

РЕГУЛЯЦІЯ ВІТАМІНОМ В₁ ТА ЙОГО ТІОЛЬНОЮ ФОРМОЮ АКТИВНОСТІ КАТЕПСИН-L-ПОДІБНИХ ФЕРМЕНТІВ В ОРГАНАХ БІЛИХ ЩУРІВ

О. Устянська, О. Шварцова, С. Петрова, С. Петров

*Одеський національний університет імені І.І. Мечникова
пер. Шампанський, 2, Одеса 65058, Україна
e-mail: ustjansky_olga@ukr.net*

У роботі обговорюються можливі механізми інгібування тіаміном і тіамінтіолом активності катепсин-L-подібних ферментів. Досліджено вплив тіаміну та його тіольної форми на активність даних ферментів у тканинах білих щурів. Показано, що обидві ці сполуки характеризуються інгібуючою дією на активність катепсин-L-подібних ферментів у печінці та в нирках.

Ключові слова: тіамін, тіамінтіол, катепсин-L-подібні ферменти, сульфгідрильні групи.

За останні роки в літературі накопичилася велика кількість даних, яка свідчить про важливу роль протеолітичних ферментів у діагностиці, патогенезі та лікуванні різноманітних хвороб [2, 4, 6, 7, 26]. Протеолітичні ферменти не лише беруть участь у неспецифічному розпаді білкових молекул, а й мають регуляторне значення, будучи одним із механізмів біологічного контролю функцій органів і тканин організму [5, 8, 9, 15].

Оскільки протеолітичний потенціал клітин значною мірою визначається лізосомним апаратом, дослідження цистеїнових лізосомальних ферментів, зокрема катепсин-L-подібних протеїназ, викликає особливе зацікавлення [4, 17, 22, 24, 28].

Цистеїновими є ті пептидгідролази, у яких нуклеофілом активного центру є сульфгідрильна група залишку цистеїну. Вперше цистеїнові протеїнази були виявлені та досліджені у тропічних рослин. У даний час вони знайдені у представників усіх царств живих організмів [15, 17], але найширше ці ферменти вивчаються в організмі людини [1, 2, 4, 21].

У попередніх наших роботах було показано вплив тіаміну на активність катепсин-L-подібних ферментів *in vivo* [20]. Встановлено, що при таких умовах тіамін діє неоднозначно, оскільки його вплив як на активність ферментів, так і на всі інші метаболічні процеси в живих організмах відбувається на молекулярно-генетичному рівні та шляхом нейрогуморальної регуляції на клітинному рівні.

Деякі дослідження доводять можливість існування коферментної та некоферментної дії метаболітів тіаміну на активність ферментів [10, 11, 14, 18, 23], зокрема, сірковмісних [12, 13]. Проте дія тіаміну на катепсини мало вивчена.

Характерною особливістю тіаміну є його перетворення в тіамінтіол із відкритим тіазоловим циклом. Унаслідок перебігу реакцій обміну між тіольною формою тіаміну та S-цистеїновими білковими залишками можуть утворюватися змішані тіамін-білкові дисульфіди. Змішані дисульфіди тіаміну (в тому числі й дисульфіди ефірів тіаміну), а також дисульфідна форма тіаміну, достатньо легко відновлюються низькомолекулярними тіолами з утворенням циклічної форми тіаміну із закритим тіазоловим циклом. Крім того, відомо, що у тіаміні піримідиновий і тіазоловий компоненти з'єднуються один з одним метиленовим містком [19].

Метою нашої роботи було вивчити можливу взаємодію тіаміну зі сульфгідрильними групами активного центру катепсину L шляхом тіодисульфідного механізму, що є проявом некоферментної функції тіаміну. Для перевірки цього припущення були виконані експерименти з розчинами тіаміну та тіамінтіолу *in vitro*.

Дослідження проводили на статевозрілих щурах-самцях лінії Wistar, масою 180–200 г. Усі тварини містилися у стандартних умовах віварію Одеського національного університету імені І.І. Мечникова.

Матеріалом дослідження були гомогенати печінки, нирок і тонкого кишківника. Тканини гомогенізували в 0,9% розчину NaCl у співвідношенні 1:10 протягом 4–5 хв. Отриманий гомогенат тканин центрифугували при 8 000 g (+ 4°C) протягом 30 хв.

У експерименті *in vitro* активність катепсин-L-подібних ферментів визначали в супернатанті після додавання розчинів тіаміну і тіамінтіолу в таких концентраціях: 0,33; 0,66; 1,32; 2,64 мкг/мл.

Визначення активності катепсин-L-подібних протеїназ проводили за методом Чорної [21] в модифікації Вовчук, Чернадчук [2]. Основа методу полягає у визначенні кількості продуктів гідролізу білкового субстрату – азоказеїну, що не осідають при додаванні 10% трихлороцтової кислоти. Оптичну щільність визначали при довжині хвилі 366 нм на спектрофотометрі СФ–26.

Питому активність виражали в мкмоль/хв на мг білка.

Білок визначали за методом Lowry [25].

Для розрахунку отриманих результатів застосовували методи статистичного аналізу з використанням параметричних критеріїв оцінки розбіжності між вибірками. Достовірно різними вважалися результати при $P < 0,05$ [16].

Результати проведених нами досліджень наведені в таблиці.

Активність катепсин-L-подібних ферментів під впливом тіаміну і тіамінтіолу в тканинах білих щурів, мкмоль/мг білка ($M \pm m$; $n=10$)

Орган	Контроль	Концентрація тіаміну, мкМ/мл				Концентрація тіамінтіолу, мкМ/мл			
		0,33	0,66	1,32	2,64	0,33	0,66	1,32	2,64
Печінка	0,770±0,080	0,560±	0,697±	0,630±	0,351±	0,682±	0,670±	0,533±	0,540±
		0,085*	0,012	0,053*	0,047*	0,134	0,114	0,010*	0,090*
Нирки	2,285±0,315	0,670±	0,711±	0,863±	0,567±	0,659±	0,748±	0,540±	0,535±
		0,160*	0,083*	0,054*	0,038*	0,090*	0,161*	0,090*	0,030*
Тонкий кишківник	1,963±0,220	1,860±	2,013±	2,800±	2,474±	1,625±	2,148±	2,185±	2,460±
		0,498	0,115	0,315	0,570	0,441	0,512	0,550	0,388

Примітка. * – достовірна різниця порівняно з контролем, $P < 0,05$.

Як видно з таблиці, найвища активність катепсин-L-подібних ферментів у контролі була виявлена в нирках. Вона становила 2,285 мкмоль/мг білка. Деяко меншою вона була в тонкому кишківнику – 1,963 мкмоль/мг білка. Мінімальну активність катепсин-L-подібних ферментів було встановлено в печінці – 0,770 мкмоль/мг білка.

Після внесення тіаміну і тіамінтіолу до надосадової рідини *in vitro* в різних концентраціях ми спостерігали зниження активності досліджуваних ферментів порівняно з показниками контрольної групи у тканинах печінки. Найсильніший ефект інгібування тіаміном і тіамінтіолом було виявлено в нирках. У цьому органі внесення кожного з двох форм вітаміну В₁ призводило до зниження активності катепсин-L-подібних ферментів у 3–4 рази. Причому максимальні концентрації як тіаміну, так і тіамінтіолу викликали максимальний інгібувальний ефект. У печінці ми спостерігали менш виражене, проте

достовірне інгібування активності катепсин-L-подібних ферментів у присутності тіаміну і тіамінтіолу. Максимальний інгібувальний ефект спостерігався при використанні максимальних концентрацій тіаміну і при додаванні тіамінтіолу з концентрацією 1,32 мкМ/мл.

У тонкому кишківнику достовірних змін активності даних ферментів у присутності як тіаміну, так і тіамінтіолу виявлено не було.

Що стосується зміни активності катепсин-L-подібних ферментів під дією різноманітних концентрацій тіаміну і тіамінтіолу, були отримані такі дані. Після внесення максимальної концентрації вітаміну В₁ (2,64 мкг/мл) активність ферменту була мінімальною в печінці і нирках – 0,351 і 0,567 мкмоль/мг білка відповідно. Максимальну активність досліджуваних ферментів ми спостерігали у тканинах нирок і тонкого кишківника при концентрації тіаміну 1,32 мкМ/мл – 0,863 та 2,800 мкмоль/мг білка відповідно; і в тканинах печінки при 0,66 мкМ/мл тіаміну. Активність ферменту при даній концентрації була 0,697 мкмоль/мг білка.

Вітамін В₁ і його тіольна форма істотно не відрізняються за інтенсивністю інгібувального ефекту, за винятком нирок: активність досліджуваного ферменту при додаванні тіамінтіолу в концентрації 1,32 мкМ/мл менша в 1,5 разу порівняно з тіаміном за таких самих умов. Такі зміни активності катепсин-L-подібних ферментів, можливо, пояснюються особливостями біохімічних процесів у досліджуваних органах.

При вивченні впливу тіаміну і тіамінтіолу на активність даних ферментів було встановлено, що обидві ці сполуки здатні інгібувати активність катепсин-L-подібних ферментів у печінці та нирках.

Можливо, інгібувальний ефект тіаміну та його тіольної форми обумовлений здатністю цих сполук взаємодіяти шляхом тіолдисульфідного механізму із залишками цистеїну в активному центрі ферментів.

Тіамін і його тіольна форма інгібують активність катепсин-L-подібних ферментів у печінці та в нирках білих щурів й істотно не відрізняються за інтенсивністю інгібувального ефекту. Інгібування тіаміном та його тіольною формою катепсин-L-подібних ферментів може бути пов'язане зі взаємодією цих сполук із залишками цистеїну в активному центрі ферменту.

1. *Веремеенко К. Н., Кизим А. И., Семешкиева Т. В.* Активность цистеиновых протеиназ и их ингибиторов в раковых опухолях гортани // Укр. біохім. журн. 2005. Т. 77. № 2. С. 159–161.
2. *Вовчук И. Л., Чернадчук С. С.* Активность тканевых катепсин-L-подобных протеиназ у женщин с онкопатологией тела матки // Укр. біохім. журн. 2004. № 2. С. 56–60.
3. *Дилакян Е., Гуреева Т., Звездилина С.* и др. Особенности взаимодействия катепсина L с ингибиторами цистеиновых протеиназ из культур трансформированных фибробластов и ингибиторами из актиномицет // Вопр. мед. хим. 2000. Т. 46. С. 508–509.
4. *Жанаева С. Я., Дьяков А. И., Алексеенко Т. А.* Прогностическая значимость цистеиновых протеаз лизосом в определении эффективности противоопухолевой терапии // Биомедицинская химия. 2009. Т. 55. С. 89–97.
5. *Жлоба А. А., Дунаевский В. А.* Активность секретируемых форм цистеиновых катепсинов в крови в качестве маркера процессов тканевого роста // Вопросы онкологии. 1996. Т. 42. № 1. С. 70–76.
6. *Жлоба А. А.* Очищення, ідентифікація і властивості цистеїнових катепсинів тканин

- тварин // Укр. біохім. журн. 1986. Т. 58. № 4. С. 100–111.
7. Мавлянов И. Р., Мухитдинов Б. Б., Ахмадалиев Н. Н. Состояние лизосомальных ферментов печени и почек при неспецифическом гнойном поражении почек // Экспериментальні дослідження. 2002. С. 97–99.
 8. Мод Ш. Х., Билквис Б. Очистка и изучение свойств ингибитора тиоловых протеиназ из легкой козы *Capra hircus* // Биохимия. 2009. Т. 74. С. 963–971.
 9. Мосолов В. В. Новое о природных ингибиторах протеолитических ферментов // Биоорганическая химия Т. 24. 1998. С. 332–340.
 10. Пархоменко Ю., Донченко Г., Пилипчук С. и др. Характерные метаболические нарушения в тканях крыс, вызванные длительным приёмом алкоголя // Укр. біохім. журн. 2007. Т. 79. № 3. С. 61–69.
 11. Пархоменко Ю. М., Пилипчук С. Ю., Сидорова А. А. и др. Нарушение метаболизма тиаминина в мозгу крыс при экспериментальном алкоголизме и возможность их коррекции витамином Е // Укр. біохім. журн. 2008. Т. 80. № 4. С. 96–101.
 12. Петров С. А. Некоферментные эффекты тиаминина и его метаболитов // Біомедицина хімія. 2006. Т. 52. С. 335–345.
 13. Петров С. А. Роль катаболитів тиаминина в регуляції обміну аміно- і кетокислот // IX Укр. біохім. з'їзд. Харків, 2006. С. 163.
 14. Пилипчук С., Пархоменко Ю., Протасова З. та ін. Взаємодія тиаминкінази мозку шурів із тиамином і його похідними // Укр. біохім. журн. 2001. Т. 73. № 2. С. 51–56.
 15. Потеряева О., Короленко Т., Свечникова И. и др. Цистеиновые протеиназы и их ингибиторы при развитии мышинной НА-1 гепатомы и противоопухолевой терапии // Биомедицинская химия. 2004. Т. 50. № 2. С. 172–179.
 16. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. Минск: Высшая шк., 1973. 230 с.
 17. Руденська Г. Н., Пунов Д. В. Цистеїнові протеїнази мікроорганізмів і вірусів // Біохімія. 2008. Т. 73. С. 3–17.
 18. Сидорова А. А., Степаненко С. П., Пархоменко Ю. М. Характеристика тиаминтрифосфатазы плазматической мембраны нервных клеток // Укр. біохім. журн. 2009. Т. 81. № 3. С. 57–61.
 19. Степура А. И., Пилецкая Т. П., Степура И. И. Роль тиольной формы тиаминина в обмене оксида азота // Биохимия. Т. 70. 2005. С. 416–429.
 20. Устянська О., Нікітінський Д., Петров С. Вплив ін'єкцій тиаминина на активність катепсин-Л- та катепсин-В-подібних ферментів у тканинах білих шурів // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2009. Вип. 49. С. 38–42.
 21. Черная В. И., Рева А. Д. Активність катепсину Н в мозку і пухлинах мозку людини // Укр. біохім. журн. 1989. Т. 61. № 5. С. 47–50.
 22. Черная В. И. Влияние однократного и хронического рентгеновского облучения низкой интенсивности на активность катепсина L мозга крыс // Укр. біохім. журн. 2001. Т. 73. № 2. С. 97–101.
 23. Янций О. Р., Пархоменко Ю. М., Донченко Г. В. Внутриклеточная локализация тиаминсвязывающих белков печени и почек крыс // Укр. біохім. журн. 2003. Т. 75. № 6. С. 111–114.
 24. Buhling F., Waldburg N. Lysosomal cysteine proteases in the lung: role in protein processing and immunoregulation // Eur. Respir. J. 2004. Vol. 23. N 4. P.620–628.
 25. Lowry O. H., Rosenbrough N. I., Fan A. Z., Randol R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193. P. 265–275.

26. Moczon T. A. Cysteine proteinase in the penetration glands of the cercariae of *Tylodelphys excavate* (Trematoda, Diplostomidae) // *Parasitol. Research*. 2006. P. 23–34.
27. Stoka V., Turk B., Turk V. Lysosomal cysteine proteases: structural features and their role in apoptosis // *IUBMB Life*. 2005. Vol. 57. N 4–5. P. 347–353.

Стаття: надійшла до редакції 06.05.10

прийнята до друку 18.10.10

REGULATION BY VITAMIN B₁ AND ITS THIOL FORM OF ACTIVITY OF CATHEPSIN-L-LIKE-ENZYMES IN WHITE RATS' ORGANS

O. Ustjansky, O. Shvarcova, S. Petrova, S. Petrov

*Mechnikov National University of Odessa
Shampansky Lane, 2, Odessa 65058, Ukraine
e-mail: ustjansky_olga@ukr.net*

Probable thiamine and thiamine-thiol inhibition mechanisms of cathepsin-L-like-enzymes' activity are discussed in this article. Thiamine and thiamine-thiol influence on cathepsin-L-like-enzymes' activity in white rats' tissues has been studied. It has been found out that both of this compounds influence cathepsin-L-like-enzymes' activity in liver and in kidneys.

Key words: thiamine, thiamine-thiol, cathepsin-L-like-enzymes, sulfhydryl groups.

РЕГУЛЯЦИЯ ВИТАМИНОМ В₁ И ЕГО ТИОЛЬНОЙ ФОРМОЙ АКТИВНОСТИ КАТЕПСИН-L-ПОДОБНЫХ ФЕРМЕНТОВ В ОРГАНАХ БЕЛЫХ КРЫС

О. Устянская, О. Шварцова, С. Петрова, С. Петров

*Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова
пер. Шампанский, 2, Одесса 65058, Украина
e-mail: ustjansky_olga@ukr.net*

В работе обсуждаются возможные механизмы ингибирования тиамин и тиаминтиолом активности катепсин-L-подобных ферментов. Исследовано влияние тиамин и его тиольной формы на активность данных ферментов в тканях белых крыс. Показано, что оба эти соединения характеризуются ингибирующим действием на активность катепсин-L-подобных ферментов в печени и в почках.

Ключевые слова: тиамин, тиаминтиол, катепсин-L-подобные ферменты, сульфгидрильные группы.