

БИОХИМИЯ

УДК 577.15 : 546.21 : 541.515

В. Н. НИКАНДРОВ, Ю. М. СУДНИК, Н. С. ПЫЖОВА

**ГЕНЕРИРОВАНИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА
ПРОТЕИНАЗАМИ И ТРИПСИНОГЕНОМ В ВОДНО-СОЛЕВЫХ
РАСТВОРАХ***(Представлено академиком Е. Ф. Коноплей)*

Согласно гипотезе кислород-зависимых реакций протеолиза, в активации зимогенов и в функции ряда протеиназ участвуют активные формы кислорода [1, 2]. Это было продемонстрировано на примере катализируемого папаином и пепсином фибринолиза, а также при обработке образцов трипсиногена источниками активных форм кислорода [3, 4].

В указанном плане логичен вопрос об источнике активных форм кислорода при действии протеиназ или активации трипсиногена. До сих пор данная сторона протеолиза фактически не исследовалась.

Учитывая эти обстоятельства, нами была изучена возможность образования активных форм кислорода при разложении H_2O_2 или при восстановлении молекулярного кислорода пепсином, трипсиногеном, трипсином и папаином.

Эксперименты проведены с использованием очищенных образцов пепсина свиньи (Sigma, США; Lot 68F-8235), трипсиногена быка (Sigma, США; Lot 129F-8090), папаина (Fluka, Швейцария), трипсина (Srofa, ЧСФР).

Генерирование активных форм кислорода исследовали методом хемилюминесценции на отечественной установке ЛХМ 1Ц-01 при 25 °С и в атмосфере воздуха. Состав реакционной смеси: 0,06М фосфатный буфер рН 7,4—2,0 мл; раствор протеиназы или зимогена (1 мг/мл) — 1,0 мл; водный раствор ($1,2 \cdot 10^{-4}$ М) люминола (5-амино-2,3-дигидрофталазиндиона-1,4) — 1,0 мл; растворы специфических эффекторов или бидистиллированная вода — 0,1 мл; раствор H_2O_2 ($3 \cdot 10^{-3}$ М) — 1,0 мл. При исследовании аутогенерирования активных форм кислорода вместо H_2O_2 вносили равный объем бидистиллированной воды. Образование адренохрома при O_2^- -зависимом окислении адреналина регистрировали спектрофотометрически при 480 нм, 25 °С и в атмосфере воздуха, как подробно описано ранее [5, 6]. Реакционная смесь включала 0,06 М фосфатный буфер рН 7,4—1,0 мл; 0,16М раствор адреналина $\cdot HCl$ — 0,3 мл; раствор исследуемого белка (10 мг/мл) — 0,2 мл. Концентрацию адренохрома рассчитывали, принимая коэффициент молекулярной экстинкции равным $4020 M^{-1} \cdot cm^{-1}$ [5].

Содержание белка определяли спектрофотометрически по абсорбции при 280 нм, используя значение $A_{1cm}^{1\%}$ для пепсина свиньи — 14,0 [7], трипсиногена и трипсина быка — 13,9 и 14,4 соответственно [8], папаина — 25,0 [9].

В работе использованы также Cu, Zn-супероксиддисмутаза эритроцитов (Sigma, США), каталаза печени, этилендиаминтетраацетат натрия, L-гистидин (Reanal, Венгрия), L-адреналина гидрохлорид, азид натрия

(Serva, Германия), D-маннит (Chemapol, ЧСФР). Остальные реактивы были отечественного производства квалификации «хч» или «чда», их подвергали дополнительной очистке.

Все эксперименты выполнены не менее чем пятикратно, результаты подвергали статистической обработке с вычислением *t*-критерия Стьюдента.

Внесение в систему «люминол-Н₂О₂» пепсина вызывает резкую «вспышку» хемилюминесценции с последующим затуханием ее (рис. 1).

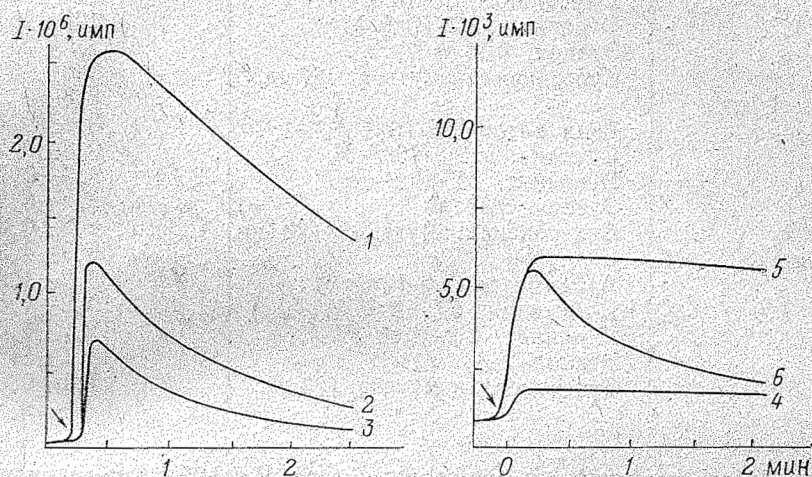


Рис. 1. Кинетика хемилюминесценции в системе «люминол-Н₂О₂» при добавках пепсина (1), трипсина (2), трипсиногена (3), а также папаина (5, 6). Растворитель — 0,06 М фосфатный буфер рН 7,4; пепсин, трипсин и трипсиноген добавлены в количестве 1 мг, а папаин — 1 мг (5) или 0,1 мг (6). 4 — уровень фона системы без добавки белков. Стрелкой отмечен момент внесения Н₂О₂

Анаморфоза кинетики затухания хемилюминесценции в полулогарифмических координат $\ln C \div t$ представляет собой прямую с изломом. По-видимому, процесс затухания сложен и состоит, по крайней мере, из двух реакций, подчиняющихся кинетике первого порядка с константами скорости $k_1 = 1,1 \cdot 10^{-2} \text{ мин}^{-1}$ и $k_2 = 5,0 \cdot 10^{-2} \text{ мин}^{-1}$. Значительная «вспышка» хемилюминесценции наблюдается при внесении в систему также трипсиногена или трипсина, однако она почти на порядок менее интенсивна, чем в случае пепсина. Кинетика затухания в полулогарифмических координатах описывается прямой с изломом и, по-видимому, также включает две реакции первого порядка. Однако значения констант скорости реакции составили: $k_1 = 4,7 \cdot 10^{-2} \text{ мин}^{-1}$ и $1,7 \cdot 10^{-2} \text{ мин}^{-1}$ для трипсина и трипсиногена соответственно и k_2 для обоих белков — 10^{-2} мин^{-1} .

В отличие от перечисленных белков добавление в указанную систему папаина существенно снижает фон хемилюминесценции (рис. 1), обусловленный спонтанным разрушением Н₂О₂ следовыми примесями ионов металлов. Эффект тушения, скорее всего, вызван взаимодействием активных форм кислорода с *sn*-группами остатков цистеина в молекуле папаина. В определенной мере это подтверждается тем, что при уменьшении количества папаина в реакционной смеси степень тушения фона хемилюминесценции заметно уменьшается.

Азид натрия и гистидин значительно уменьшали светосумму хемилюминесценции, инициируемой пепсином или трипсин(оген)ом (табл. 1). Это указывает, по-видимому, на образование синглетного кислорода при разложении Н₂О₂. Причем характер кривых затухания хемилюминесценции в присутствии азидата натрия и гистидина существенно меняется. В присутствии азидата натрия кривые имеют вид гиперболы, тогда как после добавки гистидина кинетика затухания описывается прямой линией (не показано). Перехватчики ·ОН-радикала (маннит и этанол) мало влияли на хемилюминесценцию, инициируемую добавками пепсина

Таблица 1. Изменения светосуммы хемилюминесценции, инициируемой протеиназами и трипсиногеном в системе «люминол— H_2O_2 », при добавках перехватчиков активных форм кислорода ($n=5$)

Исследуемый белок	Эффекторы	Светосумма, $\times 10^4$ имп.
Пепсин, 1 мг	—	471 \pm 6
	Азид натрия, $6 \cdot 10^{-3}$ М	18 \pm 3*
	L-гистидин, $2,5 \cdot 10^{-3}$ М	153 \pm 10*
	D-маннит, $2,2 \cdot 10^{-3}$ М	428 \pm 15
	Этанол, 0,33 М	539 \pm 25
	Супероксиддисмутаза, 120 ед.	548 \pm 25
Трипсиноген, 1 мг	—	3,3 \pm 0,5
	Азид натрия, $6 \cdot 10^{-3}$ М	0,7 \pm 0,1*
	L-гистидин, $2,5 \cdot 10^{-3}$ М	0,8 \pm 0,2*
	D-маннит, $2,2 \cdot 10^{-3}$ М	3,3 \pm 0,7
	Этанол, 0,33 М	3,5 \pm 0,2
	Супероксиддисмутаза, 120 ед.	2,9 \pm 0,3
Трипсин, 1 мг	—	35,9 \pm 4,3
	Азид натрия, $6 \cdot 10^{-3}$ М	3,2 \pm 1,2*
	L-гистидин, $2,5 \cdot 10^{-3}$ М	10,2 \pm 1,5*
	D-маннит, $2,2 \cdot 10^{-3}$ М	12,2 \pm 1,0*
	Этанол, 0,33 М	14,1 \pm 1,3*
	Супероксиддисмутаза, 120 ед.	7,1 \pm 0,9*

* Здесь и далее статистически достоверные (при $P \leq 0,05$) изменения по отношению к контролю.

Таблица 2. Влияние комплексонов на хемилюминесценцию, инициируемую пепсином, трипсиногеном или трипсином в системе «люминол— H_2O_2 » ($n=5$)

Исследуемый белок	Эффекторы	Светосумма, $\times 10^4$ имп.
Пепсин, 1 мг	—	471 \pm 6
	ЭДТА, 10^{-4} М	399 \pm 11*
	$1,1 \cdot 10^{-3}$ М	255 \pm 19*
	о-фенантролин, 10^{-4} М	414 \pm 22
Трипсиноген, 1 мг	$3,9 \cdot 10^{-3}$ М	220 \pm 18*
	—	3,3 \pm 0,5
	ЭДТА, 10^{-4} М	3,6 \pm 0,3
	$1,1 \cdot 10^{-3}$ М	1,8 \pm 0,2*
Трипсин, 1 мг	о-фенантролин, 10^{-4} М	3,1 \pm 0,3
	$3,9 \cdot 10^{-3}$ М	2,5 \pm 0,2
	—	35,9 \pm 4,3
	ЭДТА, 10^{-4} М	31,9 \pm 4,0
	$1,1 \cdot 10^{-3}$ М	19,7 \pm 2,1*
	о-фенантролин, 10^{-4} М	32,3 \pm 3,8
	$3,9 \cdot 10^{-3}$ М	18,0 \pm 2,0*

или трипсиногена, но заметно уменьшали светосумму хемилюминесценции в случае трипсина. В присутствии супероксиддисмутаза светосумма хемилюминесценции, инициируемой добавками пепсина или трипсиногена, почти не изменялась, а в случае трипсина — резко уменьшалась.

Иницируемая протеиназами или трипсиногеном хемилюминесценция сильно подавлялась добавками ЭДТА или о-фенантролина (табл. 2). Причем действие последнего было более сильным в случае пепсина и трипсина. Хемилюминесценция, инициируемая пепсином, полностью подавляется добавками диэтилдитиокарбамата натрия ($1,7 \cdot 10^{-3}$ М).

Изложенные факты позволяют заключить, что пепсин и трипсин (оген) способны разлагать H_2O_2 с образованием синглетного кислорода, а также $\cdot\text{OH}$ и O_2^- -радикалов. Подавление такой способности комплексонами свидетельствуют в пользу того, что эта способность может быть

обусловлена присутствием в образцах протеиназ и зимогена ионов металлов с переменной валентностью. Сравнивая хемилюминесценцию, инициируемую в системе «люминол- H_2O_2 » добавками трипсиногена и плазминогена человека, следует отметить, что при одинаковом эффекте азидата натрия процесс, вызванный добавкой плазминогена, более чувствителен к перехватчикам $\cdot OH$ -радикала, ЭДТА и о-фенантролину [13].

В отсутствие добавок экзогенной H_2O_2 пепсин в водно-солевом растворе индуцирует люминол-зависимую хемилюминесценцию, значительно

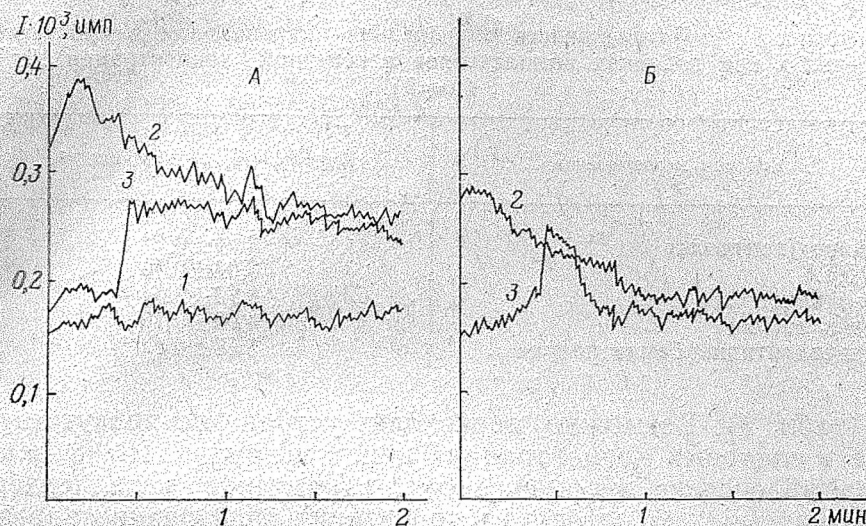


Рис. 2. Кинетика люминол-зависимой хемилюминесценции в системе, не содержащей экзогенной H_2O_2 , в присутствии 1 мг пепсина свиной (А) или трипсиногена быка (Б). Растворитель — 0,06 М фосфатный буфер рН 7,4; 1 — интенсивность фона системы без добавки белков, 2 — хемилюминесценция в присутствии пепсина или трипсиногена, 3 — тоже + каталаза печени

превышающую интенсивность фона (рис. 2). Одновременное внесение с пепсином каталазы ($5 \cdot 10^{-5}$ М) вызывает уменьшение интенсивности хемилюминесценции в начальный период до уровня фона. В последующем уровень хемилюминесценции достигал такого в отсутствие каталазы. Это наводит на мысль, что пепсин способен генерировать радикалы кислорода, часть из которых превращается в H_2O_2 . В случае трипсиногена наблюдается такая же картина. Причем не отмечается столь значительная разница между пепсином и трипсиногеном, которая имеет место в случае разложения H_2O_2 .

Способность папаина к образованию активных форм кислорода была изучена в реакции образования адренохрома при окислении адреналина. Этот подход избран потому, что активность папаина резко угнеталась нитротетразолиевым синим — перехватчиком супероксидного радикала [1, 3, 10], а окисление адреналина в адренохром — процесс, могущий зависеть от O_2^- -радикала [11].

В 0,06 М фосфатном буфере рН 7,4 при концентрации адреналина 10^{-2} М и концентрации папаина в реакционной смеси 1,3 мг/мг адреналин медленно окисляется с образованием адренохрома:

Время (мин)	Концентрация адренохрома ($\cdot 10^{-6}$ М)
0	0
20	$4,9 \pm 1,0$
45	$16,4 \pm 1,2$
120	$19,9 \pm 1,2$

Скорость образования адренохрома в расчете на 1 М папаина составляет всего $6,1 \cdot 10^{-3}$ М \cdot мин $^{-1}$, что на два порядка ниже, чем скорость медленного генерирования адренохрома плазминогеном человека [6]. Это

может быть обусловлено способностью SH -группы цистеина молекулы папаина взаимодействовать с O_2^- -радикалом. Причем значение константы скорости такого взаимодействия выше, чем константы скорости реакции O_2^- с адреналином: $2,7 \cdot 10^6$ и $4,0 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ соответственно [12]. Поэтому действительная скорость генерирования O_2^- -радикала папаином может значительно превышать скорость образования адренохрома. Процесс образования последнего нечувствителен к азиду натрия и ЭДТА, но значительно усиливался *o*-фенантролином и диэтилдитиокарбаматом

Таблица 3. Интенсивность образования адренохрома в присутствии папаина и при добавках комплексонов в конечной концентрации 10^{-2} M ($n=5$)

Условия эксперимента	Адренохром, $10^{-7} \text{ M} \cdot \text{мин}^{-1}$
Папаин (контроль)	$3,64 \pm 0,21$
+ЭДТА	$3,64 \pm 0,19$
+ <i>o</i> -фенантролин	$8,73 \pm 0,34^*$
+азид натрия	$4,02 \pm 0,19$
+диэтилдитиокарбамат натрия	$8,56 \pm 0,42^*$

натрия (табл. 3). Возможно, происходит устранение присутствующих в растворе в следовых концентрациях ионов металлов. Но не исключается и взаимодействие комплексонов с каким-либо металлсодержащим участком папаина, на котором и происходит образование адренохрома. Данные литературы по этому вопросу отсутствуют. Следует отметить, что генерирование O_2^- плазминогеном человека ЭДТА заметно усиливал, а *o*-фенантролин ингибировал [6].

Итак, изложенные результаты свидетельствуют о способности протеиназ и трипсиногена генерировать активные формы кислорода. Это хорошо согласуется с высокой чувствительностью активности папаина и пепсина к действию нитротетразолиевого синего [1, 3] и с вероятным участием активных форм кислорода в активации трипсиногена [4]. Следовательно, получено подкрепление второй части гипотезы кислородзависимых реакций протеолиза и свидетельство образования эндогенных для протеиназ и зимогена активных форм кислорода. Остается не совсем ясным смысл более интенсивного образования активных форм кислорода трипсином в сравнении с трипсиногеном. Тем более что перехватчики активных форм кислорода мало изменяли активность трипсина [1, 10]. Однако нужно иметь в виду, что пути участия активных форм кислорода в каталитической функции протеиназ могут быть более сложными, чем прямое вовлечение выделяемых в окружающий растворитель радикалов кислорода в расщепление пептидной связи [14]. Раскрытие этих путей, как и выяснение наличия и топографии ионов металлов в молекулах изучаемых белков, является самостоятельной проблемой.

Summary

The active oxygen species-generating capability of pepsin, trypsinogen, trypsin and papain during H_2O_2 decomposition and O_2 reduction was studied by luminol-dependent chemiluminescence and adrenaline oxidation methods. An active oxygen species generation was significantly changed in the presence of EDTA, *o*-phenanthroline, sodium diethyldithiocarbamate.

Литература

1. Nikandrov V. N. // 14th Internat. Congress of Biochemistry: Abstracts. Vol. 1. Prague, 1988. P. 60.
2. Nikandrov V. N., Pyzhova N. S. // Folia Haematol. 1988. Bd. 115, H. 4. S. 557—561.
3. Pyzhova N. S., Nikandrov V. N., Nikandrov N. N. // Internat. Conference of regulat. of free radical reactions: Abstracts. Varna, 1989. N 129.
4. Пыжова Н. С., Никандров В. Н. // Докл. АН БССР. 1991. Т. 35, № 12. С. 1130—1133.
5. Green S., Mazur A., Shorr E. // J. Biol. Chem. 1956.

Vol. 220, N 1. P. 237--255. 6. Никандров В. Н., Пыжова Н. С. // Весті АН БССР. Сер. біял. навук. 1988. № 5. С. 58—63. 7. Городецкий Д. И., Мясоедов Н. Ф., Степанов В. М. // Биохимия. 1975. Т. 40, № 6. С. 1305—1311. 8. Мосолов В. В. Протеолитические ферменты. М., 1971. 9. Sluysterman L. A. E., Wijdenes J. // Biochim. Biophys. Acta. 1970. Vol. 220, N 3. P. 593—595. 10. Никандров В. Н., Пыжова Н. С., Клавсуть З. Д. // Влияние перехватчиков активных форм кислорода на фибринолитическую активность протеина. Деп. в ВИНТИ. 1983, № 7027-B88. 11. Misra H. P., Fridovich I. // J. Biol. Chem. 1972. Vol. 247, N 10. P. 3170—3175. 12. Афанасьев И. Б. // Успехи химии. 1979. Т. 48, № 6. С. 974—1014. 13. Никандров В. Н., Судник Ю. М., Вотяков В. И. // Докл. АН СССР. 1986. Т. 287, № 3. С. 751—755. 14. Пыжова Н. С. Участие активных форм кислорода в процессах протеолиза: Дис. ... канд. биол. наук, Минск, 1990.

*Белорусский научно-исследовательский
институт эпидемиологии и микробиологии
Минздрава Республики Беларусь*

Поступило 13.03.92