

ISSN 1810-5033

**НОВОСТИ
МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ
НАУК**

**NEWS
OF BIOMEDICAL
SCIENCES**

Минск

3 2004

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор В.Н. Гурин

**Ф.И. Висмонт, Н.Н. Войтенко, В.И. Вотяков, А.В. Гурин,
В.А. Кульчицкий (зам. главного редактора), Л.М. Лобанок,
В.А. Матюхин, В.Н. Никандров, И.Н. Семененя, В.В. Солтанов,
С.Н. Черенкевич, А.Г. Чумак, Г.П. Миронова (ответственный секретарь)**

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

**К.В. Анохин (Москва), Н.Н. Боголепов (Москва), Ю.А. Владимиров (Москва),
А.И. Григорьев (Москва), П.П. Денисенко (Санкт-Петербург),
Д.П. Дворецкий (Санкт-Петербург), Ю.Д. Игнатов (Санкт-Петербург),
А.А. Кубатиев (Москва), В.И. Медведев (Москва), К.С. Раевский (Москва),
А.Н. Разумов (Москва), В.Л. Свидерский (Санкт-Петербург), С.Б. Середенин
(Москва), К.В. Судаков (Москва), Б.И. Ткаченко (Санкт-Петербург),
В.А. Труфакин (Новосибирск), G. Burnstock (UK), N. Dale (UK),
R. Gerstberger (Germany), M. J. Kluger (USA), V. Lasetic (Serbia and
Montenegro), K.M. Spyer (UK), M. Szekely (Hungary), W. Winlow (UK)**

АДРЕС РЕДАКЦИИ:

220072, Минск, ул. Академическая, 28, к. 203. Тел. 284-16-30

Факс: 8-10-375-17-284-16-30

E-mail: biblio@fizio.bas-net.by

ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК
БЕЛАРУСИ

НОВОСТИ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

NEWS OF BIOMEDICAL SCIENCES

Научное издание
№ 3, 2004

*Основан в 2001 году как журнал «Известия Национальной академии наук
Беларуси». Серия «Медико-биологических наук»*

Выходит четыре раза в год

СОДЕРЖАНИЕ

ФИЗИОЛОГИЯ И ОБЩАЯ ПАТОЛОГИЯ

Raevsky V.V., Dawe G.S., Zarei M., Stephenson J.D. Excitatory and inhibitory responses to acetylcholine and noradrenaline in the somatosensory cortex of young and aged rats.....	5
Лукашенко Т.М., Солтанов В.В. Изменение активности нейронов ретикулярной формации продолговатого мозга при введении липополисахарида <i>E.coli</i> в тонкую кишку ваготомированным крысам.....	15
Солтанов В.В., Головач М.В. Гуморальный путь модуляции активности симпатических эфферентных волокон при введении аденозина в кишку	19
Шишкова М.К., Семененя И.Н., Пономарев В.В. Содержание прогестерона, тиреоидных гормонов и кортизола в ликворе у пациентов с субфебрилитетом.....	25
Мардас Д.К. Изменение активности ингибиторов протеиназ и концентрации кортикостерона и йодсодержащих тиреоидных гормонов в крови у крыс при перегревании.....	28
Степанова Н.А. Участие монооксида азота в механизмах влияния три- и тетраодтиронина на процессы детоксикации и температуру тела при экспериментальной лихорадке.....	34
Булгак А.А., Мрочек А.Г., Гурин А.В. К вопросу об участии полиморфно-ядерных лейкоцитов при реперфузионных повреждениях миокарда.....	40
Калюнов В.Н., Чаплинская Е.В., Житкевич Т.И. Содержание нейроростового протеина в плазме крови доноров и пациентов с хроническим бронхитом.....	46

НЕЙРОМОРФОЛОГИЯ И НЕЙРОХИМИЯ

- Арчакова Л.И., Тур Г.Е., Новаковская С.А. Особенности организации подслизистой основы толстой кишки человека и ее значение в формировании межкишечных анастомозов 50

БИОХИМИЯ И ЭНДОКРИНОЛОГИЯ

- Макарчиков А.Ф., Русина И.М., Лучко Т.А. Модификация метода определения активности тиаминтрифосфатазы и его использование для исследований транспорта фермента в митохондриях почек быка..... 56
- Пронько С.П., Зиматкин С.М. Метаболизм этанола у мышей с генетически обусловленным дефицитом каталазы и цитохрома P450 2E1..... 64
- Лапшина Е.А., Доманский А.В., Заводник Л.Б., Заводник И.Б. Лизис эритроцитов человека, индуцируемый гипохлорной кислотой. Эффект органической гидроперекиси и нитрита..... 68
- Надольник Л.И., Нецецкая З. В., Виноградов В. В. Влияние однократного воздействия внешнего γ -излучения на активность тиреопероксидазы щитовидной железы крыс..... 75
- Броско Н.В., Заводник Л.Б., Белоновская Е.Б., Буко В.У. Исследование сочетанного влияния железа и μ -излучения на свободно-радикальные процессы и структуру печени крыс..... 79
- Шпак Г.А. Ранний метаболический ответ клеток PC12 на действие полипептидных факторов роста при тепловом шоке..... 86

ФАРМАКОЛОГИЯ И ТОКСИКОЛОГИЯ

- Гаркун Ю.С., Денисов А.А., Черенкевич С.Н., Молчанов П.Г., Кульчицкий В.А. Нейротоксические эффекты иботеновой кислоты в гиппокампе..... 92
- Иоскевич Н.Н., Мойсеенок А.Г. Пантенол как средство профилактики и лечения реперфузионно-реоксигенационного синдрома нижних конечностей..... 96

МЕДИЦИНСКАЯ БИОЛОГИЯ И МЕДИЦИНСКАЯ ГЕНЕТИКА

- Бекиш О.-Я.Л., Бекиш Вл.Я. Значение свободнорадикальных процессов в становлении системы паразит-хозяин при гельминтозах 103
- Красковский Г.В., Терпинская Т.И., Миронова Г.И., Манина Е.Ю., Росецкая С.Д. Влияние иммунизации в латентный период ассоциацией негомологичных онкотолерогена и адьюванта на индуцированное уретаном опухолеобразование в легких у мышей..... 111
- Suleymanoglu E. Molecular phylogenetics and functional evolution of major RNA recognition domains of recently cloned and characterized autoimmune RNA-binding particle..... 116

ОБЗОРЫ

- Никандров В.Н. Структура и свойства молекулы плазминогена..... 127
- Nichelmann M. What is the optimum temperature for animal keeping: a synopsis of own experiments 147

NEWS OF BIOMEDICAL SCIENCES

No 3, 2004

Founded by Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Belarus

Published quarterly since January, 2001

Editorial Board:

V. N. Gourine (Editor-in-Chief)

S. N. Cherenkevich, A.G. Chumak, A. V. Gourine, V.A. Kulchitsky (Associate Editor-in-Chief)
L. M. Lobanok, V. A. Matukhin, G. P. Mironova (Responsible Secretary), B. N. Nikandrov,
I. N. Semeneya, V. V. Soltanov,
F.I. Vismont, N. N. Voitenok, V. I. Votiakov

Address of the Editorial Office:

220072 Minsk, Akademicheskaya str. 28, room 203

Republic of Belarus

Tel/Fax: (375)-17-284-16-30

E-mail: biblio@fizio.bas.-net.by

CONTENTS

PHYSIOLOGY AND GENERAL PATHOLOGY

- Raevsky V.V., Dawe G. S., Zarei M., Stephenson J. D.** Excitatory and inhibitory responses to acetylcholine and noradrenaline in the somatosensory cortex of young and aged rats..... 5
- Lukashenko T.M., Soltanov V.V.** Changes in the neuronal activity in the bulbar reticular formation after application of lipopolysaccharide *E.coli* to the small intestine of vagotomized rats..... 15
- Soltanov V.V., Halavach M.V.** Humoral modulation of activity of sympathetic efferent fibers after infusion of adenosine into the small intestine..... 19
- Shishkova M.K., Semeneya I.N., Ponomarev V.V.** Progesterone, thyroid hormones, and cortisol in liquor of subfebrile patients..... 25
- Mardas D.K.** Influence of high temperature on the activity of proteinase inhibitors and concentration of corticosterone and iodine-containing thyroid hormones in blood of rats..... 28
- Stepanova N. A.** Participation of nitric oxide in the mechanisms of the influence of tri- and tetraiodothyronine on the detoxication processes and body temperature during experimental fever..... 34

Bulhak A.A., Mrochek A.G., Gourine A.V. Polymorphonuclear leukocytes in myocardial reperfusion injury.....	40
Kalunov V.N., Chaplinskaya E.V. Zhitkevich T.I. The content of nerve growth protein in blood plasma of donors and chronic bronchitis patients	46
NEUROMORPHOLOGY AND NEUROCHEMISTRY	
Archakova L.I., Tur G.E., Novakovskaya S.A. Some features of organization of tela submucosa of the human large intestine and its significance in the formation of intestinal anastomosis.....	50
BIOCHEMISTRY AND ENDOCRINOLOGY	
Makarchikov A. F., Rusina I. M., Luchko T. A. A modified method of measurement of the thiamine triphosphatase activity and its use in studies of the enzyme transport into bovine kidney mitochondria.....	56
Pronko S.P., Zimatkin S.M. Ethanol metabolism in mice with genetically specified deficiency of catalase and cytochrome P450 E1.....	64
Lapshina E.A., Domanski A.V., Zavodnik L.B., Zavodnik I.B. Lysis of human red blood cells induced by hypochlorous acid. Effect of organic hydroperoxide and nitrite.....	68
Nadolnik L.I., Niatsetskaya Z.V., Vinogradov V.V. The effect of single external γ -radiation exposure on thyroperoxidase activity of the rat thyroid.....	75
Brasko N.V., Zavodnik L.B., Belanovskaya E.B., Buko V.U. A combined iron and γ -irradiation effect on free radical processes and liver texture in rats.....	79
Shpak G.A. Early metabolic response of PC12 cells to polypeptide growth factors under heat shock.....	86
PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY	
Garkun Yu.S., Denisov A.A., Cherenkevich S.N., Molchanov P.G., Kulchitsky V.A. Neurotoxic effects of ibotenic acid in the hippocampus.....	92
Ioskevich N.N., Moiseenok A.G. Pantenol as a remedy in prevention and treatment of reperfusion and reoxygenation syndrome in the lower extremities	96
MEDICAL BIOLOGY AND MEDICAL GENETICS	
Bekish O.-J.L., Bekish V.J. The importance of free radical processes for parasite – host system in helminthosis	103
Kraskovsky G. V., Terpinskaya T. I., Mironova G.I., Manina E. Ju., Rosetskaya S. D. The effect of immunization by an association of non-homologous oncotolerogen and adjuvant in the latency of urethane-induced tumour growth in lungs of mice.....	111
Suleymanoglu E. Molecular phylogenetics and functional evolution of major RNA recognition domains of recently cloned and characterized autoimmune RNA-binding particle.....	116
REVIEWS	
Nikandrov V.N. The structure and properties of a plasminogen molecule.....	127
Nichelmann M. What is the optimum temperature for animal keeping: a synopsis of own experiments... ..	147

*В.Н. НИКАНДРОВ***СТРУКТУРА И СВОЙСТВА МОЛЕКУЛЫ ПЛАЗМИНОГЕНА***Институт физиологии НАН Беларуси, Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии Минздрава Республики Беларусь*

Протеолитические реакции играют важную роль в реализации многих (если не всех) процессов жизнедеятельности и практически всех основных патологических процессов.

Среди множества звеньев протеолиза достаточно пристальное внимание исследователей привлекает система плазминоген (Pg) – плазмин, включающая не менее десяти различных белков: Pg, активаторы Pg, ингибиторы этих активаторов, плазмин, ингибиторы плазмينا. Эта система – один из двух известных в настоящее время механизмов модификации межклеточного матрикса – арены межклеточных взаимодействий и разнообразных многочисленных событий, развертывающихся на поверхности клетки. Стратегическое положение в системе, как традиционно принято считать применительно к кровяному руслу и кровотоку, занимает реакция образования сериновой трипсиноподобной протеиназы – плазмина (Е.С. 3.4.21.7) из зимогена – Pg. Неудивительно, что эта реакция и ее компоненты являются объектом многолетних интенсивных исследований целого ряда научных центров и лабораторий. Этим объясняется и то внимание, которое уделяют молекуле Pg. Представление о роли этого зимогена в организме за последние десятилетия заметно изменилось. Наибольшее количество Pg, по-видимому, синтезируется в печени [1,2]. Однако известны места независимого внепеченочного синтеза белка: например, микроглия нервной ткани [3], роговица глаза [4]. Установлено наличие специфических рецепторов Pg на поверхности мембран ряда клеток животного организма [5,6] и патогенных микроорганизмов: возбудителей менингита, *Salmonella enterica* var. *typhimurium* [7], *Helicobacter pylori* [8], *Borrelia burgdorferi* [9] и других. В нервной ткани Pg фактически выполняет функции нейротрофина: например, промотирует генез мезэнцефальных дофаминергических нейронов, модулирует функции NMDA-рецепторов нейронов гиппокампа [10]. Добавки Pg (10^{-10} – 10^{-8} М) к культуре клеток симпатических ганглиев оказывали защитное действие от повреждающего эффекта H_2O_2 , глутамата, хлорида аммония [11,12]. Такое же защитное действие проявлялось на культуре клеток глиомы Сб при переводе их на среду с низким содержанием сыворотки крови [13]. Вместе с тем добавки Pg вызывали деструкцию клеток чувствительных спинальных ганглиев новорожденной крысы и усиливали действие на них повреждающих факторов [14]. Микроинъекции в область ядер ствола головного мозга крысы раствора Pg сопровождались изменениями электрической активности нейронов этих ядер [15], а суперфузия понтобульбоспинальных препаратов мозга крысы раствором Pg более 10 мин вела к необратимой блокаде электрической активности нейронов ядер мозга, контролирующей дыхательную функцию [16]. Даже кратковременная (20 мин) экспозиция катехоламинсодержащих клеток феохромоцитомы в растворе Pg в концентрации 10^{-10} – 10^{-7} М сопровождалась выраженными изменениями интенсивности внутриклеточного АТФ- или Ca^{2+} -активируемого протеолиза [17]. В то же время исследования показали, что в культуральной жидкости при этом не образуется сколь-нибудь заметное количество плазмина [12], т. е. Pg на преобразуется в активную протеиназу, его действие реализуется, по-видимому, непротеолитическим путем. Вероятно, роль Pg и плазмина как собственных белков молока велика при созревании ряда сортов сыра: сортов швейцарского типа, чеддера [18, 19].

Вне сомнения, это далеко не все стороны биологического действия белка. Однако и они усиливают интерес к нему, его структуре и свойствам молекулы, которые пока все еще далеки от полной ясности.

В настоящей статье обобщены данные литературы и результаты собственных исследований, проводимых с 1980 в лаборатории биохимии НИИ эпидемиологии и микробиологии Минздрава Республики Беларусь, особенностей структуры молекулы этого зимогена, ее структурной лабильности и некоторых функциональных свойств. Следует сразу оговорить, что большинство данных относится к молекуле Pg человека. Исследования сравнительно-биохимического плана представлены достаточно скупо.

Pg - является одноцепочечным гликопротеином. В составе зимогена обнаружено ~ 2.5% орцино-положительных нейтральных сахаров и 2.9 М сиаловых кислот [20], они существенны для функции

белка. Молекулярная масса этого белка в зависимости от его формы, источника выделения и метода определения оценена в 75--93 кДа: а значение pI – 6.0-8.8 [21, 22]. Молекула Pg лишена свободных SH-групп, однако содержит до 24 дисульфидных связей [23, 24], причём 1--2 из них: Cys₅₄₇--Cys₆₆₅ и Cys₅₅₇--Cys₅₆₅ имеют стратегическое значение для связи тяжёлой (H) и лёгкой (L) цепей плазмина [25], а также важны для реализации процесса активации: разрушение этих дисульфидных связей делает нечувствительной область, содержащую связь Arg₅₆₀--Val₅₆₁, к действию урокиназы. Молекула Pg человека состоит из 790 аминокислотных остатков, в том числе [26]:

Lys - 47	Thr - 61	Gly - 60	Ile - 20
His - 23	Ser - 56	Ala - 37	Leu - 42
Arg - 42	Glu - 56	Cys - 48	Tyr - 30
Asp - 36	Gln - 29	Val - 46	Phe - 20
Asn - 39	Pro - 69	Met - 10	Trp - 19

Зимоген кролика, например, состоит из 793 аминокислотных остатков, причем в нем заметно увеличено число остатков Arg – 54, Ala – 50, но снижено число остатков Pro – 58 и Val – 34 [27].

Первичная структура зимогена человека (как и отдельных видов животных) расшифрована (рис. 1). Полипептидная цепь включает 5 гомологичных повторов или “кринглов”, которые находятся в N-концевой части молекулы. Эти кринглы соответствуют автономным структурным, функциональным и сборочным единицам [28]. Единичные замены аминокислотных остатков в Pg: Ala₆₀₀→Thr ведут к функциональной блокаде активного центра образующегося из зимогена плазмина и, как следствие, к тромбофилическим состояниям. Таковы мутантные формы Pg: Tochigi I, II, Nagoya I [29]. Неактивный плазмин образуется из зимогена при замене Gly→Arg в кодоне 732 – это вариант Kanagawa I [30].

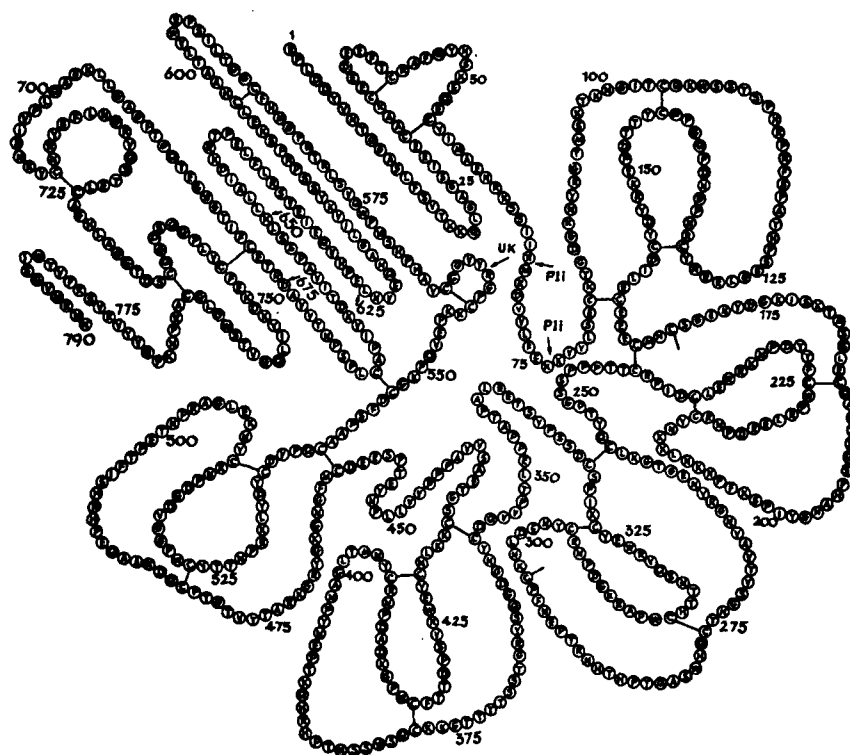


Рис.1. Первичная структура молекулы плазминогена человека [20]. Показаны места расщепления молекулы зимогена при активации его урокиназой (УК) и при частичном протеолизе N-концевой области плазмином (Pii)

Что касается **пространственной структуры** Pg, то несмотря на то, что еще D. L. Kline [31] удалось получить препараты зимогена в кристаллическом виде, она до сих пор остаётся недостаточно

туранта в концентрации менее 3 М состояние Trp-содержащих участков сильно не изменяется: сдвиги λ_{\max} и $\Delta\lambda$ не превышают 2 нм, а изменения I_{355}/I_{328} составляют 17% (рис. 7). Это позволяет предположить и некоторое разупорядочивание окружения триптофановых остатков. При концентрации GuHCl 3--4 М в изменениях Trp-содержащих участков проявляется фазность. Уже в первые 5 мин отмечен заметный батохромный сдвиг λ_{\max} , зависящий от концентрации денатуранта. При концентрации гидрохлорида гуанидина 3 М этот сдвиг нарастает к 30 минуте и дальнейших изменений не происходит. При концентрации денатуранта 4 М отмечено постепенное (но менее сильное) нарастание батохромного сдвига λ_{\max} на протяжении 120 мин. Величина $\Delta\lambda$ при действии GuHCl в обеих указанных концентрациях изменяется идентично и также с проявлением фазности: существенное увеличение значения этого параметра происходит уже через 5 мин, затем наблюдается его монотонный, но менее выраженный рост величины вплоть до 60 минуты.

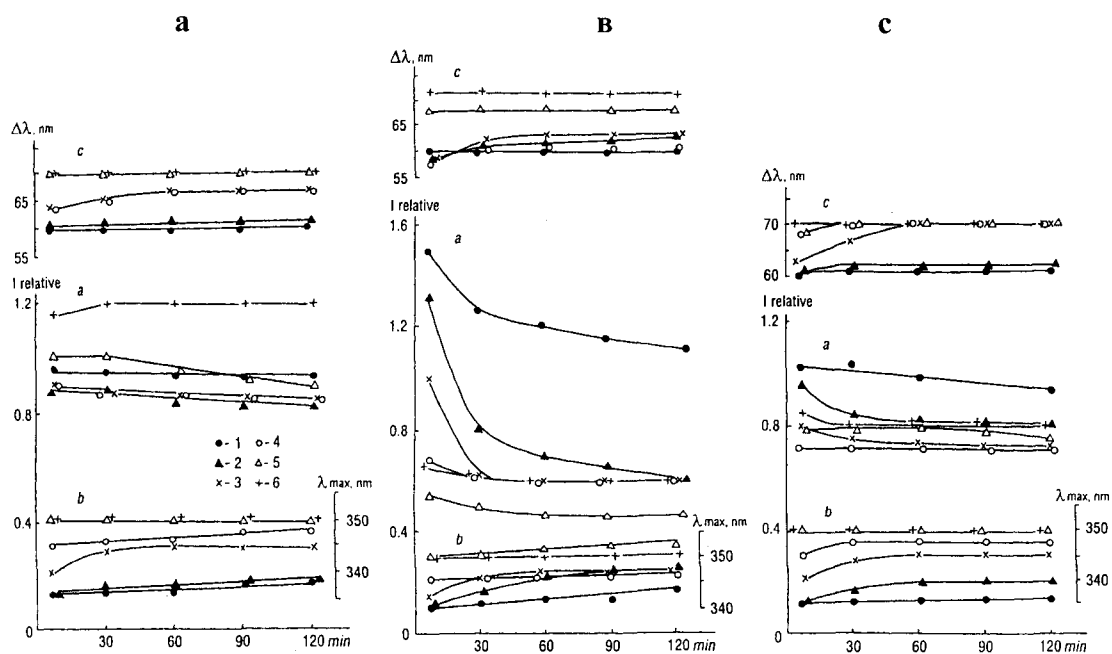


Рис.6. Влияние времени экспозиции на изменения относительной интенсивности (I_{relative} , а), положение максимума (λ_{\max} , б) и полуширины ($\Delta\lambda$, в) спектров плазминогенов человека (А), кролика (В), быка (С) при добавках гидрохлорида гуанидина в концентрации 1(1), 2 (2), 3 (3), 4 (4), 5 (5) и 6 (6) М. Растворитель – 0.06М фосфатный буфер рН 7.4, содержащий 0.1М NaCl; 25°C [96]

Тушение флуоресценции при действии GuHCl в этом диапазоне концентраций не усиливается в сравнении с эффектом денатуранта в концентрации 2 М. По-видимому, при указанных концентрациях возрастает контакт остатков триптофана с растворителем. Более того, происходит выраженное пространственное разобщение Trp-содержащих участков. Во всяком случае, на такое допущение наводит практически одинаковая динамика $\Delta\lambda$ при различающихся изменениях λ_{\max} . Величина I_{355}/I_{328} в присутствии 3 М гидрохлорида гуанидина резко возрастает через 30 мин, а при концентрации денатуранта 4 М изменения этого параметра максимальны уже через 5 мин (рис. 7). Складывается впечатление, что в последнем случае денатурант вызывает быстрое тушение преимущественно коротковолновых (“голубых”) остатков триптофана. При концентрации денатуранта 5-6 М изменения λ_{\max} , $\Delta\lambda$ и I_{355}/I_{328} сразу же достигают максимума (рис. 6, 7). Причем добавка соли гуанидина в концентрациях 5 М заметно ослабляла тушение флуоресценции, а 6 М -- увеличивала ее интенсивность на 15--20%. По-видимому, локальное разупорядочивание структуры зимогена в этих условиях ведет к снятию тушащего влияния соседних групп на флуоресценцию длинноволновых (“красных”) остатков триптофана. Это наводит на мысль, что последние ориентированы в белке при участии довольно прочных связей, не разрывааемых при меньших концентрациях денатуранта.

изученной. Методом седиментационного равновесия в нейтральном изотоническом буфере показано, что P_g не проявляет склонности к самоассоциации [32]. Из значения константы седиментации (S_{20w}^0) 4.3s, константы диффузии (D_{20w}^0) $4.31 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, парциального удельного объёма (V) $0.71 \text{ cm}^3/\text{g}$, характеристической вязкости $[\eta]$ 0.08, рассчитали молекулярный вес белка – 83.8 кДа и соотношение осей молекулы для негидратированного продолговатого эллипсоида (9–16) и для негидратированного сплющенного эллипсоида (16–22) [33]. Близкие значения константы седиментации, парциального удельного объёма и характеристической вязкости P_g получены [34]. Допуская, что молекула продолговатый негидратированный жёсткий эллипсоид, они рассчитали соотношение осей молекулы, которое оказалось равным 22.

Вторичная структура P_g человека (Glu- и Lys-формы) так же, как и плазмينا, судя по данным спектроскопии кругового дихроизма, включает ~20% β-структур, 80% неупорядоченного клубка и очень небольшую долю α-спирали [25].

Однако это справедливо только для зимогена крови человека. Проведенные сравнительные исследования электрофоретически гомогенных образцов P_g человека, кролика и быка, выделенных методом аффинной хроматографии на лизин-содержащих сорбентах, показали [35, 36], что спектры кругового дихроизма в дальней ультрафиолетовой области в водно-солевых растворах у P_g человека, кролика и быка характеризуются широкой отрицательной полосой, слабой у зимогена человека и более интенсивной – у P_g кролика и быка с экстремумами соответственно при 205, 213 и 214 нм (рис. 2). Действительно, результаты расчета доли элементов вторичной структуры показали низкое содержание α-спиралей в зимогене человека (табл. 1). Кроме того, P_g кролика включает наибольшую долю β-структур в сравнении с остальными зимогенами.

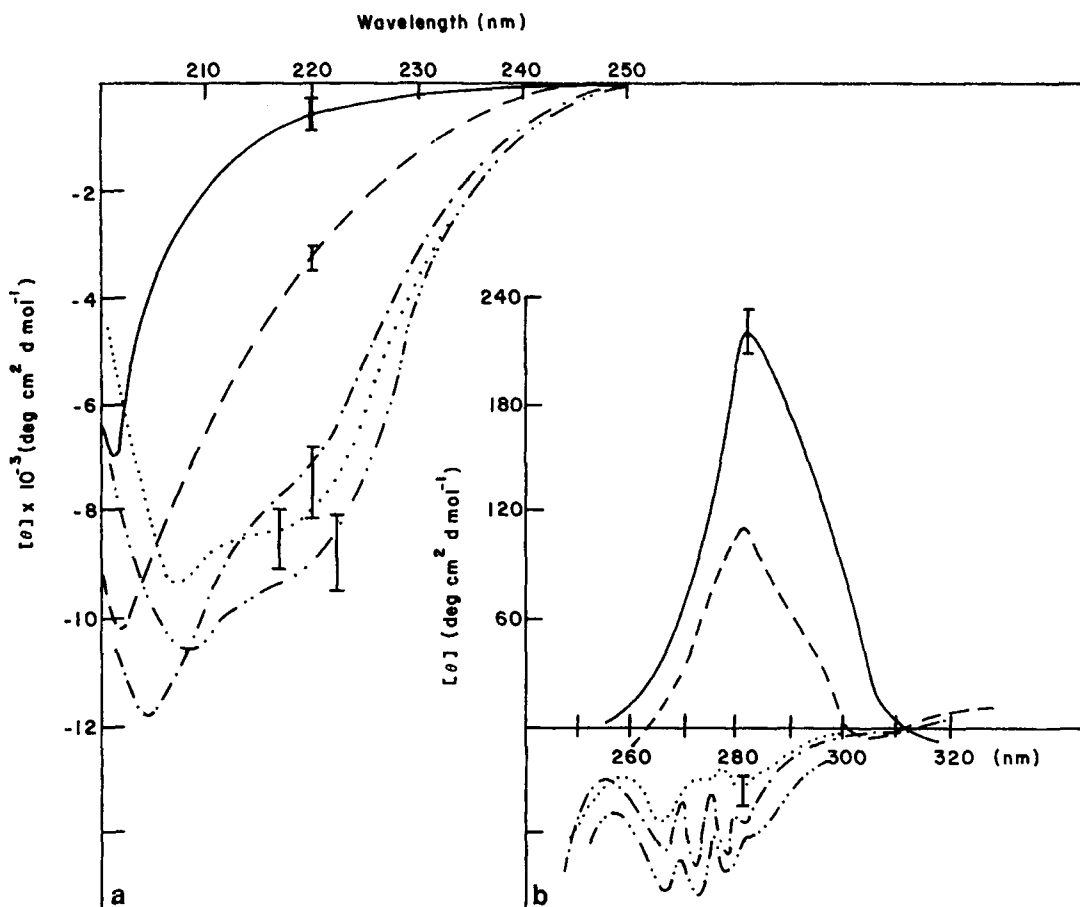


Рис. 2. Спектры кругового дихроизма плазминогенов человека (—), кролика (•••••), быка (—••—••), стрептокиназы (—•—•—) и ее эквимольярной смеси с зимогеном человека (---) в дальней (а) или ближней (б) ультрафиолетовой областях [35]

Все три изучаемые белка содержат β-структуры преимущественно антипараллельной укладки, хотя для P_g человека различия в доле двух форм β-структур были весьма невелики.

Таблица 1. Конформационные особенности плазминогенов человека, быка и кролика в 0.06M фосфатном буфере рН 7.4 [34,35]

Исследуемые параметры	Плазминогены		
	человека	кролика	быка
Число ионизирующихся остатков тирозина	24	33	35
pK _a остатков тирозина	10.2 (6)	11.2	11.2
Спектр триптофановой флуоресценции			
q _{отн}	0.06 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.18 ± 0.01
λ _{max} , нм	336 ± 0.3	336 ± 0.5	340 ± 0.2
Δλ _{max} , нм	58 ± 2	59 ± 2	60 ± 3
Ksv (M ⁻¹) тушения флуоресценции			
Cs ⁺	1.6 ± 0.2	-	-
NO ₃ ⁻	7.5 ± 0.3	10.4 ± 0.5	6.5 ± 0.2
Акриламидом	2.5 ± 0.1	6.02 ± 0.2	3.2 ± 0.4
Вторичная структура (%):			
α-спирали	6.3 ± 0.3	34.0 ± 1.5	31.4 ± 2.8
β-структуры:			
антипараллельные	7.9 ± 1.3	21.4 ± 3.0	13.0 ± 1.3
параллельные	5.0 ± 0.5	2.5 ± 0.3	2.8 ± 0.3
β-изгибы	19.5 ± 2.0	22.0 ± 2.5	18.0 ± 2.0
неупорядоченный клубок	61.3 ± 5.0	20.1 ± 1.5	34.8 ± 2.0
Спектры КД в ароматической области:			
- характер полос	интенсивная положительная	слабые отрицательные	
- положение экстремумов	281-282	267-269 272-274 278-282	

Спектры кругового дихроизма трех зимогенов в ближней УФ-области (*третичная структура*) также заметно различались (рис. 2): у Pg человека отмечена весьма интенсивная положительная полоса в области 270-300 нм с экстремумом при 281 нм (вклад тирозиновых остатков). В спектрах зимогенов кролика и быка обнаружены значительно более слабые отрицательные полосы с экстремумами у Pg кролика при 267, 272 и 279 нм, а у Pg быка – при 270, 274 и 280 нм. По-видимому, это свидетельствует о проявлении ¹L_b-переходов фенольного радикала тирозиновых остатков, характеризующихся семейством полос при 275--280 нм, а также о вкладе ¹L_a переходов триптофана, для которых характерные полосы при 260--270 нм [37]. В ряде случаев мы наблюдали у Pg кролика спектры кругового дихроизма в ближней ультрафиолетовой области, характеризующиеся слабой положительной полосой с экстремумом при 283 нм и слабой отрицательной при 260 нм. Последняя, по-видимому, отражает вклад остатков фенилаланина [38]. Эта особенность конформационной подвижности молекулы плазминогена кролика не может быть объяснена, исходя из данных литературы, и требует специальных исследований.

Локализация хромофорных групп. В этом отношении заслуживают внимания, прежде всего, особенности локализации остатков тирозина, поскольку высказано предположение, что именно за счёт них Pg взаимодействует со стрептокиназой [39]. При нитровании Pg относительно легко модифицируются в Glu-Pg 17 тирозилов, а в Lys-Pg - 18. Однако один остаток Tug модифицируется с трудом. При этом на тяжёлую цепь плазмина приходится 12 экспонированных в раство-

ритель тирозилов, а на легкую – 4. Нитрование подавляет способность зимогена взаимодействовать со стрептокиназой, но на активность плазмينا не влияет [39].

Состояние остатков тирозина было изучено также методом спектрофотометрического титрования [35, 36]. У P_g человека ионизация остатков тирозина проходит в две стадии, начиная с рН 10.0 (рис. 3). Общее число тирозилов, рассчитанное на основании максимального увеличения абсорбции при 295 нм, составляет 24. Это вполне удовлетворительно согласуется с данными литературы для Lys- P_g, полученными на основании аминокислотного анализа: 27 остатков [20]. Из этих 24 тирозилов в первую стадию ионизируются 6 остатков с константой ионизации рК=10.2.

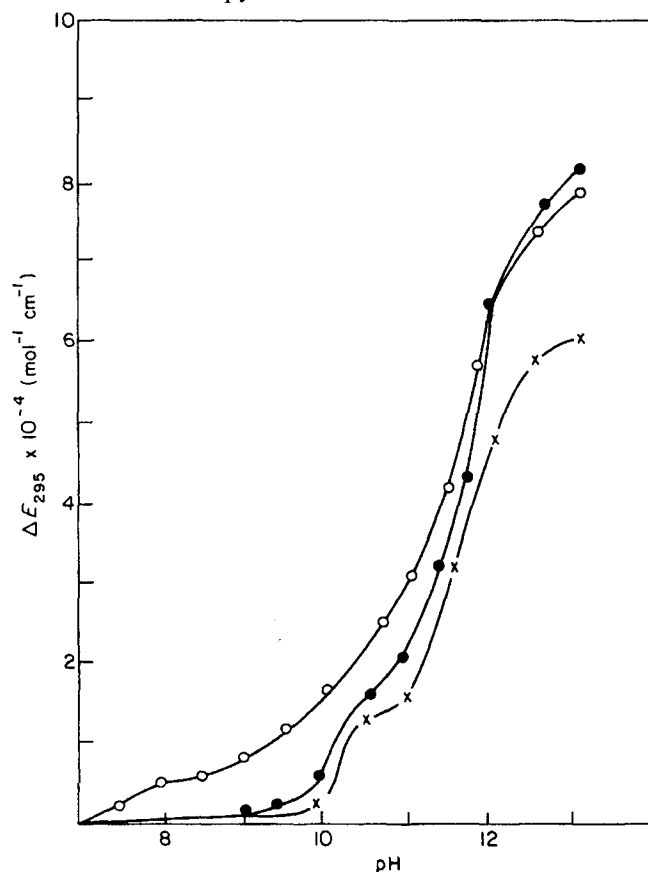


Рис. 3. Спектрофотометрическое титрование остатков тирозина плазминогенов человека (x), кролика (●) и быка (○) [34,35]. Концентрация зимогена человека - $6 \cdot 10^{-6}$ М, остальных - $3 \cdot 10^{-6}$ М. Растворитель 0.1 М раствор NaCl

Остальные 18 остатков ионизируются лишь при дальнейшем увеличении рН с рК=11.7, по-видимому, после конформационного перехода в молекуле зимогена. Ионизация остатков тирозина в зимогене человека является обратимой. Остатки тирозина в молекуле P_g кролика и быка ионизируются в одну стадию с рК 11.2 (в зимогена кролика - начиная с рН 8.5). Общее их число составляет 33 и 35 соответственно, что совпадает с данными аминокислотного анализа [40, 41]. Поскольку ионизация свободного тирозина происходит в пределах рН 9.0-9.5, можно предположить, что у зимогенов кролика и быка остатки либо частично скрыты и экспонируются в растворитель при небольших конформационных изменениях, либо расположены по соседству с сильно заряженными группами. У зимогена человека локализация тирозиновых остатков более сложна. Так, в молекуле P_g человека 6 остатков легко ионизируются, ионизация остальных 18, по-видимому, сопряжена с конформационным переходом молекулы белка. Тем не менее обратимость титрования позволяет допустить, что при спектрофотометрическом титровании P_g человека не происходит грубых нарушений структуры молекулы. Вместе с тем разница в количестве остатков тирозина, определяемых по данным спектрофотометрического титрования и, судя по литературным источникам [20], в результате аминокислотного анализа позволяет допустить, что в молекуле этого зимогена 2-3 остатка тирозина протонированы при всех значениях рН. Такие примеры известны и описаны, в частности, для химотрипсина [42].

Параметры спектров триптофановой флуоресценции зимогенов в водно-солевых растворах свидетельствуют о неоднородности остатков триптофана в этих белках, а также о различиях их состояния в

зимогенах (табл. 1). Исходя из модели трёх классов остатков триптофана в белках [43], можно допустить, что у P_g человека около 35% флуоресценции приходится на долю остатков триптофана, находящихся в свободном контакте с растворителем, и ~65% -- на долю остатков, погруженных во внутренние области макромолекулы. Близкие значения – 40% и 60% -- возможны для P_g кролика. У зимогена быка вероятно преимущественно поверхностное расположение триптофанилов с ограниченной доступностью их растворителю. Большая величина полуширины спектров может свидетельствовать также о гетерогенности топографии остатков триптофана. Низкий квантовый выход триптофановой флуоресценции P_g человека, по-видимому, обусловлен соседством тушащих флуоресценцию групп. С помощью метода избирательного тушения показано (табл. 1), что катион цезия оказывает незначительное действие на триптофановую флуоресценцию белков, причем для плазминогенов кролика и быка расчет константы Штерна--Фольмера оказывался невозможным, поскольку график зависимости I₀/I–1 от концентрации тушителя представлял прямую параллельную оси абсцисс [34, 44]. Значительно более эффективным было тушение анионом NO₃⁻ или молекулой акриламида, однако при концентрации 0,1 М происходило тушение не более 50% флуоресценции триптофанилов у всех зимогенов [44].

Можно думать, что в контакте с растворителем находится лишь часть триптофанилов, причем некоторые из них, судя по меньшей эффективности тушения акриламидом в сравнении с анионом нитрата, расположены в узких щелях. Остатки триптофана, доступные тушителям, локализованы в областях, несущих положительный заряд. Эффективность тушения флуоресценции триптофанилов более высока в случае P_g кролика, что может свидетельствовать о том, что у этого белка больше доступных тушителям триптофанилов с относительно высоким квантовым выходом.

Конформационная лабильность зимогена. Этот вопрос остается недостаточно изученным, особенно учитывая существование молекулярной гетерогенности данного белка и уже отмеченной выше специфики конформации зимогенов различных животных.

Методом триптофановой флуоресценции показано, что при pH 6.0–9.0 состояние триптофаносодержащих областей молекулы P_g человека характеризуется стабильными параметрами спектров флуоресценции. При pH 6.0–5.3 отмечается гипсохромный сдвиг максимума спектра, а при дальнейшем закислении – батохромный. Исследование тушения триптофановой флуоресценции белка анионом йода и акриламидом показало, что при нейтральном pH 34% остатков триптофана макромолекулы недоступны тушителю, однако при pH 2.0 (после кислотного перехода) доступность акриламиду приближается к 100% [45]. Известно также, что P_g человека стабилен при 0 °С, при pH 9.0 в 8 М мочеvine 4 ч, а при pH 3.0 – в течение 7 дней [46]. При комнатной температуре плазминоген стабилен в течение нескольких часов [47]. Действие кислой среды способно изменять молекулу зимогена, не снижая казеинолитическую активность образующегося при активации плазмина, но такое воздействие приводит к значительной утрате фибринолитической способности [24].

Проведенные нами исследования показали, что судя по величине квантового выхода флуоресценции (q), положению максимума (λ_{\max}) и величине полуширины ($\Delta\lambda$) спектра флуоресценции, триптофаносодержащие участки находились в стабильном состоянии у P_g человека при pH 5–8, у P_g кролика при pH 7–9, у зимогена быка при pH 6–9 [44, 48]. За пределами этих диапазонов pH отмечено тушение триптофановой флуоресценции (рис. 4). При pH 1.0 квантовый выход флуоресценции у всех трех зимогенов снижался на 42–50%. Исходя из изменения величины квантового выхода флуоресценции зимогенов, при сдвиге pH от 7.0 до 1.0 рассчитана величина pK_a, которая составила для белков человека, кролика и быка соответственно 3.0, 4.37, 3.92.

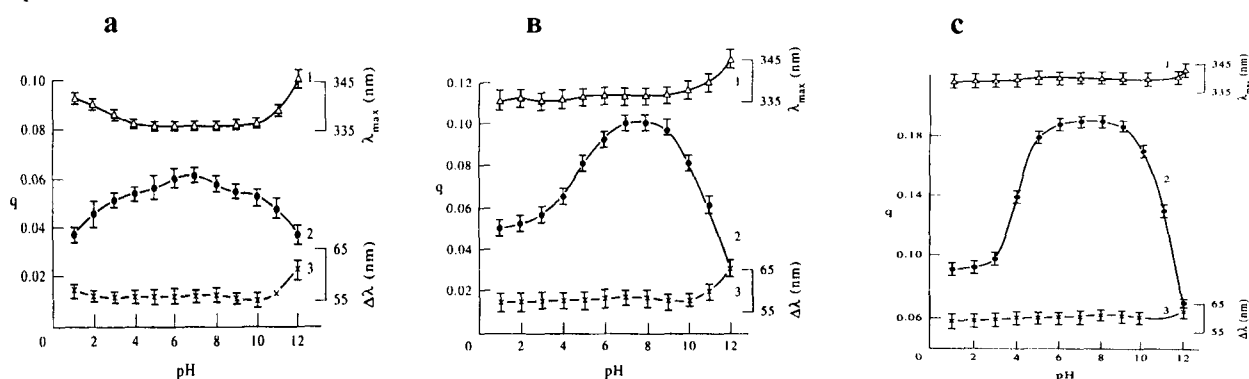


Рис. 4. Изменения квантового выхода (q, 1), положения максимума (λ_{\max} , 2) и полуширины ($\Delta\lambda$, 3) спектров плазминогенов человека (А), кролика (В), быка (С) при различном pH раствора [42, 45]

По-видимому, тушение флуоресценции триптофанилов в зимогене кролика идет за счет взаимодействия с протонированным карбоксилем Glu и Asp. В то же время значения рКа человеческого и бычьего зимогенов значительно ниже, чем константы ионизации боковых групп этих аминокислот в белках: 4.4—4.6 [43]. Возможно, тушение флуоресценции этих зимогенов в кислой среде идет с участием других механизмов, например, протонированным α -карбоксилем С-концевой части молекулы или же путем конформационного превращения макромолекулы белка. Последнее кажется справедливым для P_g человека – тушение флуоресценции в кислой среде сопровождается, начиная с рН 4.0, заметным батохромным смещением максимума спектра, позволяющим предположить увеличение доступности триптофановых остатков растворителю. Это удовлетворительно согласуется с увеличением эффективности тушения анионом нитрата триптофановой флуоресценции P_g человека при рН 3.0 в сравнении с рН 7.0: 59% и 38% соответственно [44], а также со значительным увеличением отношения I₃₅₅/I₃₂₈ (рис. 5). В то же время значения константы Штерна–Фольмера для зимогена кролика при рН 3.0 значительно ниже, чем при рН 7.0 (табл. 1 и 2). Следует также отметить, что в кислой среде степень тушения триптофановых остатков анионом нитрата (0,1 М) у всех трех исследованных зимогенов заметно возрастает (особенно сильно – у P_g быка): 40% при рН 7.0 и 87% при рН 3.0. Вероятно, при относительно высоких концентрациях нитрата тушение осуществляется по смешанному механизму. Это может обусловить отклонение от линейной зависимости “концентрация тушителя – эффект” в координатах Штерна–Фольмера [49]. Однако отсутствие изменений положения максимума и полуширины спектров флуоресценции в кислой среде у P_g кролика и быка не дает оснований предположить какие-либо конформационные изменения триптофаносодержащих участков этих зимогенов.

Таблица 2. Тушение триптофановой флуоресценции плазминогенов человека, кролика и быка при рН 3.0 и 11.0 (n = 5) [42,45]

Тушитель	K _{sv} , M ⁻¹ при рН		Степень тушения (%) 0,1 М тушителя при рН	
	3.0	11.0	3.0	11.0
Плазминоген человека				
Cs ⁺	1.5 ± 0.2	1.08 ± 0.1	14 ± 2	12 ± 0.2
NO ₃ ⁻	10.0 ± 1.0	5.40 ± 0.3	59 ± 7	40 ± 6
акриламид	2.85 ± 0.2	3.00 ± 0.3	21 ± 2	30 ± 3
Плазминоген кролика				
Cs ⁺	-	-	5 ± 1	11 ± 1
NO ₃ ⁻	3.0 ± 0.1	5.00 ± 0.5	67 ± 8	44 ± 3
акриламид	5.5 ± 0.2	2.90 ± 0.1	30 ± 2	22 ± 2
Плазминоген быка				
Cs ⁺	-	-	10 ± 1	6 ± 1
NO ₃ ⁻	7.5 ± 0.4	5.10 ± 0.4	87 ± 5	34 ± 4
акриламид	4.6 ± 0.2	2.20 ± 0.1	29 ± 3	19 ± 2

При рН 9.0 у всех трех белков также отмечается тушение триптофановой флуоресценции. Однако степень уменьшения квантового выхода при рН 12.0 у белков заметно различается: у P_g человека при сдвиге рН от 8.0 до 12.0 квантовый выход падает на 10%, у P_g кролика – на 72%, а у зимогена быка -- на 68 %. Значения рK_a функциональных групп, рассчитанные по изменению квантового выхода в диапазоне рН 8.0—12.0 для P_g человека, кролика и быка составляют 9.86; 10.9 и 11.0 соответственно. Сопоставление этих значений с результатами спектрофотометрического титрования Туг позволяет заключить, что у P_g кролика и быка данные константы полностью соответствуют константам ионизации остатков тирозина. Следовательно тушение триптофановой флуоресценции этих зимогенов в щелочной среде связано, по-видимому, с ионизацией

тирозилов. В то же время, для зимогена человека значение pK_a , найденное на основании изменения квантового выхода, несколько ниже, чем pK_a ионизации шести легко ионизирующихся остатков тирозина (10.2), хотя и близко к последнему по величине.

В щелочной среде у всех трех зимогенов наряду с тушением флуоресценции отмечается батохромное смещение максимума спектра. У Рg кролика оно фактически параллельно тушению флуоресценции, тогда как у Рg человека отмечается лишь при рН 12.0. У зимогена быка динамика более сложная: батохромному смещению предшествует коротковолновый сдвиг при рН 10.0–11.0. Кроме того, у белка человека при рН 9.0 – 10.0 отмечено небольшое сужение спектра флуоресценции, а батохромный сдвиг максимума не сопровождается уширением спектра. У Рg кролика батохромный сдвиг максимума ассоциируется с уширением спектра при рН 11.0–12.0, тогда как у Рg быка динамика полуширины спектра совпадает всецело со смещением его максимума. Сопоставление этих изменений позволяет предположить, что в щелочной среде структура Тгр-содержащих участков частично дезорганизуется. Это сопровождается, возможно, увеличением доступности остатков триптофана растворителю. Принимая во внимание изменения величины I_{355}/I_{328} (рис. 5), такое допущение может быть отнесено к Рg человека и кролика.

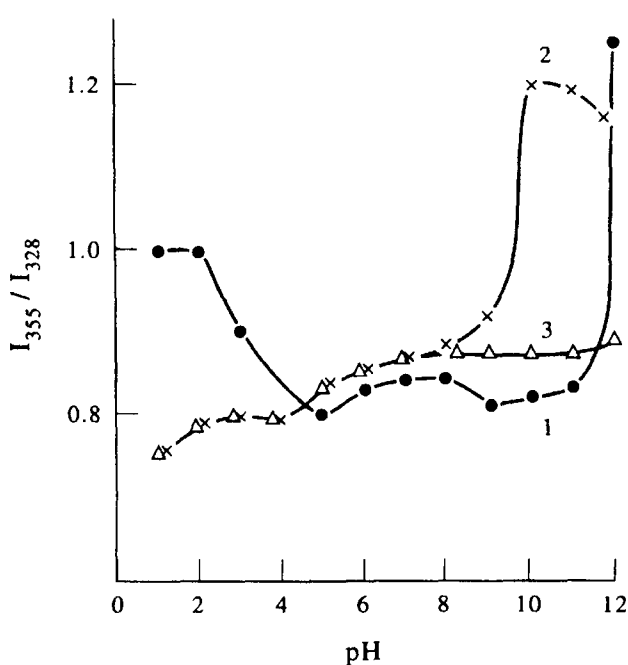


Рис.5. Зависимость величины I_{355}/I_{328} спектров флуоресценции плазминогенов человека (—●—), кролика (—x—) и быка (—Δ—) от рН раствора [45]

В то же время сдвиги максимума спектра и его полуширины Рg кролика при рН 11.0 не согласуются со степенью доступности его триптофановых остатков тушителям: она не увеличивается в сравнении с рН 7.0 [44]. Это может свидетельствовать о том, что у зимогена кролика изменения максимума спектра и полуширины обусловлены не выходом триптофанилов в свободный контакт с растворителем, а изменением локализации тех остатков, которые расположены во внутренних областях молекулы и недоступны тушителям. Вместе с тем, описанный феномен может быть обусловлен шириной “карманов”, в которых локализованы остатки Тгр. Действительно, радиус иона OH^- равен 0.15 нм, тогда как у иона NO_3^- он не менее 0.19 нм.

Следовательно, в кислой среде Тгр-содержащие участки претерпевают большие конформационные изменения в молекуле Рg человека. В щелочной среде более лабильны подобные структуры Рg кролика. Молекула зимогена быка выглядит структурно более устойчивой.

Иная картина наблюдается при действии гидрохлорида гуанидина [50]. Воздействие гидрохлорида гуанидина на Рg человека в диапазоне концентраций 2–4 М вызывает небольшое (~ 18%) тушение триптофановой флуоресценции, ослабляемое при концентрации денатуранта 5 М (рис. 6). Судя по параметрам спектров флуоресценции, при действии дена-

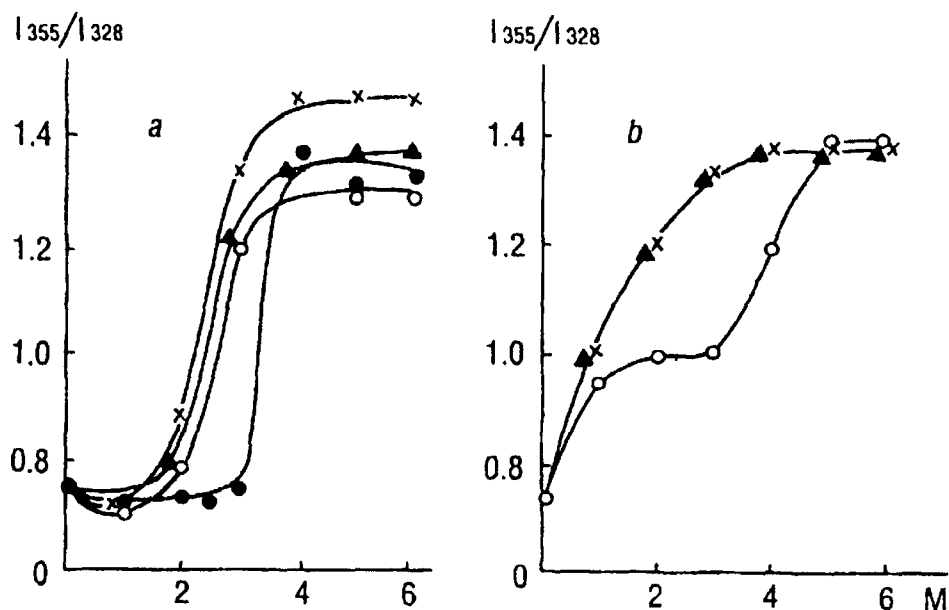


Рис. 7. Зависимость величины I_{355}/I_{328} спектров триптофановой флуоресценции плазминогенов человека (а) или быка (б) после экспозиции с гидрохлоридом гуанидина в течение 5 (—●—●—●—), 30 (—x—x—x—), 60 (—o—o—o—) и 120 (—▲—▲—▲—) мин [96]

Следовательно, действие гидрохлорида гуанидина на молекулу зимогена человека характеризуется относительно небольшими ($\pm 20\%$) колебаниями интенсивности флуоресценции, существенными проявлениями изменения состояния остатков триптофана лишь при концентрации денатуранта ≥ 3 М и весьма слабо выраженной динамикой параметров (за исключением узкого диапазона концентраций 3–4 М).

В конечной концентрации 1 М денатурант вызывает существенный рост интенсивности флуоресценции Рg быка в первые 30 мин (рис. 6). Этот эффект проявляется и через 120 мин, но слабее. Такое ослабление сочетается с медленным и небольшим – на 3 нм – батохромным сдвигом λ_{\max} . К тому же, уже через 5 мин после добавки денатуранта резко увеличивается соотношение I_{355}/I_{328} (рис. 7). Вероятно, разрыв ограниченного числа относительно слабых связей, стабилизирующих окружение триптофановых остатков, вначале устраняет действие тушащих групп на длинноволновые остатки триптофана. Последующее разрыхление участков способствует изменению окружения этих остатков таким образом, что усиление свечения становится невозможным, но тушится флуоресценция коротковолновых остатков. При концентрации денатуранта 2 М усиление флуоресценции не столь значительно, а через 30 мин оно сменяется тушением на 20%, которое достигает к 120 минуте 40%. Именно тушение, но не прирост флуоресценции происходит на фоне батохромного сдвига λ_{\max} , усиливающегося в интервале времени 30–90 мин, а также увеличения $\Delta\lambda$. Изменения I_{355}/I_{328} двухфазны: уже через 5 мин прирост величины составляет 1/3 исходной, а к 30 минуте она достигает максимума. Можно предположить, что в первые 5 мин происходит перераспределение вклада флуоресценции между разными группами остатков триптофана: увеличение доли "длинноволновых" остатков с одновременным уменьшением "коротковолновых" (из-за "раскрепощения" структуры глобулы?). К 30 минуте вследствие определенной лабильности структуры белка выявляется лишь тушение флуоресценции коротковолновых остатков. Действие гидрохлорида гуанидина в концентрации 3 М через 30 мин вызывало тушение флуоресценции на 38%, значительный батохромный сдвиг λ_{\max} , совпадающий с ростом I_{355}/I_{328} , и лишь небольшое уширение спектра флуоресценции. Можно думать, что имело место такое же перераспределение вкладов различных групп остатков триптофана, что и описанное выше. Дальнейшее увеличение концентрации денатуранта (4 М) лишь ускоряло проявление описанных сдвигов. Несколько неожиданным оказалось практически отсутствие изменений $\Delta\lambda$. Возможно, в концентрации ≤ 4 М гидрохлорид гуанидина лишь разрыхляет Trp-содержащие участки белка, не вызывая существенной дезорганизации их структуры. К тому же в первые 5 мин воздействия, по-видимому, усиливается флуоресценция "красных" остатков триптофана. При концентрации денатуранта 5 М уже через 5 мин величина сдвига λ_{\max} фактически достигает максимума (рис. 6). Это сочетается с тушением флуоресценции на 45% (к 60 минуте – на 54%),

изменения $\Delta\lambda$ значительны (8 нм), но максимального уровня они достигают лишь при концентрации гидрохлорида гуанидина 6 М. По-видимому, различные Тгр-содержащие участки молекулы Рg быка удерживаются довольно прочными связями. В присутствии 5--6 М денатуранта тушение флуоресценции несколько ослабляется, причем, судя по величине I_{355}/I_{328} , сначала (5 М) отмечается тушение "голубых" остатков триптофана, а затем – некоторое усиление свечения длинноволновых хромофоров.

В сравнении с Рg человека, действие гидрохлорида гуанидина на зимоген быка сильнее изменяет интенсивность флуоресценции: $\pm 50\%$. Причем, при низких концентрациях денатуранта в начальную стадию действия флуоресценция возрастает, но затем может сменяться тушением, изменения λ_{\max} более существенны, чем в экспериментах с Рg человека, а во всем диапазоне концентраций действие денатуранта вело к проявлению динамики параметров триптофановой флуоресценции. Уже при действии 1 М денатуранта в течение первых 5 мин на зимоген было обнаружено перераспределение доли флуоресценции разных групп остатков триптофана. В отличие от зимогена человека наблюдается не S-образная зависимость параметра I_{355}/I_{328} от концентрации денатуранта, позволяющая подозревать кооперативный характер изменений Тгр-содержащих участков, а зависимость, приближающаяся к экспоненте. Характер этой зависимости позволяет предположить двустадийность перестройки этих участков в первые 5 мин воздействия денатуранта.

Добавка к Рg кролика 1 М гидрохлорида гуанидина, практически, вызывает лишь прирост $\Delta\lambda$ на 2 нм (рис. 6). В концентрации 2 М денатурант обуславливает небольшое тушение флуоресценции, начиная с 30 мин, сочетающееся с батохромным сдвигом λ_{\max} и увеличением $\Delta\lambda$. Возможно, это свидетельствует о частичном разрыхлении Тгр-содержащих участков белка. Действие 3 М денатуранта вело к тушению флуоресценции через 5 мин на 20%, а к 90 минуте – на 28%. Этот уровень тушения максимален при действии денатуранта на данный белок. К тому же, даже в первые 5 мин заметны батохромный сдвиг λ_{\max} и увеличение $\Delta\lambda$, которые нарастают к 60 минуте. При этом $\Delta\lambda$ достигает максимума и дальнейшее увеличение концентрации гидрохлорида гуанидина не ведет к росту этого параметра. Сдвиг же λ_{\max} значителен, но не достигает предела. Поэтому складывается впечатление, что наиболее вероятно увеличение гетерогенности Тгр-содержащих участков (например, их пространственное разобщение, увеличение различий их окружения), но не разупорядочивание этих участков. Пространственное разобщение может быть вызвано разрывом части связей, определяющих различную ориентацию доменов. В концентрации 4 М гидрохлорид гуанидина, судя по усилению батохромного сдвига λ_{\max} , отсутствию существенных изменений $\Delta\lambda$ и интенсивности флуоресценции, способствует дальнейшему экспонированию триптофановых остатков в растворитель. Скорее всего, экспонирование достигает предела при концентрации денатуранта 5 М, когда сдвиг λ_{\max} максимален. Дальнейшее увеличение концентрации гидрохлорида гуанидина не усиливает изменения $\Delta\lambda$ и λ_{\max} , а тушение флуоресценции ослабляется. Можно думать, что глубокая дезорганизация Тгр-содержащих участков ведет к ослаблению тушающего влияния групп соседствующих с остатками триптофана.

Действие денатуранта на Рg кролика характеризуется заметным, но не превышающим 30% тушением триптофановой флуоресценции при концентрации агента 3--4 М. Ни в одном случае воздействие гидрохлорида гуанидина не сопровождается усилением флуоресценции. Существенные изменения состояния триптофансодержащих участков белка начинаются при концентрации денатуранта 2 М и достигают максимума при 4--5 М.

У всех трех Рgs действие GuHCl вызывает изменения интенсивности флуоресценции. Сила изменений убывает в ряду Рg быка, Рg кролика, Рg человека. В принципе, при воздействии на все зимогены достигаются одинаковые по величине сдвиги положения максимума спектра и его полуширины. Однако динамика этих параметров и зависимость их от концентрации денатуранта у зимогенов различаются. Это позволяет сделать некоторые выводы относительно особенностей лабильности структуры зимогенов, несмотря на то, что из-за более сильного (в сравнении со щелочной средой) действия гидрохлорида гуанидина структуры этих молекул подвергаются более генерализованным перестройкам, и полученные материалы описывают скорее предельно возможные изменения состояния остатков триптофана. Так, существенные изменения структуры триптофансодержащих участков у Рg человека и кролика реализуются в более узком диапазоне концентраций денатуранта, чем у зимогена быка. Причем перестройка структуры этих участков в белке кролика достигают максимума при более низкой концентрации соли гуанидина. S-образный вид графика изменения соотношения I_{355}/I_{328} в случае Рg человека (в отличие от зимогена быка) наводит на мысль, что в первом при ориентации Тгр-содержащих участков и (или) организации их окружения существенную роль может играть некоторое "критическое" число внут-

римолекулярных взаимодействий, резистентных к денатуранту в низких концентрациях. Как уже упомянуто выше, третичная структура зимогена человека более упорядочена, судя по спектрам кругового дихроизма. Возможно, это обстоятельство может обуславливать кооперативный характер перестроек Тгр-содержащих участков. У зимогена кролика для ориентации тушащих триптофановую флуоресценцию групп чувствительные к гидрохлориду гуанидина внутримолекулярные взаимодействия менее значимы.

В целом складывается впечатление, что зимоген кролика является более чувствительным к воздействию гидрохлорида гуанидина: существенные изменения состояния Тгр-содержащих участков начинают проявляться и достигают максимума при более низких концентрациях денатуранта, чем у остальных зимогенов. С этих позиций более устойчивыми выглядят триптофан-содержащие участки зимогена быка.

Данные экспериментов* по изучению эффекта нагревания на интенсивность триптофановой флуоресценции зимогенов человека и быка свидетельствуют (рис. 8), что при нагревании растворов P_g человека от 25 до 70 °С отмечается монотонное тушение триптофановой флуоресценции, типичное для температурного тушения [43, 51]. Эти изменения обратимы: при постепенном охлаждении растворов этого белка интенсивность флуоресценции достигает исходных значений. Принципиально иное явление наблюдается при нагревании P_g быка: монотонное снижение интенсивности флуоресценции при температуре 50—55 °С сменяется нелинейным падением её, что позволяет предположить наличие в этом узком диапазоне конформационной перестройки молекулы. Подобная перестройка имеет необратимый характер, так как при постепенном охлаждении растворов бычьего P_g увеличение интенсивности флуоресценции идёт по монотонному типу, не достигая исходного значения [44].

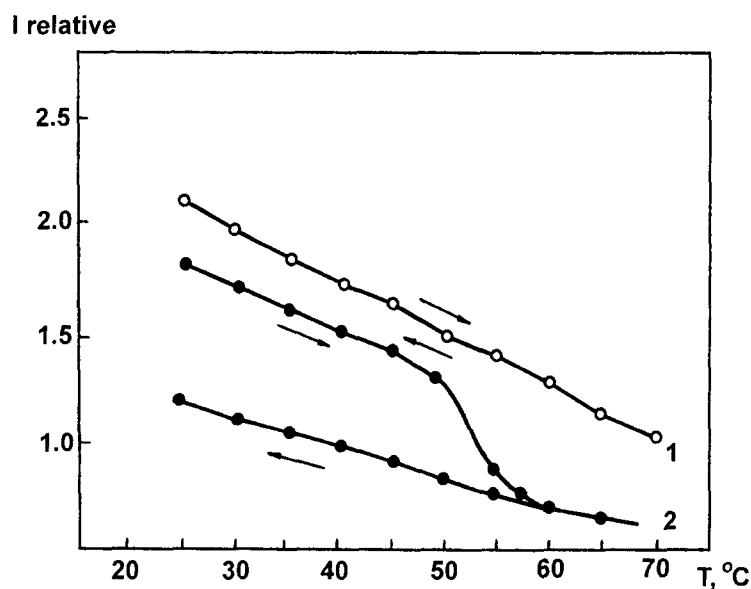


Рис. 8. Изменения интенсивности триптофановой флуоресценции плазминогенов человека (1) или быка (2) при нагревании и последующем охлаждении их растворов в 0.06М фосфатном буфере pH 7.4, содержащем 0.2 М NaCl. Стрелками показано направление изменения температуры [42]

Изложенные материалы свидетельствуют о различиях организации структуры и структурной лабильности P_g человека, кролика и быка. Эти различия, по-видимому, достаточны для того, чтобы объяснить, почему P_gs различных видов животных с разной скоростью активируются стрептокиназой. Однако они не могут дать сколь-нибудь ясное объяснение тому факту, что для активации зимогена кролика образование устойчивых эквимольных комплексов зимогена и стрептокиназы не является необходимым условием [22].

Судя по параметрам триптофановой флуоресценции, на состояние Тгр-содержащих участков в P_g человека не влияют добавки в растворитель ионов Zn²⁺, Cu²⁺, Co²⁺, Ca²⁺ в концентрации 10⁻⁸-10⁻³ М [52].

* Эксперименты выполнены Н. В. Демидчик .

При активации P_g в плазмин происходит специфический разрыв пептидной связи Arg₅₆₀--Val₅₆₁, ведущей к формированию молекулы плазмина [53]. При этом происходят заметные изменения структуры молекулы (см. табл. 3) и её функциональных свойств. Но главных события два: одноцепочечная молекула P_g превращается в двуцепочечную молекулу плазмина, а, кроме того, у молекулы проявляется каталитическая активность.

Как уже указывалось выше, 2 цепи плазмина: образующаяся из N-концевой части плазминогена тяжелая (H или A-цепь) и легкая (L или B-цепь), которая формируется из C-концевой части P_g, удерживаются 1--2 дисульфидными связями. Разрыв одной связи при pH 9.0 в 8 М мочеvine ведет к полной инактивации протеиназы с образованием двух цепей [46]. Остальные из 24 дисульфидных связей являются внутрицепочечными. При pH 3.0 разрывалось до 10 таких связей, однако функция плазмина подавлялась лишь на 50% [46]. Исследования свойств H- и L-цепи показали различия их физико-химических параметров (табл. 4), и функционального назначения.

В тяжелой цепи сосредоточены кринглы со специфическими центрами взаимодействия с ω-аминокислотами. Их более подробная характеристика будет дана ниже. Значение тяжелой цепи плазмина, по-видимому, заключается в стабилизации трехмерной структуры активного центра легкой цепи, как это было показано в опытах по реконструкции молекулы плазмина из изолированных тяжелой и легкой цепей [23]. В легкой цепи локализован активный центр плазмина, включающий остатки His₆₀₂, Asp₆₄₅ и Ser₇₄₀ [58]. Однако препараты изолированной легкой цепи плазмина сохраняют лишь 3--6% протеолитической активности протеиназы [59]. Существует наследственная аномалия молекулы P_g, связанная с неполноценностью его активного центра. После активации такого зимогена урокиназой образуется низкоактивный плазмин, инкорпорирующий диизопропилфторфосфат (при образовании эквимольного комплекса со стрептокиназой) лишь в количестве 4.7% от такового нативного плазмина [60]. Кроме того, в легкой цепи находится домен, аффинно взаимодействующий с ингибитором Кунитца [61].

Таблица 3. Физико-химические и энзиматические свойства молекул плазминогена и плазмина человека [50]

Параметры	Плазминоген	Плазмин, полученный активацией	
		стрептокиназой	урокиназой
$S_{20,w}^0, s$	4.13	4.81	5.06
$D_{20,w} \times 10^{-7} \text{ см}^2/\text{сек}$	3.96	4.77	4.91
$V, \text{ см}^3/\text{г}$	0.72	0.72	0.72
f/f_0	1.82*	1.52*	1.47
Молекулярная масса, кДа	90.4	87.5	89.3
Гидролиз ТАМе:			
$K_m, \times 10^{-3} \text{ М}$	0	21	21
$k_{кат}, \text{ М} \cdot \text{мин}^{-1}/\text{М энзима}$	0	1.6	1.6
Инкорпорация [³² P]-диизопропилфторфосфата, М на М белка**	0	1.18 ± 0.08	1.18 ± 0.08

* - сходные значения приведены в работе [51]

** - приведено по статье [52]

* Эксперименты выполнены Н. В. Демидчик

Таблица 4. Физико-химические свойства тяжёлой (Н) и лёгкой (L) цепей плазмина человека [52]

Параметры	Н-цепь	L-цепь
$S_{20,w}^0$, S	2.3	1.4
Молекулярная масса*, кДа	57.2	25.7
C-концевые аминокислоты	Asp или Arg	Leu-Asn
Доля инкорпорированного [32 P]- диизопропилфторфосфата, %	25	75
Число S-S-связей**	15-16	4

* - по данным разных авторов молекулярная масса Н-цепи колеблется от 55 до 63 кДа, а L-цепи – от 20 до 26 кДа [53]

** - приведено по статье [23]

Следует отметить, что в отличие от зимогенов других сериновых протеиназ -- трипсиногена, химо трипсиногена, имеющих заранее оформленный частично функционирующий активный центр, P_g никогда не реагирует с реагентами на активный центр. Однако R. C. Wohl et al. [62] удалось получить методом афинной и ионообменной хроматографии из фракции Кона П_{2,3} Lys-P_g, способный инкорпорировать р-нитрофенил-р'-гуанидинбензоат или [3 H]-диизопропилфторфосфат в количестве до 0.43 М/М белка или до 0.7 М/М белка соответственно, причем это не было связано с присутствием плазмина, поскольку препараты не обладали протеолитической активностью. Поэтому можно считать, что наличие активного центра, особенно, реализующего протеолиз, -- прерогатива плазмина. Однако каталитическая функция плазмина -- отдельный вопрос, не входящий в задачи данной статьи.

Легкая цепь плазмина автокаталитически распадается на фрагменты 18 кДа и 6.5 кДа, при этом энзиматическая активность уничтожается. Тяжелая цепь может деградироваться при продолжительной инкубации плазмина. Предположительно ее деградация начинается с С-конца, из 55 кДа образуется фрагмент 50 кДа [63, 64].

Взаимодействие зимогена с лигандами. Данные литературы позволяют считать, что взаимодействие P_g с низкомолекулярными лигандами и белками идет за счет, по крайней мере, трех типов сайтов: лизинсвязывающих, бензамидинсвязывающего и углеводных цепей (остатков).

В кринглах N-концевой части молекулы зимогена (после активации – тяжёлая цепь плазмина) локализованы специфические центры взаимодействия с ω-аминокислотами: лизином, Е-аминокапроновой кислотой (АКК), trans-4(аминометил)-циклогексан-1-карбоновой (транексамовой) кислотой. Это, как будет показано ниже, весьма важное свойство молекулы P_g (плазмина). Лизин и его аналоги связываются с зимогеном стехиометрически 1:1 [20, 65]. По данным калориметрического титрования [62] при рН 7.2 и ионной силе 0.15 взаимодействие плазмина с АКК сопровождается слабым тепловым эффектом ($10^5 \cdot K = -9.38 \pm 20$ л/М; $-H^0 = -0.75 \pm 0.20$ ккал/М, $-\Delta F = -8.11 \pm 0.10$ ккал/М, $\Delta S^0 = -27.4 \pm 1.70$ ккал/град). Реакция является экзотермической, причём тепловой эффект не изменяется при уменьшении ионной силы от 0.15 до 0.01 и сдвиге рН от 2.5 до 9.5. Эти обстоятельства, а также данные инфракрасной спектроскопии позволяют исключить участие во взаимодействии плазминогена с АКК электростатики кулоновского типа и выявить важную роль водородных связей, возможно, при участии гидрофобных взаимодействий [66].

Взаимодействие P_g с лизином и его синтетическими аналогами вызывает изменения физико-химических свойств белка: увеличение растворимости, скорости активации (при низкой концентрации аминокислот), адсорбции на ДЭАЭ-целлюлозе, замедление электрофоретической подвижности в щелочной зоне рН, снижение константы седиментации на 25%, уменьшение объема элюции при гель-хроматографии; “размягчает” структуру и укорачивает время жизни в организ-

ме [20, 21, 67]. При взаимодействии с АКК значение S_{20}^0 Pg снижается с 5.0 ± 0.15 s до 3.8 ± 0.15 s. Эти изменения обратимы при диализе. Можно полагать, что молекула приобретает, преимущественно клубкообразную конформацию ибо значения $[\Theta]_{220} \cdot 10^{-3}$ град·см² дмоль⁻¹ для нативной молекулы Pg и подвергнутой воздействию АКК соответствуют -4.2 и -2.2 [68]. Kd комплексов Pg с АКК или транексамовой кислотой ($4.5\text{---}5.5 \cdot 10^{-4}$ М и $8.5 \cdot 10^{-5}$ М соответственно [20, 69].

Специфические центры взаимодействия зимогена с лизином и его аналогами (лизинсвязывающие центры) состоят из одного центра с высоким сродством к АКК ($K_d = 9$ мкМ) и около четырех центров с низким сродством ($K_d = 5$ мМ), причем высокоафинный центр локализован в первых трех кринглах (остатки 79--337/353) [58]. Исследования связывания транексамовой кислоты показали также наличие одного высокоафинного центра и 4-х низкоафинных (K_d 1.1 мкМ и 0.75 мМ соответственно) в молекуле Glu-Pg. В молекуле Lys-Pg первый центр связывания слабее взаимодействует с транексамовой кислотой ($K_d = 2.2$ мкМ), а второй – значительно сильнее ($K_d = 36$ мкМ), чем в Glu-зимогене. При этом оказалось, что за изменения конформационных свойств молекулы и скорости ее активации ответственны именно низкоафинные центры [70]. Судя по результатам ЯМР - спектроскопии и протеолитической деградации, все кринглы представляют собой полости, в формировании которых принимают участие кластеры гидрофобных аминокислот, в которых существенную роль играют остатки Trp [71]. В молекуле Pg человека кринглы 2 и 3 соединены связью Cys₁₆₉--Cys₂₉₀, образуя супермодуль. Однако крингл 3 не влияет на взаимодействие крингла 2 с АКК [72]. Оказалось, что в крингле 3 есть еще один функциональный сайт: тканевая трансглутаминаза вызывает образование сшивок ϵ -(g-глутамил)лизил Lys₂₀₈--Gln₃₃₂ [73] вне каталитического участка и лизинсвязывающих сайтов. Возможно, подобные связи формируются при взаимодействии Pg с белками, мембранами клеток и т.д.

Роль лизинсвязывающих центров заключается в обеспечении способности Pg к образованию комплексов с рядом белков и мембран. Показано, что связывание Pg с мембранами нестимулированных или стимулированных тромбином тромбоцитов, образование тройных комплексов с тканевым активатором Pg, α_2 -антиплазмином, а также специфическое связывание с фибриногеном или фибрином, являющееся одним из важнейших событий в реализации фибринолиза, – процессы, протекающие всецело за счет лизинсвязывающих центров и ингибируемые ω -аминокарбоновыми кислотами [58,74-77]. Например, тромбин-стимулированный тромбоцит способен связывать 190.000 ± 45.000 молекул Pg на 1 клетку ($K_d = 2.6$ мкМ) [74].

Каждый мономер фибрина имеет один центр, связывающий Pg или плазмин и локализованный в E-фрагменте, образующемся из NH₂-концевой части молекулы. Константа диссоциации комплексов фибрин--плазмин(оген) соответствует 9.3--11.0 нМ [77]. АКК и транексамовая кислота вызывает диссоциацию этих комплексов по конкурентному типу с K_d соответственно $(0.85\text{--}1.3) \cdot 10^{-4}$ М и $(1.4\text{--}2.2) \cdot 10^{-5}$ М. Причём, установлено, что одной молекулой фибрин(оген)а могут связываться 4 молекулы Pg (Glu- или Lys-). Это связывание кооперативно [32], а изменения стандартной свободной энергии ассоциации для каждой из четырех молекул Pg соответствует -5.48 ; -7.73 ; -8.88 и 11.41 ккал/М (K_a соответственно $2.16 \cdot 10^4$; $1.32 \cdot 10^6$; $1.06 \cdot 10^7$; $1.08 \cdot 10^9$ М⁻¹).

Несмотря на столь важную роль, лизинсвязывающие центры Pg не являются единственными регуляторными центрами молекулы [78]. Существует также центр связывания р-аминобензамидина, отличный от лизинсвязывающих центров [69, 79]. Такой центр локализован в крингле 5, отличающемся от остальных по данным [¹H]ЯМР-спектроскопии большей структурированностью [80]. Он локализован в области Cys₄₆₁-Cys₅₄₀ молекулы Pg и отличается слабым сродством к бензамидину ($K_d = 1.7$ мМ⁻¹). Однако специфическое взаимодействие Pg с тромбоцитом эритроцитов (420 кДа гликопротеин) реализуется как раз за счет этого центра [81].

Связывание с фибрином вызывает изменения конформации молекулы Pg и он более легко активируется [76]. Это относится и к бычьему Pg, который в растворенном состоянии практически не активируется стрептокиназой, однако его активация частично реализуется в случае связывания с фибрином.

Наконец, взаимодействие с белками, по-видимому, может осуществляться и за счет углеводных остатков (цепей) молекулы Pg. Ранее нами было установлено образование эквимольных комплексов Pg человека и лактат-, малатдегидрогеназами, пируваткиназой, каталазой [82]. Образование таких комплексов не подавлялось АКК, но блокировалось в присутствии 0.0001 М галактозамина [83]. Это позволяет думать как раз о реализации углеводных межбелковых контактов, что нуждается в дальнейшем изучении.

Связывание лигандов молекулой Pg изменяет ее конформацию. Так, взаимодействие с АКК в крингле 1 сопровождается снижением внутренней подвижности этой структуры в масштабе времен 0.1-

-5 нс [84]. В целом же, детали структурных изменений молекулы зимогена после взаимодействия с лигандами остаются изученными крайне недостаточно. Следует все же отметить, что при взаимодействии зимогена человека со стрептокиназой, судя по данным спектроскопии кругового дихроизма, более глубокие изменения претерпевает как раз молекула стрептокиназы (рис. 2).

Молекулярная гетерогенность Pg. Зимоген характеризуется молекулярной гетерогенностью: в донорской плазме обнаружены до 12 молекулярных форм Pg [20, 58], причем гетерогенность может сохраняться и в препаратах плазмина [62].

Описаны три типа гетерогенности плазминогена [20]:

1. Гетерогенность по N-концевому остатку. Нативная молекула Pg имеет в качестве N-концевого остатка глутаминовую кислоту (Glu-Pg). В ходе реакций ограниченного протеолиза расщепляются связи Lys₇₆--Lys₇₇, Lys₇₇--Val₇₈ или Arg₆₇--Met₇₇ (рис. 2), что ведет к утрате N-концевого пептида с молекулярной массой ~8 кДа и к образованию Lys₇₇--Met₆₈ или Val₇₈--Pg (объединяют под общим названием Lys-Pg [26]. Эта протеолитическая модификация Glu-Pg катализируется как правило, следовыми количествами активного плазмина [20, 27, 85-87]. Однако есть указание на то, что аналогичное расщепление могут катализировать также тромбин, тканевый активатор плазминогена и урокиназа [85, 88]. Полагают, что урокиназа может гидролизовать связь Arg₆₈--Met₆₉ и некоторые другие [85]. При такой модификации физико-химические и функциональные свойства Pg заметно изменяются (табл. 5). Кроме того, Lys-Pg легче активируется в плазмин. Например, урокиназа активирует его в 20 раз быстрее, чем Glu-форму [58, 86], но в отличие от последней он не изменяет конформацию при действии АКК. Это, по-видимому, объясняет то обстоятельство, что в присутствии Е-АКК скорость активации Glu-Pg урокиназой возрастает в 10 раз, достигая уровня активации Lys-зимогена [85]. К этому пептиду проявляют сродство все кринглы молекулы, за исключением крингла 5. Наибольшим сродством отличается крингл 4 [90].

Таблица 5. Сравнительная оценка физико-химических и некоторых функциональных свойств Glu-и Lys-форм плазминогена человека

Параметры	Glu-плазминоген	Lys-плазминоген	Литературный источник
Молекулярная масса, кДа	85-93		[53]
	81	75*	[83]
	90,8	84 85	[20] [81]
pI	6.0-6.6	7.3-8.8	
	6.1-7.1	6.4-8.5	[20]
$S_{20, w, d, s}^0$	5.10	4.80	[25]
V, см ³ /г	0.706	0.709	[25]
Радиус Стокса, нм	4.34	4.51	[25]
f/f ₀	1.50	1.56	[25]
Растворимость при физиологических рН и ионной силе, мг/мл	~10	~1	[20]
Kd с фибриногеном, мкМ	38	0.31	[84]
Время полураспада (t _{1/2}) в организме, сутки	2.24±0.29	~0.8	[54]

* - при анализе методом гель-хроматографии молекулярная масса Lys- плазминогена достигает 105 кДа [25], поскольку удаление N-концевого участка обуславливает больший кажущийся объем – “набухание” [20]

Отщепление N-концевого пептида (8 кДа) с аминокислотным составом Lys₅HisArg₃Cys₄Asp₅Thr₃.Ser₆Glu₁₅ProGly₃Ala₆Val₃MetIle₄Leu₃Tyr₂Phe₃ значительно подавляет активацию Lys-Pg урокиназой [85]. Этот пептид способен специфически взаимодействовать с Lys-Pg в стехиометрических соотношениях 1:1 за счёт нековалентных связей. Взаимодействие подавляется АКК в низких концентрациях. Показано, что за такое взаимодействие ответственен гептапептид (Ala₄₅-Phe-Gln-Tyr-His-Ser-Lys₅₁), занимающий в интактном плазминогене позицию 45-51 [80]. Известно также, что N-концевой пептид (1--68 остатки) в положении 36--40 содержит исключительно "кислые" остатки, образующие "кислую петлю", стабилизированную связями Cys₃₅-Cys₄₃ и Cys₃₀--Cys₅₄, что сообщает ему уникальную третичную структуру. При добавке этого пептида к Lys-Pg зимоген принимает конформацию нативного Glu-Pg [57].

Кроме того, протеолиз эластазой позволяет получить Pg, у которого удалена значительная доля N-концевой части молекулы. Остается участок полипептидной цепи, включающий Val₄₄₂--Asp₇₉₀, - это миниPg [91]. МиниPg активируется урокиназой или стрептокиназой в плазмин, однако он содержит лишь один крингл и обладает крайне низким сродством к лизину, АКК и ее аналогам [58].

2. Гетерогенность, выявляемая электрофоретически в гелях полиакриламида или крахмала в кислой зоне pH (pH 4,3). Описана возможность получения двух форм Pg методами аффинной хроматографии на Lys-агарозе или при электрофорезе. Молекулярная масса их практически идентична (табл. 6). Одинаковы N- и C-концевые остатки. Однако при гель-хроматографии фракция I дает несколько больший объем элюции, что позволяет говорить о более компактной конформации [20]. Хотя, в целом, обе фракции одинаково активируются в плазмин, при низких соотношениях активатор : Pg фракция I активируется быстрее [20].

Таблица 6. Физико-химические и функциональные характеристики субформ I и II Glu-плазминогена [87]

Параметры	Glu-плазминоген I	Glu-плазминоген II
$S_{20,w}^0$, s	5.4	5.3
pH 3,2	не исслед.	5.1
7,4	-1.3	-1.8
b	не исслед.	2.6
pH 3,2		
7,4		
Молекулярная масса (кДа) при исследовании - методом электрофореза по Weber, Osborn **)	85	85
-методом седиментационного равновесия		
pH 3,2	77.2	79.5
7,4	не исслед.	83.6
pI	6.4-6.7	6.4-6.7
Гидролиз αN-Met- αN -Toz-L-Lys-β-нафтилового эфира при активации стрептокиназой (М·мин ⁻¹ ·мг Pg ⁻¹)	6.3·10 ⁻⁸	6.0·10 ⁻⁸

* Исследование скорости седиментации при концентрации белка 0.2-0.5% даёт линию регрессии $S_{20,w}^0$ + bc, где c= г/100 мл

** При диализе субформы I против буфера pH 7.4 около 10% материала имеет более низкую молекулярную массу

Каждую из этих фракций можно разделить приблизительно на 5 форм методом гелевого электрофореза в слабощелочной среде [25]. Однако данные [93] свидетельствуют о том, что фракция I имеет большую молекулярную массу, чем фракция II (соответственно 93 и 89 кДа). По

данным этих авторов фракция I имеет 32 углеводных остатка (N-связанная цепь у Asp₂₂₈ и O-связанные олигосахариды у Thr₃₄₅), а фракция II – лишь один (у Thr₃₄₅); фракция I легче активируется урокиназой или стрептокиназой (причём активация более сильно стимулируется фибрином), заметнее изменяет конформацию и активируется в присутствии транексамовой кислоты и АКК. Эта фракция имеет также большее значение K_d с фибрином, что говорит о менее эффективном взаимодействии с ним. Обе формы содержат фосфоSer₅₇₈ [94]. Вероятно, фосфорилирование значимо для регуляции функциональных свойств Pg.

Доказано существование еще одного центра гликозилирования: Ser₂₄₈ содержит цепь NeuAc-a2-3Gal b1-3GalNAc [95]. Следует отметить, что еще исследованиями [96] в тяжелых цепях плазминов, полученных активацией двух форм Pg, установлено следующее количество углеводов, М/М зимогена фракции I (или II): сиаловые кислоты – 3 (1), манноза – 3 (0.2), галактоза – 3.5 (1.3), N-Ac-GluAm – 4.3 (0.2), N-Ac-GalAm – 1.2 (1.1).

3. Гетерогенность, выявляемая при гелевом электрофорезе при щелочном pH или при изоэлектрофокусировании проявляется как 6--8 форм при электрофорезе или 3 формы при изоэлектрофокусировании, однако различий между этими формами в аминокислотном составе, N-концевом пептиде, иммунологических свойствах или специфической активности не найдено [20]. Полагают, что этот тип гетерогенности может быть обусловлен изменением содержания в молекуле Pg сиаловых кислот. Различия в углеводном составе играют определенную роль в специфике взаимодействия с фибрином или α₂-антиплазмином [58].

Вероятно, отражением подобных типов гетерогенности являются сообщения прежних лет о том, что препараты Pg после их активации различаются по соотношению активность по эфирам аргинина/активность по эфирам лизина, pH-стабильности и термостабильности [78, 97].

Большой интерес представляют материалы сравнительного изучения свойств Pgs различных животных. Очищенные образцы Pgs kota, собаки, кролика, быка имеют молекулярную массу 80–90 кДа, гомогенны при гель-электрофорезе с додецилсульфатом натрия, однако, как и зимоген человека, гетерогенны при электрофорезе без додецилсульфата натрия при pH 8.4 или изоэлектрическом фокусировании. Инкорпорация этими плазминогенами [³H]-L-1-хлор-3-тозиламидо-7-амино-2-гептанона колеблется в пределах 0.0101-0.0120 мкМ/мг, что соответствует таковой Lys-Pg человека: 0.0112 мкМ/мг [98]. Плазмины всех животных стехометрически взаимодействуют с этим ингибитором с полной инактивацией. Все плазмины содержат в активном центре по 1 остатку гистидина. Изоэлектрическая точка карбоксиметилированной тяжелой цепи плазмينا человека и кролика соответствует 5.9, а собаки, kota, быка – более низкому значению [98]. Pgs различных животных обладают молекулярной гетерогенностью. Так, существование двух основных форм, разделяемых методом аффинной хроматографии и различающихся по содержанию углеводов, родству к АКК, аминокислотному составу и другим свойствам, было показано на примере Pgs кролика [99] и овцы [100]. При этом у кролика эти формы могут быть разделены методом изоэлектрофокусирования на пять субформ каждая [40]. Особенностью молекулярной гетерогенности зимогена овцы является наличие низкомолекулярной формы (~ на 40 кДа меньше, чем нативная форма), образующейся при действии плазмина [100].

Еще одной чертой структурной специфики Pg является обнаруженное химическим анализом и методом атомно-абсорбционной спектроскопии* в его молекуле присутствие железа в количестве 1 атом на молекулу зимогена [44, 101]. Именно с этой особенностью связывают способность Pg человека генерировать активные формы кислорода в растворе, что обеспечивает активацию зимогена в активный плазмин в отсутствие добавок специфических белков активаторов Pg, а также при активации зимогена стрептокиназой [102]. Эта сторона структуры плазминогена пока очень слабо изучена.

Итак, изложенные выше материалы свидетельствуют о достаточно сложной структурной организации молекулы плазминогена, причем далеко не все особенности этой организации в настоящее время ясны. Более того, остаются пока неполностью раскрытыми структурные аспекты функциональной специфики молекулы. Эта специфика также, вне сомнения, изучена не во всех ракурсах. Структурная организация молекулы данного зимогена позволяет предположить наличие у белка целого ряда функциональных свойств, имеющих разнообразные проявления в биосистемах. Нуждаются в более обстоятельных исследованиях конформационная подвижность молекулы зимогена, сравнительно-биохимическая специфика белка. Все это составляет большую и сложную многоплановую задачу дальнейших исследований.

* Исследования выполнены канд. хим. наук Г. В. Воробьевой.

Литература

1. Gonzales-Gronow M., Robbins K.S. // *Biochemistry*. 1984. Vol. 23, № 2. P. 190-196.
2. Raum D., Marcus D., Alper Ch.A. et al. // *Science*. 1980. Vol. 208, № 4477. P. 1036-1037.
3. Nakajima K., Tsuzaki N., Nagata K. et al. // *FEBS Lett*, 1992. Vol. 308, № 2. P. 179-182.
4. Twining S.S., Wilson P.M., Ngamkitidechakul Ch. // *Biochem. J*. 1999. Vol. 3. P. 705-712.
5. Testa J.E., Quigley J.P. // *J. Nat. Cancer Inst*. 1988. Vol. 80, № 10. P. 712-713.
6. Burtin P., Fondaneche M.-C. // *J. Nat. Cancer Inst*. 1988. Vol. 80, № 10. P. 762-765.
7. Gase K., Gase A., Schirmer H., Malke H. // *Eur. J. Biochem*. 1996. Vol. 261, № 1. P. 42-51.
8. Khin M.M., Ringner M., Aleljung P. et al. // *J. Med. Microbiol*, 1996. № 6. P. 433-439.
9. Coleman J.L., Geblija J.A., Piesman J. et al. // *Cell*. 1997. Vol. 96, № 7. P. 1111-1119.
10. Kohsaka Sh., Hamaoune M., Nakajima K. // *Keio J. Med*. 1996. Vol. 45, № 3. P. 263-269.
11. Жук О.Н., Никандров В.Н. // Механизмы функционирования висцеральных систем. Междунар. конф. к 75-летию А. М. Уголева. Тез. докл. СПб, 2001. С. 129-130.
12. Никандров В.Н., Петрусенко Г.П., Жук О.Н. и др. // Достижения медицинской науки Беларуси. 2002. вып. VII. С. 49-50.
13. Лукашевич И.Б., Лукашевич В.С., Никандров В.Н. // X Съезд Белорусского общества физиологов. Тез. докл. Минск, 2001. С. 39.
14. Володкович О.И., Никандров В.Н. // Механизмы функционирования висцеральных систем. Междунар. конф. к 75-летию А. М. Уголева. Тез. докл., СПб, 2001. С. 65.
15. Кульчицкий В.А., Азев О.А., Никандров В.Н. // Докл. НАН Беларуси. 2000. Vol. 44, № 3. С. 67-69.
16. Никандров В.Н., Пятин В.Ф., Алексеева А.С. и др. // Изв. НАН Беларуси сер. мед.-биол. н. 2003. № 2. С. 40-43.
17. Никандров В.Н., Петрусенко Г.П., Гронская Р.И., Тумилович М.К. // Изв. НАН Беларуси сер. мед.-биол. н., 2003. № 2. С. 54-58.
18. Farkye N.Y., Fox P.F. // *J. Dairy Res*. 1990. Vol. 57. P. 413-418.
19. Farkye N.Y., Fox P.F. // *J. Agr. Food Chem*. 1991. Vol. 39. P. 786-788.
20. Collen D., de Maeyer L. // *Thromb. Diathes. Haemorrh*. 1975. Vol. 34, № 2. P. 396-402.
21. Davies M.C., Englert M.E., De Renzo L.C. // *J. Biol. Chem*. 1964. Vol. 239. № 8. P. 2651-2656.
22. Schick L.A., Castellino F.J. // *Biochemistry*. 1973. Vol. 12, № 22. P. 4315-4321.
23. Summaria L., Boreisha I., Wohl R.C., Robbins K.S. // *J. Biol. Chem*. 1979. Vol. 254, № 14. P. 68110-6814.
24. Slotta K.H., Gonzales J.D. // *Biochemistry*. 1964. Vol. 3. № 3. P. 285-291.
25. Уимэн Б. // Фибринолиз. Современные фундаментальные и клинические концепции. Медицина. М., 1982. С. 56-69.
26. Collen D. // *Thromb. Haemost*. 1980. Vol. 43, № 2. P. 77-89.
27. Sodetz J.M., Castellino F.J. // *J. Biol. Chem*. 1975. Vol. 250, № 8. P. 3041-3049.
28. Paddy L. // *Multidomain proteins. Proc. UNESCO Workshop Struct. Funct. Proteins. Budapest*, 1986. P. 117-121.
29. Scharrer T.M., Wohl R.C., Hach V. et al. // *Thromb. Haemost*. 1986. Vol. 55, № 3. P. 396-401.
30. Higuchi Yu., Furikara K., Ueno I. et al. // *Brit. J. Haematol*. 1998. № 1. P. 99-105.
31. Kline D.L. // *J. Biol. Chem*. 1953. Vol. 204, № 2. P. 949-955.
32. Lewis M.S., Carmassi F., So Il Chung // *Biochemistry*. 1984. Vol. 23, № 17. P. 3874-3879.
33. Davies M.C., Englert M.E. // *J. Biol. Chem*. 1960. Vol. 235, № 4. P. 1011-1013.
34. Shulman S., Alkjersig N., Sherry, S. // *J. Biol. Chem*. 1958. Vol. 233, № 1. P. 91-97.
35. Никандров В.Н., Воробьева Г.В., Демидчик Н.В., Янковская Г.С. // Докл. АН БССР. 1989. Vol. 33. P. 664-667.
36. Nikandrov V.N., Vorobyova G.V., Yankovskaya G.S., Demidchik N.V. // *Int. J. Biol. Macromol*. 1992. Vol. 14. P. 229-234.
37. Kahn P.C. // *Methods Enzymol*. 1979. Vol. 61. P. 339-378.
38. Salinovich O., Mattice W.L., Blakeney E.W. // *Biochim. biophys. acta*. 1982. Vol. 707. P. 147-153.
39. Nedkov P., Ninh K.Z. // Изв. хим. Бълг. АН. 1978. Vol. 11, № 1. P. 173-179.
40. Sodetz J.M., Brockway W.J., Castellino F.J. // *Biochemistry*. 1972. Vol. 11, № 22. P. 4451-4458.
41. Wohl R.C., Sinio L., Summaria L., Robbins K.C. // *Biochim. biophys. acta*. 1983. Vol. 745, № 1. P. 20-31.
42. Кантор Ч., Шиммель П. // Биофизическая химия. Т. I, II. Мир, М.; 1984.
43. Бурштейн Э.А. // Собственная люминесценция белка (природа и применение). Итоги науки и техники. Биофизика. Вып. 7. ВИНТИ. М.; 1977.
44. Никандров В.Н. // Стрептокиназа. Структурные и функциональные свойства. Дисс... д-ра биол. наук. Минск, 1988.
45. Зима В.М., Грузин Д.В., Мацуй С.П. // Укр. биохим. журнал. 1981. Vol. 53, № 6. С. 22-25.
46. Robbins K.C., Summaria L., Hsieh B., Shah R.J. // *J. Biol. Chem*. 1967. Vol. 242, № 10. P. 2333-2342.
47. Christensen L.R., MacLeod C.M. // *J. Gen. Physiol*. 1945. Vol. 28, № 6. P. 559-583.
48. Nikandrov V.N., Vorobyova G.V., Yankovskaya G.S., Demidchik N.V. // *Int. J. Biochem*. 1994. Vol. 26, № 8. P. 1043-1047.
49. Лакович Дж. // Основы флуоресцентной спектроскопии. Мир, М.; 1986.
50. Nikandrov V.N., Vorobyova G.V., Yankovskaya G.S., Demidchik N.V. // *News of Biomed. Sci*. 2001. № 2, P. 48-52.
51. Черницкий Е.А. // Люминесценция и структурная лабильность белков в растворе и клетке. Наука и техника. Минск, 1972.
52. Никандров В.Н., Демидчик Н.В. // Всесоюз. конфер. "Актуальные проблемы гемостаза в клинической практике. Тез. докл." М.; 1987. С. 148.
53. Jackson K.W., Emson N., Tang J. // *Regulation of coagulation. Proc. Int. Workshop., Oklahoma*, 1980. P. 515-525.
54. Robbins K.C., Summaria L., Elwyn D., Barlow G.H. // *J. Biol. Chem*. 1965. Vol. 240, № 1. P. 541-550.
55. Robbins K.C., Summaria L. // *Immunochimistry*. 1966. Vol. 3, № 1. P. 29-40.
56. Summaria L., Hsieh B., Groskopf W.R., Robbins K.C. // *J. Biol. Chem*. 1967. Vol. 242, № 21. P. 5046-5052.
57. Rickli E.E. // *Thromb. Diathes. Haemorrh*. 1975. Vol. 34, № 2. P. 386-395.
58. Lijnen H.R. // *Behring Institute Mittellungen*. 1983. Vol. 73. P. 43-55.
59. Лежен Т.И., Кудинов С.А. // Укр. биохим. журнал. 1983. Vol. 55. № 3. С. 302-306.

60. Sakata Y., Aoki N. // *J. Biol. Chem.* 1980. Vol. 255, № 10. P. 5442-5447.
61. Chauvet J., Chabbat J., Acher R. // *Int. J. Pept. Prot. Chem.* 1986. Vol. 28, № 1. P. 85-90.
62. Wohl R.C., Arzadon L., Summaria L., Robbins K. // *J. Biol. Chem.* 1977. Vol. 252, № 4. P. 1141-1147.
63. Gerlach D., Köhler W. // *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A.* 1977. Vol. 238. P. 336-349.
64. Walther Ph.J., Steinman H.M., Hill R.L., Mc Kee P.A. // *J. Biol. Chem.* 1974. Vol. 249, № 4. P. 1173-1181.
65. Walther Ph.J., Hill R.L., Mc Kee P.A. // *J. Biol. Chem.* 1975. Vol. 250, № 15. P. 5926-5933.
66. Амирханьян В.Б., Розенфельд М.А., Пирузян Л.А. // *Хим.-фарм. журнал.* 1980. Т. 14, № 8. С. 20-24.
67. Castellino F.J., Brockway W.J., Thomas K. et al. // *Biochemistry.* 1973. Vol. 12, № 15. P. 2787-2791.
68. Brockway W.J., Castellino F.J. // *J. Biol. Chem.* 1971. Vol. 246, № 4. P. 4641-4647.
69. Kosov D.P. // *Int. J. Biochem.* 1976. Vol. 7, № 6-7. P. 249-252.
70. Markus G., Priore R.L., Wissler F.C. // *J. Biol. Chem.* 1979. Vol. 254, № 4. P. 1211-1216.
71. Мацука Ю.В., Новохатний В.В., Кудинов С.А. // *Докл. АН УССР, сер. Б.* 1987. № 9. С. 63-66.
72. Sohndel S., Hu, Ch.-K., Marti D. et al. // *Biochemistry.* 1996. Vol. 35, № 7. P. 2357-2364.
73. Bendixen E., Harpel P.C., Sottrup-Jensen L. // *J. Biol. Chem.* 1995. Vol. 269, № 30. P. 17929-17933.
74. Miles L.A., Plow E.T. // *J. Biol. Chem.* 1985. Vol. 260, № 7. P. 4303-4311.
75. Silverstein R.L., Nachman R.L., Leung L.L.K., Harpel P.C. // *J. Biol. Chem.* 1985. Vol. 260, № 18. P. 10346-10352.
76. Mullertz S. // *Scand. J. Haematol.* 1979. Vol. 22, suppl. 34. P. 15-23.
77. Cederholm-Williams S.A., Swain A. // *Tromb. Res.* 1979. Vol. 16, № 5/6. P. 705-713.
78. Troll W., Sherry S. // *J. Biol. Chem.* 1955. Vol. 213, № 2. P. 881-891.
79. Wohl R.C. // *Biochemistry.* 1984. Vol. 23, № 17. P. 3799-3804.
80. Thewes Th., Ramesh V., Simplaceanu L., Llinas M. // *Biochim. biophys. acta.* 1987. Vol. 912. P. 254-269.
81. De Poli P., Bacon-Baguley Th., Kendra-Franczak S., Cederholm M., Walz D. // *Blood.* 1989. Vol. 73, № 4. P. 976-982.
82. Никандров В.Н., Воробьева Г.В., Мурашко О.Н. и др. // *Докл. АН Беларуси.* 1997. Т. 41, № 3. С. 69-75.
83. Никандров В.Н., Мурашко О.Н. // *Тез. докл. IY съезда Белорусск. Обществ. объединен. фотобиол., биофиз. «Молекулярно-клеточные основы функционирования биосистем».* Минск, 2000. С. 170.
84. Zajicek J., Chang Y., Castellino F.J. // *J. Mol. Biol.* 2000. Vol. 275, № 2. P. 333-347.
85. Wiman B., Wallen P. // *Eur. J. Biochem.* 1975. Vol. 50. P. 489-494.
86. Holvoet P., Lijnen H.R., Collen D. // *J. Biol. Chem.* 1985. Vol. 260, № 22. P. 12106-12111.
87. Bajaj S.P., Castellino F. // *J. Biol. Chem.* 1977. Vol. 252, № 2. P. 492-498.
88. Robbins K.C., Bernabe P., Arzadon L., Summaria L. // *J. Biol. Chem.* 1973. Vol. 248, № 20. P. 7242-7246.
89. Harpel P.C., Chang Tsun-San, Venderber E. // *J. Biol. Chem.* 1985. Vol. 260, № 7. P. 4432-4440.
90. An S.S.A., Marti D., Carreno C., Schaller J., Allbericio F., Llinas M. // *Fibrinolysis.* 1996. P. 1.
91. Powell J.R., Castellino F.J. // *J. Biol. Chem.* 1980. Vol. 255, № 11. P. 5329-5335.
92. Mc Clintock D.K., Englert M.E., Dziobkowski C., Snedeker E.H., Bell P.H. // *Biochemistry.* 1974. Vol. 13, № 26. C. 5334-5344.
93. Takada Y., Makino Y., Takada A. // *Thromb. Res.* 1985. Vol. 39, № 3. P. 289-296.
94. Pirie-Shepherd St.R., Stevens R.D., Andon N.L. et al. // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272, № 1. P. 7408-7411.
95. Wang H., Prior M., Bretthauer R.K., Castellino F.J. // *Biochemistry.* 1997. Vol. 36, № 26, 8100-8106.
96. Hayes M.L., Castellino F.J. // *J. Biol. Chem.* 1979. Vol. 254. P. 8768-8772.
97. Troll W. // *Fed. Proc.* 1954. Vol. 13. 311 abs.
98. Summaria L., Arzadon L., Bernabe P., Robbins K.C. // *J. Biol. Chem.* 1973. Vol. 248, № 18. P. 6522-6527.
99. Castellino F.J., Siefing G.E., Sodetz J.M., Bretthauer R.K. // *Biochem. biophys. res. commun.* 1973. Vol. 53, № 3. P. 845-851.
100. Paoni N.F., Violand B.N., Castellino F.J. // *J. Biol. Chem.* 1977. Vol. 252, № 21. P. 7725-7732.
101. Pyzhova N.S., Nikandrov V.N., Nikandrov N.N. // "20th Meeting of FEBS. Abstracts." Budapest, 1990. P. 65.
102. Nikandrov V.N. // *Intern. J. Biochem.* 1992. Vol. 24, № 1. P. 47-53.

V.N. NIKANDROV

THE STRUCTURE AND PROPERTIES OF A PLASMINOGEN MOLECULE

Institute of Physiology of National Academy of Sciences of Belarus, Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Ministry of Public Health of Republic of Belarus

Summary

The data of own study of plasminogen molecule conformation, lability of its tryptophan-containing sites (including a comparative biochemical aspect) and functional properties of this molecule (involvement in reactions of generation and transformation of active oxygen species) are generalized. Literature data on a chemical composition of plasminogen molecule; its primary, secondary, tertiary structures; a character of the structure changes after zymogen transformation to plasmin; a peculiarities of zymogen interactions with small-molecular ligands and ligands of protein nature; the different sites of such interactions (lysine-binding, benzamidine-binding, interactions of carbohydrate residues) as well as nature of molecular heterogeneity of this zymogen molecule are discussed.