

УДК 577.15.152:577.15.072/08/082

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ТИАМИНПИРОФОСФОКИНАЗЫ ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ МИОМЕТРИЯ

Оришака О.В., Вовчук И.Л., Кучеров В.А., Петров С.А.

*Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова, Одесса, Украина
E-mail: olesyabioshim@rambler.ru*

Методом электрофореза в полиакриламидном геле изучены белковый спектр и многообразие молекулярных форм тиаминпирофосфокиназы немалигнизированной и опухолевой тканей миометрия. Разработан метод выделения изоформ тиаминпирофосфокиназы и идентификации их в гелевом блоке. Изучены электрофоретические характеристики идентифицированных белков. Показано, что процесс малигнизации сопровождается изменением белкового и ферментного спектра.

Ключевые слова: тиаминпирофосфокиназа, изоформы, электрофорез.

ВВЕДЕНИЕ

Тиаминпирофосфокиназа (КФ 2.7.6.2.), осуществляющая перенос пирофосфатной группировки от АТФ к тиамину, впервые была обнаружена в головном мозгу голубей и тонком кишечнике крыс. Затем рядом исследователей этот фермент был найден в экстрактах пивных и пекарских дрожжей [1]. Очоа [2] установил наличие тиаминпирофосфокиназы (далее Т-киназа) в тканях печени, мозга и скелетной мускулатуры голубя. Впоследствии этот фермент был обнаружен во многих органах и тканях различных животных [3-6], а также в соке поджелудочной железы и растениях [7].

Т-киназа из разных источников обладает различной удельной активностью. Самыми подходящими и доступными источниками для выделения этого фермента являются дрожжи и печень животных. Однако наиболее насыщен им сок поджелудочной железы. Высокоочищенные (в 200-250 раз) препараты Т-киназы, выделенные из пивных дрожжей, при электрофорезе на полиакриламидном геле дают пять белковых зон, которые очень близко расположены друг к другу, что свидетельствует об их почти одинаковом молекулярном весе и заряде. Вполне возможно, что каждая зона, являясь изозимом, при определенных условиях специфична к определенному нуклеотидтрифосфату. Все попытки выделить эти фракции индивидуально гель-фильтрацией и хроматографией пока не увенчались успехом [7].

При исследовании гомогенности Т-киназы из печени крыс методом электрофореза в 7 %-ном полиакриламидном геле обнаруживаются две симметричные полосы, располагающиеся очень близко друг от друга. Поэтому раздельно их активность не исследовалась. В последнее время установлено, что Т-киназа обладает четвертичной структурой и, следовательно, изменение

концентрации ионов водорода может индуцировать конформационные изменения белковой глобулы, затрагивающие активный центр фермента. Не исключено также, что наличие нескольких оптимумов рН связано с существованием Т-киназы в виде множественных молекулярных форм [8].

Подробное изучение белковых спектров нормальных и патологических образцов позволяет обнаруживать биохимические маркеры определенных патологических состояний [9].

Работы по определению гомогенности препаратов обычно проводят с помощью электрофореза в 7 %-ном полиакриламидном геле. Однако, как было показано А.Л. Шварцманом [10], для некоторых ферментов, например, выделенных из опухолевой и нормальной тканей желудка человека, метод препаративного электрофореза позволяет не только подтвердить гомогенность препаратов ферментов, но и получить индивидуальные изоферменты.

В связи с этим, цель работы состояла в изучении электрофоретической характеристики водорастворимых белков и белков, полученных при солевом фракционировании из немалигнизированной и опухолевых тканей миометрия, а также в идентификации тиаминпирофосфокиназы непосредственно в гелевом блоке.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биологическим источником исследуемых белков служили образцы немалигнизированного миометрия, ткани доброкачественной (узловая фибролейомиома матки) и злокачественной (умеренно-дифференцированная лейомиосаркома матки) опухолей, которые были получены операционным путем у женщин, не проходивших дооперационного медикаментозного лечения. Патоморфологические диагнозы были верифицированы по международной классификации ВОЗ [11].

Образцы миометрия гомогенизировали с шестью объемами 0,25 М раствора сахарозы в условиях, предотвращающих разрушение субклеточных фракций. Гомогенат центрифугировали в течение 90 мин при 20 000 g (при + 4 °С). Белковый экстракт подщелачивали 0,5 М трис-НCl буфером до рН 7,7 и диализировали против 40 объемов дистиллированной воды при + 4 °С в течение 12 часов [12]. Постепенное фракционное осаждение проводили сульфатом аммония, насыщая белковый раствор до 20, 40, 60 и 80 % [12]. Для удаления избытка (NH₄)₂SO₄, препятствующего определению белка по методу Lowry [13], полученные фракции подвергали повторному диализу в тех же условиях.

Активность тиаминпирофосфокиназы определяли по количеству образовавшегося тиаминдифосфата [14]. Относительную активность выражали в нмоль тиаминна на мг ткани за 1 мин инкубации при 37 °С, удельную активность – в пмоль тиаминна на мг белка за 1 мин инкубации при 37 °С.

Электрофоретический анализ проводили на пластинах 140 × 140 × 1 мм в щелочной (трис-глициновый буфер, рН 8,3) среде в однородном 10 %-ном вертикальном полиакриламидном геле ("Reanal", Венгрия) при температуре 25 °С в течение 4,5 часов [15]. Визуализацию белков проводили окраской гелей в растворе 0,25 %-ного раствора Кумасси голубого R-250 ("Serva", Швеция), содержащего 45,0

%-ный этанол и 9,0 %-ную уксусную кислоту. Электрофореграммы получали сканированием влажных гелевых блоков с последующей компьютерной обработкой электрофореграмм с помощью программы ANAIS.

Методом препаративного электрофореза [16] на окрашенных Кумасси R-250 белковых полосах идентифицировали участки неокрашенного геля, содержащие иммобилизованные белки, в которых далее определяли активность тиаминпирофосфокиназы. В качестве контроля был взят участок гелевого блока после электрофореза в идентичных условиях, без наличия исследуемого материала в слотах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ электрофореграмм щелочного электрофореза цитозольной фракции водорастворимых белков немалигнизированной и опухолевых тканей миометрия показал, что процесс малигнизации сопровождается уменьшением количества регистрируемых белков с 15 – в образце ткани немалигнизированного до 8 – в образце узловой фибролейомиомы матки и 9 – в образце умеренно-дифференцированной лейомиосаркомы матки (рис. 1, 2, 3). Белковый спектр немалигнизированного миометрия представлен преимущественно малоподвижными и среднеподвижными белками, в ткани доброкачественной опухоли – среднеподвижными, а малигнизированного миометрия – среднеподвижными белками и белками с большой электрофоретической подвижностью (табл. 1). Следует отметить, что для всех исследованных образцов миометрия характерно наличие «мажорных», не специфических белков с R_f 0,360 - 380 и R_f 0,680 - 710. Диализ приводил к потере медленноподвижных (R_f 0,063, 0,088, 0,130, 0,140, 0,160, 0,170, 0,250, 0,290) и среднеподвижных белков (R_f 0,330, 0,420, 0,540) немалигнизированного миометрия, среднеподвижных белков (R_f 0,260, 0,340, 0,420, 0,500, 0,560) миометрия с доброкачественной опухолью, и к появлению дополнительных белков с различной электрофоретической подвижностью (R_f 0,110, 0,130, 0,250, 0,510, 0,570, 0,690, 0,850, 0,890) в малигнизированном миометрии. «Быстрые» белки в образце злокачественной опухоли, которые не регистрировались ранее, скорее всего, являются продуктами деградации «мажорного» белка с R_f 0,400.

Нами установлено, что в процессе поэтапного фракционирования белков сульфатом аммония изменяются спектр суммарных белков и тиаминпирофосфокиназы. Так, при 20%-ном насыщении сульфатом аммония из образцов немалигнизированного миометрия и миометрия с доброкачественной опухолью была фракционирована тиаминпирофосфокиназа с близкой электрофоретической подвижностью: R_f 0,690 – 0,710 (табл. 1). При этом насыщении из образца малигнизированного миометрия были фракционированы один среднеподвижный обладающий ферментативной активностью белок с R_f 0,440 и один быстроподвижный белок с R_f 0,780 (табл. 1). При 40%-ном насыщении сульфатом аммония из всех тканевых образцов был фракционирован «мажорный» белок с R_f 0,690 - 0,710 (табл. 1). При этом насыщении из образца малигнизированного миометрия были фракционированы специфические малоподвижные (R_f 0,120, 0,150, 0,160, 0,180, 0,190, 0,220, 0,250, 0,270) и быстроподвижные (R_f 0,590, 0,750, 0,780) белки. Наибольшее количество белков во

всех исследованных образцах было зарегистрировано при 60%-ном насыщении сульфатом аммония (табл. 1). Во всех исследованных образцах тканей были обнаружены «мажорные» быстроподвижные белки с Rf 0,680-0,710.

Таблица 1
Электрофоретическая характеристика белкового спектра ткани миометрия

Электрофоретическая подвижность белков (Rf)	Спектр водорастворимых белков						Фракционирование белков (NH ₄) ₂ SO ₄											
	до диализа			после диализа			20 % насыщение			40 % насыщение			60 % насыщение			80 % насыщение		
	А	Б	В	А	Б	В	А	Б	В	А	Б	В	А	Б	В	А	Б	В
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
0,019		+																
0,024	+																	
0,025				+														
0,053	+																	
0,054				+							+							
0,063	+																	
0,088	+																	
0,097				+														
0,110						+												
0,120												+						
0,130	+					+												
0,140	+																	
0,150						+							+	*				
0,160	+		+										+					
0,170	+																	
0,180														+	*			
0,190			+			+								+				
0,220						+								+	*		+	*
0,230			+															
0,250	+	*				+	*						+	+	*		+	
0,260		+	*	+														
0,270													+					
0,290	+																	
0,310				+			+	*						+				
0,330	+																	
0,340		+											+			+		
0,350														+				
0,360			+			+	*											
0,370	+														+	*		
0,380		+		+	+		+				+		+	*				
0,390																	+	*
0,400			+	*														
0,420	+	*	+	*														
0,430												+	*			+	*	

Продолжение таблицы 1

0,440					+			+*									
0,450			+								+	+*					
0,500		+									+		+				
0,510						+											
0,520												+					
0,540	+																
0,560		+														+	
0,570						+											
0,590											+						
0,600																+	
0,680																+*	
0,690						+*	+*		+*		+*	+*		+			
0,710	+	+*		+*			+*			+*			+*				
0,720																	+*
0,750											+						
0,770																+	
0,780			+			+			+			+					
0,830																+	
0,850						+											
0,890						+											
0,930																+	
0,940			+														
0,950																+	

Примечание: 1. * – фракции, обладающие ферментативной активностью.

2. А – немалигнизировавшая ткань, Б – ткань доброкачественной опухоли, В – ткань злокачественной опухоли

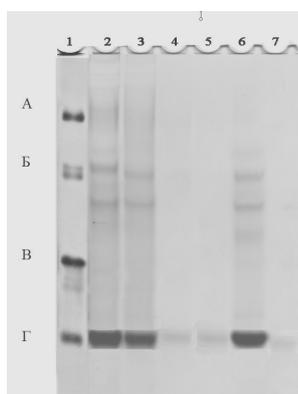


Рис. 1. Электрофореграмма растворимых белков и белков, фракционированных сульфатом аммония из ткани немалигнизированного миомерия.

1 – белковые маркеры: А – сывороточный альбумин человека, Мг 66 500 Да;

Б - овальбумин - 43 000 Да, В - карбоангидраза - 30 000 Да, Г- РНК-аза- 13 700Да.

2 – водорастворимые белки (до диализа, нанесено 195,5 мкг белка);

3 – водорастворимые белки (после диализа, нанесено 93,6 мкг белка);

4 – фракция белков, осаждаемых при 20 %-ном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (нанесено 10,9 мкг белка);

5 – фракция белков, осаждаемых при 40 %-ном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (нанесено 40,6 мкг белка);

6 – фракция белков, осаждаемых при 60 %-ном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (нанесено 66,7 мкг белка);
7 – фракция белков, осаждаемых при 80 %-ном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (нанесено 1,2 мкг белка).

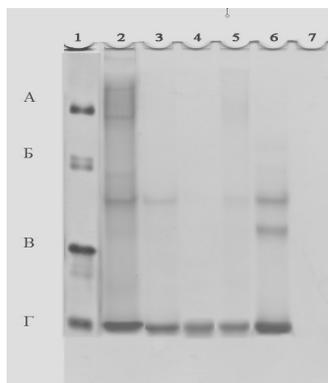


Рис. 2. Электрофореграмма растворимых белков и белков, фракционированных сульфатом аммония из ткани узловой фибролейомиомы матки.

1 – белковые маркеры: А – сывороточный альбумин человека, Мг 66 500 Да;

Б - овальбумин - 43 000 Да, В - карбоангидраза - 30 000 Да, Г- РНК-аза- 13 700Да.

2 – водорастворимые белки (до диализа, нанесено 281,8 мкг белка);

3 – водорастворимые белки (после диализа, нанесено 147,0 мкг белка);

4 – фракция белков, осаждаемых при 20 %-ном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (нанесено 11,0 мкг белка);

5 – фракция белков, осаждаемых при 40 %-ном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (нанесено 58,8 мкг белка);

6 – фракция белков, осаждаемых при 60 %-ном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (нанесено 103,0 мкг белка);

7 – фракция белков, осаждаемых при 80 %-ном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (нанесено 0,06 мкг белка).

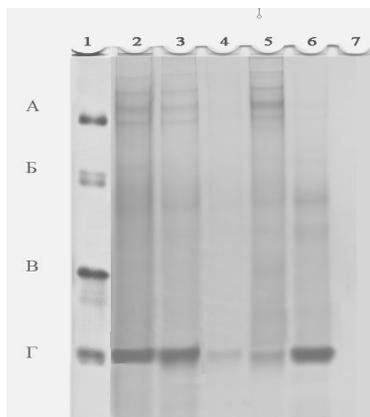


Рис. 3. Электрофореграмма растворимых белков и белков, фракционированных сульфатом аммония из ткани умереннодиф-ференцированной лейомиосаркомы матки.

1 – белковые маркеры: А – сывороточный альбумин человека, Мг 66 500 Да;

Б – овальбумин - 43 000 Да, В - карбоангидраза - 30 000 Да,

Г- РНК-аза- 13 700Да.

2 – водорастворимые белки (до диализа, нанесено 207,9 мкг белка);

3 – водорастворимые белки (после диализа, нанесено 107,3 мкг белка);

4 – фракция белков, осаждаемых при 20 %-ном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (нанесено 10,6 мкг белка);

5 – фракция белков, осаждаемых при 40 %-ном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (нанесено 56,4 мкг белка);
6 – фракция белков, осаждаемых при 60 %-ном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (нанесено 69,7 мкг белка);
7 – фракция белков, осаждаемых при 80 %-ном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (нанесено 1,2 мкг белка).

Среднеподвижные «мажорные» белки с Rf 0,370-0,380, которые обладали ферментативной активностью, были обнаружены в образцах немалигнизированной ткани и ткани доброкачественной опухоли. Характерной особенностью для немалигнизированной ткани являлось наличие среднеподвижных белков (Rf 0,250, 0,310, 0,350, 0,450, 0,520), а для ткани малигнизированного миометрия – появление белков средне- (Rf 0,220, 0,340, 0,430, 0,500, 0,560, 0,600) и быстроподвижных (Rf 0,770, 0,830, 0,930, 0,950), некоторые из них могли быть продуктами деградации соответствующих «мажорных» белков. При 80 %-ном насыщении сульфатом аммония только из немалигнизированной ткани было фракционировано два белка, обладающих ферментативной активностью с электрофоретической подвижностью Rf 0,390 и Rf 0,720 (табл. 1).

Для выделения изоэнзимов тиаминпирофосфокиназы немалигнизированной и опухолевой тканей миометрия был применен метод препаративного электрофореза в ПААГ, который позволял фракционировать до 40 мкг белка в одной пробе. Нами установлено, что процесс опухолеобразования в миометрии сопровождается увеличением количества множественных форм тиаминпирофосфокиназы. Исходная фракция водорастворимых белков немалигнизированного миометрия характеризовалась наличием двух множественных форм тиаминпирофосфокиназы которые, по данным электрофоретической подвижности относятся к медленно- и среднеподвижным белкам с Rf 0,250 и 0,420 (табл. 2). Водорастворимые белки миометрия с доброкачественной опухолью содержали три формы фермента: с Rf 0,260, 0,420 и 0,710, злокачественной опухоли – 1 форму с Rf 260 и другую форму фермента – с Rf 0,400 (табл. 3, 4).

После диализа во фракции растворимых белков немалигнизированной ткани и ткани доброкачественной опухоли была идентифицирована одна «мажорная» форма тиаминпирофосфокиназы с Rf 0,710 и 0,690 (соответственно), а в образце малигнизированного миометрия – одна «мажорная» форма фермента с Rf 0,690 и две формы с Rf 0,250 и 0,360 (табл. 2, 3, 4).

Данные литературы свидетельствуют о том, что тиаминпирофосфокиназа как индивидуальный белок может быть фракционирована из белкового раствора при 51-72 %-ном насыщении его сульфатом аммония [17]. Однако, мы установили, что поэтапное фракционирование приводит к более четкому разделению белков и позволяет получить высокоочищенные индивидуальные изоформы тиаминпирофосфокиназы с высокой удельной активностью фермента.

Таблица 2

Выделение изоферментов тиаминпирофосфокиназы из немалигнизированной ткани миометрия методом препаративного электрофореза в полиакриламидном геле, n=3

Фракция	Исходная фракция белка и изозимы	Содержание белка во фракции, мг	Относительная активность, нмоль тиамина / мг ткани	Удельная активность, пмоль тиамина / мг белка	Коэффициент очистки
Растворимые белки до диализа	Исходная фракция белка	0,1955±0,0196	0,0019±0,0002	0,0097±0,0001	1,00
	Изоzim Rf 0,250	0,0016±0,0002	0,0009±0,0001	0,563±0,061	58,00
	Изоzim Rf 0,420	0,0052±0,0006	0,0007±0,0001	0,135±0,015	13,88
Растворимые белки после диализа	Исходная фракция белка	0,0936±0,009	0,0018±0,0002	0,0192±0,002	1,00
	Изоzim Rf 0,710	0,0026±0,0003	0,0009±0,0001	0,3462±0,031	18,03
20 % насыщение (NH ₄) ₂ SO ₄	Исходная фракция белка	0,0109±0,002	0,0001±0,0001	0,0092±0,0009	1,00
	Изоzim Rf 0,310	0,0009±0,0001	0,0014±0,0002	1,5556±0,153	169,09
	Изоzim Rf 0,710	0,0018±0,0002	0,0020±0,0003	1,1111±0,031	120,77
40 % насыщение (NH ₄) ₂ SO ₄	Исходная фракция белка	0,0406±0,0038	0,0008±0,0001	0,0197±0,005	1,00
	Изоzim Rf 0,710	0,0080±0,0007	0,0010±0,0001	0,125±0,014	6,35
60 % насыщение (NH ₄) ₂ SO ₄	Исходная фракция белка	0,0667±0,007	0,0010±0,0001	0,0150±0,002	1,00
	Изоzim Rf 0,250	0,0031±0,0004	0,0012±0,0001	0,387±0,041	25,80
	Изоzim Rf 0,380	0,0052±0,0006	0,0015±0,0002	0,289±0,030	19,27
	Изоzim Rf 0,710	0,0063±0,0007	0,0017±0,0002	0,270±0,014	18,00
80 % насыщение (NH ₄) ₂ SO ₄	Исходная фракция белка	0,0012±0,0001	0,0007±0,0001	0,5833±0,0623	1,00
	Изоzim Rf 0,390	0,0006±0,0001	0,0015±0,0002	2,500±0,257	4,29
	Изоzim Rf 0,720	0,0010±0,0001	0,0016±0,0002	1,600±0,168	2,74

Таблица 3

Выделение изоферментов тиаминпирофосфокиназы из ткани миометрия с доброкачественной опухолью методом препаративного электрофореза в полиакриламидном геле, n=3

Фракция	Исходная фракция белка и изозимы	Содержание белка во фракции, мг	Относительная активность, нмоль тиамина / мг ткани	Удельная активность, пмоль тиамина / мг белка	Кэф-фициент очистки
Раствори-мые белки до диализа	Исходная фракция белка	0,2818±0,0282	0,0042±0,0004	0,0149±0,0015	1,00
	Изохим Rf 0,260	0,0018±0,0002	0,0009±0,0001	0,500±0,051	33,56
	Изохим Rf 0,420	0,0050±0,0006	0,0007±0,0001	0,140±0,015	9,40
	Изохим Rf 0,710	0,0032±0,0003	0,0009±0,0001	0,2813±0,031	18,88
Раствори-мые белки после диализа	Исходная фракция белка	0,1470±0,009	0,0040±0,0003	0,0272±0,002	1,00
	Изохим Rf 0,690	0,0023±0,0003	0,0012±0,0002	0,5217±0,031	19,18
20 % насыще-ние (NH ₄) ₂ SO ₄	Исходная фракция белка	0,0110±0,002	0,0011±0,0001	0,1000±0,010	1,00
	Изохим Rf 0,690	0,0014±0,0002	0,0019±0,0001	1,3571±0,153	13,57
40 % насыще-ние (NH ₄) ₂ SO ₄	Исходная фракция белка	0,0588±0,0038	0,0011±0,0001	0,0187±0,002	1,00
	Изохим Rf 0,690	0,0058±0,0007	0,0021±0,0003	0,362±0,039	19,36
60 % насыще-ние (NH ₄) ₂ SO ₄	Исходная фракция белка	0,1030±0,007	0,0008±0,0001	0,0078±0,0009	1,00
	Изохим Rf 0,370	0,0040±0,0004	0,0052±0,0006	1,300±0,15	166,67
	Изохим Rf 0,450	0,0050±0,0006	0,0056±0,0007	1,120±0,030	143,59
80 % насыще-ние (NH ₄) ₂ SO ₄	Исходная фракция белка	0,00006±0,0001	0,000018±0,0002	3,0±0,32	1,00

Из немалигнизированной ткани при 20 %-ном насыщении сульфатом аммония, была получена фракция, представленная двумя формами фермента: одной «мажорной» с Rf 0,710 и второй формой фермента со средней электрофоретической подвижностью (Rf 0,310). Фракции, полученные при этом же насыщении сульфатом аммония из доброкачественной и злокачественной опухолей содержали по одной форме фермента: «мажорной» с Rf 0,690, среднеподвижной с Rf 0,440,

соответственно. При 40 %-ном насыщении сульфатом аммония во всех тканевых образцах миометрия было идентифицировано по одной «мажорной» форме фермента с близкими значениями электрофоретической подвижности Rf 0,690 и Rf 0,710, что, скорее всего, свидетельствует об идентичности этих форм. Кроме «мажорной» формы, в образце малигнизированного миометрия было установлено наличие трех малоподвижных форм фермента с Rf 0,150, 0,180 и 0,220 и одной среднеподвижной формы фермента с Rf 0,430 (табл. 4).

Таблица 4

Выделение изоэнзимов тиаминпирофосфокиназы из ткани злокачественной опухоли миометрия методом препаративного электрофореза в полиакриламидном геле, n=3

Фракция	Исходная фракция белка и изоэзимы	Содержание белка во фракции, мг	Относительная активность, нмоль тиамина / мг ткани	Удельная активность, пмоль тиамина / мг белка	Коэффициент очистки
Растворимые белки до диализа	Исходная фракция белка	0,2079±0,0206	0,0026±0,0003	0,0125±0,0001	1,00
	Изоэзим Rf 0,260	0,0020±0,0002	0,0009±0,0001	0,4500±0,041	36,00
	Изоэзим Rf 0,400	0,0046±0,0005	0,0007±0,0001	0,1522±0,015	12,18
Растворимые белки после диализа	Исходная фракция белка	0,1073±0,011	0,0031±0,0003	0,0289±0,002	1,00
	Изоэзим Rf 0,250	0,0031±0,0003	0,0012±0,0002	0,3871±0,031	13,39
	Изоэзим Rf 0,360	0,0104±0,0013	0,0019±0,0002	0,1827±0,019	6,32
	Изоэзим Rf 0,690	0,0028±0,0003	0,0011±0,0002	0,3929±0,041	13,60
20 % насыщение (NH ₄) ₂ SO ₄	Исходная фракция белка	0,0106±0,002	0,0011±0,0002	0,1038±0,0109	1,00
	Изоэзим Rf 0,440	0,0015±0,0002	0,0017±0,0002	1,133±0,122	10,92
40 % насыщение (NH ₄) ₂ SO ₄	Исходная фракция белка	0,0564±0,006	0,0014±0,0002	0,0248±0,003	1,00
	Изоэзим Rf 0,150	0,0037±0,0004	0,0064±0,0004	1,7297±0,174	69,75
	Изоэзим Rf 0,180	0,0063±0,007	0,0062±0,0003	0,9841±0,098	39,68
	Изоэзим Rf 0,220	0,0121±0,0013	0,0060±0,0003	0,4959±0,050	20,00
	Изоэзим Rf 0,430	0,0140±0,0015	0,0068±0,0002	0,4857±0,049	19,58
	Изоэзим Rf 0,690	0,0152±0,0016	0,0065±0,0005	0,4276±0,047	17,24

Продолжение таблицы 4

60 % насыще- ние (NH ₄) ₂ SO ₄	Исходная фракция белка	0,0697±0,007	0,0011±0,0001	0,0158±0,002	1,00
	Изоzim Rf 0,220	0,0015±0,0002	0,0001±0,00001	0,066±0,008	4,18
	Изоzim Rf 0,430	0,0055±0,0006	0,0023±0,0003	0,418±0,043	26,46
	Изоzim Rf 0,680	0,0085±0,0009	0,0028±0,0003	0,3294±0,034	20,85
80 % насыще- ние (NH ₄) ₂ SO ₄	Исходная фракция белка	0,0012±0,0001	0,0018±0,0002	1,500±0,151	1,00

Спектр множественных форм тиаминпирофосфокиназы, полученный при 60 %-ном насыщении сульфатом аммония, характеризовался в немалигнизированном миометрии наличием «мажорного» быстроподвижного с Rf 0,710 и среднеподвижным «мажорным» белком с Rf 0,380 и одним медленноподвижным белком с Rf 0,250 (табл. 2); в доброкачественной опухоли – наличием одного «мажорного» белка с Rf 0,370 и среднеподвижного с Rf 0,450; малигнизированном миометрии – наличием одного «мажорного» белка с Rf 0,680, одного медленно- и среднеподвижного с Rf 0,220 и 0,430, соответственно.

При 80 %-ном насыщении сульфатом аммония (табл. 2, 3, 4) тиаминпирофосфокиназа была обнаружена только в немалигнизированной ткани: высокоподвижная с Rf 0,720 и среднеподвижная с Rf 0,390.

Анализ удельной активности и коэффициента очистки позволяет отметить важную особенность тиаминпирофосфокиназы, выделенной методом препаративного электрофореза. Обнаружено, что удельная активность индивидуальных форм фермента, выделенных из немалигнизированной и опухолевых тканей зависит от степени насыщения исходного раствора сульфатом аммония (табл. 2, 3, 4). Наибольшая удельная активность, а, следовательно, и коэффициент очистки установлены для фермента, фракционированного при 40 %-ном насыщении сульфатом аммония из злокачественной опухоли и фракционированного при 60%-ном насыщении сульфатом аммония - из доброкачественной опухоли (в 69,75 и 166,67 раз, соответственно). По всей видимости, метод электрофоретического разделения способствует иммобилизации тиаминпирофосфокиназы в ПААГе, которая приводит к конформационным изменениям, способствующим повышению активности и стабильности фермента, что было показано и другими исследователями для других ферментов [10, 18].

Расширение изоформного спектра тиаминпирофосфокиназы, наблюдаемое при озлокачествлении в миометрии совпадает с результатами исследования карбоксипептидазы А в процессе малигнизации яичников [19] и отличается от результатов исследования изоформного спектра гексокиназы при раке желудка [10] и изоформного спектра карбоксипептидазы А при раке эндометрия [16].

ВЫВОДЫ

1. Процесс малигнизации ткани миометрия сопровождается изменением белкового спектра и расширением изоформного состава тиаминпирофосфокиназы.
2. Повышением удельной активности иммобилизованных в полиакриламидном геле изоформ тиаминпирофосфокиназы за счет их конформационных изменений.

Список литературы

1. Weil-Malherbe H. The enzymic phosphorylation of vitamin B1 / H. Weil-Malherbe // J. Biochem. – 1939. – V. 33. – P. 1997-2007.
2. Ochoa S. Enzyme synthesis of cocarboxylase in animal tissues / S. Ochoa // J. Biochem. – 1939. – V. 33, N 9. – P. 1262-1270.
3. Thoai N. Purification of thiamine phosphorylation proteins / N. Thoai, L. Chevillard // Bull. Soc. Chem. Biol. – 1949. – V. 31, N 1. – P. 204-212.
4. Kaziro Y. Studies of thiaminokinase from baker's yeast. Nucleotide specificity / Y. Kaziro // J. Biochem. – 1959. – V. 46, N 12. – P. 1587-1596.
5. Deus B. Radiometric assay procedure for thiamine pyrophosphokinase activity / B. Deus, H. Blum, H. Holzer // Annal. Biochem. – 1969. – V. 27, N 3. – P. 492-501.
6. Mano Y. Studies on enzymatic synthesis of cocarboxylase in animal tissue. Purification and properties of thiaminokinase from rat liver / Y. Mano // J. Biochem. – 1960. – V. 47, N 3. – P. 283-290.
7. Островский Ю.М. Кокарбоксилаза и другие тиаминфосфаты / Ю.М. Островский. – Минск : Наука и техника, 1974. – 256 с.
8. Воскобоев А.И. Биосинтез, деградация и транспорт фосфорных эфиров тиамин / А.И. Воскобоев, И.П. Черникович. – Минск : Наука и техника, 1987. – 200 с.
9. Marshall T. The simplified technique of high resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis: biomedical applications in health and disease / T. Marshall, K. Williams // Electrophoresis. – 1991. – V. 12. – P. 461-471.
10. Шварцман А.Л. О структуре и функциях гекокиназы в раковых клетках человека: автореф. дис. на соискание ученой степени канд. биол. наук : спец. 03.00.04. «Биохимия» / А.Л. Шварцман. – Ленинград, 1975. – 28 с.
11. Всемирная Организация Здравоохранения / Материалы ежегодных отчетов. – Санкт-Петербург, 1981. – 286 с.
12. Ферменты / Под ред. Браунштейна А.Е. – М. : Наука, 1964. – 312 с.
13. Lowry O.H. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.I. Rosenbrough, A.Z. Fan, R.J. Randol // J. Biol. Chem. – 1951. – V. 193. – P. 265-275.
14. Елисеева Г.Д. Флуориметрическое определение тиамин, кокарбоксилазы и рибофлавина в биологических объектах / Г.Д. Елисеева // Витамины. – 1953. – Т. 1. – С. 38-57.
15. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). / Остерман Л.А. – М. : Наука, 1981. – 288 с.
16. Вовчук И.Л. Выделение и идентификация молекулярных форм карбокси пептидазы А опухолевой ткани эндометрия матки женщин / И.Л. Вовчук, В.А. Кучеров, С.А. Петров // Вісник ХНУ. – 2006. – Вип. 4, № 748. – С. 21-32.
17. Арцукевич И.М. Очистка и некоторые свойства тиаминпирофосфокиназы из печени крыс / И.М. Арцукевич, А.И. Воскобоев, Ю.М. Островский // Вопр. мед. химии. – 1977. – Т. 23, № 2. – С. 203-210.
18. Тривен М. Иммобилизованные ферменты / М. Тривен. – М. : Мир, 1983. – 213 с.
19. Вовчук И.Л. Выделение и идентификация изоферментов карбоксипептидазы А из опухолевых тканей яичников / И.Л. Вовчук // Вісник ОНУ. – 2006. – Т. 11, вип. 1. – С. 34-50.

Оришак О.В. Виділення й ідентифікація тіамінпірофосфокінази пухлинної тканини міометрія / **О.В. Оришак, І.Л. Вовчук, В.А. Кучеров, С.А. Петров** // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2012. – Т. 25 (64), № 3. – С. 145-157.

Методом електрофорезу в поліакриламідному гелі вивчені білковий спектр і різноманітність молекулярних форм тіамінпірофосфокінази немалігнізованої та пухлинної тканин міометрія. Розроблений метод виділення ізоформ тіамінпірофосфокінази та ідентифікації їх у гелевому блоці. Вивчені електрофоретичні характеристики ідентифікованих білків. Показано, що процес пухлиноутворення супроводжується змінами білкового та ферментного спектру.

Ключові слова: тіамінпірофосфокінази, ізоформи, електрофорез.

Orishaka O. V. Extracting and identification of thiamine pyrophosphokinase from tumour myometrium tissue / **O.V. Orishaka, I.L. Vovchuk, V.A. Kucherov, S.A. Petrov** // Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No 3. – P. 145-157.

Protein spectrum and molecular forms variety of thiamine pyrophosphokinase from the nonmalignant and tumour myometrium tissues were studied by the method of polyacrylamide gel electrophoresis. A method of extracting thiamine pyrophosphokinase isoenzymes and their identification in gel blocs was elaborated. Electrophoretic characteristics of the identified isoenzymes were studied. It has been shown that malignization process is accompanied by changes in protein and enzyme spectra.

Keywords: thiamine pyrophosphokinase, isoenzymes, electrophoresis.

Поступила в редакцію 14.09.2012 г.