

ТОМ 40

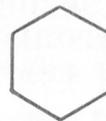
ВЫПУСК 3

МАГІ — ИЮНЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.

ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. С. ДЕБОВ

В. А. ТУТЕЛЬЯН (зам. редактора), А. И. АРЧАКОВ, И. П. АШМАРИН, Т. Т. БЕРЕЗОВ,
Ю. В. БУКИН, А. В. ВАСИЛЬЕВ, Е. Н. ГЕРАСИМОВА, В. З. ГОРКИН, И. Б. ЗБАРСКИЙ,
В. Л. КОЗЕЛЬЦЕВ (ответственный секретарь), А. Н. КЛИМОВ, Б. Ф. КОРОВКИН,
Л. А. ЛОКШИНА, В. Н. ОРЕХОВИЧ, Л. Ф. ПАНЧЕНКО, М. Ш. ПРОМЫСЛОВ,
Ю. А. РОМАКОВ, В. А. САКС, В. Б. СПИРИЧЕВ, Е. А. СТРОЕВ

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

БАЕВ А. А. (Москва)
БЫЧКОВ С. М. (Москва)
КОНСТАНТИНОВ А. А. (Хабаровск)
ЛЯХОВИЧ В. В. (Новосибирск)

ПАСХИНА Т. С. (Москва)
ТУРАКУЛОВ Я. Х. (Ташкент)
ТЯХЕПЫЛД Л. Я. (Тарту)
ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)



1994

МЕДИЦИНА ● МОСКВА

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 576.385.5:577.152.34

Э. А. Дилакян, Т. О. Балаевская,
Т. А. Закамалдина-Цама, Л. З. Тополь,
Н. И. Соловьева

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ КАТЕПСИ- НОВ D И L В ПРОЦЕССЕ ОНКОГЕННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ФИБРОБЛАСТОВ

Институт биомедицинской химии РАМН, Москва, Институт канцерогенеза Онкологического научного центра РАМН, Москва

В настоящее время установлено участие протеолитических ферментов всех типов (аспартильных, цистеиновых, сериновых и металлсодержащих) в процессах канцерогенеза. Накоплены данные, свидетельствующие о вовлечении этих ферментов в нарушение контроля роста и формирование трансформированного фенотипа раковых клеток, а также в их инвазивную активность, способность к миграции [2, 17, 19, 25, 27]. Однако функции индивидуальных протеиназ еще неясны. В связи с этим большое значение имеют модельные системы, которые используются для исследования отдельных этапов канцерогенеза. Трансфекция различных онкогенов позволяет получить линии клеток, отличающиеся по своей опухоленности и метастатической активности. Применение подобных модельных систем позволяет проследить различия в экспрессии индивидуальных протеиназ и выяснить их связь с отдельными стадиями канцерогенеза.

Используя ранее разработанную модельную систему эмбриональных фибробластов крысы, трансформированных в результате последовательной трансфекции двух разных генов [3, 4], мы получили предварительные данные относительно изменения активности цистеиновых протеиназ, подобных катепсинам L и B, в процессе онкогенной трансформации [1].

Целью настоящей работы было сравнительное изучение экспрессии аспартильной катепсин D-подобной и цистеиновой катепсин L-подобной протеиназ на двух дискретных последовательных стадиях онкогенной трансформации *in vitro* — иммортализации и опухоленной трансформации.

Методика. Исследования проводили на модельной системе эмбриональных фибробластов крысы, трансформированных в результате последовательной трансфекции плазмидной ДНК ранней области SA7 аденовируса обезьяны и c-Ha-gas онкогена [3, 4]. Первичная культура эмбриональных фибробластов (REF) крыс линии Фишер получена методом трипсинизации 18—20-дневных эмбрионов крыс и использована в качестве контроля. Иммуортализованные клетки (REF-1) получены после трансфекции плазмиды pAA13, содержащей геном ранней области SA7 аденовируса обезьяны,

в первичные фибробласты крысы [3]. Трансформированные фибробласты крысы (REF-2E1) получены из опухоли бестимусной мыши линии BALB nu/nu, индуцированной введением пула REF-1-клеток, трансформированных онкогеном E1-gas — активированным онкогеном c-Ha-gas [4]. Клетки культивировали в бессывороточной среде DMEM («Flow Lab.», Великобритания) в течение 24, 48 и 96 ч при описанных ранее условиях [1]. Клетки и кондиционированную среду хранили при -20°C .

Для получения лизатов к клеткам добавляли 0,45 % раствор NaCl, содержащий 1 мМ CaCl₂ и 0,1 % тритона X-100 (из расчета $10 \cdot 10^6$ клеток в 3 мл раствора), затем клетки подвергали 6-кратному замораживанию — оттаиванию. Далее клетки разрушали в тefлоновом гомогенизаторе в течение 10 мин; осадок отделяли центрифугированием в течение 20 мин при 650 g в 1 мин. Определяемую в полученном надосадке активность протеиназ рассматривали как внутриклеточную. Все процедуры проводили при 4°C .

Свежие интактные клетки суспендировали в 0,9 % растворе NaCl и в суспензии определяли активность ассоциированных с поверхностью клеток протеиназ.

Кондиционированную среду, предварительно замороженную и хранившуюся при -20°C , оттаивали и использовали в работе как до, так и после диализа против 0,45 % раствора NaCl, содержащего 1 мМ CaCl₂, в течение 30 ч при 4°C .

Активность протеиназ анализировали в присутствии и отсутствие активаторов и ингибиторов разных классов протеиназ: дитиотрейтола (ДТТ), этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), йодоуксусной кислоты и пепстатина («Serva», Германия). Предынкубацию в присутствии активаторов и ингибиторов (конечная концентрация 10^{-3} М, для пепстатина $2\text{—}3,5 \cdot 10^{-3}$ мМ) проводили в течение 15 мин при комнатной температуре.

Для определения протеолитической активности протеиназ в качестве субстрата использовали ¹⁴C-ацетилированный гемоглобин (¹⁴C-гемоглобин). Ацетилирование гемоглобина из крови лошади («Serva», Германия) ¹⁴C-уксусным ангидридом проводили по методу [6]. Раствор ¹⁴C-гемоглобина ($5,5\text{—}6 \cdot 10^5$ имп на 1 мг белка, $14\text{—}15$ мг/мл) в 0,1 М ацетатном буфере pH 4,2 разбавляли немеченым гемоглобином ($14\text{—}15$ мг/мл) в 0,1 М ацетатном буфере pH 4,2 и диализовали против того же буферного раствора. Реакционная смесь объемом 300 мкл для исследования интактных клеток и лизатов и 1200 мкл для кондиционированной среды содержала 50 мкл или 100 мкл 1,5 % раствора гемоглобина ($60\text{—}70 \cdot 10^3$ имп/мг) в 0,1 М ацетатном буфере pH 4,2 для клеточного материала и кондиционированной среды соответственно и исследуемую пробу —

$6 \cdot 10^4$ — 10^5 клеток или 1000 мкл кондиционированной среды. Инкубацию проводили в течение 16 ч при 37°C . Реакцию останавливали добавлением трихлоруксусной кислоты до конечной концентрации 5%. Образовавшийся осадок отделяли центрифугированием в течение 15 мин при 540 g в 1 мин и в аликвотах из надосадочной жидкости определяли радиоактивность в сцинтилляторе Брея. Активность выражали в микрограммах гемоглобина, гидролизованного за 16 ч на $1 \cdot 10^6$ клеток.

Активность цистеиновой катепсин L-подобной протеиназы оценивали по гидролизу синтетического субстрата — 7-амино-4-метил-кумаринамида карбобензокси-L-фенилаланил-L-аргинина (Z-Phe-Arg-MCA; субстрат синтезирован в Институте биомедицинской химии РАМН, Москва) при pH 6,5 в присутствии и отсутствии ДТТ и ЭДТА по методу [11]. Содержание белка определяли по методу Лоури [12].

Результаты и обсуждение. Исследована активность аспартильных и цистеиновых протеиназ в лизатах клеток, на клеточной поверхности и в кондиционированной среде эмбриональных фибробластов крысы, находящихся на двух разных стадиях онкогенной трансформации — иммортализации и туморогенной трансформации.

Показано, что в лизатах иммортализованных клеток — REF-1 протеолитическая активность, определенная по гидролизу меченого гемоглобина, значительно выше, чем в лизатах первичных фибробластов — REF (в 1,5—4 раза в зависимости от времени культивирования клеток). В лизатах трансформированных фибробластов — REF-2E1 отмечено дальнейшее увеличение гемоглобингидролизующей активности протеиназ: в 2—3 раза по сравнению с иммортализованными клетками и в 9 раз по сравнению с первичными фибробластами (рис. 1).

Изменения ассоциированной с поверхностью клеток активности протеиназ по гидролизу ^{14}C -гемоглобина на стадии иммортализации подобны изменениям активности лизатов. Однако на стадии туморогенной трансформации клеток имело место резкое снижение ассоциированной с клеточной поверхностью активности; последняя в 2—4 раза ниже, чем гемоглобингидролизующая активность протеиназ в лизатах клеток на этой стадии.

Исследование динамики секреции протеиназ показало, что увеличение гемоглобингидролизующей активности в основном коррелировало с процессом трансформации. Однако в течение первых суток культивирования (24 ч) внутриклеточная гемоглобингидролизующая активность была выше секретируемой. При дальнейшем культивировании (96 ч) секретируемая гемоглобингидролизующая активность превышала активность как внутри клетки (в 1,5—4 раза в зависимости от стадии трансформации), так и на ее поверхности (в 6 раз), что указывает на преобладание в этот период процесса секреции протеиназ, гидролизующих гемоглобин.

Для идентификации типов протеиназ, осуществляющих гидролиз гемоглобина в исследуемых культурах клеток, изучали влияние различных

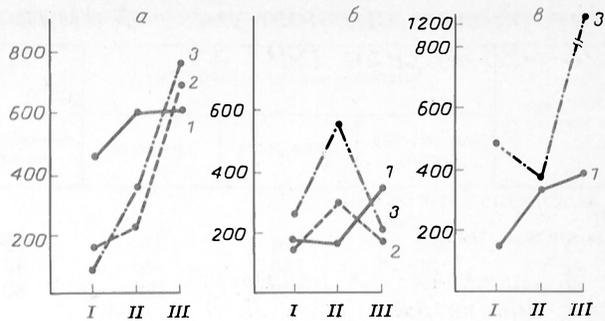


Рис. 1. Динамика изменения внутриклеточной (а), ассоциированной с поверхностью клетки (б) и секретируемой (в) активности протеиназ в процессе онкогенной трансформации эмбриональных фибробластов крысы.

Представлен протокол типичного опыта. Активность протеиназ определяли по гидролизу ^{14}C -гемоглобина при pH 4,2. По оси ординат — активность протеиназ, мкг Hb на $1 \cdot 10^6$ клеток: I — REF, II — REF-1, III — REF-2E1, 1 — 24 ч, 2 — 48 ч, 3 — 96 ч культивирования.

ингибиторов (аспартильных, цистеиновых и металлопротеиназ) на гемоглобингидролизующую активность. Анализ влияния ингибиторов показал, что гидролиз ^{14}C -гемоглобина в культурах первичных и трансформированных фибробластов крысы обусловлен в основном действием аспартильных и цистеиновых протеиназ (см. таблицу). Как видно из представленных данных, экспрессия этих протеиназ на разных стадиях трансформации и в зависимости от времени культивирования клеток носит различный характер. Так, в лизатах и кондиционированной среде первичных (REF) и иммортализованных (REF-1) клеток торможение пепстатином гемоглобингидролизующей активности составило 55—95%, а йодоуксусной кислотой — 15—55%. В лизатах трансформированных фибробластов (REF-2E1) спустя 24 и 48 ч культивирования и в кондиционированной среде этих клеток независимо от времени культивирования исследуемая активность ингибировалась пепстатином на 60—75%. Эти данные свидетельствуют о том, что в названных культурах клеток гидролиз гемоглобина осуществляется главным образом аспартильной катепсин D-подобной протеиназой. В то же время ассоциированная с поверхностью клетки гемоглобингидролизующая активность в меньшей степени связана с действием аспартильной протеиназы (10—50% ингибирования пепста-

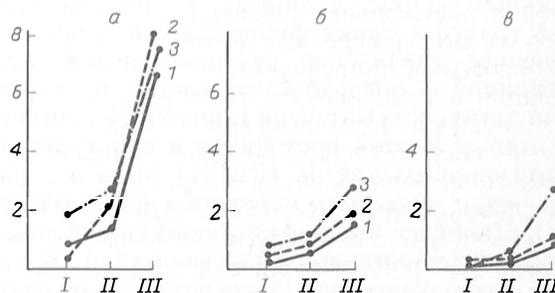


Рис. 2. Динамика изменения внутриклеточной (а), ассоциированной с поверхностью клетки (б) и секретируемой (в) активности цистеиновой катепсин L-подобной протеиназы в процессе онкогенной трансформации эмбриональных фибробластов крысы.

Представлен протокол типичного опыта. Активность протеиназы определяли по гидролизу Z-Phe-Arg-MCA при pH 6,5. По оси ординат — активность протеиназы, моль/мин на $1 \cdot 10^6$ клеток. Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

Влияние ингибиторов и активаторов на гемоглибингидролизующую активность протеиназ

Культура клеток	Активность в лизатах клеток, %			Ассоциированная с поверхностью клеток активность, %			Секретируемая активность, %		
	йодоуксусная кислота	ДТТ+ЭДТА	пенистатин	йодоуксусная кислота	ДТТ+ЭДТА	пенистатин	йодоуксусная кислота	ДТТ+ЭДТА	пенистатин
REF:									
24 ч	60	100	15	70	70	45	85	300	5
48 ч	60	150	45	40	85	70	60	110	15
96 ч	40	100	30	80	80	90	55	110	20
REF-1:									
24 ч	70	120	10	30	60	20	60	160	20
48 ч	55	120	35	30	75	60	60	200	40
96 ч	60	140	40	40	90	60	50	250	30
REF-2EJ									
24 ч	45	200	25	20	130	80	85	150	30
48 ч	40	100	30	30	100	75	60	300	30
96 ч	30	150	55	35	130	45	60	200	40

Примечание. Величина остаточной активности (%) является средней из четырех экспериментов

тином). Из представленных данных также ясно, что цистеиновым протеиназам принадлежит существенная роль в протеолитической гемоглибингидролизующей активности лизатов трансформированных фибробластов (REF-2FJ) (торможение йодоуксусной кислотой 60—70 %) и в меньшей степени — лизатов первичных (REF) и иммортализованных (REF-1) клеток (торможение йодоуксусной кислотой 40 и 30—40 % соответственно). Кроме того, торможение ассоциированной с поверхностью клетки гемоглибингидролизующей активности в присутствии ЭДТА (на 20—40 %) в культурах первичных и иммортализованных фибробластов указывает на наличие на поверхности клеток металлозависимых протеиназ, гидролизующих гемоглибин в условиях эксперимента (рН 4,2).

Показано, что характер изменения гемоглибингидролизующей активности протеиназ в клеточных лизатах и кондиционированной среде в основном подобен характеру изменения активности цистеиновой протеиназы, гидролизующей синтетический субстрат Z-Phe-Arg-MCA (см. рис. 1 и 2). Ранее нами было показано, что в исследуемых культурах эмбриональных фибробластов активность цистеиновых протеиназ, определенная по гидролизу этого субстрата, обусловлена главным образом (на 70—90 %) действием цистеиновой катепсина L-подобной протеиназы [1]. Как видно из представленных на рис. 2 данных, в процессе онкогенной трансформации фибробластов происходит постепенное увеличение внутриклеточной, ассоциированной с поверхностью клетки и секретируемой активности катепсина L-подобной протеиназы. Активность этой протеиназы в культурах иммортализованных клеток (REF-1) была в 2 раза выше, чем в культурах первичных фибробластов (REF). Наиболее высокую активность наблюдали на стадии туморогенной трансформации. В этом случае внутриклеточная и секретируемая активность катепсина L-подобной протеиназы увеличилась в 4—7—16 и 5—8—16 раз соответственно в зависимости от времени культивирования клеток (см. рис. 2). Однако, несмотря на значительное увеличение в процессе трансформации активности цистеиновой катепсина L-подобной протеиназы в кондиционированной среде, внутриклеточная активность этого фермента существенно

превышала (на порядок) ее секретируемую активность.

Полученные результаты указывают, что в культурах трансформированных эмбриональных фибробластов основная активность катепсина L-подобной протеиназы локализуется внутри клетки, тогда как активность аспартильной протеиназы, подобной катепсину D, секретируется. Кроме того, внутриклеточная активность катепсина L-подобной протеиназы значительно превосходит ее активность, определяемую на клеточной поверхности: в лизатах первичных и иммортализованных фибробластов активность этой протеиназы в 1,5—2 раза выше, чем ее активность, ассоциированная с поверхностью клетки, а на стадии туморогенной трансформации внутриклеточная активность в 3—4,5 раза выше, чем активность, экспрессированная на поверхности. В то же время, как видно на рис. 1 и 2, характер изменения ассоциированной с поверхностью клетки активности катепсина L-подобной протеиназы несколько отличался от характера изменения гемоглибингидролизующей активности, ассоциированной с клеточной поверхностью.

Таким образом, охарактеризована каждая стадия онкогенной трансформации фибробластов исследованной модельной системы в отношении экспрессии аспартильных и цистеиновых протеиназ. Выявлена четкая корреляция между увеличением внутриклеточной, ассоциированной с поверхностью клетки и секретируемой активности катепсина D- и катепсина L-подобных протеиназ и процессом трансформации фибробластов. Результаты свидетельствуют о том, что индивидуальные протеиназы экспрессируются в различной степени на разных стадиях онкогенной трансформации фибробластов и их экспрессия зависит от времени культивирования клеток. Так, катепсин D-подобная протеиназа действует преимущественно в ранние периоды (24 ч) культивирования фибробластов независимо от стадии трансформации. Активность этой протеиназы проявляется в большей степени в норме — в культуре первичных фибробластов и на стадии иммортализации (см. таблицу), в то время как цистеиновой протеиназе, подобной катепсину L, существенная роль принадлежит на стадии туморогенной трансформации, хотя увеличение ее активности в основном

коррелировало с процессом трансформации. Полученные результаты особенно интересны в связи с тем, что до настоящего времени практически нет данных относительно экспрессии аспартильных и цистеиновых протеиназ на отдельных последовательных стадиях онкогенной трансформации. Исследование этих катепсинах проводилось только на культурах полностью трансформированных клеток разного типа [2, 5, 9, 13, 20—23, 25] или на клетках злокачественных опухолей различного гистогенеза [2, 7, 15, 16, 24, 25]. При этом описано значительное повышение активности катепсина D и цистеиновых катепсин L- и B-подобных протеиназ в трансформированных клетках по сравнению с нормой [2, 5, 7, 18, 21—24].

Проведенный анализ распределения активности исследуемых ферментов внутри и на поверхности клетки, а также в кондиционированной среде показал, что на всех рассмотренных стадиях трансформации большая часть катепсин D-подобной протеиназы (60—70 %) секретируется (96 ч культивирования). Эти результаты согласуются с данными, полученными при исследовании секреции прокатепсина D раковыми клетками грудной железы; в этих исследованиях обнаружено увеличение секреции профермента до 40—50 % [5, 21, 22]. В то же время основная активность (50—70 %) катепсин L-подобной протеиназы локализуется внутри клетки, что наблюдалось даже на стадии туморогенной трансформации, несмотря на резкое возрастание секреторируемой активности этой протеиназы. Полученные данные несколько отличаются от результатов исследования МЕР — главного секреторируемого белка фибробластов мышей, трансформированных вирусом саркомы мыши Кирстен, который, как было показано, является предшественником катепсина L [8, 11, 14, 26]. Исследованиями было установлено, что синтез профермента катепсина L трансформированными фибробластами в 25 раз выше, чем его синтез родительскими клетками, причем 94 % этого белка секреторируется из клетки [10], тогда как в исследуемых нами культурах фибробластов обнаружена секреция лишь 15—40 % катепсин L-подобной протеиназы.

Исследование гемоглибингидролизующей активности в кондиционированной среде показало, что в результате диализа исследуемая активность на всех стадиях трансформации возрастает в 2—4 раза (рис. 3). Это увеличение активности скорее всего связано с диссоциацией фермент-ингибиторного комплекса и свидетельствует о том, что катепсин D-подобная протеиназа секретируется в комплексе с эндогенным ингибитором (ами). Эндогенные ингибиторы этой аспартильной протеиназы пока не описаны. Ранее подобные данные были получены нами и для катепсин L-подобной протеиназы [1]. Однако взаимодействие этих протеиназ с их эндогенными ингибиторами требует дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дилакян Э. А., Соловьева Н. И., Тополь Л. З. // *Вопр. мед. химии.*— 1991.— № 6.— С. 36—39.
2. Локшина Л. А. // Там же.— С. 15—21.
3. Тополь Л. З., Тараховский А. М., Ревазова Е. С. и др. // *Бюл. exper. биол.*— 1986.— № 2.— С. 190—192.
4. Тополь Л. З., Спитковский Д. Д., Киселев Ф. Л. // Там же.— 1988.— № 3.— С. 329—332.
5. Capony F., Rougeot C., Montcourrier P. et al. // *Cancer Res.*— 1989.— Vol. 49, N 14.— P. 3904—3909.

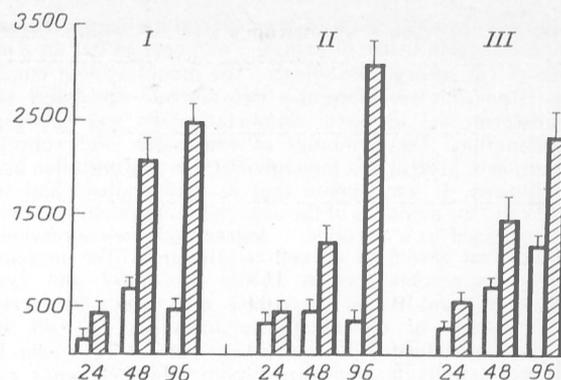


Рис. 3. Активность аспартильной катепсин D-подобной протеиназы в кондиционированной среде эмбриональных фибробластов крысы на разных стадиях онкогенной трансформации.

По оси абсцисс — время культивирования клеток, ч; по оси ординат — активность протеиназы, мкг Нб на $1 \cdot 10^6$ клеток; а — в кондиционированной среде до диализа, б — после диализа. Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

6. Cawston T. E., Murphy G. // *Meth. Enzymol.*— 1981.— Vol. 80, Pt C.— P. 711—722.
7. Chauhan S. S., Goldstein L. J., Gottesman M. M. // *Cancer Res.*— 1991.— Vol. 51.— P. 1478—1481.
8. Denhardt D. T., Hamilton R. T., Parfett C. L. J. // *Ibid.*— 1986.— Vol. 46, N 9.— P. 4590—4594.
9. Denhardt D. T., Greenberg A. H., Egon S. E. et al. // *Oncogene.*— 1987.— Vol. 2, N 1.— P. 55—59.
10. Dong J., Prence E. M., Sahagian G. G. // *J. biol. Chem.*— 1989.— Vol. 264, N 13.— P. 7377—7383.
11. Gal S., Gottesman M. M. // *Biochem. J.*— 1988.— Vol. 253.— P. 303—306.
12. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // *J. biol. Chem.*— 1951.— Vol. 193.— P. 265—275.
13. Maciewicz R. A., Wardale R. J., Etherington D. J. et al. // *Int. J. Cancer.*— 1989.— Vol. 43.— P. 478—486.
14. Mason R. W., Gal S., Gottesman M. M. // *Biochem. J.*— 1987.— Vol. 248, N 2.— P. 449—454.
15. Moin K., Rozhin J., McKernan T. et al. // *FEBS Lett.*— 1989.— Vol. 244, N 1.— P. 61—64.
16. Mort J. S., Recklies A. D., Poole A. R. // *Biochim. biophys. Acta.*— 1980.— Vol. 614.— P. 134—143.
17. Mullins D. E., Rohlich S. T. // *Ibid.*— 1983.— Vol. 695, N 3—4.— P. 177—214.
18. Murnane M. J., Sheahan K., Ozdemirli M. et al. // *Cancer res.*— 1991.— Vol. 51, N 4.— P. 1137—1142.
19. Nakajima M., Irimura T., Nicolson G. L. // *Cancer Bull.*— 1987.— Vol. 39, N 3.— P. 142—149.
20. Qian F., Bajkowski A. S., Steiner D. F. et al. // *Cancer Res.*— 1989.— Vol. 49, N 17.— P. 4870—4875.
21. Rochefort H., Capony F., Garcia M. et al. // *J. Cell Biochem.*— 1987.— Vol. 35.— P. 17—29.
22. Rochefort H., Cavailles V., Augereau P. et al. // *J. Steroid Biochem.*— 1989.— Vol. 34, N 1—6.— P. 177—182.
23. Rozhin J., Wade R. L., Honn K. V. et al. // *Biochem. biophys. Res. Commun.*— 1989.— Vol. 164, N 1.— P. 556—561.
24. Sheahan K., Shuja S., Murnane M. J. // *Cancer Res.*— 1989.— Vol. 49, N 14.— P. 3809—3814.
25. Sloane B. F., Honn K. V. // *Cancer Metastas. Rev.*— 1984.— Vol. 3.— P. 249—263.
26. Troen B. R., Ascherman D., Atlas D. et al. // *J. biol. Chem.*— 1988.— Vol. 263, N 1.— P. 254—261.
27. Tryggvasson K., Hoyhtya M., Salo T. // *Biochim. biophys. Acta.*— 1987.— Vol. 907, N 3.— P. 191—217.

Поступила 07.09.93

STUDY OF THE CATHEPSIN D AND L EXPRESSION DURING THE FIBROBLAST ONCOGENIC TRANSFORMATION PROCESS

E. A. Dilakyan, T. O. Balaevskaya, T. A. Zakamaldina-Sama, L. Z. Topol, N. I. Solovyeva

Institute of Biomedical Chemistry, Institute of Carcinogenesis, Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow.

Study of the expression of the aspartyl cathepsin D-like and cysteine cathepsin L-like proteinases was carried out on a model system of rat embryo fibroblasts. The model system employed makes it possible to distinguish two discrete successive stages of transformation in vitro: immortalization and tumorigenic transformation. The dynamics of expression and subcellular distribution of proteinases throughout the transformation process was followed. It was shown that in immortalized and transformed cells the activities of the aspartyl and cysteine proteinases were expressed to a variable degree and the expression was dependent on the time of cell cultivation. The increase in both the aspartyl cathepsin D-like proteinase and cysteine cathepsin L- and B-like proteinase activities was correlated with the stage of fibroblast transformation. At all stages studied of transformation, the major part of cathepsin L-like proteinase activity was localized within the cell, while among secreted proteinases the cathepsin D-like proteinase was apparently predominant. It was found that the secreted cathepsin D-like proteinase in all cell cultures studied was complexed with the inhibitor.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 616.155.392-07:616.155.32-008.931:577.152.34.042]-09.24

Т. А. Гуреева, Н. В. Голубева, О. Н. Лубкова, Л. А. Локшина

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ АСПАРТИЛЬНЫХ, ЦИСТЕИНОВЫХ ПРОТЕИНАЗ И ИХ ИНГИБИТОРОВ В ЛЕЙКОЗНЫХ В- И Т-ЛИМФОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА

Институт биомедицинской химии РАМН, Москва

Изучение протеолитических ферментов и их ингибиторов в отдельных популяциях лимфоидных клеток представляет интерес для выяснения роли этих ферментов в осуществлении определенных функций лимфоцитов. Результаты наших предыдущих исследований показывают, что в лейкозных В- и Т-клетках человека присутствуют аспартильные, цистеиновые (В, L, H), сериновые трипсиноподобные ферменты, активатор плазминогена урокиназного типа, дипептидиламинопептидаза IV, аминопептидазы. Величины активности отдельных протеиназ и их соотношение в разных клетках существенно различались, что указывало на разный набор ферментов [1, 2, 10, 14]. При хроматографическом исследовании лизатов лейкозных В- и Т-клеток с помощью высокоэффективной хроматографии были обнаружены ингибиторы цистеиновых протеиназ и сериновых трипсиноподобных протеиназ; уровень ингибиторов в разных лимфоидных клетках также варьировал [4, 5]. Полагая, что изменение баланса цистеиновых протеиназ и их ингибиторов может быть связано с разным функциональным состоянием этой системы в В- и Т-клетках, мы начали сравнительное исследование этих белков.

В настоящем сообщении представлены данные по выделению аспартильных, цистеиновых протеиназ и их ингибиторов из лейкозных В- и Т-лимфоцитов человека и приведены некоторые свойства полученных препаратов ферментов и ингибиторов.

Методика. В работе использовали хранившиеся в замороженном виде в течение 1 года клетки периферической крови больных В-клеточным хроническим лимфолейкозом и Т-клеточным хроническим лимфолейкозом. Условия обработки клеток и получения лизатов описаны в работе [5].

В качестве субстратов для определения актив-

ности протеиназ использовали специфические флюорогенные субстраты, синтезированные в лаборатории органического синтеза Института биомедицинской химии РАМН главным научным сотрудником В. Ф. Позднеевым: 7-амино-4-метилкумариламид карбобензокси L-фенилаланил-L-аргинина (Z-Phe-Arg·MCA) для определения суммарной активности катепсинов В и L (B+L); 7-амино-4-метилкумариламид карбобензокси L-аланил-L-аргинил-L-аргинина (Z-Ala-Arg-Arg·MCA) для определения активности катепсина В; β-нафтиламид-L-лейцина (Leu-NA), («Serva») для определения активности катепсина H. Активность выражали в наномолях продукта, освобожденного 1 мг белка за 1 мин. Активность аспартильных протеиназ определяли по гидролизу ацетилированного ¹⁴C-уксусным ангидридом гемоглобина. Условия гидролиза указанных субстратов описаны в работах [3, 5].

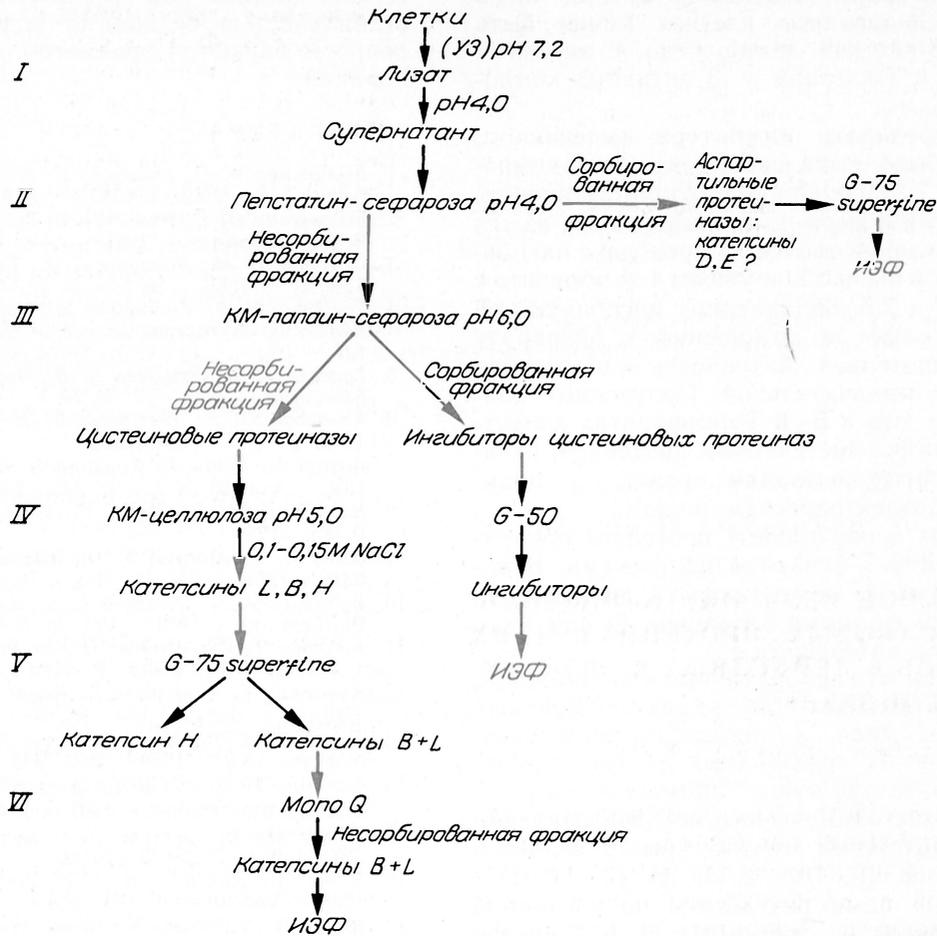
Эндогенные ингибиторы цистеиновых протеиназ тестировали по торможению активности папаина («Mergsk»), активность которого измеряли по гидролизу p-нитроанилида-N-бензоиларгинина (ВАРА), а также по торможению активности цистеиновых протеиназ, полученных из тех же клеток. Активность ингибиторов выражали в ингибиторных единицах (ИЕ) — количество наномолей субстрата, гидролиз которого тормозился 1 мг ингибитора за 1 мин.

Для препаративной работы аффинные сорбенты — пепстатин-сефарозу и карбоксиметил-папаин-сефарозу (KM-папаин-сефарозу) получали по методам [6, 8]. Для выделения ферментов и ингибиторов лизат, полученный из В- или Т-лимфоцитов, после подкисления до pH 4,0 и последующего центрифугирования (3000 g, 15 мин) хроматографировали на пепстатин-сефарозе. Неадсорбированную фракцию доводили до pH 6,5 и хроматографировали на KM-папаин-сефарозе. Неадсорбированную фракцию после диализа против 0,02 M ацетатного буфера pH 5,0 хроматографировали на KM-целлюлозе. Фракцию, содержащую цистеиновые протеиназы, элюировали с использованием градиента концентрации NaCl (0—0,3 M) и после концентрирования подвергали гель-фильтрации через сефадекс G-75 superfine при pH 6,5. Хроматографию на Mono Q проводили с помощью HPLC при pH 5,7. Адсорбированную на пепстатин-сефарозе фракцию катепсина D элюировали 0,1 M NaHCO₃ в 0,5 M NaCl pH 7,8 и затем подвергали гель-фильтрации через сефадекс G-75 superfine. Ингибиторы цистеиновых протеиназ элюировали с KM-папаин-сефарозы при pH 11,3 с последующей нейтрализацией раствора до pH 6,5. Для дальнейшей их очистки использовали гель-фильтрацию через сефадекс G-50.

Изоэлектрофокусирование (ИЭФ) проводили в 7,5 % полиакриламидном геле (ПААГ) при концентрации амфолинов 1 % (pH 3,0—10,0) при напряжении 300 В в течение 6—12 ч при 4 °C.

Результаты и обсуждение. Для изучения обнаруженных ранее цистеиновых протеиназ и их ингибиторов была разработана схема выделения, позволяющая одновременно с цистеиновыми протеиназами получать их ингибиторы, а также аспартильные протеиназы. С помощью предложенной схемы были выделены частично очищенные препараты ферментов (катепсины D, В, L, H) и

Схема выделения аспартильных, цистеиновых протеиназ и их ингибиторов из лейкозных В- и Т- лимфоцитов человека



ингибиторы цистеиновых протеиназ. На стадии V (см. схему) катепсин H был отделен от катепсинов B и L, которые нам не удалось разделить на последующих стадиях очистки. При электрофорезе в ПААГ выделенные препараты ферментов и ингибиторов были негомогенны. Некоторая характеристика выделенных препаратов представлена в таблице.

Сравнение препаратов цистеиновых протеиназ из В- и Т-лимфоцитов показывает, что из обоих типов клеток получены препараты, содержащие

катепсины В и L. Однако соотношение этих ферментов в выделенных препаратах различно. Из В-клеток получен препарат, содержащий смесь катепсинов В и L в разных соотношениях. Из Т-клеток выделен более активный препарат, в котором превалирует активность катепсина В. Возможно, что различия в содержании цистеиновых протеиназ в исследованных препаратах связаны с разной стабильностью ферментов и их частичной инактивацией по ходу выделения. По данным ИЭФ выделенные препараты цистеиновых протеи-

Сравнение аспартильных, цистеиновых протеиназ и их ингибиторов из В- и Т-клеток

Субстрат	Фермент	Активность					
		В-клетки			Т-клетки		
		нмоль/мг/мин		ИЕ	нмоль/мг/мин		ИЕ
		лизат	фермент	ингибитор	лизат	фермент	ингибитор
Z-Phe-Arg-MCA	Катепсины В+L	0,4	42	0,9	0,34	72	5,4
Z-Ala-Arg-Arg-MCA	Катепсин В	0,2	24	0,2	0,24	144	3,2
ВАРА	Папаин			68			18
				ИЭТ			
Z-Phe-Arg-MCA	Катепсины В+L		5,2	4,5		5,2	4,5
			5,6	7,5		5,8	5,6
			5,8	9,0			6,2
			6,2				7,5
Z-Ala-Arg-Arg-MC-MCA	Катепсин В		5,2			6,2	
			5,6			4,5	
¹⁴ C-Hb	Катепсин D		4,5			5,8	
			6,2				

наз представляют собой белки с близкими изоэлектрическими точками (ИЭТ). При этом обнаружено несколько форм катепсинов В и L, число которых в исследованных клетках может быть различно: в В-клетках обнаружено 4 активных компонента, а в Т-клетках — 3 активных компонента.

При ИЭФ препарата ингибитора, выделенного из В-клеток, было выявлено 3 активных компонента с рI 4,5, 7,5, 9,0. Они тормозили активность как папаина, так и ферментов, выделенных из тех же клеток. В отличие от этого в препарате ингибитора из Т-клеток были обнаружены 4 компонента с рI 4,5, 5,6, 6,2 и 7,5, обладающих ингибирующей активностью только по отношению к препарату цистеиновых протеиназ. Активность в отношении папаина была незначительной. Полученные данные указывают, что в В- и Т-лимфоцитах присутствуют ингибиторы цистеиновых протеиназ, отличающиеся по своим свойствам: родству к папаину, а также изoeлектрическим точкам.

В препаратах аспартильных протеиназ обнаружены компоненты с близкими изoelectricкими. В настоящее время мы не можем сказать, являются ли эти компоненты формами катепсина D или один из них является катепсином E.

Надо отметить, что аспартильные и цистеиновые протеиназы в отдельных популяциях лимфоидных клеток изучены мало, а данные по выделению этих ферментов из лимфоидных клеток человека практически отсутствуют. С помощью иммунохимических и гистохимических методов показано наличие в лимфоидных клетках крыс и человека катепсинов D, E [9, 18], В, L, H [7, 12, 17]. Представленные нами результаты по частичной очистке ферментов из лейкозных В- и Т-клеток показывают, что в отдельной субпопуляции лимфоидных клеток человека присутствует несколько цистеиновых протеиназ — катепсины В, L, H. Соотношение этих ферментов в В- и Т-клетках может быть различно. В этих клетках, возможно, присутствует также и катепсин S — фермент, близкий по свойствам катепсину L, обнаруженный и выделенный из лимфоидной ткани [11, 15, 20, 21]. Дифференцировать этот фермент от катепсина L по определению активности довольно трудно, и, поскольку специальных исследований, направленных на его выявление, мы не проводили, вопрос о присутствии катепсина S в изучаемых нами клетках остается открытым.

Результаты выделения ингибиторов цистеиновых протеиназ указывают на существование нескольких форм этих ингибиторов в лейкозных лимфоидных В- и Т-клетках. Они соответствуют данным о наличии двух классов эндогенных низкомолекулярных ингибиторов, обнаруженных в некоторых опухолевых клетках, в частности в клетках саркомы [13], а также уточняют данные иммунохимического анализа о присутствии двух типов ингибиторов цистеиновых протеиназ в лимфоцитах человека [13, 16, 19].

Представленные результаты являются первыми сведениями по одновременной очистке цистеиновых протеиназ и их ингибиторов из отдельных субпопуляций лейкозных клеток человека. Поскольку были получены лишь частично очищенные препараты белков, в настоящее время трудно ответить на вопрос, связаны ли некоторые обнару-

женные различия в свойствах цистеиновых протеиназ и их ингибиторов с различием их форм в В- и Т-клетках или они обусловлены различной стабильностью белков по ходу выделения. Эти вопросы являются предметом дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Былинкина В. С., Голубева Н. В., Гуреева Т. А. и др. // Бюл. exper. биол.— 1989.— № 7.— С. 85—88.
2. Былинкина В. С., Голубева Н. В., Гуреева Т. А. и др. // Вопр. мед. химии.— 1991.— № 6.— С. 30—33.
3. Геворкян Н. М., Локшина Л. А., Николаева Н. В. и др. // Там же.— 1986.— № 5.— С. 72—76.
4. Голубева Н. В., Гуреева Т. А., Былинкина В. С. и др. // Биохимия опухолевой клетки.— Минск, 1990.— С. 126—127.
5. Гуреева Т. А., Голубева Н. В., Былинкина В. С. и др. // Биохимия.— 1993.— Т. 58, № 7.— С. 1121—1130.
6. Казакова О. В., Орехович В. Н. // Там же.— 1975.— Т. 40, № 5.— С. 969—972.
7. Aoyagi T., Wada T., Koyama F. et al. // Biochem. int.— 1989.— Vol. 18, N 2.— P. 383—389.
8. Barrett A. J. // Meth. Enzymol.— 1981.— Vol. 80.— P. 771—778.
9. Bever C. T., Morgan K. D., Whitaker J. N. // Inflammation.— 1989.— Vol. 13, N 3.— P. 309—316.
10. Bylinkina V. S., Lokshina L. A., Samojlova R. S. et al. // Biochem. int.— 1992.— Vol. 28, N 1.— P. 31—39.
11. Kirschke H., Wiederanders B., Brömme D. et al. // Biochem. J.— 1989.— Vol. 264.— P. 467—473.
12. Kominami E., Tsukahara T., Bando Y. et al. // J. Biochem. (Tokyo).— 1985.— Vol. 98, N 1.— P. 87—93.
13. Lah T. T., Clifford J. L., Helmer K. M. et al. // Biochim. biophys. Acta.— 1989.— Vol. 993, N 5.— P. 63—73.
14. Lokshina L. A., Preobrazhenskaya M. E., Samoylova R. S. et al. // Biochem. int.— 1991.— Vol. 24, N 1.— P. 94—106.
15. Petanceska S., Devi L. // J. biol. Chem.— 1992.— Vol. 267, N 36.— P. 26038—26166.
16. Rinne A., Jarvinen M., Alavaikko M. // Cell. Path.— 1985.— Vol. 49.— P. 153—159.
17. Rinne A., Jarvinen M., Kirschke H. et al. // Biomed. biochem. Acta.— 1986.— Vol. 45, N 11—12.— P. 1465—1476.
18. Sakai H., Saku T., Kato Y. et al. // Biochim. biophys. Acta.— 1989.— Vol. 991, N 2.— P. 367—375.
19. Turk V., Bode W. // FEBS Lett.— 1991.— Vol. 285.— P. 212—219.
20. Wiederanders B., Broemme D., Kirschke H. et al. // Ibid.— Vol. 286, N 1—2.— P. 189—192.
21. Wiederanders B., Brömme D., Kirschke H. et al. // J. biol. Chem.— 1992.— Vol. 267, N 19.— P. 13708—13713.

Поступила 15.07.93

COMPARATIVE STUDY OF ASPARTYL, CYSTEINE PROTEINASES AND THEIR INHIBITORS FROM HUMAN LEUKEMIC B- AND T-LYMPHOCYTES.

T. A. Gureeva, N. V. Golubeva, O. N. Lubkova, L. A. Lokshina

Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow.

A procedure was developed for simultaneous isolation of aspartyl and cysteine proteinases as well as of the cysteine-proteinase inhibitors. Affinity chromatography using pepstatin-Sepharose enabled one to isolate aspartyl proteinases, while inhibitors of cysteine-proteinases were isolated by affinity chromatography on CM-papain-Sepharose; further purification of the enzymes was carried out using ion exchange chromatography and gel filtration. Partially purified preparations of cathepsin D as well as of cysteine-proteinases and their inhibitors were obtained. Some physicochemical and enzymatic properties of the enzymes and inhibitors obtained were studied.

Е. В. Кугаевская, [Л. В. Павлихина],

Ю. Е. Елисеева

УЧАСТИЕ СЕРИНОВОЙ ПРОТЕИНАЗЫ В ПРЕВРАЩЕНИИ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНОЙ (600 кДа) формы ангиотензин I-превращающего фермента в низкомолекулярную (190 кДа)

Институт биомедицинской химии РАН, Москва

Ангиотензин I-превращающий фермент (АПФ; КФ.3.4.15.1) играет ключевую роль в регуляции артериального давления, превращая ангиотензин I в прессорный пептид — ангиотензин II и инактивируя депрессорный пептид — брадикинин. АПФ был обнаружен практически во всех органах млекопитающих. Молекулярная масса АПФ, рассчитанная на основе данных седиментационного равновесия или полученная в SDS-Na-акриламидном геле, находится в пределах 130—160 кД [5], что согласуется с результатами исследований [17], в которых установлена первичная структура АПФ. Величины молекулярной массы, полученные методом гель-фильтрации, несколько выше [1, 6, 11, 16, 18], поскольку АПФ является гликопротеидом.

Нами при фракционировании сульфатом аммония экстрактов коры почек и легких быка была обнаружена форма АПФ с мол. м. около 600 кД [3]. Ряд исследователей сообщали о формах АПФ с различной молекулярной массой. АПФ, элюирующийся со свободным объемом при гель-фильтрации на сефадексе G-200, был найден в легких человека [8], кролика [13] и свиньи [12], АПФ с мол. м. 330 и 430 кД — в легких человека [14] и коже человека и мыши [7]. Сравнительное изучение форм АПФ с мол. м. 180—430 кД показало, что по ряду свойств (специфичность действия, оптимум pH, отношение к ионам хлора и ингибиторам) они не отличались друг от друга [7, 14]. Относительно форм АПФ с мол. м. выше 450 кД в литературе сведений практически не было.

Методика. Препараты, содержащие высокомолекулярную форму (ВМФ) АПФ, получали двукратным центрифугированием (при 2000 и 5000 г по 40 мин) гомогенатов ткани коркового слоя почек быка (1:6; г ткани : мл 0,25 М раствора сахарозы в 0,05 М фосфатном буфере pH 7,6). Полученный осадок экстрагировали 0,05 М фосфатным буфером pH 7,4 с 0,1 М NaCl в течение 12 ч при 4 °С и затем центрифугировали при 26 000 г 30 мин. При гель-фильтрации полученных надосадков на сефадексе G-200 активность АПФ, определяемая по гидролизу Кбз-Фен-Гис-Лей [2], обнаруживалась в виде 2 хорошо различающихся фракций, одна из которых выходила чуть позже свободного объема (рис. 1). Элюционный объем ее был несколько больше, чем у тиреоглобулина, и соответствовал мол. м. около 600 кД (ВМФ). Вторая фракция имела мол. м. 180—190 кД (низкомолекулярная форма — НМФ). О присутствии в одном препарате 2—3 форм АПФ, сильно различающихся по молекулярной массе, также сообщалось рядом исследователей [12, 20].

Результаты и обсуждение. ВМФ АПФ отщепляла С-концевые дипептиды от брадикинина, ангиотензина I и его С-концевого трипептида Кбз-Фен-Гис-Лей. Скорость гидролиза этих субстратов зависела от концентрации ионов хлора. Специфические пептидные ингибиторы АПФ SQ 20881 (тепротид) и SQ 20475, а также ЭДТА тормозили расщепление этих пептидов; IC₅₀ для тепротида составило $1 \cdot 10^{-8}$ М, для SQ 20475 — $5,7 \cdot 10^{-8}$ М, для ЭДТА — $4 \cdot 10^{-7}$ М.

Соотношение обеих форм АПФ в разных ферментных препаратах варьировало в зависимости от условий их получения и хранения. Содержание ВМФ существенно преобладало при получении препаратов из свежей ткани. Препараты

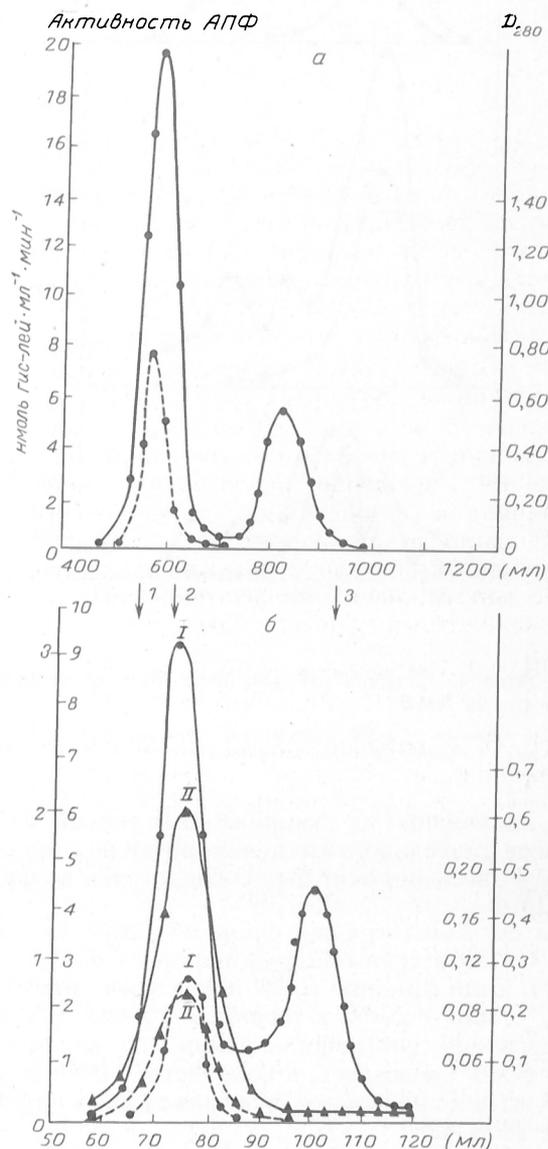


Рис. 1. Разделение 2 форм АПФ.

а — гель-хроматография супернатанта при 26 000 г на сефадексе G-200 (колонка 5,0×90 см) в 0,025 М медиальном буфере pH 7,4 с 0,2 М NaCl; б — рехроматография фракций ВМФ на сефадексе G-200. I — фракции, элюирующиеся с колонки в объеме 500—600 мл (рис. 1, а), были объединены, сконцентрированы ультрафильтрацией над мембраной РМ-30 «Амикон» и вновь нанесены на колонку с сефадексом G-200 (1,6×90 см); II — фракции, элюирующиеся с колонки в объеме 500—600 мл (рис. 1, а), проходили через колонку с аprotинин-агарозой (0,9×2 см), после чего были объединены, сконцентрированы ультрафильтрацией (РМ-30, «Амикон») и нанесены на колонку с сефадексом G-200. Сплошная линия — активность АПФ, нмоль Гис-Лей/мл/мин; пунктир — оптическая плотность при длине волны 280 нм. 1 — голубой декстран; 2 — тиреоглобулин (мол. м. 669 кД); 3 — каталаза (232 кД).

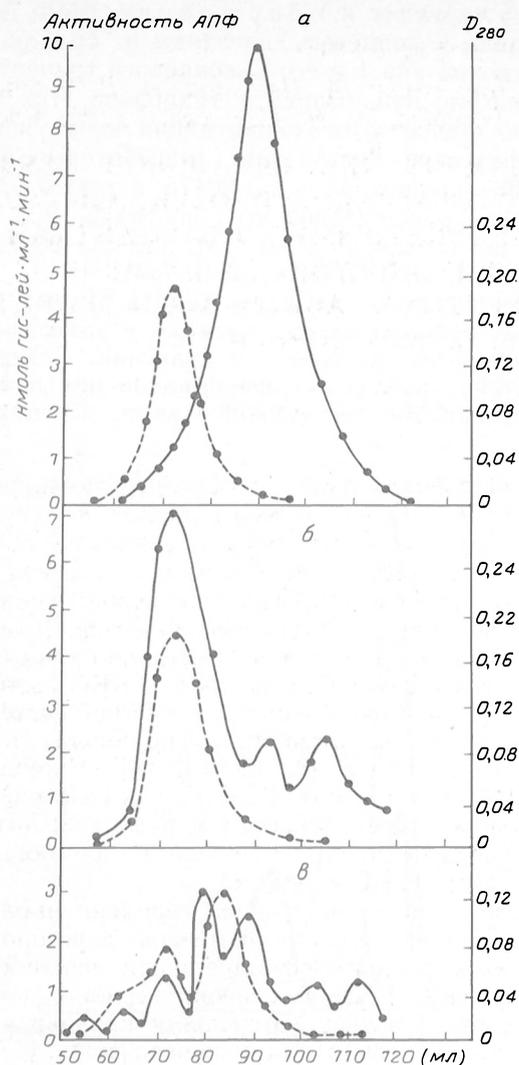


Рис. 2. Влияние трипсина (а), мочевины (б) и дезоксихолата натрия (в) на ВМФ.

Колонка с сефадексом G-200 (1,9×90 см). Фракции ВМФ объединяли (65–70 мл) и концентрировали ультрафильтрацией до 1 мл (РМ-30, «Амикон»).

АПФ, полученные из замороженных тканей, а также после длительного хранения, почти не содержали ВМФ; весь фермент был сосредоточен во фракции НМФ.

При рехроматографии фракций ВМФ на сефадексе G-200 всегда обнаруживалась и НМФ (см. рис. 1). Если фракции ВМФ перед этим хранились при 4 °С или –20 °С в течение 1–2 нед, а также подвергались ультрафильтрации, то количество ВМФ резко снижалось, а количество НМФ возрастало, что, по-видимому, указывало на ее образование из ВМФ.

Торможение активности ВМФ и высокоочищенной формы АПФ производными тепротида и брадикинина

Соединение	IC ₅₀ , мкМ	
	ВМФ	НМФ
(3 Ala) тепротид	0,2	0,1
8 (γ-Ph-Abu*) ВК	38	60
8 (β-Ph-Abu) ВК	3,9	2,0
8 (ε-Ph-Ser) ВК	25	12
	24	23

Примечание. Звездочка — Ph-Abu — фениламино-масляная кислота.

Затормозить образование НМФ и получить препарат ВМФ без примеси НМФ нам удалось с помощью контрикала — ингибитора сериновых протеиназ. Для этого мы использовали иммобилизованный на агарозе апротинин (контрикал). Колонку с иммобилизованным ингибитором (0,9×2,0 см) последовательно соединяли с колонкой с сефадексом G-200. Фракции, содержавшие ВМФ, концентрировали ультрафильтрацией. В этом случае при рехроматографии вся активность АПФ обнаруживалась лишь в высокомолекулярной фракции. Полученный препарат ВМФ был стабилен и не распадался с образованием НМФ ни при гель-фильтрации, ни при хранении (при 4 °С в течение 2 нед, при –20 °С в течение 3 мес), что позволяло думать об участии в процессе образования НМФ из ВМФ эндогенной протеиназы серинового типа.

Высокомолекулярные формы были найдены и для других ферментов: катепсина А [8], пренилтрансферазы печени свиньи [22], гексокиназы мозга крысы [9]. Переход высокомолекулярной формы в более низкомолекулярную при участии эндогенной протеиназы был описан для фосфатазы фосфорилазы мышц кролика [10].

Было исследовано влияние трипсина на препарат ВМФ, который получали с использованием иммобилизованного апротинина. К фракции ВМФ добавляли трипсин (50 мкг на 1 мг белка), выдерживали 24 ч при 4 °С и затем хроматографировали на колонке с сефадексом G-200 (1,6×90 см). Как видно на рис. 2, трипсин вызывал полное исчезновение ВМФ с образованием АПФ с мол. м. 330 кД. Рехроматография фракций с мол. м. 330 кД, а также их хранение (в условиях, описанных выше) не приводили к каким-либо изменениям молекулярной массы и активности фермента. В результате инкубации препарата АМФ в 3 М растворе мочевины (30 мин при 20 °С) в препарате обнаруживали, кроме ВМФ, еще 2 формы АПФ с мол. м. 310 и 180 кД. Воздействие 0,26 % раствора дезоксихолата натрия в течение 2 ч при 20 °С на препарат ВМФ приводило к образованию нескольких форм АПФ с мол. м. 430, 330 и 180 кД.

Было проведено сравнительное исследование торможения активности ВМФ и высокоочищенного АПФ из коры почек быка с мол. м. 190 кД некоторыми аналогами тепротида и брадикинина (см. таблицу).

Вопрос о том, что представляет собой ВМФ АПФ, до сих пор остается открытым, хотя не вызывает сомнений, что это белковый комплекс. Предполагают, что форма АПФ, элюирующаяся со свободным объемом с сефадекса G-200, представляет собой комплекс ВМФ с белками мембран [5]. Сериновая протеиназа, принимающая участие в образовании НМФ на ВМФ, может входить в состав как ВМФ, так и другого высокомолекулярного комплекса, элюирующегося во фракциях ВМФ. Имеются сообщения о существовании мультиталитических комплексов протеиназ с мол. м. 600–700 кД, состоящих из нескольких субъединиц [4, 19, 21]. Присутствие протеиназы в комплексе с ВМФ или в плазматической мембране поблизости от АПФ, по-видимому, играет важную роль в высвобождении низкомолекулярной формы АПФ из комплекса, так как, по нашим данным, образо-

вание НМФ из ВМФ сопровождается увеличением активности препарата. Исследование природы и состава белкового комплекса ВМФ является предметом наших дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Елисева Ю. Е., Орехович В. Н., Павлихина Л. В., Алексеев Л. И. // *Вопр. мед. химии.*— 1970.— Т. 16, № 6.— С. 646—649.
2. Елисева Ю. Е., Орехович В. Н., Павлихина Л. В. // *Биохимия.*— 1976.— Т. 41, № 3.— С. 506—512.
3. Орехович В. Н., Елисева Ю. Е., Павлихина Л. В. // *Вестн. АМН СССР.*— 1976.— № 9.— С. 42—47.
4. Dahlman B., Kueh L., Rutschman M. et al. // *Biochem. J.*— 1985.— VI. 228.— P. 161—170.
5. Das M., Sojfer R. L. // *J. biol. Chem.*— 1975.— Vol. 250, N 17.— P. 6762—6788.
6. Filz A., Overturf M. // *Ibid.*— 1974.— Vol. 247, N 2.— P. 581—584.
7. Hara A., Fukuyama K., Epstein W. L. // *J. invest. Derm.*— 1982.— Vol. 78, N 6.— P. 503—507.
8. Kawamura Y., Maloba T., Hata T., Doi E. // *J. Biochem.*— 1974.— Vol. 76.— P. 915—924.
9. Kimura H., Gourleu D. R. H. // *Biochim. biophys. Acta.*— 1974.— Vol. 314.— P. 157—161.
10. Mellgren R. L., Aylward J. H., Killilea S. D., Lee Y. C. // *J. biol. Chem.*— 1979.— Vol. 264, N 3.— P. 648—652.
11. Nakajima T., Oshima G., Yeh H. S. J. et al. // *Biochim. biophys. Acta.*— 1973.— Vol. 315.— P. 430—438.
12. Nishimura K., Yoshida N., Hiiwada K. et al. // *Ibid.*— 1977.— Vol. 483.— P. 398—408.
13. Nishimura K., Hiiwada K., Ueda E., Kokubu T. // *Ibid.*— 1976.— Vol. 452.— P. 144—150.
14. Nishimura K., Yoshida N., Hiiwada K. et al. // *Ibid.*— 1978.— Vol. 522.— P. 229—237.
15. Ondelli M. A., Cushman D. W. // *Ann. Rev. Biochem.*— 1982.— Vol. 51.— P. 283—308.
16. Oshima G., Gecse A., Erdos E. G. // *Biochim. biophys. Acta.*— 1974.— Vol. 350.— P. 26—37.
17. Soubrier F., Alenc-Gelas F., Hubert C. et al. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.*— 1988.— Vol. 85.— P. 9386—9390.
18. Stevens R. L., Micallizzi E. R., Fessler D. C., Pals D. T. // *Biochemistry (Wash.).*— 1972.— Vol. 11, N 16.— P. 2999—3007.
19. Tanaka K., Yoshimura T., Kumatori A. et al. // *J. biol. Chem.*— 1988.— Vol. 263, N 31.— P. 16209—16217.
20. Tani M., Mazunok K., Hashimoto S. et al. // *Life Sci.*— 1986.— Vol. 38.— P. 2277—2284.
21. Wilk S., Orłowski M. // *J. Neurochem.*— 1983.— Vol. 40.— P. 842—849.
22. Yeh L.-S., Rilling H. C. // *Arch. Biochem.*— 1977.— Vol. 183.— P. 718—725.

Поступила 20.09.93

INVOLVEMENT OF SERINE PROTEINASE IN TRANSFORMATION OF HIGH MOLECULAR (600 kDa) ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME INTO ITS LOW MOLECULAR FORM (190 kDa)

E. V. Kugaevskaya, [L. V. Pavlikhina], Yu. E. Eliseeva

Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow.

A high molecular form of angiotensin-converting enzyme with molmass about 600 kDa was found simultaneously with the well-known low molecular enzyme form of 190 kDa after fractionation of freshly prepared extracts from bovine kidney cortex and lung tissues by means of ammonium sulfate or gel filtration on Sephadex G-200. The rate of substrate hydrolysis was adequately Cl⁻-dependent for both these enzyme forms and specific inhibitors nonapeptide SQ 20881 and pentapeptide SQ 20475 inhibited similarly their activity. The enzyme high molecular form transformed into its low molecular derivative after storage, in freezing-thawing and ultrafiltration. Aprotinin, the inhibitor of serine proteinases, inhibited this kind of transformation. Stable form of the high molecular angiotensin-converting enzyme, which did not transform into its low molecular derivative, was obtained after treatment with agarose-immobilized aprotinin. Endogenous serine proteinases, which may regulate the angiotensin-converting activity *in vivo*, appears to be responsible for the enzyme transformation into its low molecular derivative.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 616.155.1-008.931:577.152.34]-07

В. Л. Доценко, Е. А. Нешкова, И. В. Чеботарь, И. В. Чельшев, А. Н. Маянский, Г. А. Яровая

СЕКРЕТИРОВАНИЕ СЕРИНОВОЙ СВЯЗАННОЙ С МЕМБРАНОЙ ПРОТЕИНАЗЫ ПОЛИМОРФНОЯДЕРНЫМИ ЛЕЙКОЦИТАМИ В УСЛОВИЯХ АДГЕЗИИ НА РАЗЛИЧНЫХ ТИПАХ РЕЦЕПТОРЗАВИСИМЫХ И РЕЦЕПТОР-НЕЗАВИСИМЫХ СОРБЕНТОВ

Центральный институт усовершенствования врачей, Москва, Нижегородский медицинский институт

Вопрос о факторах, активирующих калликреин-кининовую систему (ККС) плазмы крови при воспалении, до настоящего времени не решен. Между тем ответ на этот вопрос существен при анализе патогенеза многих заболеваний, связанных с воспалением (травма, перитонит, септицемии, язвенная болезнь желудочно-кишечного тракта, панкреатит и др.), так как ККС является ключевой плазменной протеолитической системой, регулирующей свертывание, фибринолиз и систему комплемента [8, 12, 13, 18]. Нарушение регулирующих свойств ККС при патологических состояниях может привести к ряду нежелательных последствий, в том числе к тромбогеморагическим осложнениям.

Сделанными до настоящего времени наблюдениями в этой области намечена двусторонняя связь между полиморфноядерными лейкоцитами и ферментами ККС. Так, неопровержимо доказано участие фактора Хагемана и калликреина в активации и дегрануляции нейтрофилов [17, 27, 28]. В отношении обратной связи лейкоцит — фермент ККС вопрос осложняется неоднозначностью результатов воздействия лейкоцитарных ферментов. С одной стороны, имеются данные об активирующем влиянии обогащенных базофилами лейкоцитов по иммуноглобулин (Ig) E-зависимому механизму на фактор Хагемана (XII фактор системы свертывания крови) [22, 23] и прекалликреин [9], а также о присутствии во внешней плазматической мембране нейтрофила сериновой протеиназы трипсинового типа, активирующей фактор Хагемана [10]. С другой стороны, эластаза и катепсин G — сериновые протеиназы из азурофильных гранул нейтрофилов — инактивировали фактор Хагемана и его активные формы. Эластаза, кроме этого, инактивировала также прекалликреин и калликреин [10].

Выполняя данную работу, мы ставили перед собой две основные задачи: получить сведения о том, способен ли активированный нейтрофил секретировать упомянутую выше мембранную сериновую протеиназу во внеклеточную среду; изучить последовательность секреторной деятельности нейтрофила по динамике активностей мембранного и гранулярных ферментов во внеклеточной инкубационной среде.

Для решения этих задач была выбрана схема активации нейтрофилов на рецепторзависимых (иммобилизованных IgG и C3b) и рецепторнезависимых (гидрофобных и положительно заряженных) сорбентах.

Методика. Выделение нейтрофилов человека. Нейтрофилы выделяли из периферической гепаринизированной венозной крови здоровых людей путем центрифугирования в градиенте плотности фиколл—верографин [4]. После отмывания клеток их суспендировали в растворе Хенкса с 0,1 % раствором альбумина человека ("Reanal", Венгрия). В изолированной фракции нейтрофилы составляли более 98 %, их жизнеспособность (по трипановому тесту) — более 96 %.

Приготовление иммобилизованных IgG- и C3b-активаторов. В качестве IgG-активатора использовали ковалентно связанные с сефарозой 4В ("Pharmacia Fine Chem.", Швеция) агрегированные иммуноглобулины IgG. Этот класс Ig выделяли из коммерческого препарата Ig человека путем ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-тояполе ("Toya Soda", Япония) [1]. Степень очистки препарата контролировали иммуноэлектрофорезом. Агрегацию IgG, находящихся в 0,01 М фосфатном буфере (10 мг/мл), проводили термической обработкой препарата (63 °С, 30 мин). CN-бромирование сефарозы и ее конъюгацию с IgG проводили согласно рекомендациям фирмы-изготовителя — "Pharmacia Fine Chem.". Концентрацию белка в конъюгате определяли методом, изложенным в работе [19]. В различных препаратах концентрация Ig составляла 5,0—6,1 мг на 1 мл геля. C3b-зависимую активацию нейтрофилов изучали в системе с сефадексом G-25 "Fine" ("Pharmacia Fine Chem."), конъюгированным с C3b-фактором комплемента. В данном случае была использована способность декстрана активировать комплемент по альтернативному пути (через C3b-компоиент), образуя ковалентную связь с C3b-фрагментом [20]. Конъюгация C3b-фрагмента проходила в геле сефадекса (0,1 г/мл по сухой массе геля), смешанном в равном объеме с пулом сывороток 40 доноров и инкубированном в течение 30 мин при 37 °С. Нековалентно связанные компоненты удаляли промыванием геля 2 М раствором NaCl, прогретым до 100 °С в течение 15 мин [26].

Положительно заряженный гидрофильный сорбент. ДЭАЭ-сефадекс А-25 ("Pharmacia Fine Chem.") служил контролем в отношении активации нейтрофилов (кислородзависимого метаболизма) IgG-сефарозой и C3b-сефадексом. Гранулы ионообменника перед употреблением выдерживали в растворе Хенкса на кипящей водяной бане, после чего отмывали 3 объемами того же раствора.

Гидрофобный активатор — гранулы полиметилметакрилата (ПММА) диаметром 60—100 мкм — не нуждался в предварительной обработке.

Оценка адгезии клеток и получение продуктов активированных нейтрофилов. Взвесь гранул сорбента и нейтрофилов инкубировали в равных объемах (по 0,5 мл) при 37 °С в течение, как правило, 15 и 30 мин, в некоторых экспериментах в течение 5 мин. В 0,5 мл надосадочной жидкости определяли активность лейкоцитарных ферментов. В опытах с IgG-сефарозой и C3b-сефадексом концентрация нейтрофилов составляла $6 \cdot 10^6$ клеток/мл, в опытах с ПММА и ДЭАЭ-сефадексом — $3 \cdot 10^6$ клеток/мл. Сорбенты использовали в концентрациях: $20 \cdot 10^3$ гранул/мл (IgG-сефа-

роза, C3b- и ДЭАЭ-сефадекс) и 60 мг/мл (ПММА). Такое соотношение гранул сорбентов и нейтрофилов обеспечивало примерно одинаковое количество адгезированных клеток во всех пробах (количество гранул с 3 клетками и более достигало 60—70 %) [2, 5].

Оценка стимуляции кислородзависимого метаболизма нейтрофилов. О степени активирования лейкоцитов при контакте с различными сорбентами судили по интенсивности люминолзависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ). ЛЗХЛ регистрировали на жидкостно-стинцилляционном счетчике «Бета-1» (Киевское производственное объединение «Медаппаратура»). К 1 мл клеточной взвеси ($5 \cdot 10^5$ клеток/мл) в растворе Хенкса с 0,1 % альбумином человека добавляли люминол («Рехим», Ереван), инкубировали 15 мин при 37 °С, после чего добавляли по 0,1 мл одного из сорбентов (концентрация гранул IgG-сефарозы, C3b- и ДЭАЭ-сефадекса составляет $2 \cdot 10^5$ на 1 мл, ПММА — $2 \cdot 10^4$ на 1 мл). ЛЗХЛ измеряли на протяжении 90 мин через равные интервалы времени. Результаты выражали в импульсах в 1 мин.

Определение ферментативных активностей. Об активности лейкоцитарной мембранной сериновой протеиназы (ЛМП) судили по ее БАЭЭ-эстеразной активности (N- α -бензоил-аргинии этиловый эфир) [10]. Для этого к 0,1—0,2 мл инкубационной жидкости добавляли 1,9—1,8 мл 0,05 М трис-HCl-буфера pH 8,0, 1 мл $1,5 \cdot 10^{-3}$ М раствора БАЭЭ, после чего измеряли прирост оптической плотности в течение 1—2 мин непосредственно сразу после добавления в пробу 0,1 мл фармакологического препарата тканевого ингибитора протеиназ из органов быка (гордокс — «Гедеон Рихтер», Венгрия, трасилол — «Байер», Германия).

О дегрануляционной секреции азурофильных гранул активированных лейкоцитов судили по появлению эластазоподобной и химотрипсиноподобной активностей. Эластазоподобную активность определяли по скорости гидролиза MeoSucAlaAlaProValpNA (метоксисуцинил-AlaAlaProVal-пара-нитроанилида) в 50 мкл инкубационной жидкости, результат относили к 1 мл инкубационной среды [21]. Активность выражали числом наномолей данного субстрата, расщепленных ферментом за 1 мин. О химотрипсиноподобной активности катепсина G в инкубационных средах судили по скорости расщепления N- α -бензоил-тирозин этилового эфира (БТЭЭ) и результат относили к 1 мл среды [16]. Активность выражали в наномолях в 1 мин на 1 мл. О концентрации белка в инкубационных средах судили по результатам определений методом [7].

Результаты и их обсуждение.
Активация кислородного метаболизма нейтрофилов при их контакте с сорбентами. Сорбция нейтрофилов на IgG-сефарозе и C3b-сефадексе сопровождалась значительной активацией ЛЗХЛ, достигающей пика через 10—15 мин после начала активации при совместной инкубации сорбентов с клетками (рис. 1). По прошествии 70—90 мин хемилюминесценция снижалась до исходного уровня. C3b-опосредованная ЛЗХЛ была более выражена, чем связанная с активацией FcyR (ре-

цепторов к Fc-участкам IgG) на поверхности клеток. Взаимодействие клеток с гидрофобной поверхностью ПММА и положительно заряженной поверхностью ДЭАЭ-сефадекса практически не увеличивало уровень их ЛЗХЛ.

Ферментный протеолитический спектр инкубационной среды IgG- и СЗb-активированных нейтрофилов. Инкубация нейтрофилов с IgG-сефарозой и СЗb-сефадексом в течение 15 и 30 мин и связанная с этим рецепторзависимая активация нейтрофилов приводила к появлению в инкубационной среде довольно сложного спектра протеолитической активности. На рис. 2 представлена активность сериновых протеиназ, выраженная в единицах, соответствующих скорости расщепления специфических субстратов: MeOSucAlaAlaProValpNa — амидазная (эластазоподобная), БТЭЭ-эстеразная (химотрипсиноподобная), появление которой мы рассматривали как секрецию катепсина G, и БАЭЭ-эстеразная (трипсиноподобная) активность. В составе последней активности можно было ожидать появление мембранной сериновой протеиназы (ЛМП). Данные, представленные на рисунке, свидетельствуют о том, что эластазоподобная активность в инкубационных средах была близка к нулю при всех видах активации клеток и в течение всего периода инкубации. Химотрипсиноподобная активность присутствовала в инкубатах с IgG-активатором через 15 мин после начала активации в очень незначительном количестве (65 ± 20 нмоль/мин·мл); 30-минутная инкубация увеличивала эту активность более чем в 3 раза.

СЗb-зависимая адгезия более заметно, чем IgG-зависимая, стимулировала нейтрофилы к секреции химотрипсиноподобной активности. Инкубация с этим сорбентом в течение 15 мин приводила к появлению во внесклеточной среде около 200 нмоль/мин/мл активности. Правда, увеличения секреции при более длительной инкубации клеток не отмечали.

При адгезии к гидрофобной и положительно заряженной поверхности (рис. 2) в инкубационной среде через 30 мин инкубации оказалось примерно одинаковое количество БТЭЭ-эстеразы, хотя при 15-минутной инкубации активность при гидрофобной активации значительно превышала активность в пробе с положительно заряженным сорбентом (194 ± 69 и $43,8$ нмоль/мин·мл соответственно).

Максимальную трипсиноподобную (БАЭЭ-эстеразную) активность в инкубатах клеток, активированных СЗb-адгезией, обнаруживали уже через 5 мин после начала инкубации (491 ± 55 нмоль/мин·мл). Более длительная инкубация нейтрофилов с этим активатором почти не изменяла эту величину. Активация, индуцированная Fcγ-рецепторами, через 15 мин после начала приводила к появлению еще более высокой БАЭЭ-эстеразной активности (400—700 нмоль/мин·мл). Адгезия к гидрофобной поверхности имела следствием также более быструю и интенсивную секрецию БАЭЭ-эстеразы, чем химотрипсиноподобной активности (300—400 нмоль/мин·мл). Наконец, адгезия к положительно заряженной поверхности слабо активировала секрецию БАЭЭ-эстеразы (134 ± 32 нмоль/мин·мл).

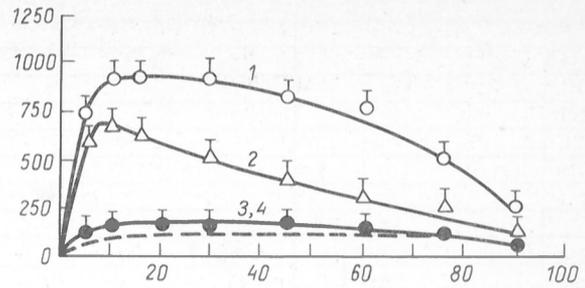


Рис. 1. ЛЗХЛ нейтрофилов, активированных в результате рецепторзависимой (на СЗb-сефадексе — 1) и IgG-сефарозе — 2) и рецепторнезависимой (на ДЭАЭ-сефадексе — 3 и ПММА — 4) адгезии клеток.

По оси абсцисс — время, мин; по оси ординат — ЛЗХЛ, имп/мин. Штриховая линия — реакция неактивированных лейкоцитов.

Определение латентной формы мембранной сериновой протеиназы (ЛМП) в секрете активированных нейтрофилов. В предыдущей работе [10] мы показали, что в белковом экстракте мембранной фракции, полученной методом [29], содержится БАЭЭ-эстераза, способная активировать фактор Хагемана человека и обладающая кининопептидной активностью. Субклеточное фракционирование нейтрофилов подтвердило наличие высокой БАЭЭ-эстеразной активности в плазматической мембране клеток и полное отсутствие этой активности в гранулярной фракции.

Мембранная протеиназа, проявляющая названные выше активности, имела необычное для протеолитических ферментов свойство: ее активность по аргининовым эфирам и трипептидным нитроанилидам резко возрастала при внесении в пробу щелочного ингибитора протеиназ из органов быка (трасилола, контрикала и гордокса), а также сульфата протамина и щелочной фракции амфолинов (pH 7,0—9,0). Фермент активировался также под действием плазменного калликрина [10].

Свойство латентной мембранной протеиназы увеличивать свою активность под действием катионных молекул трасилола послужило маркер-

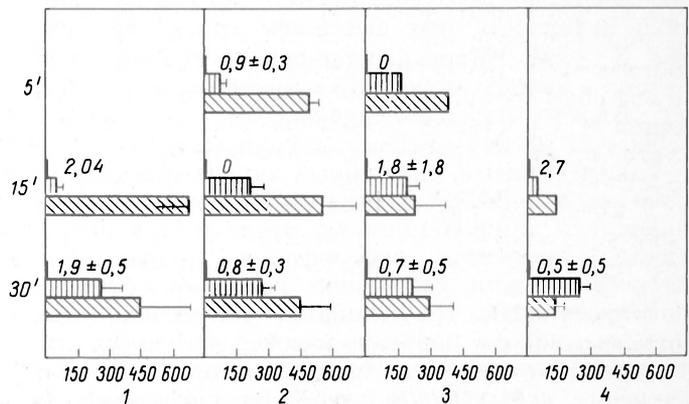


Рис. 2. БАЭЭ-эстеразная (косая штриховка), эластазоподобная (темные столбики) и химотрипсиноподобная (горизонтальная штриховка) активность (в нмоль/мин/мл) инкубационных сред активированных нейтрофилов при 5-, 15- и 30-минутной инкубации клеток с сорбентами. Представлены результаты 3—7 определений.

1 — IgG-зависимая адгезия; 2 — СЗb-зависимая адгезия; 3 — адгезия к гидрофобной поверхности (ПММА); 4 — адгезия к положительно заряженной поверхности (ДЭАЭ-сефароза).

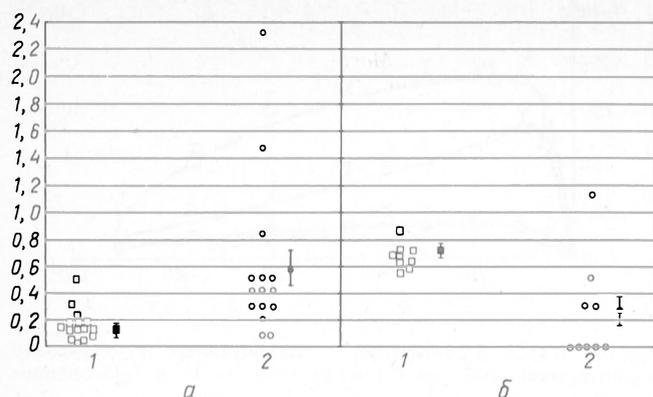


Рис. 3. Выявление активной и латентной форм ЛМП в составе БАЭЭ-эстеразной активности инкубационной среды активированных лейкоцитов. Исходная активность: *a, 1* — от 0 до 500 мЕ/мл, *б, 1* — выше 500 мЕ/мл; активность после действия трасилола: *a, 2* и *б, 2*.

ным признаком для выявления этой протеиназы в инкубационной среде активированных нейтрофилов.

На рис. 3 представлены величины БАЭЭ-эстеразной активности секретов, активированных как специфической, так и неспецифической адгезией нейтрофилов, и их изменение под действием трасилола. Поскольку исходная (до действия активатора) активность колебалась в очень больших пределах (40—800 нмоль/мин·мл), что могло быть следствием присутствия в секрете уже активированной мембранной протеиназы, мы разделили всю группу значений БАЭЭ-эстеразной активности на две подгруппы: в подгруппу *a* вошли 15 значений с относительно низкими показателями исходной активности (в пределах 40—500 нмоль/мин·мл) (см. рис. 3, *a*), в подгруппу *б* — 9 значений высоких активностей (в пределах 500—820 нмоль/мин·мл) (см. рис. 3, *б*).

Под действием поликатионных молекул трасилола БАЭЭ-эстеразная активность секретов в подгруппе *a* возросла почти в 4 раза (со 158 ± 26 до 587 ± 11 нмоль/мин·мл) (см. рис. 3, *a, 2*). Образцы секретов с активностями более 500 нмоль/мин·мл (подгруппа *б*) не увеличивали свои активности под действием трасилола (см. рис. 3, *б, 2*). Напротив, добавление 0,1 мл ингибитора в кювету приводило к быстрому снижению их БАЭЭ-эстеразной активности (в среднем с 686 ± 27 до 244 ± 110 нмоль/мин·мл).

Таким образом, маркерный тест с трасилолом показал, что БАЭЭ-эстеразная активность, появляющаяся в инкубационной среде уже в самом начале активации нейтрофилов, обусловлена, хотя бы отчасти, секрецией клетками мембранной протеиназы. На основании полученных данных мы можем полагать также, что часть латентной протеиназы активируется либо в момент секреции нейтрофилом, либо непосредственно в инкубате, поскольку латентная форма ЛМП не обнаруживалась именно в высокоактивных образцах. Интересно в этой связи отметить, что уровень активности образцов в группе *a* под действием трасилола (587 ± 11 нмоль/мин·мл) лишь незначительно отличался от исходной активности образцов в подгруппе *б* (686 ± 27 нмоль/мин·мл). На основании этого наблюдения можно пред-

положить, что во всех образцах активированных нейтрофилов наблюдался примерно одинаковый уровень секреции латентной мембранной сериновой протеиназы. Однако при рецепторзависимой адгезии (высокий уровень БАЭЭ-эстеразы), очевидно, во внеклеточную среду высвобождался какой-то активатор, переводящий мембранную протеиназу из латентной в активную форму. Такими активаторами, имея в виду свойство ЛМП активироваться поликатионными молекулами, могли быть катионные белки и катионные пептиды (дефенсины) [24].

Безусловно, тщательный анализ инкубационных сред активированных лейкоцитов позволит определить долю мембранной протеиназы среди других трипсиноподобных протеиназ, секретируемых нейтрофилом. В составе инкубационных сред в начальном и последующем периодах активации может содержаться активатор плазминогена, который секретируется под действием низких концентраций формильных пептидов до появления во внеклеточной среде лейкоцитарной эластазы [15].

Итак, рецепторзависимая адгезия нейтрофилов, активирующая клетки через CR1, CR3 [25] и несколько вариантов Fcγ-рецепторов [11], приводит к интенсивной секреции БАЭЭ-эстеразной активности, обусловленной в определенной мере секрецией мембранной трипсиноподобной протеиназы как в латентной, так и в активированной форме. Эта активность предшествует появлению сколько-нибудь значимых величин химотрипсиноподобной активности, которое может быть связано с началом процесса дегрануляции лейкоцитов и освобождения в инкубате катепсина G, хотя, по данным литературы [14], дегрануляция происходит лишь при сочетанной активации клеток иммобилизованными IgG и C3b. Более активно (уже через 15 мин) процесс освобождения тирозинэстеразной активности наблюдался при C3b-, чем при IgG-адгезии, хотя в течение 30 мин активации на всех видах сорбентов уровень химотрипсиноподобной активности во внеклеточной среде выравнивался.

Если рассматривать появление химотрипсиноподобной активности в инкубатах как начало дегрануляционных процессов в активированных нейтрофилах, остается непонятной причина очень низкой активности эластазы в тех же инкубационных средах, поскольку установлена локализация этих ферментов в одних и тех же азурофильных гранулах [6]. В исследованных нами инкубатах клеток с различными активаторами и различным временем инкубации эластазоподобная активность практически не определялась.

Данные, представленные в настоящей работе, подтверждают высказанное ранее предположение о существовании начальной стадии активации нейтрофила, способствующей продуктивной активации ККС плазмы крови [10]. Действительно, мембранная протеиназа, обладающая особым свойством активироваться поликатионными молекулами, была обнаружена в инкубатах нейтрофилов, имевших краткий адгезивный контакт не только с иммобилизованными C3b и IgG, но и с гидрофобной и положительно заряженной поверхностями. Как было показано ранее, данная

протеиназа обладает кининогеназной активностью и активирует фактор Хагемана (XII фактор системы свертывания крови). Таким образом, именно эта протеиназа могла бы осуществлять регулирующее воздействие на ККС при всех патологических состояниях, сопровождающихся реакцией воспаления.

Если анализировать уровень и время секреции трипсино- и химотрипсиноподобной активности, а также ЛЗХЛ клеток, то можно заметить, что возбуждение нейтрофилов через разные поверхностные структуры выражено неодинаково и отличается не только по количественным, но и по качественным параметрам. Это может быть связано с особенностями медиаторных узлов клетки, которые передают на эффекторные органеллы внешнее раздражение, определяя различные варианты функциональной перестройки стимулированных клеток. Такого рода дискретность возбуждения клеток, подвергнутых действию различных стимулов, нашла в наших опытах выражение не только в секреции ферментов на фоне полного отсутствия возбуждения респираторного взрыва (опыты с заряженным и гидрофобным сорбентами), но и в особенностях секреции различных протеиназ при равноценной активации кислородзависимого метаболизма (опыты с IgG- и C3b-зависимой адгезией). Ранее одним из авторов данной работы было обосновано положение о диссоциации реактивного потенциала нейтрофилов, который может быть индуцирован *in vitro* или возникает непосредственно в организме под влиянием различных кондиционирующих факторов [3]. Результаты настоящей работы иллюстрируют это положение на конкретных примерах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Брок И. // Иммунологические методы: Пер. с нем.— М., 1979.— С. 266—273.
2. Маянский А. Н., Чеботарь И. В., Коньшикина Т. М. // Иммунология.— 1989.— № 3.— С. 55—58.
3. Маянский А. Н. // Успехи соврем. биол.— 1990.— Т. 109.— С. 90—105.
4. Подосинников И. С., Нилова Л. Г., Бабиченко И. В. и др. // Лаб. дело.— 1981.— № 8.— С. 468—470.
5. Чеботарь И. В., Коньшикина Т. М. // Моделирование и клиническая характеристика фагоцитарных реакций / Под ред. А. Н. Маянского.— Горький, 1983.— С. 212—219.
6. Baggiolini M., Dewald B. // Contemp. Top. Immunobiol.— 1984.— Vol. 14.— P. 221—246.
7. Bradford M. // Analyt. Biochem.— 1976.— Vol. 72.— P. 248—254.
8. Colman R. W. // J. clin. Invest.— 1984.— Vol. 73.— P. 1249—1254.
9. Dolsenko V. L., Nenasheva N. M., Neshkova E. A. et al. // Advanc. exp. Med. Biol.— 1989.— Vol. 247.— Pt B.— P. 515—521.
10. Dolsenko V. L., Neshkova E. A., Yarovaya G. A. // Agents Actions.— 1992.— Vol. 38, N 2.— Suppl.— P. 144—156.
11. Fleit H. B., Wright S. D., Unkeless J. C. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1982.— Vol. 79.— P. 3275—3279.
12. Ghebrehwal B., Silverberg M., Kaplan A. P. // J. exp. Med.— 1981.— Vol. 153.— P. 665—676.
13. Goldsmith G. H. // J. Lab. clin. Med.— 1980.— Vol. 96.— P. 564—566.
14. Goldstein J. M., Kaplan H. B., Radin A., Frosch M. // J. Immunol.— 1976.— Vol. 117.— P. 1282—1287.
15. Granelly-Piperno A., Vassali J. D., Reich E. // J. exp. Med.— 1977.— Vol. 146.— P. 1693—1706.
16. Kang S.-H., Fuchs M. S. // Analyt. Biochem.— 1973.— Vol. 54.— P. 262—265.
17. Kaplan A. P., Kay A. B., Austen K. F. // J. exp. Med.— 1972.— Vol. 135.— P. 81—97.
18. Kaplan A. P., Meier H. L., Mandle R. // Semin. Thromb. Hemostas.— 1976.— Vol. 3.— P. 1—26.
19. Koelsch R., Lasch J., Marguard J., Hanson H. // Analyt. Biochem.— 1975.— Vol. 66.— P. 556—567.
20. Muller-Eberhard H. J., Schreiber R. D. // Advanc. Immunol.— 1980.— Vol. 29.— P. 1—53.
21. Nakajima K., Powers J. C., Ashe B. B., Zimmerman M. // J. biol. Chem.— 1979.— Vol. 254.— P. 4027—4032.
22. Newball H. H., Talamo R. C., Lichtenstein L. // Nature.— 1975.— Vol. 254.— P. 635—636.
23. Newball H. H., Rewak S. D., Cochrane C. G. et al. // Advanc. exp. Med. Biol.— 1979.— Vol. 120.— Pt B.— P. 139—152.
24. Rice W. G., Ganz T., Kinkade J. M. et al. // Blood.— 1987.— Vol. 70.— P. 757—765.
25. Ross G. D., Medof M. E. // Advanc. Immunol.— 1985.— Vol. 37.— P. 217—267.
26. Stosel Th. P., Field R. J., Gillin J. D. et al. // J. exp. Med.— 1975.— Vol. 141.— P. 1329—1347.
27. Wachtfogel Y. T., Kucich U., James H. J. et al. // J. clin. Invest.— 1983.— Vol. 72.— P. 1672—1677.
28. Wachtfogel Y. T., Pixley R. A., Kucich U. et al. // Blood.— 1986.— Vol. 67.— P. 1731—1737.
29. Wintroub B. U., Coetzi E. J., Austen K. F. // Immunology.— 1977.— Vol. 33.— P. 41—50.

Поступила 25.05.93

ADHESION-DEPENDENT SECRETION OF THE MEMBRANE-BOUND SERINE PROTEINASE BY HUMAN POLY-MORPHONUCLEAR ON VARIOUS TYPES OF RECEPTOR-DEPENDENT AND NONRECEPTOR-DEPENDENT SORBENTS

V. L. Dolsenko, E. A. Neshkova, I. V. Chebotar, I. V. Chelyshev, A. N. Mayansky, G. A. Yarovaya

Central Institute for Postgraduate Training of Physicians, Moscow.

A high level of the membrane-bound proteinase (LMP) secretion by human polymorphonuclear leukocytes (up to 680 nmol/min/ml with N-benzoyl-L-arg-EE as a substrate) was shown during the cell adhesion to receptor-dependent (immobilized aggregates of IgG and C_{3b}) and receptor-independent (DEAE-Sephadex and polymethyl methacrylate) adsorbents. Incubation medium contained 6·10⁶ cells/ml. The rate of secretion reached the maximal level during 15 min although its level was already high to the 5 min of C_{3b}- and hydrophobic surface-induced activation (491±55 and 382 nmol/min, respectively). The high level of LMP secretion coincided with the peak of luminol-dependent chemoluminescence during the receptor-dependent adhesion, but did not correlate with a low level of luminescence in the receptor-independent adhesion. Localization of LMP in latent form in neutrophil membrane was shown earlier; the enzyme activation may occur due to effect of polycationic molecules of bovine tissue proteinase inhibitor of Kunitz type, protamine sulfate, alkaline fraction of ampholines. The enzyme (with BAEE as a substrate) was identified as serine proteinase of the trypsin-like type which activated Hageman factor (the XII factor of clotting system) and demonstrated the kininogenase activity. Only slight elastase-like activity was detected after incubation of neutrophils with all the adsorbents studied (0—2 nmol/min/ml with MeOSucAlaAlaProValpNA as a substrate). Chymotrypsin-like activity achieved maximum only by 30 min of activation with all the types of adsorbents (up to 270 nmol/min/ml with N-benzoyl-Tyr-EE as a substrate); this suggests impairment of azurophilic granules and appearance of cathepsin G. The results, demonstrating the time-dependent sequence of LMP and granule enzyme secretion by activated neutrophil, suggest that the initial activating effect of LMP on the kallikrein-kinin and other blood plasma proteinase systems occurred due to Hageman factor activation. The first activating phase may be followed by destructive effect of granule enzymes on blood plasma Hageman factor, prekallikrein and their active forms followed by thrombhemorrhage complications during inflammation.

Г. А. Яровая, Н. А. Коровина, М. П. Магомедова

КАЛЛИКРЕИН-КИНИНОВАЯ СИСТЕМА И ИНГИБИТОРЫ ПРОТЕОЛИЗА ПЛАЗМЫ КРОВИ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ НЕФРОПАТИЯХ У ДЕТЕЙ

Центральный институт усовершенствования врачей, Москва

Особое значение в процессе адаптации и защиты организма, а также при определенных условиях в патогенезе различных заболеваний принадлежит протеолитическим системам тканей и плазмы крови. В плазме крови ключевая роль в регуляции активности систем гемокоагуляции, фибринолиза, комплемента и ренин-ангиотензиновой системы отводится калликреин-кининовой системе (ККС).

Компоненты ККС одними из первых реагируют на повреждение и участвуют в развитии воспалительной реакции. Калликреин (К) освобождает биологически активные пептиды — кинины, которые являются медиаторами воспаления и оказывают мощное гипотензивное действие. Кроме того, К вызывает хемотаксис и агрегацию нейтрофилов [10], освобождает эластазу [11], активирует латентную форму коллагеназы нейтрофилов [9]. Активность К и других протеиназ регулируется с помощью специальных белков — серпинов — ингибиторов сериновых протеиназ, среди которых в наибольшем количестве в плазме крови присутствует α_1 -антитрипсин (АТ), основная функция которого — инактивация нейтрофильной эластазы, и α_2 -макроглобулин (МГ), связывающий тромбин, плазмин, К, эластазу и другие протеолитические ферменты. Не вызывает сомнения, что нарушение баланса между протеолитическими ферментами и их ингибиторами приводит к развитию различных патологических процессов (шока, ДВС-синдрома, различных заболеваний воспалительного характера, деструкции тканей).

Изменение состояния ККС, выявленное при почечной патологии у взрослых, свидетельствует об участии ее компонентов в развитии и прогрессировании различных заболеваний почек [1—5]. В ряде работ отмечено угнетение ККС почек при некоторых нефропатиях. При этом плазменная ККС при данных заболеваниях, как правило, активируется [4, 6, 8]. В педиатрии имеются данные о состоянии ККС крови при гломерулонефрите. При тубулоинтерстициальных заболеваниях почек и при дизметаболических нефропатиях состояние

ККС и ингибиторов протеиназ крови практически не исследовано.

Настоящая работа проведена с целью изучения состояния ККС и ингибиторов протеиназ крови у детей, страдающих различными нефропатиями с преимущественным поражением интерстициальной ткани и канальцевого аппарата почек. Поскольку до сих пор не выявлены особенности патогенетических процессов при тубулоинтерстициальном нефрите (ТИН) и пиелонефрите (ПН), была предпринята попытка выявить возможные черты сходства в патогенезе воспалительного процесса при данных заболеваниях.

Методика. Под наблюдением находилось 30 больных ПН, 24 — ТИН, 15 — дизметаболической нефропатией (ДН). Возраст больных от 4 до 14 лет. Обследования проводили при различной активности ТИН: в стадии высокой активности процесса, стихания и клинико-лабораторной ремиссии. Высокая активность характеризовалась наличием симптомов интоксикации, выраженными изменениями со стороны общих и биохимических показателей мочи. Больных ПН обследовали при умеренной активности процесса, проявляющейся лишь мочевым синдромом в виде лейкоцитурии, следовой протеинурии и кристаллурии, и в стадии ремиссии. Детей, страдающих ДН, обследовали в период наличия изменений в моче (протеинурия и эритроцитурия различной степени, выраженная кристаллурия) и при отсутствии этих изменений.

Во избежание контактной активации ККС кровь для исследования вносили в пластиковые пробирки. Взятие крови осуществляли утром натощак из кубитальной вены. К и прекалликреин (П) отделяли от других сериновых протеиназ с помощью ионообменной хроматографии и определяли К, П (после активации) и общую эстеразную активность (ОЭА) плазмы крови спектрофотометрическим методом по скорости гидролиза N-бензоил-L-аргинин этилового эфира [2, 3]. Об антитриптической емкости плазмы крови судили по уровню АТ и МГ, который оценивали унифицированным спектрофотометрическим методом [1]. В качестве контроля были использованы данные, полученные при обследовании соматически здоровых детей, поступивших на плановое оперативное лечение по поводу косоглазия и паховых грыж.

Результаты и обсуждение. Данные о состоянии компонентов ККС в активной стадии ТИН и ПН свидетельствуют об активации этой системы, о чем можно судить по статистически достоверному повышению активности К и ОЭА ($p < 0,05$). Средний уровень П оставался в пределах нормы. Однако некоторое повышение уровня

Таблица 1

Состояние ККС и уровень ингибиторов протеиназ при различных нефропатиях в зависимости от давности заболевания

Группа обследованных	Число обследованных	К	П	АТ	МГ	ОЭА
Больные острым ТИН	9	53,3±3,5*	377,7±36,5	41,9±4,8*	3,04±0,27*	418,8±50,3
Больные хроническим ТИН	8	47,8±4,1*	402,6±54,5	30,7±3,9*	3,72±0,37	452,1±46,3*
Больные острым ПН	6	38,2±9,1	309,3±33,4	38,3±5,82	2,88±0,23*	432,2±67,4*
Больные хроническим ПН	9	46,1±8,3*	331,5±31,7	33,5±1,8*	3,27±0,22	379,3±41,2
Контроль	12	26,7±4,0	325,7±24,7	36,3±1,3	3,40±0,16	352,6±20,5

Примечание. Здесь и в табл. 2 звездочка — достоверное отличие по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).

Состояние ККС и уровень ингибиторов протеиназ при различных нефропатиях в зависимости от степени активности процесса

Группа обследованных	Число обследованных	К	П	АТ	МГ	ОЭА
Больные ТИН:						
высокая активность	15	50,2±2,5*	358,6±30,8*	39,8±3,4*	3,30±0,90*	409,9±35,2*
стихание процесса	17	40,5±3,7*	341,8±18,8	35,4±2,1*	2,98±0,19*	393,4±34,4*
ремиссия	11	36,4±4,9*	386,9±30,3	34,4±4,9*	3,27±0,30*	464,1±46,4*
Больные ПН:						
умеренная активность	15	40,6±6,0*	335,6±19,7	34,9±2,4*	3,10±0,15*	401,0±33,4*
ремиссия	21	38,1±5,5*	372,9±16,9	31,8±2,2*	3,10±0,13*	403,6±29,2*
Больные ДН:						
без изменений в моче	10	34,7±4,2	390,0±29,7	36,2±2,1	2,70±0,46*	360,8±38,6
с изменениями в моче	9	38,9±3,9*	316,7±23,8	36,9±2,5	2,90±0,39*	356,4±19,9
Контроль	12	26,8±4,0	325,8±24,8	36,31±1,34	3,37±0,16	352,6±20,6

П наблюдали у 75 % больных ТИН и в 60 % случаев при ПН. Трактовать данное явление весьма затруднительно, однако можно предположить, что повышение уровня П связано с увеличением его синтеза в гепатоцитах в ответ на воспаление.

Изменение ингибиторного потенциала в активной стадии ТИН и ПН было неоднозначным. При ТИН средний уровень АТ превышал норму, а содержание МГ оставалось в пределах нормы. При ПН уровень АТ соответствовал нижней границе нормы, а уровень МГ был несколько снижен. Следует обратить внимание на различие содержания ингибиторов протеиназ в зависимости от остроты процесса. Для острого ТИН характерно повышение уровня АТ в 66 % и снижение МГ в 55 % случаев. При хроническом процессе, напротив, имело место снижение уровня АТ в 65 % случаев и повышение среднего уровня МГ. При этом содержание МГ оставалось сниженным у половины обследованных. Острый ПН характеризовался повышением уровня АТ и снижением содержания МГ. При хроническом ПН средний уровень АТ был ниже нормы, а средний уровень МГ соответствовал нижней границе нормы (табл. 1). Различия в изменении ингибиторного потенциала в активной стадии острого и хронического процесса при ТИН и ПН вызваны особенностями патогенетических механизмов острого и хронического воспаления, в частности повышением синтеза белков острой фазы воспаления, одним из которых является АТ.

У больных ТИН стихание активности процесса сопровождалось снижением активности К ($p < 0,05$) по сравнению с активной стадией, однако нормализации данного показателя не происходило. Несколько увеличивался средний уровень П, умеренно возрастала ОЭА. Наблюдалось снижение ингибиторного потенциала как за счет АТ, так и за счет МГ ($p < 0,05$). Наиболее выраженное снижение содержания ингибиторов происходило при ТИН. Самый низкий уровень МГ отмечен в стадии стихания ТИН, в стадии ремиссии он достигал нижней границы нормы (табл. 2).

Снижение ингибиторного потенциала является, по-видимому, результатом нескольких процессов. Так, известно, что МГ образует комплекс с протеи-

назами и быстро элиминируется, а также может подвергаться протеолитическому расщеплению [7]. Уровень АТ может истощаться за счет образования комплекса α_1 -антитрипсин — эластазы (освобождение эластазы происходит при дегрануляции гранулоцитов при воспалении) и в результате свободнорадикального окисления [5]. Кроме того, уровень АТ может быть снижен при недостаточности синтеза данного ингибитора.

При ДН изменения состояния ККС носили иной характер. При наличии эритроцитурии или протеинурии имела место тенденция к повышению активности К, в то время как средний уровень П, АТ, ОЭА оставался в пределах нормы. Заслуживает внимания достоверное снижение уровня МГ ($p < 0,05$), которое сохраняется и в период отсутствия изменений при нормальных средних показателях всех других изучаемых компонентов ККС. Нормальное состояние ККС при ДН может свидетельствовать об отсутствии признаков воспаления. Снижение уровня МГ в данном случае объяснить весьма затруднительно, однако необходимо отметить, что более выраженное снижение уровня данного ингибитора отмечается у детей с преобладанием в мочевом синдроме протеинурии.

Таким образом, характер изменений состояния ККС при хроническом ТИН свидетельствует о наличии воспалительного процесса в почечной ткани, что ранее было подтверждено гистологическими исследованиями, однако не было убедительно доказано клинико-лабораторными данными. Анализ полученных данных позволяет говорить об однонаправленных изменениях состояния ККС при бактериальном и абактериальном патологическом процессе в тубулоинтерстициальной ткани почек. Исследование показателей ККС может служить дополнительным дифференциально-диагностическим тестом при ТИН и ДН. Истощение ингибиторного потенциала можно считать фактором, отягочающим течение патологического процесса и приводящим к его хронизации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Нартипова В. Ф., Пасхина Т. С. // *Вопр. мед. химии.* — 1979. — № 4. — С. 494—499.
2. Пасхина Т. С., Кринская А. В. // *Там же.* — 1974. — № 6. — С. 660—663.

3. Пасхина Т. С., Кринская А. В. // Современные методы в биохимии.— М., 1974.— С. 157—163.
4. Петрунь Н. М., Пырич Л. А., Кримневич Е. И. // Тер. арх.— 1985.— № 6.— С. 84—86.
5. Шербакова Э. Г., Варагина Н. И., Яровая Г. А. и др. // Вопр. мед. химии.— 1991.— № 5.— С. 40—43.
6. Corrtero O. A., Scicli A. V. // Amer. J. Physiol.— 1980.— Vol. 238, N 4.— P. 247—255.
7. Duke V. C., Travis J. // J. Biol. Chem.— 1984.— Vol. 259.— P. 8870—8874.
8. Mayfield R. R., Margolius H. S. // Amer. J. Nephrol.— 1983.— Vol. 21, N 3.— P. 145—155.
9. Rybak M., Stancirova M. et al. // Kinin-4.— 1984.— P. 117.
10. Schapira M., Despland E., Scott C. et al. // J. Clin. Invest.— 1982.— Vol. 69.— P. 1199—1202.
11. Wachtfogel C. // Ibid.— 1983.— Vol. 72, N 5.— P. 1672—1678.

Поступила 08.03.93

THE KALLIKREIN-KININ SYSTEM AND INHIBITORS OF PROTEOLYSIS IN BLOOD PLASMA OF CHILDREN WITH VARIOUS FORMS OF NEPHROPATHY

G. A. Yarovaya, N. A. Korovina, M. P. Magomedova

Central Institute for Postgraduate Training of Physicians, Moscow.

Activity of the kallikrein-kinin system and proteinase inhibitors were studied in blood plasma of children at various stages of tubulointerstitial nephritis, pyelonephritis and dysmetabolic nephropathy. Similar alterations in the activities of kallikrein-kinin system and in the rate of proteolysis inhibition were observed in tubulointerstitial nephritis and pyelonephritis. Supplementary demonstrations were obtained about development of inflammation in tubulointerstitial nephritis. Absence of the kallikrein-kinin system activation and a decrease in the α_2 -macroglobulin content were detected in dysmetabolic nephropathy. Definite components of the kallikrein-kinin system and the proteolysis inhibitors may be used as indicators in differential diagnosis of tubulointerstitial nephritis and dysmetabolic nephropathy.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 615.355:577.152.344 | 033.1.07

И. Ю. Сахаров, С. П. Глянец, Ф. Е. Литвин, В. Ф. Гордеев

ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ КОЛЛАГЕНАЗЫ КАМЧАТСКОГО КРАБА PARALITHODES CAMTSCHATICA

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Институт хирургии им. А. В. Вишневского РАМН, НПП «Иммунотех», Москва

Ранее было показано, что ферментный препарат, полученный из гепатопанкреаса камчатского краба *Paralithodes camtschatica* и названный коллагеназой краба, обладает высокой некролитической и очищающей раны активностью [1]. Было также доказано, что эта активность в основном обусловлена наличием в препарате двух изоферментов сериновой коллагенолитической протеазы — А и С. В предыдущих публикациях были описаны выделение и свойства этих изоферментов [3, 4, 9]. Дальнейшие усилия были направлены на исследование фармакокинетических свойств коллагеназы.

Целью настоящей работы явилось изучение процессов проникновения коллагеназы краба в кровотоки через грануляции асептической и гнойной ран у крыс и распределения этого ферментного препарата по органам после его внутри-

венного введения. Определена также степень ингибирования коллагеназы краба сывороточными белками.

Методика. Препарат «коллагеназа краба» с удельной коллагенолитической активностью 600 ед. Мандл на 1 мг белка, выделенный из гепатопанкреаса краба *P. camtschatica*, был получен, как описано в работе [6]. Изоферменты коллагенолитической протеазы краба были очищены до гомогенного состояния на ДЭАЭ-сепфарозе с помощью ионообменной хроматографии [5]. Мечение протеаз краба ^{125}I проводили при помощи йодогена [7].

Исследования *in vivo* проводили на нелинейных белых крысах-самцах массой 180—220 г. Асептические и гнойные раны формировали, как описано ранее [1]. После этого на раны наносили по 250 мкл раствора препарата коллагеназы краба с концентрацией 3 мг/мл, содержащего коллагенолитическую протеазу А, меченую ^{125}I , с активностью 10 млн имп/мин. Изотоп-меченный изофермент А, один из основных компонентов коллагеназы краба, в данном случае использовали как маркерную молекулу, слежение за которой позволило нам судить о поведении всех протеолитических ферментов, входящих в препарат. При исследовании влияния ферментативной активности на процесс проникновения коллагеназы краба в кровотоки данный препарат инaktivировали инкубацией раствора в кипящей водяной бане в течение 5—7 мин. Для удобства аппликации ферментным раствором предварительно насыщали 50 мг гелевина, нанося образующийся гель на раны под окклюзирующую повязку. Животных выводили из эксперимента через определенные промежутки времени и анализировали количество радиоактивности в пробах крови на гамма-счетчике «Тга-ког» (США).

Для изучения распределения коллагеназы краба по органам в хвостовую вену животных вводили 0,5 мл раствора изоферментов коллагенолитической протеазы, меченных ^{125}I , с активностью 1,2 млн имп/мин. Через определенный интервал времени крыс декапитировали, собирали кровь из грудной полости и извлекали внутренние органы (сердце, почки, печень, селезенку, легкие, мышечную и костную ткань). Изъятые органы промывали от сгустков крови, высушивали фильтровальной бумагой и взвешивали.

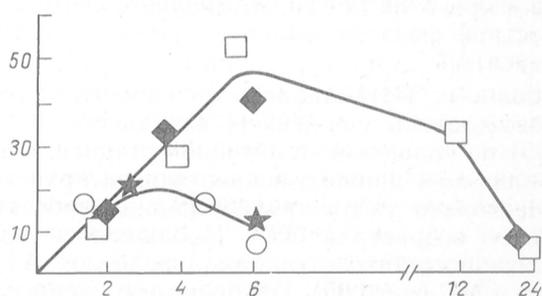


Рис. 1. Кинетика проникновения в кровотоки крысы пассивной (светлые квадраты, светлые кружки) и денатурированной (темные ромбы, темные звезды) коллагеназы краба через асептическую (светлые кружки, темные звезды) и гнойную (светлые квадраты, темные ромбы) модельные раны у крыс.

По оси абсцисс — время, ч; по оси ординат — радиоактивность, имп/мин на 1 г крови 10^3 .

Кинетика распределения по органам изоферментов коллагенолитической протеазы краба (в % от введенной дозы) после их внутривенного введения в организм

Время	Протеаза А			Протеаза С		
	кровь	печень	почки	кровь	печень	почки
10 мин	30	29	4,7	15	26	5,6
30 мин	24	13	4,7	10	21	7,2
60 мин	17	10	2,0	8	12	4,1
2 ч	16	5	2,0	5	8	2,4
24 ч	3	1	0,5	1	3	0,4

вали. Радиоактивность, содержащуюся в крови и внутренних органах, измеряли на гамма-счетчике «ЛКВ Wallac-Bromma» (Швеция).

Электрофорез проводили в градиентном (7,5—18 %) полиакриламидном геле [8].

Ингибирующую емкость крови по отношению к препарату коллагеназы краба определяли, добавляя к 1,5 мл неразведенной сыворотки крысы 1,5 мл раствора фермента в 0,15 М NaCl. Остаточную ферментативную активность измеряли после инкубации сыворотки и фермента в течение 10 мин при комнатной температуре и добавлении в реакционную среду 15 мкл Bz-Arg-pNA, растворенного предварительно в диметилсульфоксиде до концентрации 100 мМ. Оптическую плотность измеряли при 410 нм.

Результаты и их обсуждение. Хотя после аппликации препарата коллагеназы краба с помощью иммунофлюоресцентного метода изоферменты коллагенолитической протеазы были обнаружены сококализованными с фибрином только на дне раны и не зарегистрированы во вновь образующейся грануляционной ткани [2], в результате экспериментов с использованием изофермента А коллагенолитической протеазы, меченной ^{125}I , удалось показать, что ферментный препарат краба в условиях окклюзирующей повязки все же попадает в кровоток (рис. 1). Как видно, после нанесения препарата на гнойную рану крысы радиоактивность в кровотоке достигает максимального значения через 6 ч после аппликации. В дальнейшем содержание фермента постепенно снижается, и через сутки в крови находится около 10 % от его максимальной концентрации. Надо заметить, что идентичная зависимость была получена и при аппликации термоинактивированного препарата коллагеназы (см. рис. 1). Это свидетельствует о том, что в процессе транспорта фермента с поверхности раны в кровоток активность коллагеназы участия не принимает.

Подобный характер кривой был получен и при аппликации препарата коллагеназы краба на неинфицированную рану крысы (см. рис. 1). Так же, как и при нанесении на гнойную рану, кинетическая кривая накопления фермента в крови проходила через максимум. Однако максимальное значение зарегистрированной в кровотоке радиоактивности было почти в 3 раза ниже, чем в первом эксперименте, что свидетельствует о более высокой проницаемости для протеолитического препарата тканей гнойной раны, нежели асептической. Кроме того, максимальное накопление фермента в кровотоке в случае неинфицированной раны достигалось уже к 2 ч после аппликации, а спустя 6 ч обнаруживали только 50 % от максимальной концентра-

ции протеазы. Так же, как и при наблюдениях с инфицированной раной, денатурация коллагеназы краба не влияла на процесс проникновения протеазы через грануляционную ткань. Таким образом, процесс проникновения коллагеназы краба в кровоток при ее аппликационном применении определяется не активностью фермента, а состоянием раны.

Зарегистрированный факт проникновения коллагеназы в кровоток через грануляционную ткань привел нас к необходимости исследовать процесс выведения этого фермента из организма. Было показано, что после внутривенного введения изофермента А, меченного ^{125}I , эта протеаза довольно быстро выводилась из кровотока (см. таблицу). Анализируя результаты по изучению накопления фермента в различных органах крысы, мы показали, что органами, ответственными за понижение уровня коллагенолитической протеазы краба в кровотоке, являются печень и почки. Другие ткани (мозг, селезенка, сердце, легкие, мышцы) практически не содержали радиоактивной метки. Кинетика накопления коллагенолитической протеазы в тканях позволяет предположить, что первичный захват исследуемого фермента осуществляется печенью. Надо отметить, что кинетика накопления и выведения изофермента А не зависела от количества введенного в кровоток препарата коллагеназы краба в интервале 0,1—100 мг на 1 кг массы животного.

Аналогичное исследование было проведено и для изофермента С. Оказалось, что катаболизм изоферментов коллагенолитической протеазы весьма сходен (см. таблицу). Отличием явилось лишь то, что протеаза С исчезла из кровотока чуть с большей скоростью, нежели это было зарегистрировано для протеазы А краба, что в свою очередь приводило к большему ее накоплению в тканях печени и почек.

Обнаружение феномена проникновения коллагеназы краба в кровоток после ее аппликации на рану заставило нас поставить вопрос о том, в каком состоянии находится данная протеаза в кровотоке. Для его решения нами был использован электрофоретический метод (рис. 2). Так, проводя электрофорез в денатурирующих условиях, мы показали, что радиоактивная метка, находящаяся в образце крови крысы после внутривенного введения препарата коллагеназы, содержащего изофермент А, меченный ^{125}I , мигрировала со скоростью, равной скорости миграции нативной протеазы А (треки 1 и 2). Это свидетельствует о том, что в кровотоке этот фермент не подвергается протеолизу и радиоактивная метка остается локализованной на

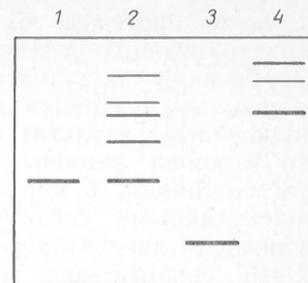


Рис. 2. Радиоавтограф градиентного геля после электрофореза образцов крови, взятых у крыс через 10 мин после внутривенного введения меченного изофермента А коллагеназы краба и препарата изофермента А в денатурирующих (треки 1 и 2) и неденатурирующих (треки 3 и 4) условиях. Треки 1 и 3 соответствуют 20 мкг меченного изофермента, 2 и 4—26 мкл сыворотки крови.

молекуле протеазы. С другой стороны, в денатурирующих условиях радиоактивная метка мигрировала со значительно более низкой скоростью, чем нативная протеаза (треки 3 и 4). Полученный результат позволяет предположить, что в крови фермент находится не в свободном состоянии, а образует комплекс с высокомолекулярными соединениями, по-видимому, с белковыми ингибиторами протеаз крови.

Это соображение подтверждается данными экспериментов по определению активности коллагеназы краба после ее инкубации *in vitro* с сывороткой крови. Так, было обнаружено, что 1 мл сыворотки крысы полностью подавляет активность 6,5 мг ферментного препарата. Следует отметить, что ингибирующая емкость крови значительно превышает количество препарата коллагеназы краба, используемое при аппликационной энзимотерапии [2], а организм, таким образом, имеет определенный запас прочности для предотвращения какого-либо побочного воздействия проникающих через рану коллагенолитических протеаз. Другими словами, при нанесении на рану препарата коллагеназы краба изоферменты проявляют свою ферментативную активность лишь на пораженной поверхности, как это было показано ранее [1]. После проникновения в кровоток они инактивируются. Полученные данные подтвердили возможность применения препарата коллагеназы краба для лечения ран в хирургии. Данные же по накоплению коллагеназы краба во внутренних органах являются предпосылкой проведения токсикологического изучения влияния этого препарата на организм экспериментальных животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Адамьян А. А., Глянцев С. П., Сахаров И. Ю., Саввина Т. В. // Бюл. exper. биол.— 1992.— № 12.— С. 660—663.
2. Глянцев С. П. Разработка современных ферментсодержащих перевязочных средств и совершенствование методов их применения в комплексном лечении гнойных ран: Дис. ... д-ра мед. наук.— М., 1993.
3. Сахаров И. Ю., Литвин Ф. Е. // Биохимия.— 1992.— Т. 57.— С. 61—69.
4. Сахаров И. Ю., Литвин Ф. Е., Артюков А. А. // Там же.— С. 40—45.
5. Сахаров И. Ю., Литвин Ф. Е., Артюков А. А., Кофанова Н. Н. // Там же.— 1988.— Т. 53.— С. 1586—1591.
6. Сахаров И. Ю., Литвин Ф. Е., Артюков А. А., Кофанова Н. Н. Способ получения коллагеназы: А. с. 1526226 СССР, 1989.
7. Fraker P. J., Speck J. C. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1988.— Vol. 80.— P. 848—856.
8. Laemmli U. K. // Nature.— 1970.— Vol. 227.— P. 680—685.
9. Sakharov I. Yu., Litvin F. E. // Comp. Biochem. Physiol.— 1990.— Vol. 97B.— P. 407—410.

Поступила 07.04.91

PHARMACOKINETIC STUDY OF COLLAGENASE FROM KING CRAB (PARALITHODES CAMTSCHATICA).

I. Yu. Sakharov, S. P. Glyantsev, F. E. Litvin, V. F. Gordeev

M. V. Lomonosov State University, A. V. Vishnevsky Institute of Surgery, Russian Academy of Medical Sciences, Research Industrial Association «Immunotech», Moscow.

The king crab collagenase was shown to permeate through both aseptic and purulent wounds into rat circulation. The rate of enzyme permeation was higher in purulent wounds, while the enzymatic activity did not affect the rate of collagenase transport into blood. After intravenous administration the enzyme was mainly accumulated

in liver and kidney, while protease was not found in the heart, spleen, lung and muscle tissues. Collagenase was rapidly eliminated from circulation and its isozymes were contained in blood not in free state, but they were bound and inactive.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 616.155.34-008.931:577.152.341-074

В. Л. Доценко, Е. А. Нешкова, Г. А. Яровая

ВЫЯВЛЕНИЕ ЛЕЙКОЦИТАРНОЙ ЭЛАСТАЗЫ ЧЕЛОВЕКА ИЗ КОМПЛЕКСА С ПЛАЗМЕННЫМ α_1 -ПРОТЕИНАЗНЫМ ИНГИБИТОРОМ ПО ЕЕ ЭНЗИМАТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ С СИНТЕТИЧЕСКИМ СУБСТРАТОМ

Российская медицинская академия последипломного образования, Москва

Лейкоцитарная эластаза, высокоактивная сериновая протеиназа с нейтральным оптимумом pH и широкой субстратной специфичностью, локализуется в азурофильных гранулах нейтрофильных полиморфноядерных лейкоцитов [21]. Физиологическая функция фермента, состоящая в протеолитическом расщеплении фагоцитируемых нейтрофилом белков, приобретает патогенетические аспекты при секреторной дегрануляции или гибели нейтрофила. Попадающая во внеклеточное пространство эластаза расщепляет основное вещество, эластиновые и коллагеновые волокна базальных мембран и соединительной ткани [10, 22, 23, 29], белки плазмы крови, в том числе факторы свертывания, фибринолиза [8, 13, 24, 27], компоненты комплемента [8], транспортные белки [18, 34] и иммуноглобулины [12].

Являясь биохимическим маркером воспалительного процесса, эластаза может играть решающую роль в патогенезе тромбогеморрагических осложнений [14, 26, 35], нарушении дыхательной функции легких [5, 15] и множественной недостаточности органов [20] как следствии обширных травм, перитонита и септицемий [16].

Высокая концентрация эластазы в азурофильных гранулах нейтрофилов, достигающая миллимолярных величин [9], требует эффективного механизма контроля. Основным регулятором активности фермента является плазменный α_1 -протеиназный ингибитор (α_1 -ПИ), обуславливающий основную антипротеолитическую и антиэластазную активность (АЭА) плазмы крови [11, 37].

Природа комплекса эластаза — α_1 -ПИ является предметом многочисленных исследований. По данным некоторых авторов, ингибитор подавляет активность эластазы практически необратимо с очень высокой константой ассоциации (k_a) — более $10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ [4, 7, 36]. Высокая k_a при значительной концентрации ингибитора в плазме крови и тканях, а также псевдообратимый характер ингибирования делают этот процесс очень быстрым и эффективным [17].

Поскольку циркулирующая в русле крови лейкоцитарная эластаза, находящаяся в комплексе с α_1 -ПИ, лишена энзиматической активности, ее количество в плазме крови оценивается в настоящее время методами иммуоферментного анализа

[25]. Эти методы, выявляющие комплекс эластаза — α_1 -ПИ [32] или непосредственно эластазу [28] по их антигенным детерминантам, позволяют оценить интенсивность процессов дегрануляции лейкоцитов и прогнозировать осложнения, вызываемые генерализацией воспаления.

Высокочувствительные количественные иммуноферментные методы определения эластазы в плазме крови больного имеют ряд недостатков, ограничивающих их применение в клинических условиях. Главными из них можно считать длительное время определения антигена эластазы и высокую стоимость наборов.

В настоящей работе описан спектрофотометрический метод выявления эластазы из комплекса с α_1 -ПИ и определения ее энзиматической активности непосредственно в плазме крови.

Методика. В работе использованы препараты лейкоцитарной эластазы, полученной методом биоспецифической хроматографии с использованием гордокс-сффарозы в качестве сорбента [1, 3].

Активность эластазы определяли по скорости гидролиза N-tert-бутоксикарбонил-аланин-p-нитрофенилового эфира (BOC-Ala-ONp) [38] и метокси-сукцинил-аланил-аланил-пропил-валил-p-нитроанилиду (MSAAPVpNA [31]). Удельная активность препаратов эластазы по первому субстрату составила 3—8 мкмоль/мин на 1 мг белка. Удельная амидазная активность эластазы, определяемая по MSAAPVpNA, составила 4—7 мкмоль/мин на 1 мг белка. Кинетические свойства препаратов эластазы, определенные по вышеуказанным субстратам при 37 °С, имели следующие значения: для BOC-Ala-ONp pH 6,5 $K_M = 0,35$ мМ, отношение $k_{кат}/K_M = 11,7 \cdot 10^3$ М⁻¹·с⁻¹; для MSAAPVpNA pH 7,5 $K_M = 0,1$ мМ, отношение $k_{кат}/K_M = 117 \cdot 10^3$ М⁻¹·с⁻¹.

Молярную концентрацию фермента рассчитывали, используя величину концентрации белка в препарате эластазы, определенную методом [6].

В экспериментах по подбору условий диссоциации комплекса эластаза — α_1 -ПИ использовали коммерческий препарат ингибитора (фирма «Sigma») в концентрации 5 мг/мл в 0,1 М трис-HCl-буферном растворе pH 8,0 или сыворотку крови доноров, разведенную в 15—50 раз физиологическим раствором NaCl. Лейкоцитарную эластазу в объеме 5—15 мкл с активностью 1,8—13,3 мЕ по MSAAPVpNA добавляли непосредственно в раствор ингибитора или в разведенную сыворотку крови (10—50 мкл), находящиеся в кювете спектрофотометра, и инкубировали 3 мин при комнатной температуре. Контролем за полнотой ингибирования эластазы служила активность аналогичной смеси, определяемая по MSAAPVpNA в стандартных условиях.

Эластазоподобную активность плазмы крови определяли по скорости гидролиза BOC-Ala-ONp методом [38], примененным для определения этой активности в плазме крови Г. А. Парфенковой и соавт. [2]. Активность по MSAAPVpNA определяли методом [31].

Влияние различных условий предварительной инкубации комплекса (pH 3,0, присутствие ацетона и ацетонитрила в инкубате) и условий определения активности фермента (состав буферного раствора, концентрация субстрата) исследовали

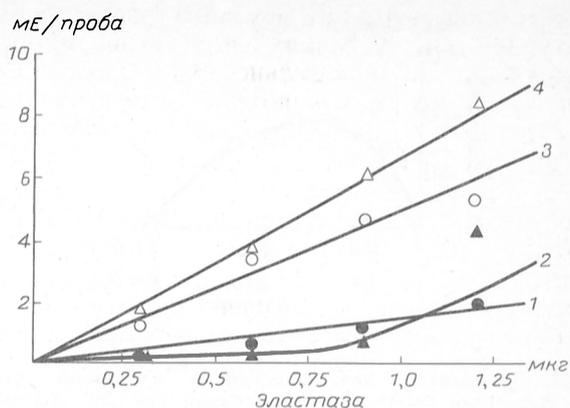


Рис. 1. АЭА сыворотки крови донора, измеренная по N-t-BOC-Ala-ONp (кривая 1) и MSAAPVpNA (кривая 2) в качестве субстратов, и собственная активность препарата эластазы по этим субстратам (кривые 3 и 4 соответственно).

по следующей схеме: после образования комплекса в кювету спектрофотометра добавляли 0,25—0,3 мл 0,1 М NaH₂PO₄ с pH, доведенным ортофосфорной кислотой до 3,0, или физиологический раствор NaCl с тем же pH. Добавляемые в кювету растворы содержали определенную концентрацию ацетона или ацетонитрила. После инкубации в течение 3 мин и добавления соответствующего буферного раствора и субстрата определяли активность фермента.

Регистрацию скорости расщепления субстратов выявляемым ферментом производили на компьютеризованном двухлучевом спектрофотометре «Hitachi U-3200» при 30 °С, используя в качестве оптического контроля кювету, содержащую все ингредиенты, кроме эластазы и сыворотки.

Условия выявления эластазы запатентованы Центральным институтом усовершенствования врачей Минздрава РФ (заявка на выдачу патента № 93001185/14 от 28.01.93).

Результаты и обсуждение. Определение АЭА сыворотки крови человека (донора) проводили с использованием двух специфических для лейкоцитарной эластазы субстратов: MSAAPVpNA и BOC-Ala-ONp. Для этого лейкоцитарную эластазу в количестве 10—40 мкл преинкубировали 3 мин с 10 мкл разведенной в 5 раз физиологическим раствором сывороткой крови, после чего определяли остаточную активность фермента. На рис. 1 представлены результаты такого определения. Как видно из расположения кривых на рисунке, активность эластазы, добавленной к сыворотке, начинает выявляться в случае приме-

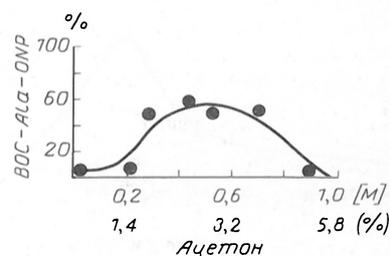


Рис. 2. Влияние ацетона на степень выявления экзогенной эластазы (в % от добавленной активности) из комплекса с плазменным α_1 -ПИ.

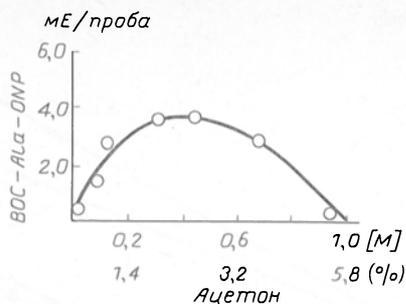


Рис. 3. Зависимость эластазоподобной эстеразной активности сыворотки крови от концентрации ацетона, содержащегося в среде для определения энзиматической активности.

нения MSAAPVpNA лишь при 1,14 мкг эластазы (кривая 2). Подсчет ингибирующей лейкоцитарную эластазу емкости сывороточных ингибиторов, произведенной по формуле:

$$\frac{A_3 - A_{3c} P \cdot 0,102}{V_{06}}$$

где A_3 — прирост оптической плотности содержимого кюветы при 410 нм за 1 мин; A_{3c} — прирост оптической плотности в кювете, содержащей эластазу и сыворотку крови, за 1 мин; P — разведение сыворотки; V_{06} — объем образца сыворотки (в мл); 0,102 — пересчетный коэффициент, учитывающий объем пробы (1 мл) и коэффициент молярной экстинкции субстрата ($\epsilon = 9786$), — показал, что АЭА сыворотки крови донора, определяемая по данному субстрату, составила 2,65 ИЕ/мл (за 1 ИЕ здесь принято количество ингибиторов, подавляющих активность 1 Е эластазы).

Использование для определения АЭА сыворотки крови другого субстрата — ВОС-Ala-ONp — свидетельствовало об отсутствии полного подавления даже невысоких активностей фермента α_1 -ПИ, содержащимся в сыворотке (см. рис. 1, кривая 1).

Исходя из данного экспериментального факта, свидетельствующего об отсутствии полного подавления активности экзогенной лейкоцитарной эластазы антиэластазным потенциалом сыворотки крови и возможности выявления небольшой части ее активности при наличии в кювете ВОС-Ala-ONp в качестве субстрата, мы попытались подобрать условия, влияющие на прочность связывания эластазы с α_1 -ПИ в сыворотке крови и, возможно, позволяющие увеличить долю выявления экзогенной эластазы.

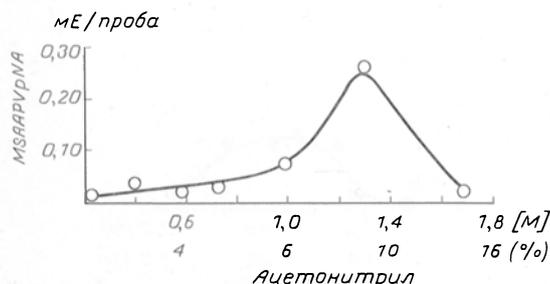


Рис. 4. Зависимость эластазоподобной активности сыворотки крови от содержания ацетонитрила в среде для измерения энзиматической активности с использованием MSAAPVpNA в качестве субстрата.

Влияние pH и органических растворителей (ацетона и ацетонитрила) на степень выявления эластазы. Предварительно сформированные комплексы (см. раздел «Методика») между добавленной к образцу плазмы лейкоцитарной эластазой и α_1 -ПИ, содержащимся в плазме крови донора, не обладали амидазной активностью по MSAAPVpNA, но имели слабую эстеразную активность при использовании в качестве субстрата растворенного в ацетонитриле ВОС-Ala-ONp. Последняя составляла от 10 до 30 % от активности добавленной эластазы при условии полного подавления активности по MSAAPVpNA такого же количества эластазы.

Предварительная инкубация пробы, содержащей комплексы плазменного α_1 -ПИ с экзогенной эластазой, в течение 3 мин при кислотном значении pH (3,0) с последующим определением эстеразной активности увеличивала на 3—5 % количество выявляемой активности. Внесение в ту же предынкубационную пробу ацетона резко увеличивало выявляемость эластазы. На рис. 2 приведена кривая, демонстрирующая процент выявляемой по ВОС-Ala-ONp эластазы в зависимости от концентрации добавленного в предынкубат ацетона. Как видно на рис. 2, максимальная выявляемость экзогенной эластазы (около 60 %) имела место при концентрации ацетона в предынкубате 0,45 М.

Оказалось, однако, что для более полного выявления эластазы из комплекса с α_1 -ПИ нет необходимости в предварительной инкубации пробы при кислотном pH в присутствии ацетона. Рис. 3 демонстрирует зависимость собственной ВОС-Ala-ONp-эстеразной активности сыворотки донора от концентрации ацетона, добавляемого в буферный раствор, в котором проводится определение активности. Как видно на рисунке, для максимального выявления эндогенной эластазоподобной активности сыворотки конечная концентрация ацетона в кювете должна составлять от 0,31 до 0,68 М.

Эксперименты по выявлению экзогенной эластазы и собственной эластазоподобной активности сыворотки в присутствии ацетонитрила, добавляемого в буфер для определения активности, были предприняты в связи с тем, что, как показали дополнительные измерения, собственная ВОС-Ala-ONp-эстеразная активность эластазы снижалась на 30—40 % в присутствии 0,45 М ацетона.

Использование MSAAPVpNA в качестве субстрата для выявляемой в присутствии ацетона эластазы не привело к успеху. Количество выявляемой из комплекса с плазменным α_1 -ПИ экзогенной эластазы не превышало 3—10 % от внесенной активности. Использование ацетонитрила (в концентрации 0,38—1,9 М) вместо ацетона увеличило выявляемость экзогенного фермента до 6—12 % от внесенной активности. На рис. 4 представлена кривая определения собственной эластазоподобной активности сыворотки по MSAAPVpNA в качестве субстрата в зависимости от концентрации добавленного в пробу ацетонитрила. Как видно на рисунке, максимальная активность достигается при концентрации 1,52 М ацетонитрила, что соответствует необходимой концентрации для максимального выявления активности экзогенной эластазы из комплекса с α_1 -ПИ.

Выявление активности экзогенной эластазы из

содержащегося в плазме крови комплекса фермента с α_1 -ПИ при увеличении концентрации субстрата. Как показали результаты описанных ранее экспериментов, использование N-BOC-Ala-ONp в качестве субстрата в присутствии определенного количества органических растворителей (аcetона и ацетонитрила) позволяло выявлять до 60 % активности внесенной в сыворотку и связанной с α_1 -ПИ эластазы. Все энзиматические реакции с использованием данного субстрата, растворимость которого в водной среде ограничена, производились в соответствии с методом [38], при конечной концентрации 0,3 мМ, т. е. при концентрации, не превышающей $1 K_m$. Изменение состава буферного раствора, в котором проводилось определение активности эластазы, позволило несколько увеличить концентрацию используемого субстрата. На рис. 5, а приведены кривые зависимости скорости ферментативной реакции 8 мкл эластазы (кривая 1) и ее комплекса с плазменным ингибитором α_1 -ПИ (разведенная 1:30 сыворотка крови; кривая 2) от концентрации BOC-Ala-ONp. Форма кривой 2 свидетельствует о резком возрастании активности эластазы в комплексе при увеличении концентрации субстрата до 2,5 мМ. При этой концентрации субстрата активность эластазы, находящейся в комплексе с ингибитором, практически равна активности незаингибированного образца эластазы в отсутствие ингибитора. Пересчет полученных скоростей реакций в координатах Лайнуивера — Берка (рис. 5, б) показал, что выявление лейкоцитарной эластазы из комплекса происходит по кинетике реакции активации фермента субстратом.

На рис. 6 приведены кривые, демонстрирующие активность экзогенной лейкоцитарной эластазы, находящейся в комплексе с α_1 -ПИ, содержащимся в 50 мкл разведенной в 50 раз сыворотки крови, по двум синтетическим субстратам. Кривые на рис. 6, а демонстрируют полное подавление активности эластазы плазменным ингибитором, тогда как результат определения активности фермента по BOC-Ala-ONp (см. рис. 6, б) при максимальной концентрации субстрата в специально составленном буферном растворе свидетельствуют о ее полном выявлении из комплекса.

В таблице приведены результаты, полученные на сывороточном ингибиторе, свидетельствующие о том, что лейкоцитарная эластаза, находящаяся

Активность лейкоцитарной эластазы, выявленной из комплекса с коммерческим препаратом α_1 -ПИ

Объект исследования	Субстрат	
	MeOSuC-Ala-Ala-Pro-ValpNa	BOC-Ala-ONp
нмоль/мин на пробу		
1. Лейкоцитарная эластаза	13,3	24,6
2. Лейкоцитарная эластаза + α_1 -ПИ	0,0	25,0

Примечание. 1 — инкубационная смесь содержала 100 мкл фермента (530 мЕ/мл по MSAAPVpNA) и 100 мкл 0,1 М трис-НСI-буфера рН 8,0. Время инкубации 5 мин. В пробу для измерения активности отбирали аликвоту объемом 50 мкл; 2 — инкубационная смесь содержала 100 мкл фермента (530 мЕ/мл по MSAAPVpNA) 20 мкл α_1 -ПИ (5 мг/мл) и 80 мкл 0,1 М трис-НСI-буфера рН 8,0. Время инкубации 5 мин, объем пробы 50 мкл.

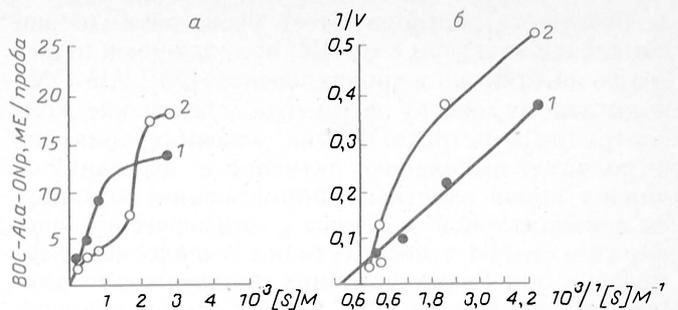


Рис. 5. Зависимость активности лейкоцитарной эластазы, выявляемой из комплекса с плазменным α_1 -ПИ, от концентрации N-BOC-Ala-ONp в пробе.

а: 1 — активность фермента; 2 — активность комплекса при увеличении концентрации субстрата до 3 мМ; б — то же в координатах Лайнуивера — Берка.

в комплексе с коммерческим препаратом α_1 -ПИ, может проявить 100 % своей активности в описанных условиях.

Отсутствие полного подавления активности лейкоцитарной эластазы α_1 -ПИ в ходе изучения АЭА плазмы крови человека при использовании в качестве субстрата BOC-Ala-ONp и постепенное увеличение этой активности с возрастанием количества добавляемой эластазы дали основание для предположения о том, что в присутствии данного субстрата и определенной концентрации ацетонитрила в качестве растворителя субстрата происходит нарушение связывания α_1 -ПИ с ферментом. По всей вероятности, в присутствии органического растворителя и при определенном составе

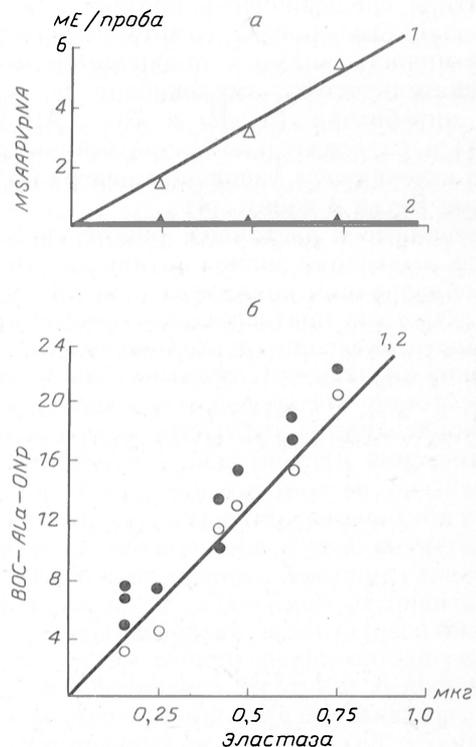


Рис. 6. Выявление экзогенной лейкоцитарной эластазы из комплекса с плазменным α_1 -ПИ при использовании MSAAPVpNA (а) и N-t-BOC-Ala-ONp (б) в качестве субстратов.

а, б: 1 — собственная активность эластазы; а, б: 2 — активность эластазы в комплексе с α_1 -ПИ.

ве буферного раствора имеет место разрыхление комплекса эластазы с α_1 -ПИ, приводящее к отщеплению ингибитора и проникновению ВОС-Ala-ONp к активному центру фермента. Увеличение концентрации субстрата в этих условиях приводит к полному выявлению активности внесенной в плазму крови эластазы. Формирование комплекса лейкоцитарной эластазы с коммерческим препаратом α_1 -ПИ с последующим выявлением фермента в описанных условиях подтверждало данные, полученные с α_1 -ПИ, содержащимся в плазме крови.

Связывание α_1 -ПИ лейкоцитарной эластазой в физиологических условиях, по данным [4, 17], имеет псевдонезобратимый характер. Он обусловлен либо очень низкой K_i ($<10^{-10}$ М), либо стабилизацией комплекса ковалентной связью, либо образованием прочного тетраэдрического комплекса между ингибитором и ферментом, образующимся за доли секунды [4]. Известно, однако, что образование комплекса эластазы с α_1 -ПИ происходит с отщеплением пептидного фрагмента от молекулы ингибитора с M_r 4000 Да [30, 33], что можно было бы расценивать как относительную сохранность активного центра фермента в образовавшемся комплексе с ингибитором, и об отсутствии каких-либо модификаций при связывании с ингибитором, нарушающих протекание ферментативного акта.

О связывании α_1 -ПИ не с активным центром, а с какой-то иной последовательностью аминокислот в молекуле фермента, в частности с тем участком, с которым происходит связывание эластина, свидетельствуют результаты исследования Хорнбека и Шнобеля [19]. На несоответствие субстратной специфичности протеиназы (лейкоцитарной эластазы человека, химотрипсина и трипсина), активность которых подавляется α_1 -ПИ, с последовательностью аминокислот в активном центре ингибитора [от P_4 к P_1 : ...Ala-Ile-Pro-Met(H)] и, следовательно, на связывание ингибитора не в первичном узнающем центре обращали внимание Бетти и соавт. [4].

Приведенные в настоящей работе сведения об условиях выявления полной активности участвующей в образовании комплекса с α_1 -ПИ лейкоцитарной эластазы подтверждают представление о сохранности активного центра молекулы фермента. Низкие значения рН предынкубации комплекса, присутствие органических растворителей, высокая концентрация субстрата создают условия для отщепления ингибитора от активного центра фермента, но не для полной диссоциации фермент-ингибиторного комплекса. Данный вывод основывается на отсутствии полной выявляемости эластазы из комплекса в присутствии MSAAPVpNA, хотя активность комплекса по этому субстрату несколько возрастает в указанных выше условиях.

Преимущество описываемого метода определения активности эластазы, связанной с α_1 -ПИ, для оценки степени дегрануляции нейтрофилов по сравнению с различными модификациями иммуноферментного метода состоит в следующем: данный метод определения активности фермента осуществляется в течение 6—10 мин (по сравнению с 4—6 ч при иммуноферментном методе); он более точен как любой спектрофотометрический метод прямого определения активности фермента; метод

не требует применения дорогостоящих иммунных препаратов и реактивов.

Авторы выражают благодарность доктору хим. наук Н. И. Ларионовой (кафедра химической энзимологии МГУ им. М. В. Ломоносова) за ценные советы и замечания при написании работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Нешкова Е. А., Доценко В. Л., Ларионова Н. И., Яровая Г. А. // Биохимия.— 1993.— № 10.— С. 8—10.
2. Парфенкова Г. А., Оглоблина О. Г., Домба Г. Ю. // Кардиология.— 1989.— № 3.— С. 94—96.
3. Baugh R. J., Travis J. // Biochemistry (Wash.).— 1976.— Vol. 15.— P. 836—841.
4. Beatty K., Bieth J. G., Travis J. // J. biol. Chem.— 1980.— Vol. 255.— P. 3931—3934.
5. Boxer L. A., Axtell R., Suchard S. // Blood Cells.— 1990.— Vol. 16.— P. 25—42.
6. Bradford M. M. // Nature.— 1970.— Vol. 227.— P. 680—685.
7. Braun N. J., Bodmer J. M., Virca D. G. et al. // Biol. Chem. Hoppe-Seyler.— 1987.— Vol. 368.— P. 299—308.
8. Brown M. S., Harpel P. S. // J. biol. Chem.— 1982.— Vol. 257.— P. 9849—9854.
9. Campbell E. J. // Amer. Rev. resp. Dis.— 1986.— Vol. 134.— P. 984—986.
10. Campbell E. J., Campbell M. A. // J. Cell Biol.— 1988.— Vol. 106.— P. 667—676.
11. Dietz A. A., Rubinstein H. M., Hodges L. // Clin. Chem.— 1974.— Vol. 20.— P. 396—399.
12. Eckle I., Kolb G., Havemann K. // Scand. J. Immunol.— 1991.— Vol. 34.— P. 359—364.
13. Eckle I., Seitz R., Egbring R. et al. // Biol. Chem. Hoppe-Seyler.— 1991.— Vol. 372.— P. 1007—1014.
14. Egbring R., Havemann K. // Neutral Proteases of Human Polymorphonuclear Leukocytes / Ed. K. Havemann, A. Jannoff.— Baltimore, 1978.— P. 442—455.
15. Endo Sh., Matsuoka T., Kan K. et al. // J. Iwate med. Ass.— 1989.— Vol. 41.— P. 721—724.
16. Fritz H., Jochum M., Duswald K.-H. et al. // Selected Topics in Clinical Enzymology / Ed. M. Werner, D. M. Goldberg.— Berlin, 1984.— Vol. 2.— P. 305—328.
17. Frommherz K. J., Faller B., Bieth J. G. // J. biol. Chem.— 1991.— Vol. 266.— P. 29—31.
18. Hammond G. L., Smith C. L., Paderson N. A. M., Sibal W. J. // J. clin. Endocr. Metab.— 1990.— Vol. 71.— P. 34—39.
19. Hornbeck W., Sehnebli H. P. // Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.— 1982.— Bd 363.— S. 455—458.
20. Jan R., Goris A., Theo P. A. et al. // Arch. Surg.— 1985.— Vol. 120.— P. 1109—1115.
21. Janoff A., Scherer J. // J. exp. Med.— 1968.— Vol. 128.— P. 1137—1151.
22. Janoff A., Zeligs J. D. // Science.— 1968.— Vol. 161.— P. 702—704.
23. Janusz M.-J., Doherty N. S. // J. Immunol.— 1991.— Vol. 146.— P. 3922—3928.
24. Jochum M., Lander S., Heimburger N., Fritz H. // Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.— 1981.— Bd 362.— S. 103—112.
25. Jochum M., Fritz H. // Selected Topics in Clinical Enzymology / Ed. D. M. Goldberg, M. Werner.— Berlin, 1983.— Vol. 2.— P. 13—18.
26. Kaplan A. P., Silverberg M., Dunn J. T., Ghebrehiwet B. // Ann. N. Y. Acad. Sci.— 1981.— Vol. 389.— P. 25—38.
27. Kleniewski J., Donaldson V. // J. exp. Med.— 1988.— Vol. 167.— P. 1895—1908.
28. Kramer M. D., Mueller-Bardorf M., Simon M. M. et al. // J. immunol. Meth.— 1990.— Vol. 131.— P. 41—48.
29. Maimardi C. L., Dixit S. N., Kang A. H. // J. biol. Chem.— 1980.— Vol. 255.— P. 5435—5441.
30. Morii M., Odani S., Ikenaka T. // J. Biochem. (Tokyo).— 1979.— Vol. 86.— P. 915—921.
31. Nakajima K., Powers G. C. et al. // J. biol. Chem.— 1979.— Vol. 254.— P. 4027—4032.
32. Neumann S., Hennrich N., Gunzer G., Lang H. // J. clin. Biochem.— 1981.— Vol. 19.— P. 238.
33. Perlmutter D. H., Pierke J. A. // Amer. J. Physiol.— 1989.— Vol. 257.— P. L147—L162.
34. Polacek D., Byrne R. E., Scannu A. M. // J. Lipid Res.— 1988.— Vol. 29.— P. 797—808.

35. Riess H., Jochum M., Machleidt W. et al. // Transplantation.— 1991.— Vol. 52.— P. 482—484.
 36. Straus S. D., Fells G. A., Wewers M. D. et al. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1985.— Vol. 130.— P. 1177—1184.
 37. Travis J., Salvesen G. S. // Ann. Rev. Biochem.— 1983.— Vol. 52.— P. 655—709.
 38. Visser L., Blout E. R. // Biochim. biophys. Acta.— 1972.— Vol. 268.— P. 257—260.

Поступила 29.07.93

DETECTION OF HUMAN LEUKOCYTE ELASTASE IN THE COMPLEX WITH BLOOD PLASMA α_1 PROTEINASE INHIBITOR BY ITS ENZYMATIC ACTIVITY WITH SYNTHETIC SUBSTRATE.

V. L. Dotsenko, E. A. Neshkova, G. A. Yarovaya

Central Institute for Postgraduate Training of Physicians, Moscow.

A spectrophotometric procedure was developed for estimation of elastase activity in human leukocytes in the form of complex with blood serum α_1 proteinase inhibitor after loosening of the complex and detection of the enzymatic activity with N-tert-buthydroxy-carbonyl-Ala-p-nitrophenyl ester as a substrate in presence of acetone or acetonitrile. The optimal conditions were described, which were required for estimation of the enzyme 100 % activity followed by addition of the leukocyte elastase standard preparation into blood serum as well as for measurement of the enzyme activity in the complex with α_1 proteinase inhibitor. The procedure took 6-10 min to evaluate the elastase activity in the complex with the inhibitor using simple buffer containing organic solvents at 30° and the available two-beam spectrophotometer.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 615.355:577.152.344.042.2] 012

Н. И. Ларионова, Н. Г. Балабушевич,
 И. П. Гладышева, Н. А. Мороз, Н. Ф. Казанская,
 О. В. Полехина, И. А. Донецкий

ПРИРОДНЫЕ ИНГИБИТОРЫ ПРОТЕИНАЗ КАК ОСНОВА ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

МГУ им. М. В. Ломоносова

Препараты на основе белковых ингибиторов протеиназ (БИП) различного происхождения прочно вошли в мировой арсенал фармацевтических средств при лечении заболеваний, связанных с дисбалансом систем протеолиза в организме. Лекарственные средства, содержащие основной панкреатический ингибитор протеиназ (ВРТИ), эффективно регулируют активность систем кининообразования, гемокоагуляции, фибринолиза и комплемента [20], нормализуют антипротеиназные ресурсы крови [1], служат протекторами клеточных повреждений [12], стабилизируют проницаемость мембран, препятствуют выходу протеаз из лизосом, тормозят активность нейтральных протеиназ поврежденных тканей и лейкоцитов, нормализуют воспалительную реакцию и уменьшают зону некроза [1]. В связи с этим лекарственные препараты ВРТИ используют при терапии острого панкреатита, шоков различной этиологии, гиперфибринолитических кровотечений, инфаркта миокарда, механических и термических травм, лучевой болезни, артрозо-артритов и т.д. [1, 13, 31]. Классический соевый ингибитор типа Баумана — Бирк (ВВИ) изучается пока лишь в эксперименте в качестве

эффективного средства при лечении экспериментальной эндотоксемии [19] и злокачественных новообразований [32]. Работами группы А. Кеннеди [29] подготовлены данные для получения разрешения на клинические испытания антиканцерогенного действия экстракта, содержащего ВВИ.

Существенным недостатком указанных БИП является быстрое удаление из кровотока после внутривенной инъекции благодаря распределению во внеклеточной жидкости, последующей аккумуляции в почках и выведению через них [18, 28]. Это обусловлено низкими молекулярными массами ВРТИ и ВВИ, которые составляют соответственно 6500 и 8000. Высокая концентрация БИП в крови при терапии может быть достигнута либо при длительном внутривенном введении, что связано со значительными затратами препаратов, либо путем пролонгирования их действия. С целью создания высокоэффективных пролонгированных препаратов БИП предложены конъюгаты с биосовместимыми полисахаридами на основе кровезаменителей — клинического декстрана и оксиэтилкрахмала (ОЭК).

Настоящая статья посвящена синтезу, характеристике свойств и применению двух конъюгатов: ВРТИ с карбоксиметилловым эфиром декстрана (ВРТИ-КМД) и ВВИ с ОЭК (ВВИ-ОЭК).

Методика. В работе использованы ингибиторы (опытные образцы ВНИИТКГП и ПО «Белмедпрепараты»), гордокс («Gedeon Richter»), апротинин («Novo»), КМД (опытный образец ПО «Белмедпрепараты»), ОЭК (опытный образец ВНИИТКГП), трипсин («Srofa»), α -химотрипсин (Олайнский завод химреактивов), панкреатический калликреин свиньи (1480 КУ/мг, любезно предоставлен проф. Фидлером, Германия), Bz-Arg-OEt, Bz-Tyr-OEt, Meo-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNA («Sigma»).

Классический ВВИ выделяли из соевых бобов по модифицированному нами методу [27], эластазу лейкоцитов человека — по методу [14].

Обратнофазовую гидрофобную жидкостную хроматографию высокого давления (ЖХВД) препаратов ВРТИ проводили, как описано в работе [21], а препаратов ВВИ — на колонке Zorbax C8 («Du Pont») в системе ацетонитрил — вода при скорости элюирования 1 мл/мин.

Препараты ВРТИ, модифицированные КМД, получали по методике [6, 8]. ВВИ-ОЭК синтезировали по методу [26]. Активность препаратов

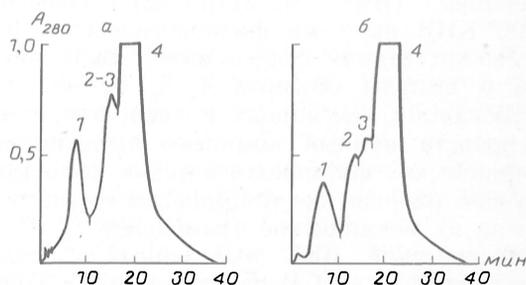


Рис. 1. Сравнительный анализ нативных препаратов ВРТИ — ингибитора (а) и апротинина (б) — на носителе Nucleosil 10с18.

Содержание (в %) фракции а: 1 — 9, 2, 3 — 14, 4 — 77, фракции б: 1 — 8, 2 — 5, 3 — 6, 4 — 81.

Свойства модифицированных препаратов БИП

Препарат БИП	Активирующий агент	Массовое соотношение БИП/полисахарид при синтезе	pH	Количество белка, мг на 1 г препарата	Сохранение антитриптической активности белка, %	Источник литературы
ПЭК ВРТИ с КМД		1:8	5,7	147	100	[7]
		1:2,5		670	53	
ВРТИ-КМД	Растворимый карбодинимид	1:2,5	4,7	45	58	[6]
		1:1,25		98	28	
ВРТИ-КМД (через ПЭК)	То же	1:2,5	4,7	130	50	[6]
		1:2,5	5,7	230	40	
		1:2,5	6,2	220	60	
		1:2,5	7,6	85	100	
ВВИ-ОЭК	Хлористый цианур	1:10	8,5	3		[26]
		1:1		6		

БИП определяли по методу [4], константы диссоциации (K_1) рассчитывали по методу [15].

Исследование фармакокинетики нативного ВРТИ и ВРТИ-КМД проводили, как описано в работе [8, 9]. Фармакокинетику ВВИ изучали при тех же дозах и способе введения, что и в работе [28].

Результаты и обсуждение. Выделение и свойства нативных препаратов ВРТИ и ВВИ. Из-за отсутствия в России производства отечественных медицинских препаратов БИП лекарственные препараты, содержащие ВРТИ, закупаются в ограниченных количествах за рубежом: гордокс в Венгрии, контрикал и трасилол в Германии, антагозан в Дании и т.д. Нами разработана технология получения ВРТИ из поджелудочной железы крупного рогатого скота. Процесс прост и позволяет из отходов производства инсулина крупного рогатого скота путем ионообменной хроматографии, химической очистки, высаливания, гель-хроматографии и осаждения получить с высоким выходом субстанцию ВРТИ медицинского назначения, получившую название ингипрол (ВФС 42-2175—92). Качество ингипрола подтверждено высоким содержанием основного вещества (не менее 5000 КИЕ/мг), физико-химическими и биологическими исследованиями. Методом обратнофазовой гидрофобной ЖХВД (рис. 1) показано, что по времени удерживания и относительному содержанию неидентифицированных примесей и основного вещества ингипрол и апротинин («Novo», Дания) очень близки.

На основе субстанции во ВНИИТКГП создана лекарственная форма ВРТИ — «ингипрол для инъекций» (ВФС 42-2176—92), содержащая 10 000 КИЕ на 1 мл физиологического раствора. Лекарственная форма может быть расфасована в ампулы объемом 2, 5, 10 мл.

Субстанция «ингипрол» и лекарственная форма прошли полный комплекс предклинических и клинических фармакологических исследований, получено разрешение Фармакологического комитета на их медицинское применение.

Классический ВВИ, выделенный с помощью хроматографии на СМ-целлюлозе и DE-ТоуореагI 650 M, является гомогенным, что доказано методами капиллярного электрофореза НРЕ-100, обратнофазовой гидрофобной ЖХВД [26]. Аминокислотный состав выделенного нами ВВИ полностью совпадает с аминокислотным составом

классического соевого ингибитора ВВИ [27].

Как ВРТИ, так и ВВИ ингибируют трипсино- и химотрипсиноподобные протеиназы. Наиболее важным свойством ВВИ является способность эффективно ингибировать нейтральные протеиназы гранулоцитов человека — эластазу и катепсин G [11]. ВВИ в отличие от ингибиторов семейства ВРТИ является двуглавым, который связывает одновременно трипсин по реактивному центру Lys16-Ser17, а химотринсин и эластазу лейкоцитов человека — по Leu43-Ser44 [24].

Синтез и характеристика модифицированных препаратов БИП. Высокомолекулярные производные БИП получали путем нековалентного и ковалентного связывания с упомянутыми полисахаридами.

Изучение взаимодействия между карбоксилсодержащим носителем — КМД и ВРТИ — основным белком с рI 10,5 показало, что в различных условиях (табл. 1) наблюдается образование прочных полиэлектролитных комплексов (ПЭК) состава КМД: (ВРТИ)_n, где n — варьирует от 1 до 20. Причем увеличение количества ионно-связанного ингибитора на кислом полисахариде приводит к одновременному понижению его ингибирующей активности, объясняющемуся достаточно сильным сближением молекул ингибитора, что создает серьезные стерические затруднения для взаимодействия их реактивных центров с протеиназой [7].

Для ковалентного связывания ВРТИ с КМД предложено два способа [6]. Первый способ предполагает реакцию ВРТИ с активированными карбодиимидом карбоксильными группами КМД. Аминогруппа остатка Lys15 реактивного центра ВРТИ может быть при этом модифицирована, следствием чего является понижение антитриптической активности конъюгата.

Для предотвращения участия аминогруппы реактивного центра ВРТИ при ковалентном связывании с активированной молекулой полисахарида второй способ модификации предполагает предварительное образование ПЭК между ионизированными карбоксильными группами КМД и аминогруппами ВРТИ с последующим образованием ковалентных связей между ними при добавлении карбодиимида. Как видно из табл. 1, это приводит к 2—3-кратному увеличению количества связанного белка по сравнению с препаратами, полученными по первому способу, при котором карбоксильные группы превращены в

О-ацильное производное мочевины, поэтому в этом случае не наблюдается локального концентрирования молекул ВРТИ вблизи полимерных цепей носителя.

При изучении процесса ковалентного связывания ВРТИ, предварительно образовавшего ПЭК с КМД, было обнаружено, что количество связанного белка на единицу массы препарата сильно зависит от величины рН среды в реакции с карбодиимидом, причем зависимость имеет экстремальный характер (см. табл. 1). Как показано в работе [23], оптимальное значение рН для реакции модификации карбоксильных групп карбодиимидом равно величине их рК. Более высокое значение рН-оптимума реакции модификации ВРТИ биополимером, содержащим карбоксильные группы, с помощью карбодиимида по сравнению с рН-оптимумом модификации белков тем же карбодиимидом, равным 4,75 [23], объясняется более высоким в сравнении с величинами рК_к карбоксильных групп белка значением рК_{каж} карбоксильных групп КМД, равным, как измерено нами, 6,2. Вследствие этого для связывания большего количества белка с карбоксилсодержащими полимерами необходимо проводить реакцию с карбодиимидом при рН, равном рК карбоксильных групп носителя.

В то время как модификация ВРТИ водорастворимыми полимерами практически не сказывается на константе ингибирования трипсина (табл. 2), она оказывает существенное влияние на ингибирование высокоспециализированных кининогеназ — калликреинов плазменного и тканевого происхождения, ответственных за образование медиаторов воспаления, — брадикинина и Lys-брадикинина. Сродство ВРТИ-КМД к панкреатическому калликреину свиньи по сравнению с нативным ингибитором уменьшается примерно в 300 раз, а к калликреину плазмы человека — в 14 раз [10]. Различное влияние ковалентного присоединения ВРТИ к полимерной матрице на его ингибиторные свойства по отношению к калликреинам плазменного и тканевого происхождения выявляет существенные различия в организации активного центра этих двух структур и функционально различных кининогеназ. Наличие двух выступающих полипептидных петель в районе связывающего участка активного центра панкреатического калликреина [16] стерически затрудняет образование прочных контактов с ВРТИ-КМД, имеющим объемные полимерные цепи по соседству с реактивным центром ингибитора.

Полученные результаты указывают, что для создания высокомолекулярного препарата ВРТИ, сохраняющего свой антипротеазный спектр, не-

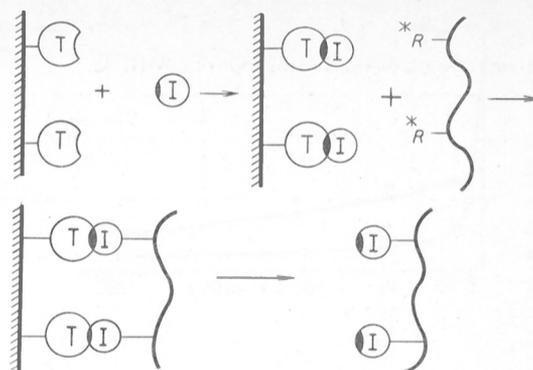


Рис. 2. Схема защиты реактивного центра ВРТИ при получении конъюгатов от модификации путем комплексообразования с иммобилизованным трипсином.

Т — трипсин; I — ингибитор.

обходим поиск более мягких методов иммобилизации, обеспечивающих правильную ориентацию макромолекул ингибитора. Учитывая тот факт, что для эффективного ингибирования панкреатического калликреина необходимо осуществление плотного контакта фермента с остатками Arg17 и Arg39 молекулы ВРТИ [16], которые в свою очередь включаются во взаимодействие с трипсином, мы использовали комплексообразование с иммобилизованным трипсином для экранирования области контакта с протеиназами от модификации водорастворимыми полимерами (рис. 2). Защита реактивного центра ВРТИ при образовании комплекса с иммобилизованным трипсином позволяет получить высокомолекулярный препарат ВРТИ, содержащий в 2,5 раза большее количество молекул ингибитора, активных по отношению к панкреатическому калликреину, т.е. находящихся в конформации, обеспечивающей элементарное взаимодействие с кининогеназой.

Синтез конъюгатов ВВИ с ОЭК с помощью хлористого цианура в качестве активирующего агента приводит к получению производных, содержащих небольшое количество белка в препаратах (см. табл. 1). Аналогичный результат получен нами при модификации ВРТИ нейтральным носителем — клиническим декстраном, активированным хлорпроизводными симм. триазина [4]. Это связано с тем, что при данном методе синтеза, как нами показано [5], происходит поперечное связывание макромолекул носителя между собой как на стадии активации, так и через макромолекулу белка, содержащую в данном случае 5 ε-аминогрупп и 2 гидроксильные группы остатков тирозина.

Таблица 2

Константы ингибирования протеиназ нативными и модифицированными препаратами БИП

Препарат БИП	Массовое соотношение БИП/носитель при синтезе	K _i , нМ				
		трипсин	панкреатический калликреин свиньи	каликреин плазмы человека	α-химотрипсин быка	эластаза гранулоцитов человека
ВРТИ		0,1	0,38	34	0,8 [30]	3700 [20]
ВРТИ-КМД	1:2,5	0,1	110	450		
ВВИ		0,1			6,4	2
ВВИ-ОЭК	1:10	200			200	120
ВВИ-ОЭК	1:1	400			200	300

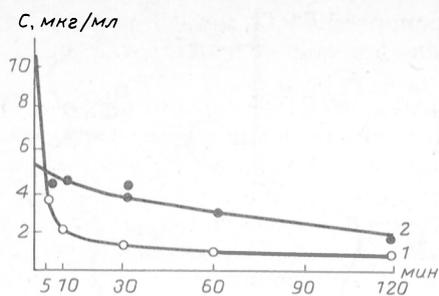


Рис. 3. Выведение препаратов нативного ВРТИ (1) и ВРТИ-КМД (2) из кровотока крыс после внутрисердечного введения в дозе 10 000 КИЕ/кг.

Измерение величин K_i трипсина, α -химотрипсина и эластазы гранулоцитов человека (см. табл. 2) показывает, что эффективность ингибирования уменьшается при модификации ВВИ. Увеличение содержания белка в препарате слабо влияет на величину K_i для ВВИ-ОЭК. Наблюдаемое снижение эффективности ингибирования протеиназ, по-видимому, обусловлено стерическими затруднениями для осуществления множественных контактов между ферментом и ингибитором, модифицированным объемным полисахаридом. Различный характер влияния модификации ВВИ ОЭК на ингибирование 3 изученных протеиназ связан с наличием различных центров связывания для трипсина, а также химотрипсина и эластазы в молекуле ВВИ. Более сильное увеличение K_i трипсина может быть связано с алкилированием ϵ -аминогруппы остатка Lys16 в трипсинсвязывающем центре, следствием которого является потеря активности частью молекулы ингибитора (величины K_i для препаратов ВВИ-ОЭК, приведенные в табл. 2, были рассчитаны нами для всех протеиназ, исходя из общей концентрации белка в препарате), в то время как наиболее важный для потенциального терапевтического применения антихимотрипсинный центр ВВИ непосредственно не реагирует с активированными гидроксильными группами носителя.

Модифицированный ВВИ сохраняет способность к одновременному связыванию трипсина и эластазы гранулоцитов, что было доказано при ингибировании эластазы (9 нМ) комплексом трипсина и ВВИ-ОЭК (40 нМ). При этом снижение активности эластазы наблюдалось без возвращения активности трипсина.

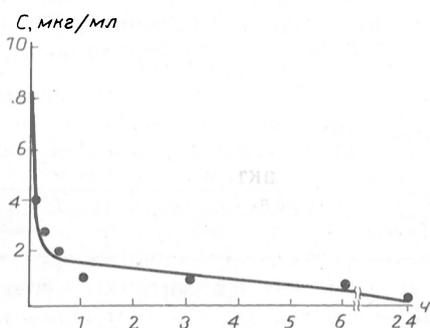


Рис. 4. Кинетика элиминации нативного ВВИ в крови мышей после внутривенного введения препарата в дозе 3 мг/кг.

Полученный результат говорит о достаточной пространственной доступности ВВИ в составе конъюгата с ОЭК. Этот вывод подтверждается тем фактом, что конъюгат ВВИ-ОЭК способен реагировать с антителами к нативному ингибитору, что свидетельствует о сохранении антигенных детерминант при модификации ВВИ ОЭК.

Фармакокинетика модифицированных препаратов ВВИ

Ранее проводились фармакокинетические исследования нативных ВРТИ [18] и ВВИ [28] при внутривенном введении нескольким видам животных. Однако количественный обсчет фармакокинетических данных в литературе не проводился. В связи с этим нами была изучена фармакокинетика нативного ВРТИ и его конъюгата с КМД у крыс и нативного ВВИ у мышей и проведен статистический анализ полученных данных. На рис. 3 представлена динамика изменения концентрации термокислостабильного ингибитора протеиназ в сыворотке крови крыс при введении препаратов, содержащих ВРТИ. Фармакокинетика ПЭК ВРТИ с КМД в крови крыс практически не отличалась от таковой нативного ингибитора, что было связано с обнаруженной нами диссоциацией ПЭК при контакте с сывороткой крови, по-видимому, из-за замещения ВРТИ другими белками крови. На рис. 4 показано выведение нативного ВВИ из крови мышей.

Фармакокинетику нативных ВРТИ и ВВИ в крови описывали уравнением двухкамерной модели:

$$C(t) = A_1 e^{-\alpha t} + A_2 e^{-\beta t}$$

Для ВРТИ-КМД адекватным математическим описанием кинетики элиминации из крови служило уравнение однокамерной модели:

$$C(t) = C_0 e^{-k_{el} t}$$

Основные фармакокинетические параметры препаратов, содержащих ВВИ, приведены в табл. 3.

Обращает на себя внимание быстрая фаза распределения (α -фаза) нативных ВРТИ и ВВИ, причем удельные объемы распределения (уд. V_1) в 2—4 раза превышают удельный физиологический объем крови, что свидетельствует об

Таблица 3

Основные фармакокинетические параметры препаратов, содержащих ВРТИ и ВВИ

Параметр	Препарат		
	ВРТИ	ВВИ	ВРТИ-КМД
A_1 , мкг/мл	9,0	7,2 (>100)	
α , мин ⁻¹	0,31 (12)	0,178 (58,5)	
A_2 , мкг/мл	1,8 (17)	1,86 (51,7)	
β , мин ⁻¹	0,010 (33)	0,0033 (69,3)	
C_0 , мкг/мл	10,8	9,1	5,3 (10)
$K_{эл}$, мин ⁻¹	0,05	0,015	0,01 (36)
MRT, мин	64	293	101
уд. V_1 , мл на 1 г массы	0,15	0,335	0,18
AUC; мкг/мл \times мин	207	857	541
уд. CLp, мл/мин \cdot г	0,008	0,0035	0,002

Примечание. В скобках — относительная ошибка (в %).

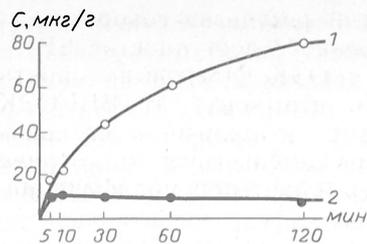


Рис. 5. Кинетика накопления препаратов нативного ВРТИ (1) и ВРТИ-КМД (2) в почках крыс после внутрисердечного введения в дозе 10 000 КИЕ/кг.

интенсивном и быстром захвате ингибиторов тканями из крови. Полувремя элиминации из крови для нативных ВРТИ и ВВИ равно 14 и 46 мин соответственно. Среднее время пребывания ВВИ в организме (MRT) в 5 раз превышает таковое ВРТИ из-за более медленной фазы выведения (β -фазы).

Модификация ВРТИ КМД приводит к уменьшению константы элиминации препарата из крови в 5 раз и соответственному увеличению полувремени элиминации из крови до 70 мин.

Среднее время пребывания в организме ВРТИ-КМД в 2 раза превышает таковое нативного ингибитора.

Сопоставляя независимые от модели фармакокинетические параметры, такие, как площадь под кривой его кинетики в крови (АВС) и общий клиренс (С_{лр}) — объем крови, освобождающийся от препарата за 1 мин, можно заключить, что препарат ВРТИ-КМД в большем количестве циркулирует в системном кровотоке. Для него характерны значения общего удельного клиренса, примерно в 4—6 раз более низкие, чем у нативного ВРТИ.

Органом, элиминирующим ВРТИ из организма, являются почки. Процесс накопления ВРТИ в почках основан на сорбции основного белка на отрицательно заряженной плазматической мембране. Модификация ВРТИ карбоксилсодержащим полисахаридом снижает основность ингибитора, что может приводить к уменьшению его фиксации в почках (рис. 5). Тканевая доступность для почек, измеряемая как отношение площадей под фармакокинетическими кривыми в почках и крови крыс в интервале 0—2 ч, уменьшает-

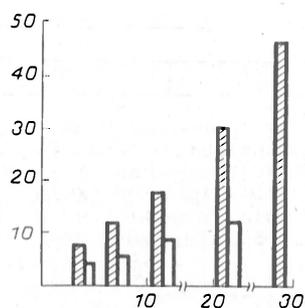


Рис. 6. Радиоактивность в моче крыс после внутрисердечного введения нативного ВРТИ (заштрихованные столбики) и ПЭК ВРТИ с КМД (светлые столбики) в дозе 300 000—400 000 имп. на 1 кг к данному моменту времени.

По оси абсцисс — время, ч; по оси ординат — радиоактивность, % от введенной дозы.

ся для препарата ВРТИ, модифицированного КМД, в 14 раз по сравнению с нативным ингибитором.

Для нативного ВРТИ ингибирующая активность, обнаруженная в почках после термокислотной обработки, ниже таковой меченого белка. Это свидетельствует о частичной инактивации ВРТИ в почках, по-видимому, под действием лизосомных протеиназ. На рис. 6 показана экскреция с мочой продуктов метаболизма ВРТИ и его ПЭК с КМД. Комплексообразование ВРТИ с кислым полисахаридом приводит к более медленному (в 3 раза) появлению радиоактивности в моче по сравнению с нативным ингибитором. Это связано, по-видимому, с уменьшенной проницаемостью стенки гломерулярных капилляров для высокомолекулярных веществ (с молекулярным радиусом более 4,2 нм) и большей устойчивостью ПЭК к перевариванию протеиназами.

Хотя фармакокинетические исследования для ВВИ-ОЭК не проводились, можно предполагать, что конъюгат будет намного дольше, чем нативный ВВИ, циркулировать в кровотоке. Носитель — ОЭК — имеет время полужизни 24 ч, он расщепляется амилолитическими ферментами и полностью выводится из организма лишь через 30 дней [3]. Если ВВИ-ОЭК будет иметь время жизни в организме, аналогичное таковому ОЭК, терапия модифицированными ВВИ может быть более действенной.

Терапевтическая эффективность препаратов, содержащих ВРТИ. Нативный ВРТИ был использован для изучения влияния ингибиторов на биохимические показатели морфофункционального состояния печени при токсическом поражении печени D-галактозамином (ДГА) [2] (Работа выполнена под руководством доцента кафедры неврологии № 2 Российского медицинского университета Л. В. Губского.) Данное поражение является удобной для исследования моделью, весьма близкой по характеру изменений к патологии человека при вирусном гепатите [25]. Наиболее наглядными для клинической оценки терапевтической эффективности ВРТИ на использованной модели являются показатели выживаемости животных и длительности времени от введения ДГА до начала развития острой печеночной энцефалопатии (ОПЭ). Как видно из табл. 4, при введении ВРТИ в суммарной дозе 20 000 КИЕ на 1 кг массы животного получено достоверное уменьшение на 50 % количества животных, у которых ОПЭ развилась в сроки до 28 ч. Увеличение суммарной дозы ингибитора до 75 000 КИЕ/кг приводило к значительному увеличению выживаемости животных.

В качестве биохимических показателей, характеризующих морфофункциональное состояние печени и протеолиз, использовали индекс Фишера [17], активность трипсиноподобных протеиназ и антитриптическую активность сыворотки крови. Индекс Фишера, представляющий собой величину отношения суммы молярных концентраций аминокислот с разветвленной цепью (валина, лейцина, изолейцина) к суммарному содержанию ароматических аминокислот (тирозина и фенилаланина), закономерно снижается при паренхиматозных гепатитах, что имеет определенное патогенетическое значение в развитии ОПЭ. В груп-

Таблица 4

Влияние ВРТИ на показатели поражения печени ДГА у кроликов (доза ДГА 4,25 ммоль/кг)

Показатель	До воспроизведения заболевания	Без лечения (n=19)	Суммарная доза нативного ВРТИ, КИЕ/кг	
			20 000 (n=9)	75 000 (n=6)
Выживаемость, %		0	0	33 (0,05 < p < 0,1)
Количество животных с ОПЭ, развившейся до 28 ч, %		70 (p < 0,05)	20 (p < 0,05)	
		Через 6 ч		
Индекс Фишера	2,9 ± 0,9	1,2 ± 0,2	1,9 ± 0,6	
		Через 2 ч		
Активность трипсиноподобных протеиназ, МЕ/мл	115 ± 20	7 ± 5	48 ± 8	
		Через 2 ч		
Антитриптическая активность, мг инактивированного трипсина на 1 мл	0,35 ± 0,02	0,47 ± 0,01 (p < 0,01)	0,42 ± 0,013 (p < 0,01)	

пе животных, получавших ВРТИ, снижение индекса Фишера было менее значительным по сравнению с группой животных, не получавших данный препарат.

Активность трипсиноподобных протеиназ сыворотки крови снижается после введения ДГА, достигая минимальных значений через 2—6 ч, причем степень снижения данного показателя у животных, получавших ВРТИ, была менее значительной (см. табл. 4). Подобные различия в группах животных без лечения и при внутривенном введении ВРТИ сохранялись в дальнейшем вплоть до гибели животных в состоянии ОПЭ.

Антитриптическая активность через 0,5 ч после введения ДГА в обеих группах животных уменьшалась в 1,5 раза по сравнению с исходным уровнем. Наши данные согласуются с наблюдениями Д. Кеплера и соавт. [25], которые отмечали уменьшение концентрации α_1 -антитрипсина (α_1 -АТ) в плазме крыс после введения ДГА. Патогенетическим механизмом дефицита α_1 -АТ являются, как показано в работе [22], ингибирование его гликозилирования в гепатоцитах, синтез α_1 -АТ, лишеного одной или двух углеводных цепей из трех, и ингибирование секреции измененного α_1 -АТ.

Через 2 ч антитриптическая активность у кроликов увеличилась, причем степень увеличения была более значительной у животных, не получавших ВРТИ. В дальнейшем практически отмечалась нормализация данного показателя, но тенденция к его более низкому значению у кроликов, леченных ВРТИ, сохранялась. Полученные результаты свидетельствуют об определенном терапевтическом эффекте ВРТИ на изучен-

Таблица 5

Выживаемость крыс с острым геморрагическим панкреатитом, леченных препаратами, содержащими ВРТИ (доза препарата 5000 КИЕ/кг)

Препарат	Число животных	Выживаемость, %	Продолжительность жизни погибших животных, сут
Без лечения	14	0	1,5 ± 0,5
ВРТИ	11	36	3,0 ± 0,5
ПЭК ВРТИ с КМД	10	100	

ной модели острой печеночной недостаточности. Данный эффект может быть связан со стабилизирующим действием ВРТИ на мембраны клеток печени и, возможно, гематоэнцефалического барьера [12], а также с его ингибирующим влиянием на протеолиз в ткани печени [13].

Препарат ПЭК ВРТИ с КМД был испытан сотрудниками кафедр госпитальной терапии № 1 и факультетской хирургии Свердловского государственного медицинского института А. В. Лирманом, Т. Н. Постниковой, В. А. Козловым и Ю. И. Барахманом при терапии геморрагического панкреатита у крыс. Результаты экспериментов представлены в табл. 5.

Более высокая эффективность ПЭК ВРТИ с КМД по сравнению с нативным ВРТИ может быть связана: во-первых, с обнаруженным при изучении фармакокинетики повышением уровня общей антитриптической активности сыворотки крови после введения ПЭК ВРТИ с КМД по сравнению с ее уровнем после введения нативного ингибитора. Увеличение общей ингибирующей активности означает повышение концентрации таких эффективных плазменных ингибиторов протеиназ, как α_1 -АТ и α_2 -макроглобулин; во-вторых, с более медленной экскрецией с мочой ПЭК ВРТИ с КМД по сравнению с нативным ВРТИ.

Таким образом, представленная работа свидетельствует об определенном прогрессе в области получения отечественных препаратов БИП медицинского назначения и перспективности использования нативных и пролонгированных препаратов БИП для лечения ряда модельных заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Веремеенко К. Н., Голобородько О. П., Кизим А. И. Протеолиз в норме и при патологии.— Киев, 1988.
2. Губский Л. В., Ларионова Н. И., Ляшенко Н. А. и др. // Теоретические, экспериментальные и прикладные исследования биологических систем.— М., 1991.— С. 270—273.
3. Кудряшов Л. И., Домбровский В. А., Алексеева Г. С. и др. // Биоорг. химия.— 1986.— Т. 12, № 6.— С. 812—818.
4. Ларионова Н. И., Казанская Н. Ф., Сахаров И. Ю. // Биохимия.— 1977.— Т. 42, № 7.— С. 1237—1243.
5. Ларионова Н. И., Казанская Н. Ф., Сахаров И. Ю. // Там же.— 1978.— Т. 43, № 5.— С. 880—886.
6. Ларионова Н. И., Казанская Н. Ф., Сахаров И. Ю., Березин И. В. // Там же.— 1979.— Т. 44, № 11.— С. 2033—2038.
7. Ларионова Н. И., Сахаров И. Ю., Унксова Л. Е. и др. // Высокомолекул. соединения.— 1981.— Т. 23—А, № 8.— С. 1823—1829.
8. Ларионова Н. И., Казанская Н. Ф., Митюшина Г. В. и др. // Хим.-фарм. журн.— 1984.— № 10.— С. 1167—1172.
9. Ларионова Н. И., Казанская Н. Ф., Митюшина Г. В. // Вопр. мед. химии.— 1985.— № 4.— С. 25—30.
10. Ларионова Н. И., Макевина Л. Г., Нартикова В. Ф. и др. // Биохимия.— 1987.— Т. 52, № 5.— С. 825—831.
11. Ларионова Н. И., Гладышева И. П., Тихонова Т. В., Казанская Н. Ф. // Там же.— 1993.— Т. 58, № 9.— С. 18—21.
12. Проценко В. А., Шпак С. // Успехи соврем. биол.— 1988.— Т. 106, № 2.— С. 255—263.
13. Сыновец А. С., Левицкий А. П. Ингибиторы протеолитических ферментов в медицине.— Киев, 1985.
14. Vaughn R., Travis J. // Biochemistry (Wash.).— 1976.— Vol. 15.— P. 836—841.
15. Bieth J. // Proteinase inhibitors.— Berlin, 1974.— P. 463—469.
16. Chen Z., Bode W. // J. molec. Biol.— 1983.— Vol. 164, N 2.— P. 283—311.

17. Fisher G. E., Funovics G. // Surgery.— 1975.— Vol. 78.— P. 279—290.
18. Fritz H., Oppitz K.-H., Meckl D. et al. // Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.— 1969.— Bd 350.— S. 1541—1550.
19. Fritz H. // Protein Degradation in Health and Disease.— Amsterdam, 1980.— P. 351—379.
20. Fritz H., Wunderer G. // Arzneimittel.— Forsch.— 1983.— Bd 33.— S. 479—494.
21. Gazdac M., Szepesi G. // J. Chromatogr.— 1981.— Vol. 218.— P. 603—612.
22. Gross V., Ludolph D., Berg D. V. et al. // Biochim. biophys. Acta.— Vol. 1036.— P. 143—150.
23. Hoare D. G., Kosland D. E. // J. biol. Chem.— 1967.— Vol. 242.— P. 2447—2453.
24. Kassel B. // Meth. Enzymol.— 1970.— Vol. 19.— P. 853—862.
25. Kepler D., Lesch R., Reutter W., Decker K. // Exp. molec. Path.— 1968.— Vol. 9.— P. 279—290.
26. Larionova N. I., Varlanov S. S., Sorochinskaya E. I. et al. // Russian Biochem. Biotechn. Express.— 1991.— Vol. 1, N 1.— P. 27—33.
27. Odani S., Ikenaka T. // J. Biochem. (Tokyo).— 1977.— Vol. 82, N 6.— P. 1513—1522.
28. Persiani S., Yeung A., Shen W. S., Kennedy A. R. // Carcinogenesis.— 1991.— Vol. 12.— P. 1149—1152.
29. Protease Inhibitors as Cancer Chemopreventive Agents / Eds. W. Troll, A. R. Kennedy.— New York, 1992.
30. Quast U., Engle J., Heumann H. et al. // Biochemistry (Wash.).— 1974.— Vol. 13.— P. 2512—2519.
31. Verstraete M. // Drugs.— 1985.— Vol. 29.— P. 236—261.
32. Witschi H., Kennedy A. R. // Carcinogenesis.— 1989.— Vol. 10.— P. 2275—2277.

Поступила 12.07.93

NATURAL INHIBITORS OF PROTEINASES AS A SOURCE OF NEW DRUGS.

N. I. Larionova, N. G. Balabushevich, I. P. Gladysheva, N. A. Moroz, N. F. Kazanskaya, O. V. Polekhina, I. A. Donetsky

M. V. Lomonosov State University, Moscow.

Isolation of the proteinases inhibitors, available for medicinal purposes, was described, where the inhibitor of the Kunitz type was obtained from bovine pancreas and the inhibitor of the Bowman-Birk type from soybeans. Screening of the immobilization procedures was carried out, which enabled the authors to produce the polymeric conjugates of the proteinase inhibitors exhibiting the maximal rate of activity against pancreatic proteinases and granulocyte elastases. Pharmacokinetics of the proteinase inhibitors obtained was studied. High molecular derivatives of the inhibitors from the bovine pancreas circulated in rat blood in larger quantities and longer, their total clearance was 5 times than native inhibitor preparations. The preparations containing these inhibitors from bovine pancreas exhibited a high therapeutic efficiency in treatment of rats with hemorrhagic pancreatitis and acute liver failure in rabbits.

на эту реакцию [5, 6]. Новые тромболитические агенты — тканевый активатор плазминогена и анизоил-плазминоген-стрептокиназа активаторный комплекс (АПСАК, «Eminase», «Beecham Pharmaceutical», Англия) — в отличие от стрептокиназы (СК) и урокиназы обладают высокой фибринспецифичностью [12]. Связывание АПСАК с фибрином происходит за счет взаимодействия лизинсвязывающих участков молекулы плазмин(оген)а и N-концевых остатков лизина фибрина. Показано, что сродство молекулы плазмин(оген)а к фибрину увеличивается при образовании эквивалентного комплекса плазмин(оген)-стрептокиназа (ПГ-СК), а наличие ацильного заместителя в активном центре не влияет на сорбционные свойства последнего [3, 7]. Фибрин ускоряет активацию плазминогена тканевым активатором (в 600 раз) и комплексом ПГ-СК (в 8 раз), но не влияет на активацию плазминогена урокиназой [9]. Однако обратимо инактивированный активатор АПСАК постепенно генерирует ферментативную активность в соответствии с константой скорости его деацилирования ($k_3=2,9 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$) [11]. Благодаря этому АПСАК по сравнению со всеми другими активаторами плазминогена обладает наибольшим временем полужизни в плазме [10]. Длительная циркуляция в кровотоке создает благоприятные условия для сорбции потенциально активного ацилактиватора к фибрину тромба, а следовательно, для пролонгирования тромболитика. Показано, что в отличие от урокиназы и СК АПСАК может поддерживать длительный лизис сгустка в системе *in vitro* даже после кратковременного контакта его со сгустком из плазмы [8].

В нашей лаборатории получен новый ацилированный плазмин(оген)-стрептокиназа активаторный комплекс (НАПСАК), который реактивируется в 1,5 раза медленнее ($k_3=2,0 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$), чем АПСАК [1].

Целью данной работы является изучение влияния сорбции НАПСАК к преформированным сгусткам на фибринолиз. Проведено сравнение сорбционных и фибринолитических свойств СК и двух препаратов НАПСАК, полученных разными способами. Изучена зависимость кинетики фибринолиза от времени предварительной сорбции и концентрации названных выше активаторов плазминогена.

Методика. В работе использовали СК, плазминоген и фибриноген производства предприятия диагностических и лекарственных средств Минздрава Беларуси, бычий тромбин производства Каунасского завода бакпрепаратов.

Соержание плазминогена в препарате фибриногена определяли путем активации последнего СК и измерении амидазной активности образовавшегося плазмина по гидролизу *p*-нитроанилида *N*-Д-Вал-Лей-Лиз (S-2251) на спектрофотометре «Shimadzu» ($\lambda=405 \text{ нм}$).

НАПСАК, тип 1 получали ацилированием свежеприготовленного комплекса ПГ-СК, полученного инкубацией плазминогена и СК в течение 10 мин при 0 °С, избытком ацилирующего агента в 0,05 М трис-НСI-буфере рН 7,4.

НАПСАК, тип 2 получали путем образования комплекса между плазминогеном и СК в присутствии избытка ацилирующего агента при 0 °С в 0,05 М трис-НСI-буфере рН 7,4.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 615.273.55.015.4.07

Р. Б. Айсина, Ю. В. Житкова, С. Д. Варфоломеев

СВЯЗЫВАНИЕ АЦИЛИРОВАННОГО АКТИВАТОРНОГО КОМПЛЕКСА ПЛАЗМИНОГЕН—СТРЕПТОКИНАЗА С ФИБРИНОМ И ФИБРИНОЛИТИЧЕСКИЙ ОТВЕТ *IN VITRO*

МГУ им. М. В. Ломоносова

Тромболитическая эффективность и величина побочных системных эффектов активаторов плазминогена зависят от их специфичности к фибрину, ферментативной активности по отношению к реакции активации плазминогена и влиянию фибрина

Зависимость начальной скорости фибринолиза плазменного сгустка от времени предварительного контакта его с 1,5 мкМ НАПСАК, тип 1 в плазме (37 °С)

Время контакта НАПСАК со сгустком, мин	Скорость лизиса сгустка, мм/мин	Отношение скоростей лизиса при кратковременном и непрерывном контакте
1	$1,06 \pm 0,02$	0,53
5	$1,16 \pm 0,02$	0,58
10	$1,24 \pm 0,03$	0,62
15	$1,40 \pm 0,03$	0,70
30	$1,60 \pm 0,03$	0,80
Непрерывный контакт	$2,00 \pm 0,05$	1,00

Примечание. После отмывания к сгусткам добавляли 0,05 М трис-НСI буфер рН 7,4.

течение 1—30 мин при 37 °С, затем надгелевую жидкость удаляли, сгустки промывали 300-кратным избытком 0,05 М трис-НСI-буфера рН 7,4 и добавляли свежую порцию буфера или плазмы и измеряли лизис сгустка первоначально сорбированным тромболитиком.

За кинетикой лизиса сгустка следили по изменению высоты (Δl) сгустка во времени с помощью катетометра [1]. Скорость фибринолиза (в миллиметрах в 1 мин) определяли как тангенс угла наклона начальных участков зависимостей Δl от Δt .

Результаты и обсуждение. На первом этапе была исследована зависимость кинетики лизиса сгустков из плазмы от концентрации НАПСАК, тип 1 при непрерывной инкубации его со сгустком и после кратковременного контакта с ними. Скорость лизиса измеряли, регистрируя расход твердого субстрата, а не накопление растворимых продуктов фибринолиза.

На рис. 1, а представлены кинетические зависимости лизиса сгустков при различных концентрациях НАПСАК (от 0,4 до 2,0 мкМ) в процессе непрерывной инкубации его со сгустком в буфере. На рис. 1, б представлены кинетические зависимости лизиса сгустков после 1-минутной инкубации их с различными концентрациями НАПСАК в буфере, последующего отмывания и переноса в буфер.

Из сравнения рис. 1, а и б видно, что скорость лизиса сгустка (тангенс угла наклона начальных участков зависимостей Δl от Δt) как при 1-минутном, так и при непрерывном контакте со сгустком повышается с увеличением концентрации добавленного ацилактиватора. Из рис. 1, б видно, что даже после 1-минутной инкубации с ацилактиватором лизис сгустка продолжается в течение 2—3 ч. По-видимому, в течение этого времени сорбированный за 1 мин на поверхности сгустка потенциально активный НАПСАК медленно деацилирует до свободного активаторного комплекса ПГ-СК, который активировал плазминоген сгустка и постепенно инактивируется. Потеря фибринолитической активности ацилактиватором через 2—3 ч может быть связана как с термической деградацией его, так и с инактивацией α_2 -антиплазмином, включенным в плазменный сгусток.

На рис. 1, в отображена зависимость скорости фибринолиза от концентрации добавленного НАПСАК при непрерывной инкубации его со сгустком и после 1-минутного контакта с ним. Дан-

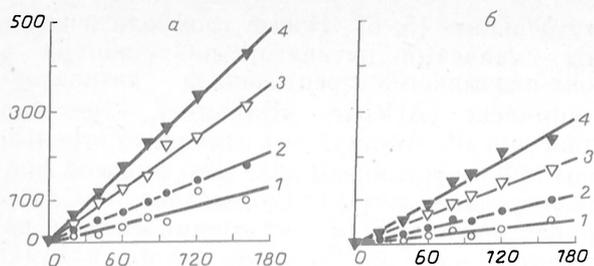


Рис. 1. Кинетика лизиса плазменных сгустков в буфере под действием различных концентраций НАПСАК, тип 1.

1 — 0,4 мкМ; 2 — 1,0 мкМ; 3 — 1,5 мкМ; 4 — 2,0 мкМ. Время контакта НАПСАК со сгустком в буфере: а — непрерывный контакт; б — 1 мин (рН 7,4, 37 °С); по осям абсцисс — время, мин; по осям ординат — уменьшение высоты столба фибринового геля, 10^{-2} мм; в — зависимость скорости фибринолиза от концентрации НАПСАК при непрерывном (1) и после 1-минутного (2) контакта со сгустком; по оси абсцисс — концентрация НАПСАК, тип 1, мкМ; по оси ординат — скорость уменьшения высоты столба фибринового геля, мм/мин.

Фибринолитическую активность полученных препаратов определяли по методу [4].

Для изучения кинетики фибринолиза плазменные сгустки формировали из бедной тромбоцитами плазмы крови человека добавлением 25 мкл раствора тромбина (50 ЕД/мл) к 0,9 мл плазмы в стеклянных пробирках диаметром 10 мм. Растворы перемешивали и инкубировали при 25 °С в течение 2 ч. В качестве надгелевой жидкости использовали 0,5 мл плазмы или 0,05 М трис-НСI-буфера рН 7,4. Аналогичным образом формировали сгустки из раствора фибриногена (3 мг/мл по коагулируемому белку), содержащего 0,3 % (в массовом соотношении) плазминогена.

Фибринолиз инициировали введением в надгелевую жидкость 10—100 мкл НАПСАК или СК. Концентрацию тромболитиков в надгелевой жидкости варьировали в пределах 0,4—2,0 мкМ.

Для оценки роли сорбции в фибринолизе сгустки инкубировали с тромболитиками в плазме в

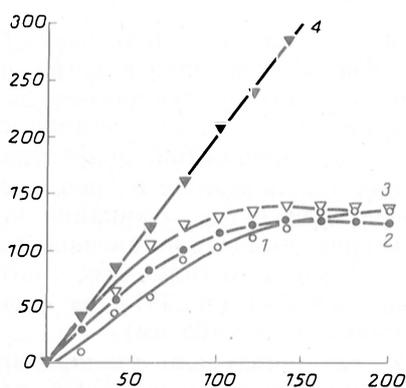


Рис. 2. Зависимость кинетики лизиса плазменных сгустков в буфере от времени их предварительного контакта с НАПСАК, тип 1 в плазме.

1 — 1 мин; 2 — 5 мин; 3 — 15 мин; 4 — непрерывный контакт. [НАПСАК] = 1,0 мкМ (рН 7,4, 37 °С). Здесь и на рис. 3 и 4: по оси абсцисс — время, мин; по оси ординат — уменьшение высоты столба фибринового геля, 10^{-2} мм.

ные результаты свидетельствуют, что после 1-минутного контакта со сгустком при всех концентрациях используемого ацилактиватора наблюдаемая скорость фибринолиза составляет 55—60 % от скорости при непрерывной инкубации тромболитика со сгустком. Причина этого явления, по-видимому, заключается в том, что равновесие между концентрацией НАПСАК в твердой и жидкой фазах устанавливается в течение первых минут.

Справедливость данного положения была подтверждена в серии экспериментов, в которой варьировалось время предварительного контакта НАПСАК со сгустком в интервале 1—30 мин. Результаты, представленные на рис. 2, демонстрируют, что с увеличением продолжительности взаимодействия НАПСАК со сгустком от 1 до 30 мин медленно повышается начальная скорость фибринолиза с 60 до 80 % от скорости, которая наблюдается при непрерывной инкубации. В табл. 1 суммирована зависимость начальной скорости фибринолиза от времени предварительной инкубации ацилактиватора со сгустком.

В данных экспериментах сорбция ацилактиватора к сгусткам исследовалась в лизирующих условиях. Следовательно, на поверхности фибрина в процессе его лизиса возникают новые N-концевые лизиновые остатки, которые являются дополнительными центрами связывания для НАПСАК. Поэтому медленное повышение начальной скорости фибринолиза с увеличением времени взаимодействия со сгустком от 1 до 30 мин, представленное в табл. 1, по-видимому, связано с увеличением как продолжительности контакта НАПСАК со сгустком, так и количества центров связывания активатора на фибрине. Тем не менее основная сорбция активатора происходит за 1 мин.

На следующем этапе оценивался вклад эндогенного α_2 -антиплазмина сгустка в кинетику фибринолиза под действием НАПСАК при кратковременном контакте со сгустком.

Нами ранее было показано [2], что пламиноген и ингибитор, включенные в сгусток, оказывают более значительное влияние на процесс фибринолиза плазмином и комплексом ПГ-СК, чем находящиеся в окружающей его жидкой фазе. Возможно, прекращение лизиса сгустка из плазмы сорбированным НАПСАК через 2—2,5 ч (см. рис. 2) вызвано ингибированием как реактивирующего активатора, так и плазмينا, образовавшегося из пламиногена, α_2 -антиплазмином, захваченным в сгусток. Даже при непрерывной инкубации ацилактиватора со сгустком из плазмы в буфере через 5 ч наблюдается замедление лизиса сгустка. С целью проверки данного предположения сгусток формировался из фибриногена, содержащего 0,3 % пламиногена и не содержащего ингибитор. Аналогично эксперименту, описанному выше, проводилась либо непрерывная, либо 1-минутная инкубация НАПСАК со сгустком в буфере.

Кинетическая зависимость лизиса такого сгустка под действием НАПСАК, тип 1 представлена на рис. 3. Как видно на рис. 3, после 1-минутной инкубации с НАПСАК лизис сгустка, не содержащего α_2 -антиплазмин, является более пролонгированным (более 5 ч) и более глубоким, чем при лизисе плазменного сгустка. Это свидетельствует о том, что α_2 -антиплазмин, включенный

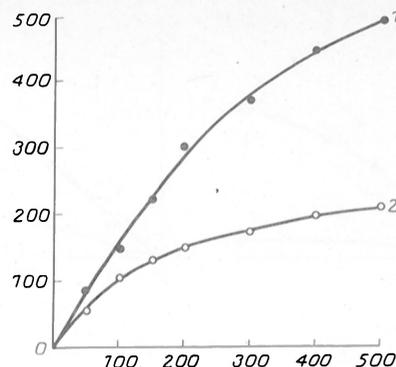


Рис. 3. Кинетика лизиса сгустка из фибриногена, содержащего примесь пламиногена, в буфере под действием НАПСАК, тип 1.

Время контакта НАПСАК со сгустком в буфере: 1 — непрерывный контакт, 2 — 1 мин. [НАПСАК]=1,0 мкМ (рН 7,4, 37 °С).

в сгусток, оказывает существенное влияние как на продолжительность, так и на глубину фибринолиза сорбированным НАПСАК. Прекращение лизиса в отсутствие ингибитора можно объяснить практически полной реактивацией НАПСАК к 5 ч реакции и параллельной потерей активаторной активности образовавшегося активаторного комплекса ПГ-СК в результате деградации молекулы стрептокиназы. По-видимому, этой же причиной можно объяснить замедление лизиса очищенных от α_2 -аниплазмина фибриновых сгустков при непрерывной инкубации их с НАПСАК (см. рис. 3, 1).

В следующей серии экспериментов было проведено сравнение фибринолитических, активаторных и сорбционных свойств СК и ацил-активаторного комплекса, полученного двумя способами. СК является наиболее распространенным в нашей стране лекарственным препаратом, используемым при тромболитической терапии. Активаторный комплекс ПГ-СК, образующийся *in situ* из пламиногена плазмы и внесенной СК, вызывает активацию пламиногена и образование локально высоких концентраций плазмينا в плазме крови, окружающей сгусток. В результате этого наряду с лизисом фибринового сгустка происходит значительное снижение системных концентраций пламиногена, α_2 -антиплазмينا и фибриногена. В отличие от всех предыдущих экспериментов сравнение свойств ацил-активаторных комплексов двух типов и СК проведено в системе, максимально приближенной к условиям *in vivo*. Для того чтобы определить роль пламиногена и α_2 -антиплазмينا в процессах, происходящих в жидкой и твердой фазах, как предварительная сорбция НАПСАК и СК к плазменным сгусткам, так и их последующий лизис сорбированным тромболитиком проводились в плазме.

В отдельных экспериментах нами была изучена стабильность НАПСАК, тип 2 и СК в плазме *in vitro* (37 °С) и найдено, что их время полужизни составляет 120 и 15 мин соответственно. Однако лизис плазменного сгустка в плазме под действием СК и НАПСАК продолжается более 4 ч (рис. 4). В связи с этим важно было оценить вклад сорбции НАПСАК и комплекса ПГ-СК в растворение сгустка в присутствии ингибитора и пламиногена.

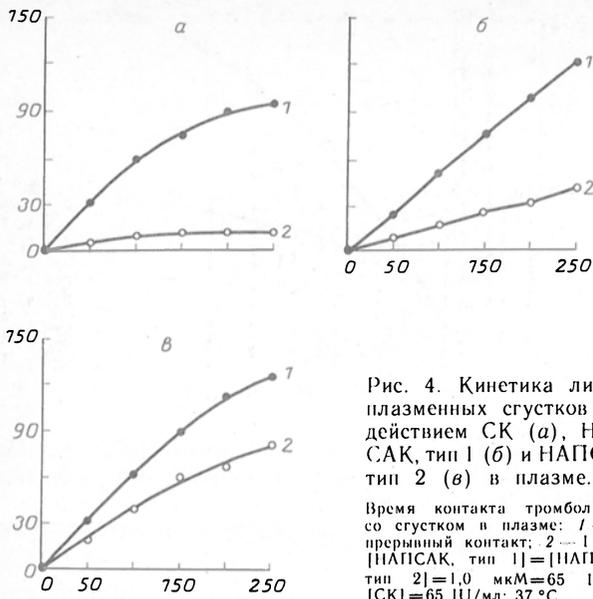


Рис. 4. Кинетика лизиса плазменных сгустков под действием СК (а), НАПСАК, тип 1 (б) и НАПСАК, тип 2 (в) в плазме.

Время контакта тромболитика со сгустком в плазме: 1 — непрерывный контакт; 2 — 1 мин. [НАПСАК, тип 1] = [НАПСАК, тип 2] = 1,0 мкМ = 65 IU/мл [СК] = 65 IU/мл; 37 °С.

НАПСАК, тип 2 получен путем образования комплекса между плазминогеном и СК в присутствии ацилирующего агента, поэтому молекула СК в нем меньше подвергнута протеолитической деградации, чем в НАПСАК, тип 1. При получении НАПСАК, тип 1 эквимольная смесь плазминогена и СК была инкубирована до добавления ацилирующего агента, в результате чего этот тип НАПСАК может содержать более деградированные молекулы СК.

На рис. 4. представлены кинетические зависимости лизиса плазменных сгустков в плазме при непрерывной и после 1-минутной инкубации их под действием НАПСАК, тип 1 и НАПСАК, тип 2 и СК. Плазменные сгустки после 1-минутной инкубации НАПСАК и СК в плазме отмывали буфером и возвращали в свежую плазму.

Как видно на рис. 4, а, несмотря на короткий период полужизни СК (15 мин), фибринолиз при непрерывной инкубации ее со сгустком продолжается около 4 ч. Однако после контакта СК со сгустком в течение 1 мин лизис сгустка прекращается через 1,5 ч. Длительный лизис сгустка при непрерывной инкубации СК в плазме можно объяснить тем, что СК активирует плазминоген не только на поверхности фибрина (как в экспериментах, описанных ранее), но и в надгелевой жидкости. Образующийся в плазме плазмин специфически сорбируется на фибрине и вносит дополнительный вклад в лизис сгустка. После инкубации СК со сгустком в течение 1 мин сгусток

лизируется только включенным в сгусток плазмином, который образуется при активации плазминогена сгустка под действием комплекса ПГ-СК, образующегося *in situ* на поверхности фибрина. Быстрое прекращение лизиса сгустка после 1-минутного контакта его с СК, по-видимому, связано с быстрой потерей активаторной активности свободным комплексом ПГ-СК. Дальнейшей активации плазминогена в плазмин на сгустке не происходит, и постепенно лизис прекращается.

Оба типа НАПСАК даже после 1-минутного контакта со сгустком лизируют его в течение более 4 ч (см. рис. 4, б, в). Это, вероятно, связано с большей стабильностью НАПСАК в плазме ($k_{\text{ин}} = 5,8 \cdot 10^{-3} \text{ мин}^{-1}$) по сравнению с СК ($k_{\text{ин}} = 4,6 \cdot 10^{-2} \text{ мин}^{-1}$), т. е. возможностью НАПСАК более длительно активировать плазминоген поверхности сгустка. На основании данных рис. 4 можно оценить вклад предварительной сорбции СК и ацилированных производных активаторного комплекса ПГ-СК.

Скорость лизиса в плазме под действием СК после 1-минутного контакта со сгустком составляет только 23 % от скорости, наблюдаемой при непрерывной инкубации СК со сгустком (см. рис. 4, а). Скорость лизиса сгустка под действием обоих типов НАПСАК после 1-минутного контакта со сгустком составляет 37 и 63 % типа 1 и 2 соответственно (см. рис. 4, б, в). Из этих результатов можно сделать вывод, что при одинаковой сорбционной способности свободного и ацилированного активаторного комплекса значительную роль в фибринолизе играет собственная активаторная активность тромболитика и его стабильность в плазме.

В табл. 2 представлены скорости фибринолиза, наблюдаемые при непрерывном и после 1-минутного контакта НАПСАК обоих типов и СК, а также отношение наблюдаемых скоростей (Б/А) в процентах, полученных в 3 сериях экспериментов. Из представленных результатов можно сделать вывод, что независимо от наличия в сгустке и надгелевой жидкости плазминогена и ингибитора НАПСАК, тип 2 демонстрирует большую относительную скорость лизиса после 1-минутного контакта со сгустком, чем НАПСАК, тип 1 и СК. Это связано, вероятно, с тем, что при данном способе получения НАПСАК сохраняется интактная структура молекулы СК и поэтому активаторная активность НАПСАК, тип 2 выше. Как видно из табл. 2, преимущество НАПСАК, тип 2 перед другими тромболитиками проявляется в большей степени в системе, приближенной к *in vivo* (плазмен-

Таблица 2

Лизис сгустка при непрерывной и 1-минутной инкубации различными тромболитиками в 3 системах (рН 7,4, 37 °С); [НАПСАК, тип 1] = [НАПСАК, тип 2] = 1 мкМ = 65 IU/мл [СК] = 65 IU/мл

Состав сгуста и надгелевой жидкости	Время контакта со сгустком	Скорость фибринолиза, мм/мин		
		СК	НАПСАК, тип 1	НАПСАК, тип 2
Сгусток из фибриногена — буфер	А. Непрерывный	1,35 ± 0,04	2,55 ± 0,07	2,65 ± 0,05
	Б. 1 мин	0,75 ± 0,02	1,65 ± 0,05	1,77 ± 0,05
	Б/А · 100, %	55	65	67
Сгусток из плазмы — буфер	А. Непрерывный	1,42 ± 0,05	1,95 ± 0,06	—
	Б. 1 мин	0,69 ± 0,04	1,10 ± 0,05	—
	Б/А · 100, %	48	64	—
Сгусток из плазмы — плазма	А. Непрерывный	0,65 ± 0,03	0,52 ± 0,03	0,63 ± 0,03
	Б. 1 мин	0,15 ± 0,02	0,18 ± 0,03	0,40 ± 0,04
	Б/А · 100, %	23	37	63

ный сгусток и надгелевая жидкость — плазма). В связи с этим НАПСАК, тип 2 можно рассматривать как перспективный тромболитический агент для терапии артериальных и венозных тромбозов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Айсина Р. Б., Попова Г. Ю., Еремеев Н. Л., Казанская Н. Ф. // Укр. биохим. журн.— 1990.— Т. 63, № 2.— С. 27—31.
2. Aisina R. B., Zhilkova Yu. V., Bashkov G. V., Varfolomeev S. D. // International Society on Thrombosis and Haemostasis, Congress 14-th: Abstracts.— New York, 1993.— P. 1266.
3. Banton C., Overell B. // Drugs.— 1987.— Vol. 33, Suppl. 3.— P. 93—96.
4. Christensen L. R. // J. clin. Invest.— 1949.— Vol. 28.— P. 163.
5. Fears R. // Semin. Thrombos. Haemostas.— 1989.— Vol. 15, N 2.— P. 129—139.
6. Fears R. // Drugs.— 1987.— Vol. 33, Suppl. 3.— P. 69—74.
7. Fears R., Ferres H., Standing R. // Ibid.— P. 51—56.
8. Fears R., Green J., Smith R., Walker P. // Thrombos. Res.— 1985.— Vol. 38, N 3.— P. 251—260.
9. Fears R., Hibbs M., Smith R., Walker P. // Biochem. J.— 1985.— Vol. 229.— P. 555—558.
10. Ferres H. // Drugs.— 1987.— Vol. 33, Suppl. 3.— P. 33—50.
11. Smith R., Dupe R., English P., Green J. // Nature.— 1981.— Vol. 290.— P. 505—508.
12. Walker I., Davidson J. // Semin. Thrombos. Haemostas.— 1987.— Vol. 13, N 2.— P. 139—145.

Поступила 24.11.93

BINDING OF THE ACYLATED PLASMINOGEN-STREPTOKINASE ACTIVATOR COMPLEX TO FIBRIN AND THE FIBRINOLYTIC RESPONSE IN VITRO.

R. B. Aisina, Yu. V. Zhilkova, S. D. Varfolomeev

Department of Chemical Enzymology, Chemical Faculty, M. V. Lomonosov State University, Moscow.

Affinity and fibrinolytic properties of streptokinase and two new preparations of acylated plasminogen-streptokinase activator complexes, produced by dissimilar procedures, were studied. Even after 1-min exposure, blood clot lysis carried out by the acyl activating complex was continued in blood plasma more than for 4 hrs, while the streptokinase produced blood clot lysis was accomplished within 1.5 hrs. After 1 min contact with clot in blood plasma the rates of lysis by streptokinase and these acylated plasminogen-streptokinase activator complexes types 1 and 2 constituted 23 %, 37 % and 63 %, respectively, as compared with the rates detected during permanent contact of thrombolytics with blood clot. The activator properties of the thrombolytic agents itself and its stability in blood plasma were of importance even in similar affinity ability of free and acylated activating complexes.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 577.175.852:577.171.4:577.152.342

Ю. Е. Елисева, Л. В. Павлихина

Т. В. Шавгулидзе, Е. Мессина, А. Джаконелло, К. Салерно, Р. Перриконе

ЭНДОГЕННЫЙ АКТИВАТОР АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА

Институт биомедицинской химии РАМН, Москва, Отдел биохимии Римского университета, Клиника детских болезней, Рим, Медицинская клиника VI, Рим

Ангиотензинпревращающий фермент (АПФ, карбоксикапепсин, дипептидил-карбоксипептидаза А; КФ 3.4.15.1) отщепляет дипептиды с карбоксильного конца олигопептидов различного строе-

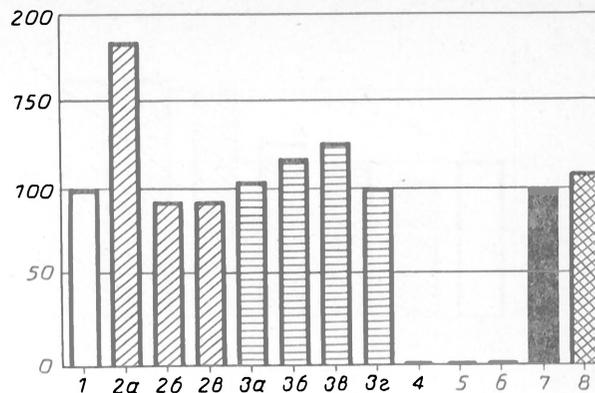


Рис. 1. Присутствие активатора АПФ в надосадках, полученных из суспензии нейтрофилов человека.

Полиморфноядерные лейкоциты промывали изотоническим буфером ФБС или НЕРЕС pH 7,4 в течение 5 мин. Клетки удаляли центрифугированием при 2000 g в течение 20 мин. Фермент инкубировали с надосадком в течение 15 мин, затем добавляли субстрат. Здесь и на рис. 2 и 3 по оси ординат — активность АПФ, %. 1 — контроль (фермент + субстрат); 2 — фермент + надосадок + субстрат [надосадки получены после одно (а), дву (б) и трех (в)-кратного промывания буфером]; 3 — фермент + надосадок + субстрат [надосадки получены после обработки нейтрофилов NH₄Cl с последующим одно (а), дву (б), трех (в) и четырех (г)-кратным промыванием буфером]; 4 — фермент + надосадок; 5 — субстрат + надосадок; 6 — фермент + 1 мкМ теотропид (ингибитор АПФ) + надосадок + субстрат; 7 — надосадок добавлен перед остановкой реакции; 8 — субстрат + надосадок (предынкубация 15 мин) + фермент.

ния [1, 3, 8, 9, 18, 19]. Превращая биологически неактивный ангиотензин I в прессорно-активный ангиотензин II и разрушая депрессорный брадикинин, АПФ играет ключевую роль в регуляции артериального давления [1, 8, 19]. Современные представления о распределении АПФ в организме, а также о его способности гидролизовать ряд физиологических пептидов позволяют предполагать участие АПФ в обмене нейропептидов и репродуктивных процессах [1, 7, 18]. Предполагается также, что он вовлечен и в реализацию ряда других функций, таких, как защитные и иммунные реакции организма.

Механизм регуляции активности АПФ в организме неясен. Известно только о влиянии некоторых гормонов (глюкокортикоиды, гормоны щитовидной железы, инсулин) на биосинтез фермента [15]. Имеются отдельные сообщения об обнаружении ингибиторов АПФ в крови [4, 12], лейкоцитах [2] и во многих органах человека [16].

Нами был обнаружен неизвестный ранее эндогенный фактор, вызывающий активацию АПФ. Активатор АПФ выделялся нейтрофилами человека, полученными из свежей крови донора.

Методика. Препараты, содержащие 90—98 % полиморфноядерных клеток и практически свободные от примеси эритроцитов, были получены в результате одноступенчатой процедуры [10], включающей центрифугирование гепаринизированной крови (50 мл), наложенной на «Mono-Poly Resolving Medium». Нейтрофилы промывали фосфатно-буферной системой (ФБС), приготовленной по методу [5], или НЕРЕС-буфером, содержащем NaCl для создания изотонической среды (объем 10 мл, концентрация $5 \cdot 10^6$ клеток на 1 мл). Клетки удаляли центрифугированием и исследовали влияние супернатантов на катализируемую АПФ реакцию. В опытах использовали высокоочищенный АПФ коры почек

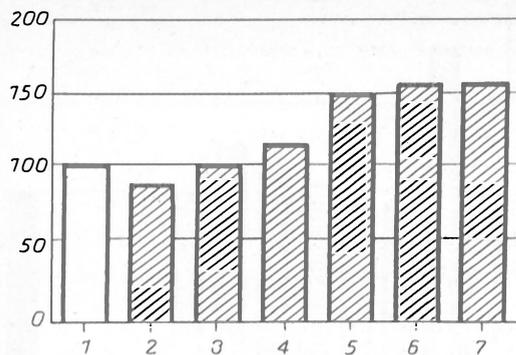


Рис. 2. Степень активации АПФ в зависимости от концентрации нейтрофилов.

Фермент инкубировали с надосадками, полученными из суспензий, содержащих нейтрофилы в разных концентрациях. 1 — контроль (фермент + субстрат); 2 — $2,0 \cdot 10^6$, 3 — $8,0 \cdot 10^6$, 4 — $3,0 \cdot 10^6$, 5 — $1,2 \cdot 10^6$, 6 — $5,0 \cdot 10^6$, 7 — $2,5 \cdot 10^6$ клеток на 1 мл.

быка. Активность АПФ определяли по расщеплению С-концевого трипептида ангиотензина I Z-Phe-His-Leu; количество отщепившегося His-Leu определяли флуориметрическим методом [3, 11] с ортофталевым диальдегидом. Реакцию проводили при 37 °С в 25 мМ барбиталовом буфере рН 7,4, содержащем 0,2 М NaCl.

Результаты и обсуждение. Надосадок, полученный после первого промывания нейтрофилов, вызывал увеличение скорости гидролиза субстрата Z-Phe-His-Leu в 1,6—2 раза по сравнению с контролем (рис. 1), что было обусловлено активацией АПФ. Надосадки, полученные при последующих промываниях клеток, активации АПФ не вызывали. Степень активации АПФ надосадком зависела от концентрации клеток в суспензии, из которой получали исследуемый раствор (рис. 2), и от количества внесенного в пробу надосадка. На флуоресценцию продукта реакции His-Leu (10 нмоль) надосадок влияния не оказывал. Он не содержал и соединений, которые вызывали бы флуоресценцию проб в отсутствие субстрата или гидролиз субстрата (см. рис. 1). Активация АПФ наблюдалась только после предварительной инкубации его с надосадком. В случае предынкубации надосадка с субстратом прост флуоресценции был незначительным. Предполагается, что активатор взаимодействует непосредственно с ферментом.

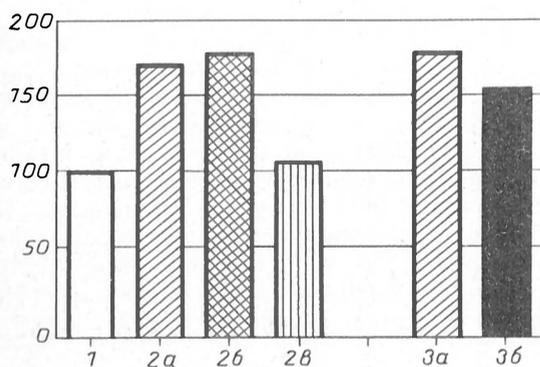


Рис. 3. Активация АПФ фракциями надосадка, полученными при ультрафильтрации и после прогрева.

1 — контроль (фермент + субстрат); 2 — ультрафильтрация: а — надосадок до ультрафильтрации, б — фракция, оставшаяся над мембраной «Centricon-30», в — ультрафильтрат; 3 — надосадок: а — до нагревания; б — после прогревания при 100 °С в течение 5 мин.

Активация АПФ надосадок прогретой сыворотки крови человека

Источник сыворотки	Активность АПФ в сыворотке, нмоль/мл/мин	Разведение сыворотки	Активность АПФ почек быка, $V/V_K \times 100$
Доноры	$14,0 \pm 0,5$ ($n=97$)	1:10	$83,2 \pm 1,6$ ($n=24$)
Больные	$9,9 \pm 3,2$ ($n=50$)	1:50	122
Больная П.	4,2	1:10	154
		1:10	0*
Больной Б.	5,5	1:50	209
		1:10	189
Больная К.	12,0	1:50	198
		1:10	237

Примечание. V — скорость гидролиза Z-Phe-His-Leu АПФ в присутствии надосадок; V_K — скорость гидролиза Z-Phe-His-Leu АПФ в контрольной пробе; звездочка — в пробу не добавлен фермент. Получение надосадков из сыворотки крови человека: сыворотку, разведенную 1:10 или 1:50 25 мМ барбиталовым буфером рН 7,4, выдерживали 5 мин при 100 °С. Выпавшие в осадок белки удаляли центрифугированием при 2000 г в течение 5 мин.

В работе [13] описана стимуляция мембранно-связанного (на поверхности эндотелиальных клеток) АПФ в присутствии фактора активации тромбоцитов. Однако это не являлось следствием прямого взаимодействия фактора с ферментом, а было опосредовано через поступление ионов кальция в клетку и обмен инозитол-1,4,5-трифосфата.

Активатор АПФ освобождался нейтрофилами в течение первых 5 мин. Источник и механизм освобождения активатора АПФ неясны. Однако полученные нами данные позволяют предположить внутриклеточный синтез, так как после обработки клеток NH_4Cl , который тормозит дегрануляцию нейтрофилов [14], наблюдалось резкое снижение активирующей АПФ способности супернатантов с последующим повышением ее после повторных промываний клеток буфером (см. рис. 1).

При ультрафильтрации супернатанта через мембрану «Centricon Centrifugal Microconcentrators», через которую не проходят белки с мол. м. выше 30 кДа, активирующий фактор оставался над мембраной. Прогревание супернатанта (1 мл в HEPES) при 100 °С в течение 5 мин снижало его способность активировать АПФ примерно на 20 % (рис. 3).

Присутствие активатора в организме было показано при исследовании супернатантов прогретых сывороток крови больных с наследственной недостаточностью С1-инактиватора системы комплемента — заболеванием, при котором наблюдается активация лейкоцитов в крови (см. таблицу). Надосадки, полученные из сывороток крови здоровых доноров, не увеличивали активность АПФ, они скорее вызывали некоторое (до 10—20 %) ее торможение. Появление (или увеличение содержания) активатора в крови больных, вероятно, можно рассматривать как защитную реакцию организма, поскольку у таких больных активирована калликреин-кининовая система, наблюдаются повышенная проницаемость капилляров и развитие отеков [6] и при этом снижена активность АПФ сыворотки (см. таблицу). Косвенным свидетельством в пользу присутствия активатора АПФ в организме могут служить

данные о повышении активности АПФ на фоне снижения содержания иммунореактивного фермента в крови крыс с острым отеком легких [17].

Итак, нами был обнаружен эндогенный активатор АПФ. Он выделяется нейтрофилами человека. Показано присутствие активатора в крови. Предполагается, что активатор АПФ, выделяемый нейтрофилами, может участвовать в модуляции защитной воспалительной реакции организма, поскольку активация фермента приводит к повышению разрушения брадикинина, медиатора воспаления.

ЛИТЕРАТУРА

1. Елисева Ю. Е. // Успехи биол. химии.— 1993.— Т. 33.— С. 106—129.
2. Елисева Ю. Е., Барсукова И. С., Орехович В. Н. // Докл. АН СССР.— 1988.— Т. 302.— С. 992—995.
3. Елисева Ю. Е., Орехович В. Н., Павлихина Л. В. // Вопр. мед. химии.— 1976.— № 1.— С. 81—89.
4. Козлова Н. И., Павлихина Л. В., Елисева Ю. Е., Орехович В. Н. // Докл. АН СССР.— 1988.— Т. 298.— С. 1481—1485.
5. Allen R. C., Stjernholm R. L., Steele R. H. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1972.— Vol. 47.— P. 679—684.
6. Colman R. W. // Advanc. exp. Med. Biol.— 1986.— Vol. 198-B.— P. 1—10.
7. Ehlers M. R. W., Riordan J. F. // Biochemistry (Wash.).— 1989.— Vol. 28.— P. 5311—5318.
8. Elisseeva Yu. E., Orekhovich V. N., Pavlikhina L. V., Alexeenko L. P. // Clin. chim. Acta.— 1971.— Vol. 31.— P. 413—419.
9. Erdos E. G. // Circulat. Res.— 1975.— Vol. 36.— P. 247—255.
10. Ferrante A., Thong Y. H. // J. immunol. Meth.— 1980.— Vol. 36.— P. 109—117.
11. Freedland J., Silverstein E. // Amer. J. clin. Path.— 1976.— Vol. 66.— P. 416—424.
12. Hazato T., Kase R. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1986.— Vol. 139.— P. 52—55.
13. Kawaguchi H., Sawa H., Yasuda H. // Biochim. biophys. Acta.— 1990.— Vol. 1052.— P. 503—508.
14. Klemmner M. S., Styrt B. // J. clin. Invest.— 1983.— Vol. 72.— P. 1793—1800.
15. Krulewitz A. H., Baur W. E., Fanburg B. L. // Amer. J. Physiol.— 1984.— Vol. 247.— P. C-163—C-168.
16. Lieberman J., Sastre A. // Lab. Invest.— 1983.— Vol. 48.— P. 711—717.
17. McCormick J. R., Moor M., Chrzanovsky R., Cieplinski W. // Advanc. exp. Med. Biol.— 1986.— Vol. 198-A.— P. 503—512.
18. Skidgel R. A., Erdos E. G. // Clin. exp. Hypertens.— 1987.— Vol. A-9.— P. 243—259.
19. Soffer R. L. // Annu. Rev. Biochem.— 1976.— Vol. 45.— P. 73—94.

Поступила 07.09.93

ENDOGENOUS ACTIVATOR OF ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME.

Yu. E. Elisseeva, L. V. Pavlikhina, T. V. Shavgulidze, E. Messina, A. Giacomello, C. Salerno, R. Perricone

Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow; Department of Biochemical Sciences, University of Rome; Clinic of Pediatric Diseases, Clinic of Medicine VI, Rome.

An endogenous activator of the angiotensin-converting enzyme (ACE), unknown earlier, was detected in freshly prepared human neutrophils. Supernatants of the neutrophil suspension produced a 1.6-2-fold activation of the ACE isolated from bovine kidney cortex. The ACE activating effect of these supernatants correlated with concentration of neutrophils in the initial suspension. The activator did not penetrate through membranes of Centricon-30. This activator was also found in blood serum of patients with hereditary deficiency of the complement C1-esterase inhibitor. The neutrophil-released ACE activator is likely to be involved in the modulation of inflammatory responses.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 617.713-001.37-092.9-07:617.764-008.831:577.152.34

Т. П. Кузнецова, Н. Б. Чеснокова, Т. С. Пасхина

АКТИВНОСТЬ ТКАНЕВОГО И ПЛАЗМЕННОГО КАЛЛИКРЕИНОВ И СОДЕРЖАНИЕ ИХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ В СЛЕЗНОЙ ЖИДКОСТИ КРОЛИКОВ ПОСЛЕ ЩЕЛОЧНОГО ОЖОГА РОГОВИЦЫ

Московский НИИ глазных болезней им. Гельмгольца, Институт биологической и медицинской химии РАМН, Москва

Лечение щелочных ожогов роговицы относится к числу наиболее трудных и сложных задач офтальмологии. Ожоговая болезнь глаз, вызванная воздействием щелочи, отличается длительным, рецидивирующим течением, а также трудной предсказуемостью развития осложнений, вплоть до перфорации роговицы на любой стадии процесса. Слезная жидкость представляет наибольший интерес в качестве объекта для разработки биохимических критериев, позволяющих прогнозировать осложнения и проводить патогенетически обоснованное лечение ожоговой болезни глаз. Перспективность биохимических исследований слезной жидкости при различных заболеваниях глаза отмечалась в ряде работ [2, 3, 8, 12]. К наиболее убедительным аргументам использования слезной жидкости при разработке биохимических тестов следует отнести существование взаимосвязи обменных процессов в роговице и непосредственно контактирующей с ней слезной жидкости, а также возможность забора слезы у больных без существенной травматизации глаз в динамике всего заболевания.

Ранее нами было изучено содержание тканевого и плазменного калликреинов и их предшественников в слезной жидкости здоровых кроликов, а также в контактирующих с ней тканях (роговице и конъюнктиве) [5]. Тканевый (КФ 3.4.21.35) и плазменный (КФ 3.4.21.8) калликреины — ферменты с различными биохимическими характеристиками и физиологическим действием, по-видимому, играющие разную роль в патогенезе ожоговой болезни. Установлено, что калликреин плазмы принимает участие в таких каскадных реакциях, как свертывание крови, фибринолиз, активация компонента [1, 7, 17]. Тканевые, или секретиремые, калликреины принимают участие в водно-электролитном обмене, регуляции клеточной пролиферации, модуляции митогенной активности инсулина [14], расщеплении пробелков, в частности эпидермального фактора роста, при превращении их в активные биологические продукты [15, 18].

В связи с этим целью настоящей работы явилось исследование изменений активности тканевого и плазменного калликреинов и содержания их предшественников в слезной жидкости кроликов после ожога роговицы щелочью и влияния на их активность лечения антипротеолитическим препаратом гордоксом.

Методика. В работе использовали 12 кроликов породы шиншилла массой 2,5—3 кг. Для общего наркоза применяли смесь растворов 2,5 % амиазины и 0,5 % седуксена в соотношении 1:1, кото-

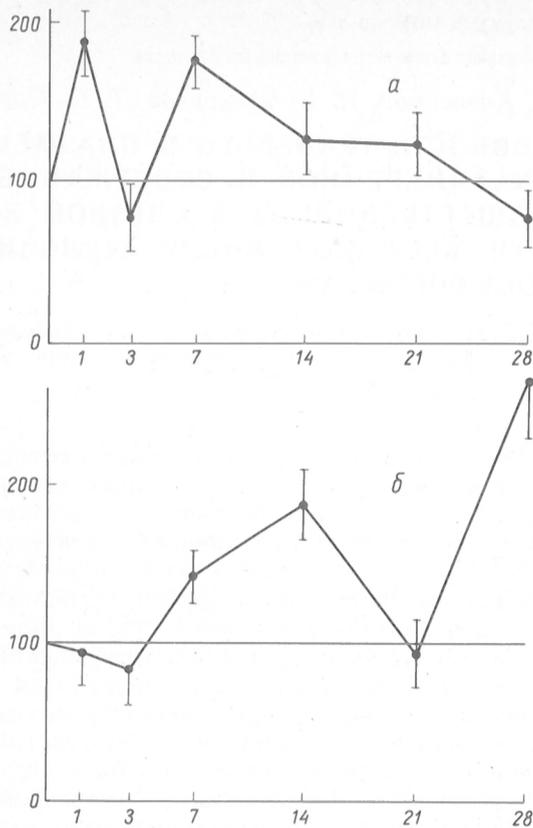


Рис. 1. Изменение активности плазменного (а) и тканевого (б) калликреинов в слезной жидкости кроликов после щелочного ожога роговицы.

По осям абсцисс — время после ожога, сут; по осям ординат — % от активности в слезной жидкости здоровых кроликов.

рую вводили подкожно из расчета 0,5 мл на 1 кг массы животного. Ожог роговицы вызывали с помощью круга из хлопчатобумажной ткани диаметром 7 мм, пропитанного 10 % NaOH, который наносили на роговицу на 40 с. После воздействия щелочью глаз промывали 20 мл физиологического раствора. Исследования проводили на 3 группах животных. 1-ю (4 кролика, 8 глаз) и 2-ю группы (4 кролика, 8 глаз) составили животные с ожогом роговицы обоих глаз, 3-я группа (4 кролика, 8 глаз) являлась контрольной. Животным 1-й и 3-й групп в течение 10 дней 1 раз в день субконъюнктивально вводили 0,3 мл физиологического раствора, а 2-й — субконъюнктивально 1 раз в сутки 0,3 мл (30 000 КИЕ) гордокса в течение 10 дней. Через 1, 3, 7, 14, 21 и 28 дней после ожога слезную жидкость собирали при помощи кружков из фильтровальной бумаги, которые закладывали за нижнее веко кролика. Для измерения активности тканевого и плазменного калликреинов в качестве флюорогенного субстрата применяли Z-Phe-Arg-MCA. Для отдельного определения активности ферментов использовали принцип определения активности в присутствии ингибиторов — апротинина, поливалентного ингибитора протеиназ, и ингибитора трипсина из бобов сои. Измерение интенсивности флюоресценции проводили на спектрофлюориметре «Shimadzu-540» (Япония) при $\lambda_{воз} = 365$ нм и $\lambda_{исл} = 470$ нм. Активность калликреинов выражали в наномолях гидролизованного субстрата за 1 мин при 37 °С и относили к 1 мг белка слезной жидкости. Более

подробно метод забора слезной жидкости и определения в ней активности тканевого и плазменного калликреинов и содержания их предшественников описан в работе [5]. Белок определяли по методу [16].

Результаты и обсуждение. В течении ожоговой болезни глаз у кроликов, вызванной щелочью, выделяется несколько стадий. Острый послеожоговый период характеризуется отеком и гиперемией конъюнктивы, поражением краевой петливой сети перилимбальных сосудов и десквамацией эпителия роговицы в зоне ожога. Характерным для щелочных ожогов является отторжение вновь образованного эпителия на 3—4-е сутки после ожога. В дальнейшем одновременно с пролиферацией эпителия роговицы наблюдаются его десквамация и изъязвление поверхностных слоев стромы, выраженный отек и инфильтрация роговой оболочки (1-я неделя после ожога). Во II стадии происходит интенсивная неоваскуляризация роговицы, снижается ее чувствительность, развиваются рецидивирующие язвенные дефекты роговицы и глубокая инфильтрация ее стромы. Может присоединиться иридоциклит с фиброзно-геморрагической экссудацией в переднюю камеру глаза (2-я и 3-я недели после ожога). Последующий период (III стадия) характеризуется новообразованием соединительной ткани и формированием рубца [10].

В предыдущей работе нами была выявлена амидазная активность в слезной жидкости здоровых кроликов [5]. В значительной степени (более 70 %) наличие этой активности обусловлено тканевым и плазменным калликреинами, активность которых составляет $0,59 \pm 0,003$ и $0,041 \pm$

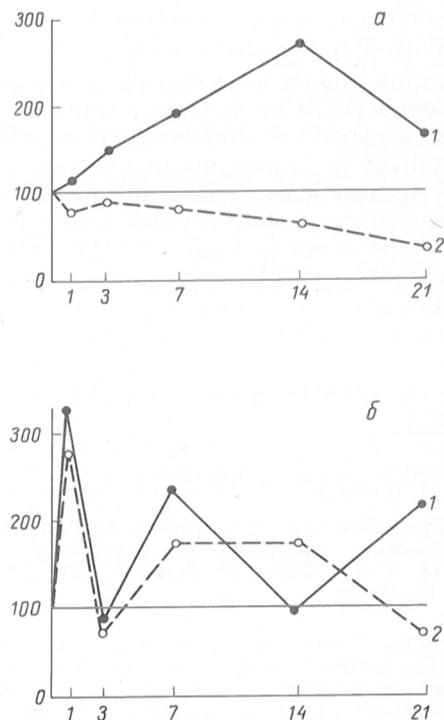


Рис. 2. Изменение активности тканевого (а) и плазменного (б) калликреинов в слезной жидкости кроликов с разными клиническими проявлениями ожоговой болезни глаз.

1 — кролик, у которого максимальные изъязвления роговицы развивались на 21-е сутки после ожога; 2 — кролик с перфорацией роговицы, образовавшейся на 1-й неделе после ожога. Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

$\pm 0,013$ нмоль/мин⁻¹/мг⁻¹ соответственно. Суммарное содержание прекалликреинов в слезной жидкости составляет $1,29 \pm 0,16$ нмоль/мин⁻¹/мг⁻¹, причем около 90 % приходится на плазменный прекалликреин.

Результаты измерения активности тканевого и плазменного калликреинов в слезной жидкости кроликов после щелочного ожога роговицы представлены на рис. 1. Полученные данные свидетельствуют о различной динамике активности этих ферментов в послеожоговом периоде. Так, активность плазменного калликреина увеличивается в течение 1-й недели, достигает максимального значения на 1-е и 7-е сутки (185 и 177 % соответственно; $p < 0,05$) и после 14 сут практически не отличается от активности фермента у контрольных животных. Напротив, активность тканевого калликреина не превышает таковую в контрольной группе кроликов в течение 1-й недели, затем увеличивается и достигает максимума на 14-е сутки эксперимента (189 %; $p < 0,05$). Второй подъем активности наблюдается в период от 21-х до 28-х суток.

Таким образом, увеличение активности плазменного калликреина происходит в острой стадии послеожогового процесса, в то время как увеличение активности тканевого калликреина наблюдается во II стадии, одной из основных характеристик которой является развитие рецидивирующих язвенных дефектов роговицы. Какую роль играет тканевый калликреин на этой стадии ожогов роговицы? Способствует ли он изъязвлению роговицы или, наоборот, участвует в компенсаторно-защитных механизмах? Несмотря на стандартное дозированное нанесение щелочного ожога, клиническое течение послеожогового процесса у животных было неоднозначным — от поверхностных эрозий роговицы у одних животных до глубоких стромальных изъязвлений и перфораций роговицы у других. Сравнение активности тканевого и плазменного калликреинов в слезной жидкости кроликов с поверхностными эрозиями и глубокими стромальными изъязвлениями не выявило статистически достоверных отличий.

В то же время нами наблюдалась небольшая группа кроликов (8 % глаз), которая существенно отличалась от большинства подопытных животных как по клиническим проявлениям заболевания, так и по активности ферментов в слезной жидкости. Особенности клинического течения ожоговой болезни глаз у этих кроликов заключались в образовании уже на 1-й неделе глубоких язв роговицы, вплоть до ее перфорации. Ранее было показано, что у них же выявляется крайне низкая активность эластазо- и трипсиноподобных ферментов в слезной жидкости на протяжении всего

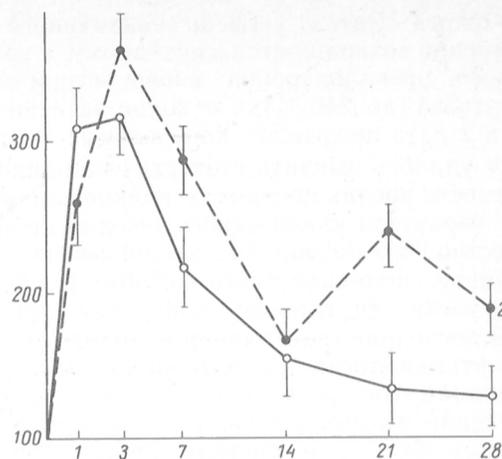


Рис. 3. Изменение содержания прекалликреинов в слезной жидкости кроликов после щелочного ожога роговицы.

По оси абсцисс — время после ожога, сут; по оси ординат — % от содержания прекалликреина в слезной жидкости здоровых кроликов.

заболевания [13]. В качестве примера на рис. 2 представлена динамика активности тканевого и плазменного калликреинов в слезной жидкости кролика основной группы с максимальным изъязвлением роговицы на 21-е сутки после нанесения ожога и кролика с чрезвычайно быстрым формированием перфорации роговицы, в течение 1-й недели эксперимента. Из приведенных данных видно, что активность плазменного калликреина не зависит от клинического течения послеожогового процесса (см. рис. 2, а). В то же время повышение активности тканевого калликреина, характерное для большинства животных, отсутствует у кролика с быстроразвившейся перфорацией роговицы и даже имеется тенденция к уменьшению активности этого фермента ниже контрольного уровня после 7-х суток наблюдения (см. рис. 2, б). Учитывая данные литературы об участии тканевого калликреина в пролиферативных процессах [18] и полученные нами данные, можно предположить, что повышение активности тканевого калликреина с 3-х по 21-е сутки носит защитно-компенсаторный характер. Особо следует отметить резкое повышение активности этого фермента в III стадии ожоговой болезни, т. е. к 28-м суткам, что, по-видимому, связано с формированием соединительнотканного рубца (бельма).

Как показали наши исследования (рис. 3), содержание предшественников активных калликреинов также изменяется в слезной жидкости кроликов после щелочного ожога роговицы. Наибольшее увеличение уровня (свыше 300 %) как тканевого, так и плазменного прекалликреинов наблюдается в течение 1-й недели после нане-

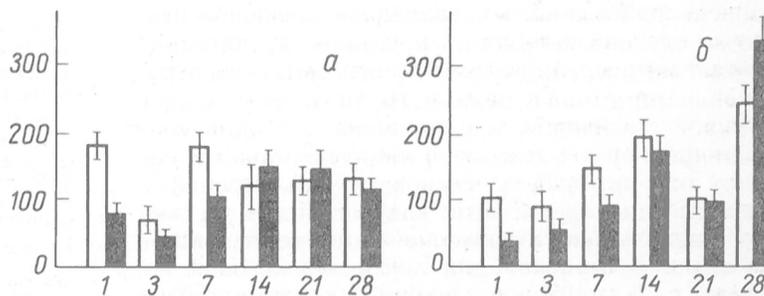


Рис. 4. Влияние лечения гордоксом на активность плазменного (а) и тканевого (б) калликреинов в слезной жидкости кроликов после щелочного ожога роговицы.

Светлые столбики — без лечения; темные — в течение 10 дней ежедневно субконъюнктивальное введение 0,3 мл гордокса (30 000 КИЕ). Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

сения ожога. Затем уровень плазменного прекалликреина возвращается к исходному, а уровень тканевого прекалликреина вновь возрастает к 21-м суткам (до 240 %) и в конце эксперимента почти в 2 раза превышает контрольные значения. Нам не удалось выявить статистически значимой зависимости уровня предшественников калликреинов от характера клинического течения процесса.

Известно, что препараты, созданные на основе апротинина, поливалентного ингибитора протеиназ, в частности гордокс, контрикал, трасилол и др., в последние годы начали находить применение в офтальмологии при лечении воспалительных заболеваний глаз [4, 6, 9, 11, 19, 20]. Показано, что лечение ожогов роговицы гордоксом восстанавливает баланс в системе протеолитических ферментов и их ингибиторов и предотвращает развитие глубоких изъязвлений роговицы, сокращает частоту возникновения ее перфораций [13]. Апротинин является одним из мощных ингибиторов тканевого и плазменного калликреинов. В связи с этим интересно было оценить влияние гордокса на активность этих ферментов в слезной жидкости в динамике послеожогового процесса. Как видно из рис. 4, лечение гордоксом приводит к снижению активности тканевого и плазменного калликреинов в течение 1-й недели, причем особенно значительно в 1-е и 7-е сутки. Особый интерес представляло выяснить влияние лечения гордоксом на степень увеличения активности тканевого калликреина на 14-е сутки после ожога в связи с предполагаемой нами компенсаторно-приспособительной функцией этого фермента. Результаты исследований свидетельствуют о том, что в этот период не выявлялось различий в активности тканевого калликреина в слезной жидкости леченых и нелеченых животных. Необходимо отметить также, что у животных, которым вводили гордокс в течение первых 10 дней после ожога, сохранялся и даже несколько увеличивался второй подъем активности фермента на 28-е сутки. На уровень предшественников калликреинов гордокс не оказывал влияния.

Суммируя полученные данные, можно заключить, что после щелочного ожога роговицы в слезной жидкости кроликов изменяется активность тканевого и плазменного калликреинов в зависимости от стадии ожоговой болезни глаз, при этом динамика активности этих ферментов носит различный характер. Активность плазменного калликреина возрастает в течение 1-й недели ожоговой болезни глаз. Активность тканевого калликреина максимально увеличена на 14-е и 28-е сутки после ожога, что, по-видимому, отражает активизацию в эти сроки пролиферативных процессов и является защитно-компенсаторной реакцией. Уровень плазменного и тканевого прекалликреинов в слезной жидкости кроликов значительно возрастает после нанесения ожога роговицы. Применение гордокса в первые 10 дней после ожога снижает активность и плазменного, и тканевого калликреинов в 1-ю неделю ожоговой болезни, не влияя на активность тканевого калликреина в последующие сроки. Эти данные подтверждают сделанное ранее заключение о целесообразности применения гордокса для лечения ожоговой болезни глаз, которое должно ограничиваться

первыми 8—10 сут, чтобы не вызвать нарушения репаративных процессов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Доценко В. Л., Пахикян Р. И., Соловьева Н. И. и др. // *Вопр. мед. химии.*— 1990.— № 3.— С. 73—76.
2. Доценко В. Л., Яровая Г. А., Пенашева Е. А. // *Там же.*— 1989.— № 2.— С. 128—133.
3. Касавина Б. С., Кузнецова Т. П. // *Вестн. офтальмол.*— 1978.— № 5.— С. 79—82.
4. Кот О. А., Проценко В. А. // *Офтальмол. журн.*— 1987.— № 6.— С. 373—377.
5. Кузнецова Т. П., Чеснокова Н. Б., Пасхина Т. С. // *Вопр. мед. химии.*— 1991.— № 4.— С. 79—82.
6. Осташевский В. Л. *Лечебное действие ингибиторов протеаз при гнойном язвенном кератите: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.*— Одесса, 1983.
7. Пасхина Т. С. // *Вестн. АМН СССР.*— 1982.— № 9.— С. 50—56.
8. Петрович Ю. А., Терехина Н. А. // *Вопр. мед. химии.*— 1990.— № 3.— С. 13—18.
9. Полунин Г. С. *Показания и способы ферментотерапии в офтальмологической практике: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук.*— М., 1990.
10. Пучковская Н. А., Шульгина Н. С., Пепомнящая В. М. *Патогенез и лечение ожогов глаз и их последствий.*— М., 1973.
11. Чеснокова Н. Б., Касавина Б. С., Щипанова А. И. // *Вестн. офтальмол.*— 1983.— № 1.— С. 48—50.
12. Чеснокова Н. Б. // *Мед. реф. журн.* VIII.— 1986.— № 3.— С. 7—11.
13. Чеснокова Н. Б. *Роль протеолитических ферментов и их ингибиторов в патологии роговицы: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук.*— М., 1991.
14. Abakumova O. Yu., Rabinovich S. E., Kulsenko N. G. // *Biomed. Sci.*— 1990.— Vol. 2.— P. 183—188.
15. Isackson P. J., Dunbar J. C., Bradshaw R. A. // *J. cell. Biochem.*— 1987.— Vol. 33.— P. 65—75.
16. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // *J. biol. Chem.*— 1951.— Vol. 193.— P. 265—275.
17. MacDonald R. J., Margolius H. S., Erdős E. C. // *Biochem. J.*— 1988.— Vol. 253.— P. 313—321.
18. Rabes H. // *Kininogenases, Kallikrein 4* / Eds G. L. Haberland, J. Rohen, M. Suzuki.— Stuttgart, 1977.— P. 125—136.
19. Reim M. // *Klin. Mbl. Augenheilk.*— 1990.— Bd 196.— S. 1—5.
20. Salonen E.-M., Tervo T., Törmä E. et al. // *Ophthalmologica.*— 1987.— Vol. 65.— P. 3—12.

Поступила 11.03.93

ACTIVITY OF TISSUE AND PLASMA KALLIKREINS AND CONTENT OF THEIR PRECURSORS IN RABBIT LACRIMAL FLUID AFTER ALKALINE BURN OF THE CORNEA.

T. P. Kuznetsova, N. B. Chesnokova, T. S. Pashkina

H. Helmholtz Institute of Eye Diseases, Institute of Biomed Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow.

Alterations in the activity of tissue and plasma kallikreins and in the levels of their precursors in rabbit lacrimal fluid were studied after alkaline burn of the cornea and treatment with hordox. The enzymatic activity was measured using the fluorogenic substrate Z-Phe-Arg-MCA. The activity of plasma kallikrein was increased in the lacrimal fluid within the first week after burn. Unlike plasma kallikrein, tissue kallikrein showed a higher activity within 14 and 28 days. The maximal increase in the levels of plasma and tissue kallikreins occurred within the first week. Subconjunctival injections of hordox, 0.3 ml (30,000 kIU), daily within 10 days led to a decrease in the activity of either kallikrein within the first week and did not alter tissue kallikrein activity within 14 and 28 days. Hordox did not affect the content of prekallikreins. The activation of tissue kallikrein at days 14-28 appears to occur due to increased proliferation and served as protective and compensatory responses; treatment with the polyvalent inhibitor of proteinases hordox within 8-10 days after burn did not affect this function of tissue kallikrein.

А. Л. Канцалиев, Н. Е. Кушлинский,
А. В. Васильев, А. А. Клименков

АКТИВНОСТЬ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ В ОПУХОЛЯХ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА С РАЗЛИЧНЫМ ПРОГНОЗОМ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Онкологический научный центр РАМН, Москва, Институт питания РАМН, Москва

По мнению большинства исследователей, изучавших факторы прогноза при раке желудка, наиболее важными из них являются наличие или отсутствие поражения серозной оболочки желудка [19], наличие метастазов в регионарных лимфатических узлах [6], площадь поражения опухолью слизистой желудка [7], степень дифференцировки опухоли, ее гистологический вариант, а также степень выраженности инфильтрации стенки желудка [20].

В настоящее время не подвергается сомнению утверждение о более благоприятном прогнозе у больных, оперированных по поводу рака желудка в ранних стадиях заболевания [15], но выявление злокачественной опухоли желудка даже в I стадии заболевания не всегда может быть гарантией полного излечения больного.

По данным различных авторов, 10—13 % больных раком желудка, опухоль у которых располагалась в пределах слизисто-подслизистого слоя, к моменту операции имели метастазы в регионарных лимфатических узлах [4, 13].

По данным [10], в 4 % наблюдений у больных раком желудка с размером опухоли менее 1 см выявлено множественное поражение регионарных лимфатических узлов.

Таким образом, анализируя данные литературы, представленные отечественными и зарубежными авторами, можно сделать вывод о том, что важными характеристиками рака желудка, определяющими клиническое течение заболевания, являются способность опухолей к инвазии в окружающие ткани и склонность к метастазированию.

На современном этапе исследования проблемы метастазирования в эксперименте существует мнение о том, что клетки злокачественных опухолей проявляют свою способность к инвазии и диссеминации благодаря синтезу и секреции во внеклеточное пространство комплекса протеолитических ферментов, в частности цистеиновых протеиназ — катепсина В и L, а также аспартильной протеиназы — катепсина D [12].

Методика. Учитывая существование и практическое использование в клинической практике благоприятных и неблагоприятных прогностических факторов при раке желудка, представлялось возможным на основании вышеуказанного выделить среди обследованных больных две группы. В 1-ю группу вошли 2 мужчин и 7 женщин с относительно благоприятными клинико-морфологическими признаками: I—II стадией заболевания, диаметром опухоли менее 10 см, высокой степенью дифференцировки опухоли, отсутствием инвазии в серозный слой стенки органа и метастазов в регионарных лимфатических узлах, низкой (I—II)

степенью клеточного и структурного атипизма, низкой степенью инфильтрации стенки желудка опухолью. Во 2-ю группу вошли 4 мужчины и 5 женщин с III—IV стадией заболевания, низкодифференцированными опухолями, диаметр которых был более 10 см, метастазами в регионарных лимфатических узлах, поражением серозной оболочки желудка опухолевым процессом, высокой степенью инфильтрации, высоким (III степень) клеточным и структурным атипизмом опухоли. Возраст пациентов колебался от 39 до 78 лет.

После хирургического удаления опухоли желудка из препарата выделяли ее фрагмент, не пораженную опухолью слизистую желудка и лимфатический узел, одну часть которого направляли на гистологическое исследование. Из полученных образцов тканей готовили гомогенаты общепринятым методом [2].

Определение активности катепсина D проводили спектрофотометрическим методом [1] с использованием в качестве субстрата гемоглобина («Sigma», США).

Определение активности катепсина В проводили спектрофлуориметрическим методом с использованием в качестве субстрата N-бензоил-DL-аргинин-β-нафтиламида («Serva», Германия) [2].

Активность катепсина L изучали спектрофлуориметрическим методом [5] с использованием в качестве субстрата CBZ-phe-arg-7amido-4methylcoumarin («Sigma», США).

Результаты и обсуждение. Наиболее высокая активность катепсина D в опухолях отмечена в группе больных с неблагоприятным прогнозом заболевания ($235,3 \pm 31,2$ нмоль/мин на 1 мг белка), которая значительно превышала таковую в группе больных с благоприятным прогнозом ($134,9 \pm 16,2$ нмоль/мин/мг). Различия в активности катепсина D в опухолях больных 1-й и 2-й групп оказались статистически значимыми ($p < 0,02$).

Образцы не пораженной опухолевым процессом слизистой желудка в 1-й группе больных характеризовались самой высокой активностью катепсина D ($168,8 \pm 22,1$ нмоль/мин на 1 мг белка) в сравнении с таковой в интактной слизистой у пациентов 2-й группы ($110,1 \pm 19,7$ нмоль/мин/мг). Однако различия в активности катепсина D в образцах не пораженной опухолевым процессом слизистой у больных 1-й и 2-й групп не были статистически значимыми. Необходимо отметить, что в 1-й группе больных активность катепсина D в

Таблица 1

Активность катепсина В, L и D в опухоли, лимфатических узлах и не пораженной опухолевым процессом слизистой у больных раком желудка

Фермент	Материал		
	опухоль	слизистая	лимфатический узел
Катепсин D, нмоль/мин на 1 мг белка:			
1-я группа	$134,9 \pm 16,2$	$168,8 \pm 22,1$	$73,5 \pm 13,6$
2-я группа	$235,3 \pm 31,2$	$110,1 \pm 19,7$	$168,2 \pm 34,8$
Катепсин В, нмоль/мин на 1 мг белка:			
1-я группа	$238,7 \pm 38,0$	$59,7 \pm 14,8$	$86,6 \pm 30,1$
2-я группа	$87,8 \pm 10,5$	$65,3 \pm 11,0$	$92,4 \pm 19,9$
Катепсин L, нмоль/мин на 1 мг белка:			
1-я группа	$67,4 \pm 7,2$	$32,8 \pm 5,2$	$38,3 \pm 6,8$
2-я группа	$42,3 \pm 11,6$	$38,0 \pm 10,9$	$32,9 \pm 9,1$

Таблица 2

Активность катепсинов В, L и D в опухолях и не пораженной опухолевым процессом слизистой у больных раком желудка с различным прогнозом заболевания

Катепсин D		Катепсин В		Катепсин L		D/В (коэффициент)
опухоль	слизистая	опухоль	слизистая	опухоль	слизистая	
1-я группа (благоприятный прогноз)						
99,0	112,9	120,2	100,0	55,0	39,7	0,82
116,4	54,4	47,9	34,4	46,8	32,1	2,43
135,5	141,3	568,2	63,0	102,2	35,3	0,24
83,7	359,1	95,3	78,8	55,4	51,7	0,88
118,4	55,4	315,7	10,7	81,5	6,2	0,38
162,2	88,5	77,0	32,0	72,9	26,9	2,11
81,9	269,1	125,0	43,2	31,9	14,8	0,66
210,7	214,6	576,1	151,1	80,9	54,1	0,37
206,5	218,3	234,7	24,1	80,4	34,4	0,88
2-я группа (неблагоприятный прогноз)						
112,9	61,8	42,3	19,0	62,7	111,0	2,67
256,8	147,4	90,5	70,5	28,3	22,1	2,84
360,7	88,0	89,8	67,2	36,1	36,3	4,02
203,5	115,6	60,3	63,7	26,9	56,5	3,38
231,1	227,1	81,9	84,7	9,8	50,8	2,82
308,7	135,9	115,9	89,7	124,6	5,1	2,66
358,5	52,2	149,4	125,0	34,4	6,5	2,40
135,2	34,8	92,3	36,1	11,5	21,6	1,47
150,2	128,2	67,5	32,0	59,4	30,7	2,23

образцах интактной слизистой желудка оказалась выше, чем в опухолях ($134,9 \pm 16,2$ и $168,8 \pm 22,1$ нмоль/мин на 1 мг белка соответственно).

Наиболее высокая активность катепсина D выявлена в лимфатических узлах, пораженных метастазами рака желудка ($168,2 \pm 34,1$ нмоль/мин на 1 мг белка). Ферментативная активность была самой низкой в лимфатических узлах, не пораженных метастазами, у больных 1-й группы ($73,9 \pm 13,6$ нмоль/мин на 1 мг белка). Различия в активности катепсина D в лимфатических узлах у больных 1-й и 2-й групп были статистически достоверными ($p < 0,05$).

Полученные результаты хорошо согласуются с имеющимися сведениями об участии аспартильных протеиназ в процессах канцерогенеза, и в частности с данными о прямой корреляции высокого содержания катепсина D и его проформы в клетках рака молочной железы и неблагоприятным течением заболевания [11, 14, 16, 18].

В опухолях больных 1-й группы с благоприятным прогнозом заболевания была выявлена самая высокая активность катепсина В — $238,7 \pm 38,0$ нмоль/мин на 1 мг белка (табл. 1). Наиболее низкая активность фермента отмечена в опухолях пациентов 2-й группы ($87,8 \pm 10,5$ нмоль/мин на 1 мг белка), для которых были характерны прогностически неблагоприятные клинико-морфологические признаки заболевания. Различия в активности катепсина В в опухолях у больных 1-й и 2-й групп статистически достоверны ($p < 0,05$).

Средние показатели активности катепсина В в образцах интактной слизистой у больных 2-й группы ($65,3 \pm 11,0$ нмоль/мин на 1 мг белка) не отличались от таковых в интактной слизистой у больных 1-й группы ($59,7 \pm 14,8$ нмоль/мин/мг).

Нами также не обнаружено достоверных различий в активности катепсина В в лимфатических узлах, пораженных метастазами (2-я группа), по сравнению с образцами тканей лимфатических узлов, не пораженных метастазами рака желудка

($92,4 \pm 19,9$ и $86,6 \pm 30,1$ нмоль/мин на 1 мг белка — 1-я и 2-я группы соответственно).

Наиболее низкая активность катепсина L зарегистрирована в опухолях желудка у больных 2-й группы ($42,3 \pm 11,6$ нмоль/мин на 1 мг белка). Активность катепсина L в опухолях у пациентов 1-й группы превышала таковую во 2-й группе ($67,4 \pm 7,2$ нмоль/мин на 1 мг белка), однако различия не были статистически значимыми.

Достоверных различий в активности катепсина L в образцах интактной слизистой желудка у больных двух выделенных нами групп не отмечено ($38,0 \pm 10,9$ и $32,8 \pm 5,2$ нмоль/мин на 1 мг белка соответственно). Однако активность катепсина L в некоторых образцах не пораженной опухолевым процессом слизистой у больных 2-й группы оказалась значительно выше, чем в 1-й группе.

Не выявлено достоверных различий в активности катепсина L в интактных лимфатических узлах и в лимфатических узлах, пораженных метастазами ($38,3 \pm 6,8$ и $32,9 \pm 9,1$ нмоль/мин на 1 мг белка соответственно).

Отсутствие изменений в активности цистеиновых протеиназ может быть обусловлено тем обстоятельством, что, по имеющимся данным литературы, ферменты этой группы участвуют лишь в начальных стадиях опухолевой трансформации клеток, а в дальнейшем степень вовлеченности их в процессы онкогенеза определяется балансом как специфических (цистатинов), так и неспецифических (продуктов онкогенеза gas — белок p21) эндогенных ингибиторов [3, 8, 9, 12].

При анализе показателей активности катепсинов В, L и D в опухолях, интактной слизистой и лимфатических узлах при раке желудка отмечены различия в активности вышеуказанных ферментов в группах с благоприятными и неблагоприятными клинико-морфологическими признаками заболевания. Различия в активности катепсинов В и D в опухолях больных 1-й (благоприятный прогноз заболевания) и 2-й (неблагоприятный прогноз заболевания) групп оказались статистически достоверными ($p < 0,05$ для катепсина В и $p < 0,02$ для катепсина D).

Различия показателей активности катепсинов В и D в опухолях больных с неблагоприятным прогнозом заболевания были статистически значимыми ($p < 0,001$).

Отмечена отрицательная корреляционная зависимость между активностью катепсинов В и D в опухолях больных обеих исследованных групп ($r = -0,51$, $p < 0,95$ — 1-я группа; $r = -0,75$, $p > 0,95$ — 2-я группа, число наблюдений в каждой группе 9).

Не выявлено значимой корреляционной связи между активностью катепсина L и активностью катепсинов В и D в опухолях желудка.

Полученные нами данные по разнонаправленной корреляционной связи между активностью катепсинов В и D в опухолях у пациентов 1-й и 2-й групп позволили рассмотреть соотношение абсолютных показателей активности этих ферментов индивидуально у каждого больного.

В группе больных с неблагоприятным течением заболевания значения коэффициента у 7 из 9 больных оказались меньше 1. В группе больных с благоприятным прогнозом заболевания в опухолях

всех пациентов значение этого коэффициента было выше 1 (табл. 2).

Таким образом, для больных раком желудка с прогностически благоприятными клинико-морфологическими признаками было характерно повышение активности катепсина В в опухолях. Повышение активности катепсина D, наоборот, имело место в первичных опухолях у пациентов с неблагоприятными клинико-морфологическими признаками (2-я группа), что явилось подтверждением вывода, сделанного в работе [7], в которой отмечено, что у крыс с асцитной гематомой Йосиды изменения активности протеолитических ферментов в плазме соответствуют сдвигам энзимологических характеристик опухоли: в процессе роста опухоли активность катепсина D повышается, а активность катепсина В понижается.

Выявленные изменения активности лизосомальных протеиназ в опухолях желудка могут служить дополнительным независимым прогностическим показателем течения заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баррет А. Дж., Хит М. Ф. // Лизосомы. Методы исследования.— М., 1980.— С. 45—156.
2. Васильев А. В., Капелевич Т. А., Тютельян В. А. // Вопр. мед. химии.— 1983.— № 3.— С. 127—130.
3. Гешелин С. А., Вовчук С. В., Близнюк Б. Ф., Варбанец В. Ф. // Вопр. онкол.— 1984.— № 10.— С. 9—18.
4. Клименков А. А., Патюшко Ю. И., Губина Г. И. Опухоли желудка.— М., 1988.
5. Barret A. J., Kirschke H. // Meth. Enzymol.— 1981.— Vol. 80.— P. 505—561.
6. Cavallaro A., Agresta F., Rizzo S. et al. // J. Chir.— 1989.— Vol. 10, N 3.— P. 88—92.
7. Conti A., Tonini V. // Ibid.— N 6.— P. 303—307.
8. Hiwasa T., Yokoyama S., Ha J. M. et al. // FEBS Lett.— 1987.— Vol. 21, N 1.— P. 23—26.
9. Hiwasa T., Sawada T., Sakiyama S. // Carcinogenesis.— 1990.— Vol. 11, N 1.— P. 75—80.
10. Matsushita M., Hachisura K., Yamaguchi A. et al. // Jap. J. Cancer Clin.— 1988.— Vol. 34, N 11.— P. 1584—1589.
11. Mullins D. E., Rohlich S. T. // Biochim. biophys. Acta.— 1982.— Vol. 695.— P. 177—214.
12. Nicolson G. // Cancer Res.— 1987.— Vol. 47, N 6.— P. 1473—1478.
13. Ohsawa T., Higashi T., Tsigi T. // Acta med. Okayama.— 1989.— Vol. 43, N 1.— P. 9—15.
14. Rochefort H., Cavailles V., Garsia M. et al. // J. Cell. Biochem.— 1987.— Vol. 35.— P. 17—29.
15. Secco G., Fardelli R., Campora E. et al. // J. surg. Oncol.— 1988.— Vol. 38, N 1.— P. 10—13.
16. Tandon A. K., Clark G. M., Chamnes G. C. et al. // New Engl. J. Med.— 1990.— Vol. 322, N 5.— P. 297—302.
17. Tessitore L., Messina M., Aragno M. et al. // Biochemistry.— 1980.— Vol. 15.— P. 1046.
18. Three S., Rochefort H., Garsia M. et al. // Cancer Res.— 1989.— Vol. 49, N 21.— P. 6008—6012.
19. Vitale M., Coda A., Massa G. et al. // Minerva chir.— 1988.— Vol. 43, N 12.— P. 1049—1054.
20. Watanabe M., Higashi T., Watanabe A. et al. // Biochem. Med. Metab. Biol.— 1989.— Vol. 42, N 1.— P. 21—29.

Поступила 01.11.93

ACTIVITY OF PROTEOLYTIC ENZYMES IN TUMORS OF PATIENTS WITH GASTRIC CANCER WITH VARIOUS DISEASE PROGNOSSES

A. L. Kantsaliev, N. E. Kushlinsky, A. V. Vasiliev, A. A. Klimentkov

Oncological Research Centre, Institute of Nutrition, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow.

Activity of lysosomal proteinases cathepsin B, L and D was studied in tissues of malignant tumors, cancer and normal lymph nodes and mucosal membrane obtained from 18 patients with gastric cancer. The enzymatic activity was distinctly higher in cancer tissues as compared with controls. Activity

of cathepsin D was increased in tissues with diminished rate of the tumor differentiation, with pronounced cancer invasion and metastases to regional lymph nodes — the group of highly negative prognosis. At the same time, activity of cathepsin B was increased in tissues of patients with positive prognosis of gastric cancer; negative correlation of cathepsin B activity was observed in both groups of patients. This correlation may be considered as an additional prognostic factor.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 615.322:582.28].017:[615.355:577.152.344

Г. В. Андреевко, Л. В. Лютова, Г. Н. Руденская, М. А. Карабасова, О. Г. Купенко, В. А. Исаев

ФИБРИНОЛИТИЧЕСКИЕ И ТРОМБОЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПРЕПАРАТА МОРИКРАЗЫ

МГУ им. М. В. Ломоносова, МНПП «Тринита»

Широкое распространение заболеваний, связанных с тромбообразованием, отложением фибриновых масс в суставах и др., требует расширения арсенала средств, способных растворять образовавшиеся в организме тромбы. Современное состояние биохимической науки позволяет разрабатывать и внедрять в практику метод ферментной терапии в качестве активного воздействия на патологические процессы при лечении различных заболеваний. Для этой цели используют и ферменты, оказывающие протеолитическое действие. Среди них хорошо зарекомендовал себя отечественный препарат фибринолизин [7]. Все большее применение, особенно за рубежом, находят ферменты, оказывающие активаторное действие на плазминоген, в том числе стрептокиназа, стрептодеказа и активатор тканевого типа, полученный методом генной инженерии [8]. Готовится к клиническим испытаниям препарат триаза — комплекс протеаз, выделенных из культуральной жидкости непатогенного гриба *Trichothecium roseum* в лаборатории антибиотиков МГУ им. М. В. Ломоносова [4]. Однако производство их ограничено, поэтому остается актуальным поиск новых ферментных препаратов.

Цель настоящего исследования — изучить в условиях *in vitro* и *in vivo* препарат морикраза, представляющий комплекс протеаз.

Методика. Препарат морикраза получен на кафедре химии природных соединений МГУ им. М. В. Ломоносова и МНПП «Тринита» из гепатопанкреаса камчатского краба по оригинальной методике. Морикраза содержит трипсин, химо трипсин, эластазу, неизвестный фермент, активный по субстрату Glp-Phe-Alap-Na, а также ферменты, активные по субстратам карбокси пептидаз А и В, и металлпротеиназу [5].

Исследование свойств препарата проводили в условиях *in vitro* и *in vivo*. Всего поставлено 5 серий экспериментов. В I серии изучали фибринолитическую активность различных концентраций морикразы на стандартных и прогретых при 86 °С фибриновых пластинах. Во II серии проверяли стабильность препарата при длительном его хранении в различных температурных режимах — 4, 22 и 37 °С. В III серии определяли коллагеназную активность препарата

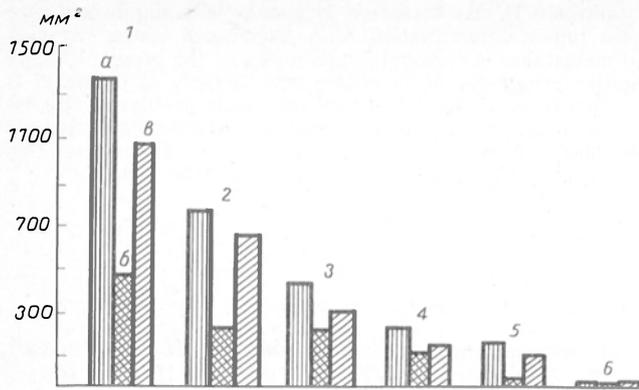


Рис. 1. Фибринолитическая активность морикразы на стандартных и прогретых фибриновых пластинах.

a — суммарная фибринолитическая активность; *b* — плазминоподобная активность; *a* — активаторная активность. Концентрация: 1 — 4 мг/мл, 2 — 2 мг/мл, 3 — 1 мг/мл, 4 — 0,5 мг/мл, 5 — 0,125 мг/мл, 6 — 0,063 мг/мл.

по лизису рубцовой ткани, полученной во время операции по иссечению рубца на лице пациента в клинике ЦНИИ стоматологии. IV и V серии экспериментов проведены в условиях *in vivo* на 40 белых нелинейных крысах массой 200 г. В IV серии морикразу вводили однократно струйно в дозе 10 мг на 1 кг массы тела в *v. jugularis*. Кровь для исследования брали до, через 10 и 120 мин после введения препарата и центрифугировали в течение 10 мин при 2000 об/мин. Для характеристики состояния свертывающей и фибринолитической систем крови в плазме определяли суммарную фибринолитическую активность, активность активатора плазминогена и плазмина, фибринолиз по времени лизиса сгустка зуглобулинов, общую антиплазминовую активность, содержание фибриногена и показатели *r* и *k* тромбоэластограммы. Результаты обработаны статистически с использованием критерия Стьюдента [1].

В V серии изучали возможность растворения морикразой преобразованного тромба на экспериментальной модели. Для этого у крысы, находящейся под аминазиновым наркозом, освобождали сегмент яремной вены, на оба его конца накладывали лигатуры, тонкой иглой вводили тромбин (40 ед/мл — 0,01 мл), через 1 ч после образования тромба снимали лигатуры и в одноименную

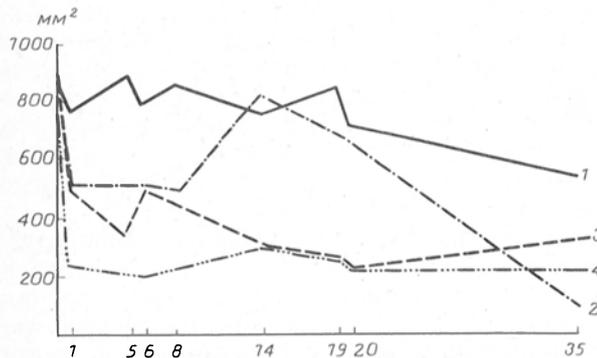


Рис. 2. Изменение общей фибринолитической активности морикразы в зависимости от сроков и условий хранения. По оси абсцисс — день исследования. 1 — хранение при 22 °С, 2 — при 4 °С, 3 — при 37 °С, 4 — в присутствии рубца.

вену противоположной стороны вводили морикразу в концентрации 10 мг на 1 кг массы тела. Отмечали время реканализации сосуда.

Результаты и обсуждение. После 24-часовой инкубации нанесенных на стандартные и прогретые фибриновые пластины растворов морикразы в количестве 0,03 мл в концентрациях 0,063, 0,125, 0,5, 1, 2 и 4 мг/мл была выявлена высокая дозозависимая фибринолитическая активность препарата. Значительная разница в величине зон лизиса на обоих видах пластин свидетельствует о том, что ферменты, входящие в состав комплексного препарата, способны не только растворять фибрин, но и отщеплять пептид от молекулы плазминогена, превращая последний в активный плазмин. Следовательно, морикраза проявляет свойства активатора плазминогена, что является весьма желательным для подобного рода препаратов. Важно отметить, что на долю активатора приходится большая часть активности ферментов (рис. 1).

Сохранение в течение длительного времени активности препарата имеет важное значение как для его хранения, так и для его применения, так как позволяет регулировать частоту аппликаций (в случае наружного использования). В настоящем исследовании мы сравнивали активность морикразы (1 мг/мл), хранящейся при температуре 4, 22 и 37 °С в виде нативного раствора, а также с рубцами, взятыми от больных во время операций. Как видно на рис. 2, препарат обладает довольно высокой стабильностью, которая находится в зависимости от температурного режима. При комнатной температуре через день фибринолитическая активность снижается с 870 до 780 мм², а затем держится примерно на одном уровне до 20-го дня исследования. При температуре 37 °С происходит более быстрая инактивация: через 10 дней остается около 50 % активности. Наиболее благоприятный режим хранения — температура 4 °С, при которой в течение 3 нед активность остается на исходном уровне. Инкубация морикразы с рубцовой тканью приводит к более быстрой потере активности, особенно в первые дни исследования. В течение этого времени рубец полностью растворялся. Эффект может быть связан с ингибиторами протеаз из ткани рубца. Аналогичные результаты — инактивацию фермента — мы получали при инкубации морикразы с кровью животных и человека.

В следующей серии исследований проводили более подробное изучение лизиса рубцовой ткани под действием морикразы. Навески рубцовой ткани человека массой по 100 и 30 мг, взятые во время операций, помещали в пробирки с раствором морикразы в концентрациях 0,25, 0,5, 1 и 2 мг/мл. Через 3 дня инкубации в термостате при 37 °С большие навески стали рыхлыми, лизис составил в среднем 50–70 %, 30-миллиграммовые навески, инкубированные с препаратом при тех же условиях, через 2–3 сут растворились полностью. Не выявлено прямой зависимости скорости растворения от концентрации ферментов (рис. 3).

Как показали предыдущие исследования [2, 3, 6], внутривенное введение препаратов, обладающих протеолитической активностью, вызывает зна-

чительные изменения в состоянии свертывающей и фибринолитической систем крови. Как видно на рис. 4, через 10 мин после внутривенного введения морикиразы обнаруживается активация фибринолиза, выражающаяся в почти двукратном повышении активности активатора плазминогена и несколько меньшем — плазмине, ускорении времени лизиса эуглобулиновой фракции. Со стороны свертывающей системы реакция на введение была неоднозначна: при неизменной концентрации фибриногена и тенденции к уменьшению показателя r тромбозластограммы показатель k увеличился в 2,5 раза. Последнее свидетельствует о резком замедлении формирования полноценного сгустка. Повышается уровень антиплазминов.

Через 120 мин после введения морикиразы активация фибринолиза сменяется на противоположную: практически полностью исчезает активатор плазминогена, очевидно, происходит образование необратимого комплекса активатор плазминогена — антиактиватор. Депрессия фибринолиза подтверждается и значительным удлинением времени лизиса эуглобулинов. Отмечается тенденция к уменьшению уровня антиплазминов, что также может быть связано с комплексобразованием этих ингибиторов с плазмином. Концентрация и активность последнего к этому сроку становятся ниже исходного уровня на 60%. Нового выделения антиплазмينا в кровотоки, по-видимому, не происходит. Изменение свертывающего потенциала усиливается в сторону гипокоагуляции, что можно рассматривать как защитную реакцию организма животного на депрессию фибринолиза, которая является одним из факторов риска тромбообразования.

Прежде чем перейти к изучению растворения сгустков у животных, мы исследовали возможность растворения тромбов в пробирках. Для этого сгустки крови, приготовленные из 0,3 мл человеческой или крысиной крови с добавлением тромбина, помещали в пробирки с теми же концентрациями раствора морикиразы, которые использовали в предыдущей серии опытов. Протеаза в максимальной концентрации растворяла сгустки человеческой крови за 60 мин, а крысиной — за 120 мин, в минимальной — за 120 мин и 10 ч соответственно. Более медленное растворение сгустков крови крысы объясняется повышенной концентрацией ингибиторов фибринолиза в крови крысы по сравнению с человеком.

У 10 крыс вызывали тромб в яремной вене по описанной выше методике. Через 1 ч после образования тромба внутривенно вводили морикиразу (10 мг на 1 кг массы тела). У 90% животных тромб растворился через 3—5 ч. Случаев летальности не отмечалось.

В заключение необходимо отметить, что результаты, полученные в условиях *in vitro*, свидетельствуют о высокой фибринолитической и коллагеназной активности препарата. Преимуществами морикиразы являются наличие у входящих в ее состав ферментов активаторной активности и довольно высокая стабильность. Препарат обладает хорошими тромболитическими свойствами, лизируя тромбы в условиях как *in vivo*, так и *in vitro*.

При внутривенном введении морикиразы хорошо переносилась, не было ни одного летального

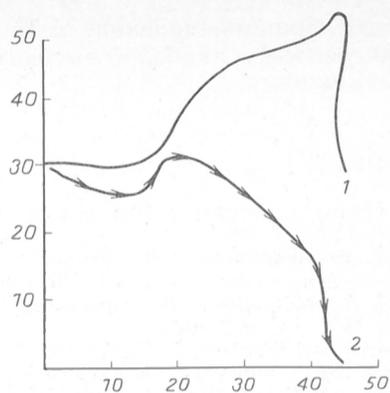


Рис. 3. Растворение 30 мг рубцовой ткани в 1 мл раствора морикиразы (2 мг/мл).

По оси абсцисс — часы наблюдения; по оси ординат — масса ткани, мг. 1 — контроль (0,85% NaCl); 2 — раствор морикиразы.

исхода, отсутствовали судорожная реакция, явная кровоточивость или внутрисудистый тромбоз. Изменения фибринолитической системы носят двухфазный характер, что отмечается после применения препаратов подобного действия [2, 3] и объясняется защитной реакцией здорового животного на экзогенное повышение фибринолитического потенциала. Отличительной особенностью морикиразы от других протеиназ, введение которых вызывает резкую гипофибриногемию [6], является то, что снижение фибриногена в нашем опыте не превышало 20% (к 120-й минуте эксперимента). Вероятнее всего, это можно объяснить действием ингибиторов крови.

Однако было бы несвоевременно рекомендовать препарат для внутривенного введения с целью тромболизиса. Очевидно, целесообразнее использовать его локально, для очистки гнойных ран, растворения внутрисуставных отложений фибрина. В данном направлении нами были проведены эксперименты на животных. Об этом будет сообщено в отдельной публикации. Кроме того, учитывая, что препарат представляет собой комплекс ферментов, предполагается в дальнейшем

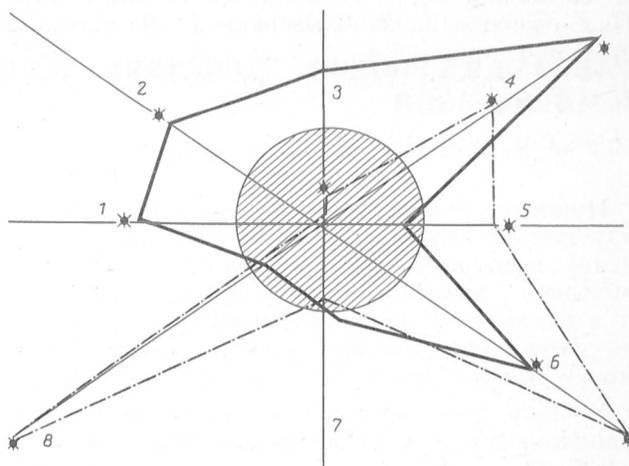


Рис. 4. Показатели систем гемостаза и фибринолиза до и после внутривенного введения морикиразы (10 мг на 1 кг массы тела; в % от исходных).

Заштрихованная область — до введения; сплошная линия — через 10 мин, пунктирная — через 120 мин после введения. 1 — суммарная фибринолитическая активность; 2 — активатор плазминогена; 3 — плазмин; 4 — антиплазмины; 5 — r тромбозластограммы; 6 — k тромбозластограммы; 7 — фибриноген; 8 — время лизиса эуглобулинов. Звездочка — $p < 0,001$.

провести его фракционирование с целью выделения компонентов с наиболее высокими активаторными свойствами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Болезни сердца и сосудов / Под ред. Е. И. Чазова.— М., 1992.— Т. 2.— С. 98.
2. Ландау Н. С., Андреевко Г. В., Лютова Л. В. и др. // Приклад. биохим.— 1990.— № 2.— С. 468—474.
3. Лютова Л. В., Андреевко Г. В., Карабасова М. А. и др. // Там же.— № 5.— С. 623—626.
4. Максимова Р. А., Шаркова Т. С., Пальмова Н. Г. и др. // Всесоюзная конф. «Физиология и патология гемостаза»: Материалы.— Полтава, 1991.— С. 100—101.
5. Методы исследования фибринолитической системы крови. / Под ред. Г. В. Андреевко.— М., 1981.
6. Рудинская Г. Н. // Симпозиум «Химия протеолитических ферментов», 3-й: Материалы.— М., 1993.— С. 21—22.
7. Серебрякова Т. Н., Андреевко Г. В., Цыманович С. Г. и др. // Науч. докл. высш. школы. Биол. науки.— 1985.— № 2.— С. 66—71.
8. Hugenholtz P. G., Simoons M. L., Serruys P. W. et al. // Wien. med. Wschr.— 1987.— Bd 137, N 22.— S. 506—512.

Поступила 15.06.93

FIBRINOLYTIC AND THROMBOLYTIC PROPERTIES OF THE DRUG MORIKRASE

G. V. Andreenko, L. V. Lyulova, G. N. Rodenskaya, M. A. Karabasova, O. G. Kупenko, V. A. Isaev
M. V. Lomonosov State University, Moscow.

Fibrinolytic and thrombolytic properties of morikrase, a complex of proteinases obtained from hepatopancreatic tissues of king crab (*Paralithodes camtschatica*), were studied in vivo and in vitro. High fibrinolytic activity and dose-dependent activating properties were detected on standard and heated fibrin plates. The preparation maintained its properties during long-term storage at 4° and 22 °C. The thrombolytic activity of the drug, affecting the preformed thrombus, was observed both in vitro and in vivo, in rats with experimental thrombosis. Two-phase alteration of the fibrinolytic system and moderate hypocoagulation were found after intravenous administration of morikrase.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 616-001.4-085.454.1.0.152: [615.357:577.152.344]-036.8-07

В. А. Исаев, Л. В. Лютова, М. А. Карабасова, О. Г. Купенко, Г. В. Андреевко, Г. Н. Руденская

РАНОЗАЖИВЛЯЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ МАЗИ С МОРИКРАЗОЙ

МГУ им. М. В. Ломоносова, МНП «Тринита»

Наиболее перспективным методом освобождения ран от некротических масс является применение протеолитических ферментов. Они избирательно действуют на поврежденные ткани и в отличие от хирургического очищения раны не нарушают здоровые участки кожи, которые могут быть очагами островковой эпителизации.

В настоящее время в клинической практике применяются различные ферментные препараты [3, 5, 8].

Целью настоящего исследования явилось экспериментальное изучение ранозаживляющего действия мази, содержащей комплекс протеолитических ферментов, выделенных из гепатопанкреаса камчатского краба. Новый препарат назван морикразой. Одновременно исследовали влияние наружного применения морикразы на свертывающую

и фибринолитическую системы крови, так как при нанесении на раневую поверхность через поврежденную ткань и сосуды возможно попадание препарата в кровяное русло.

Методика. В качестве лечебного средства использовали мазь, содержащую 1 % морикразы.

Для исследования раздражающего кожу и ранозаживляющего действия морикразы проводили две серии экспериментов на белых нелинейных крысах-самцах массой 180—200 г. В I серии раздражающее действие препарата изучали на крысах, которым выстригали на спине два участка шерсти размером 3×3 см. На эти участки наносили препарат в виде двух лекарственных форм: мази и 0,1 % раствора. Во II серии мазь наносили шпателем крысам на гнойно-язвенные раны на шее. Контрольным животным наносили мазевую основу. До начала и после окончания каждой серии опытов брали кровь из яремной вены с 3,8 % цитратом натрия в соотношении 9:1. Плазму получали центрифугированием в течение 10 мин при 2000 об/мин с охлаждением.

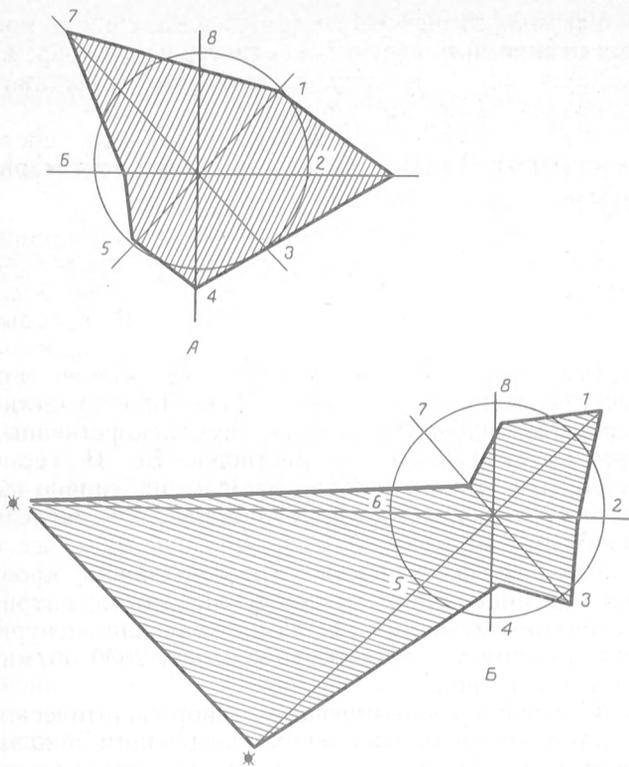
Состояние свертывающей и фибринолитической систем крови оценивали по следующим показателям: концентрации фибриногена, времени рекальцификации, тромбоэластограмме, времени лизиса сгустка фракции эуглобулинов, зонам лизиса на стандартных фибриновых пластинках, содержание активатора плазминогена, плазмина и антиактиватора [9].

В работе использовали следующие препараты: бычий фибриноген, бычий тромбин (Каунасское предприятие по производству бактериальных препаратов, Литва), активатор плазминогена из сердца свиньи (получен в лаборатории ферментативного фибринолиза биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова). Материал статистически обработан с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. В I серии опытов исследовали раздражающее действие препарата морикразы на кожные покровы крыс. В течение 20 дней 18 животным наносили на участки кожи мазь с морикразой и 0,1 % раствор морикразы. В первые минуты нанесения препарата отмечалось легкое покраснение кожи, которое быстро исчезало. Не отмечалось никакого раздражающего кожу действия. Волосистой покров восстанавливался одинаково у крыс как в опытной, так и в контрольной группах (8 животных), которым наносили на кожу мазевую основу и физиологический раствор.

Для проведения II серии были отобраны животные с гнойными язвами на шее. Язвенные образования, размеры которых колебались от 100 до 300 мм², содержали некротические массы, скопления гноя. Мазь наносили ежедневно шпателем прямо в рану и окружающие ткани (20 животных), контрольной группе животных (14 крыс) — только мазевую основу.

В опытной группе отмечали постепенное затягивание раневой поверхности в течение 10 дней, формирование очень тонкого нежного кожного покрова. Последующее применение мази приводило к формированию более плотной, чем на первом этапе, кожи и не мешало появлению волосистого



Номограмма изменений показателей свертывания и фибринолиза после наружного применения мази с морикразой у интактных животных (а) и у крыс с гнойными язвами (б).

На окружности отложены показатели до лечения, принятые за 100%, по радиусам — изменения тех же показателей (в % к исходному уровню). 1 — фибриноген; 2 — время рекальцификации; 3 — показатель *k* тромбоза; 4 — время лизиса сгустка эуглобулиновой фракции плазмы; 5 — зоны лизиса на стандартных фибриновых пластинках; 6 — активатор плазминогена; 7 — плазмин; 8 — антиактиватор. Звездочка — $p < 0,01$.

покрова. Лишь у одного животного применение мази с морикразой не дало полного заживления раны.

В контрольной группе также отмечали процесс заживления под действием мазевой основы, но он шел более медленно и к 10 дням был менее выраженным, чем в опытной группе.

Очевидно, что морикраза, обладающая протеолитическими и фибринолитическими свойствами, способствовала удалению из раны некротических и гнойных масс, что приводило к более быстрому формированию эпителия.

Известно, что для тех же целей применяется фибринолитический фермент фибринолизин как компонент мази с ранозаживляющим действием.

Применение препаратов с протеолитическим действием требует осторожности. Известно, что при попадании в кровь протеазы могут вызвать кровотечения или, напротив, тромбозы [2]. В связи с этим необходимо при использовании таких препаратов изучать состояние системы свертывания и фибринолиза. Учитывая возможность проникновения ферментов, содержащихся в мази, в сосудистое русло, мы изучали активность свертывающей и фибринолитической систем крови до и после применения препарата. Полученные результаты представлены в виде номограмм (см. рисунок). Номограмма составлена по следующему принципу. На окружности отложены принятые за 100% показатели до применения препарата, а по радиусам — изменения тех же показателей после наружного применения морикразы, выра-

женные в процентах по отношению к исходному уровню.

Как видно из рисунка, 10-дневное применение мази у животных с язвами приводило к увеличению содержания фибриногена, но без заметных изменений со стороны свертывающей системы крови. Возможно, увеличение концентрации фибриногена связано с репаративными процессами, происходящими при заживлении раны. Одновременно с этим отмечалась значительная активация системы фибринолиза. Вдвое сократилось время лизиса сгустка фракции эуглобулинов. Важно отметить, что повышение фибринолитической активности крови у подопытных животных связано не с активацией плазмينا, а с повышением активности активатора плазминогена, что на определенном этапе репаративных процессов дает положительный эффект. Известно, что активатор плазминогена способствует лучшей эпителизации тканей [2].

Применение мази и раствора препарата у интактных животных не вызывает изменений концентрации фибриногена, что подтверждается как прямым определением этого белка, так и неизменяющейся максимальной амплитудой на тромбозаграмме. Отмечается почти двукратное удлинение времени рекальцификации что указывает на наличие гипокоагуляции у этих животных. Остальные изменения изученных показателей были недостоверны.

Таким образом, мазь с морикразой обладает фибринолитическими свойствами и, следовательно, ее применение рационально при лечении ран, осложненных нагноением. Известно, что общие принципы местного лечения ран сводятся к прекращению и уменьшению болей в ране, предупреждению и ограничению воспалительных осложнений, удалению некротических масс, улучшению условий регенерации [3, 5, 8]. Фибринолитическая система играет значительную роль в процессе заживления ран [2, 10, 11]. Показано, что для ран с длительным воспалительным процессом, вызванным их инфицированием и локальными лейкоцитарными инфильтратами, характерен низкий уровень фибринолитической (протеолитической) активности [11]. Кроме того, рядом исследователей показано, что некоторые протеолитические ферменты способны расщеплять как денатурированные, так и нативные белки. Однако скорость гидролиза денатурированных белков во много раз выше, чем нативных. Устойчивость к протеиназам нативных белков связана с пространственными препятствиями, обусловленными неоднородностью значительной части пептидных связей субстрата для действия на них протеиназ. Отсутствие в денатурированных тканях ингибиторов протеиназ делает их доступными для ферментативного протеолиза [4]. По-видимому, механизм ранозаживляющего действия морикразы основан на расщеплении в первую очередь именно денатурированных белков.

Возможно, благоприятное действие мази с морикразой обусловлено тем, что морикраза представляет собой комплекс ферментов со сложным составом. В нее входят не только трипсин и химотрипсин, применяемые для лечения гнойных ран, но также эластаза, неизвестный фермент, активный по субстрату Glp-Phe-Alap-NA, а также фер-

менты, активные по субстратам для карбокси-пептидаз А и В, металлпротеиназа. Кроме того, в качестве мазевой основы применена оригинальная сложная композиция, в состав которой входят добавки веществ, обладающих репаративными свойствами и являющихся в настоящее время предметом патентования. Именно этим можно объяснить, что и в группе животных, которым применялась только мазевая основа, также шел успешно процесс затягивания ран, но несколько медленнее.

Несмотря на то что в последние годы для лечения гнойных ран предложено много новых средств — антиоксиданты [1, 6], иммобилизованные протеолитические ферменты [4], лимфокины [7], их поиск продолжается.

Полученные нами данные позволяют сделать вывод, что мазь с морикразой может стать еще одним эффективным средством с разносторонним воздействием на рану. Оказывая комплексное протеолитическое действие, морикраза способствует лизису и отторжению нежизнеспособных некротических тканей. Благодаря фибринолитическим и тромболитическим свойствам морикраза лизирует коагулированные белки, очищая рану на позднем этапе заживления от тромбов, способствует улучшению процессов регенерации с помощью примененных в мазевой основе оригинальных добавок.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агеев А. Ю., Николаев А. В., Абасов Б. Х. и др. // Бюл. exper. биол.— 1989.— № 7.— С. 35—37.
2. Андреев Г. В. Фибринолиз: Биохимия, физиология, патология.— М., 1979.
3. Вишневецкий А. А., Костюченко Б. М., Маршак А. М. // Хирургия.— 1974.— № 1.— С. 1—12.
4. Гончар А. М., Коган А. С., Салганик Р. И. Раневой процесс и иммобилизованные протеолитические ферменты.— Новосибирск, 1986.
5. Даценко Б. М., Белов С. Г., Тамм Т. И. Гнойная рана.— Киев, 1985.
6. Захаров В. В., Мамедов Л. А., Мещерякова С. А. и др. // Бюл. exper. биол.— 1989.— № 6.— С. 690—693.
7. Ковальчук Л. В., Байрат Б., Ганковская Л. В. // Там же.— № 9.— С. 340—343.
8. Кузин М. И., Костюченко Б. М. Раны и раневая инфекция.— М., 1981.
9. Методы исследования фибринолитической системы крови / Под ред. Г. В. Андреев.— М., 1981.
10. Толстых П. И., Гостищев В. К., Потапова И. Н. // Экспериментально-клинические аспекты репаративных процессов и методы их стимуляции.— М., 1977.— С. 76—79.
11. Чакарбарти Р. // Фибринолиз: Современные фундаментальные и клинические концепции.— М., 1982.— С. 154—162.

Поступила 15.06.93

THE WOUND HEALING EFFECT OF OINTMENT CONTAINING MORIKRASE

V. A. Isaev, L. V. Lyulova, M. A. Karabasova, O. G. Kupenko, G. V. Andreenko, G. N. Rudenskaya

Trinita Scientific-Industrial Association,
M. V. Lomonosov State University, Moscow.

An ointment containing, 1 % morikrase (a complex of proteinases isolated from hepatopancreatic tissues of king crab *Paralithodes camtschatica*) exhibited the wound healing properties and did not irritate the skin tissues during long-term treatments of rats. Only slight hypocoagulation was observed in intact animals after external application of the ointment. At the same time, the drug caused an increase in fibrinolytic activity in blood of rats with purulent wounds due to activation of the plasminogen activator.

В. В. Семенов, И. А. Студенцова, А. Д. Дурнев,
С. Б. Середенин, А. О. Визель

АНТИМУТАГЕНЫ КАК МОДИФИКАТОРЫ ЦИКЛАЗНОЙ СИСТЕМЫ КЛЕТКИ

Казанский медицинский институт, НИИ фармакологии РАМН, Москва, Институт органической и физической химии им. А. Е. Арбузова РАН, Казань

Результаты исследований антимутагенеза свидетельствуют о том, что к настоящему времени достигнуты определенные пределы в эффективном поиске антимутагенов. Дальнейший прогресс в этой области, несомненно, будет определяться состоянием теоретической разработки проблемы антимутагенеза.

Ряд факторов позволяет поставить вопрос о создании новых представлений о механизме действия антимутагенов. К ним, в частности, относятся огромное разнообразие химической структуры антимутагенов, наличие у них дозозависимой инверсии генетического эффекта, различия в эффективности при переходе от одного биологического объекта к другому, положительная корреляция между антимутагенным действием веществ и стимулирующей рост и развитие активностью (по крайней мере у растений), способность антимутагенов ингибировать различные типы мутагенеза — химического и радиационного, формирование мощного антимутагенного ответа на действие очень низких концентраций антимутагенов. Все перечисленные факторы поддаются объяснению, если допустить, что в формировании клеточного антимутагенеза принимают участие регуляторные системы клетки. Для деятельности последних характерны триггерный механизм действия, дозозависимая инверсия конечного ответа, повышение общей резистентности в ответ на действие разнообразных физических и химических факторов, неодинаковая функциональная активность регуляторных систем у разных биологических объектов и т. д. С учетом того, что регуляторные системы клетки контролируют такие генетические процессы, как репликация, транскрипция, трансляция [10] и, что особенно важно, репарация [6, 15], становится очевидно, что в механизме антимутагенеза необходимо учитывать деятельность регуляторных систем клетки. Косвенным подтверждением участия регуляторных систем клетки в процессах антимутагенеза является то, что некоторые эффективные антимутагены (аденозин, интерферон, гормоны роста и др.) являются одновременно активными модификаторами регуляторных систем клетки [6, 8, 10]. Исходя из этого, в настоящей работе исследована антимутагенная активность известных модификаторов регуляторных систем — аденозина, теофиллина, кофеин-бензоата натрия и экзогенного цАМФ [19] — в концентрациях, модулирующих уровень эндогенного цАМФ. Параллельно изучена связь между антимутагенной и цАМФ-модулирующей активностью известных антимутагенов: токоферола ацетата (антиоксидант) [1], парааминобензойной кислоты (репараген) [14], а также димефосфона — мембранотропного фосфорорга-

нического лекарственного препарата — диметилового эфира 1,1-оксибутилфосфоновой кислоты [17].

Методика. В работе использовали предварительно подобранные высокие и низкие концентрации препаратов: аденозина — 20,00 и 0,63 мМ, кофеин-бензоат натрия — 2,00 и 0,02 мМ, теофиллина — $6,5 \cdot 10^{-2}$ и $2,5 \cdot 10^{-4}$ мМ, экзогенного цАМФ — $7,2 \cdot 10^{-1}$ и $7,2 \cdot 10^{-4}$ мМ, димефосфона — 0,62 и 0,16 мМ, токоферола ацетата — 1,25 и 0,16 мМ, парааминобензойной кислоты (ПАБК) — 20,0 и 0,63 мМ.

Антимутагенную активность и уровень эндогенного цАМФ определяли на воздушно-сухих семенах скерды, клетки меристемы которых синхронизированы в предсинтетической стадии клеточного цикла. Для определения антимутагенной активности препаратов воздушно-сухие семена 2 ч замачивали в воде, затем 2 ч обрабатывали препаратами в высоких и низких концентрациях. После отмывания (20 мин) семена помещали на 2 ч в мутагенный 8,0 мМ раствор тиофосамида, вновь отмывали и проращивали в 0,01 % растворе колхицина при 26 °С. Для исследования отбирали проростки с длиной корешка 1,5—2,0 мм. Фиксацию, окраску препаратов и учет aberrаций производили согласно [3]. При определении эндогенного цАМФ семена после 2 ч замачивания в воде обрабатывали 2 ч препаратами в антимутагенной и неантимутагенной концентрациях. После отмывания (20 мин) семена высушивали фильтровальной бумагой и фиксировали в жидком азоте. Эндогенный цАМФ определяли в 50 семенах по методу [24]. Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с использованием критерия Стьюдента [18].

Результаты и обсуждение. Приведенные в таблице результаты свидетельствуют о наличии у всех исследованных препаратов антимутагенной активности в одной из использованных в опыте концентраций. Наиболее активными антимутагенами оказались димефосфон, токоферола ацетат, аденозин и кофеин-бензоат натрия. Антимутагенный эффект этих препаратов превышал 50 %. Теофиллин и цАМФ снижали уровень индуцированных aberrаций соответственно на 37,1 и 45,2 %. При обработке семян препаратами в антимутагенных концентрациях уровень эндогенного цАМФ во всех случаях достоверно увеличивался. Наиболее эффективно повышали содержание циклонуклеотида аденозин, димефосфон и токоферола ацетат. При воздействии этими препаратами уровень цАМФ во всех случаях превышал контрольный на 55,7, 52,7 и 45,7 % соответственно. В меньшей степени по сравнению с контролем увеличивали количество цАМФ кофеин-бензоат натрия (на 26,3 %), ПАБК (на 24,2 %) и экзогенный цАМФ (на 22,1 %). Обработка семян препаратами в немутагенных концентрациях ни в одном случае не привела к достоверному повышению уровня эндогенного цАМФ. Наоборот, аденозин, кофеин-бензоат натрия и экзогенный цАМФ достоверно снижали уровень цАМФ по сравнению с контролем.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что повышение уровня внутриклеточного цАМФ взаимосвязано с реализацией антимутагенного потенциала исследуемых нами соединений. Посколь-

Содержание эндогенного цАМФ в зависимости от антимутагенной активности препаратов

Препарат	Концентрация, мМ	Антимутагенный эффект, %	Уровень эндогенного цАМФ	
			нмоль на 1 мг белка	выше (+) ниже (—) контроля, %
Контроль (H ₂ O)	—	—	2390	0
Аденозин	20,0	Отсутствует	2088*	—12,6
	0,63	58,6	3721*	+55,7
Кофеин	2,00	Отсутствует	2039*	—14,7
	0,02	54,5	3019*	+26,3
Теофиллин	$6,5 \cdot 10^{-2}$	Отсутствует	2198**	—8,0
	$2,5 \cdot 10^{-4}$	37,1	2896*	+21,2
цАМФ	$7,2 \cdot 10^{-1}$	Отсутствует	2023*	—15,4
	$7,2 \cdot 10^{-4}$	45,2	2917*	+22,1
Димефосфон	0,16	Отсутствует	2509**	+4,9
	0,62	73,2	3649**	+52,7
ПАБК	20,0	Отсутствует	2214**	—7,4
	0,63	57,1	2968*	+24,2
Токоферол	0,16	Отсутствует	2653*	+11,0
	1,25	62,7	3482**	+45,7

Примечание. Одна звездочка — $p < 0,01$, две — $p > 0,01$.

ку взаимодействие цАМФ с протеинкиназами происходит кооперативно (коэффициент Хилла составляет 2,0 ед.) [20], то увеличение клеточной концентрации цАМФ лишь на 20—30 % уже вызывает активацию ферментов цАМФ-зависимого фосфорилирования белков с последующей модуляцией метаболических процессов [19, 20]. Результаты наших опытов показали, что препараты проявляли антимутагенную активность только в тех концентрациях, которые повышали уровень эндогенного цАМФ более чем на 20 %. В противоположность этому димефосфон в концентрации 0,16 мМ и токоферола ацетат в концентрации 0,16 мМ, повышавшие уровень эндогенного цАМФ на 4,5 и 10,5 % соответственно, не обладали антимутагенным эффектом.

Несмотря на то что изученные нами препараты имели различный механизм действия (аденозин, теофиллин, кофеин и экзогенный цАМФ модулируют циклазную систему клетки [19], токоферола ацетат ингибирует образование свободных радикалов [16], ПАБК воздействует на процессы репарации ДНК [14], димефосфон стабилизирует клеточные мембраны [17]), все они в антимутагенных концентрациях повышали уровень эндогенного цАМФ. Это дало основание предположить, что индуцируемая препаратами циклазная система активирует различные механизмы клеточного антимутагенеза: репарацию ДНК, систему антиоксидантной защиты, изменение проницаемости клеточной мембраны для мутагенов и, по-видимому, множество других процессов клеточного антимутагенеза. Аналогичные факты описаны в литературе. Так, с повышением содержания эндогенного цАМФ интенсифицируются процессы репарации ДНК, что повышает резистентность клетки к химическим мутагенам [5, 6, 15, 29]. У *E. coli* цАМФ является антагонистом мутагенной репарации [28], а влияние кофеина на репарационные процессы скорее всего опосредуется цАМФ [23].

На фоне высокого уровня цАМФ, стимулируе-

мого аденозином, ингибируется генерация супероксидного аниона в нейтрофилах, обработанных ФМА [4]. Эффект аденозина может реализоваться через рецепторы наружной мембраны без его проникновения внутрь клетки [20].

К этому необходимо добавить, что антиоксиданты не только могут выполнять роль «ловушек» активных форм кислорода, но и способны ускорить метаболическую инактивацию, одновременно подавляя активацию мутагенов и канцерогенов в цитохром Р 450-зависимой ферментной системе [21]. Кроме того, при увеличении внутриклеточной концентрации циклонуклеотида цАМФ-зависимые протеинкиназы активируют гидроксилазы ароматических аминокислот, окисляющие различные промежуточные продукты метаболизма [26], а теофиллин, повышающий уровень внутриклеточного цАМФ, ускоряет метаболизм ксенобиотиков, слабо метаболизирующихся в организме человека [30]. В совокупности эти биохимические реакции могут ускорять инактивацию мутагена в клетке.

Опубликовано множество работ, в которых однозначно показано, что эндогенный цАМФ тормозит высвобождение лизосомных ферментов [19] и стабилизирует мембрану лизосом [12], в результате чего на фоне повышенного уровня внутриклеточного цАМФ уменьшается вероятность нарушения мутагенной целостности лизосом и высвобождения сильного эндомутагена — фермента ДНКазы [22].

В литературе имеются сведения, что цАМФ-зависимое фосфорилирование изменяет проницаемость плазматической мембраны, в результате чего повышается устойчивость клеток к такому итеркаляру ДНК, как бромистый этидий, трансляция которого через поверхностную мембрану в этих условиях резко уменьшается [2].

Резистентность клеток к мутагенам во многом определяется скоростью их роста и интенсивностью репликации ДНК. Показано, что снижение скорости роста и репликации приводит к ускорению репарации повреждений ДНК [27]. В большинстве исследований по изучению влияния цАМФ на скорость роста клеток выявлен отчетливый эффект ингибирования этого процесса [11], что увеличивает время восстановления повреждений ДНК [3].

Известно, что вещества, повышающие содержание эндогенного цАМФ в момент и сразу после облучения (аденозин, теофиллин и некоторые другие), обладают радиозащитным свойством. Снижение фонда циклонуклеотида в эти сроки дает сенсibiliзирующий эффект [7, 25]. И в этом случае радиозащитный эффект аденозина не требует его проникновения в клетку и реализуется через

A-рецепторы плазматической мембраны [13].

Вышеизложенное дает основание предположить, что циклазная система регулирует процессы, активация которых в совокупности формирует резистентность клеток к мутагенам неодинакового механизма действия. Реализацию антимуутагенного потенциала изученных нами препаратов можно представить в виде каскада событий, направленных от поверхности плазматической мембраны, где формируется информационный сигнал, к индукции вторичных мессенджеров, которые через систему регуляторных ферментов индуцируют

одновременно различные механизмы антимуутагенеза. Большое разнообразие химической структуры антимуутагенов свидетельствует об отсутствии единого антимуутагенного рецептора в клетках и в то же время позволяет предположить наличие в некоторых случаях общих конечных путей реализации антимуутагенного потенциала веществ. Критерий цАМФ-модулирующей активности веществ совместно с другими, например с наличием у соединений антиоксидантной активности, может стать основой при разработке фармакологического подхода к поиску и отбору эффективных антимуутагенов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алекперов У. К. // Успехи соврем. генет. — 1979. — Вып. 8. — С. 168—181.
2. Ганелина Л. Ш. // Цитология. — 1985. — Т. 27, № 8. — С. 851—864.
3. Дубинина Л. Г. Структурные мутации в опытах с *Speris capillaris*. — М., 1978.
4. Елисеев В. В., Помавченко Г. М. Роль аденозина в регуляции физиологических функций организма. — СПб., 1991.
5. Жестяников В. Д. Репарация ДНК и ее биологическое значение. — Л., 1979.
6. Жестяников В. Д. // Всесоюзное о-во генетиков и селекционеров, Съезд, 5-й: Тезисы докладов. — М., 1987. — С. 90—91.
7. Животова Н. И., Филиппович И. В., Романцев Е. Ф. // Вопр. мед. химии. — 1976. — № 4. — С. 533—538.
8. Засухина Г. Д., Васильева И. М., Колодина И. В. и др. // Докл. АН СССР. — 1987. — Т. 45. — С. 485—487.
9. Зиганшина Л. Е., Студенцова И. А., Большакова Е. В. // Казан. мед. журн. — 1983. — № 2. — С. 125—127.
10. Ивашкин В. Т., Васильев В. Ю., Северин Е. С. Уровни регуляции функциональной активности органов и тканей. — Л., 1987.
11. Иткес А. В., Туницкая В. Л., Северин Е. С. // Биол. химия. — 1985. — Т. 26. — С. 125—151.
12. Коровкин Б. Ф. // Вестн. АМН СССР. — 1985. — № 1. — С. 12—22.
13. Кулинский В. И., Яшунский В. Г. // Всесоюзный радиобиологический съезд, 1-й: Тезисы докладов. — М., 1989. — С. 734—735.
14. Рапопорт И. А., Васильев С. В., Давниченко Л. С. // Докл. АН СССР. — 1979. — Т. 247, № 1. — С. 231—234.
15. Семенов В. В., Каримова Ф. Г., Сабирова Л. Р., Леонова С. А. // Цитол. и генет. — 1993. — Т. 27, № 1. — С. 28—32.
16. Середенин С. Б., Дурнев А. Д. Фармакологическая защита генома. — М., 1992.
17. Студенцова И. А., Хафезьянова Р. Х., Данилов В. И. и др. // Научно-практическая конф. посвящ. 100-летию Казанского о-ва невропатологов и психиатров: Материалы. — Казань, 1992. — С. 157.
18. Урбах В. Ю. Биометрические методы. — М., 1964.
19. Федоров Н. А. Биологическое и клиническое значение циклических нуклеотидов. — М., 1979.
20. Федоров Н. А., Градуловацки М. Г., Чехович Г. Е. Циклические нуклеотиды и их аналоги в медицине. — М., 1990.
21. Шуляковская Т. С., Коен Я. М., Рыкова В. И. и др. // Вопр. онкол. — 1987. — № 1. — С. 78—83.
22. Bradley M. O., Victoria T. J. et al. // Mutat. Res. genet. Toxicol. Test. — 1987. — Vol. 189, N 1. — P. 69—79.
23. Goth G., Cleaver I. E. // Mutat. Res. — 1976. — Vol. 36. — P. 105—114.
24. Gilman A. J. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1970. — Vol. 67, N 1. — P. 305—312.
25. Langendorff H. // Strahlentherapie. — 1970. — Bd 140. — S. 428.
26. Morgenroth V. H., Hegstrand L. R., Roth R. H., Greengard P. // J. biol. Chem. — 1975. — Vol. 250. — P. 1946—1948.
27. Nakano Shuji, Koga Tatsuhiko, Ichinose Ishiro et al. // Mutat. Res. — 1989. — Vol. 217, N 1. — P. 45—51.
28. Radman M. // Biochem. Soc. Trans. — 1977. — Vol. 5. — P. 1194—1199.
29. Saitin A., Rall T. V. // Molec. Pharmacol. — 1970. — Vol. 6. — P. 13—23.

ANTIMUTAGENS AS MODIFYING AGENTS OF THE CELL CYCLASE SYSTEM.

V. V. Semenov, I. A. Studentsova, A. D. Durnev, S. B. Seredenin, A. O. Visel

Medical School, Institute of Organic and Physical Chemistry, Kazan, Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow.

Ability of adenosine, coffeine, theophylline, cAMP, dimephosphone, PABA and tocopherol acetate to modify the rate of mutagenesis induced as well as to affect the content of endogenous cAMP were studied in experiments with seeds of *Crepis capillaries*. Those concentrations of these drugs which decreased the rate of mutations, were shown to increase the content of endogenous cAMP in the seeds. Higher concentrations of the drugs did not exhibit any antimutagenic activity as well as did not contribute to an increase in the cAMP content, but sometimes decreased distinctly cyclonucleotide content in the seeds.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 615.917:547.262].085.356:577.161.3].036.8.07

К. Д. Плещитый, Т. В. Давыдова, В. Г. Фомина

ИММУНОКОРРИГИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ ВИТАМИНА Е ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ ЭТАНОЛОМ

Институт общей патологии и патологической физиологии РАМН, Москва

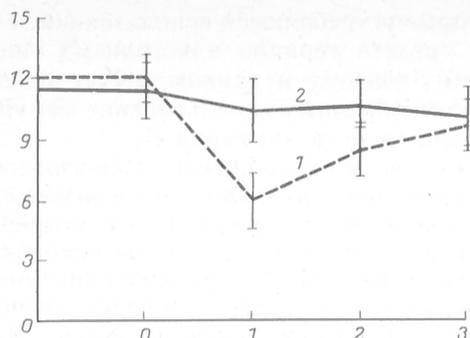
Витамин Е является одним из наиболее распространенных естественных антиоксидантов, чье биологическое действие изучено достаточно широко. Помимо антиоксидантных свойств, витамину Е присущи некоторые свойства, благоприятствующие его применению в различных областях медицины: он обладает мембраностабилизирующими свойствами [16], чем, видимо, обусловлено его противовоспалительное действие [20], является антибластомным агентом [23], оказывает иммуностимулирующее и иммунокорригирующее действие. Так, показано, что дополнительное введение витамина Е вызывает стимуляцию гуморального и клеточного иммунного ответа [13, 17], его применение предотвращает развитие иммунных нарушений при некоторых заболеваниях и стрессе [10, 19]. Подобное обстоятельство указывает на возможность успешного применения витамина Е в клинике алкоголизма. Известно, что в патогенезе этого заболевания стресс играет серьезную роль [5]; при этом в лимбических структурах мозга формируется гиперактивная детерминанта [7], а применение антиоксидантов, и в частности витамина Е, как было показано, способно приводить к подавлению ее деятельности [11]. Кроме того, имеющиеся в литературе данные свидетельствуют, что вещества, обладающие иммунорегуляторными свойствами, способны оказывать влияние на влечение к алкоголю [3, 4], что указывает на возможную роль иммунной системы в патогенезе алкоголизма, чему недавно были получены прямые доказательства [2, 15]. И, наконец, длительный прием этанола сопровождается выраженными иммунными нарушениями

[14], которые усугубляются использованием классических средств терапии алкоголизма типа тетурама [6], поэтому в данном случае представляется целесообразным использование иммунокорригирующих свойств витамина Е.

В связи со всем сказанным в задачу настоящего исследования входило экспериментальное изучение влияния витамина Е на потребление этанола и его действия на системы гуморального и клеточного иммунитета, функционирование которых нарушено вследствие приема этанола.

Методика. Опыты были проведены на мышах-самцах линий СВА и С57BL/6 с исходной массой тела 16—18 г и морских свинках-самцах агути с исходной массой 200—250 г. При изучении влияния витамина Е на потребление этанола мыши линии С57BL/6 в свободном выборе получали 15 % раствор этанола и воду. Замеры расхода этанола и воды производили ежедневно. Через 1 мес после начала алкоголизации мышам в течение 3 дней ежедневно орально вводили масляный раствор d,l,α-токоферола ацетата ("Serva", ФРГ) в суточной дозе 5 МЕ. В этом и во всех последующих экспериментах животным контрольных групп вводили масло — растворитель витамина Е. В этот период и последующие 3 нед мыши продолжали получать для питья в свободном выборе раствор этанола и воду. Помимо потребления этанола в свободном выборе, об уровне алкогольной мотивации можно судить по продолжительности наркотического сна, вызываемого этанолом. Известно, что уровень влечения к этанолу находится в обратной зависимости от уровня чувствительности к наркотическому действию алкоголя, поэтому были проведены эксперименты в этом направлении. При этом мыши линии С57BL/6 в течение 5 дней ежедневно орально получали витамин Е в суточной дозе 5 МЕ, после чего им внутривентриально вводили 25 % раствор этанола из расчета 6 г/кг с последующей регистрацией продолжительности сна [1].

При изучении иммунокорригирующих свойств витамина Е мыши линии СВА в течение 3 мес получали вместо питьевой воды 15 % раствор этанола, после чего им в течение 3 дней орально вводили витамин Е (по 5 МЕ ежедневно) на фоне применения этанола. Затем животных внутривентриально иммунизировали 0,2 мл 10 % суспензии эритроцитов барана и на 5-й день после иммунизации в селезенке прямым методом Эрне определяли число антителообразующих клеток (АОК). В экспериментах на морских свинках животным в течение 1 мес ежедневно орально вводили по 1 мл 25 % раствора этанола. Затем свинкам на фоне продолжающегося приема этанола в течение 3 дней вводили витамин Е в суточной дозе 50 МЕ. У животных брали кровь путем внутрисердечной пункции до начала эксперимента, перед приемом витамина Е (т. е. через 1 мес после начала алкоголизации) и после завершения приема витамина Е. Из крови путем центрифугирования в градиенте фиколла — верографина или перколла выделяли фракцию лимфоцитов. Идентификацию Т-клеток производили путем розеткообразования с эритроцитами кролика [22], а В-лимфоцитов — путем розеткообразования с комплексом эритроциты барана + антитела + комплемент [12]. При постановке реакции ги-



Влияние витамина Е на потребление алкоголя мышами линии С57ВL/6.

По оси абсцисс — срок после введения витамина Е, нед; по оси ординат — потребление этанола мышами, г на 1 кг массы тела. 1 — мыши, получавшие витамин Е; 2 — контроль.

перчувствительности замедленного типа (ГЗТ) животным в подушечки задних лап вводили по 0,1 мл полного адьюванта Фрейнда. На 5-й день после введения адьюванта в гладко выстриженную кожу бока животных вводили 0,1 мл раствора вакцины БЦЖ, содержащего 10 мкг препарата. Об интенсивности проявлений реакции ГЗТ судили по диаметру эритемы через 24 ч после введения препарата. Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Результаты экспериментов приведены на рисунке, из которого следует, что витамин Е вызывает выраженное снижение потребления этанола мышами линии С57ВL/6, сохраняющееся на протяжении 1 нед после прекращения приема витамина. Эта тенденция сохранялась и в течение 2-й недели, хотя различия уже не носили достоверного характера. С этими данными также коррелируют результаты опытов по изучению продолжительности наркотического сна: под влиянием витамина Е продолжительность наркотического сна мышей возросла со $129,0 \pm 15,0$ до $196,0 \pm 16,8$ мин ($p < 0,01$).

В таблице приведены данные о влиянии этанола и витамина Е на некоторые иммунологические показатели у мышей линии СВА и морских свинок. Как видно из таблицы, применение этанола

Влияние хронической алкогольной интоксикации и витамина Е на некоторые иммунологические показатели у мышей и морских свинок

Показатель	Контроль	Алкогольная интоксикация	Алкогольная интоксикация + витамин Е
Количество ОАК/10 ⁶			
спленоцитов	$131,4 \pm 16,9$	$47,1 \pm 12,3^*$	$104,7 \pm 7,3^{**}$
Лейкоциты, мм ³	7230 ± 410	7710 ± 520	7060 ± 430
Лимфоциты:			
%	$43,6 \pm 2,2$	$37,8 \pm 2,8$	$59,5 \pm 2,4^{**}$
абс., мм ³	3152 ± 290	$2914,4 \pm 186$	$4200,7 \pm 280^{**}$
Т-лимфоциты:			
%	$33,4 \pm 2,4$	$12,7 \pm 1,7^*$	$31,0 \pm 3,9^{**}$
абс., мм ³	$1052,6 \pm 152,0$	$370,1 \pm 43,3^*$	$1302,2 \pm 61,6^{**}$
В-лимфоциты:			
%	$28,0 \pm 3,1$	$22,9 \pm 3,7$	$28,6 \pm 1,9$
абс., мм ³	$882,6 \pm 24,1$	$667,4 \pm 95,7$	$1201,4 \pm 209,1$
ГЗТ на БЦЖ (диаметр эритемы, мм)	$9,8 \pm 1,1$	$5,9 \pm 0,52^*$	$11,3 \pm 1,1^{**}$

Примечание. Одна звездочка — статистически достоверные различия между контролем и группой животных с алкогольной интоксикацией, две — статистически достоверные различия между группой животных с алкогольной интоксикацией и группой животных с алкогольной интоксикацией, получавших витамин Е.

вызывало резкое подавление продукции АОК, уменьшение содержания лимфоцитов в периферической крови за счет выраженного снижения уровня Т-лимфоцитов и способствовало подавлению кожных проявлений реакции ГЗТ. В то же время применение витамина Е приводило к полной нормализации всех изученных иммунологических показателей, нарушенных вследствие длительного приема этанола.

Полученные данные свидетельствуют о том, что применение витамина Е ослабляет потребление этанола в свободном выборе и удлиняет продолжительность наркотического сна у мышей линии С57ВL/6, предрасположенных к потреблению этанола. Оба этих обстоятельства указывают на то, что витамин Е способствует подавлению алкогольной мотивации. Хотя говорить с полной убежденностью о механизмах, лежащих в основе выявленных закономерностей, преждевременно, однако можно высказать несколько достаточно аргументированных предположений. Во-первых, известно, что в патогенезе образования детерминантных структур в ЦНС велика роль процессов перекисного окисления; при этом доказан защитный эффект антиоксидантов, в частности витамина Е [11]. Таким образом, речь может идти о подавлении деятельности сформировавшихся в ЦНС детерминантных структур, ответственных за влечение к алкоголю. Если это так, то эффективным окажется применение других, помимо витамина Е, антиоксидантов, в чем необходимо убедиться при выполнении дальнейших исследований. Вторым моментом, тесно связанным с первым, является наличие у витамина Е свойств антистрессорного препарата центрального действия [9], тогда как роль стрессорных факторов в развитии влечения к алкоголю достаточно значительна [5]. Наконец, следует учитывать то обстоятельство, что под влиянием витамина Е происходит усиление выброса в ЦНС эндорфинов [8] — реакция, которая индуцируется применением алкоголя и наркотиков. Вполне возможно, что в данной ситуации подобный эффект витамина Е делает биологически неуместной реализацию реакции, направленной на достижение того же эффекта.

Влияние витамина Е на опиоидную систему отчасти объясняет и выявленный в экспериментах механизм его иммунокорректирующего действия. Известно, что опиоидные пептиды обладают иммунорегуляторными свойствами [18]. Наряду с этим необходимо учитывать возможность восстановления под влиянием витамина Е медиаторного обмена в ЦНС, нарушенного вследствие приема этанола [1], что могло бы приводить к нормализации центральной регуляции иммунных процессов. Нельзя также исключить вызываемое витамином Е ослабление свободнорадикальных воздействий на иммунокомпетентные клетки, так как известно, что свободные радикалы оказывают неблагоприятное действие на деятельность этих клеток [21].

ЛИТЕРАТУРА

1. Буров Ю. В., Ведерникова Н. Н. Нейрохимия и фармакология алкоголизма. — М., 1985.
2. Давыдова Т. В., Фомина В. Г. // Бюл. exper. биол. — 1987. — № 12. — С. 672—674.
3. Евсеев В. А., Давыдова Т. В., Фомина В. Г. и др. // Пат. физиол. — 1990. — № 6. — С. 30—32.

4. Евсеев В. А., Давыдова Т. В., Фомина В. Г. // Бюл. экспер. биол.— 1991.— № 6.— С. 637—639.
5. Евсеев В. А., Магаева С. В. // Вестн. АМН СССР.— 1985.— № 8.— С. 18—23.
6. Кеостантинов Т. П., Пастушенко Л. А., Зажирей В. Д. // Проблемы алкоголизма.— М., 1973.— Вып. 3.— С. 156—162.
7. Крыжановский Г. Н., Евсеев В. А. // Вестн. АМН СССР.— 1988.— № 3.— С. 10—14.
8. Крыжановский Г. Н., Лузина Н. Л., Ярыгин К. Н. // Бюл. экспер. биол.— 1989.— № 11.— С. 566—567.
9. Меерсон Ф. З., Пшеничкова М. Г. Адаптация к стрессовым ситуациям и физическим нагрузкам.— М., 1988.
10. Меерсон Ф. З., Сухих Г. Т., Плецитый К. Д. // Бюл. экспер. биол.— 1985.— № 6.— С. 646—647.
11. Никушин Е. В. // Нейрохимия.— 1989.— № 1.— С. 124—145.
12. Оббариус И. Д. // Журн. микробиол.— 1979.— № 6.— С. 46—48.
13. Плецитый К. Д. // Иммунология.— 1985.— № 2.— С. 72—73.
14. Плецитый К. Д., Давыдова Т. В. Влияние алкоголя, наркотиков и табакокурения на иммунную систему.— М., 1989.
15. Плецитый К. Д., Давыдова Т. В., Фомина В. Г. // Факторы клеточного и гуморального иммунитета при различных физиологических и патологических состояниях.— Челябинск, 1992.— С. 82—83.
16. Спиричев В. Б., Ковь И. Я. // Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева.— 1978.— № 4.— С. 425—434.
17. Bendich A., Gabriel E., Machlin L. J. // J. Nutr.— 1986.— Vol. 116.— P. 675—681.
18. Carr D. J. J. // Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.).— 1991.— Vol. 43.— P. 710—721.
19. Haberal M., Hamaloglu E., Bora S. et al. // Burns.— 1988.— Vol. 14.— P. 388—393.
20. Kamimura M. // J. Vitaminol.— 1972.— Vol. 18.— P. 204—209.
21. Nishida Y., Tanimoto K., Akaoka I. // Clin. Immunol. Immunopath.— 1981.— Vol. 19.— P. 319—324.
22. Wilson A. B., Coombs R. R. // Int. Arch. Allergy.— 1973.— Vol. 44.— P. 544—552.
23. Watson R. R., Petro T. M. // Ann. N. Y. Acad. Sci.— 1982.— Vol. 393.— P. 205—208.

Поступила 01.11.93

VITAMIN E: IMMUNOCORRECTING EFFECT IN ALCOHOL INTOXICATION.

K. D. Pletsityi, T. V. Davydova, V. G. Fomina

Institute of General Pathology and Pathophysiology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow.

Chronic alcohol intoxication of mice CBA and C57BL/6 strains decreased distinctly the content of T lymphocytes in peripheric blood and inhibited the immune response to sheep erythrocytes. Vitamin E, administered into mice at a dose of 5 IU and into guinea pigs — of 50 IU within 3 days, restored completely the immunity status of these animals. Besides, vitamin E decreased ethanol consumption in mice kept under conditions of alternative choice of water-ethanol within one week after its injection.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 616.12-008.331.1-085.874.2-036.8-07:616.153.915-39

А. В. Васильев, И. Р. Бяшева,

Г. Р. Покровская, Г. Ю. Мальцев,

Е. А. Варсанович, Л. А. Орлова, С. Х. Сото

ИССЛЕДОВАНИЕ СИСТЕМЫ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ У БОЛЬНЫХ ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ ПРИ ОБОГАЩЕНИИ ДИЕТЫ ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫМИ ЖИРНЫМИ КИСЛОТАМИ ω 3 И α -ТОКОФЕРОЛОМ

Институт питания РАМН, Москва

Развитие гипертонической болезни сопровождается нарушениями в системе перекисного окисления липидов (ПОЛ), что выражается в повыше-

нии уровня продуктов ПОЛ в плазме крови. Это обусловлено увеличением содержания субстратных липидов, возрастанием прооксидантной активности плазмы крови, особенностями катаболизма липопротеидов [1, 2, 5]. Помимо ферментной антиоксидантной системы, важным фактором защиты от свободнорадикального воздействия являются эндогенный α -токоферол (α -ТФ) и аскорбат [12, 13]. Относительный дефицит α -ТФ может возникать при использовании в лечении гипертонической болезни препаратов, содержащих полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) ω 3, или при диетотерапии с обогащением рациона ПНЖК ω 3 и в конечном счете приводит к изменению динамического равновесия функционирования системы антиоксидантной защиты (АОЗ) и процессов ПОЛ. В этой связи представлялось целесообразным провести комплексное исследование системы ферментной АОЗ, содержания продуктов ПОЛ и уровня α -ТФ в крови в зависимости от химического состава рациона, используемого в диетотерапии больных гипертонической болезнью.

Методика. Обследовано 32 мужчины, страдающих гипертонической болезнью II стадии. 16 из них в течение 28 дней получали гипонатриевую противоатеросклеротическую диету А1. Остальные 16 больных в течение этого же периода времени находились на аналогичной диете, но в которой 20 г суточной дозы растительного масла заменяли 20 г ихтиеного масла — ИХМ (эйконола), полученного по специальной технологии из скумбрии в НПП «Тринита». Применяемый в данном исследовании эйконол содержал 25 % ПНЖК ω 3. Половине больных из этой группы в составе эйконола вводили 12,5 мг α -ТФ, т. е. то количество, которое содержится в 20 г растительного масла, а другие 8 человек из этой же группы получали в составе эйконола 125 мг α -ТФ. Содержание холестерина, триглицеридов, холестерина липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) сыворотки крови исследовали на биохимическом анализаторе «Спектрум» фирмы «Эбботт» (США) с использованием стандартных наборов реактивов. Уровень α -ТФ в сыворотке крови определяли флуориметрическим методом [8] после экстракции гексаном. Активность каталазы оценивали на основе разработанного автоматизированного метода с использованием алкогольдегидрогеназой индикаторной реакции [3]. Активность супероксиддисмутазы (СОД) и глутатионредуктазы (ГР) определяли с помощью модифицированного метода на автоматическом анализаторе ФП-901 фирмы «Лабсистемс» (Финляндия) [3, 4]. Активность глутатионпероксидазы (ГП) в гемолизатах эритроцитов определяли модифицированным методом по скорости окисления НАДФ в глутатионредуктазной реакции, сопряженной с восстановлением гидроперекиси, и выражали в наномолях НАДФ на 1 мг эритроцитарного белка в 1 мин [16]. Содержание апо-белков липопротеидов сыворотки крови определяли на иммунохимическом анализаторе ICS-II фирмы «Бекман» (США) методом кинетической нефелометрии с использованием наборов стандартных антител.

Результаты и обсуждение. Для изучения особенностей взаимосвязи между состоянием

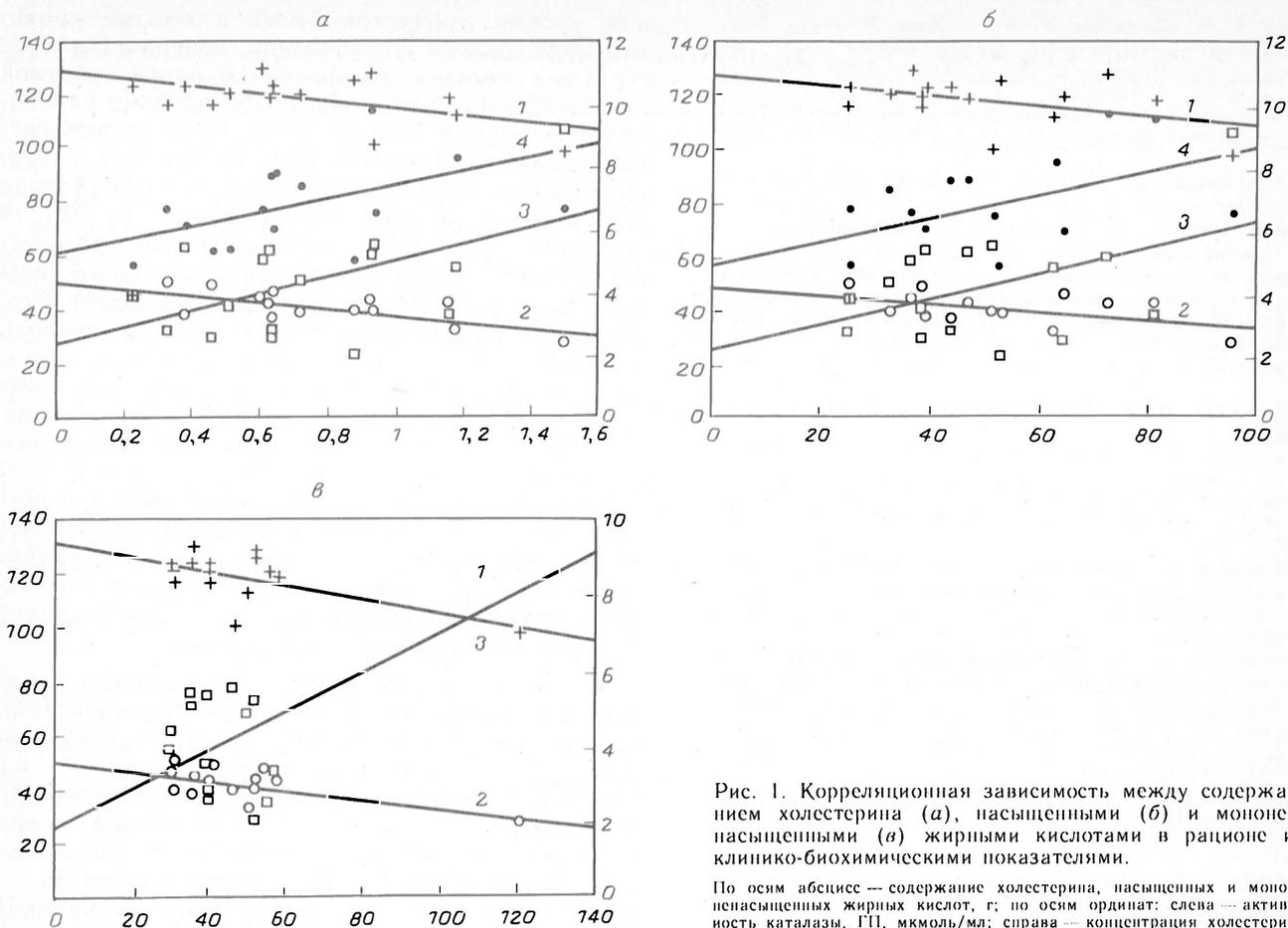


Рис. 1. Корреляционная зависимость между содержанием холестерина (а), насыщенными (б) и мононенасыщенными (в) жирными кислотами в рационе и клинико-биохимическими показателями.

По осям абсцисс — содержание холестерина, насыщенных и мононенасыщенных жирных кислот, г; по осям ординат: слева — активность каталазы, ГП, мкмоль/мл; справа — концентрация холестерина в сыворотке крови (в мкмоль/л), коэффициент атерогенности. 1 — каталаза; 2 — ГП; 3 — индекс атерогенности; 4 — холестерин.

исходного пищевого и метаболического статуса больных проводилась оценка фактического питания обследованных больных в домашних условиях. Результаты данного исследования представлены на рис. 1. Как видно, выявлена положительная корреляционная зависимость между уровнем потребления в составе рациона холестерина, его содержанием в сыворотке крови ($r=+0,53$; $p<0,05$) и коэффициентом атерогенности ($r=+0,53$; $p<0,05$), что закономерно. Заслуживает внимания обнаруженная корреляция между содержанием холестерина в рационе и активностью каталазы ($r=-0,50$; $p<0,05$) и ГП ($r=-0,70$; $p<0,05$) в эритроцитах. В этой связи особый интерес представляет факт установленной корреляционной взаимосвязи между содержанием в рационе насыщенных жирных кислот, концентрацией в сыворотке холестерина ($r=+0,49$; $p<0,05$), коэффициентом атерогенности ($r=+0,46$; $p<0,05$), активностью каталазы

($r=-0,40$; $p<0,05$) и ГП ($r=-0,53$; $p<0,05$), а также между фактическим потреблением мононенасыщенных жирных кислот, коэффициентом атерогенности ($r=+0,636$; $p<0,05$), активностью каталазы ($r=-0,60$; $p<0,05$) и ГП ($r=-0,62$; $p<0,05$). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о высокой чувствительности отдельных компонентов ферментной АОЗ к алиментарным воздействиям, и прежде всего к изменению жирового состава.

У всех больных, получавших рационы, содержащие повышенное количество ПНЖК семейства $\omega 3$, отмечалась положительная динамика свертывающей и противосвертывающей систем крови, что проявлялось достоверным снижением уровня фибриногена на 30 и 24 % по сравнению с исходным. Результаты клинико-биохимической оценки эффективности диетотерапии представлены в табл. 1, из которой видно, что по сумме большинства показателей, характеризую-

Таблица 1

Биохимические показатели липидного, углеводного, белкового и минерального обмена в сыворотке крови больных гипертонической болезнью до и после применения различных диет

Показатели	Диета А1		Диета А1+ИХМ+12,5 мг α -ТФ		Диета А1+ИХМ+125 мг α -ТФ	
	до лечения	после лечения	до лечения	после лечения	до лечения	после лечения
Холестерин, ммоль/л	6,87±0,37	5,92±0,27	6,75±0,37	5,21±0,31	6,99±0,67	4,79±0,20
Холестерин ЛПВП, ммоль/л	1,38±0,1	1,39±0,08	1,31±0,16	1,23±0,13	1,45±0,14	1,03±0,10
Апо А1, мг на 100 мл	84,0±5,1	94,8±6,9	88,41±6,5	132±12	79,6±7,87	125±13,7
Апо В, мг на 100 мл	65,0±6,3	57,1±4,7	64,2±7,16	94±6,97	65,8±10,9	92±9,45
Триглицериды, ммоль/л	2,22±0,47	1,27±0,14	1,59±0,16	0,78±0,07	2,85±0,89	1,12±0,23
Коэффициент атерогенности	4,32±0,44	3,6±0,4	4,76±0,81	3,76±0,78	3,89±0,35	3,99±0,52

Показатели системы АОЗ и интенсивности ПОЛ у больных гипертонической болезнью до и после применения различных диет

Показатели	Диета А1		Диета А1+ИХМ+12,5 мг α-ТФ		Диета А1+ИХМ+125 мг α-ТФ	
	до лечения	после лечения	до лечения	после лечения	до лечения	после лечения
Каталаза, мкмоль/мин/л	119±2,2	110±2,4	116±3,76	89,8±4,57	123±1,75	88,5±2,28
СОД, усл. ед/мл	1838±45,6	1692±34,6	1910±80,4	1962±64,9	1765±30,4	1867±63,6
ГР, мкмоль/мин/мл	0,8±0,06	0,67±0,09	0,77±0,05	0,84±0,06	0,84±0,11	1,0±0,07
ГП, мкмоль/мин/мл	42,4±1,4	32±0,5	39,3±2,08	45,3±2,07	45,5±1,30	47,2±1,32
SH-группы, моль/л, ($\cdot 10^{-4}$)	2,39±0,11	2,59±0,16	2,32±0,15	2,19±0,21	2,46±0,17	2,24±0,22
α-ТФ, мг/л	7,99±1,32	15,7±3,58	7,35±1,17	9,60±0,83	8,64±2,44	8,10±0,83
Витамин А, мкг/л	417±31,3	823±163	413±45,3	545±45,3	421±46,2	534±42,9
МДА, мкмоль/мл	0,47±0,06	0,41±0,06	0,39±0,05	1,08±0,12	0,54±0,10	0,77±0,10
ДК, мкмоль/мл	0,85±0,1	0,75±0,11	1,07±0,16	0,41±0,04	0,62±0,07	0,37±0,04

Примечание. МДА — малоновый диальдегид, ДК — диеновые конъюгаты.

этих состояние липидного обмена, наибольший эффект достигнут при использовании диеты А1 с включением эйконола.

Так, если у больных, получавших диету А1, к концу лечения уровень холестерина и триглицеридов снижался на 14 и 43 % соответственно, то у больных, получавших диету А1+ИХМ+12,5 мг α-ТФ, уровень холестерина и триглицеридов снижался по сравнению с исходным на 23 и 51 % ($p<0,05$). При использовании диеты А1+ИХМ+125 мг α-ТФ эти показатели были меньше исходных на 31 и 61 % соответственно. Сходная положительная динамика была установлена и для апо-А1, содержание которого в сыворотке возрастало при использовании диеты А1 на 13 %, диеты А1+ИХМ+12,5 мг α-ТФ на 49 % и диеты А1+ИХМ+125 мг α-ТФ на 57 %.

Несмотря на значительно выраженный гиполлипидемический, тромболитический, антиатерогенный и гипотензивный эффект, наблюдаемый при включении ПНЖК семейства ω3 в рацион больных с сердечно-сосудистой патологией [14], в значительном числе экспериментальных и клинических исследований показано их инициирующее влияние на процессы ПОЛ [11, 15]. Известно, что ПНЖК семейства ω3 эффективно инкорпорируются в фосфолипиды мембран клеток различных тканей, увеличивая степень их ненасыщенности. В ряде сообщений отмечена восприимчивость мембранно-связанных, внутриклеточных липидов и липидов в системной циркуляции к атакам свободных радикалов в условиях применения диет с включением эйкозопентаеновой и декозагексаеновой кислот [9, 15]. Учитывая, с одной стороны, потенцирующее влияние липидных перекисей на развитие гипертонической болезни [5] и, с другой — протекторное действие α-ТФ, препятствующего активации процессов ПОЛ даже при значительном увеличении квоты ПНЖК семейства ω3 — до 10 г в сутки [10], особый интерес представляло комплексное исследование интенсивности ПОЛ в совокупности с изучением состояния системы АОЗ у больных гипертонической болезнью при влиянии различного соотношения ПНЖК ω3 и α-ТФ в составе противоиатеросклеротической диеты. Результаты проведенного исследования представлены в табл. 2, на основании которых можно сделать заключение, что из всех ферментов АОЗ наиболее чувствительна к используемой диетотерапии каталаза, активность которой при использовании диеты А1, обогащенной эйконолом и

различными количествами α-ТФ, достоверно снижалась на 23—28 %. В свою очередь обращает на себя внимание выявленное в этих условиях значительное снижение содержания в сыворотке крови витаминов А и Е — на 31 и 32 % соответственно. Полученные данные позволяют считать, что для стабилизации процессов ПОЛ при назначении диет, обогащенных ПНЖК семейства ω3, достаточно использовать α-ТФ в дозах, лишь незначительно превышающих физиологические, — 5—7 мг α-ТФ на 1 г ПНЖК ω3. Одновременно можно сделать вывод о необходимости исследования системы АОЗ и процессов ПОЛ при оценке эффективности диетотерапии больных гипертонической болезнью.

Вместе с тем представленные результаты свидетельствуют об ограниченной информативности каждого из показателей системы АОЗ. В свою очередь наличие значительного числа информационных переменных какого-либо процесса предполагает необходимость их интегрального выражения, что в полной мере относится к многофакторному анализу функционального состояния системы АОЗ. В отдельных сообщениях предлагаются различные варианты кумулятивного показателя состояния системы АОЗ. Так, С. Чевари и соавт. [7] предлагают для подобной оценки показатель «фактор антиоксидантного состояния» (ФАС):

$$\text{ФАС} = \frac{A \text{ каталазы} \cdot A \text{ СОД}}{C \text{ МДА}}$$

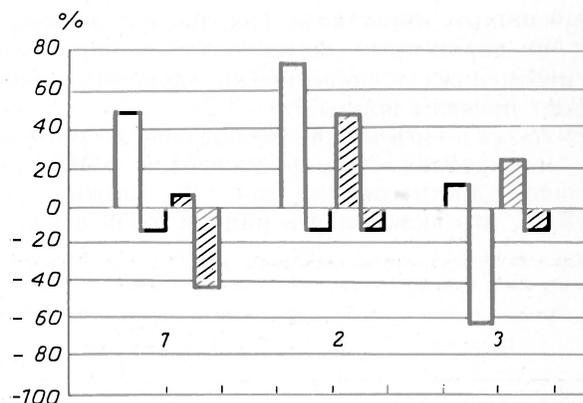


Рис. 2. Значения АОИ при различной диетотерапии (в % от нормы).

1 — диета А1; 2 — диета А1+ИХМ+12,5 мг α-ТФ; 3 — диета А1+ИХМ+125 мг α-ТФ. Светлые столбики — до лечения, заштрихованные — после лечения.

где A — активность ферментов; C — концентрация МДА.

Недостатком предложенного показателя является то, что он применим только в пределах одного исследования: опыт — контроль, здоровые — больные, до лечения — после лечения и т. п., а также отсутствие учета концентрационных взаимоотношений между переменными. Другие авторы [7] в качестве интегрального показателя предлагают «антиоксидантный коэффициент» (АОК) для плазмы крови и эритроцитов:

$$\text{АОК плазмы} = \frac{C \alpha\text{-ТФ} + C \text{SH-группы общая}}{C \text{ДК} + C \text{МДА}},$$

$$\text{АОК эритроцитов} = \frac{C \alpha\text{-ТФ} + C \text{SH-группы общая} + C \text{SH-группы свободная}}{C \text{МДА}}$$

Так как включаемые величины имеют неодинаковую размерность, их значение выражают в процентах по отношению к величинам нормы, принятым за 100. Данный показатель позволяет лишь в весьма ограниченной степени характеризовать состояние ферментной антиоксидательной системы, поскольку число ее компонентов значительно больше того, что включается в расчет АОК. Помимо этого, выражение фактических результатов в процентах от нормы ограничивает, как и в случае ФАС, возможность его использования необходимостью наличия групп сравнения и исключает использование при широкой вариации границ нормы, что необходимо для исследований в клинике.

Учитывая вышеизложенное, предлагается в качестве интегрального показателя системы АОЗ антиоксидантный индекс (АОИ):

$$\text{АОИ} = (k_1 A \text{ каталазы} + k_2 A \text{ СОД} + k_3 A \text{ SH-группы} + k_4 A \text{ ГП}) - (k_5 C \text{ МДА} + k_6 C \text{ ДК}),$$

где k_1 — 6 — коэффициенты, уравнивающие концентрационные величины и величины активности (k_1 — $4 = 1/A$ ферментов и k_5 — $6 = 1/C$ МДА; ДК).

В данном случае определяемый АОИ можно сравнивать с физиологическими и патологическими значениями, рассчитывая пределы нормы по справочным величинам. Так, расчет значения АОИ по справочным материалам и определению переменных у практически здоровых доноров дает пределы нормы 1,8—2,2.

Используя подобный анализ полученных результатов и оценивая степень дисперсии АОИ при различной диетотерапии (рис. 2), можно утверждать, что включение в рацион α -ТФ в коли-

честве 125 мг приводит к наибольшей стабилизации системы АОЗ.

Однако даже предложенный упрощенный вариант модели антиоксидательной системы свидетельствует как о возможности, так и о необходимости совершенствования методов многофакторного анализа комплекса АОЗ организма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Волгарев М. Н., Самсонов М. А., Покровский В. Б. // Вопр. питания.— 1993.— № 2.— С. 4—10.
2. Карагодина З. В., Корф И. И., Львович Н. А. и др. // Вопр. мед. химии.— 1988.— № 3.— С. 20—22.
3. Мальцев Г. Ю., Васильев А. В. // Там же.— 1994.— № 2.— С. 95—98.
4. Мальцев Г. Ю., Орлова Л. А. // Там же.— С. 91—94.
5. Сюрин А. А., Кобзев Г. В., Кулагин Ю. И. и др. // Там же.— 1991.— № 2.— С. 26—28.
6. Тугушева Ф. А., Куликова А. И., Зубина И. М. // Там же.— 1993.— № 5.— С. 18—21.
7. Чевари С., Анджл Т., Штрентер Я. // Лаб. дело.— 1991.— № 10.— С. 9—13.
8. Черняускене Р. Ч., Варшкявичене З. З., Грибаускас П. С. // Там же.— 1984.— № 6.— С. 362—365.
9. Brown I. E., Wahle K. W. S. // Clin. chim. Acta.— 1990.— Vol. 193.— P. 147—156.
10. Haglund O., Luostarinen R., Wallin R. et al. // J. Nutr.— 1991.— Vol. 121.— P. 165—169.
11. Hu M.-Z., Frankel E. N., Lebovitz B. E. et al. // Ibid.— 1989.— Vol. 119.— P. 1574—1582.
12. Janero D. R., Burghardt B. // J. molec. cell. Cardiol.— 1989.— Vol. 11.— P. 1111—1124.
13. Jialal I., Vega G. Z., Grundy S. M. // Atherosclerosis.— 1990.— Vol. 82, N 3.— P. 185—191.
14. Kinsell J. E., Iokesh B. R., Stone R. A. // Amer. J. clin. Nutr.— 1990.— Vol. 52.— P. 1028.
15. Meydani M., Natiello F., Joldin B. et al. // J. Nutr.— 1991.— Vol. 121.— P. 484—492.
16. Mille G. // J. biol. Chem.— 1959.— Vol. 234.— P. 502—506.

Поступила 01.11.93

THE STATE OF THE ANTIOXIDATIVE SYSTEM IN PATIENTS WITH HYPERTENSION KEPT ON A DIET ENRICHED WITH ω_3 -POLYUNSATURATED FATTY ACIDS AND α -TOCOPHEROL.

A. V. Vasilyev, [I. R. Bityasheva], G. R. Pokrovskaya, G. Yu. Maltsev, E. A. Varsanovich, L. A. Orlova, S. Kh. Soto

Institute of Nutrition, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow.

A state of the antioxidation system in blood and the rate of lipid peroxidation were studied in patients with hypertension. High sensitivity of the antioxidation system enzymes to alterations in the diet fat composition was detected in the patients, nutrition of whom was evaluated in detail. Excessive doses of α -tocopherol, added to the diet enriched with ω_3 -polyunsaturated fatty acids normalized lipid peroxidation and stabilized the enzyme activity involved in the antioxidation system. The integral parameter, proposed for evaluation of the antioxidation protection state and designated as "antioxidation index" involved estimation of catalase, superoxide dismutase, glutathione reductase and peroxidase activities as well as of content of malonic dialdehyde and diene conjugates in erythrocytes.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994
УДК 616.153.1:577.152.34]-074:543.544

А. С. Бурейко, В. В. Дорофеев,
И. Г. Щербак

ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭСТЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ С ПОМОЩЬЮ НЕПРЕРЫВНОЙ ГАЗОВОЙ ЭКСТРАКЦИИ ЛЕТУЧЕГО ПРОДУКТА

1 медицинский институт им. И. П. Павлова, Санкт-Петербург

Изучение протеолитических ферментов и их эндогенных ингибиторов продолжает привлекать внимание исследователей [6—8], однако требует использования надежных и точных методов регистрации активности ферментов. Высокая специфичность некоторых препаратов, таких, как факторы свертывания крови, протеолитические компоненты комплемента, делает невозможным использование белковых субстратов для определения их активности. В то же время широко распространенные спектрофотометрические методы с применением хромогенных субстратов не лишены ряда недостатков. К ним прежде всего относятся невозможность определения активности ферментов в гомогенатах тканей и других средах, а также высокая стоимость хромогенных субстратов протеиназы.

В ряде последних работ [3, 5] обсуждается возможность применения статических вариантов газохроматографического парофазного анализа (ПФА) для регистрации летучих продуктов ферментативного гидролиза эфирных субстратов. Метод позволяет путем остановки реакции после добавления ингибитора в инкубационную смесь и проведения газохроматографического анализа равновесной паровой фазы получить одну точку на кинетической кривой.

При применении другого (динамического) варианта ПФА — непрерывной газовой экстракции (НГЭ) — возможны периодическая регистрация летучего продукта в потоке газа-экстрагента, проходящего над реакционной смесью, и, следовательно, получение в одном опыте всей кинетической кривой. Очевидными преимуществами такого подхода являются надежное выявление начального линейного участка зависимости и возможность более точного вычисления активности фермента.

Методика. Теория. Исходя из общего уравнения, описывающего НГЭ реакционных систем [2], связь скорости изменения концентрации летучего продукта в газовой фазе $v_g = dC_g/dt$ и скорости жидкофазного процесса $v_l = dC_l/dt$ можно выразить следующим образом:

$$v_g = -\omega C_g / (KV_1) + (1/K)v_l, \quad (1)$$

где C_l , C_g — концентрация продукта в жидкой

и газовой фазах соответственно, v_l — объемная скорость газа-экстрагента, V_1 — объем реакционной смеси, K — коэффициент распределения летучего компонента.

На начальном линейном участке кинетической кривой, где $v_l = v_l^0 = \text{const}$, концентрация летучего продукта в газовой фазе составит:

$$C_g(t) = (v_l^0 V_1 / v_g) [1 - \exp(-v_g t / KV_1)]. \quad (2)$$

При выполнении условий

$$t < 0,04 K v_l / v_g \quad (3)$$

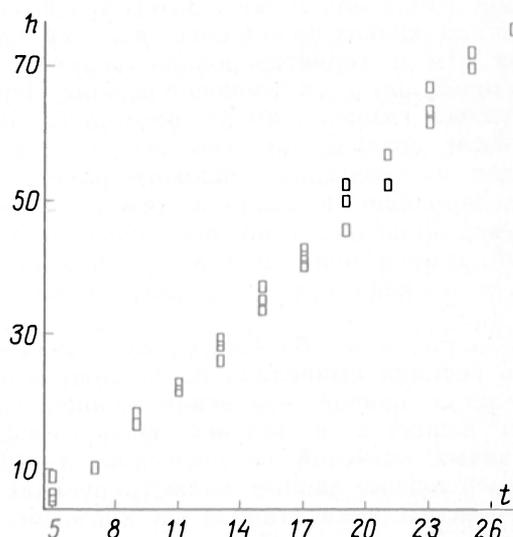
уравнение (2) с погрешностью менее 2 % можно переписать в виде:

$$C_g(t) = (1/K)v_l t. \quad (4)$$

При проведении градуировки газового хроматографа целесообразно включить коэффициент распределения летучего продукта в градуировочный множитель G (т. е. $G = C_1^{ал} / h_g$, где $C_1^{ал}$ — концентрация анализируемого летучего вещества в калибровочном растворе, h_g — высота пика определяемого компонента на хроматограмме пробы газовой фазы, полученной при точном воспроизведении условий проведения НГЭ). В этом случае начальная скорость ферментативного процесса и связанная с ней через коэффициент k активность фермента A ($A = k v_l^0$) рассчитываются из соотношения:

$$A = k G dh_g(t) / dt. \quad (5)$$

Реактивы и оборудование. Непрерывную газовую экстракцию проводили в специальном термостатируемом реакторе [1], снабженном магнитной мешалкой и патрубками для подвода и отвода газа. Температура реактора поддерживалась равной $37,0 \pm 0,2$ °С. Проходящий через реак-



Зависимость высоты пика этанола (h , мм) от времени инкубации (t , мин) при гидролизе БАЭЭ (0,887 ммоль/л) под действием cIa (30 мкг).

Зависимость высоты пика этанола от времени инкубации t при гидролизе БАЭЭ под действием $c1s$ (30 мкг) при различных концентрациях субстрата

t , мин	Концентрация БАЭЭ, ммоль/л				
	0,933	0,267	3,281	8,196	15,605
5	27,50	14,0	36,25	120,0	80,0
7	46,75	20,0	64,25	200,0	165,0
9	65,0	25,5	108,75	300,0	255,0
11	76,25	34,2	154,25	385,0	340,0
13	101,25	38,0	188,75	457,5	420,0
15	115,00	42,0	242,50	535,0	508,0
17	133,75	48,0	276,25	617,5	602,0
19	143,75	51,5	310,00	690,0	705,0
v , мм/мин	8,47	2,71	20,31	40,80	44,04

Примечание. Высота пиков приведена к чувствительности хроматографа $2 \cdot 10^{-11}$ А.

тор газ насыщался летучими веществами и через фторопластовую мембрану, улавливавшую брызги жидкости, поступал в газовую петлю автоматически управляемого шестиходового газового крана-дозатора (кран термостатировался при 82°C). При повороте крана проба газа из петли направлялась в аналитическую колонку хроматографа «Цвет-102» с модифицированной газовой схемой. Использовали стальную аналитическую колонку размером $1 \text{ м} \times 4 \text{ мм}$, заполненную неподвижной фазой SE-30 и 0,1 % полиэтиленгликольмонолауратом (Detergent BRIJ-35) на хроматоне NAW HMDS (0,25—0,315 меш); температура термостата колонок 82°C , газ-носитель — азот, 30 мл/мин, детектор ионизационно-пламенный, шкалы электрометра ($5\text{—}20$) $\cdot 10^{-11}$ А.

В качестве примера был исследован процесс гидролиза N- α -бензоиларгинин этилового эфира (БАЭЭ) под действием $c1s$ -эстеразы ($c1s$). В работе использовали препараты $c1s$ -субкомпонента комплемента, выделенного согласно [4], и БАЭЭ («Sigma»).

При проведении кинетических опытов в реактор помещали 0,5—1,0 мл раствора БАЭЭ в фосфатном буфере pH 6,86; скорость газа, пропускаемого через реактор, составляла 13 мл/мин. Раствор термостатировали 10 мин. Затем при помощи дозатора для жидких проб в смесь вводили 0,5 мл раствора $c1s$ и герметизировали реактор при помощи мембраны из силиконовой резины. Первое переключение газового крана проводили через 5 мин после дозирования, так как требовалось время для установления теплового равновесия, затем дозирование выполняли каждые 2 мин. На рисунке приведена типичная зависимость измеренной высоты пика этанола h на хроматограмме от времени t для 3 параллельных опытов.

Результаты и обсуждение. Начальную скорость реакции вычисляли по наклону линейного участка кривой изменения концентрации летучего вещества в газовой фазе. Разброс рассчитанных значений не превышал 5—10 %. Экспериментальные данные, иллюстрирующие изменение высоты пика этанола на хроматограмме для опытов с различной концентрацией БАЭЭ, приведены в таблице. На основе этих данных была построена зависимость начальной скорости реакции от начальной концентрации субстрата в координатах Лайнуивера — Бэрка; коэффициент

корреляции составил 0,9998. Рассчитанная из этой зависимости константа Михаэлиса (K_M) оказалась равной $(5,6 \pm 0,6) \cdot 10^{-3}$ моль/л. Важно отметить, что для вычисления K_M , вообще говоря, нет необходимости в проведении градуировки газового хроматографа, так что погрешность определения калибровочного коэффициента не отражается на расчетном значении K_M . Полученная величина K_M хорошо согласуется с данными литературы: согласно [9], K_M находится в пределах $(2,5\text{—}5) \cdot 10^{-3}$ моль/л.

Разработанный метод пригоден для определения эстеразной активности и кинетических характеристик различных протеиназ, а также других ферментов, катализирующих реакции, сопровождающиеся образованием летучих продуктов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бурейко А. С., Мариничев А. И. // Вестн. Ленингр. ун-та. Сер. 4.— 1991.— № 2 (11).— С. 56—61.
2. Мариничев А. И., Иоффе Б. В. // Докл. АН СССР.— 1987.— Т. 292, № 5.— С. 1181—1185.
3. Романчук Л. А., Куликова А. И. // Сборник трудов ЛМИ / Под ред. И. Г. Щербака.— 1987.— С. 2—14.
4. Arland G. I., Reboil A., Meyer C. M., Colomb M. // Biochim. biophys. Acta.— 1977.— Vol. 485.— P. 215—226.
5. Curini R., Curtis S. A., D'Ascenzo G., Lagana A. // Talanta.— 1989.— Vol. 36, N 11.— P. 1087—1090.
6. Gigli I. // Meth. Enzymol.— 1988.— Vol. 162.— P. 626—639.
7. Pubinina E., Babenko G., Shcherbak I. // Free radical Biol. Med.— 1992.— Vol. 13.— P. 1—7.
8. Soltrup-Jensen L., Birkedal-Hansen H. // J. biol. Chem.— 1989.— Vol. 261.— P. 393—401.
9. Valet G., Cooper N. // J. Immunol.— 1974.— Vol. 112.— P. 339—350.

Поступила 28.04.93

GAS CHROMATOGRAPHIC ESTIMATION OF THE ESTERASE ACTIVITY OF PROTEOLYTIC ENZYMES BY MEANS OF CONTINUOUS GAS EXTRACTION OF A VOLATILE PRODUCT.

A. S. Bureiko, V. V. Dorofeikov, I. G. Scherbak
I. P. Pavlov First Medical Institute, St. Petersburg.

A new procedure was developed for estimating the esterase activity of proteolytic enzymes by using $C1s$ subcomponent of complement and N- α -benzoyl-L-arginine ethyl ester as a substrate. In contrast to other methods, which used static variants of gas chromatographic vapour-phase analysis for registration of the volatile reaction product alcohol, the procedure involved steady gas extraction of the volatile product in the gas stream over the incubation mixture. This method enabled to obtain a kinetic curve during one experiment as well as to elevate the accuracy of enzymatic activity estimation.