

4. Кузьмич Р.Г., Кузьмич О.В., Летунович А.А. Экологические подходы к решению проблемы качества молока при маститах у коров при использовании лазера // Ученые записки ВГАВМ. - 2004. - Т. 40. -4.1.-С. 87-88.
5. Карташова В.М. Получение молока высокого качества // Ветеринария. - 1985. - №7. - С. 12-15.

Резюме

Использование низкоинтенсивного лазерного излучения при субклиническом мастите обеспечивает 100% выздоровление животных при средней продолжительности лечения 3,5-4 дня. Под воздействием лазера на 2-3 день количество соматических клеток в молоке при субклинической форме мастита снизилась на 23-28,5 %, при катаральном мастите - на 35-41%. Ключевые слова: лазер, молоко, мастит

Summary

Technological properties of milk of cows at an irradiation of a udder the laser «Institute of animal industries of National academy of sciences of Belarus».

D.V. Malashko.

Efficiency of the laser is investigated at mastitises at cows. Efficiency at a subclinical mastitis has made 100 %. Normalization of technological properties of milk has come for 3,5-4 day. Key words: laser, milk, mastit.

УДК 577.152.3

АКТИВНОСТЬ ТИАМИНМОНОФОСФАТАЗЫ В ПОЧКАХ БЫКА

**А.Ф. Макарчиков, И.М. Русина,
Т.А. Лучко, И.Э. Гуляй, Е.А. Макар**

УО «Гродненский государственный аграрный университет»
ГНУ «Институт биохимии НАН Б»
г. Гродно, Беларусь

Витамин В₁ (тиамин) выступает как незаменимый пищевой фактор для человека и животных. Его недостаточное поступление в организм или дефекты системы обмена могут проявляться в виде широкого спектра симптомов - от признаков, характерных для состояния предболезни, до тяжелых расстройств нервной и кардиоваскулярной систем. Этот факт неблагоприятно отражается на продуктивности сельскохозяйственных животных, приводя к экономическим потерям. Биологическая активностью обладают фосфорные эфиры витамина - тиаминдифосфат (ТДФ) и трифосфат (ТТФ), выполняющие соответственно коферментную и некоферментную функции. В последние годы достигнут заметный прогресс в исследованиях роли ТТФ для жизнедеятельности кле-

ток различных типов, что привело к концепции об участии тиаминфосфатов в молекулярных процессах адаптации [1]. Эта концепция способна дать импульс практическим разработкам препаратов витамина В₁ по новым назначениям, включающим такие ситуации, когда организм человека и животных испытывает повышенные стрессорные нагрузки.

Наряду с ТДФ и ТТФ неотъемлемым компонентом тканей животных является тиаминмонофосфат (ТМФ), о функциях которого в настоящее время ничего не известно. В клетках нервной системы гидролиз ТМФ осуществляется мембранно-ассоциированными фосфатазами, по-видимому, не обладающими строгой избирательностью к субстрату; по крайней мере, нет никаких данных, которые могли бы указывать на существование специфичной ТМФазы [2, 3, 4]. Однако в литературе практически отсутствуют сведения о свойствах ТМФазы невозбудимых тканей. В связи с этим, цель настоящей работы состояла в исследовании свойств фермента, катализирующего гидролиз ТМФ в почках быка.

Для получения мембран образцы ткани гомогенизировали в 50 мМ трис-НСL буфере, рН 7,4, содержащем 0,15 М КСL, 0,2 мМ ЭДТА, и центрифугировали в течение 1 ч при 105000g. Солубилизацию ТМФазной активности осуществляли с помощью широко применяемых в биологических исследованиях детергентов - тритона X-100, додецилсульфата Na, дезоксихолата Na и твина 40. Для этого осадки мембран суспендировали в 20 мМ трис-НСL буфере, рН 7,4, содержащем 50 мМ NaCL, 0,2 мМ ЭДТА, 0,1 мМ фенилметилсульфонилфторид и 1% детергент, выдерживали 30 мин при 4°C и центрифугировали в том же режиме с целью удаления нерастворимого материала. Среди исследованных нами поверхностно-активных веществ самыми подходящими свойствами для экстракции ТМФазы обладает дезоксихолат Na. При его использовании степень солубилизации, определяемая отношением активности в супернатанте к общей активности гомогената, составила 41,3%. Другие детергенты оказались менее эффективными.

Для частичной очистки ТМФазы солубилизат мембран почек быка пропускали через калиброванную белками-стандартами колонку с сефакрилом S-200 (0 2,2 x 46 см), уравновешенную 20 мМ трис-НСL буфером, рН 7,4, содержащим, 0,2 мМ ЭДТА и 0,1 М NaCL. ТМФазная активность элюировалась во фракциях свободного объема колонки, что указывает на высокую молекулярную массу фермента, поскольку предел эксклюзии для сефакрила S-200 в случае хроматографии белков равен 250 кДа. Эти же фракции обладали способностью катализировать гидролиз инозин- и уридинмонофосфата, причем ИМФазная и

УМФазная активности значительно превышали активность ТМФазы (рис. 1). Гидролиза п-нитрофенилфосфата не наблюдалось.

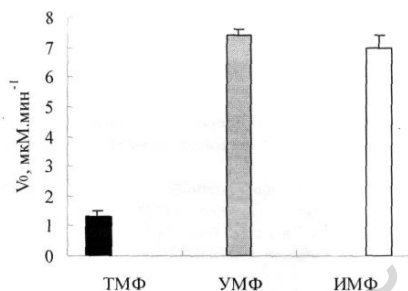


Рис. 1. Соотношение фосфатазных активностей в препарате ТМФазы, частично очищенном методом гель-хроматографии на колонке с сефакилом S-200

ТМФазная активность препарата имеет два выраженных рН-оптимума (при рН 5,5 и 9,0), причем скорость гидролиза ТМФ в щелочной среде гораздо выше, чем в кислой. Исследование зависимости начальной скорости реакции от концентрации ТМФ при рН 9,0 показало, что данная активность обусловлена действием двух ферментов, различающихся кажущимся сродством к субстрату. Это обстоятельство находит отражение в нелинейном характере графика Хейнса (рис. 2). Экстраполяция линейных ветвей кинетической кривой до точек пересечения с осью абсцисс в подобных ситуациях позволяет с хорошим приближением рассчитать величины кажущихся K_n , которые в данном случае составили 0,45 мкМ и 1,93 мкМ.

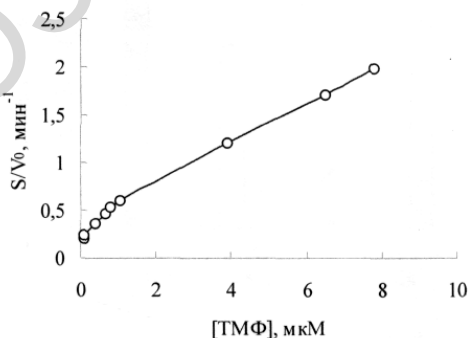


Рис. 2. Зависимость начальной скорости ТМФазной реакции от концентрации субстрата в координатах Хейнса

Частично очищенный препарат фермента проявлял активность в отсутствие катионов двухвалентных металлов. Добавление в реакционную смесь ионов Mg^{2+} , Mn^{2+} или Ca^{2+} в концентрации 5 мМ приводило к ингибированию ТМФазной реакции соответственно на 23, 52 и 41% (рис. 3).

Представленные выше результаты свидетельствуют о том, что в почках быка гидролиз ТМФ при щелочных рН может осуществляться под действием двух мембранно-связанных белков, отличающихся от щелочной фосфатазы. Пока не ясно, присутствует ли в почках (и других органах) специфичная ТМФаза, или же оба фермента относятся к 5'-нуклеотидазам. Этот вопрос требует дальнейшей разработки. Однако, вне зависимости от специфичности, данные ферменты характеризуются очень низкими значениями кажущихся K_m . Поскольку внутриклеточная концентрация ТМФ – величина порядка 0,2-0,3 мкМ [1], можно ожидать, что в физиологических условиях имеет место высокая скорость его утилизации. В непрерывном гидролизе ТМФ, по-видимому, и заключается стратегия клетки, с тем, чтобы немедленно вовлечь образующийся свободный тиамин в реакции фосфорилирования до биологически активных форм - ТДФ и ТТФ.

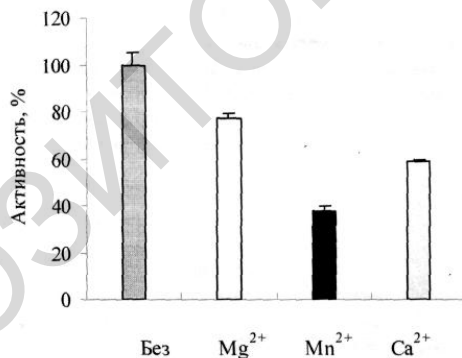


Рис. 3. Зависимость ТМФазной активности от катионов двухвалентных металлов

Литература

1. Thiamine triphosphate and thiamine triphosphatase activities: from bacteria to mammals. A.F. Makarchikov, B. B. Lakaye, I.E. Gulyai e.a. // Cell. Mol. Life Sci. - 2003. - Vol. 60. - P. 1477-1488.
2. Kiessling K.-H. Thiamine phosphatases in liver, kidney, and brain of the rat // Acta Chem. Scand. - 1960. - Vol. 14. - P. 1669-1670.

3. Ogawa K., Fujimoto T., Inomata K. Electron microscopic cytochemistry of membrane enzymes // *Trab. Inst. Cajal.* - 1981. - Vol. 72.-P. 5-17.
4. Ogawa K., Sakai M. Recent findings on ultracytochemistry of thiamin phosphatases // *Ann. NY Acad. Sci.* - 1982. - Vol. 378. - P. 188-214.

Данная работа выполнялась при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований, грант Б05-346

Резюме

Исследованы свойства мембранно-ассоциированной ТМФазы из почек быка. Солюбилизованный с помощью дезоксихолата Na и частично очищенный гель-хроматографией на колонке с сефакрилом S-200 препарат фермент катализировал гидролиз ТМФ, ИМФ и УМФ, проявляя рН оптимумы при рН 5,0 и 9,0. Катионы Mg^{2+} , Mn^{2+} и Ca^{2+} ингибировали ТМФазную активность соответственно на 23, 52 и 41%. Молекулярная масса фермента превышает 250 кДа. Кинетические исследования свидетельствуют о том, что ТМФазная активность препарата, регистрируемая при рН 9,0, определяется действием двух различных ферментов, значения кажущихся K_m которых равны 0,45 мкМ и 1,93 мкМ.

Ключевые слова: тиаминмонофосфатаза, кинетические свойства, почки быка.

Summary

Some properties of bovine kidney membrane-associated ThMPase have been studied after its solubilization with sodium deoxycholate and partial purification on a Sephacryl S-200 column. The enzyme preparation was found to catalyze the hydrolysis of ThMP, IMP as well LJMP, showing pH optima of 5.0 and 9.0. Divalent cations, such as Mg^{2+} , Mn^{2+} or Ca^{2+} , inhibited activity by 23, 52 and 41% respectively. The enzyme has a high molecular mass exceeding 250 kDa. Kinetic studies revealed that ThMPase activity of the preparation at pH 9.0 was due to the action of two different enzymes with apparent K_m values of 0.45 microM and 1.93 microM.

Key words: thiamine monophosphatase, kinetic properties, bovine kidney