

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ
БЕЛОРУССКОЕ ОБЩЕСТВО ФИЗИОЛОГОВ



**ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ
ОРГАНИЗМА
В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ**

СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ

*Под общей редакцией
доктора медицинских наук, профессора В. С. Улащика
и доктора биологических наук А. Г. Чумака*

МИНСК
РИВШ
2008

УДК 612.8.04:612.015 (082)

ББК 28.707.3

Ф94

Рекомендовано :
Ученым советом Института физиологии
Национальной академии наук Беларуси
(протокол № 7 от 04.09.2008 г.)

Редакционная коллегия :

д-р мед. наук, проф., чл.-кор. НАН Беларуси (гл. ред.) *В. С. Улащик*;
д-р биол. наук, проф. (ред. разд.) *В. Н. Калюнов*;
д-р мед. наук, профессор, чл.-кор. НАН Беларуси (ред. разд.) *В. А. Кульчицкий*;
д-р биол. наук, проф. (ред. разд.) *В. Н. Никаноров*;
д-р биол. наук (ред. разд.) *А. Г. Чумак*;
д-р биол. наук, проф. *Л. И. Арчакова*;
д-р мед. наук, проф., чл.-кор. НАН Беларуси *Ф. И. Висмонт*;
д-р биол. наук, проф., чл.-кор. НАН Беларуси *В. В. Солтанов*;
д-р мед. наук, проф. *А. И. Кубарко*;
канд. биол. наук (отв. секр.) *В. С. Левковец*;
канд. биол. наук, доц. *А. В. Сидоров*

Рецензенты :

д-р мед. наук, проф., акад. НАН Беларуси *И. П. Антонов*;
д-р мед. наук, проф., чл.-кор. НАН Беларуси *Л. М. Лобанок*;
д-р биол. наук, проф., чл.-кор. НАН Беларуси *Е. И. Слобожанина*

Книга издана при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований

Функциональные системы организма в норме и при патологии :
Ф94 сб. науч. тр. / под ред. В. С. Улащика, А. Г. Чумака. – Минск : РИВШ,
2008. – 454 с.

ISBN 978-985-500-226-1.

Настоящее издание посвящено памяти академика Валерия Николаевича Гурина. Содержит оригинальные и важные материалы по проблемам регуляции функций, полученные физиологами и клиницистами Беларуси, России, Украины и дальнего зарубежья.

Рассчитано на широкий круг медиков и биологов, интересующихся вопросами организации и регуляции процессов жизнедеятельности.

УДК 612.8.04:612.015 (082)

ББК 28.707.3

ISBN 978-985-500-226-1

© Институт физиологии НАН Беларуси, 2008

© Оформление. ГУО «Республиканский институт
высшей школы», 2008

ВЛИЯНИЕ АДЕНОЗИНМОНОСФАТОВ И УРИДИНДИ- ФОСФАТА НА РАСЩЕПЛЕНИЕ БЕЛКОВ ПРОТЕИНАЗАМИ

Н. С. Пыжова², В. Н. Никандров¹

¹Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

²НИИ эпидемиологии и микробиологии Минздрава Республики
Беларусь, Минск, Беларусь

Регуляция физиологических и биохимических процессов пуриновыми и пиримидиновыми нуклеотидами играет важную роль практически во всех живых организмах. Однако эта область физико-химической биологии и медицины остается все еще недостаточно изученной.

В 1987 г. обнаружено специфическое подавление плазминоген-активаторной функции стрептокиназы АТР и 3',5'-АМР: процесс угнетался на 50% при концентрации нуклеотидов, приближающейся к 0,1М [1]. Другие нуклеотиды – АDР, АМР, 2',3'-АМР, GТР, UТР, СТР эффекта не дали. Фибринолитическая протеиназа гриба *Arthrobothrys longa* – “лонголитин” на 75% угнеталась в присутствии 0,01М АТР [2]. Это также достаточно высокая концентрация АТР. Однако дальнейшие исследования плазминогенактиваторной способности β- и γ-субъединиц фактора роста нервов показали, что эффективная концентрация нуклеотида – в пределах 0,0001М [3]. Причем, β-субъединица чувствительнее γ-субъединицы. Эти результаты вылились в описание феномена АТР-ингибируемых реакций протеолиза [4; 5]. В дальнейшем при исследовании расщепления различных белков субстратов сериновыми (трипсином, химотрипсином, субтилизином), цистеиновой – папаином и аспартильной – пепсином протеиназами, а также металлопротеиназой бацилл нами было также показано, что активируемый АТР и неопосредованный кварцетином протеолиз распространен шире, чем считали [6].

Цель настоящего исследования – раскрыть особенности действия аденозинмонофосфатов и уридиндифосфата на расщепление белкового субстрата различными протеиназами.

Материалы и методы. В работе использованы образцы трипсина (КФ 3.4.21.4), α-химотрипсина (КФ 3.4.21.1), пепсина (КФ 3.4.23.1) фирмы «Sigma» (США), папаина (КФ 3.4.22.2), кумасси голубой G-250, АМР, 3',5'- АМР, 2',3'- АМР, UDP фирмы «Fluka» Швейцария, субтилизина *B. subtilis* (КФ 3.4.21.62), металлопро-

теиназы *V. subtilis* (КФ 3.4.24.4) фирмы «Диагностикум», Москва, бактоагар типа «Difco» («Ferak», Германия); желатин («Serva», Германия).

Другие реактивы квалификации «хч» или «чда» были производства стран СНГ, их использовали после соответствующей дополнительной очистки.

Протеолитическую активность определяли по лизису желатина в тонком слое агар-агара как описано ранее [6]. Концентрация белков составляла 10 г/л, агар-агара – 10 г/л. В качестве растворителя для приготовления белково-агаровых пластин использовали 0,05 М трис-НСl буфер рН 7,4 с добавкой нуклеотидов соответствующей концентрации. В качестве растворителя при работе с пепсином использовали 0,2 М ацетатный буфер рН 1,47, при работе с остальными протеиназами и активаторами – 0,05 М трис-НСl буфер рН 7,4. Пластины с нанесенными пробами (10 мкл) инкубировали при 37°C в течение 20 ч. Зоны лизиса визуализировали обработкой белок-агаровых пластин 1 н трихлоруксусной кислотой.

Содержание белка в растворах оценивали по оптическому поглощению при 280 нм, используя соответствующие значения $A_{\text{см}}^{\%}$, приведенные в предыдущей статье [6], а также колориметрическим методом с кумасси G-250 [7].

Все исследования выполнены не менее чем четырехкратно, результаты обработаны статистически с вычислением *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Судя по полученным данным, расщепление желатина трипсином было мало чувствительным к аденозинмонофосфатам: лишь в максимальной концентрации АМР желатинолитическая активность его увеличивалась на 25% (рис.).

В этой же концентрации UDP стимулировал расщепление данного белка трипсином на 35 % (здесь и далее по тексту приведены лишь статистически достоверные ($P \leq 0,05$) изменения). В отличие от трипсина расщепление желатина α -химотрипсином было более чувствительно к добавкам именно циклических АМР и UDP. Так, в концентрации 10^{-6} – 10^{-5} М 3',5'- АМР способствовал увеличению желатинолитической активности химотрипсина на 25–55%, тогда как добавки этого нуклеотида в максимальной концентрации снижали активность на 25%. Действие 2',3'- АМР носило еще более сложный характер: в концентрации 10^{-7} – 10^{-5} М нуклеотид вызвал снижение желатинолитической активности химотрипсина на 25%.

В концентрации 10^{-3} М наблюдалось усиление желатинолиза химотрипсином на 27%, а при максимальной концентрации нуклеотида процесс угнетался на 57%. Добавки UDP во всем концентрационном диапазоне обусловили увеличение интенсивности расщепления желатина этой протеиназой на 22–38%.

Желатинолитическая активность субтилизина на 20–30% угнеталась 5-AMP в диапазоне концентраций 10^{-5} – 10^{-3} М. Добавки 3',5'-AMP, в целом, вызвали интенсификацию расщепления желатина субтилизином на 25–30% за исключением концентрационного диапазона 10^{-6} – 10^{-5} М. Усиление же расщепления желатина этой протеиназой в присутствии 2',3'-AMP наблюдалось в диапазоне концентраций нуклеотида 10^{-5} – 10^{-2} М с максимумом при 10^{-4} М – на 60%. К добавкам UDP данная протеиназа была индифферентна. Действие AMP на желатинолитическую активность папаина также было достаточно слабым: в концентрациях 10^{-7} и 10^{-3} М добавки нуклеотида усиливали расщепление белка на 22 и 25% соответственно, а в концентрации 10^{-5} М угнетали процесс на 25%.

Циклические нуклеотиды влияли еще меньше – лишь в максимальной концентрации 3',5'-AMP (но не 2',3'-AMP) подавлял расщепление желатина папаином на 25%. Слабый эффект наблюдался и при добавках UDP. Лишь в концентрации 10^{-3} М данный нуклеотид повышал желатинолитическую активность папаина на 25%.

С нарастанием концентрации 5-AMP угнетал желатинолитическую активность пепсина практически линейно, особенно заметно при концентрациях 10^{-3} М и 10^{-2} М – на 30% и 60% соответственно. Добавки его в концентрации 10^{-5} – 10^{-3} М подавляли лизис белка на 20–30%. Расщепление желатина пепсином оказалось индифферентным к 3',5'-AMP. Вместе с тем второй циклический нуклеотид, начиная с концентрации 10^{-5} М, угнетал процесс линейно, при максимальной концентрации – на 60%. Эффект UDP был слабым и не превышал 20%.

Желатинолитическая активность металлопротеиназы при добавках любого из трех аденозинмононуклеотидов изменялась на 20–32%, причем в диапазоне концентраций 10^{-4} – 10^{-2} М. Если AMP вызвал угнетение ее, то циклические нуклеотиды – усиление. К добавкам UDP данная протеиназа была индифферентна.

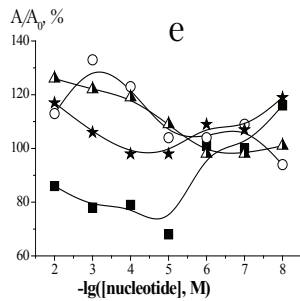
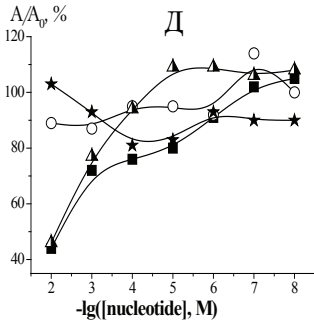
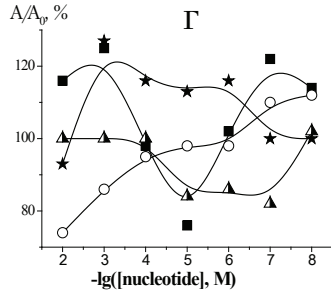
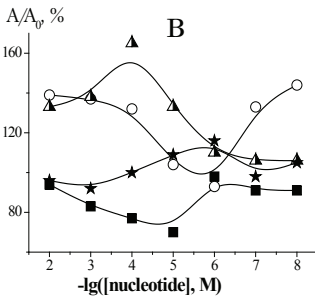
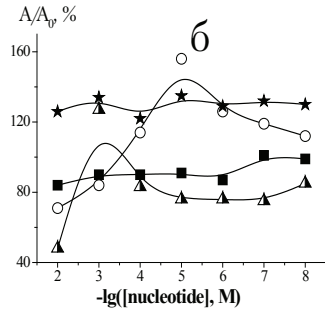
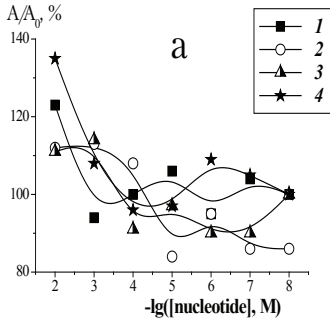


Рис. Изменения расщепления (% к контролю) желатина в тонком слое агарового геля трипсином (а), α -химотрипсином (б), субтилизином (в), папаином (г), пепсином (д) и металлопротеиназой бацилл (д) при добавках AMP (1), 3',5'-AMP (2), 2',3'-AMP (3), UDP (4); n = 5

Желатинолитическая активность металлопротеиназы при добавках любого из трех аденозинмононуклеотидов изменялась на 20–32 %, причем в диапазоне концентраций 10^{-4} – 10^{-2} М. Если АМР вызвал угнетение ее, то циклические нуклеотиды – усиление. К добавкам UDP данная протеиназа была индифферентна.

Полученные материалы свидетельствуют о довольно слабом влиянии исследуемых нуклеотидов на расщепление желатина протеиназами. Эффект АТР был, более силен, но и он проявлялся при максимальной концентрации нуклеотида [6]. Почти такая же картина, за исключением химотрипсина отмечена и для действия ГТР. В ряде моментов на желатинолитическую активность трипсина и химотрипсина существенное влияние оказали добавки GDP. Однако желатин, в целом, не являлся субстратом на котором эффекты нуклеозидфосфатов были выраженными. Как мы уже отмечали, сила эффекта зависит от белка субстрата [5,6]. Поэтому сила выявленных в настоящем исследовании изменений активности протеиназ при воздействии аденозинмонофосфатов и UDP может существенно возрастать при расщеплении иных белков субстратов. Более того, биохимическая ситуация в клетках и тканях значительно сложнее, чем в данном модельном эксперименте, поэтому выявленные эффекты не могут быть оставлены без внимания.

Список литературы

1. Никандров В. Н., Пыжова Н. С., Вотяков В. И. // Бюлл. эксперим. биол. и мед. – 1987. – Т. 103, № 7. – С. 49–51.
2. Цыманович С. Г., Никандров В. Н., Максимова Р. А. и др. // Вопр. мед. химии. – 1992. – Т. 38, № 3. – С. 44–45.
3. Никандров В. Н., Пыжова Н. С. // Проблемы медицинской энзимологии: труды всерос. конф. – М., 2002. – С. 163–164.
4. Никандров В. Н., Пыжова Н. С. // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем / Сб. статей. – Минск, 2004. – Ч. I. – С. 236–238.
5. Nikandrov V. N., Pyzhova N. S. // Cell. Mol. Biol. – 2006. – Vol. 52, № 4. – P. 30–39.
6. Пыжова Н. С., Никандров В. Н. // Биоорган. химия. – 2008. – Т. 34, № 3. – С. 382–391.
7. Bradford M. M. // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.