

**Министерство здравоохранения Республики Беларусь
Республиканская научная медицинская библиотека**

**Health Ministry of the Republic of Belarus
Republican scientific medical library**

Достижения медицинской науки Беларуси

Выпуск IX

Рецензируемый научно-практический ежегодник

**Accomplishments
of Medical Science
in Belarus**

9th Issue

Минск
ГУ РНМБ
2004

УДК 577.156.1:[616.98:579.871.1

**Расщепление белковых субстратов
внутриклеточными протеиназами
Corynebacterium diphtheriae штамма PW-8**

В.Н. Никаноров, Н.С. Пыжова, Н.Л. Шатило

Рубрика: 76.03.41

Тема НИР: «Изучить набор внутри- и внеклеточных протеиназ у токсигенных и нетоксигенных штаммов *Corynebacterium diphtheriae* и их взаимосвязь с токсигенностью».

Сроки выполнения НИР: 2002–2004 гг.

Научный руководитель: д-р биол. наук, проф. В.Н. Никаноров.

Источник финансирования: госбюджет.

Метаболические особенности возбудителя дифтерии *Corynebacterium diphtheriae* по-прежнему остаются недостаточно изученными, несмотря на длительную историю этого заболевания.

Методом лизиса фибриновых и белково-агаровых пластин (концентрация белка 10 г/л, агар-агара — 10 г/л) установлено, что в присутствии 0,01 моль фосфатного буфера pH 7,4 протеиназы разрушенных повторным замораживанием-оттаиванием и ультразвуковой дезинтеграцией клеток трехсуточной культуры *Corynebacterium diphtheriae* штамма PW-8 (выращенной в присутствии сыворотки крови) расщепляют белки-субстраты, образуя следующий ряд: человеческий фибриноген > человеческий сывороточный альбумин = казеин > желатин > человеческий тромбин. Складывается впечатление, что фибриноген — наиболее чувствительный субстрат при работе с протеиназами коринебактерий. Однако при росте на питательной среде, не содержащей сыворотки, степень расщепления белков субстратов внутриклеточными протеиназами изменяется следующим образом: казеин = тромбин > альбумин > желатин = фибриноген.

Фибриногенолитическая активность внутриклеточных протеиназ микробных клеток, выращенных на бульоне Лингуда или бульоне Мартена (обогащенных сывороткой крови), снижалась при pH 10, 5 или 3 на 27–30, 18–20 и 27–33% соответственно. Независимо от среды культивирования активность полностью подавлялась о-фенантролином (0,001 моль). Фибриногенолитическая активность протеиназ клеток, выращенных именно на бульоне Мартена, угнеталась добавками (0,001 моль) фенилметилсульфонилфторида, р-хлормеркурибензоата или ЭДТА на 50, 35 и 25% соответственно. Эти факты наводят на мысль, что фибриногенолитическую активность проявляют, по-видимому, все четыре основные группы протеиназ. Однако во всех случаях важно участие ионов переходных металлов.

Независимо от среды культивирования фибриногенолитическая активность протеиназ микроорганизма была нечувствительной к ионам (0,001 моль) Mg^{2+} , Mn^{2+} , Pb^{2+} , полностью подавлялась ионами Hg^{2+} , стимулировалась добавками ионов Fe^{2+} или Fe^{3+} на 50–65 или 20–30% соответственно. Активность протеиназ клеток, выращенных на бульоне Лингуда, на 50% угнеталась ионами Ca^{2+} , слабо (на 20–22%) активировалась ионами Co^{2+} , Cu^{2+} , Cu^{-} и была нечувствительной к ионам Cr^{3+} , Zn^{2+} . В слу-

час культивирования на бульоне Мартена образующиеся фибринолитические протеиназы угнетались на 20–25% ионами Cr^{3+} и Ca^{2+} , но не ионами меди.

Активность протеиназ независимо от использованной среды культивирования полностью подавлялась нитротетразолиевым синим или азидом натрия в концентрации 0,01 моль. Только при исследовании клеток, выращенных на бульоне Мартена, фибринолитическая активность внутриклеточных протеиназ угнеталась адреналином, маннитом, тиомочевинной на 40–45%, гистидином, триптофаном, метионином — на 20–25%. В то же время лишь у выращенных на бульоне Лингуда клеток протеиназная активность подавлялась 25%-ным этанолом (на 30%). Протеолитическая активность именно таких клеток была более чувствительной к действию цистеина: их активность угнеталась на 60% при концентрации эффектора 0,01 моль, в меньшей концентрации он не оказывал влияния. Фибринолитическая активность клеток, выращенных на бульоне Мартена, подавлялась цистеином слабее — на 15–30%, но в значительно большем диапазоне его концентраций — 0,000001–0,01 моль.

Протеиназы клеток, выращенных на бульоне Лингуда, умеренно (на 25–45%) угнетались в присутствии АТФ > ГТФ = АМФ = 2,3-АМФ > 3,5-АМФ (но не ГДФ) в концентрации 0,01 моль, тогда как протеиназы клеток, выращенных на бульоне Мартена на 25–35% угнетались ГТФ > АТФ = 2,3-АМФ = ГДФ.

Совокупность полученных фактов свидетельствует о наличии у коринебактерий дифтерии набора внутриклеточных протеиназ, изменяющегося в зависимости от условий культивирования. Складывается впечатление, что фибринолитическая активность присуща протеиназам, действие которых определяется присутствием ряда переходных металлов, опосредуется активными формами кислорода (особенно супероксидным радикалом). Эти протеиназы частично угнетаются добавками АТФ (или ГТФ). Изменения условий культивирования или питательной среды принципиально не сказываются на этих свойствах, хотя придают специфические особенности реакциям протеиназ на отдельные эффекторы *in vitro*.

Область применения: физиология и биохимия патогенных микроорганизмов, энзимология, экспериментальная медицина, медицинская биотехнология.

Область применения: полученные в результате исследования данные следует учитывать в биотехнологии вакцинно-сывороточных препаратов при оптимизации режимов и схем получения биопрепаратов на основе биосинтеза коринебактериями.

Предложения по сотрудничеству: совместные исследования по данной проблеме.

Splitting of protein substrates by intracellular proteinases of *Corynebacterium diphtheriae* PW-8

Y.N. Nikandrov, N.S. Pyzhova, N.L. Shatilo

Corynebacterium diphtheriae PW-8 (grown in the presence of blood serum) proteinases splits human fibrinogen > human serum albumin = casein > gelatin > human thrombin. Fibrinogenolytic activities of these proteinases were inhibited by the group of specific

proteinase inhibitors (0.001 mol) and by o-phenanthroline, by Hg^{2+} ions (0.001 mol) and stimulated by Fe^{2+} > Fe^{3+} ions. This activity was inhibited by nitrotetrazolium blue or sodium acid (0.01 mol) completely, and by some purine nucleotides, especially by ATP or GTP. The sensitivity of proteinase activity to effectors depended on cultivation conditions (nutrient medium).

Field of application: physiology and biochemistry of pathogenic microorganisms, enzymology, experimental medicine, medicine biotechnology.

Proposals for co-operation: joint study of the problem.