



УДК 577.112.6:577.152.34

СИНТЕЗ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ФРАГМЕНТОВ ФИБРИНОГЕНА И ИХ ВЛИЯНИЕ НА АКТИВНОСТЬ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

© 2006 г. В. Н. Никандров**, Н. С. Пыжова**, В. П. Голубович*,
О. В. Мельник*, В. П. Мартинович**

*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, 220141, Минск, ул. Акад. Купревича, 5/2;

**Институт физиологии НАН Беларуси, Минск

Поступила в редакцию 30.08.2005 г. Принята к печати 27.10.2005 г.

Синтезированы аналоги фрагментов фибриногена Gly-Pro-Arg и Arg-Gly-Asp: Gly-Pro-Arg-Pro (I), Gly-Pro-Arg-Pro-Met-OMe (II), Gly-Pro-Arg-Pro-Phe (III), Gly-Pro-Arg-Pro-Asp (IV), Gly-Pro-Arg-Pro-Glu (V), Arg-Asn-Trp-Asp (VI). Методом лизиса фибриновых пластин исследовано их влияние на активность протеиназ различных типов. Обнаружено, что все исследованные пептиды ингибировали плазмин (степень ингибирования – 85–60%) и γ -субъединицу фактора роста нервов (55–93%). Тетрапептид (VI) оказался эффективным ингибитором тканевого активатора плазминогена и γ -субъединицы фактора роста нервов (степень ингибирования 96 и 93%). Пептиды практически не влияли на активность урокиназы и умеренно ингибировали активность стрептокиназы (III, IV, VI), папаина (I, II, IV, VI), субтилизина (V и VI), α -химотрипсина (III, V, VI) и металлопротеиназы *Bacillus subtilis* (VI). Соединения ингибировали трипсин (за исключением I и III) при нанесении на фибриновые пластины в концентрации 1×10^{-3} М, при концентрации 1×10^{-4} М пептиды (I) и (II) вызывали повышение протеолитической активности на 35 и 47% соответственно.

Ключевые слова: фибриногена фрагменты, синтез аналогов, влияние на активность протеиназ.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что пептидные фрагменты фибриногена проявляют самостоятельную биологическую активность, в том числе антикоагулянтную, антитромботическую и др. [1, 2]. Их модификации позволяют получать аналоги, часто существенно превосходящие природные пептиды по уровню активности, избирательности действия и энзиматической устойчивости. Наиболее изучены аналоги Arg-Gly-Asp – центра связывания фибриногена и других адгезивных гликопротеинов с мембранным рецепторным комплексом GP IIb/IIIa [3–7] и пептиды на основе последовательности Gly-Pro-Arg, находящейся на аминоконце фибрина [8–10].

Известно, что антикоагулянтное действие Gly-Pro-Arg и его аналога с остатком пролина на С-конце обусловлено их способностью избирательно связываться с определенными участками молекулы фибриногена и блокировать процесс по-

лимеризации фибрин-мономера [9]. Однако структурные особенности большинства аналогов Arg-Gly-Asp и Gly-Pro-Arg позволяют предположить, что суммарный спектр антикоагулянтной или антитромботической активности этих пептидов определяется их взаимодействием с различными протеиназами плазмы крови. В пользу этого предположения свидетельствует обнаруженный в наших экспериментах разный уровень антикоагулянтной активности этих соединений в модельной системе фибриноген-тромбин и непосредственно в плазме крови.

Цель данного исследования – синтез аналогов Gly-Pro-Arg-Pro, модифицированных по С-концу введением остатков дикарбоновых кислот, метионина, фенилаланина, и аналога Arg-Gly-Asp – тетрапептида Arg-Asn-Trp-Asp, обладающего, наряду с антитромботической, также и иммуномодуляторной активностью [11], и исследование их влияния на фибринолитическую активность различных типов протеиназ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Пептиды были синтезированы классическими методами пептидной химии, с использованием протонирования для блокирования гуанидиновой группы аргинина, что позволило исключить ис-

Сокращения: DCC – *N,N'*-дициклогексилкарбодимид; HOBt – 1-гидроксибензотриазол; TEA – триэтиламин; ONSu – сукцинимид-*N*-оксис; Pfp – пентафторфенил; Pcp – пентахлорфенил; ТАП – тканевый активатор плазминогена; ФРН – фактор роста нервов.

Автор для переписки (тел.: +375 (17) 2648263; эл. почта: vermar@iboch.bas-net.by).

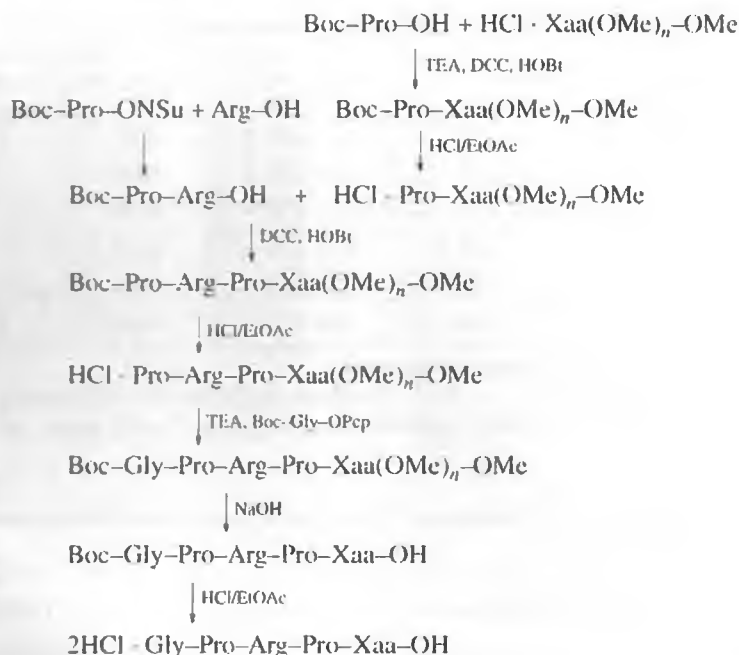


Схема 1. Синтез пептидов общей формулы $2\text{HCl} \cdot \text{Gly-Pro-Arg-Pro-Xaa-OH}$, где Xaa – Met, Phe, Asp или Glu; $n = 0$, когда Xaa – Met или Phe, $n = 1$, когда Xaa – Asp или Glu.

пользовании N^t -производных аргинина и стадии отщепления N^t -защит. С-Концевые дикарбоновые кислоты вводили в реакцию в виде диметил-эфиров. Пептиды общей формулы Gly-Pro-Arg-Pro-Xaa синтезировали по схеме 1, тетрапептид-стандарт Gly-Pro-Arg-Pro был синтезирован по аналогичной схеме, с использованием Pro-OMe в качестве С-концевого фрагмента. На схеме 2 показан синтез пептида Arg-Asn-Trp-Asp, в табл. 1 – основные физико-химические константы синтезированных соединений. Для определения структуры в однородности пептидов применялись методы масс-спектрометрии, ВЭЖХ, ТСХ и др.

При исследованиях влияния пептидов на активность протеиназ было использовано несколько групп протеолитических ферментов. Первая представляет собой узкоспецифичные протеиназы, обладающие способностью активировать плазминоген – это урокиназа, стрептокиназа, γ -субъединица фактора роста нервов (ФРН) и тканевый активатор плазминогена (ТАП).

Плазминоген-активаторную активность оценивали по действию пептидов на плазминоген человека. Для этих экспериментов применяли плазминоген, специфически связанный с фибрином за счет аффинных свойств: этот комплекс всегда присутствует вместе с фибрином в организме и остается в препарате фибрина при выделении, если не использовать специальных методов для извлечения от него.

Вторая группа протеолитических ферментов была представлена сериновыми протеиназами – прежде всего плазмином, а также трипсином, химотрипсином и субтилизином. Из других семейств протеиназ мы исследовали цистеиновую протеиназу – папаин и аспартильную – пепсин, а также металлопротеиназу из *Bacillus subtilis*. При

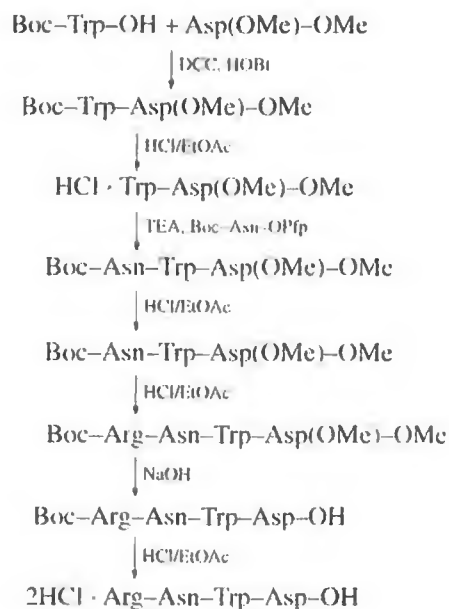


Схема 2. Схема синтеза пептида $2\text{HCl} \cdot \text{Arg-Asn-Trp-Asp-OH}$.

Таблица 1. Физико-химические характеристики синтезированных соединений

Пептид	$[\alpha]_D^{20}$	Т. пл., °С	R_f (А)**	R_f (Б)**	R_f^{***} , мин
Gly-Pro-Arg-Pro-OH · 2HCl (I)	-75	123–125	0.20	0.05	7.332
Gly-Pro-Arg-Pro-Met-OMe · 2HCl (II)	-112	118–121	0.62	0.26	15.061
Gly-Pro-Arg-Pro-Phe-OH · 2HCl (III)	-73	175–178	0.74	0.13	19.205
Gly-Pro-Arg-Pro-Asp-OH · 2HCl (IV)	-42	178–181	0.13	0.25	28.171
Gly-Pro-Arg-Pro-Glu-OH · 2HCl (V)	-78	133–136	0.18	0.10	21.836
Arg-Asn-Trp-Asp-OH · 2HCl (VI)	-56	141–143	0.38	0.32	20.149

* Концентрация пептидов – 10 мг/мл, растворитель – метанол.

** (А) – *n*-бутанол–уксусная кислота–вода 4 : 1 : 1; (Б) – хлороформ–метанол–20%-ный аммиак 6 : 4 : 1.

*** R_f – время удерживания (аналитическую ВЭЖХ проводили как описано в “Эксперимент. части”).

Таблица 2. Влияние олигопептидов на плазминоген-активаторную способность активаторов плазминогена урокиназы, ТАП и γ -субъединицы ФРН

Пептид	С, М	Стрептокиназа	Урокиназа	ТАП	γ -Субъединица ФРН
Gly-Pro-Arg-Pro-OH (I)	10^{-3}	173 ± 17 (0.87)	не исслед.	$462 \pm 15^*$ (1.28)	324 ± 11 (1.03)
	10^{-2}	157 ± 21 (0.79)	282 ± 12 (1.02)	$491 \pm 20^*$ (1.36)	$113 \pm 14^*$ (0.36)
Gly-Pro-Arg-Pro-Met-OMe (II)	10^{-3}	173 ± 14 (0.87)	не исслед.	343 ± 10 (0.95)	296 ± 8 (0.94)
	10^{-2}	167 ± 17 (0.84)	290 ± 11 (1.05)	$188 \pm 10^*$ (0.52)	$32 \pm 6^*$ (0.10)
Gly-Pro-Arg-Pro-Phe-OH (III)	10^{-3}	$155 \pm 12^*$ (0.78)	не исслед.	350 ± 11 (0.97)	296 ± 20 (0.94)
	10^{-2}	175 ± 14 (0.88)	301 ± 13 (1.09)	$188 \pm 17^*$ (0.52)	$138 \pm 9^*$ (0.44)
Gly-Pro-Arg-Pro-Asp-OH (IV)	10^{-3}	$155 \pm 8^*$ (0.78)	не исслед.	332 ± 0 (0.92)	305 ± 10 (0.97)
	10^{-2}	221 ± 11 (1.10)	282 ± 7 (1.02)	$108 \pm 10^*$ (0.30)	$139 \pm 13^*$ (0.44)
Gly-Pro-Arg-Pro-Glu-OH (V)	10^{-3}	161 ± 16 (0.81)	не исслед.	332 ± 11 (0.92)	295 ± 8 (0.94)
	10^{-2}	163 ± 14 (0.82)	268 ± 9 (0.97)	$274 \pm 13^*$ (0.76)	$85 \pm 6^*$ (0.27)
Arg-Asn-Trp-Asp-OH (VI)	10^{-3}	176 ± 16 (0.88)	не исслед.	332 ± 24 (0.92)	280 ± 15 (0.89)
	10^{-2}	$155 \pm 10^*$ (0.78)	257 ± 8 (0.93)	$14 \pm 4^*$ (0.04)	$22 \pm 7^*$ (0.07)
Контроль	–	199 ± 10	276 ± 9	361 ± 17	315 ± 13

Примечание. Условия эксперимента: 0.06 М фосфатный буфер pH 7.4, *n* 5, 37°С, 20 ч; показана площадь зон лизиса фибриновых пластин (S_0 , мм²); в скобках приведено соотношение площадей лизиса S_0/S_k , где S_k – результат контрольного эксперимента.

* $p \leq 0.05$.

исследовании этих протеиназ в качестве субстрата использовали фибриновые пластины, не содержащие функционально активного плазминогена – он был инактивирован УФ-облучением по специальной методике [12].

Синтезируемые пептиды (I)–(VI) оказали действие на активность протеиназ в зависимости от характера протеиназы и структуры пептида. Исследования были проведены при использовании двух рабочих концентраций пептидов – 1×10^{-2} и 1×10^{-3} М. Подавление протеолитической активности наблюдалось в основном при концентрации пептидов 10^{-2} М (табл. 2–4).

Результаты исследования влияния пептидов на плазминоген-активаторную активность приведены в табл. 2. В отношении урокиназы соединения были практически не активны – величины эф-

фектов не превышали 10% при их концентрации 1×10^{-2} М. В отношении стрептокиназы наблюдалось умеренное ингибирование активности тетрапептидами (I) и (VI). Следует отметить, что при снижении концентрации пептида на порядок активность пентапептида (IV) выросла примерно на 30% ($p \leq 0.05$). На два других представителя этой группы – γ -субъединицу ФРН и ТАП, исследуемые пептиды в концентрации 1×10^{-2} М оказали сильное действие: плазминоген-активаторную активность γ -субъединицы ФРН пентапептид (II) и тетрапептид (VI) ингибировали на 90–95%. При уменьшении концентрации на порядок эффект исчезал.

Особенно интересные эффекты были обнаружены в экспериментах с ТАП – среди исследуемых соединений – тетрапептид (VI) оказался эффек-

Таблица 3. Фибринолитическая активность различных протеиназ в присутствии олигопептидов

Пептид	С. М	Трипсин	Химотрипсин	Плазмин	Субтилизин	Папаин	Пепсин	Металлопротеиназа <i>B. subtilis</i>
(I)	10^{-3} 10^{-2}	$311 \pm 11^*$ (1.35) 191 ± 13 (0.83)	164 ± 10 (0.90) $146 \pm 7^*$ (0.80)	не исслед. $42 \pm 4^*$ (0.33)	не исслед. 138 ± 6 (0.94)	105 ± 10 (1.11) $71 \pm 0^*$ (0.75)	52 ± 6 (1.13) $36 \pm 2^*$ (0.78)	не исслед. 48 ± 3 (0.94)
(II)	10^{-3} 10^{-2}	$338 \pm 15^*$ (1.47) $179 \pm 7^*$ (0.78)	164 ± 9 (0.90) 155 ± 11 (0.85)	$161 \pm 0^*$ (1.27) $51 \pm 7^*$ (0.40)	не исслед. 153 ± 12 (1.04)	80 ± 7 (0.84) $72 \pm 4^*$ (0.76)	49 ± 5 (1.07) $35 \pm 3^*$ (0.76)	не исслед. 53 ± 0 (1.04)
(III)	10^{-3} 10^{-2}	246 ± 8 (1.07) 191 ± 16 (0.83)	167 ± 14 (0.92) $137 \pm 8^*$ (0.75)	не исслед. $39 \pm 0^*$ (0.31)	не исслед. 155 ± 8 (1.05)	89 ± 6 (0.94) 90 ± 4 (0.95)	50 ± 5 (1.09) $32 \pm 1^*$ (0.70)	не исслед. 55 ± 8 (1.08)
(IV)	10^{-3} 10^{-2}	239 ± 10 (1.04) $161 \pm 9^*$ (0.70)	153 ± 13 (0.84) $142 \pm 9^*$ (0.78)	не исслед. $19 \pm 3^*$ (0.15)	не исслед. 123 ± 7 (0.84)	84 ± 4 (0.88) $63 \pm 4^*$ (0.66)	52 ± 5 (1.13) $25 \pm 2^*$ (0.54)	не исслед. 43 ± 6 (0.84)
(V)	10^{-3} 10^{-2}	223 ± 8 (0.97) $106 \pm 7^*$ (0.46)	149 ± 22 (0.82) $137 \pm 0^*$ (0.75)	не исслед. $21 \pm 4^*$ (0.17)	не исслед. $119 \pm 5^*$ (0.81)	85 ± 7 (0.89) 90 ± 7 (0.95)	52 ± 4 (1.13) $64 \pm 3^*$ (1.37)	не исслед. 41 ± 4 (0.80)
(VI)	10^{-3} 10^{-2}	281 ± 23 (1.22) $143 \pm 11^*$ (0.62)	156 ± 12 (0.86) $113 \pm 10^*$ (0.62)	не исслед. $20 \pm 11^*$ (0.16)	не исслед. $110 \pm 5^*$ (0.75)	101 ± 10 (1.06) $64 \pm 3^*$ (0.67)	49 ± 1 (1.07) $25 \pm 2^*$ (0.54)	не исслед. $38 \pm 1^*$ (0.75)
Контроль	–	230 ± 11	182 ± 9	127 ± 6	147 ± 10	95 ± 5	46 ± 3	51 ± 3

Примечание. Условия эксперимента: для пепсина 0.2 М ацетатный буфер pH 1.47, для остальных протеиназ – 0.06 М фосфатный буфер pH 7.4; 37°C, n 4. Остальные пояснения см. под табл. 2.

* $p \leq 0.05$

Таблица 4. Фибринолитическая активность трипсина через 2 ч от начала инкубации пластины фибринового геля в присутствии пептидов (10^{-2} М)

Пептид	S_0 , мм ²
(I)	69 ± 3
(II)	$35 \pm 4^*$
(III)	73 ± 2
(IV)	71 ± 0
(V)	0*
(VI)	0*
Контроль	71 ± 4

Примечание. Условия эксперимента: n 4, 37°C , 0,06 М фосфатный буфер.

* $p \leq 0,05$.

тивным ингибитором, а тетрапептид (I) проявил стимулирующий эффект. Поскольку субстратная специфичность ТАП связана с остатком аргинина субстрата [13], действие пептидов в определенной мере может быть обусловлено наличием в них остатка аргинина. Следует отметить, что эффект пептидов вызван воздействием именно на белок-активатор, а не на образующийся в ходе активации плазмина. В пользу этого свидетельствует весьма слабое действие пептидов на фибринолиз, инициированный стрептокиназой или урокиназой (или его полное отсутствие).

Все исследуемые пептиды оказали влияние на активность сериновых протеиназ, наиболее выраженными были эффекты при концентрации пептидов 10^{-2} М (табл. 3). При указанной концентрации активность трипсина угнеталась пептидами (II), (IV), (V) и (VI) на 22, 30, 54 и 48% соответственно. При на порядок меньшей концентрации пептидов наблюдалось даже увеличение фибринолитической активности трипсина – соединения (I), (II) и (VI) повышали ее на 35, 47 и 22% (в последнем случае достоверных изменений не выявлено, наблюдалась лишь тенденция).

При концентрации 10^{-2} М соединения (I), (III), (IV), (V) и (VI) подавляли фибринолитическую активность α -химотрипсина на 20, 25, 22, 25 и 38% соответственно. При уменьшении концентрации на порядок пептиды практически не оказывали сколько-нибудь существенного влияния на активность данной протеиназы.

Наиболее заметно действие пептидов проявлялось на фибринолитическую активность плазмина: при концентрации эффекторов 10^{-2} М эта активность угнеталась на 60–85%, причем наиболее сильное подавление активности вызвано соединениями (IV)–(VI) – на 83–85%. Такое сильное действие в сравнении с действием на трипсин и α -химотрипсин может объясняться несколькими причинами, в том числе наличием в молекуле плазмина бензамидинсвязывающего сайта, который, возможно, обеспечивает связывание с после-

дующими пептидами, а также особенностями субстратной специфичности этой протеиназы: предпочтительным расщеплением пептидных связей, образованных остатками лизина и аргинина [14].

На активность сериновой протеиназы иного подсемейства – субтилизина незначительное ингибирующее действие оказали при концентрации 10^{-2} М только пептиды (V) и (VI), вызывая снижение активности на 19–25% ($p \leq 0,05$).

Столь же слабым был эффект пептидов на активность цистеиновой протеиназы – папаина. Только при концентрациях 10^{-2} М отмечено угнетение активности (за исключением (III) и (V)), которое не превышало 24–33% ($p \leq 0,05$).

Несколько неожиданное и разноплановое влияние оказали пептиды на активность пепсина. Во всех случаях оно также проявлялось лишь при концентрации пептидов 10^{-2} М, причем угнетение активности соединениями (I)–(III) составило 22–30%, тогда как при действии пептидов (IV) и (VI) достигалось практически 50%-ное снижение активности. Вместе с тем пептид (V) вызвал небольшое, но отчетливое увеличение протеолитической активности на 37% ($p \leq 0,05$).

Следует отметить, что хотя наиболее сильное действие исследуемые пептиды оказали на активность плазмина (выше были указаны возможные причины), из данных литературы о структуре пепсина не следует ни наличия бензамидинсвязывающего сайта, ни субстратной специфичности, подобной плазминовой. Однако нами при исследовании влияния пептидов на активность протеиназ взят лишь один белковый субстрат, исходя главным образом из отношения структуры синтезированных пептидов к фибриногену. Это вовсе не означает, что при использовании другого белка-субстрата вся описанная картина сохранится. Более того, в силу своей природы синтезированные пептиды в той или иной мере могут расщепляться различными протеиназами. В какой-то степени это иллюстрируется влиянием пептидов на фибринолитическую активность трипсина в начальной фазе протеолиза – через 2 ч (табл. 4). Так, пептид (II) (Gly-Pro-Arg-Pro-Met-OMe) вызвал угнетение активности трипсина на 50%, а пептиды (V) и (VI) (Gly-Pro-Arg-Pro-Glu-OH и Arg-Asn-Trp-Asp) практически полное ее подавление. Из сопоставления этих результатов видно, что в начальный период данные пептиды оказывали больший эффект. Вместе с тем пептид (IV) (Gly-Pro-Arg-Pro-Asp-OH) не вызвал сколько-нибудь заметного изменения фибринолитической активности, тогда как через 20 ч наблюдалось небольшое, но отчетливое ее снижение. Это позволяет думать, что в реализации действия пептидов на активность протеиназ участвуют несколько различных по механизму путей.

Итак, дана предварительная характеристика влияния полученных олигопептидов на плазминоген-активаторную способность четырех активаторов плазминогена и фибринолитическую активность различных протеиназ. Обнаруженные

ингибиторы ТАП и γ -субъединицы ФРН могут быть использованы для разработки аффинной хроматографии этих протеиназ. На фибринолитическую активность протеиназ исследуемые соединения, в целом, оказали умеренное воздействие. Оно было более сильным лишь в отношении плазмина (60–85% угнетения активности) и довольно слабо выраженным в случае субтилизина и металлопротеиназы из *B. subtilis*. Несколько неожиданным явилось подавление рядом синтезированных пептидов активности пепсина, а также возрастание активности трипсина при более низких концентрациях пептидов (I) и (II). Раскрытие возможных причин подобных явлений, как и действие пептидов на расщепление протеиназами других белковых и низкомолекулярных субстратов, составляет предмет наших дальнейших исследований.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы L-аминокислоты и их производные (Reanal, Венгрия; Fluka, Швейцария; Sigma, США). Процессы синтеза соединений, удаления защитных групп контролировали методом ТСХ на пластинках с закрепленным слоем силикагеля (Sorbfil, Россия) в системах растворителей: хлороформ–метанол–25%-ный раствор аммиака, 60 : 40 : 10 (А); бутанол–уксусная кислота–вода, 40 : 10 : 10 (Б); изопропанол–уксусная кислота–вода, 40 : 10 : 10 (В). Вещества обнаруживали на пластинках с помощью хлор-бензидинового реагента.

Масс-спектры FAB записаны на приборе PE SCIEX API 150EX (Perkin Elmer, США), ионизация осуществлялась пучком электронов с энергией 40 эВ.

Аналитическую ВЖЭХ проводили на хроматографе фирмы "Waters" (Millennium³², 966 фотодиодный детектор, колонка Vydac 201HS52 RP C18 (2.1 × 250 мм)). Используемый градиент концентраций – от 10 до 40% ацетонитрила в воде с добавлением 0.1% TFA. Скорость потока 1 мл/мин.

Аминокислотный состав пептидов, гидролизированных в запаянных ампулах с 6 н. HCl при 110°C в течение 20 ч, проводили на автоматическом аминокислотном анализаторе LMV (Швеция).

Температуры плавления (некорректируемые) определяли на приборе Кофлера. Оптическую плотность исследуемых соединений измеряли на спектрофотометре J-20 (Jasco, Япония).

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) фирмы "Fluka" Швейцария, урокиназы (КФ 3.4.21.73) (J.C.R., Япония), стрептокиназы ОАО "Белмедпрепараты" (Беларусь), субтилизина *B. subtilis* (КФ 3.4.21.62), металлопротеиназы

B. subtilis (КФ 3.4.24.4) фирмы "Диагностикум", Москва.

ТАП выделяли из ткани свежего сердца свиньи, высушенного ацетоном и эфиром, путем экстракции 0.1 н. HCl, осаждения активной фракции при pH 6.2 и осаждения белков сульфатом аммония по ранее разработанной методике [15]. Плазмин (КФ 3.4.21.7) получали из фракции Кона III₂₋₃ человеческой плазмы крови (из партий, в которых исходно определена высокая активность плазмина) методом аффинной хроматографии на колонке с лигнине-сефарозой [16]. Удельная активность используемых образцов плазмина составляла 20 казеннолитических ед./мг белка. Образцы были получены при электрофорезе в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, а после обработки 2-меркаптоэтанолом характеризовались двумя полосами, соответствующими легкой и тяжелой цепям плазмина.

Олигомер ФРН получали из гомогенатов подчелюстных слюнных желез самцов белых мышей методом солевого осаждения и хроматографии [17]. Образцы были гомогенны при электрофорезе в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия и имели специфическую активность 3.4×10^4 биологических ед./мг белка. γ -Субъединицу ФРН выделяли путем закисления раствора и гель-хроматографии на сефадексе G-100 [18]. В работе использовали также фибриноген человека и тромбин производства НИИ гематологии и переливания крови МЗ РБ, BrCN-сефарозу, реагенты для электрофореза – Sigma, США.

Плазминоген-активаторную способность активаторов плазминогена определяли методом лизиса плазминогенсодержащих фибриновых пластин, а для определения фибринолитической активности протеиназ использовали фибриновые пластины, подвергнутые УФ-облучению и не содержащие функционально активного плазминогена. Подробно определение плазминоген-активаторной и фибринолитической активности (в мм² площади зон лизиса фибринового геля) описано нами ранее [12, 19, 20]. В качестве растворителя при работе с пепсином использовали 0.2 М ацетатный буфер pH 1.47, при работе с остальными протеиназами и активаторами – 0.06 М фосфатный буфер pH 7.4.

К растворам энзимов добавляли аликвоты водных растворов исследуемых пептидов до их конечной концентрации 1×10^{-3} – 1×10^{-2} М, а в контрольные пробы – соответствующее количество деионизованной воды. Пластины с нанесенными образцами инкубировали при 37°C в течение 20 ч.

Содержание белка в растворах оценивали по оптическому поглощению при 280 нм, используя следующее значение $A_{\text{см}}$: плазмин 17.0 [21], стрептокиназа 9.0 [22], фибриноген человека 16.0 [23], трипсин быка 14.4 [24], химотрипсин быка 20.0 [25], папаин 25.0 [26], пепсин свиньи 14.0 [27].

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Laudano A.P., Doolittle R.F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1978. V. 75. P. 3085–3089.
2. Plow E.F., Pierschbacher M.D., Ruoslahti E., Marguerie G.A., Ginsberg M.H. // *Blood*. 1987. V. 70. P. 110–115.
3. Zablocki A.F., Miyano M., Rao S.N., Panzer-Knodle S., Nicholson N., Feigen L. // *J. Med. Chem.* 1992. V. 35. P. 4914–4917.
4. Cheng S., Craig W.S., Mullen D., Tschopp J.F., Dixon D., Pierschbacher M.D. // *J. Med. Chem.* 1994. V. 37. P. 1–8.
5. Bogdanovich-Knipp S.J., Chakrabarti S., Williams T.D., Dillman R.K., Siahaan T.J. // *J. Peptide Res.* 1999. V. 53. P. 530–541.
6. Song X., Xu C.R., He H.T., Siahaan T.J. // *Bioorg. Chem.* 2002. V. 30. P. 285–301.
7. Крысько А.А., Маловичко О.Л., Кабанова Т.А., Мазепа А.В. // *Биоорганическая химия*. 2004. Т. 30. С. 594–598.
8. Левицкая Н.Г., Клейменов Л.Н., Петросян М.Т., Розенфельд М.А., Калихевич В.Н., Ардемасова З.А. // *Бюлл. эксп. биол. мед.* 1988. Т. 104. С. 190–192.
9. Laudano A.P., Doolittle R.F. // *Biochemistry*. 1980. V. 19. P. 1013–1019.
10. Kawasaki K., Tsuji T., Hirase K. // *Chem. Pharm. Bull.* 1991. V. 39. P. 584–589.
11. Янченко В.В., Мартинович В.П., Мельник О.В., Голубович В.П., Новиков П.Д., Новиков Д.К., Шпретха К.Г. // *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. 2004. № 3. С. 22–32.
12. Никандров В.Н., Пыжова Н.С., Вотяков В.И. // *Вопр. мед. химии*. 1987. Т. 33. С. 84–87.
13. Madison E.L., Coombs G.S., Corey D.R. // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 7558–7562.
14. Никандров В.Н. // *Новости медицины-биологии*. 2004. № 3. С. 127–146.
15. Андреев Г.В., Мизалина Л.А. // *Биохимия*. 1974. Т. 36. С. 685–689.
16. Brockway W.J., Castellino F. // *J. Biol. Chem.* 1971. V. 246. P. 4641–4647.
17. Буравский В.А., Горбунова Н.Б., Колтунов В.В., Лукашевич В.С., Полукошко Е.Ф. // *Изв. АН БССР. Сер. биол. наук*. 1984. № 4. С. 79–84.
18. Лукашевич В.С. // *Изв. АН БССР. Сер. биол. наук*. 1987. № 3. С. 80–82.
19. Pyzhova N.S., Nikandrov V.N., Nikandrov N.N. // *Thromb. Res.* 1996. V. 82. P. 303–312.
20. Никандров В.Н., Пыжова Н.С. Способ определения активаторов плазминогена. А.с. СССР 1472508. 1988.
21. Wohl R.C., Arzadon L., Summania L., Robbins K. // *J. Biol. Chem.* 1977. V. 252. P. 1141–1147.
22. Kirschenbaum D.M. // *Anal. Biochem.* 1975. V. 68. P. 465–484.
23. Cederholm-Williams S.A., Swain A. // *Thromb. Res.* 1979. V. 16. P. 705–713.
24. Мосолов В.В. Протеолитические ферменты. М.: Наука, 1971. 414 с.
25. Sluiterman L.A., Wijdenes J. // *Biochem. Biophys. Acta*. 1970. V. 200. P. 593–595.
26. Городецкий Д.И., Мясоедов Н.Ф., Степанов В.М. // *Биохимия*. 1975. Т. 40. С. 1305–1311.
27. Bradford M.M. // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248–254.

Synthesis of Modified Fragments of Fibrinogen and Their Effect on the Activity of Proteolytic Enzymes

V. N. Nikandrov^b, N. S. Pyzhova^b, V. P. Golubovich^a, O. V. Mel'nik^a, and V. P. Martinovich^{a,†}

[†] Phone: +375 (17) 2648263; e-mail: vermar@iboch.bas-net.by

^a Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, ul. akademika Kuprevicha 5/2, Minsk, 220141 Belarus

^b Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Belarus, ul. Akademicheskaya 28, Minsk, 220141 Belarus

New analogues of the Gly-Pro-Arg and Arg-Gly-Asp fragments of fibrinogen were synthesized: Gly-Pro-Arg-Pro (I), Gly-Pro-Arg-Pro-Met-OMe (II), Gly-Pro-Arg-Pro-Phe (III), Gly-Pro-Arg-Pro-Asp (IV), Gly-Pro-Arg-Pro-Glu (V), and Arg-Asn-Trp-Asp (VI). Their effect on the activity of proteases of various types was studied with the method of lysis of fibrin plates. All the peptides were found to inhibit plasmin activity (by 60–85%) and the γ -subunit of nerve growth factor (by 55–93%). Tetrapeptide (VI) proved to be an effective inhibitor of tissue activator of plasminogen and the γ -subunit of nerve growth factor (by 96 and 93%, respectively). The peptides exerted practically no effect on the activity of urokinase and moderately inhibited the activity of streptokinase [(III), (IV), and (VI)], papain [(I), (II), (IV), and (VI)], subtilisin [(V) and (VI)], α -chymotrypsin [(III), (V), and (VI)], and *Bacillus subtilis* metalloprotease (VI). They inhibit trypsin [except for (I) and (III)] when applied on fibrin plates at a concentration of 1×10^{-2} M, while, at a concentration of 1×10^{-3} M, (I) and (II) induced an increase in proteolytic activity by 35 and 47%, respectively.

The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2006, vol. 32, no. 1; see also <http://www.maik.ru>

Key words: fragments of fibrinogen, synthesis of analogues, effect on activity of proteases