

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ И КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 616.153.1:577.152.34+616.154:577.175.85]-074

©Коллектив авторов

### ДЕЙСТВИЕ ЛЕЙКОЦИТАРНОЙ ЭЛАСТАЗЫ НА ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЙ КИНИНОГЕН ПЛАЗМЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА В ПРИСУТСТВИИ АЛЬФА-1-ПРОТЕИНАЗНОГО ИНГИБИТОРА. АНАЛИЗ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ ДЕГРАДАЦИИ.

В.Л. ДОЦЕНКО<sup>1</sup>, Е.А. НЕШКОВА<sup>1</sup>, Э.РУГНЕС<sup>2</sup>, Х.ЙОХАНСЕН<sup>2</sup>,  
Т.Б. БЛОХИНА<sup>1</sup>, Г.А.ЯРОВАЯ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Российская Медицинская Академия Последипломного Образования,  
г.Москва, 123836, Баррикадная 2, тел/факс 945-24-15.

<sup>2</sup>Школа Фармации, Университет Осло, г. Осло.

В работе изучено действие лейкоцитарной эластазы на высокомолекулярный кининоген (ВМК) плазмы крови человека в отсутствии и в присутствии различных концентраций  $\alpha$ -1ПИ. Результаты свидетельствуют, что даже при концентрации ингибитора в 3-5 раз превышающей молярную концентрацию эластазы, деградация ВМК под действием фермента происходит постепенно, уменьшаясь в течение 1-2 часов после начала совместной инкубации. Скорость ингибирования эластазы  $\alpha$ -1ПИ в присутствии ВМК оказалась приблизительно равной и не зависела от порядка добавления эластазы в инкубационную смесь (до или после  $\alpha$ -1ПИ). Деградация кининогена эластазой в присутствии  $\alpha$ -1ПИ сопровождается нарушением его адгезивной функции при довольно высокой устойчивости ингибиторной активности этого белка по отношению к SH-протеиназам.

Таким образом, ингибирование лейкоцитарной эластазы  $\alpha$ -1ПИ в присутствии кининогена происходит в течение достаточно длительного времени, что приводит к деградации интактного кининогена. Последнее может иметь значение в патогенезе тромбо-геморрагического синдрома как осложнения тяжелого воспалительного процесса.

**Ключевые слова:** нейтрофилы, лейкоцитарная эластаза, воспаление, высокомолекулярный кининоген, белки плазмы крови

**ВВЕДЕНИЕ.** Основной протеиназой азурофильных гранул полиморфноядерных лейкоцитов, имеющей нейтральный оптимум pH и оказывающей наиболее разрушительное действие на биологические структуры, является эластаза. Известно, что она освобождается из первичных гранул лейкоцитов в процессе их дегрануляции. Дегрануляционная активность адгезированных на эндотелиальных клетках лейкоцитов в очаге травмы или в микрососудистом русле органов-мишеней при септицемии приводит к повреждению не только эндотелиальных клеток и базальных мембран, но и белков плазмы крови, в том числе факторов свертывающей и фибринолитических систем, а также белков так называемой контактной фазы активации гемостаза, куда входят высокомолекулярный кининоген, прекалликреин, факторы XI и XII (см. [1] и приведенные там ссылки). Эти события являются основой для развития полиорганной и/или дыхательной недостаточности и тромбо-геморрагического синдрома [2,3].

Повреждающее действие лейкоцитарной эластазы в отношении белков ткани и плазмы крови происходит несмотря на быстрое связывание освобождающегося фермента ингибиторами плазмы крови: альфа-1-протеиназным ингибитором ( $\alpha$ -1ПИ) и отчасти альфа-2-макроглобулином ( $\alpha$ -2М). Подавление активности эластазы  $\alpha$ -1 протеиназным ингибитором в условиях *in vitro* происходит в течение нескольких микросекунд [4, 5]. Вопрос о том, насколько быстро ингибирование фермента происходит в плазме крови в присутствии плазменных белков - потенциальных субстратов эластазы - остается открытым. Предполагают, что расщепление белковых субстратов эластазой без доступа  $\alpha$ -1ПИ может происходить локально, в непосредственной близости от плазматической мембраны адгезированного нейтрофила [6, 7]. Возможно также, что при острой реакции воспаления  $\alpha$ -1ПИ подвергается окислению реактивными метаболитами кислорода, и его действие на лейкоцитарную эластазу становится малоэффективным [8, 9].

Мы предположили, что расщепление белков плазмы крови под действием эластазы в присутствии  $\alpha$ -1ПИ может протекать в результате конкуренции за связывание с эластазой белковых субстратов и ингибитора.

Для проверки этого предположения было изучено действие лейкоцитарной эластазы на высокомолекулярный кининоген (ВМК) плазмы крови человека в присутствии различных концентраций  $\alpha$ -1ПИ. Были изучены также возможность  $\alpha$ -1ПИ в конкурентном вытеснении высокомолекулярного кининогена из комплекса с эластазой.

**МЕТОДИКА.** Лейкоцитарная эластаза (ЛЭ) была выделена и очищена из лейкоцитарной массы человека путем биоспецифической хроматографии экстракта гомогената лейкоцитов на трисилл-сефарозе [10]. Экстракцию белка проводили из взвеси лейкоцитов ( $10^8$  клеток/мл) в 0,05 М трис-HCl буфере, содержащем 1 М NaCl, 0,005 М  $\text{CaCl}_2$ , 0,34 М сахарозу, 0,005% тритон X-100, pH 7,8, при многократном замораживании - оттаивании с последующей гомогенизацией и центрифугированием. Супернатант разбавляли в 3 раза буфером, уравнивающим сорбент (0,05 М трис-HCl, содержащим 1 М NaCl, pH 7,8), и пропускали через колонку размером 3,5x15 см, заполненную гордокс-сефарозой. Элюцию фермента проводили 0,1 М ацетатным буфером, содержащим 1 М NaCl и имеющим pH 5,2. Удельная активность препарата со специфическим

субстратом метокси-сукцинил-Ала-Ала-Про-Вал-*n*-нитроанилидом (MeoSuc-Ala<sub>2</sub>-Pro-Val-pNA, Sigma, St.Louis, Mo, США), определенная в 0,1 М трис-НСl буфере, рН 7,6, содержащем 0,5 М NaCl, составляла 20 мкмоль/мин·мг.

**Высокомолекулярный кининоген (ВМК)** из плазмы крови человека был получен методом Dittman et.al [11], включающем ионообменную хроматографию цитратной плазмы крови человека в присутствии 0,05 М бензамидина на DEAE - и CM - сефадексе (Pharm. AB, Стокгольм, Швеция) и гель-фильтрацию на сефадексе G-50 (Pharm. AB). Концентрацию иммунореактивного кининогена во фракциях определяли методом электрофореза в додецилсульфате Na (ДС-электрофорез) [12] с последующим иммуноблоттингом с применением антител кролика против ВМК. Препарат содержал 331 мкг ВМК в 1 мл; перед использованием его обязательно диализовали против 0,1 М трис-НСl буфера, рН 7,6.

**Альфа-1-протеиназный ингибитор ( $\alpha$ -1ПИ)** получен из сыворотки крови человека. 160 мл сыворотки, разведенной в 2 раза 0,1 М трис-НСl буфером, рН 8,0, содержащим 25 мг/л полибрена (гексадимедринбромид, Serva), 0,003 М ЭДТА и 0,02% NaN<sub>3</sub>, вносили в колонку с QAE-сефадексом А-50 (Pharm. AB, Швеция). Элюцию связанных с ионообменником белков проводили градиентом NaCl от 0,1М (600мл) до 0,6 М (600мл). Фракции, содержащие  $\alpha$ -1ПИ, объединяли, диализовали против 0,1М трис-НСl буфера, рН 8,0, и повторяли процедуру хроматографии в колонке объемом 50 мл с QAE-сефадексом А-50. Элюированные фракции фильтровали на колонке с сефадексом G-100 (Pharmacia AB), концентрировали и хранили в течение 0,5 месяца при t° -70°C.

**Активность  $\alpha$ -1ПИ** определяли по степени ингибирования трипсина (Srofa, Чехословакия) и лейкоцитарной эластазы. Удельная активность полученного препарата по трипсину составляла 1,1 ИЕ/мг. При этом за 1 ИЕ принимали такую активность ингибитора, при которой происходило подавление 1 Е активности трипсина (1 мкмоль/мин по N- $\alpha$ -бензоил-аргинин этиловому эфиру в качестве субстрата при рН 8,0 и t° 25° С). Титрование лейкоцитарной эластазы препаратом ингибитора проводили в 0,1 М трис-НСl буфере, рН 7,6, с использованием MeoSuc Ala<sub>2</sub>-Pro-Val-pNa в качестве субстрата. 1 мкл препарата ингибитора (26,2 мкг, 0,5 нмоль) полностью подавлял 20 мкл (69 пикомоль) лейкоцитарной эластазы, то есть полученный препарат содержал около 14 % ингибитора.

#### **Действие лейкоцитарной эластазы на ВМК.**

Инкубацию ЛЭ с ВМК проводили в течение различных промежутков времени: 20 сек., 5, 10 и 15 минут, а также 1, 2, 3 и 4 минут. Инкубационная смесь содержала 200 мкл ВМК (66,2 мкг; 0,55 нмоль), 10 мкл ЛЭ (1мкг; 34,5 пикомоль) и 30 мкл 0,1 М трис-НСl буфера, рН 8,6. После инкубации из инкубационной смеси отбирали аликвоты объемом 30 мкл, добавляли 10 мкл 8% раствора додецилсульфата Na (ДС-Na) и выдерживали в кипящей водяной бане в течение 5 минут.

#### **Действие лейкоцитарной эластазы на ВМК в присутствии $\alpha$ -1ПИ.**

В первом варианте экспериментов добавление эластазы на 30 секунд предшествовало добавлению  $\alpha$ -1ПИ. Во втором варианте - эластазу добавляли в инкубационную смесь, уже содержащую ингибитор.



**Вариант А:** к 200 мкл ВМК (0,55 нмоль) добавляли 10 мкл ЛЭ (34,5 пикомоль). После 30-секундной преинкубации в смесь вносили 6, 12 или 24 мкл разведенного в 10 раз  $\alpha$ -1ПИ, т.е. количество ингибитора, необходимое для полного ингибирования эластазы, а также в 2 и 4 раза его превышающее. Аликвоты по 30 мкл отбирали через 15 сек., 1, 2, 3, 60 и 120 минут. Реакцию останавливали добавлением 10 мкл 8% ДС-На и выдерживанием в течение 5 минут при 100°C.

**Вариант Б:** к 200 мкл ВМК добавляли 6, 12 или 24 мкл (0,3, 0,6 или 1,2 нмоль, соответственно) в 10 раз разбавленного  $\alpha$ -1 ПИ. После 30-секундной преинкубации в смесь вносили 10 мкл (34,5 пикомоль) ЛЭ, перемешивали и по истечении 15 сек, 1, 2, 3, 60 и 120 мин отбирали аликвоты объемом 30 мкл. Реакцию останавливали добавлением раствора ДС-На и кипячением.

#### ***Действие комплекса лейкоцитарной эластазы с $\alpha$ -1ПИ на ВМК.***

Для формирования комплекса 40 мкл ЛЭ (4мкг, 138 пикомолей) инкубировали с 24 или 48 мкл  $\alpha$ -1 ПИ, предварительно в 10 раз разведенного 0,1 М трис-HCl буфером, pH 7,6 (1,2 или 2,4 нмоль соответственно). По истечении 10 мин. 40 мкл комплекса добавляли к 200 мкл ВМК и смесь инкубировали в течение 6 часов, отбирая аликвоты объемом 30 мкл и инактивируя их добавлением 10 мкл 8% ДС-На и 5-минутным кипячением.

#### ***Электрофоретический анализ продуктов деградации ВМК.***

Анализ продуктов деградации методом электрофореза в ДС-На - полиакриламидном геле проводили без восстановления в однородном 10% вертикальном геле, используя Hoefer SE 200 Mighty Small Mini - Vertical Unit - Vertical Unit и EPS 3500 Power Supply (Pharmacia Biotech). Визуализацию фрагментов белков проводили окраской гелей в растворе 0,25 % Кумасси голубого R - 250, содержащего 50 % метанола и 10 % уксусной кислоты. После отмывания и насыщения гелей глицерином их высушивали и подвергали компьютерному анализу.

Идентификацию полученных при электрофорезе ингибитора, комплекса его с эластазой и фрагментов ВМК проводили с помощью иммуноблоттинга после перенесения белковых зон на нитроцеллюлозу согласно методу Towbin et al. [13] на установке Hoefer TE 70 Semi Phor (Hoefer Scientific Instr., США) с антителами кролика против  $\alpha$ -1ПИ (Code N A0012, Dako A/S, Дания) в разведении 1:2000 или с антителами кролика против ВМК, полученными в лаборатории университета г.Осло. Связанные антитела кролика определяли с помощью антител козы, конъюгированных со щелочной фосфатазой (Bio-Rad Immuno-Blot Assay kit, Goat Anti-Rabbit [Cat N 170-6509]). Окрашенные протеинограммы сканировали на сканнере Shimadzu CS-9000. При анализе протеинограмм количество нативного или деградированного кининогена в белковых зонах оценивали по их плотности. Активность лейкоцитарной эластазы оценивали по скорости уменьшения плотности зоны нативного кининогена или увеличению плотности зон продуктов его деградации. Молекулярную массу белков в Да определяли, сравнивая местоположение зон с белковыми стандартами (Pharmacia Biotech): фосфорилаза «b» (94 кДа), бычий сывороточный альбумин (67 кДа), овальбумин (43 кДа), карбоангидраза (30 кДа), соевый ингибитор трипсина (20,1 кДа),  $\alpha$ -лактальбумин (14,4 кДа).



**Действие эластазы на ингибиторную функцию ВМК (СРІ- активность) в присутствии  $\alpha$ -1 ПИ.**

К 50 мкл ВМК (16,5 мкг, 0,137 нмоль), находящихся в 0,1 М трис-НСІ буфере, рН 8,0, добавляли 2,5 мкл ЛЭ (8,6 пикомоль) и смесь инкубировали до добавления 12 мкл разведенного в 10 раз  $\alpha$ -1 ПИ (31,5 мкг, 0,6 нмоль) 10 минут, 1 и 2 часа. Контролем служила смесь 50 мкл ВМК, 12 мкл  $\alpha$ -1 ПИ и 2,5 мкл 0,1 М трис-НСІ буфера, рН 8,0. Продукты деградации ВМК и контрольную пробу инкубировали с раствором папаина в течение 30 минут, после чего проверяли остаточную активность фермента.

Во втором варианте инкубации в пробу, содержащую 50 мкл ВМК, добавляли 2,5 мкл эластазы и после 30-секундной инкубации ингибировали эластазу  $\alpha$ -1ПИ, который вносили в пробу либо в эквимольном эластазе количестве (0,012 мкл, 3,1 мкг), либо в 2,4 раза больше. После добавления ингибитора отбирали аликвоты через 10 минут, а также через 1 и 2 часа.

**Действие чистой эластазы и эластазы в присутствии  $\alpha$ -1ПИ на адгезивную способность высокомолекулярного кининогена.**

Изучение действия эластазы на адгезивность кининогена проводили в двух вариантах. В первом варианте были сформированы три инкубационных пробы в составе: 1. *контрольная проба* содержала 100 мкл биотинированного ВМК (3360 нмоль) и 23,6 мкл 0,01 М Na-фосфатного буфера, рН 7,4, с 150 mM NaCl; 2. *первая опытная проба* содержала 100 мкл биотинированного ВМК и 20 мкл ЛЭ (69 пикомоль); после преинкубации в течение 1 часа к пробе добавляли 3,6 мкл  $\alpha$ -1 ПИ (1,8 нмоль); 3. *вторая опытная проба* содержала 100 мкл биотинированного ВМК и 3,6 мкл  $\alpha$ -1ПИ. В эту инкубационную смесь вносили 20 мкл ЛЭ и инкубировали в течение 2 часов. По истечении времени инкубации пробы разводили 0,01 М Na-фосфатным буфером таким образом, чтобы каждая инкубационная проба была представлена серией разведений, содержащих: 80, 40, 20, 10, 5 и 2,5 нмоль ВМК, и вносили в лунки полистиролового планшета, в котором, после определенной последовательности промываний, инкубаций со стрептавидином, конъюгированным с пероксидазой хрена, и соответствующим субстратом, оценивали количество кининогена, адгезированного на поверхности лунок.

Во втором варианте инкубационные пробы имели следующий состав: *Первая контрольная проба* содержала 50 мкл биотинированного ВМК и 475 мкл упомянутого выше фосфатного буфера. *Вторая контрольная проба* содержала 50 мкл биотинированного ВМК, 18 мкл разведенного в 10 раз  $\alpha$ -1ПИ (0,9 нмоль) и 457 мкл фосфатного буфера. Первая, вторая и третья опытные пробы содержали 50 мкл биотинированного ВМК, 10 мкл ЛЭ (34,5 пикомоль), 18 мкл  $\alpha$ -1 ПИ (1:10) и 447 мкл фосфатного буфера. Время преинкубации ВМК с ЛЭ в I пробе составляло 1 минуту, во II - 5 минут и в III - 10 минут, по истечении которого в инкубационную пробу добавляли  $\alpha$ -1ПИ. Четвертая опытная проба повторяла по составу первые три, но 18 мкл ингибитора в нее добавляли ранее эластазы, после чего сразу же приступали к процедуре разведения. В данном варианте серия разведений содержала 320, 160, 80, 40, 20, 10, 5 и 0 нмоль биотинированного ВМК. Оценку поверхностного связывания ВМК проводили так, как это описано для первого варианта.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Дегградация высокомолекулярного кининогена под действием лейкоцитарной эластазы.

Инкубация ВМК с лейкоцитарной эластазой уже через 5 минут приводила к расщеплению молекул ВМК. При этом в течение первой минуты на электрофореграмме нарастала плотность полосы белка с  $M_r$  96 кДа, которая затем в течение следующих 4-х минут исчезала, уступая место продукту деградации с  $M_r$  57 кДа. Инкубация ВМК в течение 10-15 минут влекла за собой появление стабильной белковой зоны с  $M_r$  около 30 кДа. На рис.1 представлена электрофореграмма ВМК и продуктов его деградации после его инкубации с эластазой в течение 20 секунд, 1, 2, 3 и 4 минут. Расщепление ВМК в инкубационной пробе происходило со скоростью 467 нмоль в минуту, что соответствовало активности фермента 46,7 мкмоль/мин·мл или 467 мкмоль /мин·мг.

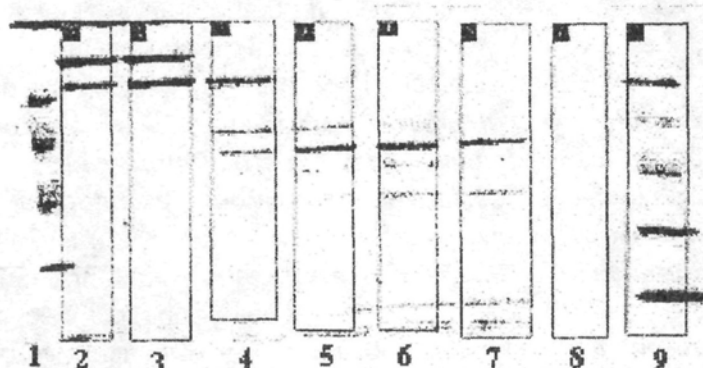


Рисунок 1.

Действие лейкоцитарной эластазы на высокомолекулярный кининоген плазмы крови человека. ДС-На-электрофореграмма в 10% ПААГ, окраска Кумасси R-250. 1 и 9 - набор стандартных белков; 2 - ВМК; 3 - ВМК + эластаза, 20 сек.; 4 - ВМК + эластаза, 1 мин.; 5 - ВМК + эластаза, 2 мин.; 6 - ВМК + эластаза, 3 мин.; 7 - ВМК + эластаза, 4 мин.; 8 - эластаза. Количественные характеристики белков в тексте.

### Образование комплекса лейкоцитарной эластазы с $\alpha$ -1 ПИ.

На рисунке 2 показано связывание 2,4 мкл (63 мкг) препарата  $\alpha$ -1ПИ возрастающими концентрациями лейкоцитарной эластазы. Изменение количества эластазы в пробе от 5 мкл (17,2 пмоль) до 60 мкл (206 пмоль) при одинаковой концентрации  $\alpha$ -1 ПИ (1,2 нмоль на пробу) приводило практически к полному связыванию  $\alpha$ -1ПИ ферментом и образованию стабильного в условиях ДС-На-электрофореза фермент-ингибиторного комплекса. Исходя из эквимольного отношения концентраций фермента и ингибитора в комплексе, можно сделать вывод о том, что в частично очищенном препарате  $\alpha$ -1ПИ содержится около 17 % ингибитора. Эта величина примерно соответствует количеству активного ингибитора в препарате  $\alpha$ -1ПИ, рассчитанному по энзиматическому титрованию ЛЭ ингибитором. Полного ингибирования 20 мкл эластазы (68,8 пмоль) достигали при внесении в пробу 1 мкл препарата  $\alpha$ -1ПИ (0,5 нмоль). Таким образом, расчет количества активного  $\alpha$ -1ПИ в препарате частично очищенного ингибитора по электрофореграмме с последующим иммуноблоттингом, а также по результатам энзиматического титрования эластазы ингибитором с

использованием хромогенного специфического субстрата, показал примерно одинаковое содержание активного ингибитора в препарате: иммуноблоттинг свидетельствовал о наличии примерно 17 %  $\alpha$ -1ПИ в использованном препарате, энзиматическое титрование -  $\approx 14$  %.

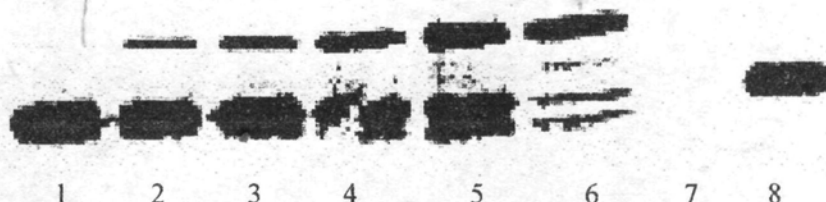


Рисунок 2.

Образование комплекса лейкоцитарной эластазы с  $\alpha$ -1 ПИ. ДС-На-электрофореграмма в 10% ПААГ. Иммуноблот с антителами против  $\alpha$ -1 ПИ. 1.  $\alpha$ -1ПИ (63 мкг); 2.  $\alpha$ -1ПИ + 5мкл эластазы; 3.  $\alpha$ -1ПИ + 10мкл эластазы; 4.  $\alpha$ -1ПИ + 20 мкл эластазы; 5.  $\alpha$ -1ПИ + 40 мкл эластазы; 6.  $\alpha$ -1ПИ + 60 мкл эластазы; 7. 70 мкл эластазы; 8.  $\alpha$ -1ПИ (31 мкг).

#### **Результаты совместного инкубирования комплекса ЛЭ- $\alpha$ -1ПИ с высокомолекулярным кининогеном.**

Результаты инкубации ВМК с комплексом ЛЭ- $\alpha$ -1ПИ показали, что несмотря на полное подавление амидазной активности лейкоцитарной эластазы ингибитором в эквимольной, а также в 2, 4 и 5 раз ее превышающей концентрации, лейкоцитарная эластаза сохраняла свою деструктивную способность по отношению к ВМК в течение по крайней мере 4-6 часов.

На рис. 3 представлена электрофореграмма, иллюстрирующая результаты длительной инкубации ВМК с предварительно сформированным комплексом ЛЭ- $\alpha$ -1ПИ. Оценка интенсивности окраски белковых зон свидетельствует, что основная полоса ВМК в ходе инкубации с комплексом уменьшает свою плотность, тогда как белковая зона с  $M_r$  96 кДа при длительной инкубации становится более плотной.

При количественной оценке нативного кининогена в инкубационных пробах, содержащих 10 мкл эластазы, активность которой предварительно подавлялась  $\alpha$ -1ПИ в различных концентрациях, оказалось, что в течение первых 15-30 секунд инкубации происходило заметное уменьшение (на 10-70 %) плотности полосы нативного кининогена. В течение последующего времени инкубации (1-4 часа) плотность данной полосы продолжала уменьшаться, но со значительно меньшей скоростью (0,2 - 0,5 % в час). На рис. 4 представлены данные, показывающие уменьшение количества ВМК (в % от исходного), рассчитанное по электрофореграммам аликвот, отобранных в различное время после начала инкубации ВМК с комплексом ЛЭ- $\alpha$ -1ПИ.



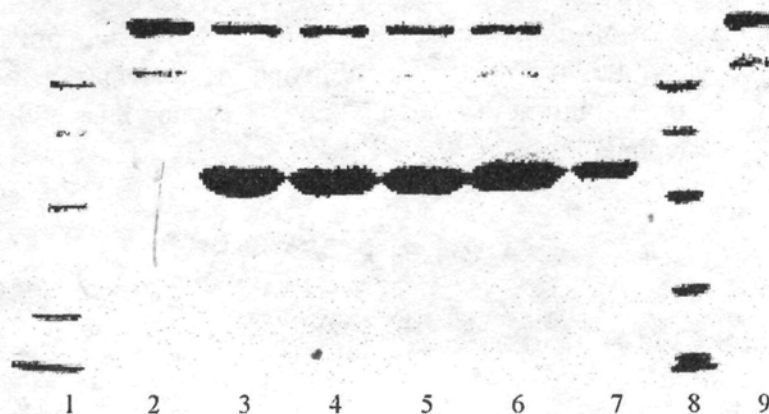


Рисунок 3.

Результаты инкубации ВМК с комплексом ЛЭ -  $\alpha$ -1ПИ. ДС-Na-электрофореграмма в 10 % ПААГ, окраска Кумасси R-250. Молярное отношение ЛЭ к  $\alpha$ -1 ПИ при формировании комплекса: 1:2. Инкубационная смесь содержала 200 мкл ВМК и 40 мкл ЛЭ -  $\alpha$ -1ПИ. 1 и 8 - набор стандартных белков; 2. ВМК; 3. ВМК + ЛЭ -  $\alpha$ -1 ПИ (20 сек); 4. ВМК + ЛЭ -  $\alpha$ -1 ПИ (1 час); 5. ВМК + ЛЭ -  $\alpha$ -1 ПИ (3 часа); 6. ВМК + ЛЭ -  $\alpha$ -1 ПИ ( 20 час); 7 ЛЭ -  $\alpha$ -1 ПИ; 9 ВМК.

#### Результаты инкубирования ВМК с лейкоцитарной эластазой в присутствии $\alpha$ -1 ПИ.

Активность эластазы, определяемая с белковым субстратом в присутствии  $\alpha$ -1 ПИ, сохранялась в течение по крайней мере 2-х часов инкубации. В первом случае, когда  $\alpha$ -1 ПИ добавляли после 30-секундной инкубации ВМК с эластазой, главное падение активности (в среднем на 38 % от первоначальной) происходило в первые 15 секунд совместного инкубирования. В последующие 3 минуты активность уменьшалась до 3-27 % и только через 1 - 2 часа после начала инкубации активность падала до 0 - 0,4 % от исходной. На рис. 5 (А) представлены величины остаточной активности ЛЭ через 15 сек, 1, 3, 60 и 120 минут после внесения в инкубационную смесь  $\alpha$ -1 ПИ.

При внесении ЛЭ в инкубационную смесь, содержащую ВМК и  $\alpha$ -1 ПИ, фермент также терял активность лишь через 2 часа (рис.5,Б). Через 15 сек после добавления эластазы в инкубационную смесь ее активность падала, в среднем на 25 %. В том случае, когда концентрация  $\alpha$ -1ПИ в среде инкубации соответствовала молярной концентрации эластазы, ее активность через 15 секунд после добавления в инкубат почти не изменялась. Если концентрация  $\alpha$ -1 ПИ в 5 раз превышала эквимольную, активность фермента сохранялась на уровне 60 %. По истечении 3-х минут активность эластазы падала до 5 - 15 % от начальной активности, независимо от концентрации  $\alpha$ -1 ПИ в инкубационной смеси, и только через 1 - 2 часа остаточная активность эластазы составляла 0 - 0,5 %.

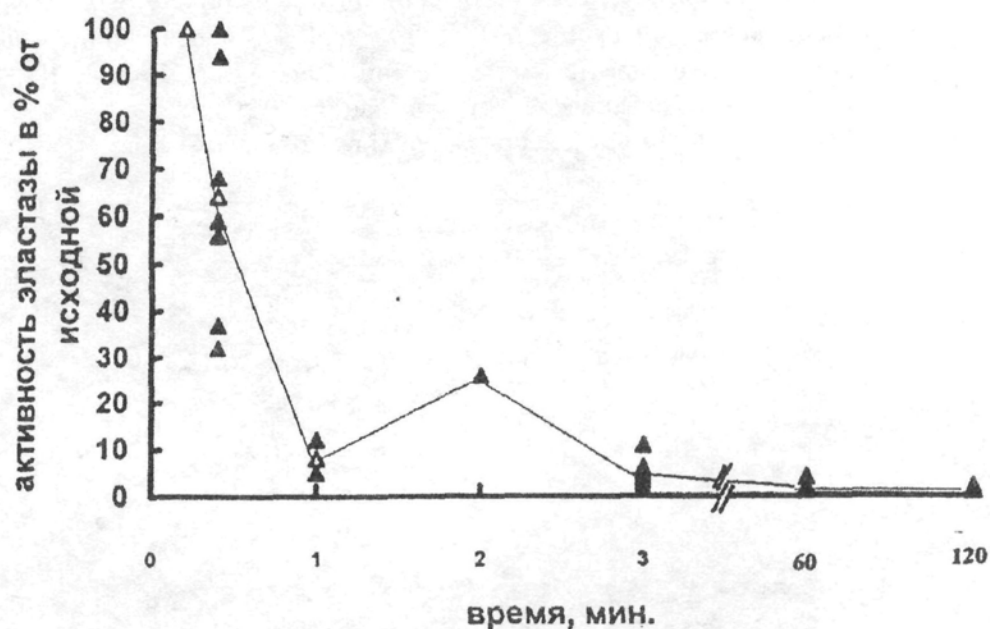
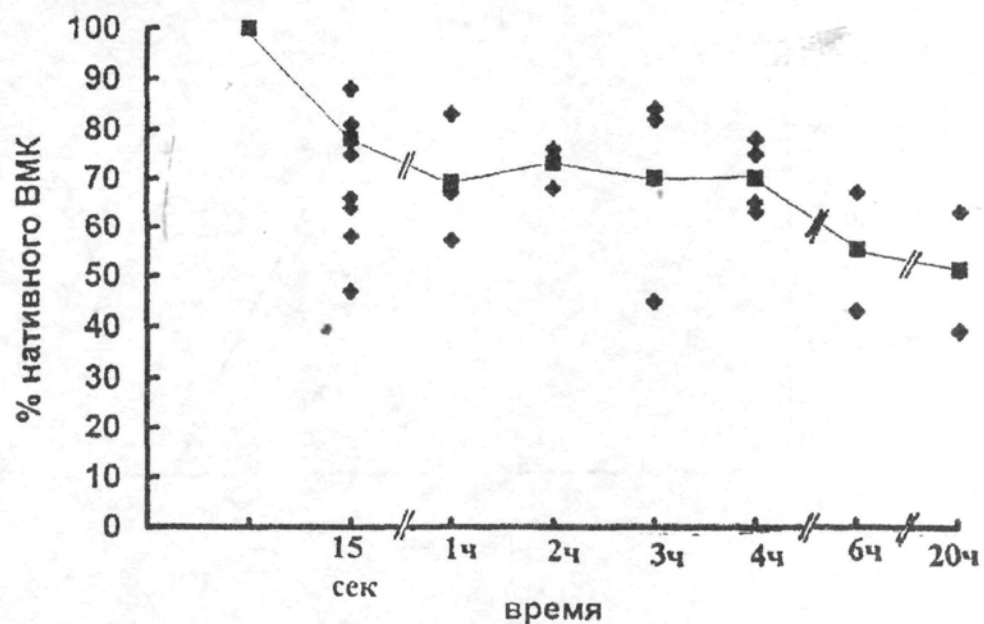


Рисунок 4.

Сохранность интактного ВМК (в %) при инкубации с комплексом ЛЭ -  $\alpha$ -1ПИ. Расчеты произведены по плотности ДС-Na-электрофоретических фракций ВМК в инкубационных пробах ВМК с комплексом. По оси абсцисс указано время инкубации, по оси ординат - % интактного ВМК.

На рис.6 (А и Б) представлены ДС-Na-электрофореграммы ВМК после действия эластазы в присутствии  $\alpha$ -1ПИ. Результаты свидетельствуют о том, что расщепление лейкоцитарной эластазой ВМК происходит в присутствии ингибитора независимо от того, в какой последовательности в инкубационную пробу добавлен ингибитор: до или после эластазы.

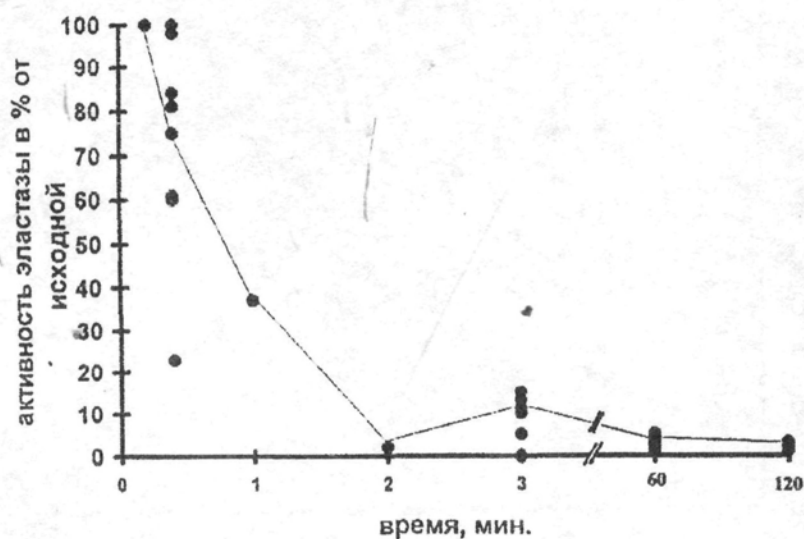


Рисунок 5.

Активность лейкоцитарной эластазы в отношении ВМК в присутствии  $\alpha$ -1ПИ. А. Последовательность внесения в пробу: ВМК + ЛЭ +  $\alpha$ -1ПИ. На оси абсцисс - время инкубации с  $\alpha$ -1ПИ. Б. Последовательность внесения в пробу: ВМК +  $\alpha$ -1ПИ + ЛЭ. На оси абсцисс - время инкубации с ЛЭ. На оси ординат - активность эластазы в % от начальной.

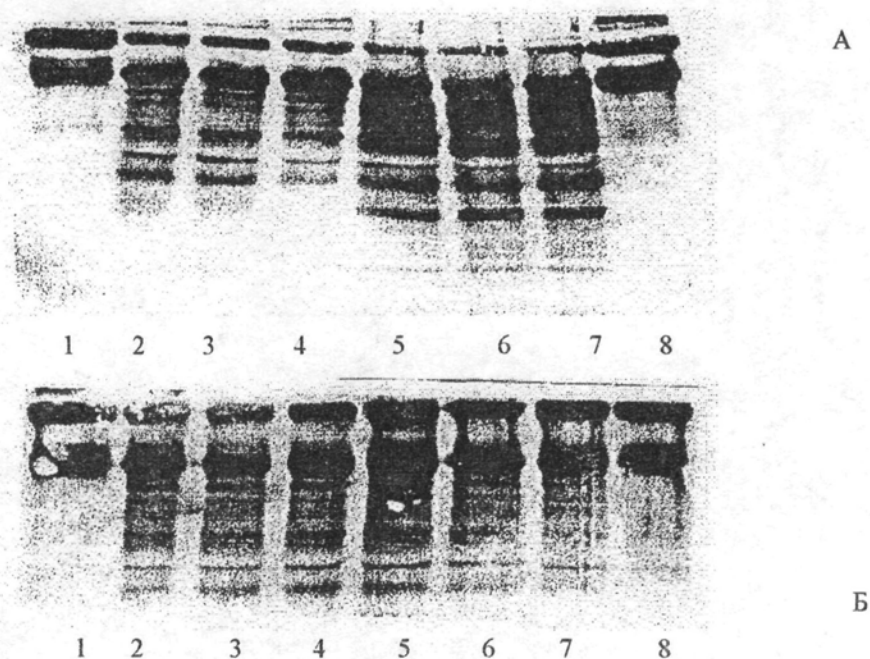


Рисунок 6.

Результат действия лейкоцитарной эластазы на ВМК в присутствии  $\alpha$ -1ПИ. ДС-Na-электрофореграмма в 10% ПААГ. Иммуоблоттинг с антителами против ВМК. А. Последовательность внесения: ВМК + ЛЭ +  $\alpha$ -1ПИ. 1 и 8 ВМК; 2. + $\alpha$ -1ПИ (15 сек); 3. +  $\alpha$ -1ПИ (1 мин.); 4. +  $\alpha$ -1ПИ (3 мин); 5. +  $\alpha$ -1ПИ (60 мин); 6 и 7. +  $\alpha$ -1ПИ (120 мин); Б. Последовательность внесения: ВМК +  $\alpha$ -1ПИ + ЛЭ. 1 и 8. ВМК; 2. + ЛЭ (15 сек); 3. + ЛЭ (1 мин); 4. + ЛЭ (3 мин); 5. + ЛЭ (120 мин); 6 и 7. + ЛЭ (60 мин); Концентрация ингибитора равна молярной концентрации эластазы.



**Действие лейкоцитарной эластазы на ингибиторную способность ВМК по отношению к папаину в присутствии  $\alpha$  - 1 ПИ.**

Лейкоцитарная эластаза в инкубационной среде с ВМК (в соотношении 36,5 пмоль: 550 нмоль) инактивировала на 50 % ингибирующую способность ВМК по отношению к папаину уже через 10 минут инкубации. Инкубация с эластазой более длительное время разрушала эту способность кининогена на 60%. На рис. 7 (кривая 1) представлен график уменьшения ингибиторной активности ВМК, в зависимости от времени инкубации.



Рисунок 7.

Изменение ингибиторной способности ВМК по отношению к папаину под действием чистой эластазы и эластазы в присутствии  $\alpha$ -1ПИ. 1. ВМК + эластаза (после инкубации в течение 10, 60 и 120 мин добавляли  $\alpha$ -1 ПИ в концентрации в 5 раз превышающую эквимольную). 2. ВМК + эластаза +  $\alpha$ -1ПИ ( после 0,5-минутной инкубации добавляли  $\alpha$ -1 ПИ и инкубировали повторно 10, 60 и 120 мин). Концентрация ингибитора равнялась молярной концентрации эластазы. 3. ВМК + эластаза +  $\alpha$ -1ПИ (после 0,5-минутной инкубации добавляли  $\alpha$ -1 ПИ и инкубировали повторно 10, 60 и 120 мин). Концентрация ингибитора в 2,5 раза превышала молярную концентрацию эластазы.

Эластазная активность, действие которой на ВМК ограничивалось 30 секундами, по истечении которых в пробу добавляли  $\alpha$ -1 ПИ, почти не изменяла ингибирующую способность ВМК.

#### **Действие лейкоцитарной эластазы на адгезивную функцию ВМК.**

Результаты, представленные на рис.8, свидетельствуют, во-первых, о более высоких адгезивных свойствах кининогена в присутствии  $\alpha$ -1ПИ, при содержании от 40 нМ до 320 нМ биотинированного кининогена на лунку (кривые 1 и 2). Во-вторых, даже кратковременное действие лейкоцитарной эластазы в течение 1, 5, или 10 минут приводило к значительному уменьшению адгезивных свойств ВМК. При инкубации эластазы с ВМК лишь в течение 1 минуты в большей мере повреждались адгезивные свойства ВМК, чем при 5 и 10-минутном инкубировании (кривые 3, 4, 5). И, в третьих, полная потеря

адгезивных свойств кининогена происходила в результате действия эластазы в присутствии  $\alpha$ -1 ПИ (кривая 6).

Дегрануляция полиморфноядерных лейкоцитов при заболеваниях со значительным воспалительным компонентом (тяжелые травмы, перитониты, сепсис) приводит к появлению в русле крови высоких концентраций лейкоцитарной эластазы, которая связывается в основном с  $\alpha$ -1 ПИ и циркулирует в сосудистом русле в виде комплекса с ним. Несмотря на довольно длительное и успешное изучение воспаления вообще и дегрануляционной активности лейкоцитов в частности, до сих пор сведения о возможном количестве эластазы в плазме в период наибольшей активности лейкоцитов остаются противоречивыми. Данные Jochum et al [1,9] свидетельствуют об увеличении концентрации эластазы (в виде комплекса с  $\alpha$ -1 ПИ) при сепсисе до 2000 нг/мл, что соответствует примерно 70 пикомолям фермента в 1 мл. По результатам Bogdanova et al., полученным при исследовании плазмы крови больных с тяжелыми воспалительными реакциями, в 1 мл плазмы содержатся 50-70 мкг эластазы [15].

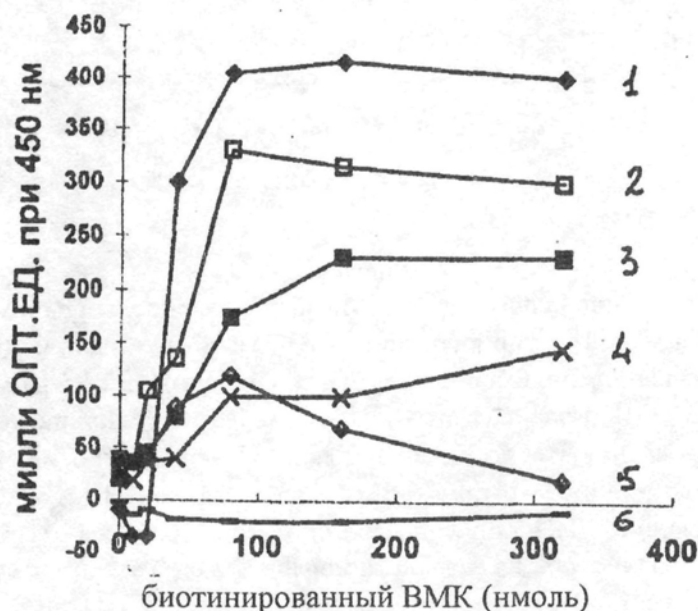


Рисунок 8.

Адгезивная способность ВМК и ее изменение под действием лейкоцитарной эластазы в присутствии  $\alpha$ -1 протеиназного ингибитора. 1. ВМК; 2. ВМК +  $\alpha$ -1 ПИ; 3. ВМК + эластаза. Инкубация 5 мин. с последующим добавлением  $\alpha$ -1 ПИ; 4. ВМК + эластаза. Инкубация 10 мин. с последующим добавлением  $\alpha$ -1 ПИ; 5. ВМК + эластаза. Инкубация 1 мин. с последующим добавлением  $\alpha$ -1 ПИ; 6. ВМК +  $\alpha$ -1 ПИ + эластаза. Инкубация с эластазой в течение 10 мин. Молярная концентрация ингибитора во всех пробах в 3,6 раза превышала концентрацию эластазы.

Если принять во внимание данные о содержании в азурофильных гранулах гранулоцита миллимолярных количеств эластазы [16], то концентрация этого фермента в 1 мл плазмы может возрасти при дегрануляции до 75 мкг, что соответствует 2,5 нмоль фермента.

Образование комплекса лейкоцитарной эластазы с  $\alpha$ -1ПИ *in vitro*, при измерении активности фермента по синтетическому субстрату, происходит в течение 13 мсек [17] с константой ассоциации  $1,3 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{сек}^{-1}$  [18, 19].

Концентрация  $\alpha$ -1ПИ в плазме в молярном выражении (от 26 до 50 нмоль/мл [20]) в два и более десятка раз превышает самую высокую из возможных концентраций эластазы. Однако относительная концентрация  $\alpha$ -1ПИ среди плазменных белков составляет лишь около 4 %, что в значительной степени может изменить кинетику взаимодействия фермента с ингибитором, если ее сравнивать с кинетикой взаимодействия эластазы с  $\alpha$ -1ПИ в буферном растворе *in vitro*.

В наших экспериментах концентрация  $\alpha$ -1ПИ, в присутствии которого исследовалось действие эластазы на ВМК, изменялось от 0,3 до 1,5 нмоль препарата на пробу, что соответствовало либо одной эквимолярной дозе ингибитора, полностью подавляющей активность эластазы по синтетическому субстрату, либо превосходило эквимолярную дозу в 2, 3 и 5 раз. При этом относительная концентрация  $\alpha$ -1ПИ в инкубационной пробе колебалась от 2,4 до 4,6 %, то есть примерно соответствовала концентрации ингибитора в плазме крови.

Как показывают результаты, лейкоцитарная эластаза расщепляет высокомолекулярный кининоген, несмотря на добавленный через 30 секунд после начала ее действия ингибитор, в концентрации, равной молярной концентрации эластазы или превышающей эту концентрацию в 4-5 раз. При этом активность эластазы в инкубационной среде постепенно падала, но даже по истечении 3-х минут совместной инкубации с  $\alpha$ -1ПИ составляла в среднем 5,3 % от первоначальной активности, что соответствовало 18 нмоль/мин в расчете на объем пробы. Некоторая активность эластазы сохранялась даже через 1-2 часа после добавления ингибитора в инкубационную смесь. Интересно, что количество добавленного ингибитора в первые несколько минут совместной инкубации практически не влияло на скорость снижения активности эластазы, определяя лишь степень снижения активности фермента через 0,5 - 2 часа.

Кининоген подвергался расщеплению эластазой и в том случае, когда фермент вносился в инкубационную смесь после ингибитора. При концентрации  $\alpha$ -1ПИ, превышающей эквимолярную в 5 раз, деградирующее действие эластазы составляло почти 56 % своей первоначальной активности в конце 1-й минуты инкубации. По истечении 3-х минут эта активность падала до 13 % и составляла 0,4 % от исходной лишь через 1 час инкубации.

Результаты иммуноэлектрофоретического определения кининогена в цитратной плазме после добавления различных количеств эластазы и длительной инкубации показали, что происходит значительная деградация кининогена, несмотря на присутствие в данном объеме плазмы  $\alpha$ -1ПИ, достаточного для подавления активности эластазы (результаты в статье не представлены).

Таким образом, лейкоцитарная эластаза способна расщеплять молекулы высокомолекулярного кининогена даже в присутствии  $\alpha$ -1ПИ в концентрации, в несколько раз превышающей эквимолярную концентрацию.

Неожиданный результат был получен при инкубировании ВМК и комплекса лейкоцитарной эластазы с  $\alpha$ -1ПИ. Независимо от того, в каком



избытке в пробе, содержащей комплекс, присутствовал  $\alpha$ -1ПИ, происходило расщепление примерно 25% ВМК в течение 30 сек инкубации. Последующая инкубация комплекса с ВМК в продолжении 1, 2 и 3-х часов только незначительно изменяла концентрацию нативного кининогена. Таким образом, по-видимому, перераспределение эластазы между  $\alpha$ -1ПИ и кининогеном и частичное расщепление последнего происходило в течение короткого времени (1-2 минуты); в последующий период времени наблюдалась лишь следовая деструктивная активность фермента.

Полученные данные в определенной мере подтверждают давние результаты Ohlsson [21] о перераспределении лейкоцитарной эластазы между этим ингибитором и  $\alpha_2$ -макроглобулином. В таком же ключе могут быть интерпретированы и гистохимические результаты Tsujii и соавторов, показавших, что эластаза, находящаяся в комплексе с  $\alpha$ -1ПИ способна связываться с эластиновой выстилкой кровеносных сосудов и оказывать на нее деструктивное действие [22]. Что касается действия  $\alpha$ -1ПИ на лейкоцитарную эластазу, связанную с белком (эластином), то по данным [23], ее активность может быть подавлена  $\alpha$ -1ПИ лишь на 46-48 %, хотя в молярном отношении его количество в 3-4 раза превышало концентрацию эластазы [23]. Похожие данные были получены и другими авторами [24], показавшими, что в присутствии хрящевой ткани сустава для подавления активности эластазы требуется гораздо большая концентрация ингибитора, чем для ингибирования свободного фермента. О подобном действии эластазы на плазменный белок (интер- $\alpha$ -трипсиновый ингибитор) в присутствии большого избытка  $\alpha$ -1ПИ сообщили в своей последней статье Albani et al. [25].

Что касается функций высокомолекулярного кининогена, и в частности его способности подавлять активность SH-протеиназ, то это свойство оказалось устойчивым к действию лейкоцитарной эластазы в присутствии  $\alpha$ -1 протеиназного ингибитора. Если обратиться к рис.1, демонстрирующему деструкцию ВМК под действием эластазы, то можно предположить, что зона белка с  $M_r$  96 кДа, интенсивность которой нарастала в течение первой минуты инкубации, содержала домены D2 и D3, связывающие тиоловые протеиназы, неповрежденными. Поскольку падение ингибиторной активности на 1/3 происходило лишь в течение 10 минут, следует предположить, что и полоса белка с  $M_r$  58 кДа, которая устойчиво появлялась в течение следующих 4-5-и минут, еще содержала эти домены.

При действии эластазы в присутствии ингибитора постепенное расщепление нативной молекулы и появление основной полосы с  $M_r$  96 кДа, по всей вероятности, почти не сказалось на данной функции высокомолекулярного кининогена.

Если рассматривать воздействие эластазы на адгезивную функцию ВМК, то здесь получен несколько неожиданный результат. Добавление эластазы в инкубационную пробу, содержащую ВМК и  $\alpha$ -1ПИ, в концентрации в 4 раза превышающей молярную концентрацию эластазы, полностью уничтожало адгезивную функцию кининогена. Деструкция кининогена чистой эластазой в течение 5, 10 и 15 минут перед добавлением  $\alpha$ -1ПИ несколько увеличивала адгезивные способности биотинированного кининогена, по сравнению с

предыдущим случаем. Этот феномен, очевидно, может быть объяснен увеличением адгезивных свойств у небольших по молекулярной массе продуктов деградации кининогена, которые появлялись в инкубационной среде уже через 5-7 минут после добавления фермента и имитировали адгезию неповрежденной молекулы.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о гидролитическом действии лейкоцитарной эластазы на высокомолекулярный кининоген плазмы крови человека, несмотря на присутствие в инкубационной среде высокой концентрации  $\alpha$ -1ПИ, а также о деградирующем действии эластазы, находящейся в предварительно сформированном комплексе с  $\alpha$ -1ПИ.

Полученные данные позволяют предположить, что не только высокомолекулярный кининоген, но и другие белки плазмы крови расщепляются под действием эластазы *in vivo* в присутствии  $\alpha$ -1ПИ и могут служить основой для понимания патогенетической значимости высокой концентрации циркулирующей в русле крови лейкоцитарной эластазы в развитии тромбогеморрагических осложнений при тяжелых воспалительных процессах, таких как множественная травма, перитонит и септицемии. Можно полагать также, что эластаза успевает оказать повреждающее действие на ряд плазменных белков до образования комплекса с циркулирующим  $\alpha$ -1ПИ, а ее комплекс с этим ингибитором, по-видимому, на является абсолютно стабильным.

Наибольшее неконтролируемое протеолитическое действие эластазы на белки плазмы крови можно ожидать в условиях наследственного или приобретенного дефицита  $\alpha$ -1ПИ, что часто наблюдается при критических состояниях организма.

Работа поддержана Российским Фондом Фундаментальных Исследований (гранты N 96-04-48018 и 00-04-49410) и Комиссией Европейского Союза (грант «INCO-Copernicus» 1998-1999 гг).

Авторы благодарят профессора МГУ Н.И.Ларионову за ценные советы и замечания по оформлению работы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Jochum M., Machleidt W., Fritz H. (1993) In Handbook of Mediators in Septic Shock. Eds. E. Neugebauer and J.W. Holaday - CRC Press/ Boca Baton, London, Tokyo, pp. 335-362.
2. Mythen M.G., Barelay G.R., Purdy G., Hamilton-Davies C., et al. (1993) Blood Coagul. Fibrinolysis, 4, 999-1005.
3. Chignard M., Balloy V., Reyes P. (1993) Eur. Respir. J., 6, 791-796.
4. Yamanouchi H., Fujita J., Hojo S., Yoshinouchi T., Kamei T., Yamadori I., Ohtsuki Y., Ueda N., Takahara J. (1998) Europ. Respir. J., 11, 120-125.
5. Fourrier F. (1998) Blood Coagul. Fibrinolysis. Suppl., 2, S39 - S45.
6. Machovich R., Owen W.G. (1990) Blood Coagul. Fibrinolysis, 1, 79 -84.

7. Owen C.A., Campbell M.A., Sannes Ph.L., Boukedes S.S., Campbell E.J. (1995) *J. Cell Biol.*, **131**, 775-789.
8. Billing A.G., Jochum M., Frohlich D., Cheronis J.C., Fritz H. (1997) *Eur.J.Clin.Invest.*, **27**, 1030-1037.
9. Vogelmeier C., Biedermann T., Maier K., Mazur G., Behr J., Krombach F., Buhl R. (1997) *Eur.Respir.J.*, **10**, 2114-2119.
10. Нешкова Е.А., Доценко В.Л., Ларионов Н.И., Яровая Г.А. (1993) *Биохимия*, **58**, 1886-1892.
11. Dittmann B., Steger A., Wimmer R., Fritz H. (1981) *Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.*, **362**, 919-927.
12. Laemmli U.K. (1970) *Nature*, **227**, 680-685.
13. Towbin H., Staechlin T., Gordon J. (1979) *Proc. Natl.Acad.Sci.USA*, **76**, 4340-4345.
14. Jochum M., Fritz H. (1989) In: *Immune Consequences of Trauma, Shock, and Sepsis*. Eds. Faist E., Ninnemann J.L., Green D.R. Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg. pp.165-172.
15. Bogdanova M., Domazetovska S., Gruiev T., Polenokovic B. (1997) *MedLab*, 12<sup>th</sup> European Congress of Clinical Chemistry, Abstracts., 286.
16. Frommherz K.J., Faller B., Bieth J.G. (1991) *J. Biol.Chem.*, **266**, 15356-15362.
17. Bieth J.G. (1986) In: *Regulating of Matrix Accumulation*, Mecham R.P., ed., Acad.Press, New York., pp. 217-320.
18. Beatty K., Bieth J.G., Travis J. (1980) *J.Biol.Chem.*, **255**, 3931-3934.
19. Braun N.J., Bodmer J.G., Schnebli H.P. (1987) *Biol.Chem.Hopper-Seylers*. **368**, 299-308.
20. Weiss S.J. (1989) *N.Engl.J.Med.*, **320**, 365-376.
21. Ohlsson K. (1978) In: *Neutral Proteases of Human Polymorphonuclear Leukocytes*. Eds. Havemann K., Janoff A. pp. 167-177.
22. Tsujii T., Katajama K., Naito I., Seno S. (1988) *Histochem.*, **88**, 443-451.
23. Hornebeck W., Schnebli H.P. (1982) *Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.*, **363**, 455-458.
24. Burkhardt H., Kasten M., Rauls S., Renkopf E. (1987) *Reumatol. Int.*, **7**, 133-138.
25. Albani D., Balduyck M., Mizon J. (1997) *J.Lab.Clin.Med.*, **130**, 339-347.

Поступила 15.10.2000.



**THE EFFECT OF LEUKOCYTE ELASTASE ON HUMAN PLASMA  
HIGH MOLECULAR WEIGHT KININOGEN IN THE PRESENCE  
OF ALPHA-1-PROTEINASE INHIBITOR. ANALYSIS OF PROTEOLYTIC  
DEGRADATION**

V.DOTSENKO<sup>1</sup>, E. NESHKOVA<sup>1</sup>, E. RUGNES<sup>2</sup>, H. JOHANSEN<sup>2</sup>, T. BLOKHINA,  
G. JAROVAYA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Russian Medical Academy for Postgraduate Education, Barrikadnaya 2, Moscow 123836,  
Russia. Tel/fax: (095) 945-24-15, e-mail: acadbio @orc.ru

<sup>2</sup> School of Pharmacy, Dept. Pharmacology, Postboks 1068 Blindern, N-0316 Oslo, Norway,  
tel: +47-22-85-65-95, fax: +47-22-84-44-02,  
e-mail: h.t.johansen@farmasi.uio.no

Degranulation of polymorphonuclear leukocytes (neutrophils) and releasing of leukocyte elastase during inflammation occur not only in injured tissue but in plasma in the presence of considerable excess of alpha-1 proteinase inhibitor ( $\alpha$ -1PI). However, in spite of the absence of free elastase in patients' plasma, even in such severe inflammation as peritonitis and septicaemia, degradation of the connective tissue structures and plasma proteins may be determined.

However the reasons of such destructive action are not yet determined.

In this paper the action of leukocyte elastase on human plasma high molecular weight kininogen (HMWK) was studied in the absence or in the presence of different concentrations of  $\alpha$ -1PI. The results showed that degradation of the intact molecules of HMWK occurred under the action of elastase during 1-2 hours of combined incubation even if the concentration of  $\alpha$ -1PI in the mixture in 3-5 fold exceeds the molar elastase concentration.

The rate of elastase inhibition by  $\alpha$ -1PI in the presence of HMWK did not depend on an order of enzyme and inhibitor addition to the incubation medium. HMWK degradation by elastase in the presence of  $\alpha$ -1PI was accompanied by impairments in its adhesion function although high tolerance of HMWK inhibitory activity with respect to SH-proteinases preserved.

Thus, total inhibition of leukocyte elastase by  $\alpha$ -1PI, in the presence of high molecular weight kininogen develops during relatively long time interval. The pronounced destruction of intact HMWK molecules takes place during this period of gradual elastase inhibition. This fact seems to be very important in pathogenesis of thrombo-haemorrhage syndrom as a complication of severe inflammation.

**Key words:** neutrophils, leukocyte elastase, inflammation, high molecular weight kininogen, human plasma proteins