

УДК 577.15:591.466(043.5)

**О. В. Бірюкова**, асп., **Д. О. Нікітінський**, асп., **С. А. Петров**, д-р біол. наук, проф.

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,  
біологічний факультет, кафедра біохімії;  
пров. Шампанський, 2, м. Одеса, 65058 Україна

### АКТИВНІСТЬ КАТЕПСИН-В-ПОДІБНИХ ФЕРМЕНТІВ В ТКАНИНАХ БІЛИХ ЩУРІВ ЗА ВПЛИВУ ТІАМІНУ ТА ТІАМІНТІОЛУ

Досліджено вплив тіаміну та тіамінтіолу на активність катепсин-В-подібних ферментів в тканинах білих щурів. Встановлено, що обидві ці сполуки здатні інгібувати досліджувані ферменти. Обговорюються можливі механізми інгібування тіаміном та тіамінтіолом активності катепсин-В-подібних ферментів.

**Ключові слова:** тіамін, тіамінтіол, катепсин-В-подібні ферменти.

Останнім часом у світовій літературі накопичилась велика кількість даних, які свідчать про важливу роль протеолітичних ферментів у патогенезі, діагностиці та лікуванні різноманітних захворювань [1, 2]. Протеолітичні ферменти не тільки приймають участь у неспецифічному розпаді білкових молекул, але мають і регуляторне значення, являючи собою один із механізмів біологічного контролю функцій органів та тканин організму [3, 4].

Оскільки протеолітичний потенціал клітин в значному ступені визначається лізосомним апаратом, дослідження маловивчених лізосомальних катепсин-подібних ферментів, зокрема катепсин-В-подібних протеаз, викликає особливу зацікавленість [5, 6].

Активність катепсин-В-подібних ферментів регулюється багатьма чинниками, одним із яких є вплив вітамінів. В літературі існують дані, які свідчать про можливість існування некоферментної дії метаболітів тіаміну на активність сірковмісних ферментів [7, 8]. Можливо, даний механізм реалізується через дисульфідні взаємодії.

Метою наших досліджень було вивчення впливу тіаміну та тіамінтіолу на активність катепсин-В-подібних протеаз у деяких органах щурів.

#### Матеріали і методи

Дослідження проводили на статевозрілих щурах-самцях лінії Wistar масою 180–200 г. Всіх тварин утримували у стандартних умовах виварію Одеського національного університету імені І. І. Мечникова. Маніпуляції з тваринами проводили згідно з європейською Конвенцією про захист тварин, які використовуються для експериментальних наукових цілей.

Матеріалом дослідження були гомогенати печінки, нирок та тонкого кишечника.

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

Отриманий гомогенат тканин центрифугували при 8.000 g (+4°C) протягом 30 хвилин.

В експерименті *in vitro* активність катепсин-В-подібних ферментів визначали в супернатанті після додавання розчинів тіаміну та тіамінтіолу. В середовищі кінцеві концентрації цих сполук склали: 0,33; 0,66; 1,32; 2,64 мкМ.

Відносну активність катепсин-В-подібних ферментів визначали за кількістю *p*-нітроаніліну – продукту гідролізу синтетичного субстрату *N*-бензоіларгінін-*p*-нітроанілід (надалі – БАПНА) – при рН 6,0 за методом Erlanger [9].

Оптичну щільність визначали при довжині хвилі 383,5 нм. Відносну активність ферменту виражали в мкмольх *p*-нітроаніліну на мг тканини за 240 хвилин інкубації при 37 °С, питому активність – в мкмольх на мг білка.

Вміст білку визначали за методом Lowry [10].

Для обчислення отриманих результатів застосовували методи статистичного аналізу з використанням параметричних критеріїв оцінки розбіжності між вибірками. Достовірно різними вважалися результати при  $p \leq 0,05$  [11].

### Результати дослідження та їх обговорення

В результаті проведених досліджень отримано дані, що наведені в таблиці.

Таблиця

Питома активність катепсин-В-подібних ферментів в тканинах білих щурів за впливу тіаміну та тіамінтіолу (мкмоль *p*-нітроаніліну / мг білка)

Орган	Конт- роль	Питома активність катепсин-В-подібних ферментів (мкмоль / мг білка)							
		Концентрація тіаміну (мкМ)				Концентрація тіамінтіолу (мкМ)			
		0,33	0,66	1,32	2,64	0,33	0,66	1,32	2,64
Печінка	0,117± 0,01	0,033 ± 0,008*	0,015 ± 0,013*	0,024 ± 0,013*	0,029 ± 0,007*	0,016 ± 0,006*	0,018 ± 0,007*	0,019 ± 0,007*	0,042 ± 0,029*
Нирки	0,045 ± 0,003	0,013 ± 0,001*	0,002 ± 0,006*	0,007 ± 0,0007*	0,007 ± 0,0008*	0,005 ± 0,002*	0,008 ± 0,001*	0,004 ± 0,007*	0,026 ± 0,016*
Тонкий кишечник	0,056 ± 0,004	0,012 ± 0,004*	0,010 ± 0,002*	0,015 ± 0,006*	0,017 ± 0,001*	0,040 ± 0,004*	0,017 ± 0,003*	0,064 ± 0,028	0,013 ± 0,036*

Примітка: \* – вірогідна різниця по відношенню до контролю,  $p \leq 0,05$

При визначенні активності катепсин-В-подібних ферментів в гомогенатах тканин тварин контрольної групи нами було встановлено максимальне значення досліджуваного показника в тканинах печінки (0,117 мкмоль / мг білка). Активність досліджуваних ферментів в тканинах нирок та тонкого кишечника були приблизно однаковими.

Після додавання різних концентрацій тіаміну та його тіольної форми до надоводової рідини ми спостерігали значне зниження активності катепсин-В-подібних ферментів у порівнянні з показниками контрольної групи щурів. Виняток склали тканини тонкого кишечника, в яких за наявності у середовищі тіольної форми тіаміну в концентрації 1,32 мкМ активність досліджуваних ферментів практично не змінювалась.

Що стосується змін активності катепсин-В-подібних ферментів під впливом різноманітних концентрацій тіаміну та тіамінтіолу, то нами були отримані такі дані: після додавання тіаміну до концентрації 0,66 мкМ спостерігалися мінімальні показники в тканинах всіх досліджуваних органів. Максимальна активність ферментів спостерігалася в тканинах печінки, нирок при додаванні тіаміну до кон-

центрації 0,33 мкМ; в тканинах тонкого кишечника – за концентрації 2,64 мкМ вітаміну у середовищі. Такі зміни активності катепсин-В-подібних ферментів, можливо, пов'язані зі специфічністю функцій досліджуваних органів.

За різних концентрацій тіамінтіолу в надосадовій рідині активність ферментів в досліджуваних органах не змінювалась.

На підставі отриманих даних можна припустити, що інгібуючий ефект тіаміну та його тіольної форми пов'язаний з дисульфідними взаємодіями між вітаміном та цистеїновими залишками активного центру катепсину В, що призводить до зниження його реакційної спроможності.

### **Висновки**

1. Тіамін та його тіольна форма інгібують активність катепсин-В-подібних ферментів в тканинах білих шурів.

2. Суттєвої різниці між інгібуючим ефектом тіаміну та його тіольної форми не виявлено.

### **Література**

1. Дилакян Э. А. Цистеиновые протеиназы при неопластической трансформации // Вопр. мед. хим. - 2000. - Т. 46, № 5. - С. 490-491.
2. Особенности взаимодействия катепсина L с ингибиторами цистеиновых протеиназ из культур трансформированных фибробластов и ингибиторами из актиномицет / Э. А. Дилакян, Т. А. Гуреева, С. Л. Звездилина, В. А. Журбицкая, Ф. Л. Киселёв, Н. И. Соловьёва // Вопр. мед. хим. - 2000. - Т. 46, № 5. - С. 508-509.
3. Жлоба А. А. Очистка, идентификация и свойства цистеиновых катепсинов тканей животных // Украинский биохимический журнал. - Т. 58, № 4. - С. 100-111.
4. Цистеиновые протеиназы и их ингибиторы при развитии мышшиной НА-1 гепатомы и противоопухолевой терапии / О. Н. Потеряева, Т. А. Короленко, И. Г. Свечникова, С. Я. Жанаева, О. В. Паламева, В. И. Каледин, Д. В. Новицки // Биомедицинская химия. - 2004. - Т. 50, № 2. - С. 172-179.
5. Черная В. И., Рева А. Д. активность катепсина Н в мозге и опухолях мозга человека // Укр. биох. журн. - 1989. - Т. 61, № 5. - С. 47-50.
6. Primed-site Probing of Papain-like Cysteine Proteases / Jose Maria Pfizer, Irmgard Assfalg-Machleidt, Werner Machleidt, Luis Moroder, Norbert Schaschke // International Journal of Peptide Research and Therapeutics formerly known as "Letters in Peptide Science", 2006. - P. 44-67.
7. Петров С. А. Некоферментные эффекты тиамин и его метаболитов // Биомедицинская химия. - 2006. - Т. 52, вып. 4. - С. 335-345.
8. Петров С. А. Роль катаболитов тиамин в регуляции обмена аминокислот и кетокислот // Материалы IX Украинского биохимического съезда 24-27 октября 2006 года. - Харьков. - С. 163.
9. Erlanger B. F. et al. The preparation endopeptidases of two new chromogenic substrates of trypsin // Arch. Biochem. Biophys. - 1961. - Vol. 95. - P. 271-278.
10. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. I. Rosenbrough, A. Z. Fan, R. J. Randall // J. Biol. Chem. - 1951. - Vol. 193. - P. 265-275.
11. Рокицкий П. Ф. Биохимическая статистика. - Минск: Высш. Школа, 1973. - 230 с.

**О. В. Бірюкова, Д. О. Нікітінський, С. А. Петров**

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,  
кафедра биохимии  
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина

**АКТИВНОСТЬ КАТЕПСИН-В-ПОДОБНЫХ ФЕРМЕНТОВ В ТКАНЯХ БЕЛЫХ  
КРЫС ПОД ДЕЙСТВИЕМ ТИАМИНА И ТИАМИНТИОЛА**

**Резюме**

Исследовано влияние тиамин и тиаминтиола на активность катепсин-В-подобных ферментов в тканях белых крыс. Показано, что оба эти соединения способны ингибировать изучаемые ферменты. Обсуждаются возможные механизмы ингибирования тиамин и тиаминтиолом активности катепсин-В-подобных ферментов.

**Ключевые слова:** тиамин, тиаминтиол, катепсин-В-подобные ферменты.

**O. V. Birjukova, D. O. Nikitinsky, S. A. Petrov**

Odessa National Mechnikov University,  
Dvoryanskaya str., 2, Odessa, 65082, Ukraine

**ACTIVITY OF THIAMINE-AND-THIAMINE-THIOL-INFLUENCE-CATHEPSIN-B-  
LIKE-ENZYMES IN WHITE RATS' TISSUES**

**Summary**

Thiamine and thiamine-thiol influence on cathepsin-B-like-enzymes' activity in white rats' tissues has been studied. It has been found out that both of these compounds obtain the capability to inhibit studied enzymes. Probable thiamine and thiamine-thiol inhibition mechanisms of cathepsin-B-like-enzymes' activity are discussed.

**Keywords:** thiamine, thiamine-thiol, cathepsin-B-like-enzymes.