

УДК 577.15:591.466(043.5)

## ВПЛИВ ІН'ЄКЦІЙ ТІАМІНУ НА АКТИВНІСТЬ КАТЕПСИН-L-ТА КАТЕПСИН-B-ПОДІБНИХ ФЕРМЕНТІВ У ТКАНИНАХ БЛИХ ЩУРІВ

О. Устянська, Д. Нікітінський, С. Петров

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова  
пров. Шампанський, 2, Одеса 65058, Україна  
e-mail: ustjansky\_olga@ukr.net

Досліджено активність катепсин-L- і катепсин-B-подібних ферментів під дією внутрішньом'язової ін'єкції тіаміну. Введення тіаміну зменшує активність катепсин-L-подібних ферментів у тканинах печінки та тонкого кишечника через одну годину. Встановлено, що тіамін, введений *in vivo*, діє неоднозначно на катепсин-B-подібні протеїнази. Обговорюється можлива некоферментна дія тіаміну на активність катепсин-L- та катепсин-B-подібних ферментів.

*Ключові слова:* тіамін, катепсин-L-подібні ферменти, катепсин-B-подібні ферменти, некоферментна дія.

Зацікавлення вивченням катепсинів обґрунтовано тим, що вони проявляють високу біологічну активність. Зокрема, цистеїнові катепсини відіграють істотну роль у таких важливих процесах життєдіяльності організму, як процеси росту, диференціація клітин та ін. Вони здійснюють частковий протеоліз деяких ферментів, регулюючи таким чином їхню активність [4, 8].

Активність катепсинів регулюється багатьма чинниками, одним із яких є вітаміни. Літературні дані свідчать про можливість існування некоферментної дії метаболітів тіаміну на сірковмісні ферменти [6, 7]. Але ці дані є результатом лише поодиноких досліджень. Було встановлено, що деякі продукти катаболізму тіаміну, які утворюються в організмі, проявляють власні ефекти, не пов'язані з коферментними функціями. Деякі дослідники вказують на те, що сам тіамін і особливо продукти його окислення та розпаду в організмі здатні діяти на активність багатьох ферментів [6, 7].

Якщо в експериментах з очищеними ферментами можна впевнено говорити про існування чи відсутності некоферментної регуляції тіаміном і його метаболітами того чи іншого ферменту, то в досліджах *in vivo* в більшості випадків така констатація неможлива.

У багатьох дослідках було відмічено зниження ферментативної активності під впливом тіаміну, що не може бути результатом коферментної дії цього вітаміну.

Особливе місце серед некоферментних функцій тіаміну займає проблема регуляції обміну сірковмісних сполук.

Катепсини L і B, які є тіоловими протеїназами, здатні взаємодіяти в організмі з деякими сірковмісними сполуками. Проте ця здатність практично не вивчена.

Метою нашої роботи було вивчити вплив тіаміну на активність цистеїнових протеїназ, зокрема катепсин-L- та катепсин-B-подібних ферментів, у деяких органах щурів.

Досліди проводили на щурах лінії Wistar, загальною кількістю 50 тварин масою 180–200 г. Тварин тримали у стандартних умовах віварію Одеського національного університету ім. Мечникова. За добу до дослідів припиняли харчування, але давали пити воду.

Введення тіаміну проводили шляхом внутрішньом'язової ін'єкції. Контрольній групі щурів вводили по 0,2 мл фізіологічного розчину, а дослідній групі – 0,2 мл тіаміну у концентрації 10 мг в 1 мл (що відповідає 2 мг тіаміну на грам маси).

Для дослідження використовували гомогенати печінки, нирок і тонкого кишечника.

Тканини гомогенізували в 0,9% розчині NaCl у співвідношенні 1:10 протягом 4–5 хв.

Отриманий гомогенат тканин центрифугували за 8.000 g (+4°C) протягом 30 хв.

Визначення активності катепсин-L-подібних протеїназ проводили за методом Чорної [12] у модифікації І. Л. Вовчук, С. С. Чернадчук [1]. Метод базується на визначенні кількості продуктів гідролізу білкового субстрату – азоказеїну. Оптичну щільність визначали при довжині хвилі 366 нм, на спектрофотометрі СФ–26.

Активність катепсин-B-подібних ферментів визначали за кількістю продуктів гідролізу синтетичного субстрату N-бензоїларгінін-p-нітроаніліду при рН 6,0 за методом Erlanger [13], у модифікації С. С. Чернадчук, І. Л. Вовчук [11]. Оптичну щільність визначали при довжині хвилі 383,5 нм.

Питому активність виражали в мкмоль на мг білка.

Білок визначали за методом Lowry [15].

Для обчислення отриманих результатів застосовували методи статистичного аналізу з використанням параметричних критеріїв оцінки розбіжності між вибірками. Достовірно різними вважалися результати при  $P < 0,05$  [9].

За літературними даними, в різних органах тварин катепсини L і B представлені нерівномірно. Найбільшою активністю даних ферментів характеризуються тканини нирок і печінки. Слід зазначити, що активність катепсинів може коливатися залежно від стану клітин. Так, активність катепсину L у печінці щурів після 24-годинного голодування тварин знижується в 6 разів, а активність катепсину B – зростає у 100 разів [4, 5].

За результатами наших дослідів активності катепсин-L-подібних ферментів у гомогенатах тканин білих щурів (печінки, нирок, тонкого кишечника), у контрольній групі тварин, яким вводили фізіологічний розчин, були отримані такі дані (табл. 1). Найбільшу активність катепсин-L-подібних ферментів виявлено в тканинах тонкого кишечника (1,339 мкмоль/мг білка), мінімальну – в тканинах печінки (0,457 мкмоль/мг білка). У тканинах нирок активність ферменту порівняно з тонким кишечником незначно менша і становить 1,077 мкмоль/мг білка.

Наступний етап наших дослідів був присвячений вивченню динаміки зміни активності катепсин-L-подібних ферментів при введенні тіаміну.

Таблиця 1

Питома активність катепсин-L-подібних ферментів під впливом тіаміну в тканинах білих щурів (мкмоль/мг білка;  $M \pm m$ ;  $n=50$ )

Органи	Контроль	Час після введення тіаміну	
		1 год	6 год
Печінка	0,457±0,098	0,367±0,029	0,860±0,060*
Нирки	1,077±0,364	1,112±0,181	1,201±0,066
Тонкий кишечник	1,339±0,489	0,877±0,065*	1,266±0,112

Примітка. \* – ймовірна різниця щодо контролю  $P < 0,05$ .

Після внутрішньом'язового введення тіаміну спостерігалось зниження активності катепсин-L-подібних ферментів щодо показників контрольної групи через одну годину у тканинах печінки та тонкого кишечника.

У тканинах білих щурів активність катепсин-L-подібних ферментів була різною та змінювалася протягом однієї–шести годин. Після введення тіаміну впродовж першої години в більшості випадків спостерігалася тенденція до зниження активності катепсин-L-подібних ферментів, а в тонкому кишечнику відзначено імовірне зменшення на 40%.

Через 6 год досліджуваний показник приходить до норми, а в печінці становить 140% від норми. Очевидно, це свідчить про існування циклічності біохімічних процесів у організмі тварин.

При визначенні активності катепсин-B-подібних ферментів (табл. 2) у гомогенатах тканин тварин контрольної групи ми встановили максимальне значення досліджуваного показника в тканинах печінки (0,070 мкмоль/мг білка). Мінімальна активність досліджуваних ферментів виявлена у тканинах нирок (0,010 мкмоль/мг білка). У тканинах тонкого кишечника вона становила 0,020 мкмоль/мг білка, що у 2 рази більше порівняно з нирками та у 3,5 рази менше порівняно з печінкою.

Таблиця 2

Питома активність катепсин-B-подібних ферментів у тканинах білих щурів під впливом тіаміну (мкмоль/мг білка;  $M \pm m$ ;  $n=50$ )

Органи	Контроль	Час після введення тіаміну	
		1 год	6 год
Печінка	0,070±0,048	0,072±0,013	0,020±0,001*
Нирки	0,010±0,006	0,040±0,023*	0,030±0,012*
Тонкий кишечник	0,020±0,001	0,022±0,005	0,010±0,005*

**Примітка.\*** – ймовірна різниця що до контролю,  $P < 0,05$ .

Введення тваринам тіаміну приводило до збільшення активності катепсин-B-подібних ферментів у тканинах нирок в 4 рази через 1 год і в 3 рази – через 6 год порівняно з контролем.

Під дією внутрішньом'язової ін'єкції тіаміну в тканинах печінки та тонкого кишечника активність ферментів через 1 год практично не змінювалась. Зменшення активності катепсин-B-подібних ферментів було найбільш виразним через 6 год у тканинах печінки (у 3,5 разу) та у тканинах тонкого кишечника (у 2 рази) порівняно з контролем.

Таким чином, вищевказані зміни активності досліджених протеїназ, можливо, пов'язані з проявами некоферментних функцій тіаміну, які в даному випадку можуть реалізуватися на рівні дисульфідних взаємодій між тіаміном і цистеїновими залишками активного центру фермента.

Підсумовуючи результати проведених досліджень, можна зробити висновок, що під впливом ін'єкцій тіаміну в тканинах нирок виявлена стимуляція активності катепсин-B-подібних ферментів. Введення тіаміну в експерименті *in vivo* знижує активність катепсин-B-подібних протеїназ у тканинах печінки та тонкого кишечника білих щурів через 6 год. Після внутрішньом'язового введення тіаміну активність катепсин-L-подібних ферментів у тканинах печінки та тонкого кишечника знижувалася через одну

годину. Наведені у роботі досліді свідчать про наявність некоферментної дії метаболітів тіаміну на досліджувані ферменти.

1. *Вовчук И. Л., Чернадчук С. С.* Активность тканевых катепсин-L-подобных протеиназ у женщин с онкопатологией тела матки // Укр. биохим. журн. 2004. № 2. С. 56–60.
2. *Дилакян Э. А.* Цистеиновые протеиназы при неопластической трансформации // Вопр. мед. хим. 2000. Т. 46. № 5. С. 490–491.
3. *Дилакян Э. А., Гуреева Т. А., Звездилина С. Л.* и др. Особенности взаимодействия катепсина L с ингибиторами цистеиновых протеиназ из культур трансформированных фибробластов и ингибиторами из актиномицет // Вопр. мед. хим. 2000. Т. 46. № 5. С. 508–509.
4. *Жлоба А. А.* Очистка, идентификация и свойства цистеиновых катепсинов тканей животных // Укр. биохим. журн. 1986. Т. 58. № 4. С. 100–111.
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. *Петров С. А.* Некоферментные эффекты тиамин и его метаболитов // Биомед. химия. 2006. Т. 52. Вып. 4. С. 335–345.
7. *Петров С. А.* Роль катаболитов тиамин в регуляции обмена аминокислот // Материалы IX Укр. биохим. съезда. Харьков, 24–27 октября 2006 г. Харьков. С. 163.
8. *Потеряева О. Н., Короленко Т. А., Свечникова И. Г.* и др. Цистеиновые протеиназы и их ингибиторы при развитии мышинной НА-1 гепатомы и противоопухолевой терапии // Биомед. химия. 2004. Т. 50. № 2. С. 172–179.
9. *Рокицкий П. Ф.* Биохимическая статистика. Минск: Высш. шк., 1973. 230 с.
10. *Руденская Г. Н., Пугов Д. В.* Цистеиновые протеиназы микроорганизмов и вирусов // Бихимия. 2008. Т. 73. Вып. 1. С. 3–17.
11. *Чернадчук С. С., Вовчук И. Л.* Активность катепсина В в опухолевой ткани репродуктивных органов женщин // Ученые записки Таврич. нац. ун-та. Сер. биол. 2003. Т. 16 (55). № 2. С. 202–207.
12. *Черная В. И., Рева А. Д.* Активность катепсина Н в мозге и опухолях мозга человека // Укр. биохим. журн. 1989. Т. 61. № 5. С. 47–50.
13. *Erlanger B. F. et al.* The preparation endopeptidases of two new chromogenic substrates of trypsin // Arch. Biochem. Biophys. 1961. Vol. 95. P. 271–278.
14. *Jose Maria Pfizer, Irmgard Assfalg-Machleidt, Werner Machleidt et al.* Primed-site Probing of Papain-like Cysteine Proteases // International J. of Peptide Research and Therapeutics formerly known as "Letters in Peptide Science". 2006. P. 44–67.
15. *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.

**INFLUENS OF INJECTION OF THIAMINE ON CATHEPSIN-L- AND CATHEPSIN-B-LIKE ENZYMES AKTIVITY IN WHITE RAT'S TISSUES****O. Ustjansky, D. Nikitinsky, S. Petrov**

*Mechnikov National University of Odessa  
2, Shampanskyi Lane, Odessa 65058, Ukraine  
e-mail: ustjansky\_olga@ukr.net*

Activity of cathepsin-L- and cathepsin-B-like proteinases under activity of intra muscular injection of thiamin has been studied. Injection of thiamine reduces the activity of cathepsin-L-like proteinases in tissues of liver and small intestine in an hour. It is established, that thiamine injected *in vivo* act the complex on cathepsin-B-like enzymes in organs of some rats. Probable noncoferment activity of thiamine on cathepsin-L- and cathepsin-B-like proteinases is discussed in white rat's tissues.

*Key words:* thiamine, cathepsin-L-like proteinases, cathepsin-B-like enzymes, noncoferment activity.

**ВЛИЯНИЕ ИНЪЕКЦИЙ ТИАМИНА НА АКТИВНОСТЬ КАТЕПСИН-L- И КАТЕПСИН-B-ПОДОБНЫХ ФЕРМЕНТОВ В ТКАНЯХ БЕЛЫХ КРЫС****О. Устьянская, Д. Никитинский, С. Петров**

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

Исследована активность катепсин-L- и катепсин-B-подобных ферментов под действием внутримышечных инъекций тиамин. Введение тиамин уменьшает активность катепсин-L-подобных ферментов в тканях печени и тонкого кишечника через один час. Установлено, что тиамин, введенный *in vivo*, действует неоднозначно на катепсин-B-подобные протеиназы. Обсуждается возможное некоферментное воздействие тиамин на активность катепсин-L- и катепсин-B-подобных ферментов.

*Ключевые слова:* тиамин, катепсин-L- и катепсин-B-подобные ферменты, некоферментное воздействие.

Стаття надійшла до редколегії 07.10.08

Прийнята до друку 10.12.08