

УДК 571.152.3:577.156

РАСПАД СТРЕПТОКИНАЗЫ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПОЧЕЧНОГО КАТЕПСИНА В

В.П. Фаенкова, Т.Ф. Субботина, Л.В. Галевская

(Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
им. акад. И.П. Павлова; e-mail: biochem@sptu.rssi.ru)

Катепсин В, выделенный из почек человека, инкубировали с препаратом стрептокиназы “Стрептаза” (“Белмедпрепараты”, Минск) при 37° и рН 5,0. Активность катепсина В в отношении стрептокиназы оценивали с помощью гель-фильтрации, электрофореза в ПААГ, а также по величине ее функциональной активности. Появление продуктов деградации (8–10 кДа и около 50 кДа) отмечалось уже после 5 мин инкубации, но не сопровождалось никакими нарушениями плазминоген-активирующей способности. Дальнейшая деградация стрептокиназы приводила вначале к увеличению времени активации плазминогена, а затем к ингибированию фибринолиза вплоть до его полного прекращения.

Катепсин В – важнейшая цистеиновая протеиназа лизосом, участвующая в процессах деградации многих внутри- и внеклеточных белков. Протеолитическое действие катепсина В изучали в отношении таких белков, как гистон, гемоглобин, альбумин [1–3]. Вместе с тем в литературе практически отсутствуют сведения о роли катепсина В в деградации фармакологических препаратов белковой природы. Целью настоящей работы явилось исследование воздействия катепсина В из почек человека на препарат стрептокиназы.

Стрептокиназа, являющаяся белком β-гемолитических стрептококков, широко применяется в практической медицине в качестве тромболитического препарата. Механизм действия белка заключается в конформационной активации плазминогена, приобретающего способность катализировать гидролиз фибрина в составе комплекса со стрептокиназой [4–6]. Терапевтическое действие вводимой пациентам стрептокиназы весьма кратковременно, что может быть обусловлено ее быстрой деградацией, предположительно при участии катепсина В.

Материалы и методы

Катепсин В выделяли из почки человека разработанным нами методом [7]. В результате очистки был получен препарат с удельной активностью 14 МЕ/мг белка по хромогенному синтетическому субстрату паранитрофенилового эфира N-α-карбобензоксиг-L-лизина (Z-Lys-O-Np-HCl), синтезированному на кафедре природных соединений Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова.

Стрептазу (коммерческий препарат стрептокиназы, АО “Белмедпрепараты”, Белоруссия) растворяли в физиологическом растворе, пока ее активность не достигала 2500 МЕ/мл.

Обработку стрептокиназы катепсином В проводили в условиях, оптимальных для фермента. Инкубационная

смесь содержала 0,1 мл рабочего раствора стрептокиназы и 0,1 мл (0,2 МЕ) препарата катепсина В в 0,02 М ацетатном буфере (рН 5,0), содержащем 1 мМ ЭДТА и 5 мМ дитиотрейтол. Инкубацию проводили при 37°, ее продолжительность варьировали от 5 до 30 мин. Контрольная проба содержала стрептокиназу и буфер.

Продукты протеолиза изучали методами гель-фильтрации на колонке (33,5×1,1 см), заполненной *Акрилксом Р-60*, а также методом щелочного электрофореза в ПААГ с додецилсульфатом натрия.

Плазминоген-активирующую способность стрептокиназы оценивали с помощью турбидиметрического метода регистрации образования и лизиса фибринового сгустка [8]. В качестве источников фибриногена и плазминогена использовали пул бедной тромбоцитами цитратной плазмы здоровых доноров. Для активации свертывания применяли тромбин человека (“Ренам”, Россия), который растворяли в физиологическом растворе до установления активности 12–13 с по тромбиновому тесту (~2 мг/мл). Регистрацию оптической плотности инкубационной среды проводили с помощью фотоэлектроколориметра МКМФ-02М со светофильтром 340 нм в кювете толщиной 1 см, термостатируемой при 37°. При графической регистрации процесса использовали самописец ЛКД-4-003. Стандартная процедура исследования состояла в следующем. В кювету вносили 1,78 мл 0,02 М вероналового изотонического буфера (рН 7,4), содержащего 1 мМ CaCl₂; 0,1 мл плазмы крови и 0,02 мл инкубационной смеси, содержащей стрептокиназу и катепсин В (действие фермента при этом прекращалось, поскольку катепсин В полностью теряет активность при рН 7,4). Через 1 мин добавляли 0,1 мл раствора тромбина, быстро перемешивали и регистрировали динамику изменений оптической плотности во времени. Восходящая часть кривой соответствовала образованию фибринового сгустка; нисходящая – его

лизису. Для характеристики фибринолиза использовали следующие показатели: 1) время сохранения максимума светопоглощения; 2) максимальная скорость (тангенс угла наклона касательной к кривой в точке наибольшей крутизны); 3) длительность.

Результаты и обсуждение

Было установлено, что в контрольной пробе стрептокиназы не утрачивает активности и не подвергается распаду в течение как минимум 120 мин. Обработка стрептокиназы катепсином В приводит к постепенной деградации белка. Результаты электрофоретического разделения образующихся продуктов представлены на рис. 1. Уже после 5-минутной обработки наряду с интактными молекулами стрептокиназы (89 кДа) появляются низкомолекулярные пептиды (8,5–10 кДа) и продукты с молекулярной массой ~50 кДа, которые затем также расщепляются. После 10-минутной обработки отмечается увеличение содержания низкомолекулярных пептидов (4,5–8,5 кДа) и появление продуктов с молекулярной массой 32 кДа. Количество этих продуктов в свою очередь снижается после 18-минутной инкубации стрептокиназы с катепсином В, а продукты с молекулярной массой 50 кДа полностью исчезают. К этому времени еще сохраняется небольшое количество неповрежденных молекул стрептокиназы, хотя количество низкомолекулярных пептидов продолжает увеличиваться. После 30-минутной обработки обнаруживаются в основном низкомолекулярные пептиды (3–8,5 кДа), а также небольшое количество продуктов с молекулярной

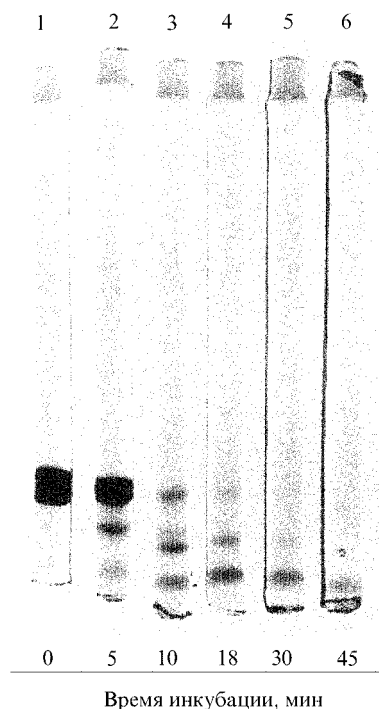


Рис. 1. Результаты ПААГ-ЭФ препарата стрептокиназы (250 МЕ) при разной продолжительности его обработки катепсином В (200 МЕ)

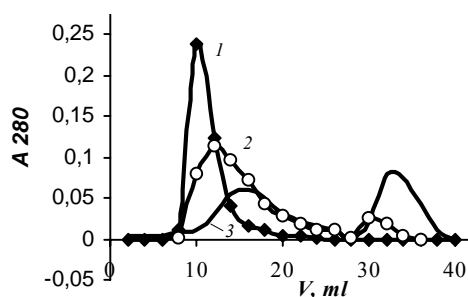


Рис. 2. Профили элюции гель-хроматографического разделения продуктов деградации стрептокиназы (250 МЕ) катепсином В (200 мВ) на Акрилексе P-60 (33,5×1,1 см) при времени инкубации, мин: 1 – контроль; 2 – 10; 3 – 30

массой 32 кДа; последние оказываются также разрушенными после 45-минутной инкубации.

Результаты хроматографического разделения контрольной и опытных (10 и 30 мин инкубации) проб представлены на рис. 2. В случае стрептокиназы из контрольной пробы наблюдается один пик ($V_e = 10$ мл). Ее плазминоген-активирующая способность полностью сохраняется. После 10-минутной обработки катепсином наблюдается смещение этого пика и его расширение ($V_e = 12$ мл), что указывает на уменьшение размеров части молекул. Плазминоген-активирующая способность в этом пике может быть обусловлена наличием как неповрежденных молекул стрептокиназы, так и крупных молекул продуктов протеолиза, возможно, еще обладающих активностью. Появляется пик низкомолекулярных пептидов (4,5–8,5 кДа). Он не обладает плазминоген-активирующей способностью. После 30-минутной обработки появляется пик ($V_e = 16$ мл), соответствующий молекулярной массе 32 кДа, а также увеличивается и расширяется пик низкомолекулярных пептидов (3–8,5 кДа). Эти пики не обладают плазминоген-активирующей способностью.

Проверка функциональной активности стрептокиназы в ходе обработки ее катепсином В показала, что инкубация в течение 5 мин не приводит к изменению параметров фибринолиза по сравнению со стрептокиназой из контрольной пробы (рис. 3, кривые 1, 2). Это объясняется сохранением достаточного количества неповрежденных молекул стрептокиназы (рис. 1). Увеличение продолжительности обработки приводит к торможению фибринолиза (рис. 3, кривые 3, 4 и 5). Первоначально (кривая 3) отмечается увеличение в 4,5 раза времени сохранения максимума светопоглощения. Эта величина характеризует скорость накопления активного плазмينا, так как лизис сгустка начинается только тогда, когда концентрация активированного фермента достигает определенного уровня. Таким образом, первоначально происходит снижение скорости активации плазминогена из-за уменьшения в ходе деградации количества молекул стрептокиназы, способных образовывать

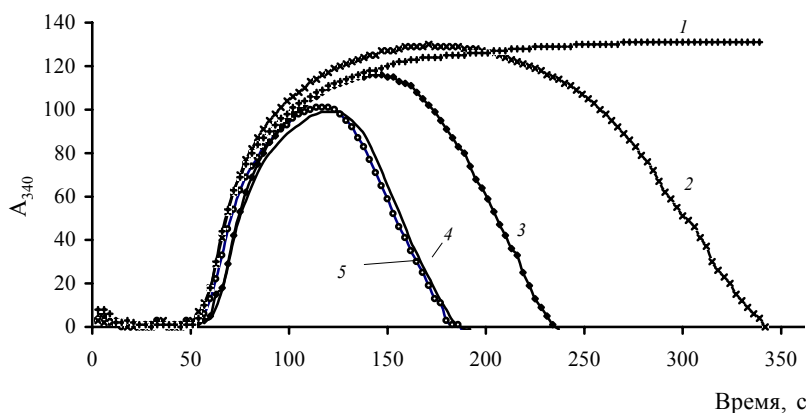


Рис. 3. Влияние продолжительности обработки стрептокиназы (250 МЕ) катепсином В (200 мВ) на процесс фибринолиза (мин): 1 – 0; 2 – 5; 3 – 10; 4 – 18; 5 – 30

активаторный комплекс, однако, в конце концов, активируется весь имеющийся плазминоген. Об этом свидетельствуют неизменность времени и скорости лизиса (рис. 3, кривые 1, 2 и 3). Эти величины определяются количеством активного плазмина. Кроме того, лизис фибрина, как уже отмечалось, может осуществляться под действием самого активаторного комплекса в том случае, если продукты протеолиза стрептокиназы способны еще его образовывать. После 18-минутной обработки стрептокиназы катепсином В (рис. 3, кривая 4) наряду с 11-кратным увеличением времени сохранения максимума светопоглощения происходит и заметное снижение скорости фибринолиза, что можно объяснить уменьшением не только скорости образования комплекса стрептокиназа–плазминоген, но и количества активированного плазмина. Вероятно, в этот период процесс образования активированного плазминогена начинает лимитироваться количеством функционально активной стрептокиназы. После 30-минутной обработки препарата катепсином В не наблюдается лизиса сгустка (рис. 3, кривая 5).

В следующей серии экспериментов была исследована зависимость параметров функциональной активности стрептокиназы от количества катепсина В. В этих опытах время инкубации составляло 10 мин, а количество фермента в пробе варьировалось от 50 до 400 МЕ. В этом диапазоне концентраций была выявлена линейная зависимость времени сохранения максимума светопоглощения от количества катепсина В (рис. 4).

Таким образом, указанная величина наиболее точно отражает количество стрептокиназы в пробе. Изменения времени лизиса в зависимости от количества катепсина В имеют “пороговый” характер: при уровне катепсина от 50 до 200 МЕ время лизиса сохраняется неизменным, а при дальнейшем увеличении количества фермента время лизиса начинает возрастать.

Как известно, молекула стрептокиназы состоит из одной полипептидной цепи (414 аминокислот) и не содержит углеводных или липидных компонентов. В молекуле белка можно выделить 15 N-концевых амино-

кислот, три глобулярных домена (α -, β -, и γ) и 32 C-концевые аминокислоты [6]. Имеются сведения о том, что для образования полноценного активаторного комплекса необходимо наличие всех трех доменов стрептокиназы. Утрата же стрептокиназой 15 первых и 20 последних аминокислот никак не отражается на ее активности, тогда как фрагмент, охватывающий остатки 60–333, сохраняет только 1% активности и оказывается слабосвязанным с плазминогеном [4].

Полученные нами данные о динамике изменения активности стрептокиназы в ходе ее обработки катепсином В свидетельствуют о том, что первоначально расщепление стрептокиназы идет в концевых областях молекулы. Об этом свидетельствует то, что плазминоген-активирующая способность белка сохраняется на начальных этапах ферментной обработки. При анализе первичной структуры стрептокиназы обращает на себя внимание то, что в концевых областях стрептокиназы действительно имеются связи, образованные парами основных аминокислот. Кроме того, такие связи расположены в α -домене, между участками связыва-

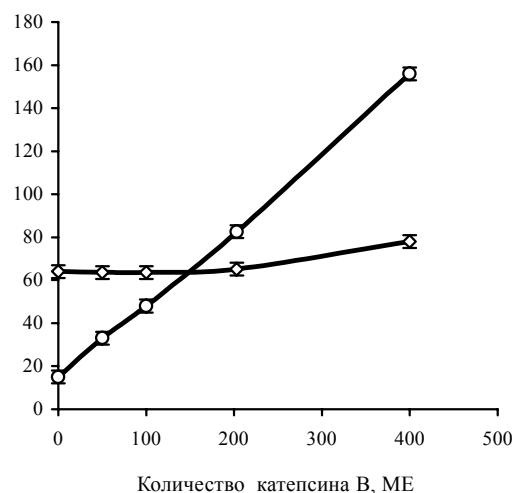


Рис. 4. Зависимость параметров фибринолиза (время сохранения максимума светопоглощения (1) и время фибринолиза (2) от количества катепсина В (исходная активность стрептокиназы 250 МЕ, время обработки 10 мин)

ния с интактным плазминогеном и участком связывания с плазминогеном комплекса. Вероятно, образующиеся в ходе протеолиза продукты с молекулярной массой 50 кДа еще могут связываться с плазминогеном, но не способны его активировать из-за разрушения α -домена.

Таким образом, установлено, что катепсин В из почек человека обладает высокой протеолитической

активностью в отношении стрептокиназы, что объясняет кратковременность терапевтического эффекта препарата.

Процесс деградации стрептокиназы катепсином В проявляется в первую очередь в увеличении времени сохранения максимума светопоглощения на турбидиметрической кривой фибринолиза, а затем и в замедлении фибринолиза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kirschke H., Langner J., Rieman S. et al.* // Protein degradation in Health and Disease. Amsterdam, 1980. P. 15.
2. *Щербак И.Г., Никандров Н.Н., Фаенкова В.П.* // Вопр. мед. хим. 1987. **33**. С. 115.
3. *Kirschke H., Joronen I., Rinne A., et al.* // Proteolysis in Cell Function. Amsterdam, 1997. P. 479.
4. *Reed G.L., Lin L.F., Parhami-Seven B., Kussie P.* // Biochemistry. 1995. **34**. P. 10266.
5. *Shi G.Y., Chang B-I., Chen S-M. et al.* // Biochem. J. 1994. **304**. P. 235.
6. *Wang X., Lin X., Loy J.A. et al.* // Science. 1998. **281**. P. 1662.
7. *Щербак И.Г., Субботина Т.Ф., Фаенкова В.П.* Способ выделения цистеиновых катепсинов из экстрактов тканей. Патент РФ на изобретение. № 2126684; Оpubл. 27.02.1999. Бюл. № 6.
8. *Щербак И.Г., Субботина Т.Ф., Фаенкова В.П., Рюмина Е.В.* // Вопр. мед. химии. 2001. **47**. С. 80.

Поступила в редакцию 25.10.02