

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ

Государственное учреждение
«Научно-производственный центр
«Институт фармакологии и биохимии
Национальной академии наук Беларуси»

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ
И КЛИНИЧЕСКАЯ
ФАРМАКОЛОГИЯ**

**МАТЕРИАЛЫ
МЕЖДУНАРОДНОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ
КОНФЕРЕНЦИИ**

Гродно, 29-30 сентября 2011 г.

Гродно
2011

УДК 577.1:615(063)

Редакционная коллегия:
П.С. Пронько, П.Т. Петров, В.А. Аверин

Экспериментальная и клиническая фармакология: Материалы международной научной конференции / Отв. ред.: Пронько П.С. – Гродно: 29-30 сентября 2011 г.– Гродно: 2011.– 276 с.

В сборнике представлены материалы международной научно-практической конференции «Экспериментальная и клиническая фармакология», отражающие результаты исследований ученых из Беларуси, России и Казахстана.

Материалы конференции представляют интерес для фармакологов, биохимиков, физиологов, медицинских работников и организаторов здравоохранения, специалистов в области производства лекарственных препаратов, а также аспирантов и студентов факультетов медико-биологического профиля.

УДК 577.1:615(063)

© Коллектив авторов, 2011
© Государственное учреждение
«Научно-производственный центр
«Институт фармакологии и биохимии
Национальной академии наук Беларуси»,
2011

ОБ ОСОБЕННОСТЯХ РЕГУЛЯЦИИ ПРОЦЕССОВ ПРОТЕОЛИЗА НЕОРГАНИЧЕСКИМИ ИОНАМИ ФОСФАТОВ И НУКЛЕОЗИДФОСФАТАМИ

В.Н. Никандров, Н.С. Пыжова

Институт физиологии НАН Беларуси, 220072 Беларусь, Минск, ул. Академическая, 28;

E-mail: nikandrov@fizio.bas-net.by

Протеолитические реакции являются одним из всеобщих и генеральных механизмов биохимической регуляции разнообразных процессов, а также «инструментом» реализации функций например, пищеварения. Без участия этих процессов не обходится практически ни одна функция жизнеобеспечения практически всех живых организмов, а также инициация и(или) генезис большинства основных патологических процессов.

В силу этих причин проблема регуляции протеолитических процессов является одной из наиболее важных междисциплинарных проблем химии, биологии, медицины и ряда отраслей сельского хозяйства.

Среди уровней регуляции протеолитических процессов особенно многообразной является метаболическая регуляция.

В последние десятилетия был открыт путь АТФ-активируемого кверцетин-опосредованного протеолиза, имеющий важное значение для реализации клеточного цикла, а также утилизации внутриклеточных короткоживущих и дефектных белков. В литературе описаны также протеолитические реакции, активируемые АТФ, но не связанные с участием кверцетина.

На протяжении почти 30 лет, исследуя разнообразные процессы протеолиза, мы описали несколько необычных феноменов его проявления.

В настоящей статье частично обобщены результаты наших многолетних исследований влияния биогенных фосфатов на реализацию ряда протеолитических реакций *in vitro*.

Полной неожиданностью для нас явилась стимуляция расщепления белков-субстратов стандартными, хорошо известными протеиназами – трипсином, α -химотрипсином, субтилизином, металлопротеиназой бацилл. Причем эффект в значительной степени зависел от используемого белка. Так, АТР в концентрации 10^{-5} – 10^{-4} М усиливал расщепление трипсином казеина, но не фибриногена, гемоглобина, сывороточного альбумина и желатина [1]. До наших работ была описана активация в присутствии АТР протеолитической активности лишь папаина [2]. Поскольку в литературе пока нет сведений о способности исследуемых протеиназ к аутофосфорилированию, полученные материалы дают лишь повод для размышлений о возможных механизмах такого эффекта. Известно, что в составе ряда протеиназ содержатся остатки фосфата: например, пепсин А свиньи фосфорилирован по Ser⁶⁸, но дефосфорилирование не отражается на энзиматических свойствах образующегося пепсина D. *Следовательно, АТР-активируемый протеолиз является более широко распространенным явлением, чем принято считать.*

В 1987 году нами впервые описано специфическое подавление плазминоген-активаторной функции стрептокиназы АТР и 3',5'АМР: процесс угнетался на 50% при концентрации нуклеотидов, приближающейся к 0,1М [3]. Другие нуклеотиды – ADP, АМР, 2',3'-АМР, GTP, UTP, CTP эффекта не дали. Позднее было установлено угнетение фибринолитической активности протеиназами гриба *Arthrobothrys longa* [4]. В последующем уже на субъединицах фактора роста нервов установлено, что подавление их плазминогенактиваторной способности происходит при концентрации АТР порядка 10^{-4} М [5].

Таким образом, был обнаружен *новый феномен – АТР-ингибируемые реакции протеолиза*. После нас лишь в 2000 г. группа аргентинских исследователей сообщила об аналогичном эффекте АТР на расщепление инсулина протеиназой инсулизином [6]. Систематические исследования на образцах стандартных протеиназ позволили нам установить ингибирование АТР протеолитической активности трипсина, α -химотрипсина, субтилизина, папаина, металлопротеиназы бацилл в диапазоне концентрации нуклеотида 10^{-3} – 10^{-2} М [1], также зависящее от белка-субстрата.

Фибриногенолитическая активность внутриклеточных протеиназ микробных клеток культуры *Corynebacterium diphtheriae* шт. РW-8, выращенных на бульоне Лингуда или бульоне Мартена (обогащенных сывороткой крови), снижалась при рН 10, рН 5 или рН 3 на 27–30%, на 18–20%, или 27–33% соответственно. Независимо от среды культивирования, активность полностью подавлялась о-фенантролином (0,001 М). При этом протеиназы клеток, выращенных на бульоне Лингуда, умеренно (на 25–45%) угнетались в присутствии АТР >GTP = АМР = 2',3'-АМР > 3',5'АМР (но не GDP) в концентрации 0,01 М, тогда как протеиназы клеток, выращенных на бульоне Мартена на 25–35% угнетались GTP > АТР = 2',3'-АМР = GDP [7]. Причем в зависимости от белка-субстрата и нуклеотида подавление протеолитической активности наблюдали при концентрации эффектора 10^5 – 10^6 М.

Еще одним своеобразным явлением в регуляции протеолиза явился так называемый «фосфатный» эффект в протеолизе, который впервые был зафиксирован нами в 1998 г. при изучении фибринолитической активности субклеточных фракций гомогенатов печени и головного мозга мышей [8].

Несмотря на кажущуюся тривиальность вопроса, судя по имеющейся литературе, ранее систематических исследований влияния неорганического ортофосфата на процессы протеолиза не проводилось. Нами было показано, что митохондриальная фракция головного мозга и печени мышей не расщепляла фибрин. Фибринолиз проявлялся в присутствии неорганического ортофосфата [9]. Добавки ADP тоже вели к проявлению

фибринолитической активности, а при добавке $ADP + P_i$ наблюдался эффект неполной аддитивности. Казалось бы, это свидетельствует о стимуляции протеолиза вследствие ресинтеза АТФ. Однако фибринолитическая активность проявлялась и в присутствии разобщающего агента – 2,4-динитрофенола, не снималась цианидом [9].

На отдельных клеточных линиях лимфобластов также продемонстрировано увеличение протеолитической активности в присутствии P_i [4]. Причем, судя по данным ингибиторного анализа, в ряде случаев этот эффект не связан с ресинтезом АТФ. Все это наводит на мысль, что существует независимый от ресинтеза АТФ путь стимуляции протеолиза P_i – «фосфатный эффект». Сущность и распространенность «фосфатного эффекта» остаются практически неизученными.

Исследованиями на стандартных протеиназах и активаторах плазминогена мы продемонстрировали, что неорганический ортофосфат усиливает плазминоген-активаторную способность активаторов плазминогена (стрептокиназы, урокиназы, тканевого активатора из сердца свиньи), в целом, стимулирует расщепление белков сериновыми протеиназами (трипсином, химотрипсином, субтилизином), папаином, металлопротеиназой бацилл, а в низких концентрациях ($>0,005$ М) – и пепсином [1]. Следовательно, авторский феномен «фосфатного эффекта» в протеолизе имеет в своей основе непосредственное воздействие на функциональные свойства протеиназ;

Оказалось также, что ионы неорганического пирофосфата, в целом, стимулируют расщепление ряда белков сериновыми протеиназами. Пирофосфат угнетает расщепление практически всех белков пепсином и металлопротеиназой бацилл. При 10^{-5} – 10^{-3} М пирофосфата отмечены повышение желатино(гемоглобино-, фибриногено)литической активности пепсина, стимуляция активации плазминогена тканевым активатором и стрептокиназой, но начиная с концентрации 10^{-3} М подавляется его активация урокиназой [1].

Более того, соли ортофосфорной кислоты разной степени замещения (NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 и Na_3PO_4) также оказали неодинаковое воздействие расщепление белка-субстрата (на примере лизиса желатина) протеиназами. Наименее эффективен в потенцировании лизиса желатина трипсином был Na_2HPO_4 , тогда как Na_3PO_4 превосходил остальные соли во всем диапазоне концентраций (0,00016–0,01М). Действие Na_3PO_4 и NaH_2PO_4 на расщепление желатина α -химотрипсином принципиально не различалось ($\pm 20\%$ разницы), тогда как Na_2HPO_4 резко уступал этим солям в концентрации $\geq 0,00063$ М. Если в концентрации 0,01М Na_3PO_4 потенцировал протеолиз на 25%, то Na_2HPO_4 подавлял его на 60%. Более сложный характер зависимости наблюдался в экспериментах с остальными четырьмя протеиназами. Однако, в целом, для субтилизина предпочтительны добавки NaH_2PO_4 , которые в диапазоне концентраций 0,00063–0,005М сильнее потенцировали лизис желатина, чем остальные соли. Расщепление желатина папаином подавлялось на 30–35% при добавках Na_2HPO_4 в концентрации $\geq 0,025$ М или Na_2HPO_4 в концентрации 0,00032–0,00125М, но не Na_3PO_4 . Для желатинолиза, катализируемого пепсином или металлопротеиназой, предпочтительны добавки Na_2HPO_4 , тогда как остальные соли в концентрации более 0,0025М подавляли процесс полностью в случае пепсина или на 60–65% в случае металлопротеиназы [10].

Следовательно, эффекты ортофосфата на протеолитические реакции зависят не только от природы протеиназы, расщепляемого белка субстрата, концентрации ортофосфата, но и от вида иона этого эффектора – его состава и свойств. В мировой литературе этот вопрос не раскрыт. Между тем, учитывая, что основным белком тела человека и теплокровных животных является коллаген, а ряд патогенных микроорганизмов продуцирует протеиназы, лизирующие этот белок, полученные данные не только углубляют представления о молекулярных механизмах регуляции протеолиза, но и значимы для разработки подходов к созданию средств подавления патогенного действия протеиназ микроорганизмов.

Выявленные эффекты могут быть использованы в качестве своеобразных зондов дифференциально-диагностического плана. Так, при исследовании активности внеклеточных протеиназ пяти госпитальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* (предоставлены нам сотрудниками лаборатории внутрибольничных инфекций ЦНИЛ Белгосмедуниверситета, штаммы выделены от больных различных стационаров г. Минска) по восьми белкам субстратам в ряде случаев была обнаружена практически одинаковая активность. Например, внеклеточные протеиназы штаммов штаммов **2, 3, 4** практически в одинаковой мере расщепляли желатин (180 ± 6 , 160 ± 10 и 180 ± 9 мм²) и фибриноген быка (100 ± 7 , 110 ± 5 и 100 ± 5 мм²). Однако расщепление фибриногена протеиназами штамма **2** АТР в концентрации 10^{-4} М усиливал на 20%, а в концентрации 10^{-2} М – угнетал на 60%. У штамма **3** отмечены однотипные по направленности изменения протеолиза: +50% и –70% соответственно. Активность внеклеточных протеиназ штамма **4** по этому субстрату подавлялась добавками АТР в концентрации 10^{-3} – 10^{-2} М на 20% и 70% соответственно [11].

Проведенные совместно с НИИ пульмонологии и фтизиатрии Минздрава Республики Беларусь исследования показали [12], что по изменению желатинолитической активности плазмы при добавлении АТР в концентрациях 10^{-5} М, 10^{-4} М и 10^{-3} М образцы плазмы крови доноров могут быть разделены на три группы. При исследовании образцов плазмы пациентов страдающих бронхо-легочными заболеваниями, установлено, что в восьми случаях добавление АТР в указанном диапазоне концентраций вызывает угнетение желатинолитической активности. Установлено, что образцы бронхоальвеолярной лаважной жидкости (БАЛЖ) не расщепляют сывороточный альбумин, казеин, гемоглобин, фибриноген человека или быка, но обладают слабой способностью расщеплять желатин. Как правило, желатинолитическая активность образцов БАЛЖ индифферентна к добавкам ионов кальция в концентрации 0,00006 М, однако может изменяться в присутствии АТР. По характеру сдвигов желатинолитической активности в присутствии АТР БАЛЖ можно разделить на 3 группы: индифферентные к добавкам нуклеотида, подавляемые этими добавками, и активируемые АТР.

Разумеется это лишь первые попытки использования описанных феноменов. Конкретное значение их для физиологии и патологии клетки пока неясны и составляют объемную задачу исследований в перспективе.

Список литературы

1. Пыжова Н.С., Никандров В.Н. Влияние биогенных фосфатов на расщепление белков протеиназами и функцию активаторов плазминогена // Биоорг. химия, 2008, т. 34, № 3, с. 382–391.
2. Pillai S., Zull J.E. // J. Biol. Chem. 1985, vol. 260, № 14, p. 8384–8389.
3. Никандров В.Н., Пыжова Н.С., Вотяков В.И. Влияние адениловых нуклеотидов на активаторную функцию стрептокиназы // Бюлл. эксп. биол. мед. 1987, т. 103, № 7, с. 49–51.
4. Цыманович С.Г., Никандров В.Н., Максимова Р.А., Шаркова Т.С., Андреев Г.В., Серебрякова Т.Н. Физико-химические свойства тромболитического препарата лонголитина // Вопр. мед. химии. 1992, т. 38, № 3, с. 44–45.
5. Никандров В.Н., Пыжова Н.С. Энзиматические свойства фактора роста нервов и его субъединиц // Проблемы медицинской энзимологии: Тр. Всерос. конф. М., 2002, с. 163–164.
6. Camberos M.C., Perez A.A., Udrisa, D.P., Wanderle, M.I., Cresto J.C. // Exp. Biol. Med. 2001, vol. 226, p. 334–341.
7. Никандров В.Н., Пыжова Н.С., Шатило Н.Л. Расщепление белковых субстратов внутриклеточными протеиназами *Corynebacterium diphtheriae* PW-8 // Достижения медицинской науки Беларуси, вып. IX, Минск, 2004, с. 65–66.

8. Никандров В.Н., Пыжова Н.С. Регуляция протеолиза: новые данные о роли активных форм кислорода и биогенных фосфатов // Актуальные вопросы гепатологии. Третий симпозиум гепатологов Белоруссии. Минск: 1998, с. 39.

9. Никандров В.Н., Пыжова Н.С. Нетривиальные проявления протеолиза на молекулярном и клеточном уровнях, их фундаментальное и прикладное значение // Новости медико-биол. наук, 2010, № 3, с. 14–28.

10. Пыжова Н.С., Никандров В.Н. Особенности активации лизиса желатина протеиназами в присутствии солей неорганического ортофосфата // Достижения медицинской науки Беларуси, вып. XII, Минск, 2007, с. 25–26.

11. Никандров В.Н., Пыжова Н.С., Скороход Г.А. Использование необычных феноменов протеолиза для дифференциации штаммов патогенных микроорганизмов // Молекулярная диагностика инфекционных болезней. Междунар. научно-практ. конференция. Материалы конференции. Минск: 2007. С. 217-218.

12. Пыжова Н.С., Никандров В.Н., Лаптева И.М., Жук О.Н. Влияние АТФ на желатинолитическую активность плазмы крови и бронхоальвеолярной лаважной жидкости у больных при заболеваниях органов дыхания // Междунар. конференция. «Протеолиз, механизмы его регуляции и роль в физиологии и патологии клетки. Тезисы докладов». Минск, 2007, с. 65–66.

ON THE FEATURES OF PROTEOLYSIS REGULATION BY PHOSPHATE IONS AND NUCLEOSIDE PHOSPHATES

V.N. Nikandrov, N.S. Pyzhova

Institute of Physiology of NAS of Belarus, 220072 Belarus, Minsk

Results of our own long-term research into the effect of some biogenic phosphates on proteolytic processes were generalized. The essence of the first time described phenomena, ATP inhibiting proteolytic reactions and the phosphate effect in proteolysis, was briefly described. It was demonstrated that ATP-activated proteolytic reactions were more widespread than it had been considered. The fundamental and applied importance of these opened phenomena is discussed.