

РЕГУЛЯЦІЯ ТІАМІНОМ ТА ЙОГО МЕТАБОЛІТАМИ АКТИВНОСТІ
ДЕЯКИХ ПРОТЕОЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ

Досліджено роль тіаміну та його метаболітів у регуляції ферментів протеолітичної системи (пепсину, трипсину та катепсину L). Встановлено, що метаболіт тіаміну – тіохром здатен підвищувати активність пепсину, трипсину. Тіамін і тіохром підвищують активність частково очищеного препарату катепсину L, що, можливо, пов'язано з тіолдисульфідною взаємодією між молекулами тіаміну та активним центром досліджуваного ферменту.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: тіамін, тіохром, тіамінпірофосфат, протеолітичні ферменти, некоферментні функції.

ВСТУП. Тіамін є одним з найбільш досліджених вітамінів. Встановлено його коферментну форму. Відомі ферменти, в яких він є коферментом. Добре досліджено його анаболізм до ТМФ, ТПФ, ТТФ [2, 16, 19, 24]. Значно менше досліджень, присвячених катаболізму тіаміну в організмі [8, 11]. Така ситуація пов'язана з тим, що значна кількість дослідників вважає єдиною біологічно активною формою цього вітаміну його кофермент – тіамінпірофосфат.

Проте в літературі накопичилась певна кількість досліджень, які свідчать про те, що деякі катаболіти тіаміну виконують свої специфічні функції в організмі, які ніяким чином не пов'язані з коферментною дією [10–12].

У ході попередніх наших досліджень встановлено, що один з кінцевих катаболітів тіаміну – тіохром виконує специфічні регуляторні функції [9, 11, 12]. Тому метою даної роботи було з'ясувати роль тіаміну та його метаболітів у регуляції ферментів протеолітичної системи.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Експерименти проводили на 50 білих щурах лінії Вістар. Використовували дорослих, статевозрілих тварин (3–4 місяці) масою 180–200 г. За добу до експерименту припиняли їх годувати, але продовжували поїти водою [6]. Усі маніпуляції зі щурами проводили згідно з Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, які використовуються для дослідних та інших наукових цілей. Тварин виводили з експерименту електричним струмом.

У дослідженні використовували тканину нирок.

© С.А. Петров, О.В. Устянська, 2011.

Очищені ферменти отримано за допомогою стандартної методики [5, 13], яка була модифікована в нашій лабораторії [7].

З тканини нирок щурів методами екстракції, діалізу, фракціонування $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, хроматографії на сефадексі G–50 отримано препарати частково очищеного катепсину L.

Для дослідження регуляції тіаміном та його похідними активності частково очищеного катепсину L було взято 1 М розчин тіаміну та еквімолярні розчини бенфотіаміну, тіохрому і тіамінпірофосфату. Визначення активності катепсину L проводили за методом Чорної [18] в модифікації Вовчук, Чернадчук [3]. Основа методу полягає у визначенні кількості продуктів гідролізу білкового субстрату – азоказеїну, які не осідають при додаванні 10 % трихлороцтової кислоти. Оптичну щільність визначали при довжині хвилі 366 нм на спектрофотометрі СФ–26.

Питому активність виражали в мкМ тирозину на 1 мг білка.

Визначення активності пепсину та трипсину проводили за методом Anson [20], який оснований на зниженні екстинції розчину гемоглобіну після його руйнування відповідним ензимом.

Білок визначали за методом Lowry [22].

Для розрахунку отриманих результатів застосовували методи статистичного аналізу з використанням параметричних критеріїв оцінки розбіжності між вибірками [14].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Для з'ясування можливих механізмів участі метаболітів тіаміну в регуляції активності протеолітичних ферментів було досліджено вплив тіаміну і

його метаболітів на активність очищених препаратів пепсину і трипсину. Ці дані наведено в таблиці.

Як видно з наведених даних, тіамін у концентраціях від 5,6 до 100,8 мг% не змінював активність пепсину і трипсину, додавання ТПФ у концентраціях від 33,6 до 100,8 мг% знижувало активність обох досліджених ферментів. Тіохром підвищував активність пепсину в концентраціях від 11,2 до 33,6 мг%, можливо, за рахунок приєднання гідрофобних ділянок

молекули пепсину. На активність трипсину цей метаболіт тіаміну не впливав.

Аналізуючи дані, одержані з попередніх робіт у нашій лабораторії, в сукупності з результатами експериментів *in vivo* [8, 11], можна вважати, що тіохром підвищує протеолітичну активність у шлунку за рахунок активації пепсину. Підвищення протеолітичної активності в цьому органі при надходженні тіаміну і ТПФ, очевидно, пов'язане з перетворенням даних сполук на тіохром.

Таблиця – Вплив тіаміну та його метаболітів на активність пепсину і трипсину (мг пептидів/г білка; год)

Протеїнази	Концентрація метаболітів тіаміну, мг%	Тіамін	ТПФ	Тіохром	Контроль
Пепсин	5,6	2,00±0,21	2,17±0,05	2,44±0,24	2,21±0,12
	11,2	2,21±0,11	2,31±0,07	2,92±0,14	
	16,8	2,16±0,19	2,13±0,08	2,98±0,18	
	33,6	2,12±0,08	1,70±0,10	2,92±0,18	
	67,2	2,10±0,12	1,42±0,06		
	100,8	2,02±0,14	1,50±0,10		
Трипсин	5,6	1,84±0,04	1,77±0,05	2,12±0,09	1,89±0,08
	11,2	1,89±0,03	1,86±0,04	2,03±0,18	
	16,8	1,76±0,03	1,99±0,08	2,18±0,12	
	33,6	1,59±0,10	1,32±0,06		
	67,2	1,70±0,15	1,42±0,07		
	100,8	1,71±0,16	1,22±0,07		

У наших дослідженнях метаболізму тіаміну в організмі білих щурів було показано, що тіамін в цей період значною мірою залишається у вільному стані, але 30 % його окиснюється в тіохром [11].

Отримавши дані про різноспрямовану дію метаболітів тіаміну на протеїназну активність пепсину і трипсину, ми зацікавилися можливістю регуляції цим вітаміном інших протеолітичних ферментів. Таким ферментом було вибрано катепсин L.

Вибір цього катепсину пов'язаний з тим, що в системі катепсинів він є одним з найактивніших ферментів, що роблять вирішальний внесок в ініціацію протеолізу [1, 4, 15, 18, 21, 23]. Також даний катепсин є тіоловою протеїназою, активність якої залежить від наявності сульфгідрильних груп. Катепсин L цілком може реагувати з тіаміном та його похідними, оскільки відомо, що один із способів протеалізації тіаміну полягає в розкритті його тіазолового кільця з утворенням тіамінтіолу і надалі змішаних тіаміндисульфідів [17].

Було досліджено регуляцію тіаміном та його похідними активності даного катепсину. Для дослідження ми взяли еквімолярні роз-

чини тіаміну, бенфотіаміну, тіохрому і тіамінпірофосфату.

Як видно з даних, наведених на рисунку 1, тіамін і тіохром проявляли активуючу дію на катепсин L; ТПФ не мав достовірно значущого активуючого ефекту, що пов'язано з особливостями структури цих речовин і, можливо, з тіолдисульфідною взаємодією між молекулами тіаміну та активним центром катепсину L.

Таким чином, проведені дослідження свідчать про те, що до некоферментних функцій тіаміну слід додати ще одну – некоферментну активацію протеолітичних ферментів, зокрема пепсину, трипсину та катепсину L.

ВИСНОВКИ. 1. Катаболіт тіаміну – тіохром підвищує активність протеолітичних ферментів (пепсину та трипсину), можливо, за рахунок приєднання гідрофобних ділянок молекул цих ферментів.

2. Тіамін і тіохром підвищують активність частково очищеного катепсину L, що, можливо, пов'язано з тіолдисульфідною взаємодією між молекулами тіаміну та активним центром досліджуваного ферменту.

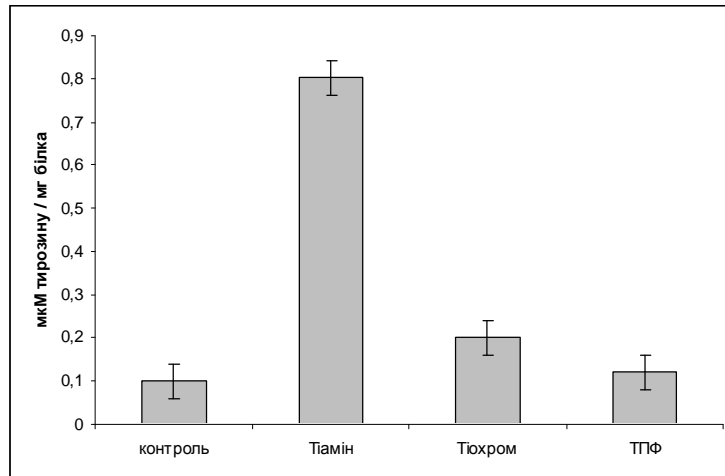


Рис. 1. Вплив тіаміну та його похідних на активність частково очищеного препарату катепсину L (мкМ тирозину/мг білка за хвилину), n=50.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Веремеєнко К. Н. Активність цистеїнових протеїназ і їх інгібіторів в ракових опухлях гортани / К. Н. Веремеєнко, А. І. Кизим, Т. В. Семешкієва // Укр. біохім. журн. – 2005. – **77**, № 2. – С. 159–161.
- Взаємодія тіамінкінази мозку щурів із тіаміном і його похідними / С. Ю. Пилипчук, Ю. М. Пархоменко, З. С. Протасова [та ін.] // Укр. біохім. журн. – 2001. – **73**, № 2. – С. 51–56.
- Вовчук І. Л. Активність тканинних катепсин-L-подібних протеїназ у жінок онкопатології тіла матки / І. Л. Вовчук, С. С. Чернадчук // Укр. біохім. журн. – 2004. – № 2. – С. 56–60.
- Жанаєва С. Я. Прогностическая значимость цистеїнових протеаз лизосом в определении эффективности противоопухолевої терапії / С. Я. Жанаєва, А. І. Дьяков, Т. А. Алексеєнко // Биомедицинская химия. – 2009. – **55**. – С. 89–97.
- Жлоба А. А. Очищення, ідентифікація і властивості цистеїнових катепсинів тканин тварин // Укр. біохім. журн. – 1986. – **58**, № 4. – С. 100–111.
- Западнюк І. П. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте / І. П. Западнюк, В. І. Западнюк, Е. А. Захария – К. : Вища школа, 1974. – 304 с.
- Пат. № 46633 Україна, МПК (2009), С12N 9/50, С12N 9/64. Спосіб визначення активності матричної металопротеїнази-2 / Вовчук І. Л. ; заявник та патентодержатель Вовчук І. Л. – № u 2009 08087 ; заявл. 31.07.09 ; опубл. 25.12.09, Бюл. № 24.
- Петров С. А. Вивчення метаболізму тіаміну в органах і тканинах мишей in vivo та in vitro / С. А. Петров // Фізіол. журн. – 1992. – **38**, № 1. – С. 69–80.
- Петров С. А. Ингибирование алкогольдегидрогеназы тиохромом / С. А. Петров // Укр. біохім. журн. – 1992. – **64**, № 6. – С. 91–94.
- Петров С. А. Некоферментные эффекты тиаміна і його метаболітів // Біомедицина хімія. – 2006. – **52**. – С. 335–345.
- Петров С. А. Регуляція тиаміном і його метаболітами процесів формування і обміну амінокислот в організмі : автореф. дисс. на соискание учен. степени д-ра биол. наук : спец. 03.00.04 "Биохимия" / Петров Сергей Анатольевич ; Институт радиобиологии Академии наук Беларуси. – Минск, 1992. – 32, [1] с., включая обл. : с. 12.
- Петров С. А. Роль катаболітів тіаміну в регуляції обміну аміно- і кетокислот / С. А. Петров // IX Український біохімічний з'їзд : тези доп. – Х., 2006. – С. 163.
- Практическое руководство по энзимологии / под ред. Г. А. Кочетова. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : Высш. школа, 1980. – 272 с.
- Рокицький П. Ф. Біохімічна статистика / П. Ф. Рокицький. – Мінськ : Вища школа, 1973. – 320 с.
- Руденська Г. Н. Цистеїнові протеїнази мікроорганізмів і вірусів / Г. Н. Руденська, Д. В. Пупов // Біохімія. – 2008. – **73**. – С. 3–17.
- Сидорова А. А. Характеристика тиаминтрифосфатазы плазматической мембраны нервных клеток / А. А. Сидорова, С. П. Степаненко, Ю. М. Пархоменко // Укр. біохім. журн. – 2009. – **81**, № 3. – С. 57–61.
- Степура А. І. Роль тійольної форми тиаміна в обміні оксида азота / А. І. Степура, Т. П. Пилецкая, І. І. Степура // Биохимия. – 2005. – **70**. – С. 416–429.

18. Чёрная В. И. Катепсина L из опухоли мозга человека. Очистка и содержание / В. И. Чёрная // Укр. біохім. журн. – 1998. – **70** (5). – С. 97–103.
19. Янчий О. Р. Внутриклеточная локализация тиаминсвязывающих белков печени и почек крыс / О. Р. Янчий, Ю. М. Пархоменко, Г. В. Донченко // Укр. біохім. журн. – 2003. – **75**, № 6. – С. 111–114.
20. Anson M. L. The estimation of pepsin with hemoglobin / M. L. Anson, A. E. Misky // L. Gen. Physiol. – 1932. – **16**, № 1. – P. 59–67.
21. Buhling F. Lysosomal cysteine proteases in the lung: role in protein processing and immunoregulation / F. Buhling, N. Waldburg // Eur. Respir. J. – 2004. – **23**, № 4. – P. 620–628.
22. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. I. Rosenbrough, A. Z. Fan [et al.] // J. Biol. Chem. – 1951. – **193**. – P. 265–275.
23. Stoka V. Lysosomal cysteine proteases: structural features and their role in apoptosis / V. Stoka, B. Turk, V. Turk // IUBMB Life. – 2005. – **57**, № 4–5. – P. 347–353.
24. Thiamine triphosphate and thiamine triphosphatase activities: from bacteria to mammals / I. E. Gulyai, A. F. Makarchikov, B. Lakaye [et al.] // Cell. Mol. Life Sci. – 2003. – **60**. – P. 1477–1480.

С.А. Петров, О.В. Устьянская
ОДЕССКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.И. МЕЧНИКОВА

РЕГУЛЯЦИЯ ТИАМИНОМ И ЕГО МЕТАБОЛИТАМИ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

Резюме

Исследовано роль тиамин и его метаболитов в регуляции ферментов протеолитической системы (пепсина, трипсина и катепсина L). Установлено, что метаболит тиамин – тиохром способен повышать активность пепсина, трипсина. Тиамин и тиохром повышают активность частично очищенного препарата катепсина L, что, возможно, связано с тиолдисульфидным взаимодействием между молекулами тиамин и активным центром исследуемого фермента.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: тиамин, тиохром, тиаминпирофосфат, протеолитические ферменты, некоферментные функции.

S.A. Petrov, O.V. Ustianska
I.I. MECHNYKOV ODESSA NATIONAL UNIVERSITY

REGULATION BY THIAMINE AND ITS METABOLITES ACTIVITIES OF SOME PROTEOLYTIC ENZYMES

Summary

In the article the role of thiamine and its metabolites in adjusting of enzymes of the proteolytic system (pepsin, trypsin and cathepsin L) has been investigated. It has been determined that metabolite of thiamine – a thiochrome is capable to raise the activity of proteolytic enzymes of pepsin and trypsin. The thiamine and its catabolite thiochrome promotes activity of the partly cleared cathepsin L, that possibly is related to thioldisulfide interactions between the molecules of thiamine and active center of the investigated enzyme.

Отримано 24.12.10

Адреса для листування: С.А. Петров, Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, пров. Шампанський, 2, Одеса, 65058, Україна.