УДК 577.152.3+534.29-7/-8

Е. А. ЧЕРНЯВСКИЙ, В. М. ШКУМАТОВ

ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАЗВУКА НА СЕРИНОВЫЕ ПРОТЕАЗЫ, БЕЛКИ ФИБРИНОЛИТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ И ПРОЦЕССЫ ИХ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ

НИИ физико-химических проблем
Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь

Одним из перспективных подходов к лечению тромботических заболеваний является применение внутрисосудистого ультразвука (УЗ). Вместе с тем прямое акустохимическое воздействие на белки крови, при использовании УЗ в тромболитической терапии, может стать причиной развития предтромботического состояния. Несмотря на широкое применение, до настоящего времени выбор оптимальных параметров УЗ носит эмпирический характер.

В настоящей работе с целью оптимизации режимов акустоферментативного лизиса тромбов было изучено влияние УЗ обработки на структурно-функциональную организацию сериновых протеаз и их неактивных предшественников, а также на фибриноген, фибрин и процессы их протеолитической модификации плазмином.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В работе использовали трипсиноген, трипсин, химотрипсиноген и химотрипсин, выделенные из поджелудочной железы, а также фибриноген (ФГ) и плазминоген (ПГ) из крови крупного рогатога скота; препарат урокиназы — Alphakinase-250.000 (Alpha Therapeutic, США), рекомбинантный тканевый активатор плазминогена (т-АП) — «Aktylise» (Boehringer Ingelheim, США); PPSB-концентрат для заместительной терапии гемофилии В, содержащий смесь факторов свертывания крови IX, II, VII и X с общими активностями 640, 580, 600 МЕ соответственно («Intersero», Германия). Применялась ультразвуковая система «Пульсар», разработанная в Белорусском национальном техническом университете (г. Минск). Выходная мощность генератора 80 Вт. Генератор обеспечивает импульсный режим работы с регулируемой скважностью. Были использованы волноводы длиной 245 мм, диаметром 0,6 мм. Резонансная частота подбиралась для каждого волновода и находилась в диапазоне 25—27,5 кГц. Интенсивность регулировалась ступенчато в диапазоне 0—55 Вт/см^2. В качестве методов анализа были использованы: высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) (хроматограф фирмы «Shimadzu» (Япония) со спектрофотометрическим детектором на диодной матрице SPD-M10Avp); гель-электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS гель-электрофорез); адсорбционная спектроскопия в УФ-области спектра (спектрофотометр Shimadzu UV-1202 (Япония)).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние УЗ на сериновые протеазы и их предшественники. Нами исследовано влияние низкочастотного импульсного (27,4 кГц, 51,2 Вт/см^2, 50 % скважность) УЗ на ряд предшественников сериновых протеаз: трипсиноген, химотрипсиноген, плазминоген, протромбин, одноцепочечные формы тканевого активатора плазминогена (т-АП) и урокиназы, их активные формы, смесь витамин К-зависимых факторов свертывания крови (PPSB-комплекс). Установлено, что УЗ-обработка в течение 30 мин не приводила к разрыву пептидных связей, образованию межмолекулярных или межцепочечных ковалентных сшивок в исследованных белках. Не наблюдалось экспонирования новых, чувствительных к действию различных протеаз, пептидных связей в молекулах проферментов. На рис. 1 представлены денситограммы SDS гель-электрофореза восстановленных образцов исходного (рис. 1, *а*, денситограмма *1*) и УЗ-обработанного (рис. 1, *б*, денситограмма *1*) плазминогена. Видно, что оба образца характеризовались наличием одной полипептидной цепи, соответствующей Glu-плазминогену.

В случае химотрипсиногена, химотрипсина, трипсиногена и трипсина методами УФ-спектроскопии первой и второй производных, гель-проникающей (рис. 2, *а*) и обратно-фазовой (рис. 2, *б*) хроматографии установлено, что в процессе УЗ-обработки часть молекул исходных белков подвергалась денатурации с последующей протеолитической деградацией.

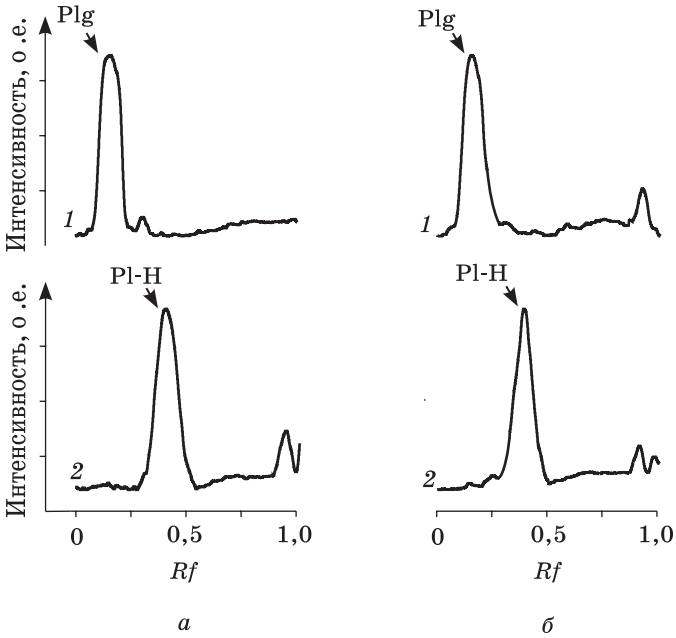

Рис. 1. Денситограммы SDS гель-электрофореза восстановленных контрольного (*а*) и УЗ-обработанного в течение 30 мин (*б*) образцов плазминогена:
1 — плазминоген; *2* — продукты активации урокиназой.
Plg — плазминоген, Pl-H — «тяжелая» цепь плазмина.
УЗ: 25,1 кГц, 48,4 Вт/см^2, 50 % скважность

На рисунке 2 представлены результаты анализа исходных и УЗ-обработанных образцов химотрипсина. Из рисунка видно, что УЗ-обработка приводила к уменьшению количества нативного белка и накоплению продуктов с низкой молекулярной массой. При этом профили элюирования исходных (рис. 2, *а*, кривая *1*) и УЗ-обработанных образцов схожи и отличались только относительными площадями пиков. Это могло свидетельствовать об образовании в процессе УЗ-обработки полипептидов, идентичных продуктам автолиза данных белков. Для проверки этого предположения был проведен анализ образцов методом обратно-фазовой хроматографии (рис. 2, *б*). Как и в случае гель-проникающей хроматографии, при анализе образцов химотрипсина методом обратно-фазовой хроматографии наблюдалось существенное уменьшение пика, соответствующего исходному белку, и идентичность профилей элюирования обработанных и контрольных образцов (рис. 2, *б*).

Следует отметить, что в случае УЗ-обработки химотрипсиногена происходило накопление продуктов с временами удерживания, идентичными продуктам, образующимся при УЗ-обработке химотрипсина и присутствующим в качестве примесей в исходных препаратах белка. Аналогичные результаты были получены для пары трипсиноген/трипсин.

Полученные результаты позволили сделать вывод, что УЗ вызывал денатурацию части белков, после чего они подвергались быстрой протеолитической деградации следовыми количествами ферментов в случае проферментов, и автолизу, в случае активных протеаз. Данный механизм был подтвержден отсутствием

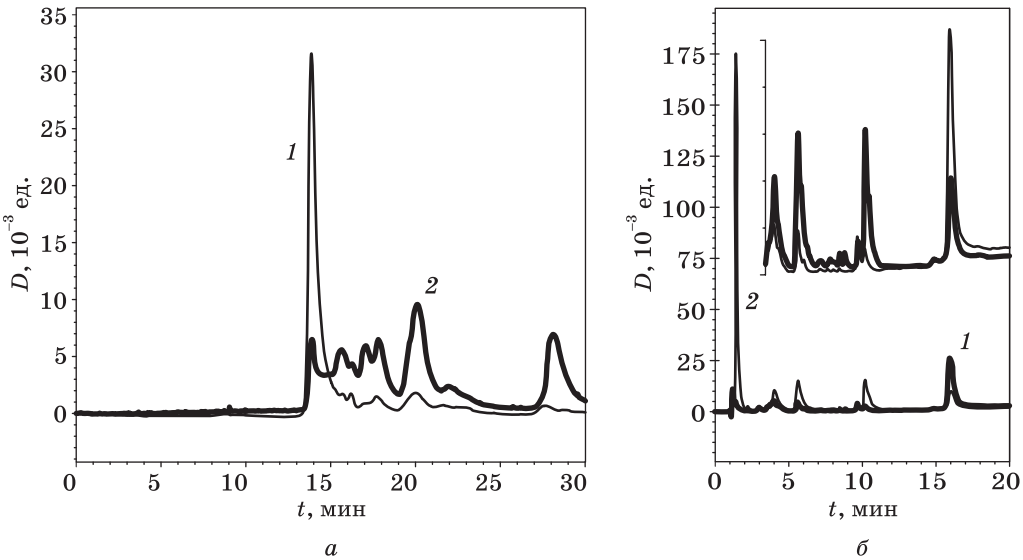

Рис. 2. Анализ образцов термостатированного при 37 °С в течение 15 мин (*1*) и обработанного УЗ в течение 15 мин (*2*) химотрипсина методом ВЭЖХ:
а — гель-проникающая хроматография. Колонка «Zorbax GF-250» (250 х 4,6 мм) («Agilent», США), элюент 0,08М NaФБ (pH 7,4), содержащий 0,5 М KCl. Скорость протока — 0,2 см^3/мин; *б* — обратнофазовая хроматография. Колонка «NUCLEOSIL 500-5 C18 PPN» (125 х 4 мм) («Macherey — Nagel», Германия). Элюент А — 0,1 % ТФУ в воде и элюент Б — 0,08 % раствор ТФУ в ацетонитриле. Градиент от 10 % Б до 100 % Б в течение 25 мин. Скорость протока — 1 см^3/мин

низкомолекулярных продуктов при УЗ-обработке данных белков в присутствии ингибитора сериновых протеиназ (PMSF). Об УЗ-денатурации белков свидетельствовало изменение спектров флуоресценции комплексов белков с зондами на основе производных индолкарбазолов [1], а также повышение интенсивности в спектрах УФ-поглощения и ярко выраженный коротковолновой сдвиг первой и второй производных спектров поглощения (рис. 3). При этом более четко выраженные эффекты характерны для химотрипсина, а не его неактивного предшественника — химотрипсиногена, что хорошо согласуется с данными анализа методами гель-проникающей и обратно-фазовой хроматографии. При изучении эквимолярной смеси химотрипсиногена и трипсиногена показано, что в условиях автоактивации проферментов в УЗ-поле наблюдалось уменьшение скорости образования активных форм трипсина и химотрипсина в основном за счет деградации трипсина [2]. Отсутствие значительных нарушений структуры белков (модификация боковых радикалов аминокислот, ковалентная или нековалентная агрегация) и дополнительное накопление «тяжелых» и «легких» цепей в УЗ-поле было показано и в случае смеси факторов свертывания крови IX, II, VII и X (PPSB-концентрат) [3].

Предварительная УЗ-обработка плазминогена приводила к уменьшению удельной активности продукта его активации. При этом продукт активации характеризовался наличием полипептидных цепей, идентичных плазмину. Аналогичные изменения были установлены для свободнорадикального окисления плазминогена и плазмина гидроксильными радикалами, генерируемыми в системе Cu(III)/аскорбат. При этом авторами было сделано предположение относи-

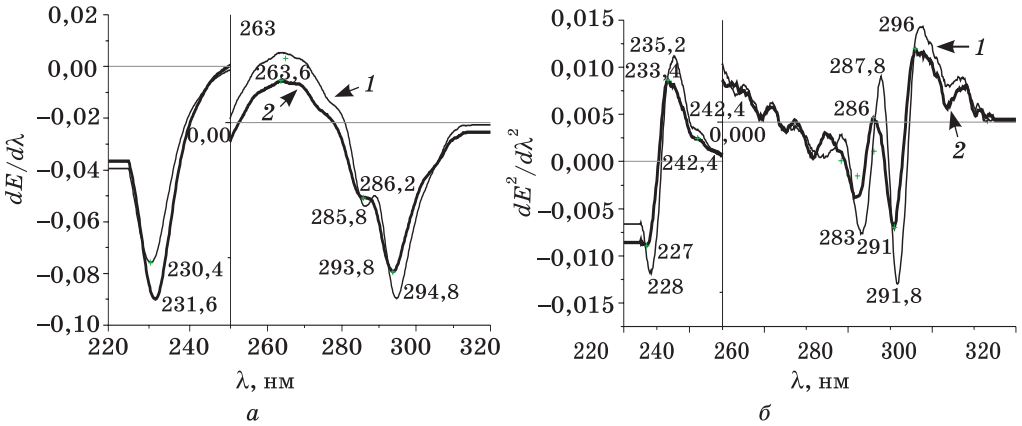

Рис. 3. Первая (*а*) и вторая производная (*б*) спектра поглощения термостатированного при 37 °С (*1*) и УЗ-обработанного в течение 15 мин (*2*) раствора химотрипсиногена в 0,05М Трис-HCl, 0,15М NaCl буфере с pH 7,4

тельно окисления остатка гистидина активного центра фермента [4]. В случае УЗ также возможно окисление боковых радикалов аминокислот (в частности, гистидина активного центра плазмина) гидроксильными радикалами, генерируемыми в поле УЗ-кавитации. Действие УЗ на плазмин сопровождалось снижением амидолитической активности (гидролиз синтетического субстрата S-2251), а также протеолитической активности плазмина по отношению к казеинату натрия, фибриногену и фибрину. В свою очередь, УЗ-обработка рекомбинантного тканевого активатора плазминогена (т-АП) приводила к уменьшению скорости гидролиза фибриногена смесью плазминогена с т-АП, причем в большей степени, чем в случае предварительной УЗ-обработки плазминогена и урокиназы. Большая чувствительность т-АП к УЗ-воздействию объясняется уникальной структурой данного белка. По сравнению с другими проферментами одноцепочечный т-АП обладает собственной каталитической активностью за счет взаимодействий, стабилизирующих активную конформацию одноцепочечного фермента [5].

Влияние УЗ на фибриноген. Методом SDS гель-электрофореза установлено, что УЗ не вызывал разрыва полипептидных и межцепочечных дисульфидных связей, а также образования ковалентных сшивок. Как для УЗ-обработанного, так и контрольного образцов фибриногена было характерно идентичное распределение полипептидных полос на электрофореграммах продуктов ограниченного протеолиза плазмином. Полученные результаты свидетельствовали о том, что УЗ не индуцировал конформационных изменений, приводящих к экспонированию новых участков гидролиза плазмином.

Анализ кинетических кривых образования фибрина показал, что УЗ приводил к уменьшению начальной скорости образования и максимальной концентрации фибрина при увеличении времени обработки (рис. 4). Ранее было показано, что γ-облучение и свободнорадикальное окисление реактивом Фентона приводило к потере свертывающей активности и увеличению чувствительности к протеолитической деградации в результате образования агрегатов фибриногена [6]. Гель-проникающая хроматография фибриногена до и после УЗ-обработки показала увеличение молекулярной массы белка от 340 кДа, соответствующей протомерной форме белка, до агрегатов с Mr ≥ 1000 кДа.

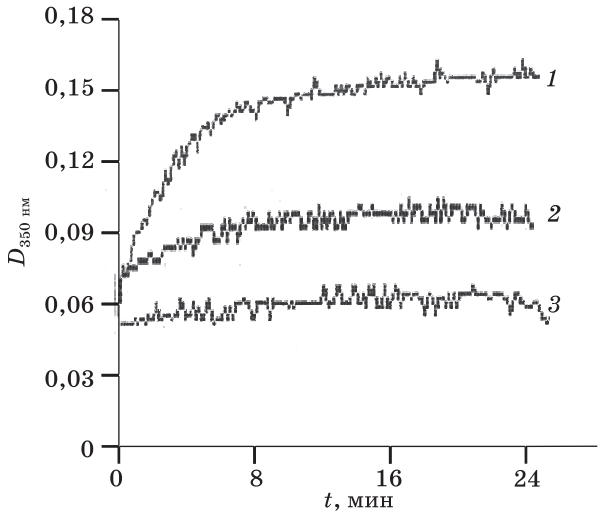

Рис. 4. Кинетика тромбин-индуцируемого свертывания исходного (*1*), обработанного УЗ (25,1 кГц, 48,4 Вт/см^2, скважность 50) в течение 5 мин (*2*) и 30 мин (*3*) фибриногена

Таким образом установлено, что УЗ-обработка фибриногена приводила к образованию агрегатов, характеризующихся потерей тромбин-индуцируемой свертываемости. Скорость гидролиза агрегатов комплексами [плазминоген—урокиназа] или [плазминоген—т-АП] была выше по сравнению с нативным фибриногеном. Предположено, что агрегация, по аналогии с образованием фибрина, сопровождалась конформационными изменениями, приводящими к экспонированию плазминоген-связывающих участков в молекуле фибриногена.

Влияние УЗ на протеолитическую деградацию фибриногена. Следующий этап работы заключался в исследовании эффектов низкочастотного УЗ на фибриногенолиз в системе фибрин(оген)-плазминоген-активатор плазминогена. В качестве активаторов плазминогена были использованы стрептокиназа (СК), урокиназа (УК) и тканевый активатор плазминогена (т-АП).

При совместной УЗ-обработке фибриногена с плазминогеном, фибриногена с т-АП и смеси фибриногена, плазминогена и т-АП, как и в случае предварительной обработки фибриногена, происходило увеличение скорости фибриногенолиза. Статистический анализ показал отсутствие различий в кинетических кривых фибриногенолиза во всех трех случаях. Полученные результаты свидетельствовали о стабилизирующем действии фибриногена на инактивацию т-АП в поле УЗ-кавитации. В свою очередь, при использовании в качестве активатора урокиназы или стрептокиназы УЗ практически не влиял на скорость плазминолиза. Отсутствие эффекта на скорость фибринолиза могло быть связано с нивелированием эффектов УЗ на фибриноген и урокиназу. Следует отметить, что урокиназа, в отличие от т-АП, не образует комплексов с фибрином.

Смесь фибриногена, плазминогена и активатора плазминогена обрабатывали низкочастотным УЗ в течение 10 мин, после чего оставляли для дальнейшего гидролиза при 37 °С в течение 4 ч.

Установлено, что в течение 10 мин как в контрольном (рис. 5, *а*, кривая *1*), так и УЗ-обработанном (рис. 5, *б*, кривая *2*) образце скорость накопления пептидов была одинаковой. Однако сразу после прекращения УЗ-обработки скорость накопления пептидов резко возрастала. Анализ методами ВЭЖХ (рис. 5, *б*) и SDS гель-электрофореза (рис. 5, *в*) показал, что после УЗ-обработки происходил быстрый гидролиз фибриногена, о чем свидетельствовало резкое уменьшение относительного содержания пика на хроматограмме и отсутствие полос, соответствующих нативным цепям фибриногена на электрофореграммах. На основании полученных результатов были рассчитаны начальные скорости накопления пептидов для каждого активатора плазминогена в случаях УЗ-обработки до и после добавления активатора (см. таблицу). Видно, что во всех случаях УЗ-обработка приводила к увеличению скорости гидролиза фибриногена.

Отсутствие значительных изменений скорости реакций протеолиза в зависимости от режима УЗ-обработки свидетельствовало, что основной молекулярной мишенью для действия УЗ являлся фибриноген. Наибольшее увеличение в скорости гидролиза в случае использования УЗ с т-АП объясняется возможностью образования комплексов активатора с фибриногеном за счет экспонирования сайтов полимеризации при действии УЗ (см. таблицу).

Начальные скорости накопления пептидов при гидролизе фибриногена смесью плазминогена с активатором плазминогена

№	Активатор	Начальная скорость протеолиза, 10^{-3} мкмоль/см^3 · мин		
		Контроль	Режим УЗ-обработки	
			До добавления активатора	После добавления активатора
1	Т-АП	0,67	3,1	3,1
2	УК	0,67	2,0	1,8
3	СТК	0,53	0,7	1,1

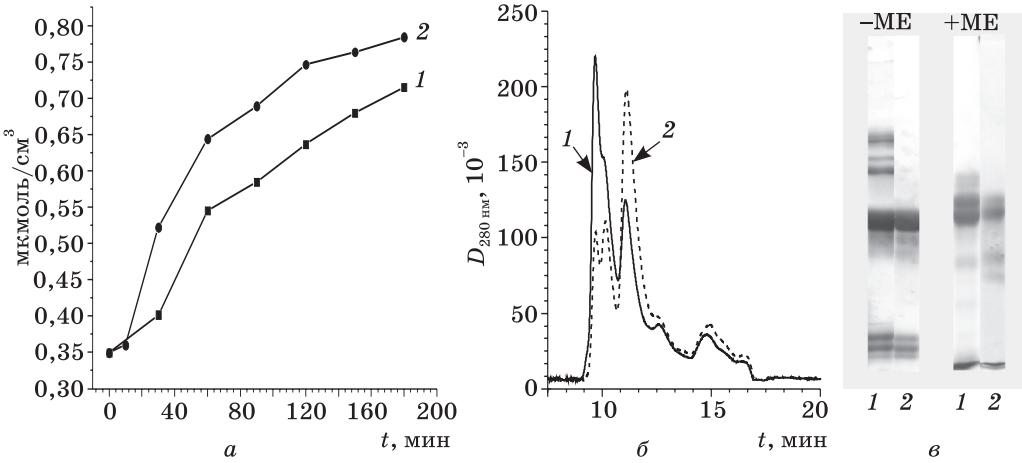

Рис. 5. Кинетика накопления пептидов в процессе гидролиза смеси фибриноген : плазминоген : т-АП (*а*) и результаты анализа проб, полученных через 30 мин гидролиза, методами гель-проникающей хроматографии (*б*) и SDS гель-электрофореза (*в*):
1 — контроль; *2* — смесь, обработанная УЗ в течение 10 мин. ME — 2-меркаптоэтанол

Известно, что в присутствии фибриногена, фибрина и продуктов их деградации происходит образование тройного комплекса: фибрин(оген)—плазминоген — тканевый активатор. При этом для фибрина характерна большая степень увеличения скорости активации за счет экспонирования скрытых в молекуле фибриногена сайтов связывания плазминогена и т-АП [5]. Ранее было установлено, что обработка фибриногена УЗ приводила к образованию ассоциатов с большей молекулярной массой. Можно предположить, что УЗ вызывал конформационные изменения в молекуле фибриногена, приводящие к экспонированию полимеризационных сайтов и, как следствие, сайтов связывания плазминогена и т-АП. Образование комплексов плазминогена и т-АП с фибриногеном препятствовало их инактивации в поле УЗ-кавитации.

Исследовано влияние мощности, скважности и времени УЗ-обработки на скорость фибриногенолиза. Установлено, что обработка УЗ мощностью до 5 Вт/см^2 не влияла на скорость протеолитической деградации фибриногена. Наибольшее увеличение скорости фибриногенолиза наблюдалось в диапазоне мощности 5—15 Вт/см^2 при скважности более 20 % и времени воздействия до 15 мин. Дальнейшее увеличение продолжительности воздействия (более 15 мин) и мощности выше 15 Вт/см^2 лишь в незначительной степени увеличивало скорость гидролиза фибриногена.

Влияние УЗ на протеолитическую деградацию фибрина. Исследовано влияние УЗ на плазменный сгусток. Установлено, что УЗ не приводил к активации плазминовой системы и разрушению ковалентных связей в молекулах фибрина. Основное действие УЗ заключалось в экстракции белков сыворотки крови, находящихся в порах и внутри фибриновых волокон [7]. Для детального изучения механизмов воздействия УЗ на фибринолиз нами была использована модель фибринового сгустка, полученного путем свертывания очищенного препарата ФГ тромбином в присутствии ионов кальция. Исходный препарат ФГ содержал достаточное количество фактора XIII для исчерпывающей ковалентной сшивки мономеров фибрина. Инициирование плазминолиза осуществляли, помещая сгусток в раствор, содержащий ПГ и т-АП. Смесь инкубировали при 37 °С. Анализ восстановленных образцов продуктов гидролиза предварительно обработанного УЗ и контрольного фибриновых сгустков методом SDS гель-электрофореза показал, что в первые 30 мин инкубирования в раствор высвобождались достаточно большие *X* и *Y* фрагменты фибрина и, возможно, их полимерные формы, о чем свидетельствовало наличие на денситограммах пика, соответствующего интактной β-цепи. После 1 ч инкубирования их количество существенно уменьшалось, и уже после 2 ч на денситограммах присутствовали только пики, соответствующие γ'-γ' и β''-цепям фибрина, что говорит о наличии в растворе исключительно *D*-димеров. В свою очередь, гель-электрофорез восстановленных образцов супернатантов, полученных при гидролизе УЗ-обработанного фибрина в присутствии плазминогена и плазминогена с т-АП, показал, что в течение всего времени инкубирования в раствор выделялись не только *D*-димеры, но и ранние продукты протеолитической деградации — *X* и *Y* фрагменты, что подтверждается присутствием на денситограммах проб пика, соответствующего интактной β-цепи фибрина. Полученные данные хорошо согласуются с послойной моделью ферментативного лизиса сгустка в случае проникновения активатора плазминогена внутрь сгустка за счет диффузии [8]. Так, в контрольном эксперименте происходил

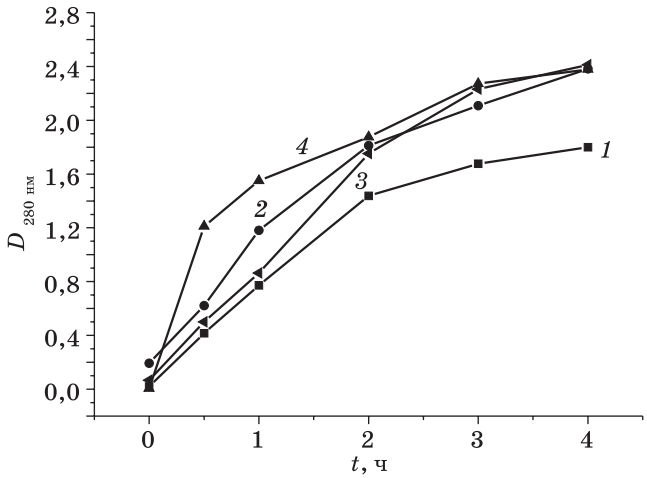

Рис. 6. Кинетика протеолитической деградации фибрина смесью плазминогена с т-АП при различных режимах:
1 — контроль; *2* — предварительное озвучивание фибрина в течение 30 мин; *3* — предварительное озвучивание фибрина с плазминогеном в течение 30 мин; *4* — озвучивание смеси фибрина, плазминогена и т-АП в течение 30 мин

последовательный гидролиз фибрина, и в раствор не высвобождались большие фрагменты фибриновой сети. При УЗ-обработке фибрина ранее было показано изменение структуры сети, приводящее к более глубокому проникновению активатора внутрь сгустка. Можно предположить, что в данном случае протеолиз шел во всем объеме сгустка, и соответственно в раствор высвобождались большие фрагменты полимерной сети. Данные отличия наблюдались и при сравнении лизиса сгустка, индуцированного активатором фибриногена, присутствующим в окружающем буфере с лизисом сгустка, содержащего активатор [9]. Полученные результаты свидетельствовали об увеличении проницаемости активатора плазминогена внутрь сгустка.

Параллельно с анализом проб методом SDS гель-электрофореза процесс фибринолиза контролировали по образованию растворимых пептидов. Как видно из рис. 6, УЗ-обработка увеличивала скорость фибринолиза. При этом предварительная обработка фибрина и фибрина с плазминогеном увеличивала скорость фибринолиза в одинаковой мере. Полученные результаты свидетельствовали о стабилизирующем действии фибрина на инактивацию плазминогена в поле УЗ-кавитации. Аналогичные результаты были получены при изучении влияния УЗ на фибриногенолиз.

В свою очередь, УЗ-обработка фибрина в присутствии плазминогена и т-АП увеличивала скорость фибринолиза в большей степени. Известно, что в присутствии фибриногена, фибрина и продуктов их деградации скорость активации плазминогена т-АП увеличивается за счет образования тройного комплекса: фибрин(оген) — плазминоген — тканевый активатор. При этом для фибрина характерна большая степень увеличения скорости активации за счет экспонирования скрытых в молекуле фибриногена сайтов связывания плазминогена и т-АП [5].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследовано влияние низкочастотного импульсного УЗ на ряд предшественников сериновых протеаз: трипсиноген, химотрипсиноген, плазминоген, протромбин и одноцепочечные формы тканевого активатора плазминогена (т-АП) и урокиназы и их активные формы. Установлено, что УЗ не вызывал разрыва или образования ковалентных связей в белках, а также экспонирования новых, чувствительных к действию различных протеаз, пептидных связей в молекулах проферментов. УЗ-обработка фибриногена приводила к образованию агрегатов, характеризующихся потерей тромбин-индуцируемой свертываемости и увеличению скорости плазминолиза.

Изучено влияние УЗ-обработки на процесс протеолитической деградации фибриногена и фибрина в системах фибрин(оген) — плазминоген — активатор плазминогена. Установлено, что УЗ-обработка сопровождается увеличением скорости гидролиза фибриногена и фибрина при различных режимах добавления активаторов. В условиях совместной УЗ-обработки фибрин(оген)а с плазминогеном, т-АП, а также их смесей показано стабилизирующее действие фибриногена на молекулы данных белков. Максимальная скорость фибринолиза достигалась при УЗ-обработке фибрина в присутствии плазминогена и т-АП.

Таким образом, в настоящей работе оптимизированы режимы УЗ-воздействия и последовательность введения тромболитических ферментов, что позволило минимизировать побочные эффекты акусто-ферментативного лизиса тромбов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Немкович Н. А.*, *Крученок Ю. В.*, *Собчук А. Н.* и др. // Оптика и спектроскопия. 2009. Т. 107, № 2. С. 292—299.

2. *Ovsianko S. L.*, *Chernyavsky E. A.*, *Minchenya V. T.* et al. // Ultrason. Sonochem. 2005. Vol. 12. P. 219—223.

3. *Шкуматов В. М.*, *Адзерихо И. Э.*, *Лесникович Ю. А.*, *Чернявский Е. А.* // Биохимия. 2004. Т. 69, № 2. С. 243—250.

4. *Lind S. E.*, *McDolagh J. R.*, *Smith C. J.* // Blood. 1993. Vol. 82, № 5. P. 1522—1531.

5. *Tachias K.*, *Madison E. L.* // J. Biol. Chem. 1997. Vol. 272, № 1. P. 28—31.

6. *Shacter E.*, *Williams J. A.*, *Levine R. L.* // Free Rad. Biol. Med. 1995. Vol. 18. P. 815—821.

7. *Cherniavsky E. A*, *Adzerikho I. E.*, *Shkumatov V. M.* // Biochemistry (Moscow) Suppl. B: Biomed. Chem. 2009. Vol. 3, № 2. P. 164—171.

8. *Collet J. P.*, *Park D.*, *Lesty C.* // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2000. Vol. 20, № 6. P. 1354—1361.

9. *Komorowicz E.*, *Kolev K.*, *Lerant I.* // Circ. Res. 1998. Vol. 82. P. 1102—1108.

Поступила в редакцию 03.02.2011.