

Министерство здравоохранения Республики Беларусь  
Республиканская научная медицинская библиотека

Health Ministry of the Republic of Belarus  
Republican scientific medical library

**Достижения  
медицинской науки  
Беларуси**

Выпуск XI

Рецензируемый научно-практический ежегодник

**Accomplishments  
of Medical Science  
in Belarus**

11th Issue

Минск  
ГУ РНМБ  
2006

УДК 546.185:611-018.54]+547.96:577.15

### Характер действия иона пирофосфата на функцию активаторов плазминогена и расщепление белков протеиназами

*И.С. Пыжова, В.И. Никандров***Рубрика: 76.03.41**

*Тема НИИР:* «Изучить влияние биогенных фосфатов на реакции протеолиза для разработки дифференциально-диагностических тестов и медицинских биотехнологий».

*Сроки выполнения НИИР:* 2005 – 2006 гг.

*Научный руководитель:* д-р биол. наук, проф. В.И. Никандров.

*Источник финансирования:* государственный бюджет Республики Беларусь.

Влияние ионов неорганического фосфата на процессы протеолиза до сих пор недостаточно изучено, поскольку не проводились целенаправленные исследования. Ранее на основе стимуляции ионами ортофосфата фибринолитической активности митохондриальной фракции головного мозга и печени мышей было выдвинуто представление о «фосфатном эффекте» в протеолизе (Никандров, Пыжова, 1998, 2001), не зависящем от ресинтеза в системе АТФ. Действие ионов неорганического пирофосфата оставалось неясным.

Методом лизиса белков субстратов (фибриногена человека, казеина по Гаммерстену, сывороточного альбумина лошади, гемоглобина быка или желатина) в тонком слое агарового геля (концентрация белков – 10 г/л, агара “Difco” – 10 г/л) с последующей визуализацией зон лизиса белков путем обработки пластин 1 н раствором трихлоруксусной кислоты изучено влияние пирофосфата натрия в концентрации  $10^{-8}$ - $10^{-1}$  М на плазминоген-активаторную способность стрептокиназы, урокиназы, тканевого активатора плазминогена из сердца свиньи, а также на активность трипсина,  $\alpha$ -химотрипсина, субтилизина, папаина, пепсина и металлопротеиназы *Bacillus megaterium*.

Пирофосфат в концентрации  $10^{-5}$ - $10^{-4}$  М вызвал рост плазминоген-активаторной способности стрептокиназы на 27-35% и тканевого активатора на 20-100%, при концентрации  $10^{-1}$  М подавлял урокиназу на 40%.

При концентрации  $10^{-1}$ - $10^{-1}$  М анион усиливал расщепление трипсином практически всех белков в 1,5-5,0 раз (особенно гемоглобина), а расщепление фибриногена - на 30-120% при концентрации  $10^{-6}$ - $10^{-2}$  М. Наиболее сильно пирофосфат активировал расщепление  $\alpha$ -химотрипсином желатина: анион был эффективен уже в концентрации  $10^{-6}$  М с максимумом при  $10^{-2}$  М (290%). В меньшей

мере возрастало расщепление гемоглобина и альбумина, а лизис фибриногена этой протеиназой пирофосфат ( $10^{-2}$ - $10^{-1}$  М) подавлял на 55-60%. В концентрации  $10^{-4}$ - $10^{-1}$  М анион стимулировал расщепление субтилизином фибриногена, гемоглобина, желатина и альбумина в 1,3-3,7 раза (лизис желатина уже при концентрации аниона  $10^{-6}$  М возрастал на 50%), тогда как лизис казеина активировался лишь при концентрации пирофосфата  $10^{-2}$  М, а с увеличением ее подавлялся на 60%.

Протеолитическая активность цистеиновой протеиназы папаина стимулировалась пирофосфатом в диапазоне  $10^{-2}$ - $10^{-1}$  М лишь по гемоглобину и желатину в 1,4-3,6 раза. В то же время лизис фибриногена и казеина подавлялся анионом в диапазоне  $10^{-3}$ - $10^{-1}$  М на 20-50%, а расщепление альбумина – полностью.

В присутствии  $10^{-5}$ - $10^{-3}$  М пирофосфата активность аспартильной притеиназы пепсина росла по гемоглобину, желатину и фибриногену в 1,4-2,8 раз, а при концентрации  $> 10^{-3}$  М угнеталась вплоть до полного подавления.

Активность металлопротеиназы бацилл возрастала лишь при концентрации аниона  $10^{-5}$ - $10^{-5}$  М при расщеплении гемоглобина и казеина в 1,3-1,8 раз. При концентрации  $\geq 10^{-4}$  М (а по фибриногену – начиная с  $10^{-6}$  М) анион угнетал активность протеиназы по всем субстратам вплоть до полного подавления.

Следовательно, пирофосфат оказывает выраженное влияние на активность протеиназ всех четырех групп, активацию плазминогена стрептокиназой и, особенно, его тканевым активатором, причем, зачастую, при достаточно низких концентрациях. Влияние носит сложный характер, зависящий от концентрации аниона, конкретной протеиназы (активатора плазминогена), расщепляемого субстрата. Повышение пирофосфатом гемоглоблинолитической активности всех протеиназ, вероятно, отражает изменения субстрат-энзимных взаимодействий из-за специфического связывания аниона с гемом. Однако изменения в расщеплении других белков наводят на мысль о возможных разной степени изменениях конформации молекул протеиназ, что диктует необходимость дальнейшего изучения взаимодействия пирофосфата с протеиназами.

*Область применения:* общая, медицинская и прикладная энзимология, экспериментальная медицина, медицинская биотехнология.

*Рекомендации по использованию:* полученные факты следует учитывать в биотехнологии энзиматического гидролиза белкового сырья, при разработке дифференциально-диагностических тес-

тов, основанных на протеолитических реакциях

*Предложения по сотрудничеству:* совместные исследования с институтами и центрами, разрабатывающими вопросы медицинской биотехнологии, биохимии и физиологии патогенных микроорганизмов, а также регуляции протеолиза в норме и патологии в Беларуси.

### **Character of Pyrophosphate Ion Effect on Plasminogen Activators Function and Proteolysis by Proteinases**

*V.N. Nikandrov, N.S. Pyzhova*

The effect of sodium pyrophosphate ( $10^{-8}$ - $10^{-1}$  M) on plasminogen-activating ability of streptokinase, urokinase, tissue plasminogen activator and cleavage of casein, horse serum albumin, bovine hemoglobin, gelatin and human fibrinogen by trypsin,  $\alpha$ -chymot-

rypsin, subtilysin, papain, pepsin and *Bacillus megaterium* metalloproteinase was studied. The effect is complex and dependent on anion concentration, concrete proteinase (or plasminogen activator) and protein substrate. The changes of different protein cleavage by proteinases allow to assume possible conformational transitions of proteinases molecules and to dictate the necessity of further studying of pyrophosphate-proteinase interactions.

*Field of Application:* general, medicinal and applied enzymology, experimental medicine, medicine biotechnology.

*Proposals for Cooperation:* joint studies in the fields of medicinal biotechnology, biochemistry and physiology of pathogenic microorganisms, proteolysis regulation in physiology and pathology (biochemistry, bioorganic chemistry, physical chemistry) in Belarus, the CIS, and with other countries.