



УДК 577.151.042 : 577.334

ВЛИЯНИЕ БИОГЕННЫХ ФОСФАТОВ НА РАСЩЕПЛЕНИЕ БЕЛКОВ ПРОТЕИНАЗАМИ И ФУНКЦИЮ АКТИВАТОРОВ ПЛАЗМИНОГЕНА

© 2008 г. Н. С. Пыжова*, В. Н. Никандров**#

*НИИ эпидемиологии и микробиологии Минздрава Республики Беларусь, Минск;

**Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, 220072 ул. Академическая, 28

Поступила в редакцию 10.07.2007 г. Принята к печати 19.07.2007 г.

Методом лизиса фибриновых пластин и пяти белков субстратов в тонком слое агарового геля показано, что неорганический ортофосфат (0.001–0.06 М) усиливал на 50–250% активаторную функцию стрептокиназы, урокиназы, тканевого активатора плазминогена и, в целом, – в 1.2–12.0 раз усиливал лизис ряда белков трипсином, α -химотрипсином, субтилизином, папаином, металлопротеиназой бацилл, а при концентрации <4 мМ – и пепсином. В большей концентрации фосфат резко угнетал активность пепсина и подавлял на 40–50% лизис желатина папаином, желатина (в максимальной концентрации) и казеина металлопротеиназой. Ионы неорганического пирофосфата (10^{-8} – 10^{-1} М) усиливали на 20–400% расщепление ряда белков сериновыми протеиназами, а в концентрации 10^{-5} – 10^{-3} М – и активность пепсина, функцию тканевого активатора плазминогена и стрептокиназы на 100 и 40%. Пирофосфат при концентрации $>10^{-3}$ М и $>10^{-4}$ М угнетал лизис практически всех белков соответственно пепсином и металлопротеиназой. АТР в концентрации $\leq 10^{-3}$ М на 20–60% усиливал лизис казеина сериновыми протеиназами, металлопротеиназой, пепсином (также и при 10^{-2} М на 30–260%). При концентрации 10^{-2} М он угнетал на 20–100% расщепление ряда белков трипсином, химотрипсином, папаином, металлопротеиназой, а в концентрации 10^{-3} М – лизис альбумина пепсином и белков (кроме фибриногена) металлопротеиназой. При концентрации ГТР 10^{-7} – 10^{-2} М на 20–90% повышалось расщепление ряда белков сериновыми протеиназами, папаином и лизис желатина пепсином, а лизис альбумина этими энзимами угнетался на 40–70%. При [ГТР] 10^{-6} – 10^{-5} М слабо росло расщепление гемоглобина и казеина металлопротеиназой бацилл, при $\geq 10^{-3}$ М ее активность подавлялась на 20–50%. АDP усиливал на 80–130% лизис желатина трипсином, казеина пепсином и папаином, подавлял активность металлопротеиназы на 20–100% (при $\geq 10^{-3}$ М). Выявлены особенности воздействия АМР, GD(M)P на лизис желатина.

Ключевые слова: ортофосфат; пирофосфат; нуклеозидфосфаты; активность протеиназ; активаторная функция урокиназы, стрептокиназы, тканевого активатора.

ВВЕДЕНИЕ

Физико-химические механизмы реализации протеолитических реакций и их регуляция на молекулярном и клеточном уровне все еще далеки от полной ясности.

Так, неясна роль ионов неорганического фосфата в регуляции протеолиза; несмотря на кажущуюся тривиальность вопроса, данные литературы фрагментарны. Ранее показано, что митохондриальная фракция головного мозга и печени мышцей не расщепляла фибрин. Фибринолиз проявлялся в присутствии P_i [1–3]. Добавки АDP тоже вели к проявлению фибринолитической активности, а в присутствии АDP + P_i наблюдался эффект неполной аддитивности. Казалось бы, это свидетельствует о стимуляции протеолиза

вследствие ресинтеза АТР. Однако фибринолитическая активность проявлялась и в присутствии разобщающего агента – 2,4-динитрофенола, не снималась цианидом [2, 3]. 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 АТР. Все это наводит на мысль, что существует независимый от ресинтеза АТР путь стимуляции протеолиза P_i – “фосфатный эффект”. Сущность и распространенность “фосфатного эффекта” остаются практически неизученными.

В 1987 г. описано специфическое подавление плазминогенактиваторной функции стрептокиназы АТР, а также 3',5'-АМР: процесс угнетался на 50% при концентрации нуклеотидов, приближающейся к 0.1 М [5]. Другие нуклеотиды – АDP, АМР, 2',3'-АМР, ГТР, УТР, СТР эффекта не дали. Попытки связать это свойство с возможно-

Сокращения: P_i – неорганический ортофосфат; PP_i – неорганический пирофосфат; BSA – бычий сывороточный альбумин.

Автор для связи (тел.: +375 (17) 2841759; эл. почта: nikan-drov@fizio.bas-net.by).

Таблица 1. Расщепление белков-субстратов различными протеиназами в тонком слое агарового геля (мм^2 зон лизиса)

Субстрат	Трипсин	Химотрипсин	Субтилизин	Папаин	Пепсин	Металлопротеиназа <i>B. megaterium</i>
Фибриноген	156 ± 10	122 ± 7	274 ± 18	76 ± 6	122 ± 8	118 ± 7
Казеин	347 ± 19	415 ± 24	512 ± 33	289 ± 18	193 ± 12	388 ± 14
Гемоглобин	140 ± 5	161 ± 9	198 ± 8	83 ± 11	151 ± 7	172 ± 10
Желатин	462 ± 9	309 ± 13	514 ± 21	154 ± 9	120 ± 11	588 ± 22
Сывороточный альбумин	212 ± 10	302 ± 11	215 ± 8	146 ± 6	286 ± 6	20 ± 3

Условия эксперимента: концентрация белков в агаровом геле – 10 г/л, концентрация протеиназ – 0.3 г/л, объем наносимого образца – 10 мкл; растворитель для пепсина 0.2 М ацетатный буфер pH 1.47, для остальных протеиназ – 0.05 М Трис-HCl-буфер pH 7.4; 37°C, 20 ч, $n = 5$.

стью перехвата нуклеотидами супероксидного радикала, учитывая четко показанное участие его в активации плазминогена стрептокиназой [6], были безуспешны. Оказалось, например, что АТР и ГТР сопоставимы по эффективности взаимодействия с супероксидным радикалом в модельной системе [7], но только АТР подавляет активаторную функцию стрептокиназы. Фибринолитическая протеиназа гриба *Arthrobothrys longa* – “лонголитин”, на 75% угнеталась в присутствии 0.01 М АТР [8]. Это также достаточно высокая концентрация АТР, но дальнейшие исследования плазминогенактиваторной способности β - и γ -субъединиц фактора роста нервов показали, что эффективная концентрация нуклеотида находится в пределах 0.1 мМ [3, 9]. Причем, β -субъединица чувствительнее γ -субъединицы. Однако распространение, механизм и роль данного феномена также неясны.

Цель настоящего исследования – раскрыть особенности действия орто(пиро)фосфата и нуклеозидфосфатов на расщепление белков различными протеиназами и плазминогенактиваторную активность активаторов плазминогена.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Образцы протеиназ расщепляли избранные для экспериментов белки-субстраты и в отсутствие добавок P_i , PP_i или нуклеозидфосфатов (контрольные группы). Большинство протеиназ интенсивнее расщепляли желатин и казеин (табл. 1). Активаторы плазминогена в отсутствие перечисленных эффекторов инициировали лизис фибринового геля со следующей интенсивностью: стрептокиназа – $290 \pm 15 \text{ мм}^2$, урокиназа – $506 \pm 23 \text{ мм}^2$, тканевый активатор плазминогена – $180 \pm 7 \text{ мм}^2$.

Неорганический ортофосфат вызвал увеличение расщепления гемоглобина на 36–1100%* тремя

*Здесь и далее по тексту приведены только статистически достоверные изменения ($P \leq 0.05$).

сериновыми протеиназами, особенно субтилизинном, а также на 33–358% лизиса желатина трипсином, α -химотрипсином и на 20–92% расщепления BSA субтилизинном (рис. 1). Действие P_i на расщепление остальных белков этими протеиназами было менее сильным, а в случае казеина и фибриногена – вовсе отсутствовало. Неорганический ортофосфат усиливал на 22–76% расщепление гемоглобина, казеина и BSA (но не фибриногена) папаином, а лизис желатина, как правило, угнетал. Катализируемый пепсином протеолиз усиливался на 45–200% в присутствии P_i лишь при низкой его концентрации. С увеличением концентрации эффектора активность пепсина заметно угнеталась, вплоть до полного подавления (по BSA и казеину).

Наиболее заметное увеличение активности металлопротеиназы бацилл в присутствии P_i (с максимумом при его концентрации 0.03 М) наблюдали при расщеплении гемоглобина (на 44–240%) и в меньшей степени – желатина и BSA. Причем при максимальной концентрации P_i расщепление желатина подавлялось на 44%. Фосфат угнетал расщепление металлопротеиназой казеина на 22–47%.

В присутствии неорганического фосфата возрастала на 20–230% плазминогенактиваторная способность всех активаторов плазминогена, но особенно сильно – тканевого активатора из сердца свиньи (рис. 2).

Поскольку добавки фосфатов изменяют ионную силу раствора, изучено влияние хлорида натрия в различной концентрации на расщепление желатина протеиназами [2].

Лишь у трипсина есть аналогия в действии хлорида натрия и фосфатов в идентичном диапазоне изменения ионной силы. Следовательно, изменения активности химотрипсина, субтилизина, папаина, пепсина в присутствии P_i не сопряжены с изменениями ионной силы раствора и, по всей видимости, несут специфический характер [2].

Неорганический пирофосфат. В присутствии PP_i на 20–400% возросло расщепление ряда белков сериновыми протеиназами (рис. 3). Так, лизис

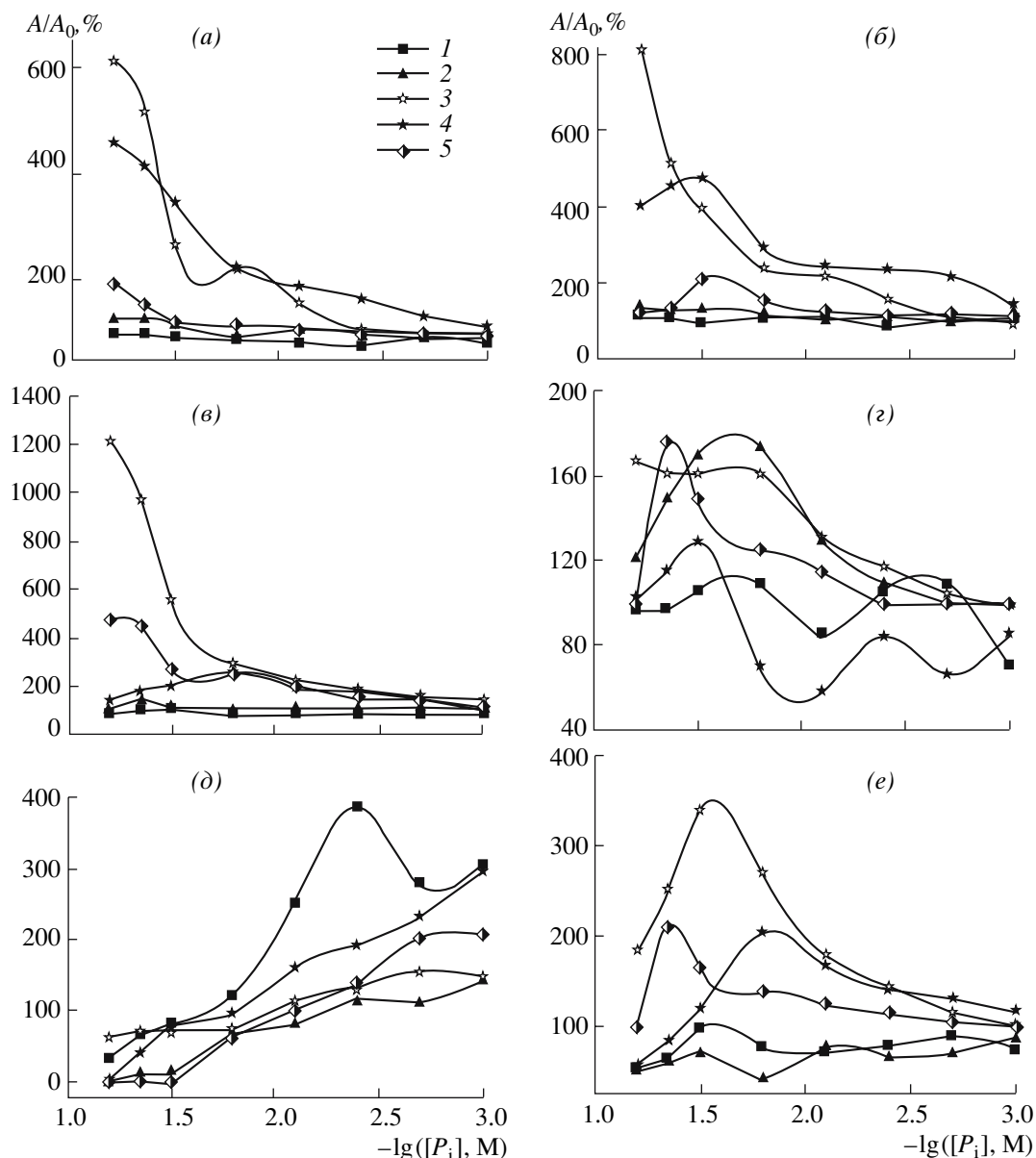


Рис. 1. Изменения расщепления (% к контролю) белков-субстратов: фибриногена (1), казеина (2), гемоглобина (3), желатина (4), сывороточного альбумина (5), в тонком слое агарового геля трипсином (а), α -химотрипсином (б), субтилизинном (в), папаином (г), пепсином (д) и металлопротеиназой бацилл (е) при добавлении неорганического ортофосфата; $n = 5$.

гемоглобина, желатина химотрипсином, субтилизинном возрастал на 28–226%. Они же на 55–250% интенсивнее расщеплялись папаином при концентрации $PP_i \geq 10^{-2}$ М. Расщепление казеина и гемоглобина пепсином и металлопротеиназой усиливалось на 31–75% при концентрации $PP_i 10^{-6}$ – 10^{-4} М, а фибриногена пепсином – на 44–83%. Вместе с тем пирофосфат угнетал на 55% лизис казеина субтилизинном (в концентрации 10^{-1} М), BSA папаином (10^{-4} – 10^{-1} М), всех белков – пепсином и металлопротеиназой бацилл (10^{-4} М). В концентрации $PP_i 10^{-5}$ – 10^{-3} М заметно росло расщепление

желатина, фибриногена и гемоглобина пепсином. Обнаруженные эффекты PP_i не вызваны соответствующими изменениями ионной силы раствора.

Неорганический пирофосфат увеличивал плазминогенактиваторную способность тканевого активатора и стрептокиназы (но не урокиназы) на 20–95% при концентрации 10^{-4} – 10^{-3} и на 25–30% при концентрации 10^{-5} – 10^{-4} М (рис. 2). Плазминогенактиваторная способность урокиназы угнеталась 10^{-1} М пирофосфатом на 40%.

Аденозинфосфаты. Добавки АТФ в концентрациях $\geq 10^{-3}$ М активировали лизис казеина трипси-

ном на 40–57, химотрипсином на 21–40, субтилизином на 23–55%, усиливали лизис ряда белков пепсином: казеин – во всем диапазоне концентраций – на 28–108%; фибриноген, гемоглобин и BSA лишь 10^{-2} М АТФ на 258, 122 и 35% соответственно, желатин – 10^{-4} – 10^{-2} М АТФ – на 34–152%, а также лизис металлопротеиназой бацилл казеина (на 36–52% при концентрации АТФ 10^{-7} – 10^{-5} М) и BSA (на 42% при 10^{-6} М) (рис. 4). Вместе с тем нуклеозидтрифосфат в концентрации 10^{-2} М ингибировал протеолиз субстратов трипсином (на 20–56%, кроме фибриногена), химотрипсином и папаином (на 27–65%, кроме BSA), металлопротеиназой – на 64–100%. Подавление расщепления пепсином BSA отмечено при концентрации АТФ 10^{-3} М. В этой же концентрации АТФ угнетал лизис металлопротеиназой всех белков на 25–77%.

ADP, в целом, оказал относительно слабое влияние на расщепление желатина протеиназами (табл. 2). В диапазоне концентраций 10^{-3} – 10^{-8} М изменения активности этих протеиназ, как правило, не превышали 20%. Однако при концентрации нуклеотида 10^{-2} М усиливалось расщепление желатина трипсином на 82, папаином – на 45%.

Расщепление желатина при добавках АМР росло лишь на 23–25% для трипсина (10^{-2} М нуклеотида) и папаина (10^{-3} М). Оно подавлялось на 23–30% в случае субтилизина (10^{-5} – 10^{-4} М) и на 21–32% в случае металлопротеиназы (10^{-5} – 10^{-3} М). АМР в концентрациях 10^{-5} – 10^{-2} М угнетал лизис желатина пепсином на 20–56%.

Гуанозинфосфаты. Действие GTP на протеолитическую активность трипсина проявлялось, главным образом, в концентрации 10^{-2} М как усиление расщепления белков на 25–82%. Исключение составлял BSA, деструкция которого угнеталась на 50% (рис. 5). При этой же концентрации GTP расщепление фибриногена и казеина химотрипсином возрастало на 22–31%. Наблюдалось увеличение желатинолитической активности химотрипсина при концентрации нуклеотида 10^{-7} – 10^{-6} и 10^{-4} М на 32–39%. В более высокой концентрации (10^{-2} М) GTP вызвал угнетение гидролиза химотрипсином гемоглобина и BSA на 22 и 44% соответственно.

GTP подавлял в концентрации 10^{-2} М расщепление субтилизином гемоглобина и BSA на 43 и 66% соответственно, а в концентрации 10^{-4} – 10^{-3} М – лизис казеина на 22–23%. Фибриногенолитическая активность папаина при максимальной концентрации нуклеотида возрастала на 44%, а изменения BSA-литической активности носили сложный характер: от увеличения на 21–29% (10^{-5} – 10^{-6} М GTP) до подавления на 43% (10^{-2} М GTP). GTP на 34–37% стимулировал расщепление пепсином желатина в диапазоне концентраций 10^{-6} – 10^{-4} М, а расщепление BSA – лишь при максимальной концентрации (на 87%), тогда как в диапазоне кон-

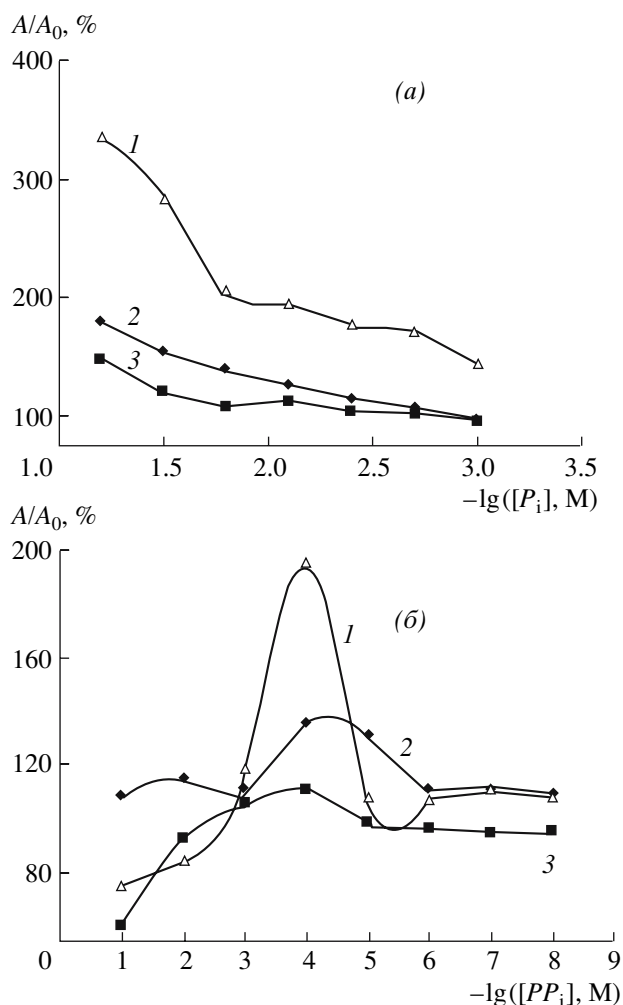


Рис. 2. Влияние неорганического ортофосфата (а) или неорганического пирофосфата (б) на плазминогенактиваторную функцию тканевого активатора плазминогена (1), стрептокиназы (2) или урокиназы (3) (по лизису фибриновых пластин, % к контролю; $n = 4$).

центраций 10^{-4} – 10^{-3} М наблюдалось угнетение лизиса этого белка на 35–40%. GTP в концентрации 10^{-3} – 10^{-2} М подавлял на 24–26% расщепление пепсином гемоглобина. Протеолитическая активность металлопротеиназы бацилл на 22–63% подавлялась GTP в концентрации 10^{-3} – 10^{-2} М.

Расщепление желатина трипсином в присутствии GDP (10^{-3} – 10^{-2} М) возрастало на 32–56%, а GMP лишь при максимальной концентрации усиливал лизис белка на 80% (табл. 2). Желатинолитическая активность химотрипсина под действием GDP росла во всем диапазоне концентраций на 25–60%, тогда как GMP вызывал ее увеличение на 40% лишь в концентрации 10^{-5} М. GDP (но не GMP) в максимальной концентрации вызвал угнетение желатинолитической активности субтилизина на 22%. GDP в концентрации 10^{-3} М (GMP – на поря-

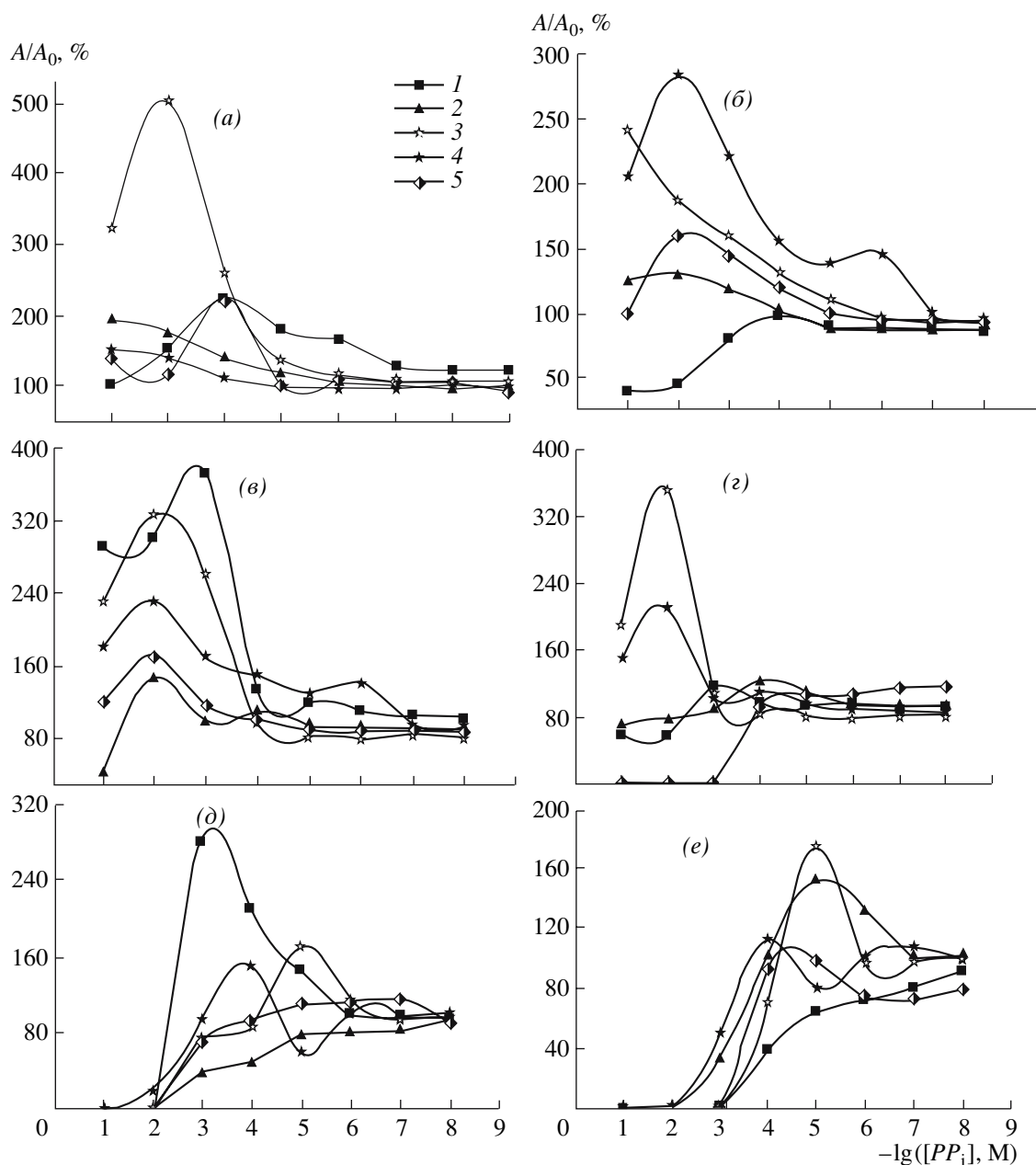


Рис. 3. Влияние неорганического пирофосфата на расщепление (% к контролю) белков-субстратов; $n = 5$. Обозначения кривых 1–5 для белков и рисунков а–е для протеиназ те же, что на рис. 1.

док выше) стимулировал желатинолитическую активность папаина на 24–25%. Вместе с тем именно GMP, но не GDP, в концентрации 10^{-2} М на 60% подавлял расщепление белка пепсином, тогда как активность металлопротеиназы резко (на 74%) угнеталась GDP в максимальной концентрации.

Совокупность полученных данных раскрывает новые аспекты регуляции протеолиза на молекулярном уровне. Так, ионы P_i способны существенно изменять интенсивность расщепления белков протеиназами различных групп (сериновыми, ци-

стеиновыми, аспартильными, металлопротеиназами), а также плазминогенактиваторную способность стрептокиназы, урокиназы и тканевого активатора из сердца свиньи. Эффект зависит не только от природы катализатора или концентрации иона. Он в значительной мере определяется и использованным белком-субстратом. Этот момент имеет методическое значение. Между тем, внимания к данному вопросу в литературе уделяется недостаточно. Полученные результаты свидетельствуют о стимуляции расщепления протеиназами ряда белков в присутствии ионов P_i в опреде-

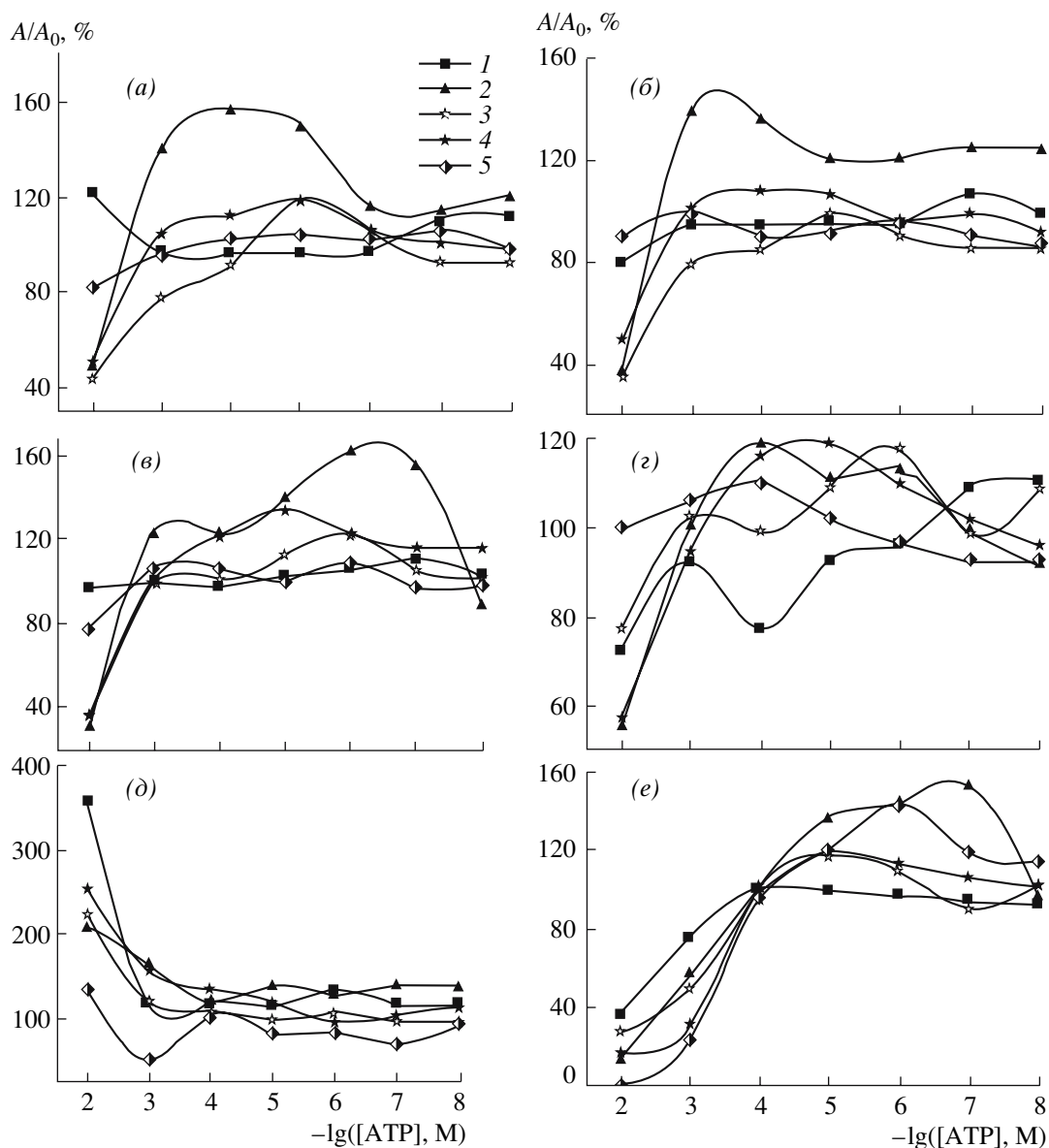


Рис. 4. Изменения расщепления (% к контролю) белков-субстратов протеиназами в присутствии АТФ; $n = 4$. Обозначения те же, что на рис. 1.

ленной концентрации. Следовательно, описанный ранее “фосфатный эффект” в протеолизе может реализоваться уже на уровне взаимодействия энзим–субстрат, но механизм реализации пока неясен. Между тем, ионы P_i являются одними из основных в живых организмах и образуют одну из буферных систем тканей и клеток. Выяснение механизма “фосфатного эффекта” требует в перспективе специальных исследований взаимодействия ионов фосфата с сайтами молекулы протеиназы или активатора плазминогена, а также с макромолекулой белка-субстрата. Это объемная задача, которая внешне выглядит вполне стандартной, но в реальности она может быть сопряжена с целым рядом неожиданных моментов.

Сильное воздействие на расщепление белков протеиназами и активацию плазминогена оказали ионы PP_i . Однако в этом случае угнетение расщепления отдельных белков протеиназами в диапазоне концентраций PP_i 10^{-5} – 10^{-1} М было более выражено. В то же время ортофосфат P_i наиболее сильно проявил ингибирующее действие на протеолитическую активность пепсина в концентрации >0.005 М, тогда как в минимальной концентрации он способствовал резкому увеличению этой активности.

Продемонстрирована в разной мере, но порой весьма существенная активация АТФ расщепления белков-субстратов всеми использованными протеиназами. Следовательно, феномен АТФ-ак-

Таблица 2. Влияние нуклеозидфосфатов на расщепление желатина различными протеиназами в тонком слое агарового геля (мм^2 зон лизиса), $n = 5$

Нуклеозидфосфат, молярность	Трипсин	Химотрипсин	Субтилизин	Папаин	Пепсин	Металлопротеиназа <i>B. megaterium</i>
ADP, 0 (контроль)	374 ± 9	300 ± 11	521 ± 16	149 ± 8	207 ± 22	474 ± 46
10 ⁻²	681 ± 12*	235 ± 8*	474 ± 26	212 ± 15*	198 ± 21	92 ± 28*
10 ⁻³	400 ± 6	260 ± 27	498 ± 14	148 ± 9	199 ± 35	154 ± 11*
10 ⁻⁴	376 ± 6	309 ± 10	499 ± 21	140 ± 10	220 ± 25	440 ± 22
10 ⁻⁵	371 ± 6	287 ± 26	428 ± 3	146 ± 20	204 ± 31	399 ± 13
10 ⁻⁶	384 ± 21	287 ± 13	465 ± 22	154 ± 22	221 ± 19	413 ± 22
10 ⁻⁷	377 ± 7	290 ± 21	463 ± 15	142 ± 27	198 ± 21	434 ± 27
10 ⁻⁸	355 ± 4	279 ± 35	433 ± 20	128 ± 20	187 ± 18	409 ± 25
AMP, 0 (контроль)	425 ± 15	356 ± 5	689 ± 0	93 ± 2	116 ± 0	961 ± 31
10 ⁻²	523 ± 6*	298 ± 9	650 ± 15	108 ± 6	51 ± 2*	827 ± 29
10 ⁻³	400 ± 10	319 ± 4	570 ± 5*	116 ± 0*	83 ± 2*	743 ± 27*
10 ⁻⁴	425 ± 15	320 ± 15	529 ± 12*	90 ± 5	88 ± 2*	763 ± 7*
10 ⁻⁵	452 ± 11	324 ± 11	487 ± 11*	70 ± 10	93 ± 2*	656 ± 19*
10 ⁻⁶	406 ± 6	311 ± 13	676 ± 13	95 ± 0	105 ± 5	969 ± 8
10 ⁻⁷	441 ± 12	361 ± 10	625 ± 20	113 ± 3*	118 ± 5	961 ± 16
10 ⁻⁸	425 ± 5	352 ± 0	625 ± 25	105 ± 5	121 ± 4	1114 ± 25
GDP, 0 (контроль)	506 ± 11	310 ± 3	619 ± 19	100 ± 5	98 ± 8	870 ± 29
10 ⁻²	790 ± 7*	456 ± 5*	484 ± 0*	98 ± 3	93 ± 2	228 ± 11*
10 ⁻³	669 ± 7*	473 ± 0*	638 ± 25	124 ± 6*	110 ± 1	848 ± 7
10 ⁻⁴	541 ± 12	390 ± 10*	716 ± 26	113 ± 3	90 ± 1	946 ± 0
10 ⁻⁵	570 ± 6	425 ± 5*	625 ± 13	110 ± 5	93 ± 2	915 ± 0
10 ⁻⁶	612 ± 1*	490 ± 16*	512 ± 17	93 ± 7	98 ± 3	878 ± 22
10 ⁻⁷	518 ± 11	425 ± 5*	518 ± 20	102 ± 3	83 ± 2	777 ± 21
10 ⁻⁸	541 ± 3	441 ± 0*	582 ± 11	103 ± 3	79 ± 2	736 ± 7
GMP, 0 (контроль)	425 ± 16	356 ± 5	689 ± 10	93 ± 5	115 ± 0	961 ± 30
10 ⁻²	763 ± 7*	293 ± 13	625 ± 20	116 ± 6	47 ± 2*	1000 ± 8
10 ⁻³	375 ± 5	298 ± 13	676 ± 0	105 ± 4	105 ± 3	1000 ± 8
10 ⁻⁴	451 ± 11	415 ± 5	637 ± 13	102 ± 2	105 ± 3	994 ± 4
10 ⁻⁵	489 ± 16	501 ± 17*	600 ± 12	95 ± 0	90 ± 0*	877 ± 22
10 ⁻⁶	478 ± 8	410 ± 10	625 ± 25	95 ± 0	93 ± 6	885 ± 14
10 ⁻⁷	483 ± 9	400 ± 18	638 ± 25	97 ± 3	100 ± 10	893 ± 8
10 ⁻⁸	425 ± 5	385 ± 8	702 ± 13	103 ± 3	97 ± 7	1000 ± 8

* $P \leq 0.05$.

тивированного и непосредственного убиквитином протеолиза имеет более широкое распространение, чем принято считать. Фактически до наших исследований активация протеолиза АТР в подобной ситуации была показана только в отношении папаина [10]. Механизм такой стимуляции также нуждается в проведении дальнейших исследований, тем более что в литературе нет сообщений о

возможности аутофосфорилирования молекул использованных нами протеиназ.

Вместе с тем в ряде случаев проявлялось ингибирование АТР в концентрации 10^{-3} М протеолитической активности пепсина, металлопротеиназы, а в более высокой концентрации – активности трипсина, химотрипсина, пепсина. Направленность и сила эффекта существенно зависели от

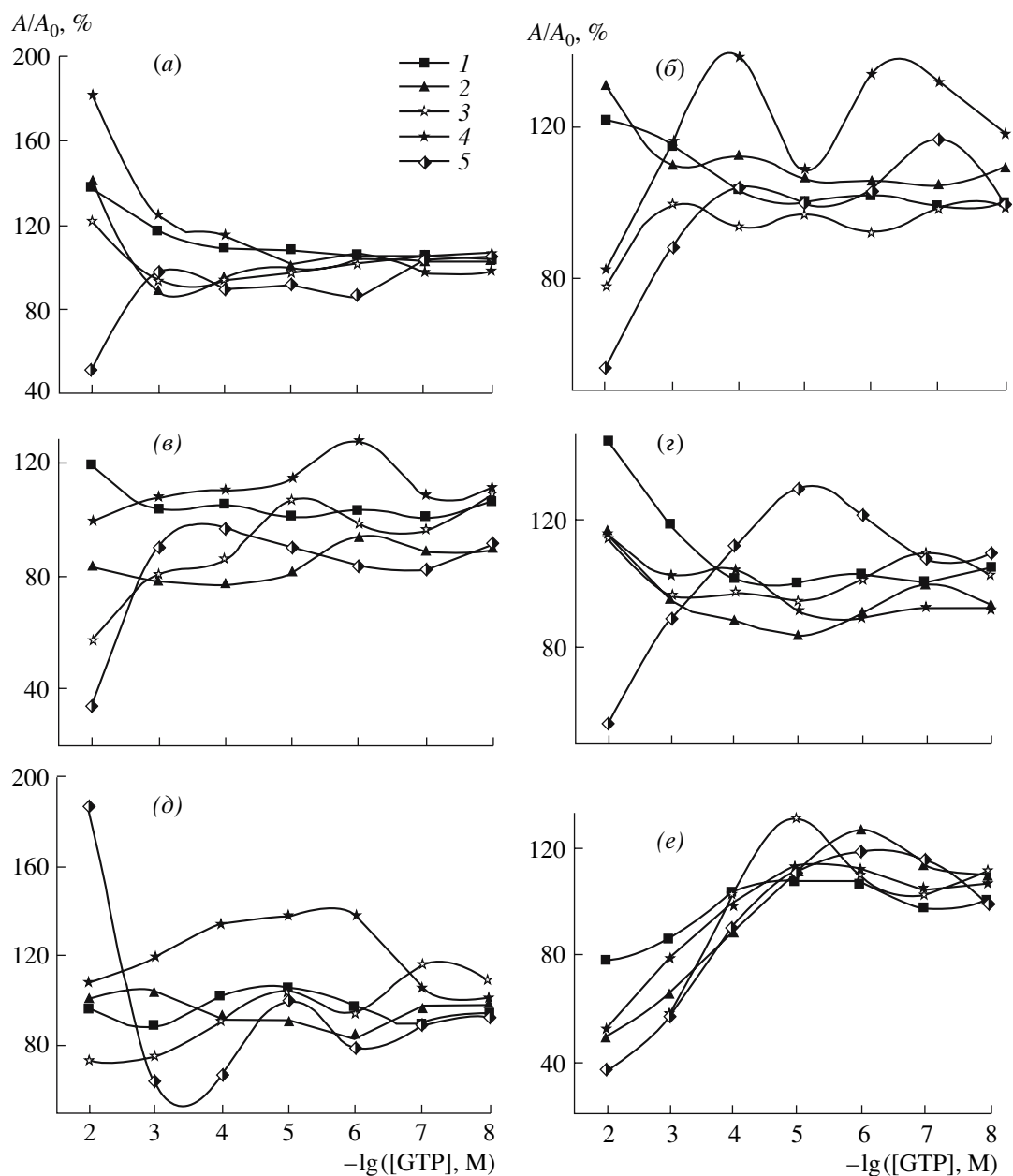


Рис. 5. Влияние GTP на расщепление (% к контролю) белков-субстратов протеиназами; $n = 4$. Обозначения те же, что на рис. 1.

белка-субстрата. В этом отношении вполне объяснимо несоответствие результатов, полученных разными группами исследователей. Так, аргентинская группа сообщила о подавлении АТР протеолитического действия инсулина [11]. Проведенные же позднее в одном из центров США исследования дали противоположный результат [12]. Между тем в этих работах использованы неидентичные и субстраты, и образцы протеиназы.

Это расширяет представления о феномене АТР-ингибируемых реакций протеолиза, но его природа пока остается нераскрытой. Мы полага-

ли, что действие нуклеотидов может быть обусловлено наличием в молекулах протеиназ специфических пуринасвязывающих сайтов [13]. Однако ранее полученные факты свидетельствуют о нечувствительности, например, активаторной функции стрептокиназы к иным нуклеотидам, кроме АТР [5], а изложенные выше материалы – о различной эффективности, например, АТР, АДФ и АМФ на лизис желатина протеиназами. Можно было бы думать, что угнетение активности протеиназ АТР в концентрациях более 10^{-3} М вызвано усилением аутолиза протеиназ, учитывая достаточно длительный период контакта эффиктора с ферментами

(см. “Эксперимент. часть”). Но это не согласуется с тем, что эффект ингибирования АТР проявлялся далеко не на всех субстратах.

Полученные нами результаты также свидетельствуют о влиянии на отдельные протеолитические реакции других адениловых и гуаниловых нуклеотидов. Оно проявлялось при концентрации эффектора 10^{-8} – 10^{-5} М.

Все эти материалы выдвигают проблему взаимодействия нуклеозидфосфатов с протеиназами, что также выливается в многоплановые исследования. Отметим, что в целом ряде случаев протеиназы патогенных микроорганизмов могут выступать в качестве фактора или кофактора патогенности. Но этот вопрос остается непроработанным. Полученные нами материалы позволили продемонстрировать целесообразность и полезность использования ионов P_i или АТР в качестве своего рода “зондов” для более тонкой дифференциации особенностей таких штаммов [14].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

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, АТР, АДФ, АМР, ГТР, GDP, GMP фирмы “Fluka” Швейцария, урокиназы (КФ 3.4.21.73) (J.C.R., Япония), стрептокиназы (ОАО Белмедпрепараты, Беларусь), субтилизина *Bacillus subtilis* (КФ 3.4.21.62), металлопротеиназы *Bacillus megaterium* (КФ 3.4.24.4) фирмы “Диагностикум”, Москва, бактоагар типа “Difco” (Ferak, Германия); желатин (Serva, Германия).

Тканевый активатор плазминогена выделяли из ткани свежего сердца свиньи как описано в предыдущей статье [15]. Фибриноген человека и тромбин были производства Научно-практического центра гематологии и трансфузиологии Минздрава Республики Беларусь; гемоглобин быка, казеин по Гаммерстену, сывороточный альбумин быка и другие реактивы квалификации “х. ч.” или “ч. д. а.” были производства стран СНГ, их использовали после соответствующей дополнительной очистки.

Плазминогенактиваторную способность активаторов плазминогена определяли методом лизиса плазминогенсодержащих фибриновых пластин как описано в предыдущей статье [15].

Протеолитическую активность определяли по лизису фибриногена, казеина, альбумина, гемоглобина или желатина в тонком слое агар-агара как подробно описано ранее [16]. Концентрация белков составляла 10 г/л, агар-агара – 10 г/л. В качестве растворителя для приготовления белково-агаровых пластин использовали деионизированную воду, в которую добавляли аликвоты Na_2HPO_4 +

KH_2PO_4 или $Na_4P_2O_7$, 0.05 М Трис-НСI-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-НСI-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 М трихлоруксусной кислотой.

Содержание белка в растворах оценивали по оптическому поглощению при 280 нм, используя соответствующие значения $A_{cm}^{\%}$, приведенные в предыдущей статье [15], а также колориметрическим методом с Кумасси G-250 [17].

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Никандров В.Н., Пыжова Н.С. // Актуальные вопросы гепатологии. Третий симп. гепатологов Белоруссии / Ред. Цыркунов В.М. Минск: Белорусский центр мед. информации, 1998. С. 39.
2. Никандров В.Н., Пыжова Н.С. // Межд. научная конф. “Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем”: Сб. статей. Том I / Ред. Волоотовский И.Д. Минск: ИООО “Право и экономика”, 2006. С. 114–116.
3. Nikandrov V.N., Pyzhova N.S. // Cellular and Molecular Biology. 2006. V. 52. P. 30–39.
4. Никандров В.Н., Пыжова Н.С., Шатило Н.Л. // Инфекция и иммунитет. Матер., приуроченные к V междунар. форуму по глобальной вакцинологии “Вакцины и иммунизация” / Ред. Титов Л.П. Минск: ИНПРЕДО, 2001. С. 193–202.
5. Никандров В.Н., Пыжова Н.С., Вотяков В.И. // Бюлл. эксп. биол. мед. 1987. Т. 103. С. 49–51.
6. Nikandrov V.N. // Jnt. J. Biochem. 1992. V. 24. P. 47–53.
7. Никандров В.Н., Пыжова Н.С., Клиггер Ю.Е. // Докл. АН БССР. 1987. Т. 31. С. 1045–1048.
8. Цыманович С.Г., Никандров В.Н., Максимова Р.А., Шаркова Т.С., Андреев Г.В., Серебрякова Т.Н. // Вопр. мед. химии. 1992. Т. 38. С. 44–45.
9. Никандров В.Н., Пыжова Н.С. // Труды Всероссийской конф. “Проблемы медицинской энзимологии” / Ред. Березов Т.Т. М.: МОРАГ-Экспо, 2002. С. 163–164.
10. Pillai S., Zull J.E. // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. P. 8384–8389.
11. Camberos M.C., Perez A.A., Udrisa D.P., Wanderle M.I., Cresto J.C. // Exp. Biol. Med. 2001. V. 226. P. 334–341.
12. Song E.S., Juliano M.A., Juliano L., Fried M.G., Wagner St.L., Hersh L.B. // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. P. 54216–54220.

13. Пыжова Н.С., Никандров В.Н. // Функциональная роль монооксида азота и пуринов. Сб. статей / Ред. Гурин В.Н. Минск: Полибиг, 2001. С. 142–146.
14. Никандров В.Н., Пыжова Н.С., Скороход Г.А. // Молекулярная диагностика инфекционных болезней. Междунар. научно-практ. конф. Материалы конф. Минск, 2007. С. 217–218.
15. Nikandrov V.N., Pyzhova N.S., Golubovich V.P., Mel'nik O.V., Martinovich V.P. // Russ. J. Bioorgan. Chemistry. 2006. V. 32. P. 129–135 (Никандров В.Н., Пыжова Н.С., Голубович В.П., Мельник О.В., Мартинович В.П. // Биоорган. химия. 2006. Т. 32. С. 144–150).
16. Никандров В.Н., Пыжова Н.С., Шапчиц Н.С. // Докл. НАН Беларуси. 2007. Т. 51. С. 93–98.
17. Bradford M.M. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248–254.

The Effects of Biogenic Phosphates on Protease-Induced Protein Cleavage and Functioning of Plasminogen Activator

N. S. Pyzhova^a and V. N. Nikandrov^{b,#}

[#]Phone: +375 (17) 284-1759; e-mail: nikandrov@fizio.bas-net.by

^a Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of Belarus, Minsk, Belarus

^b Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Belarus, ul. Akademicheskaya 28, Minsk, 220072 Belarus

We showed, using the method of lysis of fibrin plates and five substrate proteins in a thin layer of agar gel, that inorganic orthophosphate (0.001–0.06 M) enhances by 50–250% the activatory functions of streptokinase, urokinase, and tissue plasminogen activator and, in general, by 1.2–12.0 times enhances protein lysis by trypsin, α -chymotrypsin, subtilisin, papain, bacterial metalloprotease, and even pepsin at a concentration < 4 mM. At higher concentrations, phosphate sharply inhibited pepsin activity and inhibited by 40–50% gelatin lysis by papain and gelatin (at a peak concentration) and casein lysis by metalloprotease. Inorganic pyrophosphate ions at concentrations of 10^{-8} – 10^{-1} M enhanced the cleavage of a number of proteins by serine proteases and, at concentrations of 10^{-5} – 10^{-3} M, the activities of pepsin, plasminogen tissue activator, and streptokinase by 100 and 40%, respectively. The pyrophosphate concentrations of $>10^{-3}$ and $>10^{-4}$ M inhibited pepsin- and metalloprotease-induced lysis of virtually all proteins. ATP increased casein lysis by serine proteases, metalloprotease, and pepsin by 20–60% at concentration of 10^{-3} M and by 30–260% at 10^{-2} M concentration. At concentrations of 10^{-2} M, it inhibited the cleavage of some proteins by trypsin, chymotrypsin, papain, and metalloprotease by 20–100%, and, at concentrations of 10^{-3} M, lysis of albumin with pepsin and other proteins (except for fibrinogen) by metalloprotease. A GTP concentration of 10^{-7} – 10^{-2} M increased protein degradation by serine proteases, papain, and gelatin lysis by pepsin by 20–90%, whereas albumin lysis was inhibited by 40–70%. The presence of 10^{-6} – 10^{-5} M GTP led to a slightly increased degradation of hemoglobin and casein by bacterial metalloprotease, while 10^{-3} M GTP induced a drop in the activity of the metalloprotease by 20–50%. ADP could enhance gelatin lysis by trypsin, casein lysis by pepsin and papain, and inhibited metalloprotease activity by 20–100% (at 10^{-3} M). Peculiarities of the effects of AMP and GD(M)P on gelatin lysis were found. The English version of the paper: Russian Journal of Bioorganic Chemistry, 2008, vol. 34, no. 3; see also <http://www.maik.ru>

Key words: activatory function of streptokinase, urokinase, and tissue plasminogen activator; nucleoside phosphates; orthophosphate; protease activity; pyrophosphate