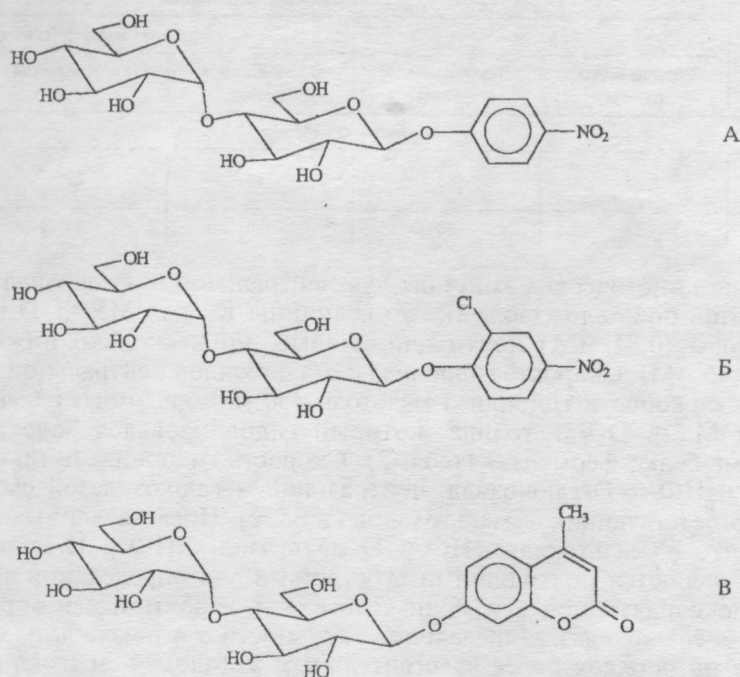


Рис. 1. Синтезированные β-мальтозиды: p-нитрофенил-β-D-мальтозид (А), 2-хлор-4-нитрофенил-β-D-мальтозид (Б) и 4-метилумбеллиферил-β-D-мальтозид (В).

Использование β-мальтозидов для определения активности α-глюкозидазы.

Механизм определения активности α-глюкозидазы с использованием β-мальтозидов в качестве субстратов и β-глюкозидазы в качестве вспомогательного фермента заключается в следующем. β-Мальтозид гидролизуют α-глюкозидазой с образованием глюкозы и β-глюкозида (Реакция I). β-Глюкозид далее расщепляется β-глюкозидазой на глюкозу и соответствующий хромофор (или флуорофор). (Реакция II).

Из реакции I и II следует, что при гидролизе β-мальтозидов только α-глюкозидазой образуется одна молекула глюкозы, тогда как при действии на β-мальтозиды смеси α-глюкозидазы и β-глюкозидазы образуются две молекулы глюкозы.

Проведенные исследования показали, что добавление в реакционную смесь 10-20 единиц  $\beta$ -глюкозидазы достаточно для того, чтобы обеспечить мгновенное полное расщепление  $\beta$ -глюкозида, образующегося из  $\beta$ -мальтозида под действием  $\alpha$ -глюкозидазы. В табл. 1 приводятся данные по гидролизу  $\beta$ -мальтозидов  $\alpha$ -глюкозидазой и смесью  $\alpha$ -глюкозидазы и  $\beta$ -глюкозидазы. Из представленных данных видно (табл. 1), что количество образовавшейся глюкозы при действии на  $\beta$ -мальтозиды смеси  $\alpha$ -глюкозидазы и  $\beta$ -глюкозидазы было в два раза больше, чем при действии только  $\alpha$ -глюкозидазы, что свидетельствует о полном гидролизе образующегося под действием  $\alpha$ -глюкозидазы  $\beta$ -глюкозида на глюкозу и хромоген (или флуороген). Количество распавшегося субстрата, определенное по количеству образовавшейся глюкозы и по количеству образовавшегося п-нитрофенола, было одинаковым (табл. 1). Скорость гидролиза НФ- $\beta$ -мальтозида смесью  $\alpha$ -глюкозидазы и  $\beta$ -глюкозидазы, определенная по количеству образовавшегося п-нитрофенола, была пропорциональна количеству добавленной в реакционную смесь  $\alpha$ -глюкозидазы. Наблюдалась прямая зависимость между количеством распавшегося  $\beta$ -мальтозида и длительностью инкубации по крайней мере в течение 1 часа.

Таблица 1

Гидролиз  $\beta$ -мальтозидов нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазой и смесью нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы и  $\beta$ -глюкозидазы. Инкубационная проба (140 мкл) содержала 20 мкл  $\alpha$ -глюкозидазы, 100 мкл 2 мМ субстрата в 50 мМ Na-фосфатном буфере pH 6,5 и 20 мкл 50 мМ Na-фосфатного буфера, содержащего или не содержащего  $\beta$ -глюкозидазу. Пробы инкубировали 30 мин. при 37°C

Субстрат	Расщепление $\beta$ -мальтозидов				
	$\alpha$ -Глюкозидаза		$\alpha$ -Глюкозидаза+ $\beta$ -Глюкозидаза		
	Образовавшаяся глюкоза	Гидролизированный субстрат	Образовавшаяся глюкоза	Гидролизированный субстрат	Образовавшийся п-нитрофенол
нмоль/час/пробу					
МУ- $\beta$ -D-мальтозид	83	83	164	82	
НФ- $\beta$ -D-мальтозид	94	94	188	94	96

Определение кинетических констант для нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы в отношении шести субстратов показало (табл. 2), что величины  $K_m$  для МУ- $\beta$ -D-мальтозида (0,78 мМ) и мальтозы (0,81 мМ) почти одинаковые, но несколько ниже для НФ- $\beta$ -D-мальтозида (0,45 мМ). Скорость гидролиза  $\beta$ -мальтозидов нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазой была близкой к скорости гидролиза мальтозы (50 мкмоль/мин/мг белка фермента) за исключением МУ- $\beta$ -D-мальтозида, который гидролизировался более медленно (31,8 мкмоль/мин/мг белка фермента) (табл. 2). Скорость гидролиза  $\alpha$ -глюкозидов, МУ- $\alpha$ -D-глюкозида и НФ- $\alpha$ -D-глюкозида, нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазой была в 14 и 39 раз ниже, чем соответствующих  $\alpha$ -мальтозидов (табл. 2). Представленные в табл. 2 данные показывают, что  $\alpha$ -мальтозиды (НФ- $\beta$ -D-мальтозид, ХНФ- $\beta$ -D-мальтозид и МУ- $\beta$ -D-мальтозид) являются подходящими субстратами для определения активности нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы почеч и мочи человека и, вероятно, для определения активности других  $\alpha$ -глюкозидаз. Определение активности  $\alpha$ -глюкозидазы с этими субстратами является на порядок более чувствительным методом, чем измерение активности фермента с соответствующими  $\beta$ -глюкозидами (табл. 2). Использование в качестве субстрата МУ- $\beta$ -D-мальтозида в сочетании с  $\beta$ -глюкозидазой вместо обычно применяемого МУ- $\beta$ -D-глюкозида для определения активности  $\alpha$ -глюкозидазы позволяет повысить чувствительность определения активности фермента в 14 раз (табл. 2) и может быть рекомендовано для определения в условиях низкой активности фермента, например, в моче больных в случае почечной недостаточности и явлениях нефротоксичности после трансплантации почки, при определении кислой  $\alpha$ -глюкозидазы при болезни Помпе и др.

Субстраты  $\beta$ -мальтозиды в сочетании с  $\beta$ -глюкозидазой могут быть использованы для определения активности  $\alpha$ -глюкозидазы в микроплатах. Для определения активности нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы в моче больных после трансплантации почки в микроплатах нами был использован субстрат НФ- $\beta$ -D-мальтозид. Количество образующегося п-нитрофенола при гидролизе НФ- $\beta$ -D-мальтозида в микроплатах было пропор-

ционально длительности инкубации (рис. 2А) и количеству добавленной мочи в пробу (рис. 2Б). Образующийся п-нитрофенол измеряли на приборе ELISA ридере. Результаты, полученные при определении активности  $\alpha$ -глюкозидазы в пробирках и микроплатах, были идентичны. Определение активности  $\alpha$ -глюкозидазы с использованием НФ- $\beta$ -D-мальтозида в качестве субстрата (в сочетании с  $\beta$ -глюкозидазой) в микроплатах очень удобно и может быть рекомендовано для проведения серийных анализов фермента в клинике.

Таблица 2

Кинетические константы гидролиза  $\beta$ -мальтозидов и  $\alpha$ -глюкозидов нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазой из почек и мочи человека

Субстрат	Нейтральная $\alpha$ -глюкозидаза			
	Почки (мембрана щеточной каймы)		Моча	
	Км, мМ	Vmax мкмоль/мин/мг белка фермента	Км, мМ	Vmax мкмоль/мин/мг белка фермента
Мальтоза	0,81	50,0*	0,81	50,0
МУ- $\beta$ -D-мальтозид	0,78	31,8		
НФ- $\beta$ -D-мальтозид		46,6	0,45	46,2
ХНФ- $\beta$ -D-мальтозид		50,0		
МУ- $\alpha$ -D-глюкозид	0,71	2,3		
НФ- $\alpha$ -D-глюкозид	4,40	1,2		

\*) Скорость гидролиза мальтозы гомогенным препаратом нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы из щеточной каймы почек человека.

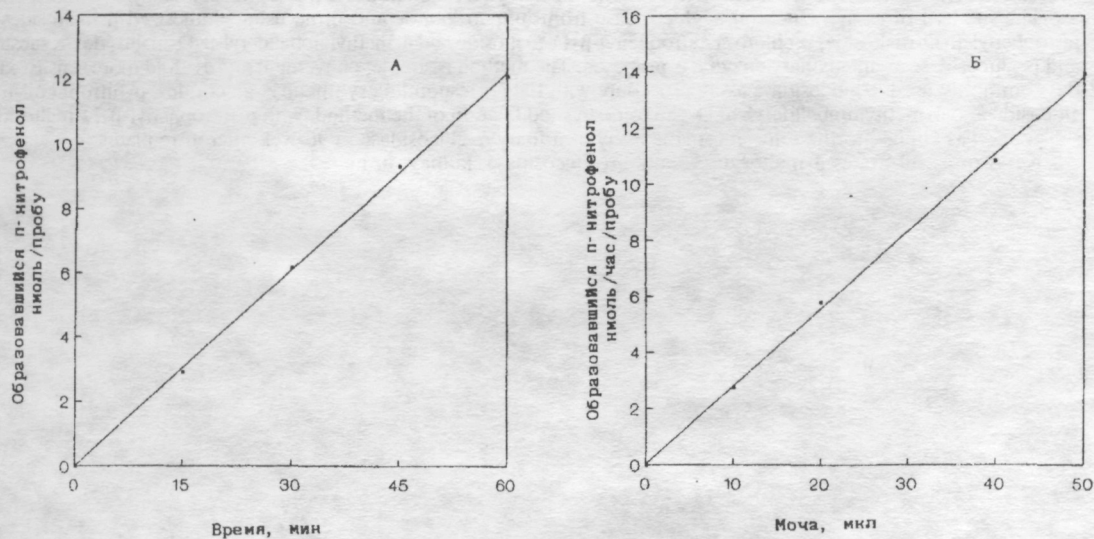


Рис. 2. Расщепление НФ- $\beta$ -D-мальтозида нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазой мочи в зависимости от длительности инкубации (А) и количества добавленной в пробу мочи (Б).

В опытах использовали мочу больных после трансплантации почки. Определение активности проводили в микроплатах, как описано в методах, используя НФ- $\beta$ -D-мальтозид в качестве субстрата и  $\beta$ -глюкозидазу, как вспомогательный фермент. Активность определяли по количеству образовавшегося п-нитрофенола.

Приведенные данные показывают, что предлагаемый метод определения активности  $\alpha$ -глюкозидазы с использованием  $\beta$ -мальтозидов в качестве субстратов и  $\beta$ -глюкозидазы, как вспомогательного фермента, прост, удобен, обладает высокой чувствительностью и может быть применен как в фундаментальных, так и клинических исследованиях.

# ЛИТЕРАТУРА

- 1 Babers F.H., Goebel U.F.J. // Biol. Chem. — 1934. — Vol. 105. — P. 473-480.
- 2 Constantzas N., Kocourek J. // Coll. Czech. Chem. Commun. — 1959. — Vol. 24, N 4. — P. 1099-1103.
- 3 Возный Я.В., Каличева И.С., Галоян А.А. // Биоорган. химия. — 1987. — Т. 13, N 12. — С. 1659-1664.
- 4 Lukomskaia I.S., Ushakova N.A. FEBS Special Meeting on Enzyme, Dubrovnic-Cavtat, April 17-21: Abstracts. — 1979. — P. S5-54.
- 5 Minamiura N., Matoba K., Nishinaka N., Yamamoto T. // J. Biochem. — 1982. — Vol. 91. — P. 809-816.
- 6 Ушакова Н.А., Лавренова Т.П., Казлас Е.В. и др. // Вопр. мед. химии. — 1988. — Т. 34, N 1. — С. 120-125.
- 7 Лукомская И.С., Лавренова Т.П., Томилина Н.А., Зубкин М.Л., Федорова Н.Д. // Вопр. мед. химии. — 1984, Т. 30, N 4. — С. 74-78.
- 8 Лукомская И.С., Лавренова Т.П., Томилина Н.А., Зубкин М.Л., Федорова Н.Д. // Вопр. мед. химии. — 1986. — Т. 32, N 5. — С. 112-119.
- 9 Дементьева И.И., Ланская И.М., Подкидышева Е.И., Лукомская И.С., Белорусов О.С., Томилина Н.А. / Трансплатология и искусственные органы. — 1995. — N 1. — С. 34-37.
- 10 Christiansen W. // J. Amer. Chem. Soc. — 1923. — Vol. 45, N 9. — P. 2192-2194.
- 11 Возный Я.В., Каличева И.С., Галоян А.А. // Биоорган. химия. — 1987. — Т. 13, N 12. — С. 1655-1658.
- 12 Booth A.G., Kenny A.J. // Biochem. J. — 1974. — Vol. 142. — P. 575-581.
- 13 Ушакова Н.А., Казлас Е.В., Лукомская И.С. // Биохимия. — 1983. — Т. 48. — С. 678-683.

## SYNTHESIS OF $\beta$ -MALTOSIDES, DERIVATIVES OF p-NITROPHENOL, 2-CHLORO-4-NITROPHENOL AND 4-METHYLBELLIFERONE, AND THEIR USE AS SUBSTRATES FOR THE ASSAY OF $\alpha$ -GLUCOSIDASE

*Y.V.Voznyi<sup>1</sup>, I.S.Lukomskaia<sup>2</sup>, I.M.Lanskaya<sup>3</sup>, E.I.Podkidisheva<sup>3</sup>.*

<sup>1</sup>Institute of Organic Chemistry of RAS, Leninsky Ave. 47, Moscow 117913, Russia, <sup>2</sup>Institute of Biomedical Chemistry of RAMS, Pogodinskaya st. 10, Moscow 119832, Russia, <sup>3</sup>Scientific Center of Surgery of RAMS, Abrikosovsky lane 2, Moscow 119874, Russia.

Synthesis of  $\beta$ -maltosides, p-nitrophenyl- $\beta$ -D-maltoside and 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-maltoside, based on interaction of heptaacetate- $\beta$ -D-maltosyl fluoride with the corresponding trimethylsilyl ethers of p-nitrophenol and 4-methylumbelliferone is described. 2-Chloro-4-nitrophenyl- $\beta$ -D-maltoside was synthesized by interaction of heptaacetate- $\alpha$ -D-maltosyl bromide with 2-chloro-4-nitrophenol in two phase system using phase transfer catalyst.

The method of assay of neutral  $\alpha$ -glucosidase from human kidney and urine using synthesized  $\beta$ -maltosides (p-nitrophenyl- $\beta$ -D-maltoside, 2-chloro-4-nitrophenyl- $\beta$ -D-maltoside and 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-maltoside) as substrates and  $\beta$ -glucosidase as an auxiliary enzyme is proposed. The method is simple, convenient and 10-fold more sensitive than the commonly used  $\alpha$ -glucosidase assay procedure with the corresponding synthetic  $\alpha$ -glucosides, p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucoside and 4-methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-glucoside. A modification of the method, with p-nitrophenyl- $\beta$ -D-maltoside as substrate, was applied to the semi-automatic assay of urinary  $\alpha$ -glucosidase in 96-well microtitre plates.

Key words: substrates  $\beta$ -maltosides, neutral  $\alpha$ -glucosidase, kidney, urine