

9. Определитель насекомых Европейской части СССР / ред.: С. П. Тарбинский, Н. Н. Плавильщиков. – Москва: Ленинград: Сельхозгиз, 1948. – 1127 с.
10. Особенности эпизоотологического процесса при псороптозе, маллофагозе и сифункулятозе жвачных животных / Р. М. Акбаев [и др.] // Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. – 2015. – № 3. – С. 8-9.
11. Патогистологические изменения в коже при сифункулятозе крупного рогатого скота / А. М. Утяганова [и др.] // Вестник Башкирского государственного аграрного университета. – 2014. – № 3 (31). – С. 27-30.
12. Прудников, В. С. Вскрытие и патоморфологическая диагностика болезней животных : монография / В. С. Прудников, Б. Л. Белкин, С. П. Герман. – Витебск: ВГАВМ, 2021. – С. 25.
13. Эктопаразитозы крупного рогатого скота в хозяйствах ленинградской области / Л. М. Белова [и др.] // Известия КГТУ. – 2008. – № 13. – С. 29-32.
14. Эпизоотическая ситуация по основным энтомозам крупного рогатого скота мясных пород в Зауралье / А. А. Никонов [и др.] // Вестник КрасГАУ. – 2014. – № 12 (99). – С. 154-157.

УДК 577.164.11:612.453.018.2

РЕГУЛЯЦИЯ БИОСИНТЕЗА КОФЕРМЕНТНОЙ ФОРМЫ ВИТАМИНА В₁ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ СВИНЬИ НА СУБКЛЕТОЧНОМ УРОВНЕ

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

УО «Гродненский государственный медицинский университет»
г. Гродно, Республика Беларусь (Республика Беларусь, 23009,
г. Гродно, ул. Горького, 80; e-mail: chemistry@grsmu.by

***Ключевые слова:** витамин В₁, тиаминкиназа, тиаминдифосфат, биосинтез, регуляция, головной мозг свиньи.*

***Аннотация.** Показано, что процесс регуляции биосинтеза коферментной формы витамина В₁ многофакторный и включает: контроль скорости тиаминкиназной реакции продуктами биопревращения витамина по принципу отрицательной обратной связи (тиаминмоно- и тиаминтрифосфат); природу востребованного клеткой нуклеотида как донора-субстрата; активацию катионами двухвалентных металлов (Mg⁺², Mn⁺², Co⁺²); воздействие метаболитов дегидрогеназ α-кетокислот (пируват, фосфоенолпируват, α-кетобутират), а также тесно связанного с дегидрогеназами цитрата. Пируват и α-кетобутират имеют два центра связывания с тиаминкиназой: ингибирующий (относительно гидрофобный) и активирующий (гидрофильный). Последний находится в непосредственной близости с центром локализации тиаминкиназы и обеспечивает взаимодействие карбонильной группы метаболита с четвертичным азотом тиазола В₁. Ионы двухвалентных металлов, увеличивая сродство субстратов и эффекторов к ферменту, создают оптимальную геометрию сорбции молекул в активном центре. Карбоксильная группа цитрата блокирует биосинтез.*

REGULATION OF BIOSYNTHESIS OF THE COENZYME FORM OF VITAMIN B₁ IN THE PIG'S BRAIN AT THE SUB-CELLULAR LEVEL

N. N. Kostenevich, I. P. Chernikevich, E. A. Baranovskaya

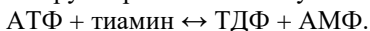
Educational Establishment «Grodno State Medical University»
Grodno, Republic of Belarus (Republic of Belarus, 23009, Grodno,
80 Gorkogo str.; e-mail: chemistry@grsmu.by)

Key words: vitamin B₁, thiamine kinase, thiamine diphosphate, biosynthesis, regulation, pig's brain.

Summary. It has been shown that the process of regulation of the biosynthesis of coenzyme form of vitamin B₁ is multifactorial and includes: control of the rate of the thiamine kinase reaction by the products of the bioconversion of the vitamin according to the principle of negative feedback (thiamine mono- and thiamine triphosphate), the nature of the nucleotide demanded by the cell as a donor-substrate, activation by divalent metal cations (Mg⁺², Mn⁺², Co⁺²), impact of metabolites of α -ketoacid's dehydrogenases (pyruvate, phosphoenolpyruvate, α -ketobutyrate), as well as citrate, which is closely related to dehydrogenases. Pyruvate and α -ketobutyrate have two thiamine kinase binding sites: an inhibitory (relatively hydrophobic) and an activating (hydrophilic) site. The latter is located in close proximity to the thiamine localization center and provides the interaction of the metabolite's carbonyl group with the quaternary nitrogen of thiazole B₁. Divalent metal ions, by increasing the affinity of substrates and effectors for the enzyme, create the optimal geometry of sorption of molecules in the active center. The carboxyl group of citrate blocks biosynthesis.

(Поступила в редакцию 01.06.2023 г.)

Введение. Общее число белков, для которых тиаминдифосфат (ТДФ) служит коферментной формой, сегодня приближается к 40 (www.brenda-enzymes.org). Пять из них кодируются геномами животных: пируват-дегидрогеназа, 2-оксоглутарат-дегидрогеназа и 3-метил-2-оксобутаноат-дегидрогеназа, входящие в состав митохондриальных дегидрогеназных комплексов α -кетокислот; цитозольная транскетотлаза; 2-гидроксиацил-КоА-лиаза пероксисом. Остальные задействованы в реакциях вторичного метаболизма, специфических для определенных групп и видов организмов. Биосинтез кофермента осуществляется тиаминкиназой (КФ 2.7.6.2), катализирующей двухсубстратную реакцию переноса пирофосфатной группировки от молекулы АТФ на тиамин:



Генетически детерминированные «поломки» в отдельных звеньях молекулы тиаминкиназы, а равно в ТДФ-зависимых ферментах, сопровождаются рядом чаще всего нейродегенеративных заболеваний [1-3]. Гомогенные препараты белка выделены из пивных дрожжей, листьев петрушки, эритроцитов человека, печени крысы, мозга свиньи [4].

Описаны кинетические модели функционирования фермента, механизм действия. Однако ясного видения регуляции ферментативного процесса пока нет. Учитывая, что в элюционной иерархии макромолекулу тиаминкиназы следует отнести к «древним» структурным образованиям, нельзя не согласиться с доминирующим постулатом [5] о неприемлемости контроля за скоростью биосинтеза кофермента посредством гормонов или на уровне нервной системы. Регуляция на уровне гормонов более правдоподобна для быстрооборачиваемых катаболических ферментов гидролиза фосфорных эфиров тиаминкиназы. «Медленные» анаболические киназы синтеза, очевидно, подвержены регуляции при помощи механизмов, работающих на субклеточном уровне, – с использованием компонентов внутренней среды клетки. Такая разноуровневая регуляция, реализуемая через концентрации или активности ферментов, лежит в основе необычайной пластичности, приспособляемости и адаптации организмов разной степени организации.

Цель работы – изучить влияние субстратов, кофакторов и эффекторов клетки на процесс биосинтеза коферментной формы витамина В₁ в головном мозге.

Материал и методы исследований. Тиаминкиназу из головного мозга свиньи выделяли по описанной ранее методике [6]. Скорость реакции оценивали согласно модификации, изложенной в работе [7]. Количество образовавшегося ТДФ находили при помощи апопируватдекарбоксилазы. Активность рекомбинированной за 30 мин при 20 °С и рН 6,8 холопируватдекарбоксилазы регистрировали по убыли НАДН в присутствии алкогольдегидрогеназы. Белок определяли по методу Лоури и спектрофотометрически по поглощению при 280 нм. Удельную активность выражали в нмоль ТДФ, образовавшегося за 1 ч при 40 °С в расчете на 1 мг белка ферментного препарата.

При оценке скорости биосинтеза ТДФ в присутствии продуктов биопревращения витамина (тиаминмоно-, тиаминтрифосфат) или аллостерических эффекторов (пируват, фосфоенолпируват, α -кетобутират) в качестве акцептора пирофосфатных групп вместо тиаминкиназы использовался меченый [тиазол-2-¹⁴С] тиамин. В остальном состав инкубационной смеси идентичен описанному в работе [7]. После остановки реакции смесь разделяли на колонке (1,2 x 10 см) с ДЕАЕ-сефадексом А-25. Невязавшийся [¹⁴С] тиамин удаляли исходным буфером. [¹⁴С] ТДФ элюировали 25 мл 0,5М HCl. Концентрацию [¹⁴С] ТДФ находили из удельной радиоактивности меченого тиаминкиназы. Радиоактивность измеряли на сцинтилляционном счетчике Mark-II (Nuclear Chicago, США). Активность фермента в этом случае выражали в условных единицах

(имп/мин), учитывая, что биосинтез 1 нмоль ТДФ соответствует его радиоактивности 0,9 имп/мин.

За изменениями структурной организации тиаминкиназы при взаимодействии с эффекторами следили после 20 мин преинкубации компонентов в среде определения. Количество пирувата, фосфоенолпирувата или α -кетобутирата, связавшихся с белком, определяли методом гель-фильтрации на колонке (1,2 x 40 см) с сефадексом G-50 [8]. Число мест связывания и значения кажущихся констант связывания рассчитывали из зависимости γ/c от γ , где c -концентрация лиганда, γ -соотношение связанный лиганд/белок, моль/моль [9].

Спектры флуоресценции фиксировали на люминесцентной установке СДЛ-2 (ЛОМО, Россия). В ходе исследований количество образца подбиралось таким образом, чтобы его поглощение при длине волны возбуждения не превышало 0,05 ОЕ. Спектры корректировались с учетом спектральной чувствительности прибора. Квантовый выход флуоресценции (В) определяли относительно водного раствора триптофана, для которого В = 0,20.

Результаты обрабатывали с помощью вычислительного комплекса ДВК-3 (Россия). Расчет кинетических констант, анализ характера активации или ингибирования активности тиаминкиназы осуществляли непараметрическим методом [10]. При графическом анализе данных рассчитывались уравнения линейной и нелинейной регрессии по методу наименьших квадратов.

Результаты исследований и их обсуждение. Подобно большинству трансфераз, катализирующих перенос фосфатных групп, тиаминкиназа из мозга свиньи неактивна в отсутствие ионов двухвалентных металлов [4]. Ионы Mg^{2+} , как и в случае фермента из пивных дрожжей, выполняют двойную роль: субстратную, в составе комплекса $Mg \cdot АТФ^{2-}$, и аллостерического активатора макромолекулы. Учитывая наличие в мозге и некоторых других не менее важных катионов (Mn^{2+} , Co^{2+}) нами одновременно проанализировано влияние их на процесс биосинтеза. Оказалось, что кофакторная способность Mg^{2+} , Mn^{2+} и Co^{2+} дифференцируется в зависимости от концентрации ионов водорода в среде инкубации. На рисунке 1 видно, что Co^{2+} наиболее эффективен при кислых значениях рН (5,5-7,0), а Mn^{2+} – при щелочных (рН 9,6). Что касается Mg^{2+} , то последний проявляет определенный полиморфизм и обеспечивает функционирование тиаминкиназы в пределах рН от 6,0 до 10,0.

Поскольку нуклеозидтрифосфаты (НТФ) находятся преимущественно в форме комплексов с катионами металлов и на биосинтез ТДФ сильно влияет их концентрация, то необходимым исходным этапом был

подбор величины оптимального соотношения этих компонентов в тиаминкиназной реакции. Изучение зависимости скорости реакции от концентрации ионов Mg^{2+} и Mn^{2+} изначально проводили при фиксированной концентрации каждого из используемых нуклеотидов, равной $1 \cdot 10^{-3}M$.

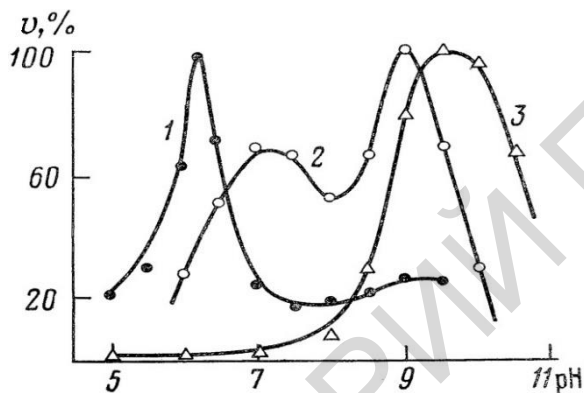


Рисунок 1 – Зависимость скорости биосинтеза ТДФ от pH при соотношениях металл/нуклеотид: 1 – $[Co^{2+}] / ATP = 2$, 2 – $[Mg^{2+}] / ATP = 4$, 3 – $[Mn^{2+}] / ATP = 1$; v – активность фермента в процентах от максимальной

Когда в роли фосфатных доноров выступали АТФ, УТФ, ИТФ и ГТФ, то наблюдаемая нами максимальная скорость достигалась при превалировании ионов Mg^{2+} над нуклеотидами в 4 раза, а в случае ЦТФ – в 6 раз. Увеличение концентрации ионов в 2-3 раза не приводило к существенному ингибированию фермента. С Mn^{2+} , как кофактором, биосинтез ТДФ максимален уже при равном соотношении нуклеотидов и ионов, за исключением ГТФ, где оптимально концентрационное соотношение $Mn^{2+} : НТФ$ 0,5 к 1. Повышение содержания иона вело к резкой инактивации глобулы. Такого рода эффекты двухвалентных катионов, по-видимому, объясняются различной способностью к хелатированию Mg^{2+} и Mn^{2+} . Надо учесть и такой факт, что кроме общего места связывания по фосфатам Mn^{2+} , который имеет незаполненную d-орбиталь, взаимодействует с атомом азота N_7 пуриновых оснований, преимущественно гуанинов, вызывая, по данным ЯМР, лабильзацию протона связи C_8-H и конформерные переходы [11]. Образовавшийся конформер $Mn-ГТФ$, возможно, хуже связывается с активным центром ферменты, что, вероятно, и является основной причиной резкого ингибирования

синтеза ТДФ в присутствии ГТФ относительно невысокими концентрациями Mn^{2+} .

Анализ зависимости скорости биосинтеза ТДФ от концентрации комплекса $Mg \cdot NTФ$, при оптимальных соотношениях нуклеотид / металл и фиксированной концентрации ТДФ, показал, что любой из исследованных НТФ может служить субстратом тиаминкиназной реакции, однако наиболее эффективным донором пирофосфатных группировок является АТФ. Остальные нуклеотиды следуют в порядке ГТФ > ИТФ > УТФ, причем максимальная скорость с двумя последними приблизительно одинакова. Полученные данные, обработанные по методу Лайнуивера-Бэрка, позволили рассчитать для каждого донора кажущиеся КМ (рисунок 2).

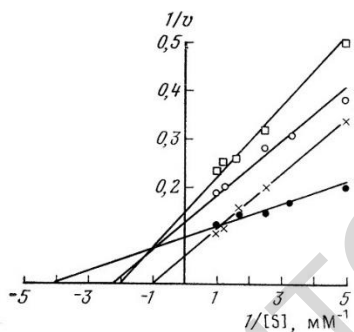


Рисунок 2 – Зависимость скорости тиаминкиназной реакции от концентрации нуклеотидов при оптимальных соотношениях с ионами Mg^{2+} в координатах Лайнуивера-Бэрка. 1 – УТФ, 2 – ИТФ, 3 – АТФ, 4 – ГТФ

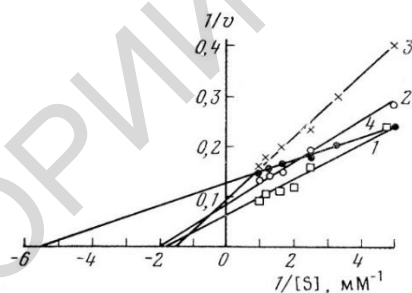


Рисунок 3 – Зависимость скорости тиаминкиназной реакции от концентрации нуклеотидов при оптимальных соотношениях с ионами Mn^{2+} в координатах Лайнуивера-Бэрка. 1 – УТФ, 2 – ИТФ, 3 – АТФ, 4 – ГТФ

Если для АТФ K_M равна $1 \cdot 10^{-3}M$, для ИТФ и УТФ она несколько ниже и практически одинакова ($4,5 \cdot 10^{-4}M$ и $4,8 \cdot 10^{-4}M$ соответственно), то насыщение фермента ГТФ происходит при более низких концентрациях (K_M в этом случае равна $1,8 \cdot 10^{-4}M$).

В присутствии Mn^{2+} фермент атакует все рассматриваемые нуклеотиды, однако в данных условиях АТФ не лучший донор пирофосфатных группировок. Скорость реакции максимальна, когда в качестве субстрата используется УТФ, причем численное значение V_{max} для УТФ с Mn^{2+} почти достигает V_{max} для АТФ с Mg^{2+} . Если принять за 100 % активность фермента с АТФ, то активности для других нуклеотидов

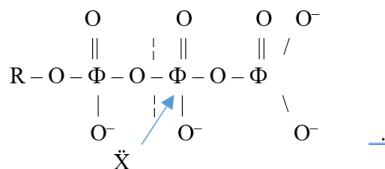
составляют 160, 120 и 70 % для УТФ, ИТФ и ГТФ соответственно. K_M , рассчитанные из двойных обратных величин (рисунок 3), для УТФ, ИТФ и АТФ весьма близки и равны $4,0 \cdot 10^{-4}$, $5,1 \cdot 10^{-4}$ и $6,2 \cdot 10^{-4}M$. В то же время, как и с Mg^{2+} , фермент чувствителен к значительно более низким концентрациям ГТФ. K_M для него в среднем в 3 раза ниже величин полунасыщения других носителей пирофосфатных группировок и составляет $1,3 \cdot 10^{-4}M$.

Широкая субстратная специфичность тиаминкиназы позволяет, в зависимости от условий, эффективно фосфорилировать поступающий в клетку витамин с помощью различных нуклеозидтрифосфатов. Данный факт одновременно служит указанием, что контакт нуклеотидов с активным центром фермента вряд ли является множественным и присоединение субстрата к ферменту с образованием промежуточного фермент-субстратного комплекса происходит по двум-трем точкам. Учитывая, что дифосфорные эфиры нуклеотидов в данной реакции не могут отдавать имеющийся у них пирофосфатный остаток, то минимальным требованием к структуре субстрата является наличие фосфотриэфирной группировки (специфический участок), с которой осуществляется взаимодействие активного центра глобулы.

Ранее [12] с помощью [γ - ^{32}P] АТФ было показано, что в тиаминкиназной реакции пирофосфатный остаток молекулы нуклеотида переносится целиком, одноэтапно, согласно схеме: тиамин + А-Ф-Ф- ^{32}P → тиамин-Ф- ^{32}P + АМФ. В таком случае возможны два варианта места разрыва фосфоэфирной связи:



Идентификация «специфического» участка молекулы донора позволяет предсказать положение такой связи. Согласно правилу Кошланда [13], если фермент расщепляет субстрат с кислородным мостиком типа R-O-Q и обнаруживает высокую специфичность для Q и низкую для R, то в процессе реакции разрушается связь примыкающая к специфическому участку молекулы, т. е. O-Q. Таким образом, с большой долей вероятности в молекуле нуклеозидтрифосфата происходит разрыв связи в положении обозначенном в варианте 2, т. е. кислород, связывающий α - и β -атомы фосфора молекулы НТФ, остается у мононуклеотида, а при образовании молекулы ТДФ возникает новая связь между кислородом оксиэтильной группы витамина и β -Ф нуклеозидтрифосфата (R – азотистое основание, \ddot{X} – атакующая нуклеофильная группа V_1):



Помимо субстратов и кофакторов тиаминкиназной реакции значимую роль в регуляции биосинтеза ТДФ могут играть продукты биопревращения витамина – тиаминмонофосфат, как продукт дефосфорилиза кофермента, и тиаминтрифосфат, наиболее фосфорилированная форма тиамин. На рисунке 4 представлена зависимость скорости реакции от содержания витамина при постоянной концентрации АТФ и переменных – тиаминтрифосфата. Серия прямых, рассчитанных по методу двойных обратных величин, имеет общую точку пересечения, лежащую на абсциссе. Это бывает в случае, когда ингибитор одновременно действует и на свободный фермент, и на фермент-субстратный комплекс, т. е. налицо случай неконкурентного ингибирования. Следовательно, тиаминтрифосфат – весьма сильный ингибитор тиаминкиназы с $K_i = 3 \cdot 10^{-6} \text{M}$. Несмотря на то, что общая концентрация метаболита в мозге составляет 0,04-0,07 мкМ, учитывая его локализацию в области плазматической мембраны, исходя из вычислений объемов сфер и цилиндров, соответствующих диаметрам тел и аксонов нервных клеток, реально ожидать существование локальной концентрации тиаминтрифосфата на два-три порядка выше, т. е. в пределах до 50 мМ. Таким образом, вследствие сильного сродства к ферменту тиаминтрифосфат может быть специфическим клеточным метаболитом, который, взаимодействуя с функциональными группами тиаминкиназы, будет регулировать процесс биосинтеза коферментной формы по кибернетическому принципу обратной связи.

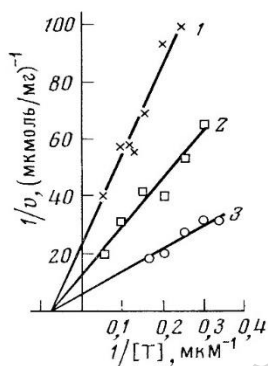


Рисунок 4 – Ингибирование тиаминкиназной реакции тиаминтрифосфатом. АТФ – фиксированный субстрат (0,5 мМ); тиамин – переменный. Концентрация тиаминтрифосфата, мкМ: 1 – 5,5; 2 – 2,3; 3 – проба без ингибитора

Тиаминмонофосфат ингибирует скорость катализа по смешанному типу в соответствии с ситуацией, при которой ингибитор более прочно связывается с комплексом фермент-тиамин по адсорбционному и слабее – по каталитическому центру. Константа диссоциации комплекса белок-тиаминмонофосфат составила $2 \cdot 10^{-4}$ М.

Таблица – Влияние 2-оксокислот и цитрата на скорость биосинтеза ТДФ

Пируват, мМ	Степень активации или ингибирования, %	Фосфоенолпируват, мМ	Степень активации или ингибирования, %	α -кето-бутират, мМ	Степень активации или ингибирования, %	Цитрат, мМ	Степень ингибирования, %
-	0	-	0	-	0	-	0
0,1	-13	0,1	-0,3	0,1	-7	0,1	1,6
0,3	-39	0,5	-0,9	0,3	-21	0,5	7,8
0,5	-26	1,0	-0,4	0,5	-12	1,0	20,1
1,0	+19	2,0	+0,2	1,0	+9	2,0	31,6
5,0	+82	5,0	+1,0	5,0	+37	5,0	50,2
10,0	+78	10,0	+0,8	10,0	+31	10,0	81,1

Автоматическая регуляция при помощи механизмов, работающих на субклеточном уровне (компоненты внутренней среды клетки), наиболее вероятна для метаболитов, участвующих в реакциях, где ТДФ является коферментной формой. В первую очередь это касается субстратов дегидрогеназ α -кетокислот – пирувата, фосфоенолпирувата и

α -кетобутирата, а также тесно связанного с дегидрогеназами – цитрата. Согласно данным таблицы, пируват, подобно ионам Mg^{2+} , характеризуется двойным разнонаправленным действием в близких к физиологическим концентрациях (0,1-0,5мМ), ингибируя, а в более высоких – активируя биосинтез ТДФ. Сходно, но менее выражено влияние α -кетобутирата. Цитрат снижает каталитическую активность фермента, причем кривая зависимости удельной активности от концентрации ингибитора представляет собой выраженную S-образную функцию. Инактивированная в присутствии цитрата или низких концентраций пирувата тиаминкиназа полностью реактивируется удалением избытка свободного эффектора. Обнаруживаемое нами в опытах неконкурентное связывание метаболитов дегидрогеназ α -кетокислот, вероятно, указывает на то, что активные центры молекулы фермента и участки связывания цитрата, пирувата и α -кетобутирата пространственно разделены. Фосфоенолпируват не влияет на скорость каталитического процесса.

Определение количества участков связывания для пирувата, фосфоенолпирувата и α -кетобутирата в координатах Скэтчарда показывает (рисунок 5), что присоединение пирувата и α -кетобутирата осуществляется по двум, очевидно разным, центрам белковой молекулы с константами связывания в случае пирувата $K_S = 0,33 \cdot 10^{-3}$ и $1,48 \cdot 10^{-3}M$. Характер взаимодействия с лигандами отражается на спектральных и поляризационных параметрах собственной флуоресценции тиаминкиназы.

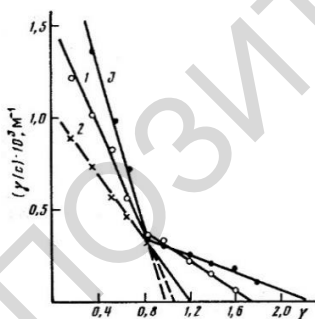


Рисунок 5 – Определение числа участков связывания α -кетобутирата (1), фосфоенолпирувата (2) и пирувата (3) с молекулой тиаминкиназы методом Скэтчарда

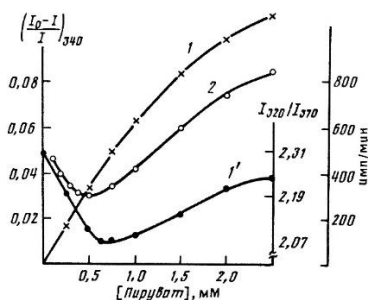


Рисунок 6 – Зависимость эффективности тушения (1), положения флуоресценции (1') и удельной ферментативной активности (2) тиаминкиназы от концентрации пирувата

Ранее установлено [14], что изменение флуоресцентных характеристик белка, при связывании с пируватом, обусловлено переносом энергии электронного возбуждения с остатков триптофана на пируват, что ведет к локальным конформационным изменениям белковой молекулы. Из данных рисунка 6 следует, что взаимодействие с пируватом сопровождается тушением триптофановой флуоресценции белка и изменением положения ее максимума, причем смещение спектра флуоресценции имеет двухфазный характер, меняющийся в зависимости от концентрации лиганда: при более низких концентрациях пирувата (до 0,6 мМ) прослеживается длинноволновый сдвиг спектра, который при повышении концентрации отчасти сменяется коротковолновым. В этой связи можно предположить, что изменение параметров собственной флуоресценции фермента отражает разнонаправленное изменение конформации молекулы белка, определяемое концентрацией пирувата. Подобные эффекты, как правило, объясняются наличием нескольких типов участков связывания лиганда на молекуле белка, взаимодействие с которыми вызывает вышеописанные структурные изменения. Следует отметить, что при концентрации пирувата $5 \cdot 10^{-3}$ М, когда задействованы оба участка связывания с тиаминкиназой, происходит повышение подвижности ряда триптофановых остатков.

Двойное, разнонаправленное действие пирувата отмечено и в случае определения ферментативной активности (рисунок 6), когда лиганд в концентрациях близких к физиологическим ингибирует ($K_1 0,47 \cdot 10^{-3}$ М), а в более высоких активирует ($K_a 2,3 \cdot 10^{-3}$ М) биосинтез ТДФ. Таким образом, пируват, являясь субстратом ряда метаболически важных тиаминдифосфатзависимых белковых систем, оказывает выраженное регуляторное влияние на активность тиаминкиназы – фермента биосинтеза коферментной формы витамина В₁. Отсюда повышение содержания пирувата в клетке до нормы, не превышающей его физиологическую концентрацию, будет вести к ингибированию биосинтеза кофермента и соответственно к снижению скорости реакции декарбоксилирования (положительная обратная связь), в то время как дальнейшее повышение содержание эффектора до концентрации, превосходящей его физиологический уровень, напротив, через активацию работы ТДФ будет способствовать усилению утилизации пирувата по принципу отрицательной обратной связи.

Из химического строения пирувата очевидно, что он может адсорбироваться в гидрофобной области молекулы белка за счет метильной группы и в гидрофильной с помощью карбонила. Естественно было ожидать, что при связывании в ингибиторном и активаторном центрах используются различные группировки молекулы. С целью получения

дополнительной информации об этом нами использован структурный аналог пирувата – фосфоенолпируват. В силу своих структурных особенностей последний практически лишен возможности адсорбироваться в гидрофобных участках молекулы фермента и, не имея карбоксильной группы, в гидрофильных (рисунок 5).

Заключение. Таким образом, как «древняя» структура в эволюционной иерархии, тиаминкиназа, вероятно, не регулируется на нейроморальном уровне, но ее ферментативная активность эффективно контролируется посредством субстратов, кофакторов и аллостерических эффекторов клетки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Abnormal thiamine-dependent processes in Alzheimer's disease. Lessons from diabetes / G. Gibson [et al.] // *Mol. Cell. Neurosci.* – 2013. – Vol. 55. – P. 17-25.
2. Luong, K.v.q. The beneficial role of thiamine in Parkinson disease / K.v.q. Luong, L. T. Nguyễn // *CNS Neurosci Ther.* – 2013. – Vol. 19. – P. 461-468.
3. Макарьчиков, А. Ф. Тиаминтрифосфат: новый взгляд на некоферментную функцию витамина В₁: монография / А. М. Макарьчиков. – Минск: Белорусская наука, 2008. – 430 с.
4. Воскобоев, А. И. Биосинтез, деградация и транспорт фосфорных эфиров тиаминкиназы / А. И. Воскобоев, И. П. Черникович. – Минск: Наука и техника, 1987. – 200 с.
5. Виноградов, В. В. Некоферментная витаминология: монография / В. В. Виноградов. – Гродно, 2000. – 535 с.
6. Черникович, И. П. Сравнительный кинетический анализ тиаминкиназ из пивных дрожжей и головного мозга свиньи / И. П. Черникович // *Журнал Гродненского государственного медицинского университета.* – 2011. – № 3. – С. 25-28.
7. Черникович, И. П. Ферментативный микрометод количественного определения тиаминдифосфата в биологических жидкостях / И. П. Черникович, Э. А. Гриценко, А. Ф. Макарьчиков // *Прикл. биохим. и микробиол.* – 1991. – Т. 27, № 5. – С. 762-771.
8. Керридж, Д. Биохимическая логика / Д. Керридж, К. Типтон. – М.: Мир, 1974. – 328 с.
9. Scatchard, C. The attractions of proteins for small molecules and ions / C. Scatchard // *Ann. Molec. Inter.* – 1949. – V.51, № 4. – P. 573-582.
10. Зайцев, В. М. Прикладная медицинская статистика: учеб. пособие. – 2-е изд. / В. М. Зайцев, В. Г. Лифляндский, В. И. Маринкин. – СПб.: Фолиант, 2006. – 432 с.
11. Anderson, I. A. Preferential interaction of manganous ions with the guanine moiety in nucleosides, dinucleoside monophosphates and deoxyribonucleic acid / I. A. Anderson, G. P. Kunitz, H. H. Evans // *Biochemistry.* – 1971. – Vol. 10, № 24. – P. 4368-4374.
12. Shimazono, N. Mechanism of transpyrophosphorylation with thiaminokinase / N. Shimazono, Y. Mono, R. Tanaka // *J. Biochem.* – 1959. – Vol. 46. – P. 959-961.
13. Koshland, D. E. Comparison of experimental binding data and the theoretical models in proteins containing subunits / D. E. Koshland, G. Nemethy, D. Filmer // *Biochemistry.* – 1966. – Vol. 5, № 2. – P. 365-373.
14. Черникович, И. П. Влияние субстратов, кофакторов и эффекторов на структуру и динамику тиаминкиназы из пивных дрожжей / И. П. Черникович, А. А. Маскевич, Г. А. Гачко // *Биоорг. химия.* – 1992. – Т. 18, № 4. – С. 509-530.