

## ХИМИЯ

УДК 577.15.024 : 546.21 : 541.515

Н. С. ПЫЖОВА, В. Н. НИКАНДРОВ

## АКТИВАЦИЯ ХИМОТРИПСИНОГЕНА И ПЕПСИНОГЕНА ПОД ДЕЙСТВИЕМ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА

(Представлено академиком О. А. Стрельченком)

Согласно развиваемым нами представлениям, каталитическая функция протеиназ и активация их зимогенов реализуются при участии собственных эндогенных для системы «протеиназа-субстрат» или зимогена активных форм кислорода [1, 2]. На примере плазминогена человека или трипсиногена быка продемонстрировано, что обработка их очищенных образцов источниками активных форм кислорода вела к активации зимогенов [3, 4]. Тем не менее, поскольку активный трипсин способен активировать собственный зимоген, нельзя исключить возможность модификации активными формами кислорода активации трипсиногена следами трипсина. Активацию же химотрипсиногена или пепсиногена не считают обусловленной действием молекул собственных протеиназ [5, 6]. Поэтому исследование возможности активации данных зимогенов активными формами кислорода диктуется логикой состояния проблемы.

Эксперименты проведены с использованием бычьего  $\alpha$ -химотрипсиногена А (Sigma, США, Lot 16H7075) и свиного пепсиногена (Sigma, США, Lot 82H8065). Зимогены растворяли соответственно в 0,06 М фосфатном (0,05 М трис-НСl) буфере рН 7,4 или в 0,1 М ацетат-цитратном буфере рН 2,5 или 1,4; затем их обрабатывали перекисью водорода, системами генерирования супероксидного радикала (подробно описаны в [4]) или ионами двухвалентного железа в виде  $\text{FeSO}_4$ . Протеолитическую активность оценивали методом лизиса фибриновых пластин, не содержащих активируемого плазминогена [2] и приготовленных на 0,03М фосфатном буфере рН 7,4 или на таком же трис-НСl буфере.

В работе использовали также  $\alpha$ -химотрипсин, пепсин (Sigma, США), тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД), рибофлавин, L-метионин, L-триптофан, L-гистидин (Reanal, Венгрия), феназинметосульфат (ФМС, Ferak, Германия), азид натрия (Serva, Германия), D-маннит (Chemapol, Чехословакия). Остальные реактивы были производства отечественного (как и человеческие фибриноген и тромбин) или стран СНГ квалификации «хч» или «чда». Их подвергали дополнительной очистке. Все эксперименты выполнены не менее чем пятикратно, результаты подвергнуты статистической обработке с вычислением t-критерия Стьюдента.

Обработка химотрипсиногена перекисью водорода вела к существенному росту его фибринолитической активности в прямой зависимости от концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$  (рис. 1). Используемый буферный раствор принципиально не влиял на результат. Активность же химотрипсина возрастала лишь в пределах 30% и уже при концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$  1,25М или 2,5М в зависимости от растворителя. Перехватчики синглетного кислорода (азид, гистидин, триптофан) или  $\cdot\text{OH}$  радикала (маннит, этанол, формиат) не снимали действие  $\text{H}_2\text{O}_2$  на химотрипсиноген (табл. 1). В присутствии азиды или маннита оно даже несколько усиливалось. В то же время один из перехватчиков супероксидного радикала — нитротетразолиевый синий вызвал подавление эффекта  $\text{H}_2\text{O}_2$  на 66%. Поскольку активность химотрипсина нечувствительна к нитротетразолиевому синему и адреналину [2], подавление действия  $\text{H}_2\text{O}_2$  одним из перехватчиков супероксидного радикала дает все основания предположить участие последнего именно в активации зимогена.

В присутствии  $\text{Fe}^{2+}$  протеолитическая активность химотрипсиногена существенно возросла лишь в диапазоне концентраций  $10^{-8}$ — $10^{-5}$  М, особенно в фосфатном буфере (рис. 1). Активность химотрипсина в этих условиях не увеличивалась.

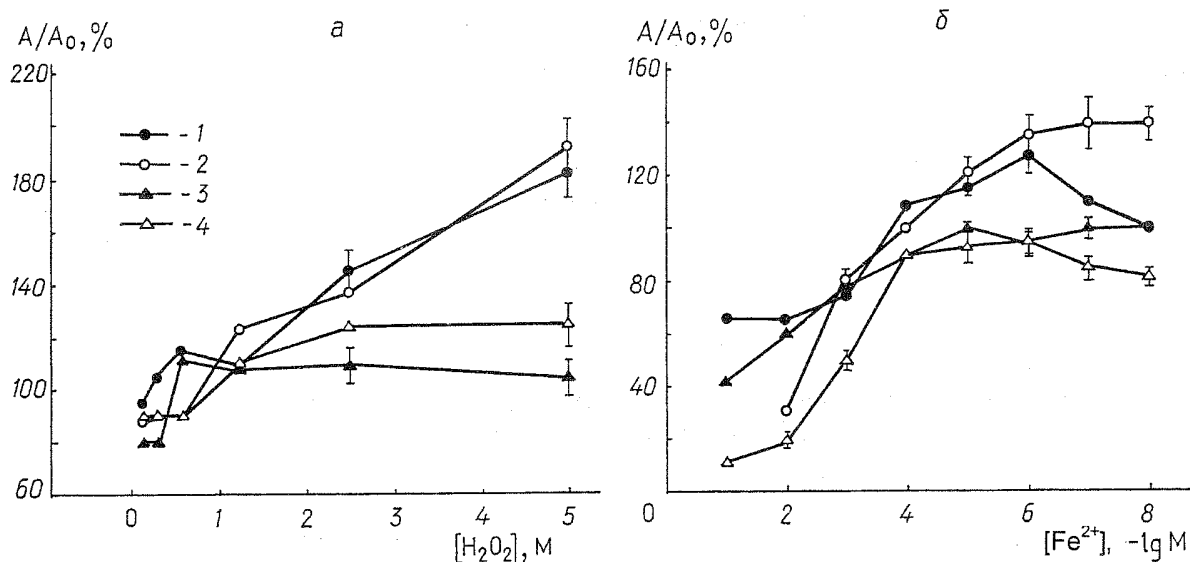


Рис. 1. Изменения фибринолитической активности образцов  $\alpha$ -химотрипсина (1, 2) или  $\alpha$ -химотрипсина (3, 4) при обработке их  $H_2O_2$  (a) или ионами  $Fe^{2+}$  (б). Изменения выражены в % по отношению к контролю, принятому за 100%. Фибринолиз изучен на фибриновых пластинах, приготовленных на 0,03 М трис-НСl буфере рН 7,4 (1, 3) или 0,03 М фосфатном буфере рН 7,4 (2, 4). Образцы химотрипсин(оген)а растворены в этих же буферных растворах

Таблица 1. Влияние перехватчиков активных форм кислорода на активацию  $\alpha$ -химотрипсина А или пепсиногена, вызванную  $H_2O_2$  в концентрации 4,5 М ( $n = 6$ , протеолитическая активность выражена в  $mm^2$  зон лизиса фибриновых пластинок, приготовленных на 0,03 М фосфатном буфере рН 7,4; в качестве растворителя для химотрипсина использован 0,06 М фосфатный буфер рН 7,4, а для пепсиногена — 0,1 М цитрат-ацетатный буфер рН 2,5 М)

Перехватчик	Химотрипсинаген		Пепсиноген	
	без обработки	+ $H_2O_2$	без обработки	+ $H_2O_2$
Контроль	21 ± 2	72 ± 4	36 ± 2	88 ± 6
Азид натрия, 0,01 М	20 ± 3	88 ± 3 *	13 ± 2 *	30 ± 3 *
L-гистидин, 0,01 М	19 ± 1	73 ± 4	24 ± 1 *	78 ± 9
L-триптофан, 0,01 М	20 ± 3	68 ± 5	35 ± 2	95 ± 6
D-маннит, 0,01 М	20 ± 0	86 ± 4 *	39 ± 3	91 ± 7
Этанол, 10%	16 ± 1 *	68 ± 4	9 ± 1 *	74 ± 8
Формиат натрия, 0,01 М	19 ± 0	79 ± 3	24 ± 0 *	19 ± 2 *
Нитротетразолиевый синий, 0,01 М	17 ± 1 *	24 ± 2 *	0 *	0 *
Адреналин, 0,01 М	27 ± 2 *	82 ± 3	51 ± 5 *	113 ± 5 *

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

Обработка образцов химотрипсина системами генерирования супероксидного радикала в отдельных случаях вела к росту их фибринолитической активности на 23—42% (табл. 2). Это зависит от состава системы генерирования радикалов, ионного состава среды. По-видимому, изменяя концентрацию компонентов системы и время экспозиции можно достичь и более впечатляющего результата.

Известно, что рН-оптимум действия пепсина на нативные белковые субстраты составляет 1,5—2,0 [7]. Однако поскольку при этой величине рН активация зимогена протекала очень быстро, основные эксперименты проведены при рН 2,5, где фибринолитическая активность пепсина равна 30% от таковой при рН-оптимуме.

Действие  $H_2O_2$  на протеолитическую активность образцов пепсиногена существенно зависело от ионного состава среды (рис. 2). Сопоставление его с влиянием перекиси на актив-

ность пепсина позволяет допустить возможность активации пепсиногена  $H_2O_2$  только при наличии ионов фосфата в растворе. В отличие от химотрипсиногена, активация этого зимогена (в том числе при обработке  $H_2O_2$ ) подавлялась рядом перехватчиков: азидом, гистидином, формиатом, нитротетразолиевым синим (см. табл. 1). Между тем, активность пепсина нечувствительна ко всем использованным перехватчикам (в данной концентрации), за исключением нитротетразолиевого синего [2]. По-видимому, наблюдаемое нами угнетение фибринолитической активности и образцов пепсиногена обусловлено воздействием перехватчиков именно на активацию зимогена. Эффект адреналина не совсем обычен: протеолитическая активность в его присутствии растет на 30—40%. В прежних исследованиях его действия на протеиназы и зимогены мы не наблюдали такой картины. Эта особенность нуждается в отдельном изучении.

Таблица 2. Фибринолитическая активность ( $\% \text{ мм}^2$  зон фибринолиза) образцов  $\alpha$ -химотрипсиногена А или пепсиногена при обработке их системами генерирования супероксидных радикалов ( $n = 6$ ; использованы пластины, приготовленные на 0,03 М фосфатном или трис-НСI буфере рН 7,4; в качестве растворителя для химотрипсиногена использовали 0,06 М фосфатный или трис-НСI буфер рН 7,4, а для пепсиногена — 0,1 М цитрат-ацетатный буфер рН 2,5)

Условия эксперимента	Химотрипсиноген А, лизис пластин на		Пепсиноген, лизис пластин на	
	фосфатном буфере	трис-НСI буфере	фосфатном буфере	трис-НСI буфере
Зимоген ( контроль )	64 ± 3	113 ± 9	49 ± 3	60 ± 4
+ ТЕМЕД ( $6 \cdot 10^{-3}$ М )+рибофлавин ( $7 \cdot 10^{-6}$ М ), 30 сек hv 2 мин hv	68 ± 4 89 ± 5 *	121 ± 11 104 ± 11	46 ± 5 44 ± 2	57 ± 3 57 ± 4
+NADH ( $1,7 \cdot 10^{-4}$ М )+рибофлавин ( $1,7 \cdot 10^{-4}$ М )+FeSO <sub>4</sub> ( $10^{-3}$ М )	77 ± 4 *	116 ± 7	45 ± 6	66 ± 5
+L-метионин ( $8 \cdot 10^{-3}$ М )+рибофлавин ( $1,1 \cdot 10^{-4}$ М )	67 ± 5	129 ± 10	46 ± 5	60 ± 4
+NADH ( $3 \cdot 10^{-4}$ М )+ФМС ( $3 \cdot 10^{-6}$ М )	79 ± 3 *	160 ± 12 *	49 ± 4	98 ± 7 *

В присутствии ионов  $Fe^{2+}$  изменения протеолитической активности образцов пепсиногена и пепсина наводят на мысль о том, что активация зимогена возможна лишь в отсутствие ионов фосфата и в диапазоне концентрации ионов железа  $10^{-6}$ — $10^{-2}$ М (см. рис. 2).

Обработка образцов пепсиногена системами генерирования супероксидного радикала только в одном случае вела к росту фибринолитической активности на 60% (табл. 2).

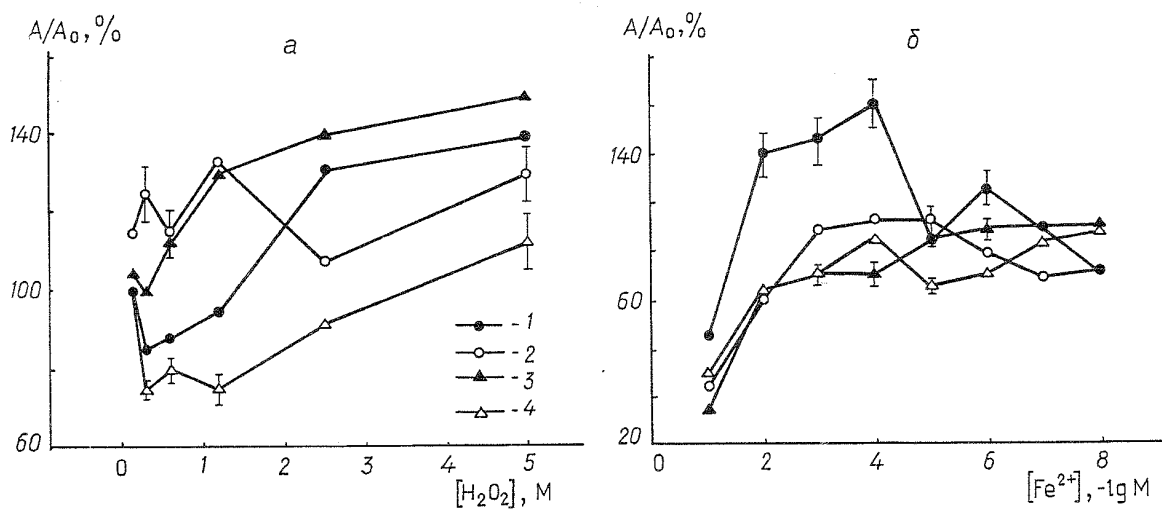


Рис. 2. Влияние  $H_2O_2$  (а) или ионов двухвалентного железа (б) на лизис фибриновых пластин образцами пепсиногена (1, 2) или пепсина (3, 4). Использованы фибриновые пластины аналогичные рис. 1, образцы пепсин(оген)а растворены в 0,1 М цитрат-ацетатном буфере рН 2,5

В экспериментах с образцами пепсиногена при рН 1,4 активация зимогена  $H_2O_2$  выявлялась лишь на пластинах фибрина, приготовленных на фосфатном буфере ( не показано). При концентрации  $H_2O_2$  1,0—3,5М увеличение фибринолитической активности образцов зимогена составило 40—60% в сравнении с контролем, а активность образцов пепсина при этом почти не менялась. Обработка зимогена при рН 1,4 ионами  $Fe^{2+}$  не вела к активации.

Изложенные материалы дают основания считать, что активные формы кислорода способны активировать химотрипсиноген и пепсиноген. Это расширяет сферу реализации кислородзависимых реакций протеолиза. С принятых позиций невозможности активации этих зимогенов собственными протеиназами, полученные факты можно считать весомым подкреплением предположения об участии активных форм кислорода в активации зимогенов. Активация химотрипсиногена (по аналогии с плазминогеном), по-видимому, реализуется с участием супероксидного радикала. Активация пепсиногена протекает более сложно, с вовлечением других форм активного кислорода (синглетного,  $\cdot OH$ ). Из сопоставления полученных фактов с ранее опубликованными материалами по активации плазминогена и трипсиногена [4,8], видны особенности, свойственные каждому из зимогенов. Вместе с тем активация химотрипсиногена, как и плазминогена, максимальна при концентрации  $H_2O_2$  выше 2,5М, при обработке ионами  $Fe^{2+}$  более демонстративна в присутствии ионов фосфата. Сходство этих двух зимогенов заключается и в большей эффективности системы ТЕМЕД+рибофлавин в сравнении с остальными. Пепсиноген среди исследованных зимогенов занимает отдельное место, возможно, в силу принципиальных отличий структуры его от зимогенов сериновых протеиназ.

### Summary

The treatment of purified samples of  $\alpha$ -chymotrypsinogen A or pepsinogen with  $H_2O_2$ ,  $Fe^{2+}$  or  $O_2^-$ -generating systems leads to a significant increase of proteolytic activity.  $H_2O_2$ -induced activation of both zymogens are strongly inhibited by nitrotetrazolium blue, and pepsinogen activation — also by azide or formate. The effect of  $Fe^{2+}$  or  $O_2^-$ -generation systems depends on their concentration, ionic composition of medium, and composition of the systems.

### Литература

1. Н и к а н д р о в В. Н.// Профилактика и лечение инфекционных и паразитарных заболеваний. Матер. юбил. конфер. Мн., 1995. С. 274—286.
2. Р у з х о в а N. S., Н и к а н д р о в V. N.// Thromb. Res. 1996. Vol. 82, N 4. P. 303—312.
3. Н и к а н д р о в В. Н. Стрептокиназа. Структурные и функциональные свойства. Дис. ... д-ра биол. наук. Мн., 1989.
4. П ы ж о в а Н. С., Н и к а н д р о в В. Н. //Докл. АН БССР. 1991. Т. 35, № 12. С. 1130—1133.
5. В u s t i n M., С o n w a y - J a c o b s A. // J. Biol. Chem., 1971. Vol. 246, N 3. P. 615—620.
6. А р р е l W.// Clin. Biochem. 1986. Vol. 19, N 6. P. 317—322.
7. М о с о л о в В. В. Протеолитические ферменты. М., 1971.
8. П ы ж о в а Н. С. Участие активных форм кислорода в процессах протеолиза. Дис. ... канд. биол. наук. Мн., 1991.

Белорусский научно-исследовательский институт  
эпидемиологии и микробиологии  
Минздрава Республики Беларусь

Поступило 25.09.2000