

УДК 577.15.024 : 546.21 : 541.515

Н. С. ПЫЖОВА, В. Н. НИКАНДРОВ

**АКТИВАЦИЯ ТРИПСИНОГЕНА БЫКА
В ПРИСУТСТВИИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА**

(Представлено академиком АН БССР Е. Ф. Коноплей)

Физико-химические механизмы протеолитических реакций остаются недостаточно ясными, несмотря на длительную историю проблемы. В последние годы было установлено участие супероксидного радикала в активации плазминогена стрептокиназой и получены свидетельства участия этого радикала в протеолизе, катализируемом папаином и пепсином [1, 2]. На этой основе сформулирована гипотеза кислород-зависимых реакций протеолиза [2, 3], одним из положений которой является участие кислородных радикалов в активации зимогенов протеиназ. Однако до настоящего времени такое участие было показано лишь для плазминогена. Между тем данный вопрос имеет принципиальное значение, поскольку характеризует степень распространенности кислород-зависимых механизмов протеолиза.

Исходя из изложенного, в настоящей работе изучена возможность активации трипсиногена — зимогена — широко распространенной протеиназы трипсина (причем трипсиноген существенно отличается по структурной организации от плазминогена) — в присутствии источников активных форм кислорода.

Эксперименты проведены с использованием образцов очищенного трипсиногена быка (Sigma, США; Lot 129 F8090). Автокаталитическую активацию зимогена проводили, инкубируя его растворы (7,2 мг/мл) в 0,1 М трис-НСl буфере рН 8,0 при 32 °С в присутствии ионов кальция в конечной концентрации 0,05 М [4]. Для изучения активации трипсиногена в присутствии источников активных форм кислорода его растворы обрабатывали при рН 7,4 перекисью водорода в конечной концентрации 0,1—4,5 М; системами генерирования супероксидных радикалов: тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД) + рибофлавин; NADH + рибофлавин + FeSO₄; феназинметосульфат (ФМС) + NADH; L-метионин + рибофлавин [5—8], а также ионами двухвалентного железа в виде FeSO₄ в конечной концентрации 10⁻⁶—10⁻¹ М.

Протеолитическую активность оценивали по методу лизиса фибриновых пластин, как подробно описано нами ранее [1]. Инактивацию присутствующего в фибриновом геле плазминогена проводили посредством УФ-облучения фибриновых пластин [9].

В работе использованы трипсиноген и трипсин быка (Sigma, США), ТЕМЕД, рибофлавин, L-метионин, L-триптофан, L-гистидин, (Reanal, Венгрия), D-маннит (Chemapol, ЧСФР), ФМС (Ferak, ФРГ). Остальные реактивы были отечественного производства квалификации «хч» или «чда», как и человеческие фибриноген и тромбин, их подвергали дополнительной очистке.

Все эксперименты выполнены 5—6-тикратно, результаты подвергнуты статистической обработке с вычислением *t*-критерия Стьюдента.

Обработка трипсиногена перекисью водорода вызывает увеличение их протеолитической активности в зависимости от концентрации H₂O₂ (рис. 1) с максимумом при 0,5—0,6 М H₂O₂. Причем эффективность активации трипсиногена при обработке его H₂O₂ не уступает таковой при автокаталитическом процессе в присутствии Ca²⁺.

Условие эксперимента	Площадь зон фибринолиза, мм ²	
Трипсиноген без обработки (контроль)	900 ± 55	
Трипсиноген после инкубации с 0,05М Са ²⁺	2500 ± 174	P < 0,001
Трипсиноген после обработки 0,5М Н ₂ О ₂	2620 ± 192	P < 0,001

По-видимому, активация трипсиногена в присутствии Н₂О₂ не связана с автокаталитическим действием на молекулы зимогена примеси активного трипсина. Так, обработка последнего перекисью водорода увеличивала активность его образцов лишь на 50%, а увеличение это проявлялось при значительно более высокой концентрации Н₂О₂, чем в случае активации трипсиногена (рис. 1). Более того, если активация трипсиногена отмечена во всем диапазоне использованных концентраций Н₂О₂ и даже при концентрации 4,5 М (хотя в несколько меньшей степени, чем при 0,5—0,6 М), то активность трипсина при такой высокой концентрации Н₂О₂ угнетается. Это позволяет думать, что обработка трипсиногена перекисью водорода вызывает именно активацию его, что ранее мы наблюдали и на примере плазминогена человека [10]. Но в отличие от последнего трипсиноген активируется под действием Н₂О₂ в значительно большей степени.

Поскольку ранее нами было показано, что Н₂О₂-зависимая активация плазминогена обусловлена, по-видимому, участием в процессе супероксидного радикала [10], было исследовано влияние перехватчиков различных активных форм кислорода на активацию трипсиногена. Этот процесс, инициируемый Н₂О₂, оказался мало чувствительным к перехватчикам синглетного кислорода, ·ОН-радикала, но на 30% подавлялся нитротетразолиевым синим (табл. 1). Специальными исследованиями мы установили, что в концентрации 0,01 М этот перехватчик супероксидного радикала понижает фибринолитическую активность трипсина не более, чем на 13%: площадь зон фибринолиза (мм²) равна в контроле 203 ± 16 и в присутствии 0,01 М нитротетразолиевого синего — 179 ± 11. Исходя из данных фактов, можно полагать, что воздействие нитротетразолиевого синего реализуется на процесс активации зимогена.

Обработка трипсиногена системами генерирования супероксидного радикала вместо Н₂О₂ лишь в трех случаях из четырех обусловила частичную активацию трипсиногена (табл. 2). Причем, как и в случае

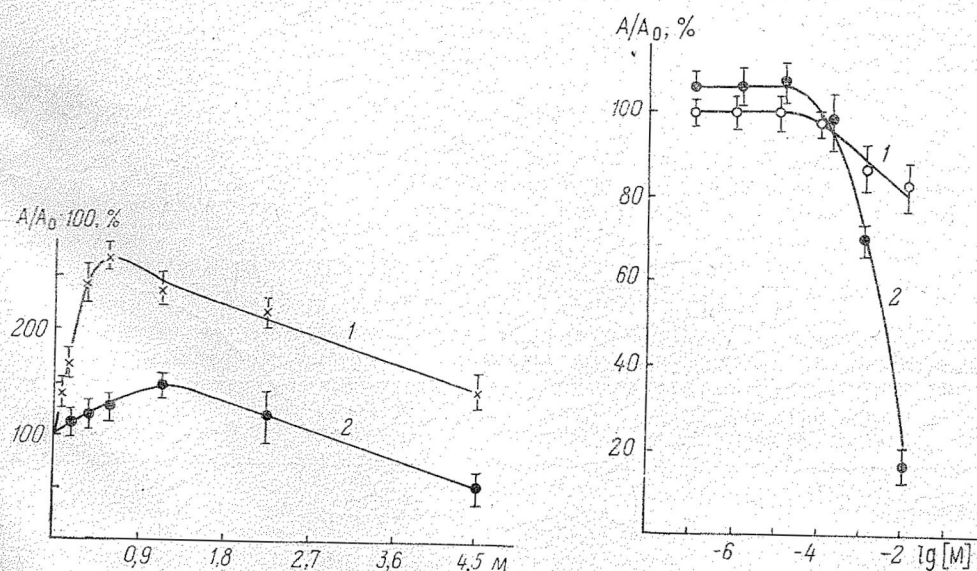


Рис. 1. Изменения фибринолитической активности образцов трипсиногена (1) и трипсина (2) при обработке их Н₂О₂. Изменения выражены в % по отношению к контролю, принятому за 100%

Рис. 2. Влияние ионов двухвалентного железа на лизис фибриновых пластин трипсином в отсутствие в среде ионов фосфата (1) и в 0,06 М фосфатном буфере (2)

активации плазминогена человека [9], наиболее эффективной была система «ТЕМЕД-рибофлавин». Однако такая обработка трипсиногена приводит к приросту протеолитической активности лишь на 20—30%. По-видимому, это обусловлено высокой агрессивностью образующихся форм активного кислорода и их неспецифическими повреждениями молекулы зимогена, ибо считают, что трипсин относительно устойчив к действию радикалов $\cdot\text{OH}$ и O_2^- [11].

Аналогично плазминогену человека [12] обработка трипсиногена ионами двухвалентного железа приводит к росту протеолитической активности, зависящему от концентрации этих ионов и от присутствия ионов фосфата в среде (табл. 3). Так, в концентрации более 10^{-4} М ионы железа не вызывают активации трипсиногена. Это вполне объяснимо, учитывая то обстоятельство, что при такой концентрации ионы железа подавляют фибринолитическую активность трипсина (рис. 2). Подобный эффект усиливается в присутствии ионов фосфата. В силу этого присутствие последнего и не позволяет зафиксировать активацию трипсиногена при обработке его образцов ионами железа (табл. 3).

Полученные материалы дают основание считать, что активные формы кислорода способны активировать трипсиноген. Причем наблюдается определенное сходство с активацией плазминогена человека, несмотря на существенные различия молекулярной организации этих двух зимогенов: оба они активируются при обработке H_2O_2 , системами генерирования супероксидных радикалов, при добавках ионов двухвалентного железа. Вместе с тем имеется ряд отличий. Основное, по-видимому, заключается в различии путей участия кислородных радикалов в процессе активации зимогенов: если в случае плазминогена ведущая роль принадлежит, вероятнее всего, супероксидному радикалу, а введение перехватчика — нитротетразолиевого синего — полностью подавляет активацию, то в случае трипсиногена этот перехватчик лишь частично блоки-

Таблица 1. Влияние перехватчиков активных форм кислорода на активацию трипсиногена ($n=6$)

Перехватчик	Площадь зон фибринолиза (мм ²), вызываемого образцами трипсиногена	
	не обработанными H_2O_2	обработанными H_2O_2
Контроль	44±3	139±9
Азид натрия 0,1М	73±5	158±10
L-гистидин 0,01М	55±2	150±11
L-триптофан 0,01М	38±3	118±8
D-маннит 0,01М	37±2	118±10
Этанол 2,5М	35±2	122±10
Нитротетразолиевый синий, 0,01М	35±2	101±8*

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

Таблица 2. Фибринолитическая активность образцов трипсиногена при обработке их системами генерирования супероксидных радикалов ($n=6$)

Условие эксперимента	Площадь зон фибринолиза, мм ²
Трипсиноген (контроль)	96±4
ТЕМЕД ($6 \cdot 10^{-3}$ М) +рибофлавин ($7 \cdot 10^{-6}$ М)	0
NADH ($1,7 \cdot 10^{-4}$ М) +рибофлавин ($1,7 \cdot 10^{-4}$ М) + FeSO_4 (10^{-3} М)	0
ФМС ($3 \cdot 10^{-6}$ М) +NADH ($3 \cdot 10^{-4}$ М)	0
L-метионин ($8 \cdot 10^{-3}$ М) +рибофлавин ($1,1 \cdot 10^{-4}$ М)	0
Трипсиноген +ТЕМЕД +рибофлавин	124±9*
Трипсиноген +NADH +рибофлавин + FeSO_4	63±5*
Трипсиноген +ФМС +NADH	115±8*
Трипсиноген +L-метионин +рибофлавин	118±6*

рует активацию. Логично предположить, что в данном случае имеет место участие так называемого «криптогенного» $\cdot\text{OH}$ -радикала, образующегося из супероксидного в определенном участке молекулы трипсиногена. Как известно, такой радикал слабо чувствителен к различным перехватчикам [13].

Следует отметить, что механизм автокаталитической активации трипсиногена до сих пор не вполне ясен. Большинство исследователей склонно считать реализацию этого пути следствием действия примесей актив-

Т а б л и ц а 3. Влияние ионов двухвалентного железа на фибринолитическую активность образцов трипсиногена ($n=6$)

Концентрация ионов железа, М	Площадь зон фибринолиза, мм ²	
	в отсутствие ионов фосфата	в 0,06М фосфатном буфере
контроль	96±6	96±8
10 ⁻⁶	327±24*	96±9
10 ⁻⁵	231±30*	77±8
10 ⁻⁴	115±10	67±4*
10 ⁻³	0	63±9
10 ⁻²	0	0
10 ⁻¹	0	0

ного трипсина [14, 15]. Однако имеются факты, не укладывающиеся в подобную трактовку: образцы трипсиногена, предварительно обработанные специфическим ингибитором трипсина из соевых бобов, полностью сохраняли способность автокаталитической активации [4].

Представленные нами результаты и их истолкование позволяют иначе взглянуть на механизм аутоактивации трипсиногена и подтверждают гипотезу кислород-зависимых реакций протеолиза. Дальнейшее расширение сферы реализации подобных реакций при активации зимогенов протеиназ, вероятно, уже является делом времени. Однако возникает чрезвычайно важный вопрос об источнике активных форм кислорода, способных вызвать аутоактивацию трипсиногена. Ответ на этот вопрос является самостоятельной задачей и требует специальных исследований.

Summary

During the treatment of trypsinogen by H_2O_2 , C_2^- radical generating systems and by Fe^{2+} ions, the zymogen activation is observed. The H_2O_2 -dependent trypsinogen activation is partially suppressed by nitrotetrazolium blue. It is assumed that, in contrast to plasminogen activation, the «cryptogenic OH» radical contributes greatly to the trypsinogen activation.

Литература

1. Никандров В. Н., Пыжова Н. С., Вотяков В. И., Клиnger Ю. Е. // Докл. АН БССР. 1987. Т. 31, №4. С. 375—378.
2. Nikandrov V. N. // 14th Internat. Congress of Biochemistry: Abstracts Prague, 1988. Vol. 1. P. 60.
3. Nikandrov V. N., Pyzhova N. S. // Folia Haematol. 1988. Bd. 115, N 4. S. 557—561.
4. Kay J., Kassel B. // J. Biol. Chem. 1971. Vol. 246, N 21. P. 6661—6665.
5. Veuchamp Ch., Fridovich I. // Anal. Biochem. 1971. Vol. 44, N 1. P. 276—287.
6. Лапина В. А., Донцов А. Е., Островский М. А. // Биохимия. 1984. Т. 49, № 10. С. 1712—1718.
7. Nishikimi M., Rao N. A., Jagi K. // Biochem. biophys. res. commun. 1972. Vol. 46, N 2. P. 849—856.
8. Никандров В. Н., Вотяков В. И., Судник Ю. М. А. с. 1252338 (СССР). Бюл. изобрет. 1986. № 31.
9. А. С. 1472508 (СССР). // Бюл. изобрет. 1989. № 14.
10. Никандров В. Н., Пыжова Н. С. // Вестн. АН БССР. Сер. биял. наук. 1989. № 1. С. 34—39.
11. Davies K. J. A. // J. Biol. Chem. 1987. Vol. 262, N 20. P. 9895—9901.
12. Pyzhova N. S., Nikandrov V. N., Nikandrov N. N. // 20th Meeting of FEBS: Abstracts. Budapest, 1990. P. 65.
13. Мерзляк М. Н. Активированный кислород и окислительные процессы в мембранах растительной клетки: Итоги науки и техники. Физиология растений. Т. 6. ВИНТИ. М., 1989. 168 с.
14. Мосолов В. В. Протеолитические ферменты. М., 1971.
15. Антонов В. К. Химия протеолиза. М., 1983.