

УДК 577.152.344:577.15.072

©Коллектив авторов

## ВЫДЕЛЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ТИАМИНПИРОФОСФОКИНАЗЫ НЕМАЛИГНИЗИРОВАННОГО И ОПУХОЛЕВОГО МИОМЕТРИЯ ЖЕНЩИН

*О.В. Оришака\*, И.Л. Вовчук, С.А. Петров*

Одесский национальный университет им. И.И. Мечникова,  
65058 Украина, г. Одесса, пер. Шампанский, 2;  
тел.: (0482) 68-78-75; эл. почта: olesyabioshim@rambler.ru

Разработан метод выделения и очистки тиаминпирофосфокиназы из немалигнизированного и опухолевого миометрия женщин. Исследованы кинетические характеристики Т-киназы немалигнизированного и опухолевого миометрия женщин. Показано, что малигнизация миометрия сопровождается снижением сродства тиаминпирофосфокиназы опухоли к тиамину и увеличением чувствительности фермента опухоли к тиохрому.

**Ключевые слова:** тиаминпирофосфокиназа, тиамин, тиохром, ингибирование, миометрий.

### ВВЕДЕНИЕ

Т-киназа (КФ 2.7.6.2 – тиаминфосфокиназа, тиаминкиназа, АТФ-тиаминфосфокиназа, тиаминфосфорилаза, тиаминпирофосфокиназа) – фермент осуществляющий перенос пирофосфатной группировки от АТФ к тиамину. Впервые грубо очищенный белковый препарат с удельной активностью 8 нмоль TDP/ч был получен из экстракта пекарских дрожжей [1], а спустя 10 лет из печени крыс [2]. В ряде работ были изучены кинетические и физико-химические свойства Т-киназы различной степени очистки, которые были получены из печени и мозга крыс [2-6], пекарских дрожжей [7-12], сердца [13], мозга свиньи [14-16], листьев петрушки [17-19], бактерий [20]. Однако, данные о степени гомогенности, структуре, физико-химических и биохимических свойствах выделенных ферментов в большинстве случаев неполные. Изучение активности тиаминпирофосфокиназы в тканях организма при различных патологических состояниях представлено в литературе недостаточно [21], а при раковой патологии встречаются лишь единичные работы по изучению активности фермента в печени животных-опухоленосителей [22-24]. В современной литературе нами не было обнаружено исследований, посвященных изучению биохимических свойств тиаминпирофосфокиназы,

выделенной из немалигнизированного миометрия, доброкачественных и злокачественных опухолей миометрия женщин.

В связи с этим цель исследования состояла в выделении Т-киназы из немалигнизированного миометрия, узловой фибролейомиомы и умеренно-дифференцированной лейомиосаркомы миометрия и определении физико-химических и биохимических свойств выделенного фермента.

### МЕТОДИКА

*Материалом для исследования* служили образцы немалигнизированного миометрия, образцы доброкачественной опухоли миометрия (узловая фибролейомиома) и образцы злокачественной опухоли (умеренно-дифференцированная лейомиосаркома), полученные операционным путём у женщин, которые не получали дооперационного медикаментозного лечения. В качестве контроля была использована пограничная с новообразованиями ткань, в которой, по результатам гистоморфологического исследования, было подтверждено отсутствие атипических клеток.

*Образцы для исследования* были предоставлены клинической лабораторией медицинского учреждения, которое обеспечивало

\* - адресат для переписки

соблюдение этических норм согласно: Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации и Международного руководства по проведению биомедицинских исследований с участием человека, Руководства по качественной клинической практике Всемирной организации здравоохранения и рекомендациям ВОЗ комитета по этике. Патоморфологические диагнозы были верифицированы специалистами сертифицированной патоморфологической лаборатории онкодиспансера г. Одессы по международной классификации ВОЗ [25]. Пациентки были предупреждены о проведении экспериментальных исследований и дали письменное согласие на проведение биохимических исследований.

*Выделение и очистку* тиаминпирофосфокиназы осуществляли фракционированием сульфатом аммония [26], гель-хроматографией [27] и электрофоретическим методом [28].

*Колоночную хроматографию* белков проводили используя метод гель-хроматографии с применением сефадекса G-100 ("Pharmacia", Швеция). Определение молекулярных масс проводили с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-100 ("Serva", Германия) по методу Andrews [29]. В качестве маркерных белков использовали: альбумин сыворотки человека, овальбумин, химотрипсиноген А, лизоцим и РНК-азу ("Serva").

*Электрофоретический анализ* проводили в денатурирующих условиях на пластинах 140×140×1 мм в щелочной (трис-глициновый буфер, pH 8,3) среде в однородном 7,0%-ном вертикальном полиакриламидном геле ("Reanal", Венгрия) при температуре +(4-6)°C в течение 4,5 ч [28]. В денатурирующих условиях электрофоретический анализ проводили на пластинах 140×140×1 мм в щелочной (трис-глициновый буфер, pH 8,3) среде в однородном 15,0%-м вертикальном полиакриламидном геле с 0,1%-ым ДДС-Na ("Reanal") при температуре +(4-6)°C в течение 4,5 ч. В качестве маркеров молекулярных масс использовали следующие белки ("Serva"): альбумин сыворотки человека, овальбумин, карбоангидразу и РНКазу. Визуализацию белков проводили окраской гелей в растворе 0,25%-го раствора Кумаси голубого R-250 ("Serva"), содержащего 45,0% этанол и 9,0% уксусную кислоту. После остановки биохимических реакций гелевые блоки промывали водой и сканировали при высоком уровне чувствительности, сохраняя цифровую информацию в формате BMP. Полученные изображения денситометрировали, используя

специальную лицензионную компьютерную программу "АнаИС" (Поджарский, Рыбалка, podzharsky@ukr.net).

*Активность тиаминпирофосфокиназы* определяли тиохромным методом после инкубации образцов (источников фермента) в течение 60 мин при 37°C [30]. Относительную активность фермента выражали в нмоль тиамина/г ткани за 1 мин, удельную активность – в нмоль тиамина/мг белка за 1 мин.

*Зависимость скорости реакции* от концентрации субстрата (тиамина) и кинетику торможения ферментативной реакции тиохромом анализировали с использованием системы координат Лайнуивера-Берка [31].

Содержание белка в тканях определяли по методу Лоури [32].

Статистическую обработку первичных данных проводили по [33], используя компьютерную программу "Microsoft Excel 97".

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

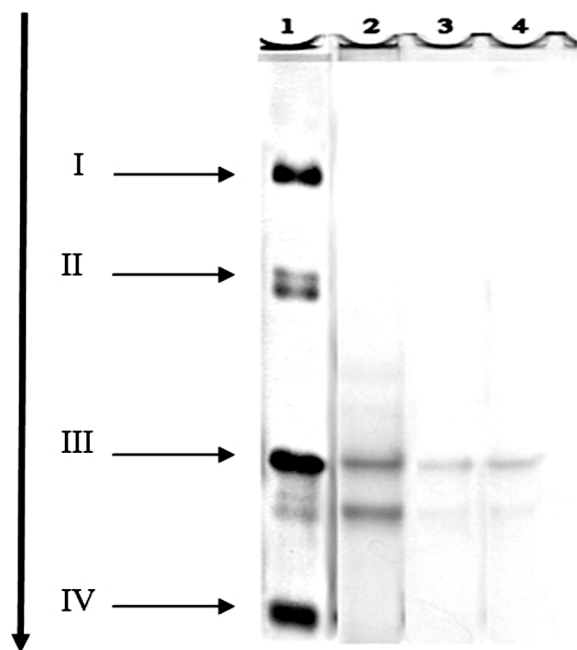
В предыдущих исследованиях активности Т-киназы в наиболее распространенных доброкачественных и злокачественных новообразованиях миометрия женщин нами была установлена наибольшая активность фермента в узловой фибролейомиоме и умеренно-дифференцированной лейомиосаркоме миометрия [34-35].

Молекулярная масса Т-киназы немалигнизированного миометрия доброкачественной и злокачественной опухолей миометрия, определенная по методу Andrews составила 53187,38 Да.

Как показали исследования, тиаминпирофосфокиназа, полученная из немалигнизированного и опухолевого миометрия по вышеописанной схеме, по данным электрофореза в редуцирующих условиях является гомогенной и представлена белком, который состоит из двух полипептидных цепей (рис 1).

Гомогенные препараты тиаминпирофосфокиназы немалигнизированного и опухолевого миометрия использовали для изучения кинетических характеристик Т-киназы.

Анализ полученных результатов показал, что для фермента, выделенного из немалигнизированного миометрия, из доброкачественной и из злокачественной опухолей насыщение фермента тиамином наблюдалось при концентрации субстрата 2,0 мкМ (рис. 2).



**Рисунок 1.** Электрофореграмма тиаминпирофосфокиназы немалигнизированного и опухолевого миометрия. **1** - маркерные белки: **I** - альбумин сыворотки человека,  $M_r$  66500 Да, **II** - овальбумин - 43000 Да, **III** - карбоангидраза - 30000 Да, **IV** - РНК-аза - 13700 Да; **2** - Т-киназа немалигнизированного миометрия; **3** - Т-киназа доброкачественной опухоли миометрия; **4** - Т-киназа злокачественной опухоли миометрия.

Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что усиление процесса малигнизации характеризуется увеличением константы Михаэлиса Т-киназы, то есть происходит снижение сродства фермента к субстрату (рис. 3).

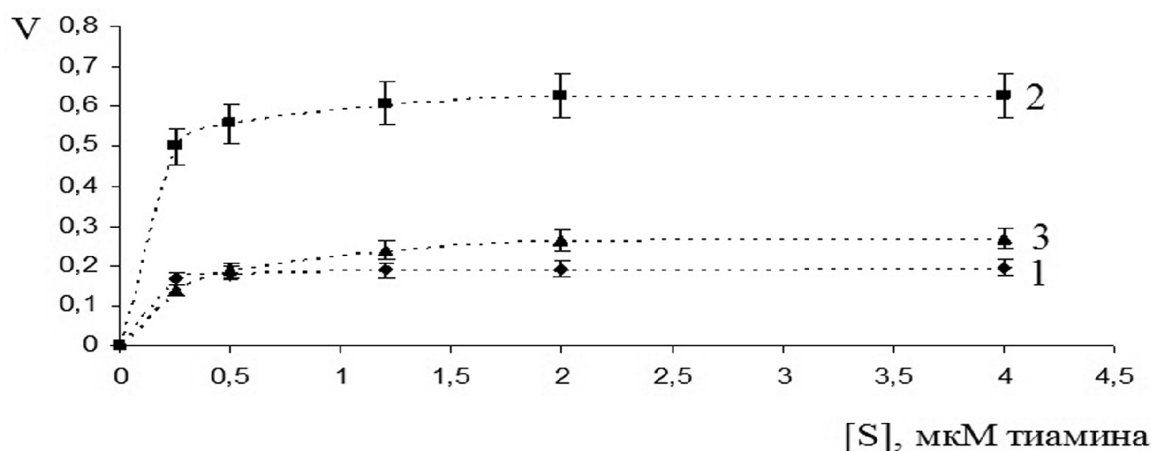
Так,  $K_M$  Т-киназы немалигнизированного миометрия была равна 0,05 мкМ,

доброкачественной опухоли – 0,07 мкМ и злокачественной опухоли – 0,30 мкМ тиамин. Для фермента немалигнизированного миометрия и фермента доброкачественного новообразования миометрия была установлена одинаковая  $V_{max}$  – 0,2 мкМ, а для фермента злокачественного миометрия  $V_{max}$  составляла 0,625 мкМ. Константа Михаэлиса фермента, выделенного из немалигнизированного и опухолевого миометрия была близка  $K_M$  Т-киназы мозга свиньи ( $K_M = 0,43 \times 10^{-6}$  М) [14] и была в 20-120 раз ниже, чем константа Михаэлиса фермента из печени крыс и из дрожжей ( $K_M = 6 \times 10^{-6}$  М) [27].

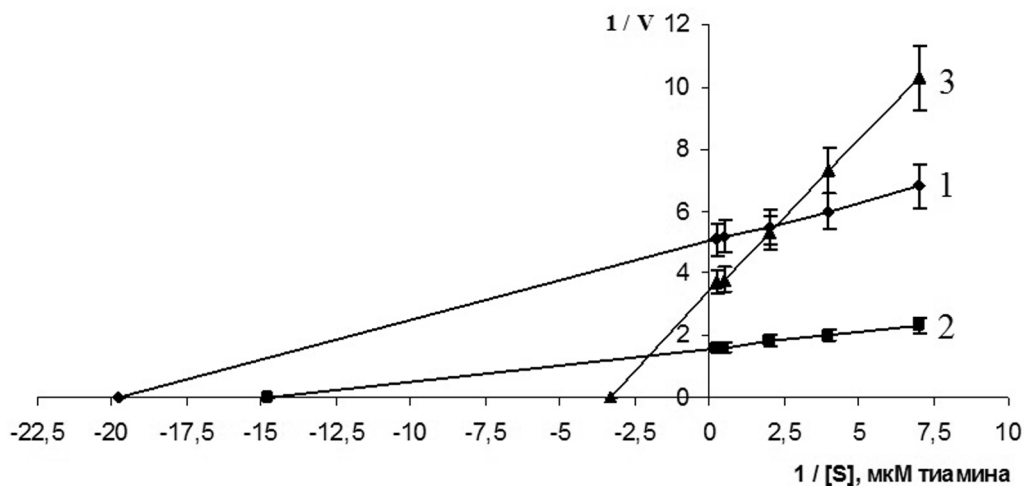
Для вычисления  $K_i$  были исследованы аналогичные фракции, обладающие максимальной ферментативной активностью, полученные после гель-хроматографии, которые использовались и для вычисления константы Михаэлиса (рис. 4-6).

Анализ полученных данных свидетельствует о том, что для Т-киназы как немалигнизированного, так и опухолевого миометрия характерно ингибирование активности фермента тиохромом по смешанному типу, однако величины констант ингибирования неодинаковы. Так, для фермента немалигнизированного и опухолевого миометрия константы ингибирования составляли 3,46 мкМ, 1,92 мкМ и 0,58 мкМ тиохрома, соответственно (рис. 4-6).

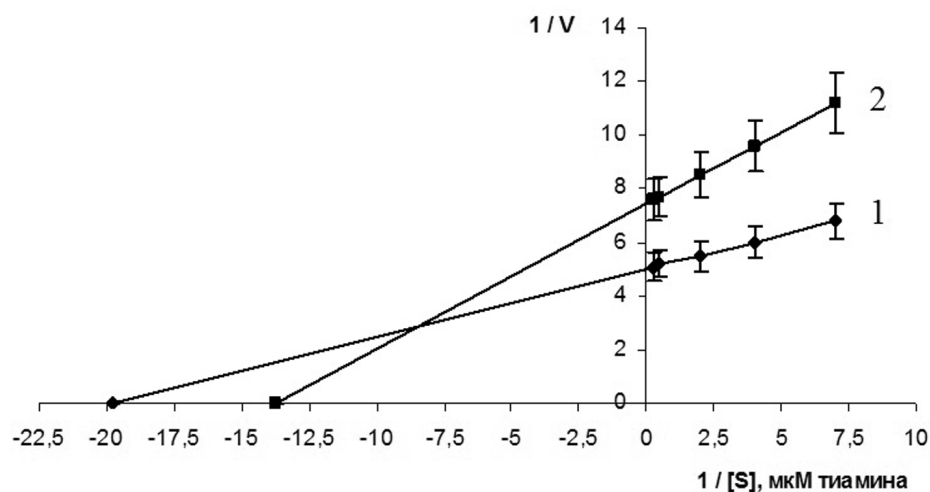
Анализ констант  $K'_S$  и  $K'_I$  тиаминпирофосфокиназы, выделенной из немалигнизированного и опухолевого миометрия (таблица), свидетельствует о том, что тиохром может реагировать как со свободным ферментом в разных точках его белковой молекулы, так и с фермент-субстратным комплексом на разных стадиях превращения этого комплекса.



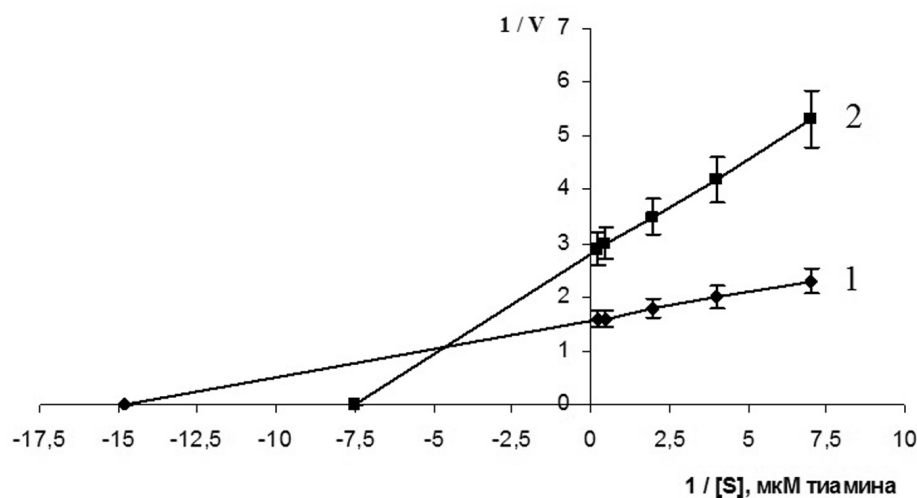
**Рисунок 2.** Зависимость скорости реакции, катализируемой тиаминпирофосфокиназой, выделенной из немалигнизированного миометрия (1), доброкачественной (2) и злокачественной (3) опухолей миометрия ( $n=8$ ).



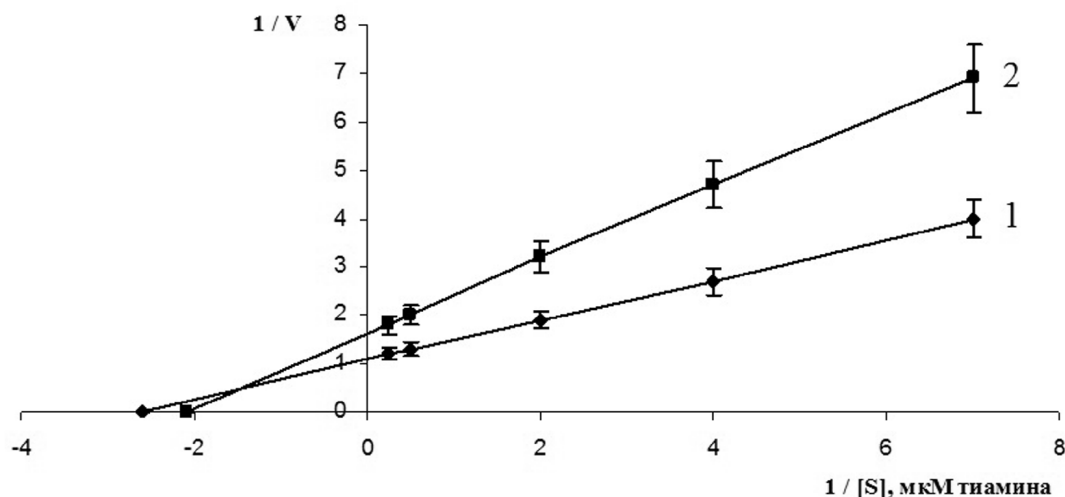
**Рисунок 3.** Зависимость скорости реакции, катализируемой тиаминпирофосфокиназой, выделенной из немалигнизированного миометрия (1), из доброкачественной опухоли (2) и из злокачественной опухоли миометрия (3) в координатах Лайнуивера-Бэрка (n=8).



**Рисунок 4.** Тип ингибирования тиаминпирофосфокиназы немалигнизированного миометрия тioxромом (по Лайнуиверу-Бэрку) (n=8). 1 - активность фермента без ингибитора. Концентрация тioxрома: 2 - 1,66 мкМ,  $K_i = 3,46$  мкМ.



**Рисунок 5.** Тип ингибирования тиаминпирофосфокиназы доброкачественной опухоли миометрия тioxромом (по Лайнуиверу-Бэрку) (n=8). 1 - активность фермента без ингибитора. Концентрация тioxрома: 2 - 1,66 мкМ,  $K_i = 1,92$  мкМ.



**Рисунок 6.** Тип ингибирования тиаминпирофосфокиназы злокачественной опухоли миометрия тиохромом (по Лайнуиверу-Бэрку) ( $n=8$ ). 1 - активность фермента без ингибитора. Концентрация тиохрома: 2 - 1,66 мкМ,  $K_i = 0,58$  мкМ.

**Таблица.** Константы  $K'_S$  и  $K'_I$  тиаминпирофосфокиназы, выделенной из немалигнизированного и опухолевого миометрия.

Константа	Немалигнизированный миометрий	Доброкачественная опухоль миометрия	Злокачественная опухоль миометрия
$K'_S$	0,012	0,021	0,023
$K'_I$	3,46	1,915	1,562

Примечание:  $K'_S$  - константа диссоциации фермент-субстратного комплекса;  $K'_I$  - константа диссоциации для отщепления ингибитора от комплекса фермент-субстрат.

Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что процесс малигнизации сопровождается уменьшением константы ингибирования Т-киназы тиохромом, следовательно, происходит повышение чувствительности фермента новообразований к данному ингибитору.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Тиаминпирофосфокиназа немалигнизированного и опухолевого миометрия имеет сходства и отличия по физико-химическим и биохимическим свойствам. Уставлено сходство Т-киназы немалигнизированного и опухолевого миометрия по молекулярной массе, структуре, насыщению фермента тиамином и типу ингибирования фермента тиохромом. Тиаминпирофосфокиназа немалигнизированного и опухолевого миометрия отличается по осаждаемости сульфатом аммония и по кинетическим характеристикам. Усиление процесса малигнизации характеризовалось увеличением константы Михаэлиса тиаминпирофосфокиназы, следовательно, происходило снижение сродства фермента

к субстрату. Для Т-киназы как немалигнизированного, так и опухолевого миометрия характерно ингибирование активности фермента тиохромом по смешанному типу с константами ингибирования – 3,46 мкМ, 1,92 мкМ, 0,58 мкМ, соответственно, то есть процесс малигнизации сопровождался уменьшением константы ингибирования Т-киназы тиохромом.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Weil-Malherbe H. (1939) J. Biochem., **33**, 1997-2007.
2. Mano Y. (1960) J. Biochem., **47**, 283-290.
3. Johnson L.R., Gubler C.J. (1968) Biochim. Biophys. Acta, **156**, 85-96.
4. Mano Y. (1960) J. Biochem., **47**, 24-36.
5. Mano Y. (1960) J. Biochem., **47**, 159-166.
6. Mano Y., Tanaka R. (1960) J. Biochem., **47**, 401-413.
7. Forsander O. (1956) Comment. Phys. Math. Helsingfors, **19**(2), 3-42.
8. Kaziyo Y. (1957) J. Biochem., **44**, 827-838.
9. Kaziyo Y. (1959) J. Biochem., **46**, 1523-1539.
10. Kaziyo Y. (1959) J. Biochem., **46**, 1587-1596.
11. Stein-Parve E.P. (1952) Biochim. Biophys. Acta, **8**, 310-324.



## БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ТИАМИНКИНАЗЫ МИОМЕТРИЯ ЖЕНЩИН

12. Thomé-Beau F., Le Thi Lan, Olomucki A., Nguyen van Thoai (1969) Biochim. Biophys. Acta, **182**, 111-121.
13. Suzuoki Z. (1955) J. Biochem., **47**, 27-39.
14. Peterson J.W., Gubler C.J., Kuby S.A. (1975) Biochim. Biophys. Acta, **397**, 377-394.
15. Wakabayashi Y. (1978) Vitamins, **52**, 229-236.
16. Wakabayashi Y. (1978) Vitamins, **52**, 223-228.
17. Mitsuda H., Takii Y., Iwami K., Yasumoto K. (1975) J. Nutr. Sci. Vitaminol., **21**, 19-26.
18. Mitsuda H., Takii Y., Iwami K., Yasumoto K. (1975) J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo), **21**, 103-115.
19. Mitsuda H., Takii Y., Iwami K., Yasumoto K. (1975) J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo), **21**, 189-198.
20. Sanemori H., Kawasaki T. (1980) J. Biochem., **88**, 223-230.
21. Deus B., Blum N. (1970) Biochim. Biophys. Acta, **219**, 489-492.
22. Kiessling K.H. (1961) Exp. Cell. Res., 311-319.
23. Савицкий И.В., Леус Н.Ф. (1968) Вопр. онкологии, **14**, 105-106.
24. Требухина Р.В. (1984) Особенности метаболизма тиамина в организме при росте злокачественных опухолей. Автореф. дисс. докт. наук, Медицинский институт, Минск.
25. Всемирная Организация Здравоохранения (1981).
26. Кочетов Г.А. (1980) Практическое руководство по энзимологии, Высш. школа, М.
27. Воскобоев А.И., Черникевич И.П. (1987) Биосинтез, деградация и транспорт фосфорных эфиров тиамина, Наука и техника, Минск.
28. Остерман Л.А. (1981) Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование, Наука, М.
29. Andrews P. (1965) J. Biochem., **96**, 595-606.
30. Елисеева Г.Д. (1953) Витамины, **1**, 38-57.
31. Варфоломеев С.Д., Зайцев С.В. (1982) Кинетические методы в биохимических исследованиях, Изд-во Московского университета, Москва.
32. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951) J. Biol. Chem., **193**, 265-275.
33. Рокицкий П.Ф. (1967) Биологическая статистика, Высш. школа, Минск.
34. Оришака О.В., Вовчук И.Л., Кучеров В.А., Петров С.А. (2012) Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського, **25(3)**, 145-157.
35. Оришака О.В., Вовчук И.Л., Петров С.А. (2012) Вестник Харьковского университета, №1008, 23-40.

Поступила: 13. 02. 2013.

## EXTRACTING AND STUDY OF BIOCHEMICAL PROPERTIES OF THIAMINE PYROPHOSPHOKINASE FROM NON-MALIGNANT AND TUMOR TISSUE OF MYOMETRIUM

*O.V. Orishaka, I.L. Vovchuk, S.A. Petrov*

Mechnikov Odessa National University, Shampansky str., 2, Odessa, 65058, Ukraine;  
tel.: (0482) 68-78-75; e-mail: olesyabioshim@rambler.ru

The method of extraction and purification of thiamine pyrophosphokinase from non-malignant and tumor tissue of myometrium has been elaborated. Kinetic characteristics of T-kinase from non-malignant and tumor tissue of women myometrium have been studied. It has been shown, that malignization of myometrium is accompanied by a decrease in affinity of thiamine pyrophosphokinase from tumor to thiamine and by an increase in sensitivity of the enzyme from tumor to thiochrome.

**Key words:** thiamine pyrophosphokinase, thiamine, thiochrome, inhibition, myometrium.