

предлежания и положение плода в родовых путях, крупноплодие, травматизация глубокопестельных самок, стрессы.

По результатам проведенной работы зоотехнической и ветеринарной службам данного сельскохозяйственного предприятия рекомендовано проводить своевременные исследования токсичности кормов и содержания в них микотоксинов, соблюдать условия содержания и кормления стельных животных, правила оказания им родовспоможения, соблюдать схемы вакцинаций и проводить исследования сыворотки крови на напряженность иммунитета.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гулько, М. В. Эндометриты крупного рогатого скота / М. В. Гулько, В. В. Чекрышева // Ветеринария Северного Кавказа. – 2021. – № 2. – С. 37-43.
2. Журов, Д. О. Структурные изменения во внутренних органах плодов крупного рогатого скота при внутриутробном токсикозе / Д. О. Журов // Актуальные проблемы лечения и профилактики болезней молодняка: материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию учреждения образования «Витебская ордена "Знак Почета" государственная академия ветеринарной медицины» (г. Витебск, 4-6 ноября 2024 г.) / Витебская государственная академия ветеринарной медицины. – Витебск: ВГАВМ, 2024. – С. 120-123.
3. Корнюшко, К. С. Влияние кормления стельных коров на морфофункциональное состояние печени плодов и новорожденных телят / К. С. Корнюшко, Д. О. Журов // Актуальные проблемы лечения и профилактики болезней молодняка: материалы Международной научно-практической конференции (г. Витебск, 4-6 ноября 2025 г.) / Витебская государственная академия ветеринарной медицины. – Витебск: ВГАВМ, 2025. – С. 227-231.
4. Патоморфологическая диагностика заразных болезней животных с развитием генитальной патологии: учебно-методическое пособие / В. С. Прудников [и др.]; Витебская ордена "Знак Почета" государственная академия ветеринарной медицины. – Витебск: ВГАВМ, 2008. – 41 с.

УДК 577.152.3.2

ВОЗДЕЙСТВИЕ ТИАМИНАЗЫ I НА АКТИВНОСТЬ ХОЛОТРАНСКЕТОЛАЗЫ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ IN VITRO И IN VIVO

Кубышин В. Л.¹, Садовничий В. В.²

¹ – УО «Гродненский государственный аграрный университет»,

² – УЗ «ГКБСМП г. Гродно»

г. Гродно, Республика Беларусь

Аннотация. В экспериментах *in vitro* в физиологических условиях установлено, что тиаминдифосфат (ТДФ) в составе холотранскетолазы не доступен действию тиаминазы. При снижении величины pH изменяется конформация фермента и тиаминаза способна расщепить ТДФ. Высокая эффективность снижения активности транскетолазы под действием тиаминазы в экспериментах *in vivo* может быть связана с интенсивной деградацией витамина В₁ в процессе *de novo* синтеза.

Summary. *In vitro* experiments under physiological conditions revealed that thiamine diphosphate (ThDP) in holotransketolase is inaccessible to thiaminase. A decrease in pH alters the enzyme conformation, allowing thiaminase to break down ThDP. The high efficiency of thiaminase-induced decrease of transketolase activity in *in vivo* experiments may be due to the intense degradation of vitamin B₁ during *de novo* synthesis.

Ключевые слова: тиаминаза I, транскетолаза, тиаминдифосфат, гиповитаминоз B₁, тиамин.

Key words: thiaminase I, transketolase, thiamine diphosphate, vitamin B₁ deficiency, thiamine.

Внутриклеточная обеспеченность организма витамином B₁ и эндогенный дефицит его коферментной формы – тиаминдифосфата (ТДФ), обуславливающего активность ТДФ-зависимых ферментов, связанных с нарушениями обмена углеводов, остаются актуальны и по сегодняшний день. Потребность организма в тиамине значительно варьирует в зависимости от физиологических состояний (возраст, гипоксия, нервно-эмоциональные нагрузки), климатических условий, физических факторов (шум, вибрация, изменение температуры), микрофлоры желудочно-кишечного тракта (при носительстве *Bac. thiaminolyticum* и других тиаминолитических микроорганизмов), а также различных патологических состояний. У таких животных, как куры, собаки, крысы, обнаружен ряд штаммов тиаминолитических клостридий, вызывающих снижение уровня тиамина в органах и тканях. Распад тиамина в кишечнике может также увеличиваться при повышении тиамининдуцирующего синтеза тиаминазы у *E. coli*. Существуют и другие антитиаминовые факторы, широко распространенные в мире растений и гидробионтов. Недостаточное поступление тиамина с пищей, а также возрастание скорости внутриклеточной деградации витамина приводят к снижению скорости тиаминзависимых реакций. Наиболее ранние признаки B₁-гиповитаминозного состояния у животных распознают по снижению активности транскетолазы (ТК) в эритроцитах, проявляющемуся в условиях, при которых концентрация ТДФ оказывается недостаточной для насыщения фермента, что, по мнению некоторых авторов, определяет тиаминный статус тканей животных. Этот факт широко используется в клинической диагностике. Вопросы, касающиеся обеспеченности организма тиаминном и регуляции активности ТК – скорость лимитирующего фермента пентозофосфатного пути (ПФП), в зависимости от способов достижения гиповитаминозного состояния животных остаются предметом обсуждения и в настоящее время.

Цель работы – на модели тиаминного гиповитаминоза исследовать изменение активности ТК. Изучить природу связи ТДФ и апо-ТК, механизмы регуляции активности ТК на коферментном уровне. Изучить воздействие тиаминазы I на активность ТК в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Препарат тиаминазы I выделяли из внутренних органов двусторчатых моллюсков [1].

Активность ТК в печени животных определяли спектрофотометрически при длине волны 340 нм по скорости окисления НАДН в сопряженных реакциях с использованием α -глицерофосфатдегидрогеназы, триозофосфатизомеразы («Реанал», Венгрия), пентозофосфат-метаболизирующих ферментов и выражали в микромолях НАД⁺, концентрация которого изменялась в реакционной среде за 1 минуту при 30 °С [2]. Инъекции тиаминазы осуществляли белым беспородным крысам внутрибрюшинно дважды с 72-часовым интервалом в общей дозе 1,5 МЕ на животное. Транскетолазу высокой степени очистки получали методом хроматографии на фосфоцеллюлозе [3].

Тиаминаза I (КФ 2.5.1.2) широко распространена в природе, что свидетельствует о значительной роли фермента в осуществлении регуляторных механизмов витамин В₁-зависимых реакций. Реакция, катализируемая тиаминазой, заключается в обратимой деградации тиаминна на пиримидиновый и тиазоловый компоненты. Отличительной особенностью тиаминазной реакции является высокая начальная скорость формирования первого продукта и последующей фазой стационарной кинетики. Существенной характеристикой реакции тиаминазы является константа равновесия равная 0,03 при использовании косубстрата анилина и 0,022 в случае использования никотинамида.

ТК печени представляет собой сложный белок, структура которого состоит из двух идентичных субъединиц, связанных двумя молекулами ТДФ в качестве кофермента. Рентгеноструктурным анализом установлено, что оба активных центра апо-ТК структурно идентичны [4] (рисунок 1).

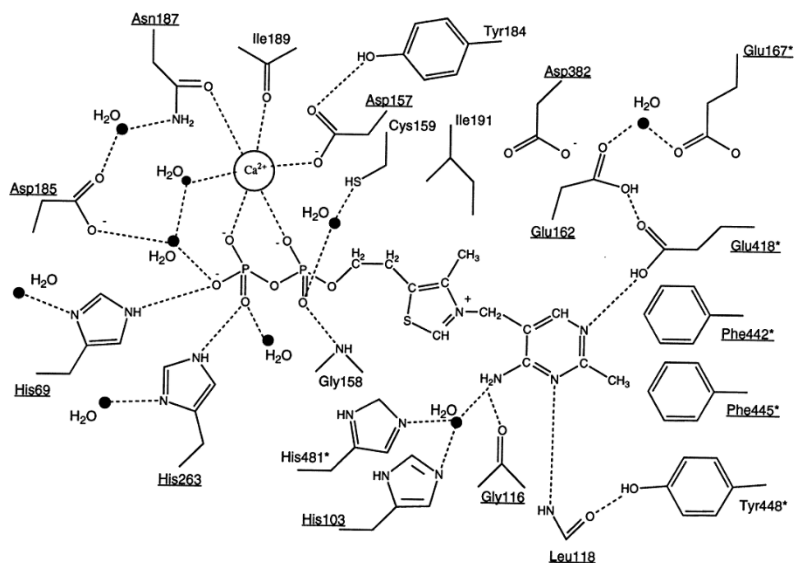


Рисунок 1 – Схема активного центра ТК (подчеркиванием обозначены консервативные аминокислотные остатки; звездочкой – аминокислотные остатки, принадлежащие другой субъединице)

Ранее нами показано, что при реактивации апофермента в присутствии субстратов, ионов Mg^{2+} и варьируемых концентраций ТДФ выявляется гетерогенность активных центров транскетолазы, отличающихся по сродству к коферменту и ферментативной активности. Представленные результаты исследований дают основание заключить, что активные центры ТК отличаются по ферментативной активности и сродству к коферменту.

Парентеральное введение экспериментальным животным тиамин-назы I в общей дозе 1,5 МЕ с двухразовым введением препарата и интервалом 72 часа приводили к снижению активности тиамин-зависимого фермента ТК (контрольная группа – $1,40 \pm 0,11$; опытная – $0,68 \pm 0,04$ мкмоль/мин), что соответствует 144 часам, в течение которых активность фермента снизилась приблизительно на 50 %. Установленный параметр согласуется со временем полуобмена холо-ТК (белковой части молекулы и кофермента), установленным в эксперименте методом радиоактивной метки [5], которое составляло ≈ 7 суток.

В ряде работ обсуждается природа и прочность связи кофермента и апофермента из различных биологических объектов. В ТК из пекарских и пивных дрожжей эта связь настолько непрочная, что ТДФ отщепляется

от белка в процессе очистки фермента. Препараты фермента из источников животного происхождения характеризуются прочной связью кофермента и апофермента.

С целью определения скорости обновления кофермента в составе ТК экспериментальным животным инъецировали ^{14}C -тиаминхлорид, предшественник ТДФ. Кинетическая кривая радиоактивности ТДФ в составе холо-ТК в полулогарифмических координатах характеризуется кривой первого порядка, из которой установлена величина полубомена и константа скорости деградации кофермента, равные 153 часа и $0,108 \text{ сут}^{-1}$ соответственно. Эти величины приближаются по абсолютным значениям к аналогичным показателям для апо-ТК печени.

В экспериментах *in vitro* установлено, что в процессе инкубации холо-ТК и тиаминазы в условиях физиологических значений pH (7,4-7,5), ТДФ в составе активного центра холофермента не доступен действию тиаминазы. При снижении величины pH 5,5-5,0 происходит изменение конформации молекулы фермента, в результате чего ТДФ подвергался воздействию тиаминазы, и, как следствие, наблюдается снижение ферментативной активности.

Наблюдаемая высокая эффективность снижения активности ТК под действием тиаминазы в экспериментах *in vivo* может быть связана с активной деградацией витамина B_1 в процессе *de novo* синтеза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пузач, С. С. Выделение и некоторые свойства тиаминазы I из *Anodonta cygnea* / С. С. Пузач, З. В. Горбач, Ю. М. Островский // Биохимия. – 1984. – Т.49, вып.7. – С. 1178-1183.
2. Кочетов, Г. А. Практическое руководство по энзимологии / Г. А. Кочетов. – М.: Высшая школа, 1980. – 272 с.
3. Кинетика диссоциации и реактивации холотранскетолазы печени крыс / В. Л. Кубышинт [и др.] // Украинский биохимический журнал. – 2012. – Т.84, №5. – С. 48-54.
4. Schneider, G. Crystallography and mutagenesis of transketolase: mechanistic implications for enzymatic thiamin catalysis / G. Schneider, Y. Lindqvist // Biochimica et Biophysica Acta. – 1998. – Vol. 1385. – P. 387-398.
5. Обмен кофермента в составе транскетолазы печени крысы / З. В. Горбач [и др.] // Биохимия. – 1986. – Т.51, вып.7. – С. 1093-1099.