

БИОХИМИЯ И ЭНДОКРИНОЛОГИЯ

УДК 577.151.042:577.334

В. И. НИКАНДРОВ, Н. С. ПЫЖОВА

**КИСЛОРОДЗАВИСИМЫЙ ПУТЬ АКТИВАЦИИ ПЛАЗМИНОГЕНА
И НОВЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ПРОТЕОЛИЗА**

Анализируя роль биохимических процессов в жизнедеятельности организма, сложно отдать предпочтение какому-либо одному из них вследствие его доминирования или исключительности. В живом организме все взаимосвязано и зависит от места и времени конкретного события. Целый ряд биохимических реакций, казалось имевших частный характер, при более глубоком и детальном изучении приобрел черты интегрального.

Заметное место среди них занимают реакции протеолиза. Исследованию их сущности, регуляции, а также роли в метаболизме, проявлении структурно-функциональной специфики разнообразных клеток, тканей, органов и т. д. посвящены монографии, множество публикаций (например, [1]). Однако до сих пор проблема протеолиза остается одной из самых сложных, важных и недостаточно изученных. Это касается и самого акта химической трансформации субстрата, осуществляемого протеиназами [2]. При рассмотрении его традиционно используются модели гидролиза амидов и сложных эфиров. Протеолитические энзимы (например, α -химотрипсин) были среди первых белков, полученных биохимиками в кристаллическом состоянии. Тем не менее, по замечанию М. В. Волькенштейна и соавт. [3], до ясного понимания работы этой протеиназы еще далеко. Можно с большой долей уверенности полагать, что данная ситуация принципиально не изменилась за прошедшие 20 лет.

Среди множества процессов протеолиза пристальное внимание специалистов ряда областей биологии и медицины привлекает система «плазминоген-плазмин», включающая активную сериновую трипсиноподобную протеиназу — плазмин (ЕС 3.4.21.7), ее зимоген — плазминоген (Pg), белки активаторы плазминогена (как правило - узкоспецифические сериновые протеиназы: урокиназа, ЕС 3.4.21.31 или тканевые активаторы), белки ингибиторы этих активаторов (их уже описано несколько) и белки ингибиторы плазмина. Наиболее специфичным из последних является α_2 -антиплазмин. Кроме того, на мембранах разнообразных клеток обнаружены специфические рецепторы плазмин(оген)а и его активаторов.

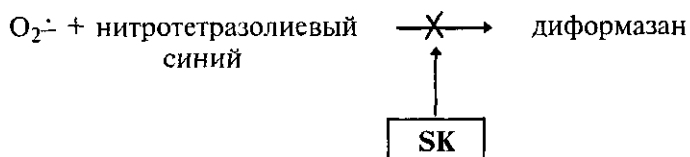
Существовавшие долгое время представления о функции системы «плазминоген-плазмин» как о только ликвидирующей избыточные отложения фибрина, способствующей реканализации кровеносного русла вследствие разрушения тромбов, за последние десятилетия подверглись значительной переоценке. Наличие компонентов данной системы в жидкостях организма (плазме крови, ликворе, лимфе, экссудатах и т. д.), на мембранах ряда клеток, а также и во внутриклеточных органеллах оказалось сопряженным с участием этой системы в целом ряде физиологических процессов и практически во всех основных патологических процессах.

На примере лишь одной нервной ткани отметим, что имеются свидетельства участия компонентов и реакций данной системы в дифференциации нервной ткани, нейробластов, миграции шванновских клеток, зернистых клеток мозжечка и некоторых других клеток, в образовании нейритов, валлеровском перерождении седалищного нерва [4—9]. Весьма вероятно участие этой системы в демиелинизации, учитывая фрагментацию плазмином основного белка миелина [10], в ангиогенезе [11]. В экспериментах продемонстрировано, что изменение баланса компонентов системы «плазминоген-плазмин» отражается на электрической активности нейронов ядер ствола мозга [12].

В силу этого, интерес к указанным реакциям, их физиологической роли и возможности направленной регуляции обусловлен не только общебиологическим фундаментальным значением, но и прикладным медицинским.

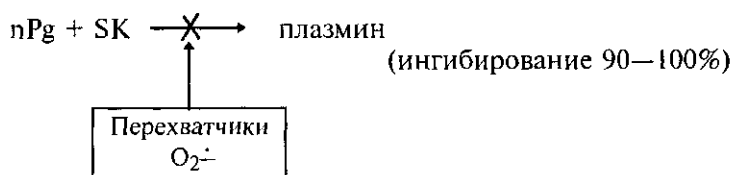
светосумме хемилюминесценции, у плазминогена быка, который слабо активируется стрептокиназой даже в сорбированном на фибрине состоянии.

Кроме того, в модельной системе генерирования супероксидного радикала было зафиксировано также принципиально новое свойство молекулы стрептокиназы — подавление восстановления нитротетразолиевого синего [22]:



Это фактически позволяло говорить о наличии у стрептокиназы супероксиддисмутазоподобной функции.

В дальнейшем нами было продемонстрировано резкое подавление плазминоген-активаторной функции стрептокиназы перехватчиками именно супероксидного радикала [23]:



Исследования воздействия на очищенные образцы плазминогена человека H_2O_2 , модельных химических систем генерирования супероксидного радикала, ионов железа дали возможность показать, что даже полностью лишённые фибринолитической активности образцы зимогена после подобных обработок эту активность проявляли [17, 18, 24, 25]. Как правило, достигалось 33—40% фибринолитической активности в сравнении с таковой после добавки к образцам плазминогена стрептокиназы (т. е. максимально возможной). Это свидетельствует, по-видимому, о том, что решающее значение для эффективности активации имеет не общая концентрация супероксидных радикалов, а их целенаправленное использование.

Наконец, важным обстоятельством явилась обнаруженная способность плазминогена человека (но не быка) генерировать в водно-солевом растворе супероксидный радикал в ходе одноэлектронного восстановления кислорода [17, 18]. Реакция эта достаточно медленная. Расчёты показали, что скорость генерирования супероксидного радикала соответствует $0.1 \text{ M} \cdot \text{мин}^{-1}$ на 1 M плазминогена. Образование супероксидного радикала было подтверждено с помощью добавки супероксиддисмутазы.

Наличие супероксидгенерирующей способности у молекулы плазминогена и супероксидконвергирующей функции у стрептокиназы закономерно ставили вопрос о природе подобных свойств у этих белков, оказавшихся чувствительными к комплексонам, особенно ЭДТА, о-фенантролину, диэтилдитиокарбамату.

Методом химического анализа в образцах плазминогена человека и стрептокиназы было обнаружено присутствие железа: 1 атом / 1 M белка [26, 27]. По-видимому, именно этим и обусловлены описанные выше свойства стрептокиназы и плазминогена.

Все эти факты позволили нам в 1987—1988 г. выдвинуть **положение о кислородзависимом пути активации плазминогена**, реализующимся не за счёт активаторов протеиназной природы, а вследствие $\text{O}_2^{\cdot -}$ — генерирующей способности плазминогена и последующей конверсии этого радикала, в данном случае при участии стрептокиназы [28, 29].

Тем самым активаторная функция стрептокиназы получала принципиально иное истолкование. Так нами был описан первый пример естественной возможности превращения зимогена в активную протеиназу, опосредованного специфическим участием супероксидного радикала. Кратко изложенные выше результаты исследований в модельных условиях хорошо согласовались с выдвинутым положением.

Оказалось, что активация плазминогена стрептокиназой не являлась единственным примером подобного механизма. Принципиальная возможность активации плазминогена при участии активных форм кислорода в биосистемах, по-видимому, периодически реализуется. Речь может идти лишь о доли вклада этого механизма в валовую активацию плазминогена. Учитывая уже известные факты наличия на мембранах ряда клеток специфических рецепто-

ров плазминогена, возможность локализации в непосредственной близости на мембране $O_2^{\cdot -}$ — генерирующих сайтов, представляется вполне вероятным, что в фиксированное время молярное соотношение плазминоген/радикал будет близким 1,0 или даже превышать его. Поэтому теоретически функционирование подобного механизма в биосистемах вполне реально.

Косвенное подтверждение этому получено в экспериментах по активации плазминогена человека субклеточными фракциями (ядерной, тяжелых мембран, митохондриальной) головного мозга и печени мышей. Судя по результатам действия на плазминогенактиваторную способность этих фракций перехватчиков активных форм кислорода (нитротетразолиевого синего, супероксиддисмутаза), некоторых метаболитических ядов (KCN, р-хлормеркурибензоата, арсенита натрия, 2,6-дихлорфенолиндофенола), а также восстановленной формы NAD [30], есть все основания думать о возможности реализации кислородзависимого пути активации плазминогена и *in situ* в биологических системах. В целом же этот аспект проблемы чрезвычайно сложен, ибо в биологических системах, как правило, реализуется несколько реакций, конкурирующих за активные формы кислорода.

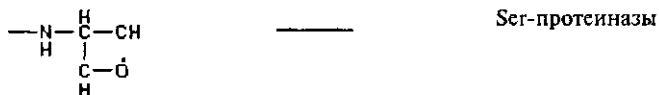
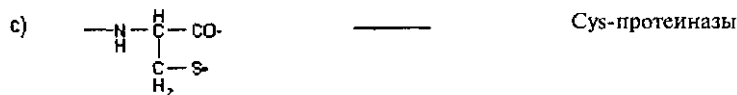
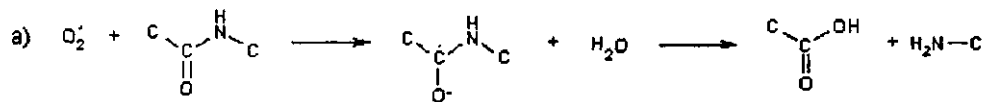
К настоящему времени кроме плазминогена возможность активации источниками активных форм кислорода продемонстрирована еще на 3-х зимогенах: трипсиногене, α -химотрипсиногене А и пепсиногене. Обобщение экспериментальных данных представлено нами в предыдущей статье [19]. Имеются различия в эффективности активации каждого из зимогенов при конкретном воздействии, что вполне объяснимо, учитывая структурную специфику этих белков.

Исследование действия перехватчиков различных активных форм кислорода на фибринолитическую активность протеиназ различных групп: сериновых (трипсина, α -химотрипсина, плазмина, субтилизина, урокиназы), цистеиновой (папаина), аспартильной (пепсина) и металлопротеиназ (из *Staph. aureus*, *Bac. subtilis* и яда *Crotalus atrox*) показало, что именно перехватчик супероксидного радикала нитротетразолиевый резко угнетал активность плазмина, папаина, пепсина, металлопротеиназы стафилококков практически полностью, активность урокиназы и субтилизина — на 30 и 55% соответственно [31, 32]. Лишь трипсин и α -химотрипсин в обычных условиях были малочувствительны к действию тетразолия. Сходство в действии этого перехватчика на активность протеиназ различных по структуре, субстратной специфичности, типу катализа весьма примечательно. Сам по себе этот факт не может служить бесспорным доказательством участия супероксидного радикала в каталитической функции перечисленных протеиназ. Однако он наводит на серьезные размышления. Кстати, отсутствие ингибирующего эффекта перехватчика на протеолитическую активность тоже нельзя рассматривать в качестве довода, отрицающего подобную возможность. Молекулы перехватчиков имеют относительно большие размеры, ограничивающие их доступ к разным участкам макромолекулы протеиназы. Такие ограничения могут быть также обусловлены зарядом молекулы перехватчика, степенью ее гидрофильности и т. д.

Но, если каталитическая функция протеиназ сопряжена с участием в ней собственных эндогенных активных форм кислорода, то логичен вопрос об их источнике.

Проведенные нами исследования наводят на мысль, что молекулы протеиназ (во всяком случае, в ряде моментов) сами генерируют активные формы кислорода и, в частности, супероксидный радикал. Основания для такого суждения дает обнаруженная в водно-солевых растворах способность папаина, трипсина, пепсина, трипсиногена генерировать такие формы [33]. С другой стороны, оказалось, что пепсин и трипсин подобно стрептокиназе проявляют супероксидконвергирующую способность, хотя и значительно более слабую [34, 35].

Еще в 1988 году была высказана идея о возможности реализации активности протеиназ и активации зимогенов через активные формы кислорода [36]. На основании очень кратко изложенных в настоящей статье фактов была **сформулирована гипотеза кислородзависимого протеолиза** [31]. Согласно ей, аутоактивация зимогенов протеиназ и каталитическая функция этих энзимов определяются участием собственных эндогенных для зимогена или системы «протеиназа-белок субстрат» активных форм кислорода. Были предложены возможные пути конкретного их участия в указанных событиях. Таких путей, по крайней мере, три (рисунок): перемещение электрона супероксидного радикала, генерированного зимогеном или системой «белок субстрат-протеиназа», на атом карбонильного углерода амидной группы, что резко дестабилизирует пептидную связь и облегчает гидролиз [37]; сайт — специфическая модификация белка субстрата или зимогена по типу формирования «криптогидроксильного» радикала активными формами кислорода, генерированными зимогеном или протеиназой; образование радикальных форм функциональных групп, входящих в активный центр протеиназы при участии генерированных самим энзимом (зимогеном) активных форм кислорода. По такому принципу, в частности, активируются растворимая гуанилатциклаза или рибонуклеотидредуктаза *E. coli* [38, 39].



Схемы возможных путей участия активных форм кислорода в реализации активации зимогенов протеиназ и протеиназного катализа

Проработка этого положения — сложная перспективная проблема, требующая совместных усилий специалистов различного профиля. Прежде всего, целесообразно предпринять создание теоретической модели протеиназного катализа с участием активных форм кислорода. Современная физическая химия белков пока не располагает экспериментальными методами регистрации быстротекущих внутримолекулярных процессов подобного плана. Ситуация значительно усложняется сходной картиной, наблюдавшейся в экспериментах по расщеплению крахмала α -амилазами: добавки каталазы или нитротетразолиевого синего вели к сильному ингибированию данной реакции [40]. Это заставляет и в данном случае подозревать участие в энзиматической реакции активных форм кислорода. Если подобная ситуация повторится еще на других гидролазах, автоматически может стать проблема ревизии общей модели энзиматического гидролиза и необходимости пересмотра представлений о структурной организации ряда протеиназ, которые не относятся к группе металлопротеиназ.

В процессе исследований, результаты которых анализируются в настоящей статье, были затронуты некоторые сопутствующие вопросы, ответившиеся в самостоятельные проблемы. Так, изучение конформации стрептокиназы, ее конформационной подвижности дало ряд пионерских материалов, на основе которых была предложена оригинальная модель структурной организации этого белка [27]. На основе обобщения собственных материалов о химической модификации функциональных групп [41] высказано суждение о значении ряда аминокислотных остатков в формировании нативной конформации стрептокиназы и образовании ее устойчивых комплексов с плазминогеном.

Попытки достичь активации плазминогена в реакциях, катализируемых некоторыми оксидоредуктазами, привели к неожиданному обнаружению феномена образования устойчивых комплексов лактатдегидрогеназы и пируваткиназы скелетных мышц, малатдегидрогеназы митохондрий сердца, каталазы печени с плазминогеном или стрептокиназой [42]. Это может иметь прямое отношение как к рецепции плазминогена мембранами клеток, так и к проблеме белок лиганд-рецепторных взаимодействий вообще. Здесь предстоит масштабная работа по изучению структурных и функциональных свойств таких комплексов, в том числе и на биологических системах. И она уже начата [43].

В ходе исследований функциональных свойств молекулы фактора роста нервов и трех его субъединиц была впервые продемонстрирована плазминоген-активаторная и протеолитическая функция β -субъединицы. Именно с этой субъединицей связывают проявление специфического нейроростового эффекта данного фактора. Более того, оказалось, что обе активности β -субъединицы подавлялись перехватчиком супероксидного радикала — нитротетразолиевым синим [44]. Выявленные особенности существенно изменяют принятые взгляды о молекулярном механизме биологического действия рассматриваемого нейротрофина.

Излагаемая в статье проблема имеет ряд прикладных аспектов. В предыдущей статье [18] мы уже останавливались на некоторых из них:

значении использования препаратов стрептокиназы в кардиологии в свете ее выраженной супероксидконвергирующей способности;

причинах положительного клинического эффекта при лечении этими препаратами хронических гепатита или простатита;

создании эффективных средств для лечения осложненных длительно незаживающих ран;

обосновании использования стрептокиназы для лечения герпетического кератоконъюнктивита;

возможностях разработки нетрадиционных подходов к фармакологической регуляции фибринолиза;

обосновании критериев направленного отбора стрептокиназоподобных активаторов плазминогена для целей медицинской биотехнологии.

Все перечисленные направления уже имеют практические решения, в том числе защищенные патентами, авторскими свидетельствами.

Гипотеза кислородзависимого протеолиза, кроме того, создает основу для разработки нетрадиционного плана ингибиторов протеолиза, а на их основе, например, препаратов антивирусного действия. В свое время в отношении плазминоген-активаторной функции стрептокиназы проблема специфических ингибиторов не имела решения в мировой литературе. Нами было впервые предложено несколько решений этой проблемы [см. 18], часть из которых также была защищена авторскими свидетельствами. Дальнейшая разработка этого направления выявила выраженную антивирусную активность у лекарственных препаратов, не относящихся к группе антивирусных [45, 46].

Но наиболее обширная и пока мало затронутая область — изучение роли кислородзависимого протеолиза в патогенезе заболеваний и разработка дифференциально-диагностических тестов. Мы располагаем собственными материалами о способности вируса гриппа активировать плазминоген как раз по кислородзависимому пути [47]. Между тем, активация плазминогена — одно из условий репродукции этого вируса в организме. В целом же для успешной разработки аспекта необходим широкий контакт с патологами, цитологами, клиницистами.

Итак, предпринятые исследования относительно узкого вопроса — механизма плазминоген-активаторной функции стрептокиназы привели не только к принципиально новым представлениям об этом механизме. Поэтапная проработка и развитие отдельных моментов последнего вылились в авторскую концепцию кислородзависимой активации плазминогена и продемонстрировали существование целого каскада новых физико-химических особенностей протеиназного катализа и активации зимогенов. Ряд из этих особенностей перерос в самостоятельные проблемы, имеющие большое теоретическое и важное прикладное значение. Их детальная разработка создает широкий фронт совместных исследований специалистов разных областей медико-биологической науки.

Summary

The results of the study of active oxygen species (superoxide radical) participation in the plasminogen-activating function of streptokinase were analyzed. The possibility of such species participation in the activation of a number of proteinase zymogens and in proteinase catalytic function was considered. A concept of oxygen-dependent pathway of plasminogen activation, a hypothesis of oxygen-dependent proteolysis and applied aspects of this problem were stated.

Литература

1. Proteolysis in Cell Functions / Eds. V. K. Hopsu-Havu et al. IOS Press, 1997.
2. Антонов В. К. Химия протеолиза. 2-ое изд. исправл. дополн. М., 1991.
3. Волькенштейн М. В., Голованов И. Б., Соболев В. М. Молекулярные орбитали в энзимологии. М., 1982.

4. Krystosek A., Seeds N. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981. Vol. 78, N 12. P. 7810—7814.
5. Becherer P. R., Wachsmann J. T. // J. Cell. Physiol. 1980. Vol. 104. P. 47—52.
6. Rosenblatt D. E., Cotman C. W., Nieto-Sampedro M. et al. // Brain Res. 1987. Vol. 415. P. 40—48.
7. Kalderon N. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979. Vol. 76, N 11. P. 5992—5996.
8. Verall Sh., Seeds N. W. // J. Cell Biol. 1989. Vol. 109. P. 265—271.
9. Hall Sc. W., VandenBerg Sc. R., Gonias St. L. // Brain Res. 1989. Vol. 495. P. 373—376.
10. Cammer W., Brosnan C. F., Bloom B. R. et al. // J. Neurochem. 1981. Vol. 36, N 4. P. 1506—1514.
11. Smolarz B., Blasiak J., Kulig A. // Postepy biochemii. 2000. Vol. 46, N 3. P. 261—270.
12. Кульчицкий В. А., Азев О. А., Никандров В. Н. // Доклады НАН Беларуси. 2000. Т. 44, № 3. С. 67—69.
13. Tillett W. S., Garner R. L. // J. Exp. Med. 1933. Vol. 58. P. 485—502.
14. Collen D., de Maeyer L. // Thromb. Diathes. Haemorrh. 1975. Vol. 34, N 2, P. 396—402.
15. Lijnen H. R. // Behring Inst. Mittellung. 1983. Vol. 73. P. 43—55.
16. Reddy K. N. N. // Enzyme. 1988. Vol. 40. P. 79—89.
17. Nikandrov V. N. // Intern. J. Biochem. 1992. Vol. 24, N 1. P. 47—53.
18. Никандров В. Н. // Профилактика и лечение инфекционных и паразитарных заболеваний. Матер. юбил. конфер. БелНИИ эпидемиологии и микробиологии. Мн., 1995. С. 274—286.
19. Никандров В. Н., Пыжова Н. С. // Современные проблемы инфекционной патологии человека (вирусология, микробиология, иммунология, эпидемиология и клиника). Матер. II научно-практ. Конфер. Мн., 2001. С. 319—339.
20. Никандров В. Н., Пыжова Н. С., Судник Ю. М. // Докл. АН БССР. 1986. Т. 30, № 6. С. 558—560.
21. Никандров В. Н., Вотяков В. И., Судник Ю. М. // Доклады АН СССР. 1986. Т. 287, № 3. С. 751—755.
22. Никандров В. Н., Пыжова Н. С., Вотяков В. И., Клингер Ю. Е. // Доклады АН БССР. 1986. Т. 30, № 11. С. 1033—1036.
23. Никандров В. Н., Пыжова Н. С., Вотяков В. И., Клингер Ю. Е. // Доклады АН БССР. 1987. Т. 31, № 4. С. 375—378.
24. Никандров В. Н., Вотяков В. И., Судник Ю. М. А. с. СССР. № 1252338. 1986.
25. Пыжова Н. С. Участие активных форм кислорода в процессах протеолиза. Дис канд. биол. наук. Мн., 1990.
26. Puzhova N. S., Nikandrov V. N., Nikandrov N. N. // 20th Meeting FEBS. Abstracts. Budapest, 1990. P. 65.
27. Никандров В. Н. // Биоорг. химия. 1994. Т. 20, № 2. С. 169—181.
28. Nikandrov V. N., Puzhova N. S. // 18th FEBS Meeting. Abstracts. Ljubljana, 1987. P. 84.
29. Nikandrov V. N., Puzhova N. S. // Folia Haematol., 1988, Vol. 115, N 4. P. 557—561.
30. Пыжова Н. С., Никандров В. Н. // Доклады НАН Беларуси. 1998. Т. 42, № 4. С. 94—99.
31. Puzhova N. S., Nikandrov V. N. // Thromb. Res. 1996. Vol. 82, N 4. P. 303—312.
32. Puzhova N. S., Nikandrov V. N. // Bull. Philippine Soc. Biochem. Mol. Biol., 25th Anniv. FAOVMB Sympos. 1997. Vol. 16. PR 5.
33. Никандров В. Н., Судник Ю. М., Пыжова Н. С. // Доклады АН Беларуси. 1992. Т. 36, № 11—12. С. 1039—1044.
34. Puzhova N. S., Nikandrov V. N. // 11th Intern. Confer. on Proteolysis and Protein Turnover. Abstracts. Turku, 1996. P. 187.
35. Никандров В. Н., Пыжова Н. С. // Тез. докл. и стэнд. сообщений. IV симпоз. «Химия протеолитических ферментов». М., 1997. С. 30.
36. Nikandrov V. N. // 14 Intern. Congress of Biochemistry. Abstracts. Prague, 1998. Vol. 1. P. 60.
37. Каюшин Л. П., Пулатова М. К., Кривенко В. Г. Свободные радикалы и их превращения в облученных белках. М., 1976.
38. Бижурин И. М., Панов М. А. Механизм формирования клеточного ответа на внешние воздействия/ Итоги науки и техники ВИНТИ. Сер. «Общие проблемы физико-химической биологии». Т. 3. М., 1986.
39. Eliasson R., Jornvall H., Reichard P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. Vol. 83. P. 2373—2374.
40. Пыжова Н. С., Никандров В. Н. // Доклады АН Беларуси. 1995. Т. 39, № 5. С. 48—52.
41. Nikandrov V. N. // Chemical Modifications of Enzymes. Eds. B. I. Kurganov et al. Nova Sci. Publ. Inc. New York, 1996. P. 567—614.
42. Nikandrov V. N., Murashko O. N., Vorobyova G. V. et al // Lett. Pept. Sci. 1997. Vol. 4, N 4—6. P. 497—502.
43. Pavlova N. I., Murashko O. N., Savinova O. V. et al // XVI Intern. Sympos. on Medicinal Chemistry. Bologna, 2000. P. 576.
44. Nikandrov V. N., Puzhova N. S., Lukashevitch V. S. et al // 18 Intern. Congress. Biochem. Mol. Biol. Abstract Book. Birmingham, 2000. P. 317.
45. Nikandrov V. N., Puzhova N. S., Boreko E. I. // XVth EFMC Intern. Sympos. on Medicinal Chemistry. Abstracts. Edinburgh, 1998. P. 84.
46. Бореко Е. И., Владыко Г. В., Коробченко Л. В. и соавт. // Заявка на патент № 961122 от 11.12.1996. Гос. Патент. Комитет Республики Беларусь. Официальный бюлл. 1998. № 2(17). С. 37.
47. Судник Ю. М., Никандров В. Н., Пыжова Н. С. и соавт. // Тез. докл. 2-го съезда Белорусск. об-ва фотобиол. и биофизиков «Молекулярно-клеточные основы функционирования биосистем». Минск, 1996. С. 179.

Институт физиологии

НАН Беларуси,

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

*Поступила в редакцию
22.01.2001*