

УДК 577.15:591.466(043.5)

ВИВЧЕННЯ ВЗАЄМОДІЇ ТІАМІНУ ТА ЙОГО МЕТАБОЛІТІВ З ЧАСТКОВО ОЧИЩЕНИМ КАТЕПСИНОМ L

Устянська О.В., Вовчук І.Л., Радіонов Д.Б., Чернадчук С.С., Петров С.А.

*Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, Одеса, Україна
E-mail: ustjansky_olga@ukr.net*

В статті вивчався вплив тіаміну та основних його метаболітів на активність частково очищеного катепсину L. Встановлено, що зв'язування тіаміну та його метаболітів з молекулою частково очищеного катепсину L відбувається за рахунок піримідинової частини молекули, а активація фермента реалізується завдяки циклічній тіазоловій частині тіаміну.

Ключові слова: частково очищений катепсин L, тіамін, 2-метил-4-амінопіримідин, 4-метил-5β-оксиетилтіазол, тіамінтіол, тіохром.

ВСТУП

Цистеїнові протеїнази відіграють важливу роль в клітинному метаболізмі білків і в різних фізіологічних процесах [1]. Ці ферменти не лише беруть участь у неспецифічному розпаді білкових молекул, але мають і регуляторне значення [2].

В теперешній час доведено, що багатопланові фізіологічні і біохімічні ефекти тіаміну не можуть бути пов'язані тільки з його коферментними функціями [3, 4]. Як показують дослідження останніх трьох десятиліть, продукти окиснення і розпаду тіаміну в організмі здатні впливати на активність багатьох протеолітичних ферментів [4, 5]. Відома ініціаторна роль катепсинів в загальній системі протеолізу клітини і активність катепсинів значною мірою лімітує загальний процес протеолізу клітини [1, 2, 6]. Крім того, катепсини є тіловими протеїназами, нуклеофілом активного центру якого є сульфгідрильна група залишку цистеїну [7]. Тіамін та його метаболіти, містять у своєму складі тіазолове кільце, яке в певних умовах в клітинах здатне розкриватися з утворенням тіамінтіолу та його похідних [8].

Серед катепсинів нами був вибраний катепсин L – найбільш регульований і активний в стресових ситуаціях. Однак в сучасній літературі відсутні дослідження стосовно впливу тіаміну та його метаболітів на активність цистеїнових протеїназ, в частності – катепсину L.

Метою нашої роботи було вивчити вплив тіаміну та основних його метаболітів на активність очищеного катепсину L, а також з'ясувати, яким шляхом відбувається зв'язування тіаміну та його похідних з молекулою ферменту.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

У досліджах було використано 50 щурів-самців лінії Вістар із масою тіла 180 – 200 г. Піддослідних тварин утримували в стандартних умовах віварію. Усі маніпуляції з тваринами проводили згідно з Європейською конвенцією про захист тварин, які використовуються для експериментальної наукової мети.

Катепсин L був виділений і очищений з нирок білих щурів за допомогою стандартної процедури виділення і очищення ферменту [2, 9, 10, 11], яка описана в попередніх роботах [12].

Екстракти піддавали електрофоретичному розподілу [13, 14] в кислих умовах (pH = 4,5) в системі вертикально-пластинчатого 7 % поліакриламідного гелю (розміри 140×120×1 мм) за допомогою апарату VE4 (Росія). Перед внесенням до слотів зразки змішували з 5 мкл 0,01 % розчину метилового зеленого, вживаного як лідируючий барвник, що містить 60 % сахарози. Відразу після нанесення проби на стартову поверхню гелю встановлювали електричний струм силою в 5 мА (на 10 хвилин), потім в 30 мА з розрахунку на один блок гелю. Електрофоретичний розподіл проводили в холодильнику протягом 3 – 4 годин. При цьому інактивації ферментів, що розділяються, не спостерігалось. Після досягнення лідируючим барвником фінішного рівня форе́з припиняли, вивільняли блоки гелів, багаторазово відмивали їх від внутрішнього буфера і використовували для визначення білка та активності ферменту.

Ділянки зафарбованного гелю сканували і аналізували за допомогою авторської програми "АнаІС".

Білок визначали за методом Лоурі [15]. Активність катепсину L вимірювали за методом Чорної [16] в модифікації Вовчук [10]. 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 катепсину L виражали в умовних одиницях адсорбції продукта гідролізу 1 % азоказеїну (ум. од.) на 1 мг білка за хвилину.

Вільний тіамін визначали за методом Єлісєєвої [17].

Для розрахунку отриманих результатів застосовували методи статистичного аналізу [18] з використанням параметричних критеріїв оцінки розбіжності між вибірками за допомогою програми Microsoft Office Excel 2003.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

У результаті обстеження трека гелю на вміст білка були виявлені дві смуги з R_f 0,48 і 0,57 (рис. 1).

Оптична щільність першого піку дорівнювала 1,141, другого – 1,310. Площа першого піку на денситограмі склала 49,9 %, площа другого піку – 51,1 %.

Обидві смуги вирізували і елюїрували у фосфатному буфері pH 6,0 протягом 2 годин. В кожному з елюатів визначали активність катепсину L і вміст білка. Активність елюату, отриманого з смуги з R_f 0,48 дорівнювала 0,40 мкМ ум. од. / мг білка за хв, а елюату, отриманого з смуги R_f 0,57 – 0,60 мкМ ум. од. / мг білка за хв.

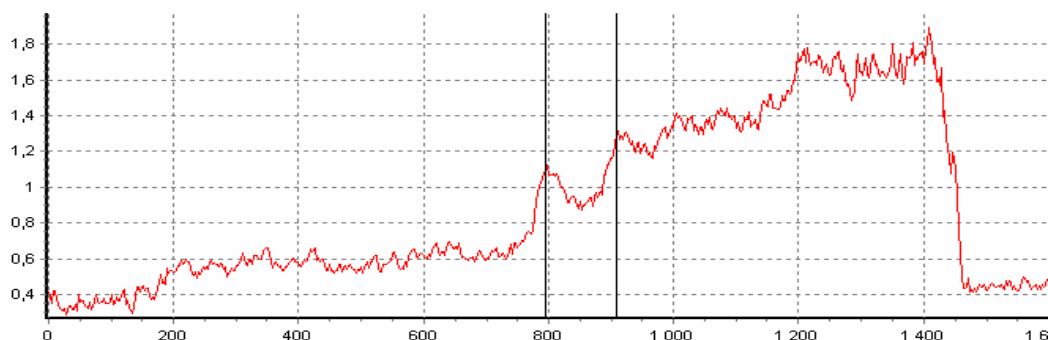
$\Delta\bar{D}o$ 

Рис. 1. Денситограма молекулярних форм катепсину L в поліакріламідному гелі. Примітка: ось x – довжина аналізованого треку, ось y – оптична щільність ($\Delta\bar{D}o$).

У зв'язку з тим, що катепсин L, отриманий із смуги з Rf 0,57 володів більшою активністю, в подальшому його використовували для визначення впливу тіаміну та його метаболітів.

Для з'ясування питання про те, які саме угруповання в молекулі тіаміну відповідальні за активуючий ефект тіаміну та його похідних ми вивчили вплив тіаміну, тіохрому, тіамінтіолу, 2-метил-4-амінопіримідину і 4-метил-5 β -оксиетилтіазолу на активність очищеного катепсину L.

Для нас важливо було встановити, чи впливає тіамін та його метаболіти на активність катепсину L, та чи є це явище фізіологічним, що має місце в клітині в реальних умовах, та чи визначається вказаний вплив фармакологічними властивостями тіаміну та його метаболітів. У зв'язку з чим, ми відпрацювали наступну модель постановки експерименту.

У стандартне середовище інкубації, що використовується для визначення активності катепсину L, вносили мікромольну кількість тіаміну та його метаболітів. У контролі замість цих метаболітів вносили 0,1 мл дистильованої води. Потім за стандартною схемою визначали активність катепсину L.

Аналіз даних свідчить про те, що тіамін і тіохром в 4,0 рази підвищують активність досліджуваного ферменту (табл. 1). У порівнянні з контролем 2-метил-4-амінопіримідин практично не впливав на активність катепсину L. Тіамінтіол знижував активність ферменту в 50 разів, а 4-метил-5 β -оксиетилтіазол підвищував в 6 разів.

Тобто, хімічна будова двуциклічного тіаміну та його метаболіту – трьохциклічного тіохрому має істотне значення в регуляції активності катепсину L.

Форма тіаміну з розірваним тіазоловим кільцем і вільною SH-групою (тіамінтіол), навпаки, негативно впливає на активність ферменту. Піримідинова половина молекули тіаміну (2-метил-4-амінопіримідин) не впливає на активність

частково очищеного катепсину L, а тiazолова половина 4-метил-5β-оксиетилтіазол різко підвищує активність ферменту.

Таблиця 1.
Вплив похідних тіаміну на активність частково очищеного катепсину L
(ум. од. / мг білка за хв, n = 3)

Контроль	Тіамін	Тіохром	Тіамінтіол	2-метил-4-амінопіримідин	4-метил-5-β-оксиетилтіазол
0,200± 0,012	0,802± 0,037*	0,804± 0,065*	0,004± 0,001*	0,150± 0,020	1,205± 0,260*

Примітка: * - різниця з контролем вірогідна (p < 0,05)

Отримані результати дозволяють припустити, що за активуючий ефект впливу тіаміну відповідає його тiazолове угруповання, коли воно існує у вигляді циклу. Відкриття цього угруповання з утворенням тіольної форми призводить до різкого зниження активності частково очищеного катепсину L. Такий вплив, ймовірно, здійснюється за рахунок блокування SH-груп ферменту в результаті приєднання до них тіамінтіолу.

В наступній серії досліджень ми досліджували роль циклічних угруповань в молекулі тіаміну та його метаболітів в зв'язуванні з катепсином L.

Для цього ми досліджували зв'язування з катепсином L метаболіта з одним тiazоловим циклом (4-метил-5β-оксиетилтіазол), двома циклами – піримідиновим і тiazоловим (тіамін) і трьома циклами (тіохром).

Для цих досліджень була розроблена наступна модель постановки експерименту.

У перший ряд пробірок, що містили виділений препарат катепсину L, додавали 1 мкмоль 4-метил,5-β-оксиетилтіазолу.

У другий ряд пробірок, що містив виділений катепсин L додавали стільки ж мкмолей тіаміну.

У третій ряд пробірок додавали стільки ж мкмолей тіохрому.

Ставили пробірки в термостат на 30 хвилин при 25 °С. Потім в усі пробірки додавали по 0,3 мл 10 % ТХУ і відділяли фермент центрифугуванням. Фермент двічі промивали і, первинну надосадову рідину та відповідну надосадову рідину після промивання, з'єднували.

У з'єднаних НОР з першого ряду пробірок спектрофотометрично визначали кількість 4-метил,5-β-оксиетилтіазолу.

У з'єднаному супернатанті з другого ряду пробірок визначали тіамін, що залишився.

У з'єднаних надосадових рідинах з третього ряду пробірок визначали флюориметрично тіохром, що залишився.

За різницею між доданим тіаміном або його метаболітами і тими з'єднаними, що залишилися в супернатанті робили висновок про кількість зв'язаних препаратів.

Як видно з аналізу даних, приведених в таблиці 2, тіазолова частина тіаміну дуже слабо зв'язується з ферментом. Активніше зв'язується з частково очищеним катепсином L тіамін. І найбільшою мірою виявлено зв'язування для тіохрому.

Таблиця 2.

Зв'язування метаболітів тіаміну катепсином L (нМоль / мг білка, n = 3)

Тіамін	Тіохром	4-метил-5-β-оксиетилтіазол
78 ± 6	1144 ± 98	4 ± 1

Ці дані дозволяють припустити, що при взаємодії тіаміну з частково очищеним катепсином L за зв'язування з ферментом відповідає піримідинова частина тіаміну, а за активацію – тіазолова частина.

ВИСНОВОК

Таким чином, ми встановили, що зв'язування тіаміну та його метаболітів з молекулою частково очищеного катепсину L відбувається за рахунок піримідинової частини молекули, а активація ферменту реалізується завдяки тіазоловій частині тіаміну, коли вона присутня у вигляді циклу.

Список літератури

1. Вовчук И. Л. Прогностическое значение определения катепсина В и его эндогенных ингибиторов при опухолевой патологии / И. Л. Вовчук // Онкология. – 2010. – Т. 12, № 2. – С. 165–168.
2. Жлоба А. А. Очистка, идентификация и свойства цистеиновых катепсинах тканей животных / А. А. Жлоба // Укр. биохим. журн. – 1986. – Т. 58, № 4. – С. 101–113.
3. Петров С. А. Некоферментні функції тіаміну в травній системі / С. А. Петров // матеріали XVIII з'їзду Українського фізіологічного товариства з міжнародною участю, (Одеса, 2010 р.). – 193 с.
4. Донченко Г. В. Основні історичні етапи розвитку біохімії вітамінів. Некоферментні механізми дії вітаміну В 1 / Г. В. Донченко, Ю. М. Пархоменко // Укр. біохім. журн. – 2000. – Т. 72, № 4-5. – С. 128–137.
5. Петров С.А. Регуляция тиамином и его метаболитами процессов образования и обмена аминокислот в организме: автореф. дисс. на соискание учен. степени докт. биол. наук : спец. 03.00.04. «Биохимия» / Петров Сергей Анатольевич ; Институт радиобиологии Академии наук Беларуси. – Минск, 1992. – 32, [1] с., включая обл. : с. 12.
6. Turk B., Turk D., Turk V. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers // Cancer Lett. – 1996. – Vol. 104. – P. 121–126.
7. Руденская Г. Н. Цистеиновые протеиназы микроорганизмов и вирусов / Г. Н. Руденская, Д. В. Пугов // Биохимия. – 2008. – Т. 73 (1) – С. 3 – 17.
8. Тоцкий В. Н., Халмуратов А. Г. Биохимические аспекты транспорта тиамин / В. Н. Тоцкий, А. Г. Халмуратов // Укр. биохим. журнал. – 1980. – Т. 52, № 1. – С. 110 –122.
9. Практическое руководство по энзимологии / Под ред. Г. А. Кочетова. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : Высш. школа, 1980. – 272 с.
10. 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.
11. Пат. № 39128 Україна, МПК (2009), C12N 9/50, C12N 9/52, C12N 9/64. Спосіб отримання карбоксипептидази А / Вовчук І. Л.; заявник та патентодержатель Вовчук І. Л. - № u 2008 09387; заявл. 17.07.2008; опубл. 10.02.2009, Бюл. № 3.

12. Устянська О.В. Регуляція тіаміном і його похідними активності катепсину L / О.В. Устянська, І.І. Бокал, С.А. Петров (та ін.) // Ученые записки Таврического национального университета. Серия «Биология, химия». Симферополь, 2011. – Т. (23), № 5. – С. 28–35.
13. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие) / Л. А. Остерман// – М. : Наука, 1981. – 288 с.
14. Андриевский А. М. Влияние ионов металлов in vitro на экспрессию активности гидролаз эфиров карбоновых кислот в онтогенезе особей *Drosophila Melanogaster* / А. М. Андриевский // Вісник Одеського національного університету. – 2008. – Т. 13, вип. 4. – С. 7–20.
15. Lowry O. H. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. I. Rosenbrough, A. Z. Fan et al. // J. Biol. Chem. – 1951. – V. 193. – P. 265–275.
16. Черная В. И. Катепсина L из опухоли мозга человека. Очистка и содержание / В. И. Черная // Укр. біохім. журн. – 1998. – Т. 70, № 5. – С. 97–103.
17. Елисеєва Г. Д. Флуориметрическое определение тиамин, кокарбоксилазы и рибофлавина в биологических объектах // Витамины. – 1953. – Т. 1. – С. 38–57.
18. Рокицкий П. Ф. Біохімічна статистика / Рокицький П. Ф. ; Мінськ : Вища школа, 1973. – 320 с.

Устянская О.В. Изучение взаимодействия тиамин и его метаболитов с частично очищенным катепсином L / О.В. Устянская, И.Л. Вовчук, Д.Б. Радионов, С.С. Чернадчук, С.А. Петров // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2012. – Т. 25 (64), № 4. – С.209-214.

В статье изучается взаимодействие тиамин и основных его метаболитов с частично очищенным катепсином L. Установлено, что связывание тиамин и его метаболитов с молекулой частично очищенного катепсина L происходят за счет пиримидиновой части молекулы, а активация фермента реализуется благодаря тиазоловой части тиамин, когда она присутствует в виде цикла.

Ключевые слова: частично очищенный катепсин L, тиамин, 2-метил-4-аминопиримидин, 4-метил-5β-оксиэтилтиазол, тиаминтиол, тиохром.

Ustjansky O.V. Study of interaction of thiamin and its metabolites with the cleared cathepsin L / O.V. Ustjansky, I.L. Vovchuk, D.B. Radionov, S.S. Chernadchuk, S.A. Petrov // Scientific Notes of Taurida V.Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No. 4. – P. 209-214.

In the article the influence of thiamin and basic its metabolites on the activity of the cleared preparation of cathepsin L are studied. It is determined that fastening of thiamin and its metabolites with the molecule of cleared cathepsin L take place due to pirimidin's part of molecule, and activating of enzyme will be realized due to tiazol's part of thiamin, when it is present as a cycle.

Keywords: cleared cathepsin L, thiamin, 2-methyl-4-aminopirimidin, 4-methyl-5β-oxyethylthiazol, thiaminthiol, thiochrom.

Поступила в редакцию 13.11.2012 г.