

УДК 577.15.08

©Коллектив авторов

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПРОТЕИНАЗ КРОВИ И МИКРООРГАНИЗМОВ

Л.В. Козлов, А.М. Бичучер, А.А. Мишин, В.Л. Дьяков, Н.И. Леонтьева,
Н.М. Грачева, Л.И. Новикова*

ФГУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.
Габричевского, Роспотребнадзора, Москва; тел.: 8-(495)-452-38-01;
факс: 8-(495)-452-18-30; эл. почта: lvkozlov@post.ru

Для определения активности протеиназ можно использовать иммуноглобулины. Поскольку продукты протеолиза, по-видимому, не сохраняют антигенные детерминанты субстрата, для слежения за ферментативным процессом можно использовать иммуноферментные методы. Иммуноферментное определение функциональной активности специфической IgA1-протеиназы было применено не только для обнаружения фермента, но и для измерения констант ингибирования этого фермента. Сорбированный на микропанели IgG оказался полезным при определении общей неспецифической протеолитической активности. В зависимости от pH среды, в которой проводится реакция, можно измерять активность нейтральных, щелочных и кислых протеиназ. Этот подход позволил оценить суммарную протеолитическую активность нейтральных протеиназ сыворотки крови. Высокая чувствительность метода обусловила возможность работать при таких разбавлениях сыворотки, когда сывороточные ингибиторы уже не блокируют действие ферментов. Проведение реакции с сывороткой крови при кислых pH приводит к активации пепсиногенов и определению активности пепсинов. Измерение суммарного уровня активности пепсиногенов в сыворотке крови может иметь диагностическую ценность в гастроэнтерологии, благодаря определяющему вкладу в измеряемую активность пепсиногена I.

Ключевые слова: протеиназы, иммуноглобулины, IgA1-протеиназа, активность, ингибирование, иммуноферментный метод.

ВВЕДЕНИЕ. При изучении протеолитической активности издавна и традиционно использовались легко доступные белковые субстраты – гемоглобин, казеин и желатина, - простейшие приемы разделения субстратов и продуктов (осаждение трихлоруксусной кислотой) и определение количества образовавшихся продуктов – спектрофотометрия, проявление нингидрином, тринитробензолсульфоокислотой или использование азокрасителей для субстратов.

В последние годы в качестве новых белковых субстратов стали доступными иммуноглобулины и новейшие методы определения их количеств – иммуноферментные методы анализа [1]. Применение иммуноферментного анализа, когда на микропанели сорбированы антитела к IgG – субстрату протеолиза, создало возможность и разделения субстрата от продуктов, и легкого определения непрогидролизованного субстрата. При этом оставался открытым вопрос о возможности сохранения антигенных детерминант на продуктах протеолиза, наличие которых могло бы привести либо к полной невозможности

* - адресат для переписки

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПРОТЕИНАЗ КРОВИ И МИКРООРГАНИЗМОВ

использования этого подхода, либо чрезвычайно затруднить интерпретацию результатов. Поскольку по началу этим методом изучалась протеолитическая активность микробных неспецифических протеиназ [2], процессы протеолиза были достаточно глубоки и трудности не возникали ввиду исчезновения антигена как такового.

В работе ставилась задача исследования возможности иммуноферментного метода тестирования протеолитической активности в случае специфической протеиназы, способной расщеплять иммуноглобулин только на два фрагмента. В качестве таковой была выбрана IgA1-протеиназа *Neisseria meningitides* [3], расщепляющая IgA1 человека в шарнирном участке и практически не имеющая других белковых или пептидных субстратов. Другой задачей было упрощение иммуноферментного метода определения активности протеиназ. Для этого субстрат (иммуноглобулин) сорбировали в лунках микропанели и после проведения реакции с ферментом в гетерогенных условиях определяли количество оставшегося субстрата реакцией со специфическими антителами, конъюгированными с пероксидазой.

МЕТОДИКА. В основу метода положено определение остаточного после протеолиза количества иммуноглобулина методом иммуноферментного анализа. Для этого проводят сорбцию препарата IgG (или IgA1) человека на поверхности лунок микропанели в 0,05 М натрий-карбонатном буфере, pH 9,5. В лунки вносят растворы протеиназы при pH, оптимальном для фермента, путем раститровки в виде двойных разведений с образованием большого диапазона концентраций в ряду из 8-12 лунок. После инкубации в течение выбранного в зависимости от активности фермента времени и температуре, удаления растворов из лунок и отмывки лунок фосфатно-солевым буфером, pH 7,4, с твином в последние вносят раствор конъюгата анти-IgG (анти-IgA) с пероксидазой хрена. После инкубации в течение 1 ч и аналогичной промывки в лунки вносят субстратный буфер с тетраметилбензидином. Через 20 мин процесс останавливают подкислением серной кислотой и измеряют светопоглощение при 450 нм на спектрофотометре с вертикальным лучом. По разности оптических плотностей растворов в опыте и контроле (без фермента) рассчитывают количество гидролизованного за выбранное время иммуноглобулина, которое характеризует активность фермента.

В работе использовали препараты трипсина и химотрипсина (СПОФА, Чехия), пепсина (г. Олайна, Латвия). IgA1-протеиназа *Neisseria meningitides* любезно предоставлена М.Г.Теймуразовым [3].

Количество пепсиногена I в крови пациентов определяли иммуноферментным набором фирмы Biohit Pic.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Для изучения потенциальных возможностей иммуноферментных методов измерения протеолитической активности было целесообразно использовать фермент с высокой специфичностью, осуществляющий ограниченный протеолиз субстрата. В качестве такого фермента была выбрана IgA1-протеиназа *Neisseria meningitides*, расщепляющая единственную связь в шарнирной области иммуноглобулина A1, что приводит к образованию двух продуктов реакции – фрагментов Fab и Fc. При этом следует отметить, что никаких других белков, кроме IgA1 человека, эта протеиназа не гидролизует.

Метод ИФА для определения IgA1-протеиназной активности можно существенно упростить, если проводить гетерогенный протеолиз, сорбируя субстрат на микропанели.

В лунках микропанели с сорбированным с IgA1 происходит падение количества IgA после инкубации с протеиназой, а в лунках с IgA2 его количество не уменьшается (рис. 1). Из полученных данных следовал важный вывод, что если продукты гидролиза – Fab и Fc фрагменты и сохраняли антигенные детерминанты, то это не приводило к невозможности контролировать процесс протеолиза с помощью ИФА.

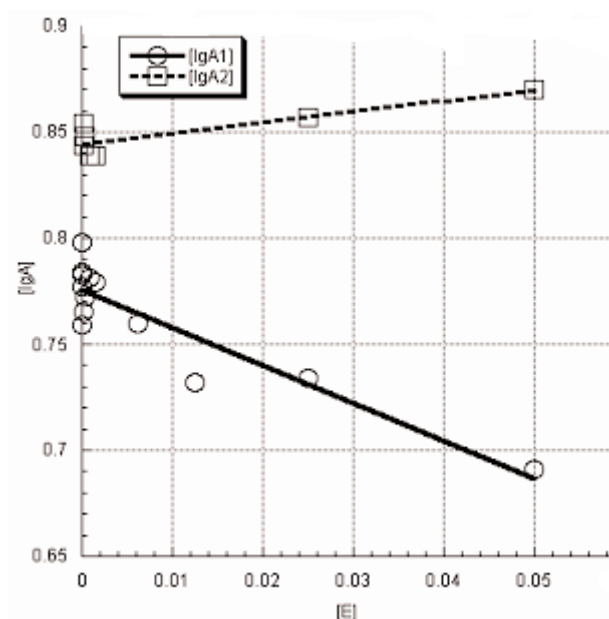


Рисунок 1.

Действие различных концентраций IgA1-протеиназы (у.е.) на количество сорбированных IgA1 и IgA2.

Упрощенный метод определения функциональной активности протеиназ оказался пригодным для определения констант ингибирования, если определение активности проводить в присутствии различных концентраций ингибитора (таблица).

Таблица. Определение констант ингибирования бацитрацином, бензамидином и IgG антителами против *Neisseria meningitidis* по измерению активности IgA1-протеазы в присутствии различных концентраций ингибиторов.

	Ингибитор		
	Бацитрацин	IgG антитела против <i>Neisseria meningitidis</i>	Бензамидин
Концентрации ингибитора мкг/мл	Относительная активность фермента, у.е.		
50	0,0045	0,0024	0,0054
10	0,0047	0,0109	0,0051
2	0,0243	0,0154	0,0063
K_i , мкг/мл	39,64	4,53	609,8
K_i , М	$2,79 \cdot 10^{-5}$	$3,02 \cdot 10^{-8}$	0,0039

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПРОТЕИНАЗ КРОВИ И МИКРООРГАНИЗМОВ

Метод применим для разных ферментов.

Была разработана универсальная тест-система для определения функциональной активности нейтральных и кислых протеиназ. Тест-система состоит из сорбированного на микропанели IgG человека. Определение оставшегося после гидролиза иммуноглобулина проводят с помощью конъюгата антител против IgG человека с пероксидазой хрена. Сам процесс протеолиза проводят при значениях pH, оптимальных для тестируемого фермента. Применимость метода была продемонстрирована для химотрипсина (рис. 2), трипсина (рис. 3) и пепсина (рис. 4).

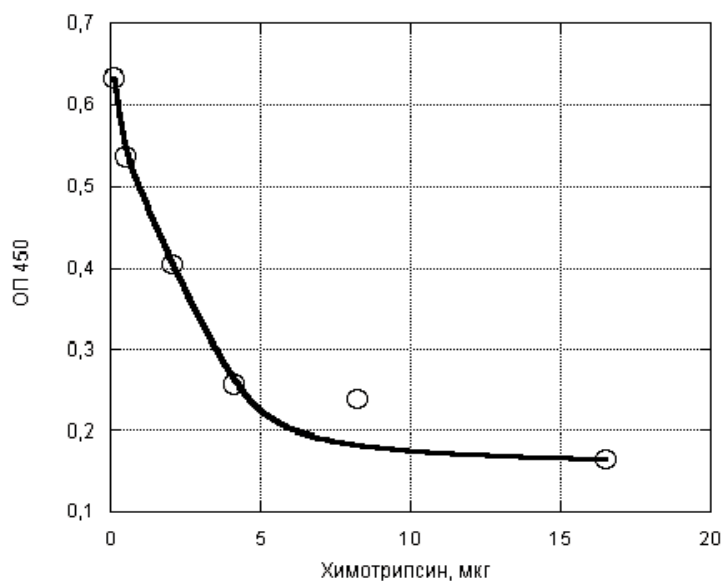


Рисунок 2.

Определение активности химотрипсина иммуноферментным методом.

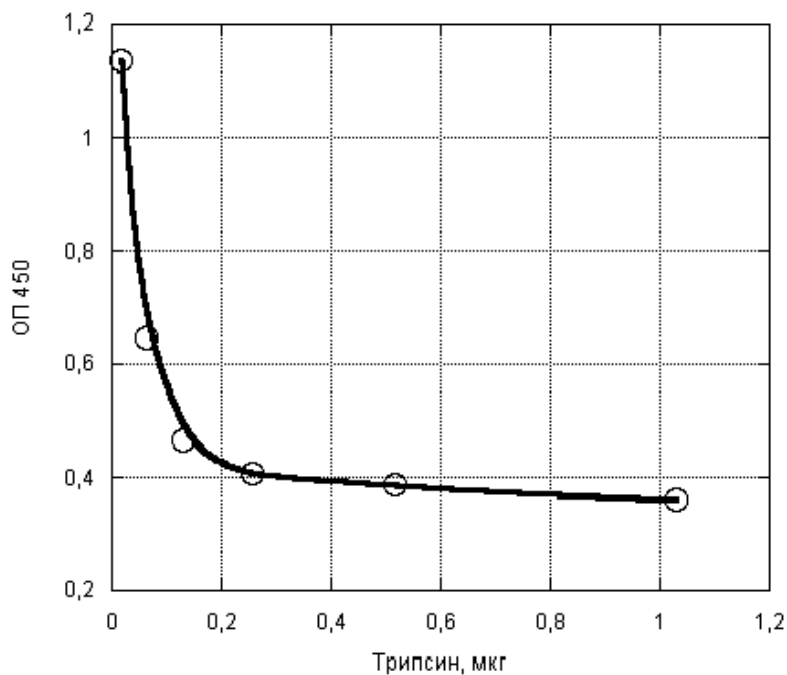


Рисунок 3.

Определение активности трипсина иммуноферментным методом.

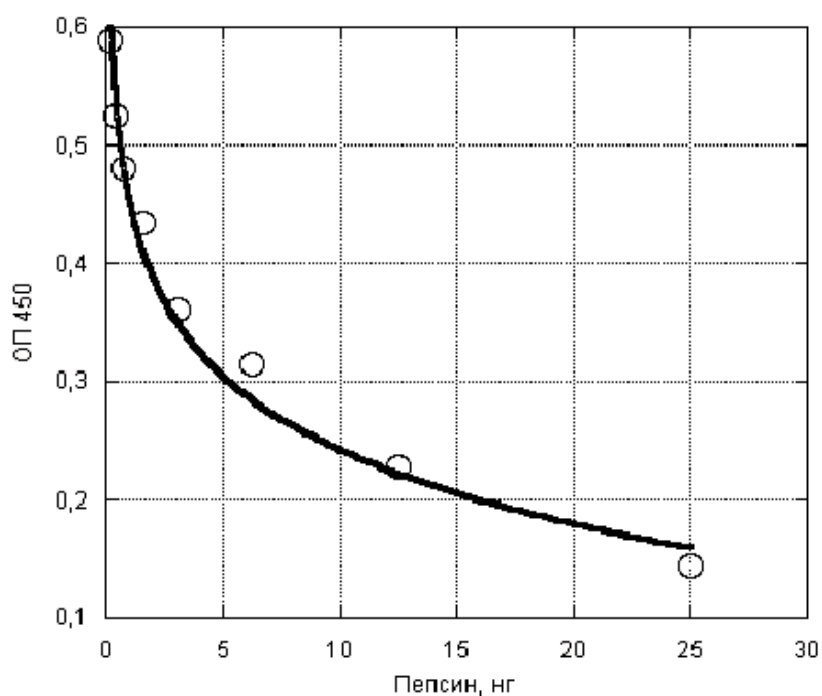


Рисунок 4.

Определение активности пепсина иммуноферментным методом.

Высокая чувствительность метода позволила определять активность ферментов в сыворотке крови, несмотря на наличие в ней ингибиторов протеиназ (рис. 5). Вероятно, что при высоких разведениях сыворотки в эксперименте (свыше 1000 раз) концентрации ингибитора и фермента снижаются до такой степени, что количество фермент-ингибиторного комплекса становится несущественным.

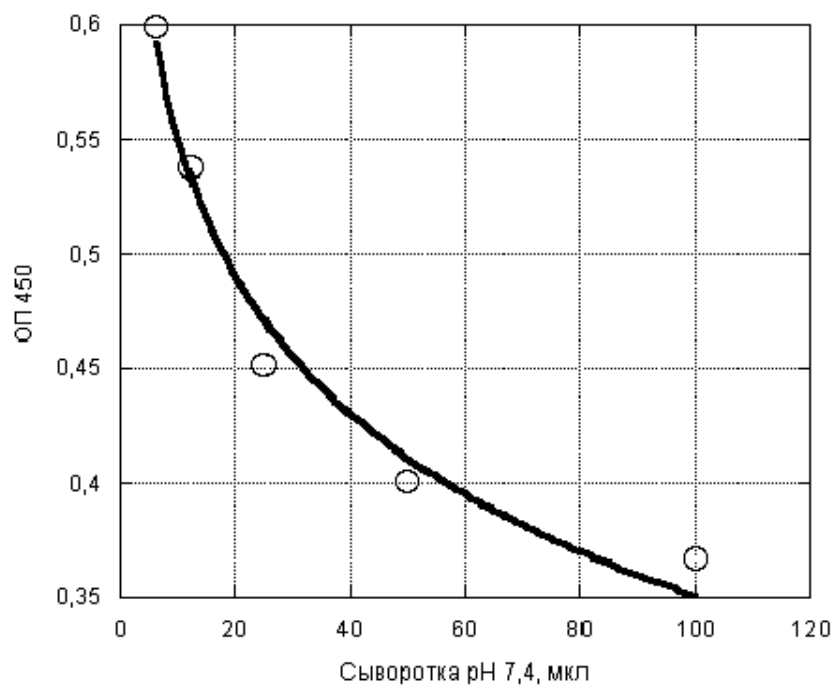


Рисунок 5.

Определение активности нейтральных протеиназ сыворотки крови человека иммуноферментным методом.

Что касается кислых протеиназ, то они в сыворотке крови присутствуют в виде зимогенов. Проведение определения протеазной активности при pH 3,0 приводит к активации предшественников и позволяет проявиться активности пепсинов (рис. 6).

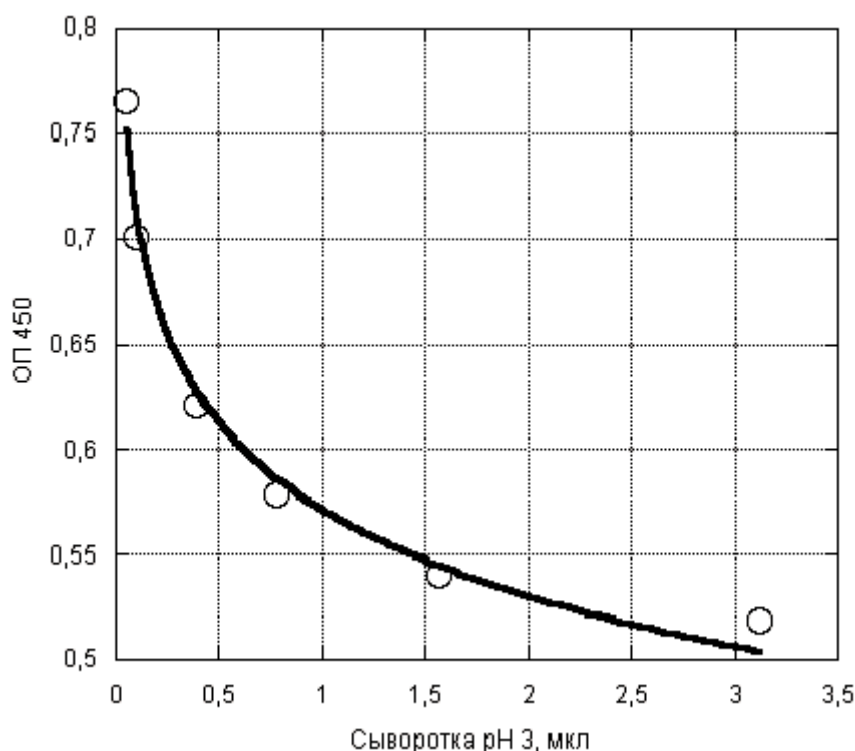


Рисунок 6.

Определение активности кислых протеиназ сыворотки крови человека иммуноферментным методом.

Сравнение рисунков 5, 2 и 3 позволяет оценить содержание активной нейтральной протеиназы в сыворотке крови как 5 мкг/мл активного трипсина или 50 мкг/мл активного химотрипсина. В плазме крови присутствуют предшественники нейтральных протеиназ в количествах до 300 мкг/мл суммарно [4], которые могут переходить в активную форму при превращении плазмы в сыворотку.

Сравнение рисунков 4 и 1 позволяет оценить содержание активного пепсина в сыворотке крови около 130 нг/мл. По литературным данным [5], в сыворотке взрослых людей содержится 133 ± 9 нг/мл пепсиногена I (содержание пепсиногена II в 10 раз ниже).

В крови человека существуют 7 фракций пепсиногена, 5 из которых составляют группу пепсиногена I (26-100 нг/мл) и 2 – пепсиногена II (3-19 нг/мл). Поскольку количество пепсиногена I примерно на порядок выше количества пепсиногена II, суммарное определение потенциальной протеолитической активности пепсиногенов позволяет оценивать, главным образом, активность пепсиногена I (рис. 7), что может иметь диагностическую ценность в гастроэнтерологии.

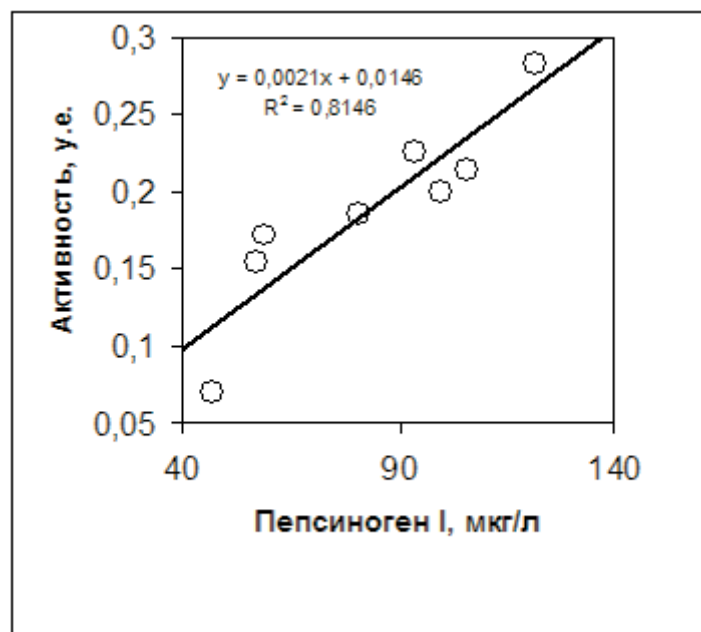


Рисунок 7.

Сравнение активности пепсиногенов в сыворотке крови пациентов с содержанием пепсиногена I.

Пепсиноген I является предшественником пепсина и синтезируется главными и шеечными клетками слизистой оболочки тела желудка. Основная часть пепсиногена секретируется в полость желудка, в то время как небольшое количество может быть обнаружено в крови. Уровень пепсиногена I в крови достоверно коррелирует с количеством главных клеток в слизистой тела желудка. Потеря главных клеток является результатом атрофического гастрита.

У пациентов с прогрессирующим атрофическим гастритом тела желудка повышен риск развития рака желудка [6].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Использование иммуноглобулинов, сорбированных на микропанелях для иммуноферментного анализа, в качестве субстратов протеолитических реакций с последующим определением иммуноферментными методами количества непрогидролизованного субстрата оказалось простым и удобным способом определения функциональной активности протеиназ, как неспецифических, так и с высокой специфичностью в отношении иммуноглобулинов. Высокая чувствительность этого метода позволяет определять активность протеиназ в сыворотке крови несмотря на наличия в ней ингибиторов. Сравнение с коммерческим методом определения количества в крови пепсиногена I определение суммарной функциональной активности пепсиногенов показало хорошую корреляцию. Поэтому измерение суммарного уровня активности пепсиногенов в сыворотке крови этим методом может иметь диагностическую ценность в гастроэнтерологии.

Работа поддержана грантом МНТЦ № 631.2.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Зинкевич О.Д., Бондаренко В.М., Тюрин Ю.А., Сафина Н.А., Анохин В.А.* (2004) ЖМЭИ, № 3, 73-77.
2. *Бондаренко В.М., Мавзютов А.Р., Агапова О.В.* (2002) ЖМЭИ, № 6, 80-85.
3. *Теймуразов М.Г.* (2006) Получение и некоторые свойства менингококковой IgA1-протеазы. Дисс. канд. наук, ФГУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора, Москва.
4. *Баскова И.П.* (1995) в: *Белки и пептиды*. Наука. М., т. 1, с. 397-433.
5. *Waldum H.L., Straume B.K., Burhol P.G., Dahl L.B.* (1980) Acta Paediatr. Scand., **69**, 215-218.
6. *Sipponen P., Kekki M., Haapakoski J., Ihamaki T., Siurala M.* (1985) Int. J. Cancer, **35**, 173-177.

Поступила: 01. 07. 2007.

DETERMINATION OF PROTEASES ACTIVITY OF BLOOD AND MICROORGANISMS

L.V. Kozlov, A.M. Bichucher, A.A. Mishin, V.L. D'yakov, N.I. Leont'eva, N.M. Gracheva, L.I. Novikova

Gabrichesky Moscow Institute of Microbiology and Epidemiology, Moscow, Russia;
tel.: 8-(495)-452-38-01; fax: 8-(495)-452-18-30; e-mail: lvkozlov@post.ru

For determination of protease activity it is possible to use immunoglobulins. Since proteolytic products apparently do not retain substrate antigenic determinants, it is possible to use ELISA methods for monitoring for enzymatic process. ELISA determination of functional activity of specific IgA1-protease has been applied not only for detection of this enzyme, but also for measurement of its inhibition constants. Fixed on a micropanel IgG may be used for evaluation of total proteolytic activity. Depending on pH values, it is possible to measure activity of neutral, alkaline and acid proteases. This approach has allowed to estimate total proteolytic activity of neutral proteases of serum. Measurement of a total level of serum pepsinogen activity can have diagnostic importance in gastroenterology, due to decisive contribution of pepsinogen I to the measured activity.

Key words: proteases, immunoglobulins, IgA1-protease, activity, inhibition, ELISA.