

УДК 612.115.12

©Коллектив авторов

РАЗНОНАПРАВЛЕННОЕ ДЕЙСТВИЕ СЕРИНОВЫХ ПРОТЕИНАЗ - АКТИВИРОВАННОГО ПРОТЕИНА С И ДУОДЕНАЗЫ - НА ТУЧНЫЕ КЛЕТКИ

*А.М. Макарова¹, Л.Р. Горбачева¹, Т.С. Замолодчикова², Л.Д. Руми²,
Ж.Д. Беспалова³, С.М. Струкова^{1*}*

¹Кафедра физиологии человека и животных, Биологический факультет
МГУ им. М.В. Ломоносова, 119899, Москва, МГУ, Ленинские горы;
тел.: 939-14-16; эл. почта Strukova@mail.ru

²Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10,

³Российский кардиологический научно-производственный комплекс МЗ РФ,
Москва, ул. 3-я Черепковская, д.15-А.

Некоторые сериновые протеиназы гемостаза через рецепторы, активируемые протеиназами (PAR), могут регулировать свертывание крови и воспаление. Известно, что антикоагулянтная протеиназа - активированный протеин С (APC) - через эндотелиальный рецептор протеина С (EPCR) и PAR1 оказывает противовоспалительное действие на клетки эндотелия и макрофаги. Нами исследовано влияние широкого диапазона концентраций APC на функциональную активность перитонеальных тучных клеток (ПТК) крыс, секретирующих медиаторы воспаления, в норме и при остром воспалении и обнаружено снижение секреции медиатора - β -гексозаминидазы, тучными клетками. Показано, что APC (0,2-2 нМ) модулирует как секрецию ПТК в норме, так и при воспалении (остром перитоните).

APC отменяет провоспалительное действие протеиназы желудочно-кишечного тракта и тучных клеток - дуоденазы (80 нМ), которая стимулирует дегрануляцию тучных клеток через PAR1. Предобработка тучных клеток катепсином G, антагонистом PAR1 рецепторов или дуоденазой отменяет защитный противовоспалительный эффект низких концентраций APC на тучные клетки. Показано, что APC блокирует секрецию медиаторов воспаления тучными клетками через высокоспецифичную активацию PAR1 рецептора.

Ключевые слова: активированный протеин С; дуоденаза; катепсин G; рецепторы, активируемые протеиназами; тучные клетки; секреция β -гексозаминидазы; воспаление.

ВВЕДЕНИЕ. Исследование роли протеиназ гемостаза в сопряжении процессов свертывания крови и воспаления - одна из фундаментальных проблем современной физиологии. Известно, что тромбин не только превращает фибриноген в фибрин, но и регулирует свертывание крови по механизму отрицательной обратной связи, превращая профермент - протеин С в сериновую протеиназу - активированный протеин С (APC) [1, 2]. Образовавшийся APC в присутствии кофактора - протеина S (витамин К-зависимого белка), иммобилизованного на эндотелии и/или тромбоцитах, - специфически расщепляет активные формы факторов V и VIII свертывания крови, блокируя тем самым генерацию тромбина [3]. Кроме антикоагулянтной активности у APC обнаружены

* - адресат для переписки

РАЗНОНАПРАВЛЕННОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРОТЕИНАЗ НА КЛЕТКИ

противовоспалительные и антиапоптотические свойства [2, 4, 5]. Непрямой противовоспалительный эффект APC реализуется через ингибирование генерации тромбина, который в высоких концентрациях обладает провоспалительной активностью. Прямое противовоспалительное действие APC проявляется в снижении продукции цитокинов (в частности, интерлейкина 6), хемокинов, адгезивных молекул (Р- и Е-селектинов), факторов роста и ряда транскрипционных факторов эндотелиальными клетками, что приводит к подавлению начальных стадий воспаления и отвечает, по-видимому, за его противовоспалительное действие при системном воспалении и сепсисе [6, 7]. Механизмы противовоспалительных эффектов APC изучены мало, хотя есть данные о вкладе в эти процессы двух рецепторов – нерасщепляемого эндотелиального рецептора протеина С (EPCR) и рецептора PAR1, известного как рецептор тромбина [3-5, 8]. В настоящее время известно, что все подтипы PAR рецепторов экспрессируются клетками желудочно-кишечного тракта [9], и их локальная экспрессия может регулироваться воспалительным процессом [10]. При воспалительных заболеваниях желудочно-кишечного тракта обнаружено повышение экспрессии APC [7]. Адекватной экспериментальной моделью, позволяющей исследовать на клеточном уровне процессы воспаления, служат тучные клетки, которые участвуют в воспалительных ответах организма, выделяя широкий спектр провоспалительных медиаторов. Тучные клетки тонкого кишечника секретируют наряду с катепсином G – антагонистом PAR1, триптазой – агонистом PAR2 [11], сериновую протеиназу – дуоденазу, первоначально обнаруженную в бруннеровых железах двенадцатиперстной кишки (рис. 1) [12].



Рисунок 1.

Локализация и физиологические функции дуоденазы. Дуоденаза экспрессируется клетками бруннеровых желез двенадцатиперстной кишки, а так же тучными клетками тонкого кишечника [12]. Физиологическая роль дуоденазы связана с процессингом проэнттеропептидазы - предшественника энтеропептидазы - ключевого фермента каскада активации пищеварительных ферментов, активирующего трипсиноген.

Ранее нами было показано, что рецептором APC на тучных клетках служит PAR1 [13], и он же является рецептором дуоденазы [14]. Об этом свидетельствует отсутствие регуляторного эффекта у инактивированных ферментов APC и дуоденазы и отмена вызванного APC и дуоденазой эффекта на тучные клетки после десенситизации тромбиновых PAR1 рецепторов. О роли дуоденазы в регуляции активности тучных клеток, стабилизированных APC, данных нет. Мы предположили, что дуоденаза, помимо участия в каскаде активации ферментов пищеварения, может также участвовать и в регуляции процессов воспаления. В связи с этим актуальным является выявление механизмов действия APC и дуоденазы на секреторную активность перитонеальных тучных клеток.

МЕТОДИКА.

Материалы. В работе использовали: активированный протеин С (APC, “Sigma”, США); дуоденазу (ИБХ РАН, Москва); катепсин G (“Sigma”); тромбин (“Sigma”); синтетический пептид-агонист PAR1 (PAR1-AP, SFLLRN, Российский кардиологический научно-производственный комплекс МЗ РФ, Москва, Россия); хромогенный субстрат для β -гексозаминидазы – *p*-нитрофенил-N-ацетил- β -D-глюкозаминид (“Sigma”); хромогенный субстрат для дуоденазы – Tos-Gly-Pro-Lys-pNA (“Sigma”); фиколл-400 (“Serva”, Германия); вещество 48/80 (“Biomol”, США); Трис (“ICN”, США); тиогликолат Na (“Fluka”, Швейцария); раствор Тироде: NaCl 145 mM, HEPES 10 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM, глюкоза 5 mM, 0,1% сывороточного альбумина, pH 7,4; буфер Na-HEPES: NaCl 145 mM, HEPES 10 mM, pH 7,4.

Методы. Эксперименты с животными выполняли в соответствии с этическими принципами и нормативными документами, рекомендованными Европейским научным фондом (ESF) и Хельсинской декларацией о гуманном отношении к животным. Тучные клетки выделяли из перитонеальной полости самцов крыс Вистар весом 250-300г, как было описано ранее [14]. Острое воспаление (перитонит) у крыс вызывали внутрибрюшинным введением тиогликолата Na в дозе 4 г/кг веса тела животного на фоне предварительного введения кетотифена – блокатора H1 рецепторов гистамина [15]. Через 16 часов после индукции воспаления выделяли перитонеальные тучные клетки [14] для исследования их секреторной активности. Контролем служили животные, получавшие только кетотифен. Количественный подсчет тучных клеток проводили в камере Горяева. После подсчета клеточную взвесь разводили раствором Тироде, исходя из необходимого в эксперименте количества клеток.

Определение β -гексозаминидазы, секретируемой тучными клетками. Эксперименты по определению β -гексозаминидазы тучных клеток проводили по методике, описанной ранее [14, 16]. К аликвотам, содержащим $(1-5) \cdot 10^5$ тучных клеток, добавляли по 10 мкл агонистов: APC, дуоденазы, катепсина G, тромбина, PAR1-AP, вещества 48/80 или раствора Тироде (в контроле) и инкубировали при 37°C в течение 10 мин (в трех параллельных пробах). Реакцию останавливали ледяным раствором Тироде. Активность β -гексозаминидазы определяли по расщеплению специфического хромогенного субстрата – *p*-нитрофенил-N-ацетил- β -D-глюкозаминида в реакционной смеси, содержащей 4 mM субстрата в 500 мкл 0,04 M цитратного буфера pH 4,5, и вычисляли содержание его по формуле: % секреции = $A/(A+B) \cdot 100\%$, где A – содержание медиатора в супернатанте, B – в осадке. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре Specord M40 при длине волны λ 410 нм.

Активность дуоденазы по отношению к субстрату TosGlyProLys-pNA определяли спектрофотометрически при длине волны λ 405 нм в стандартных условиях (10 mM Трис-HCl, pH 8,0, 37°C). Концентрация субстрата – 1 mM, концентрация фермента – 0,1-1,0 мкМ [17].

Статистическую обработку данных проводили, используя t-критерий Стьюдента. Результаты представлены как средние значения из 4-5 независимых экспериментов \pm средняя квадратичная ошибка. Различия считали достоверными при значении $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. В экспериментах *in vitro* нами было исследовано влияние широкого диапазона концентраций APC на секреторную активность спонтанно активированных тучных клеток и тучных клеток, полученных от животных с острым перитонитом. Было исследовано влияние APC на тучные клетки, активированные дуоденазой, и влияние преинкубации тучных клеток с протеиназами – дуоденазой, агонистом PAR1, и катепсином G, антагонистом PAR1, на ответ перитонеальных тучных клеток на APC.

Влияние APC на дегрануляцию тучных клеток. В первой серии опытов исследовали дозозависимость действия APC на секреторную функцию спонтанно активированных перитонеальных тучных клеток. Как видно из данных, представленных на рисунке 2, APC в низких концентрациях (0,2, 1,0 и 2,0 нМ) вызывал достоверное снижение секреции β -гексозаминидазы ПТК на 26,4%, 35,4% и 19,5% соответственно относительно спонтанного уровня секреции ($22,9 \pm 3,9\%$, $p < 0,05$, $n=6$). При концентрациях APC ниже 0,2 нМ (0,05 и 0,1 нМ) и выше 2,0 нМ (2-20 нМ) снижение спонтанной секреции было недостоверным (рис. 2).

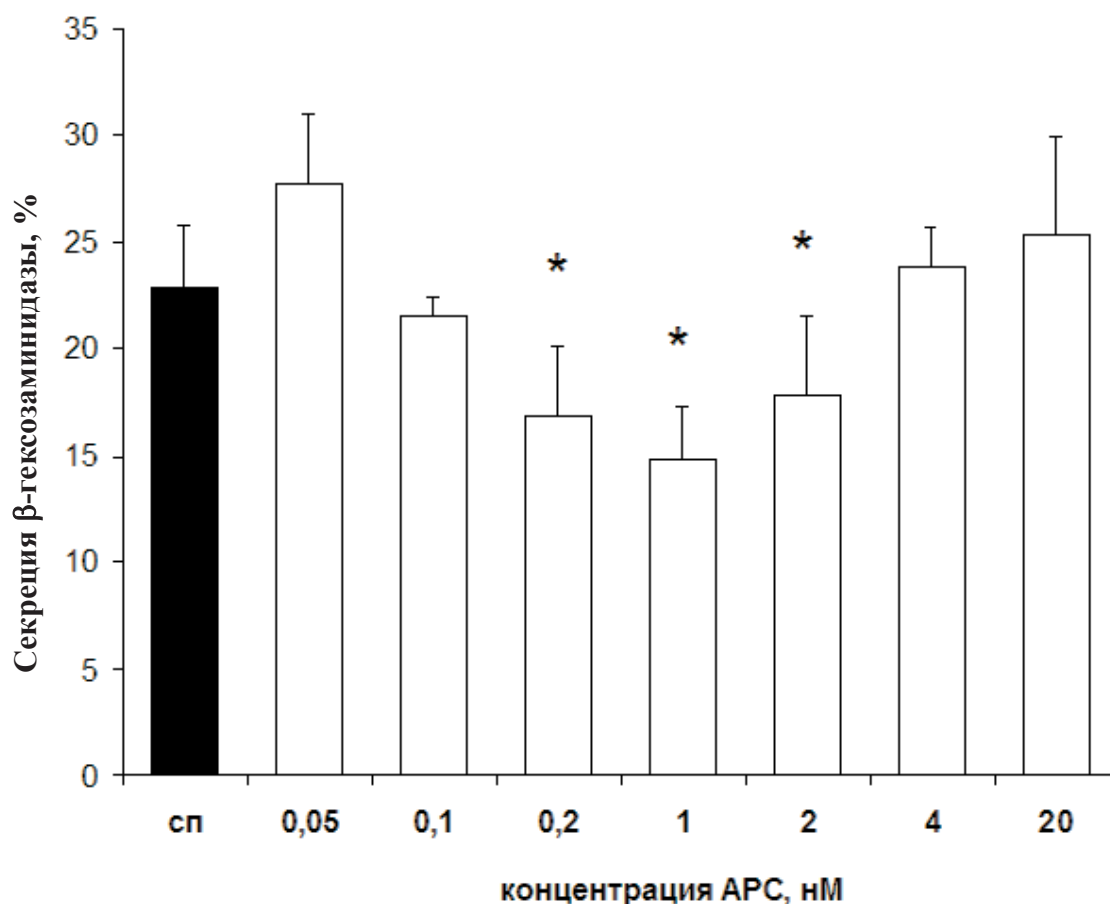


Рисунок 2.

Влияние APC на секрецию β -гексозаминидазы перитонеальными тучными клетками крысы;
* $p < 0,05$ - по отношению к спонтанной секреции (СП), $n=6$.

Таким образом, сериновая протеиназа APC уже в низких пикомолярных концентрациях (200 пМ) оказывает протекторное, стабилизирующее действие на секреторную функцию тучных клеток в норме. Эффект APC проявляется в узком диапазоне низких концентраций (>100 пМ и <4 нМ).

Во второй серии опытов исследовали влияние APC на секреторную функцию перитонеальных тучных клеток, активированных протеиназой двенадцатиперстной кишки – дуоденазой. Ранее в наших экспериментах была обнаружена положительная дозозависимая корреляция секреции β -гексозаминидазы от концентрации дуоденазы, что указывает на ее рецептор-опосредованную провоспалительную активность. Из данных, представленных на рисунке 3, видно, что 10-минутная предварительная инкубация ПТК с 1 нМ APC отменяла провоспалительный эффект 80 нМ дуоденазы на тучные клетки, возвращая их к уровню секреции, вызванной APC.

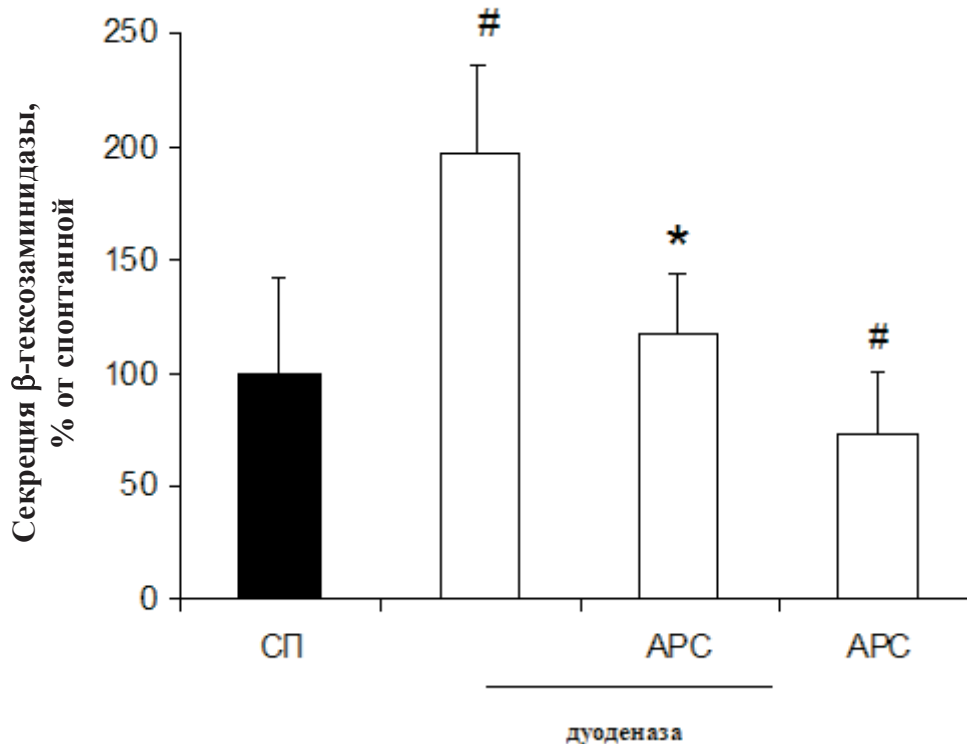


Рисунок 3.

Влияние APC (1 нМ) на секрецию β -гексозаминидазы тучными клетками, активированными дуоденазой (80 нМ); * $p < 0,05$ - по отношению к действию дуоденазы, # $p < 0,05$ - по отношению к спонтанной секреции (СП), $n=4$.

В следующей серии опытов исследовали влияние APC на секреторную функцию перитонеальных тучных клеток, полученных от крыс с острым перитонитом. Было показано, что в ответ на низкие концентрации APC (0,01, 0,05, 0,1 и 1,0 нМ) секреторный ответ снижался на $31,0 \pm 8,9$, $38,5 \pm 9,8$, $37,9 \pm 1,4$ и $38,6 \pm 13,3\%$ (относительно уровня секреции под действием вещества 48/80) ($p < 0,05$, $n=5$) (рис. 4). В контрольной группе животных, получавших только кетотифен, APC в тех же концентрациях не вызывал изменений секреции β -гексозаминидазы тучными клетками, что можно объяснить блокадой кетотифеном высвобождения оксида азота [18]. Ранее нами показано, что снижение секреции под действием APC обусловлено генерацией оксида азота, который стабилизирует тучные клетки [13]. В условиях воспаления APC проявлял противовоспалительное действие уже в концентрации 10 пМ, тогда как подобное протекторное действие на секреторную функцию тучных клеток в норме оказывал APC в концентрации на порядок выше (200 пМ).

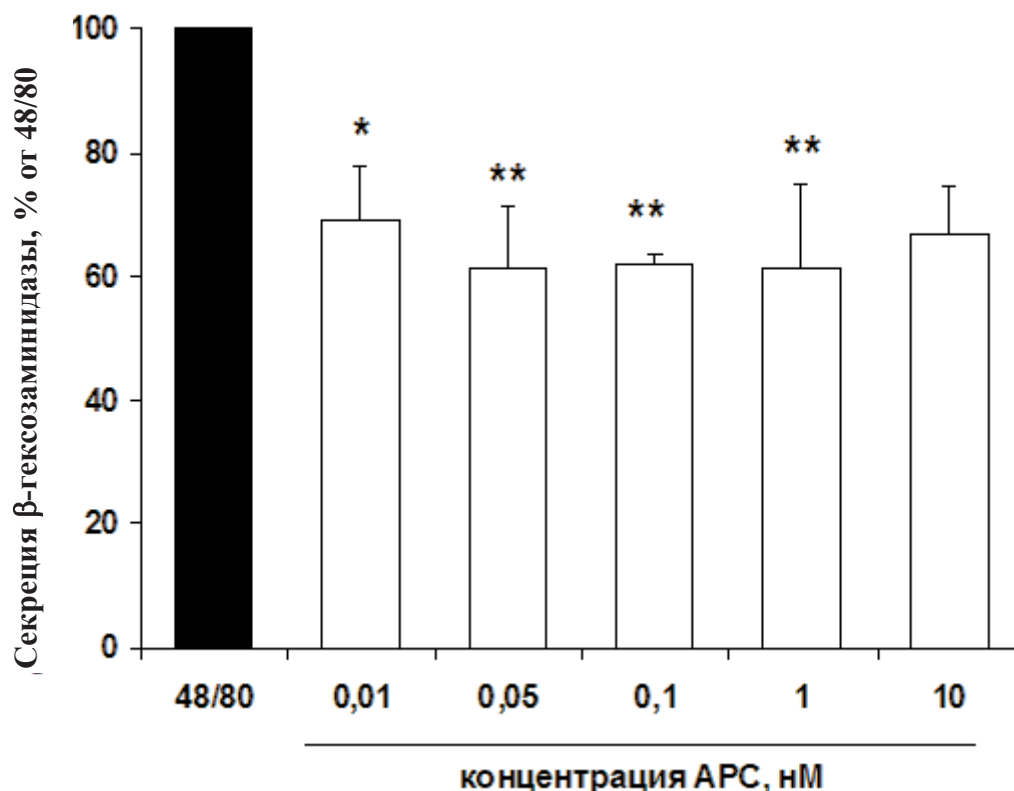


Рисунок 4.

Влияние APC на тучные клетки, полученные от крыс с острым перитонитом (вызванная веществом 48/80 секреция β-гексозаминидазы принята за 100%); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ - по отношению к действию вещества 48/80, $n=5$.

Эти данные свидетельствуют о том, что APC регулирует активность тучных клеток в норме (спонтанно активированных), клеток, активированных неиммунным стимулом, – провоспалительной протеиназой дуоденазой, а также клеток, полученных от животных с острым воспалением. Высокая аффинность APC к рецепторам тучных клеток от животных с воспалением может быть обусловлена повышением экспрессии и экспозиции PAR1 на этих активированных клетках. По-видимому, APC служит одним из эндогенных регуляторов секреторной активности тучных клеток.

Дуоденаза, как агонист/антагонист PAR1 рецепторов тучных клеток. Так как дуоденаза имеет структурное сходство с катепсином G [19] – сериновой протеиназой, освобождаемой активированными нейтрофилами и тучными клетками, мы предположили, что она может работать подобно катепсину G, как агонист/антагонист PAR1 рецептора. Катепсин G кроме критической связи Arg⁴¹-Ser⁴² в N-концевом экзодоме PAR1 рецептора, расщепляемой тромбином, может гидролизовать так же пептидные связи Phe⁴³-Leu⁴⁴ и Phe⁵⁵-Trp⁵⁶ в этом экзодоме и блокировать действие тромбина на тучные клетки, разрушая структуру “привязанного лиганда” [20, 21]. Поэтому в следующей серии экспериментов мы сравнивали действие дуоденазы с действием антагониста PAR1 рецепторов - катепсина G на тучные клетки и выясняли, сохраняется ли защитный эффект APC на тучные клетки после их активации дуоденазой или катепсином G.

Из данных, представленных на рисунке 5, видно, что предварительная инкубация тучных клеток как с катепсином G (4 мкМ), так и с дуоденазой (8 нМ) отменяла защитный противовоспалительный эффект APC (0,5 нМ) на тучные клетки. Следует отметить, что действие дуоденазы, как антагониста PAR1 тучных клеток, проявляется в более низких концентрациях, чем эффект катепсина G, выявленный лишь в концентрации 4 мкМ.

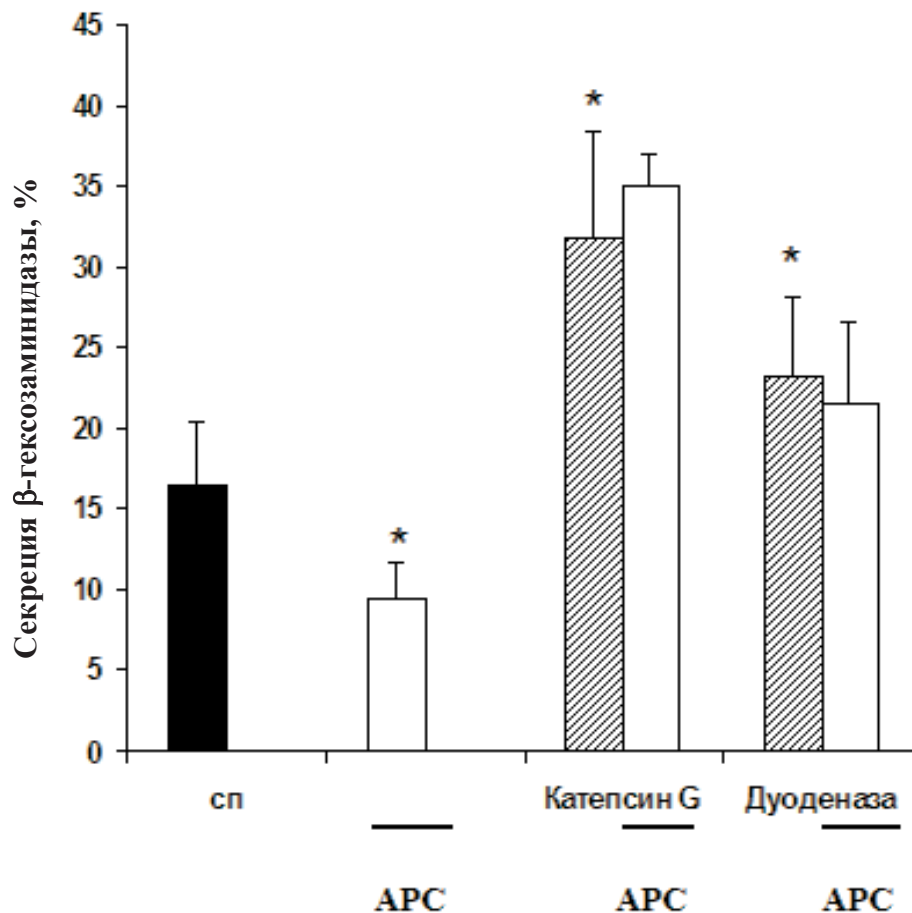


Рисунок 5.

Предварительная инкубация тучных клеток с катепсином G (4 мкМ) или дуоденазой (8 нМ) отменяет защитный противовоспалительный эффект APC (0,5 нМ) на тучные клетки; черный столбец – спонтанная секреция (контроль), штрихованные столбцы - действие катепсина G или дуоденазы, белые столбцы – последующее действие APC; * $p < 0,05$ - по отношению к спонтанной секреции (СП), $n=5$.

Инкубация тучных клеток с 10 нМ тромбина и 50 мкМ PAR1-АР оказывала провоспалительный эффект и вызывала высвобождение клетками β -гексозаминидазы ($p < 0,05$, $n=4$) (рис. 6). Предварительная 10-минутная обработка тучных клеток дуоденазой (8 нМ) приводила к снижению вызванной тромбином (10 нМ) и пептидом-агонистом PAR1 (50 мкМ) секреции β -гексозаминидазы на 38% и 42% соответственно (рис. 6). На основании этих данных можно предположить, что дуоденаза либо инактивирует PAR1 тучных клеток, либо вызывает десенситизацию этого подтипа PAR рецепторов.

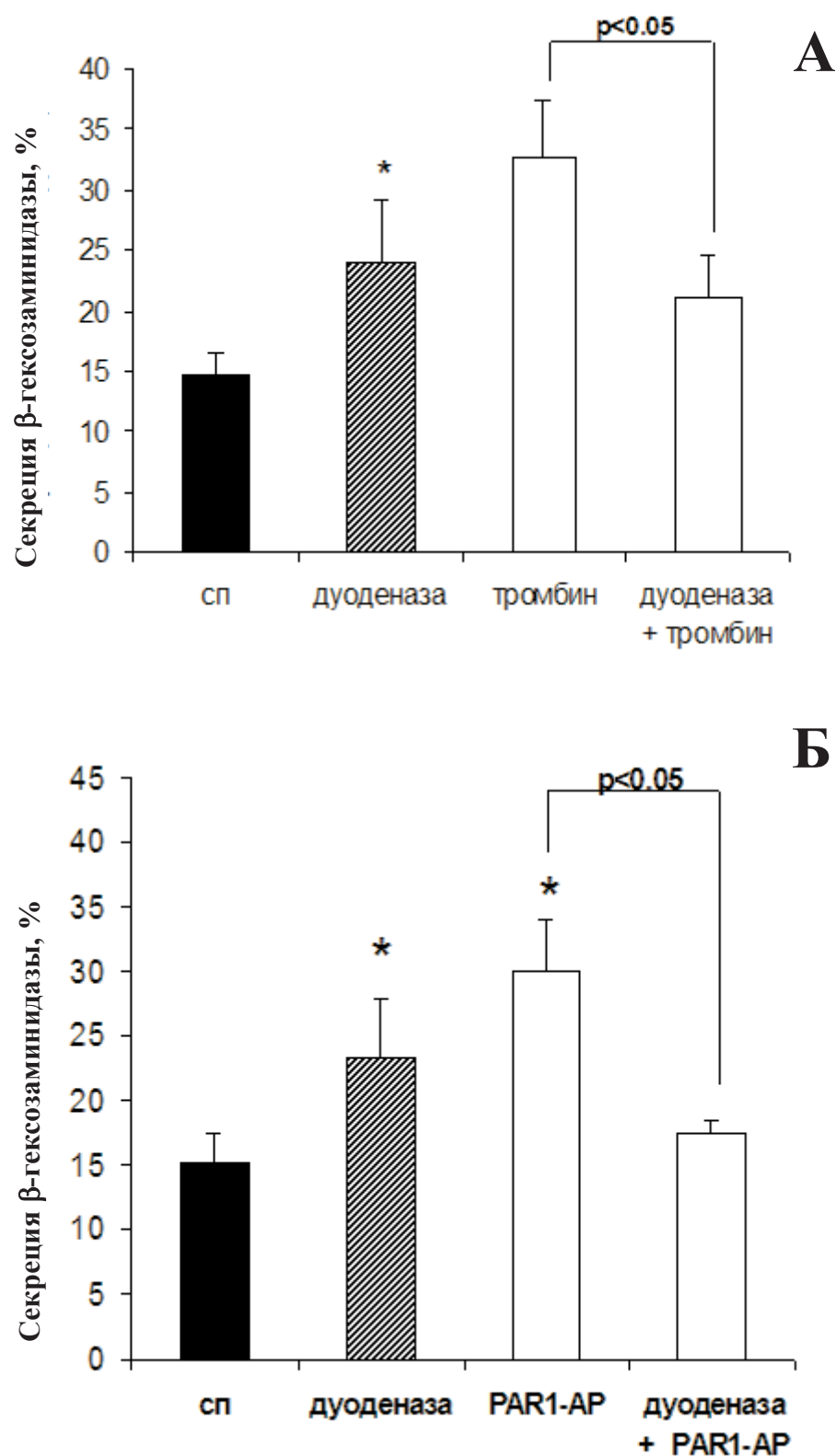


Рисунок 6.

Влияние предварительной активации перитонеальных тучных клеток крысы дуоденазой (8 нМ) на секретия β-гексозаминидазы, вызванную: **А** - тромбином (10 нМ) и **Б** - PAR1-AP (50 мкМ);
* $p < 0,05$ - по отношению к спонтанной секреции (СП), $n = 4$.

Таким образом показано, что предварительная инкубация тучных клеток с катепсином G или дуоденазой отменяла защитный противовоспалительный эффект APC. Кроме того, дуоденаза отменяет действие тромбина и PAR1-AP на тучные клетки. Этот эффект подтверждает наше предположение о том, что APC блокирует секрецию медиаторов воспаления тучными клетками через высокоспецифичную активацию PAR1 рецептора, поскольку дуоденаза может вызывать либо десенситизацию PAR1-рецепторов, подобно тромбину, либо гидролиз “привязанного лиганда”, подобно катепсину G. Вместе с тем установлено, что APC в низких (пМ-нМ) концентрациях способен регулировать активность тучных клеток в норме, при воспалении, а также тучных клеток, активированных провоспалительной протеиназой - дуоденазой.

ВЫВОДЫ.

1. Низкие концентрации APC дозозависимо блокируют секреторную активность тучных клеток в норме и при воспалении (остром перитоните у крыс).
2. APC через PAR1 регулирует секреторную функцию тучных клеток, активированных провоспалительной протеиназой - дуоденазой.
3. Протеиназы - катепсин G и дуоденаза, - отменяют защитное противовоспалительное действие низких концентраций APC на тучные клетки.

Работа поддержана грантом РФФИ № 05-04-48725.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dahlback B., Villoutreix B.O. (2005) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **25**, 1311-1320.
2. Esmon C.T. (2005) *Biochem. Soc. Trans.*, **33**, 401-405.
3. Mosnier L.O., Griffin J.H. (2006) *Frontiers in Biosci.*, **11**, 2381-2399.
4. Riewald M., Ruf W. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 19808-19814.
5. Feistritzer C., Schuepbach R.A., Mosnier L.O., Bush L.A., Di Cera E., Griffin J.H., Riewald M. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 20077-20084.
6. Струкова С.М. (2004) *Биохимия*, **69**, 1314-1331.
7. Nakamura M., Gabazza E.C., Imoto I., Yano Y., Taguchi O., Horiki N., Fukudome K., Suzuki K., Adachi Y. (2005) *J. Thromb Haemost.*, **3**, 2721-2729.
8. Ludeman M.J., Kataoka H., Srinivasan Y., Esmon N., Esmon C.T., Coughlin S.R. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 13122-13128.
9. Vergnolle N. (2000) *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **14**, 257-266.
10. Nelken N.A., Soifer S.J., O'Keefe J., Vu T.K., Charo I.F., Coughlin S.R. (1992) *J. Clin. Invest.*, **90**, 1614-1621.
11. Metcalfe D.D., Baram D., Mekori Y. (1997) *Physiol. Rev.*, **77**, 1033-1079.
12. Pemberton A.D., Zamolodchikova T.S., Scudamore C.L., Chilvers E.R., Miller H.R., Walker T.R. (2002) *Eur. J. Biochem.*, **269**, 1171-1180.
13. Макарова А.М., Русанова А.В., Горбачева Л.Р., Умарова Б.А., Струкова С.М. (2006) *Бюлл. эксп. биол. мед.*, **142**(10), 382-385.
14. Макарова А.М., Замолодчикова Т.С., Руми Л.Д., Струкова С.М. (2007) *Биоорг. хим.* **33**(5), 520-526.
15. Pejler G. (1999) *Inflamm. Res.*, **48**, 344-350.
16. Schwartz L.B., Austen K.F., Wasserman S.I. (1982) *J. Immunol.*, **123**, 1445-1450.
17. Zamolodchikova T.S., Sokolova E.A., Alexandrov S.L., Mikhaleva I.I., Prudchenko I.A., Morozov I.A., Kononenko N.I. (1999) *Eur. J. Biochem.*, **249**, 612-621.
18. Eliakim R., Karmeli F., Okon E., Rachmilewitz D. (1995) *Digest. Dis. Sci.*, **40**(3), 503-509.
19. Pletnev V.Z., Zamolodchikova T.S., Pangborn W.A., Daux W.L. (2000) *Proteins*, **41**, 8-16.

20. Molino M., Blanchard N., Belmonte E., Tarver A.P., Abrams C., Hoxie J.A., Cerletti C., Brass L.F. (1995) J. Biol. Chem., **270**, 11168-11175.
21. Dugina T.N., Kiseleva E.V., Glusa E., Strukova S.M. (2003) Eur. J. Pharmacol., **471**(2), 141-147.

Поступила: 21. 06. 2007.

VARIOUS EFFECTS OF SERINE PROTEINASES,
ACTIVATED PROTEIN C AND DUODENASE, ON MAST CELLS

A.M. Makarova¹, L.R. Gorbacheva¹, T.S. Zamolodchikova², L.D. Rumsh²,
Zh.D. Bespalova³, S.M. Strukova¹

¹Lomonosov Moscow State University, School of Biology, Department of Human & Animal Physiology,
Moscow, 119899 Russia; e-mail: Strukova@mail.ru

²Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow,
117997 Russia

³Russian Cardiology Research and Production Complex, Russian Ministry of Health, Moscow,
121552 Russia

Some serine proteinases of haemostasis can regulate blood clotting and inflammation acting at proteinase-activated receptors (PARs). It is known that the anticoagulant proteinase, activated protein C (APC), exhibits anti-inflammatory effects on endothelial cells and macrophages and this involves endothelial protein C receptor - EPCR and proteinase-activated receptor - PAR1. We have studied the effect of wide range of APC concentrations on functional activity of rat peritoneal mast cells (PMC), which secrete the proinflammatory mediators, under normal conditions and during acute inflammation in rats. APC was able to reduce β -hexosaminidase release from PMC. APC at very low concentrations (0.2-2 nM) modulated the mediator secretion from PMC under normal conditions and also during acute inflammation in rats. APC abolished the proinflammatory activity of duodenase (80 nM), the proteinase from gastrointestinal tract and mast cells. Mast cells pretreated with cathepsin G (PAR1 antagonist) or duodenase abolished protective antiinflammatory effect of low concentrations of APC on PMC degranulation. Our data indicated that blockade of the mast cells proinflammatory mediator secretion by APC involved PAR1 activation.

Key words: activated protein C, duodenase, cathepsin G, proteinase activated receptors, mast cells, β -hexosaminidase secretion, inflammation.