



УДК 577.152.34.042

© 1994 Н. Ф. Казанская

ИНГИБИТОРЫ — ФАКТОРЫ РЕГУЛЯЦИИ ПРОТЕОЛИЗА

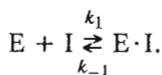
*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
химический факультет*

Ключевые слова: протеиназы; ингибиторы протеиназ, регуляция, медицинское применение.

Кратко рассмотрены функции ингибиторов протеиназ, связанные с их способностью регулировать протеолиз *in vivo*. Приведены аргументы в пользу целесообразности применения ингибиторов как лекарственных средств для терапии некоторых патологических состояний.

Широкое распространение ингибиторов протеиназ в природе объясняется необходимостью защищать белки от протеолитической атаки и регулировать скорость их утилизации. По химической природе ингибиторы протеиназ разделяются на три основные группы: 1) низкомолекулярные соединения, 2) полисахариды, 3) ингибиторы белковой природы. Соединения первой и второй групп нами не рассматриваются, хотя во многих случаях их участие в протеолитических процессах весьма существенно. Достаточно назвать гепарин, хондроитинсульфат, дерматансульфат [1].

Контроль протеолитической активности в организме осуществляется регуляцией синтеза белков, как протеиназ, так и ингибиторов, активацией проферментов и проингибиторов, наличием субстратов и т. д. Наиболее экономичен обратимый процесс взаимодействия ферментов с ингибиторами:



Этот процесс используется чаще других. Обратимость реакций ингибирования придает ему полифункциональный характер, так как равновесие может быть смещено в присутствии соединений, более прочно связывающихся либо с ферментом, либо с ингибитором, т. е. оба компонента могут вступать в другие взаимодействия.

Иллюстрацией такого процесса на физиологическом уровне может служить эксперимент, представленный на рис. 1 [2], где показан результат титрования трипсина сывороткой, содержащей набор протеиназ и ингибиторов, а также чистым α_1 -антитрипсином. В первом случае устанавливается равновесие, при котором трипсин, как специально показано, находится в комплексе с α_2 -макроглобулином и другим ингибитором. Именно наличие дополнительного ингибитора приводит к наблюдаемому снижению ферментативной активности, поскольку трипсин, как и некоторые другие протеиназы, проявляет в комплексе с α_2 -макроглобулином полную каталитическую активность по низкомолекулярному субстрату. Сходные данные получены для плазмина [3] (табл. 1).

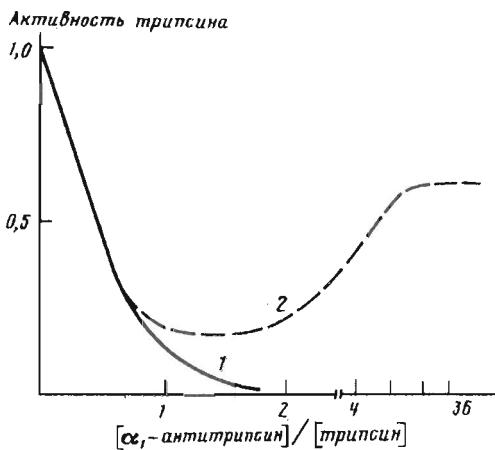


Рис. 1

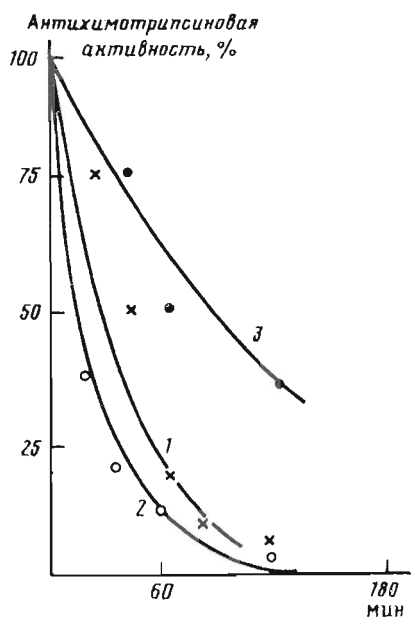


Рис. 2

Рис. 1. Титрование трипсина человека α_1 -антитрипсином (1) и сывороткой крови человека (2) [1]

Рис. 2. Падение антихимотрипсиновой активности в ране, зараженной микроорганизмами, выделяющими нейтральную протеиназу (1), субтилопептидазу-A (2), проназу (3) [8]

Смещение равновесия и установление нового состояния в системе, содержащей трипсин, субстрат и два ингибитора, один из которых связывается прочно, а другой слабо, послужили основой метода определения очень низких значений констант равновесия образования прочных комплексов [4—6]. В этом случае наблюдается весьма характерная кинетическая кривая накопления продукта реакции гидролиза субстрата в системе, содержащей комплекс фермента с прочно связывающимся ингибитором, взятыми в молярном соотношении 1 : 1. С самого начала процесса гидролиза наблюдается ускорение и не представляется возможным зарегистрировать скорость реакции для расчета концентрации фермента по уравнению $dP/dt = k \cdot [E]$. Новое равновесие устанавливается во времени, продолжительность которого зависит от значений констант скорости и равновесия, и тогда может быть вычислена искомая величина и затем истинная константа равновесия.

Гигантская в сравнении с протеиназой молекула α_2 -макроглобулина имеет домены, к которым чувствительны рецепторы клеток печени, что способствует связыванию и последующей деградации образующихся комплексов. Возможно, определенную роль при этом играет протеолитическая активность связанного с макроглобулином фермента.

Различия в скоростях взаимодействия протеиназ с ингибиторами могут приводить к перераспределению фермента. В табл. 2 приведены константы скоростей взаимодействия α_1 -антитрипсина с α -химотрипсином и трипсином. Первый реагирует значительно быстрее, но в образующемся комплексе нарушается нативная конформация фермента и происходит гидролиз связанного фермента протеиназой, оставшейся свободной. В данном случае трипсин разрушает молекулу α -химотрипсина, ингибитор остается неповрежденным и может взаимодействовать с трипсином [7].

Известны случаи разрушения ингибиторов протеиназами. На рис. 2 представ-

Значения кинетических параметров реакции гидролиза низкомолекулярного субстрата плазмином, свободным и связанным с α_2 -макроглобулином, и констант ингибирования фермента [3]

Параметр	Фермент свободный	Фермент в комплексе
$k_{кат}, c^{-1}$	11 ± 1	$6 \pm 0,5$
K_m, mM	$0,13 \pm 0,02$	$0,3 \pm 0,03$
K_i (бензамидин), mM	$0,23 \pm 0,05$	$0,5 \pm 0,02$
K_i (апротинин), усл. ед.	1	1000

Таблица 2

Константы скоростей реакций α_1 -антитрипсина с протеиназами [1]

Фермент	$k, M^{-1} c^{-1}$
Трипсин человека	$1 \cdot 10^4$
» быка	$1 \cdot 10^5$
α -Химотрипсин человека	$1,2 \cdot 10^6$
» быка	$2,6 \cdot 10^6$

лены данные о снижении антихимотрипсиновой активности в ране, зараженной микроорганизмами, выделяющими протеиназы [8]. Бактериальные протеиназы обычно не образуют комплексов с ингибиторами теплокровных животных, наблюдаемое снижение ингибиторной активности в тканях организма обусловлено разрушением белков-ингибиторов.

В работе [9], однако, показано, что имеются защитные механизмы и для ингибиторов. Хотя металлопротеиназа яда змей расщепляет интер- α -ингибитор, образующиеся при этом фрагменты сохраняют способность связывать протеиназы. Это явление более подробно исследовано на примере взаимодействия интер- α -ингибитора с трипсином свиньи [10]. При избытке трипсина из ингибитора образуются два активных фрагмента — HI-14 и HI-30, различающиеся массой и наличием или отсутствием углеводной цепи. Из сыворотки крови выделяют ингибитор с такой же N-концевой аминокислотой, как при обработке ингибитора трипсином *in vitro*. C-Конец ингибитора *in vivo* вариабелен, разные протеиназы расщепляют ингибитор по различным связям, но всегда сохраняется участок, несущий два домена типа ингибитора Кунитца (рис. 3). Подобный результат получили японские исследователи, обнаружившие в моче человека белок с M 6,2 кДа с ингибирующей активностью; аминокислотный состав выделенного белка в значительной степени сходен с составом фрагмента секреторного ингибитора из поджелудочной железы [11].

Рассмотрим некоторые примеры регуляции активности протеиназ ингибиторами. Так, в поддержании нормального состояния кровотока большую роль играет тромбин — протеиназа, которая стимулирует агрегацию тромбоцитов и таким образом участвует в образовании тромбов. Многие стадии тромбообразования регулируются своими ингибиторами [12]. В норме концентрация ингибиторов выше концентрации ферментов каскада свертывания крови. Но, например, скорость ингибирования активатора протромбина, поставляющего в систему тромбин, зависит от концентраций антитромбина, α_1 -антитрипсина и α_2 -макроглобулина, и риск тромбоза повышается при дефиците любого из этих ингибиторов.

Реакции, приводящие к активации плазминогена, также регулируются ингибиторами. Сериновая протеиназа — активатор плазминогена — имеет собственный, быстро связывающийся с ней ингибитор (константа скорости ассоциации

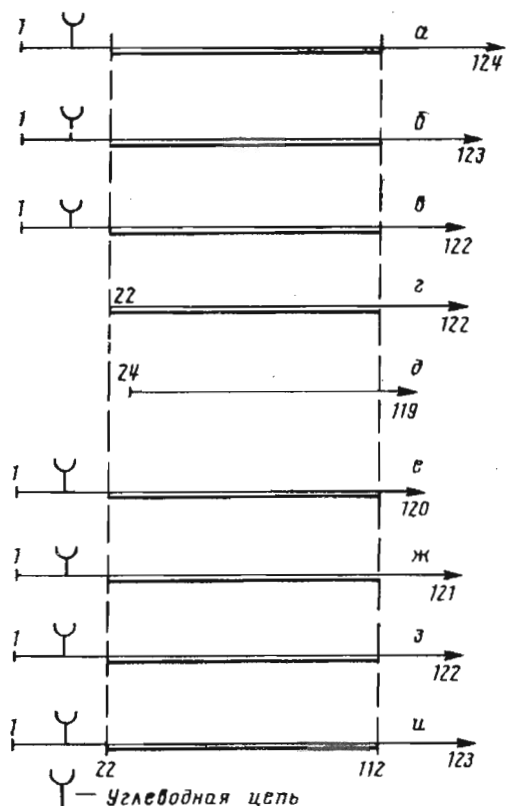


Рис. 3. Сохранение ингибирующих участков (остатки 22—112) интер- α -ингибитора трипсина человека (остатки 1—124) (а) при обработке протеиназами: α — химотрипсином (б), трипсином (в — ограниченный гидролиз), γ — исчерпывающий гидролиз), протеиназой стафилококка (д). е, ж, з — фрагменты, выделенные из мочи, и — из сыворотки

равна $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$). Активатор синтезируется клетками эндотелия в количестве, примерно равном количеству синтезируемого в клетках печени ингибитора. При патологии, связанной со снижением фибринолитической активности плазмы, уровень ингибитора активатора плазминогена повышается и возникает риск инфарктов. Образование ингибитора стимулируется интерлейкинами; наблюдается также инсулинзависимая стимуляция. Особенно сильно ускоряют синтез ингибитора липопротеиды очень низкой плотности [13]. Поэтому важной задачей является определение содержания этого ингибитора, особенно у лиц, страдающих гиперлипидемией.

Отметим еще одну проблему, связанную с недостатком ингибиторов протеиназ. Клетки организма человека исключительно активно связывают активаторы плазминогена ($K_{\text{дис}} 10^{-10} \text{ M}$, число соответствующих рецепторов на клетке около 10^5). Активатор, ассоциированный с клеткой, способен активировать плазминоген. Имеются данные, что опухолевые клетки синтезируют значительно больше активатора плазминогена, чем здоровые, и образующийся на их поверхности (в условиях относительной недостаточности ингибитора) плазмин «расчищает» путь процессу пролиферации и метастазирования [14, 15]. Имеются также данные о том, что сниженный уровень α_1 -антитрипсина у мужчин указывает на серьезный риск хронической пневмонии и заболеваний печени [16].

Скорость реакции ассоциации протеиназы с ингибитором подчиняется уравнению 2-го порядка

$$v = k[E] \cdot [I].$$

Однако *in vivo* могут наблюдаться случаи, когда полупериод реакции ассоциации значительно сокращен в сравнении с ожидаемым (см. табл. 3). Объяснение состоит в том, что концентрации протеиназ и ингибиторов в условиях *in vivo*

Полупериод ($\tau_{1/2}$ с) реакции ассоциации протеиназ с α_2 -макроглобулином в плазме и в экспериментах *in vitro* [17]

Фермент	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
Калликреин	1461	5
Катепсин	9	0,1
Эластаза	0,8	0,01

Таблица 4

Константы ингибирования различных протеиназ апротинином [21]

Фермент	K_i , М
Трипсин быка (коммерческий препарат)	$(1,0 \pm 0,2) \cdot 10^{-10}$
β -Трипсин	$(5,0 \pm 1,5) \cdot 10^{-13}$
Калликреин плазмы человека	$(3,8 \pm 0,6) \cdot 10^{-8}$
Эластаза гранулоцитов человека	$(3,7 \pm 0,5) \cdot 10^{-6}$

значительно превышают расчетные. В связи с этим очень существенными представляются сведения о локальном повышении концентрации пары ингибитор — фермент. Такая ситуация может наблюдаться при интенсивном синтезе в ответ на появление в примембранном объеме одного из компонентов. Быстрому протеканию взаимодействия способствуют также процессы сорбции ингибиторов и протеиназ на специфических поверхностях. Например, тромбин и его ингибитор в адсорбированном на гепарине состоянии реагируют в 250 раз быстрее, чем в свободном [12]. Это не каталитический процесс, сорбция лишь увеличивает вероятность сближения молекул. С другой стороны, сорбция может и предотвратить вступление в «нежелательный» процесс. Так, связанный с фибрином тканевый активатор пламиногена не взаимодействует со своим специфическим ингибитором. В растворе они реагируют очень быстро ($k_1 = 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$), и это происходит даже в присутствии пламиногена, который, сорбиравшись на фибрине, активируется с той же скоростью, что и в растворе [18].

Поскольку развитие неконтролируемого протеолиза является причиной серьезных нарушений в организме, в настоящее время обсуждаются различные способы использования белковых ингибиторов в качестве лекарственных средств. Требования, предъявляемые в этом плане к ингибиторам, просматриваются легко: молекулярная масса их не должна препятствовать их экскреции почками, они не должны вызывать иммунного ответа организма, они должны взаимодействовать с широким набором протеиназ, обнаруживая при этом достаточно высокую аффинность и скорость реакции ассоциации с ферментами. Кроме того, необходим доступный источник для их получения.

Классический ингибитор Кунитца (апротинин) может быть легко получен в высокоочищенном состоянии из поджелудочной железы млекопитающих. Он не проявляет антигенной активности [19, 20], молекулярная масса его невысока (6512 Да). Это исключительно стабильный белок: в его молекуле имеются три дисульфидные связи. Апротинин сохраняет нативную структуру в различных условиях, в отличие от многих ингибиторов он не расщепляется протеиназами крови. Особенно важно, что он имеет широкую специфичность. Несмотря на невысокую константу связывания протеиназ гранулоцитов (табл. 4), он подавляет их активность, снимая воспалительные, шоковые состояния. Апротинин играет определенную роль в процессах коагуляции, снижает размер зоны инфаркта, выравнивает уровень брадикинина.

Для того чтобы ингибитор был эффективен *in vivo*, он должен связывать целевую протеиназу быстро и практически необратимо. Так как основной функ-

цией ингибитора является защита белка-субстрата от протеолиза, оценкой эффективности ингибитора может служить период времени, необходимый для полного торможения протеиназы (t_{99}). Это время вычисляется по уравнению

$$t_{99} = 5/k_1 \cdot [I]_0,$$

где k_1 — константа скорости ассоциации, $[I]_0$ — концентрация ингибитора в терапевтической дозе (она примерно соответствует физиологической концентрации ингибиторов, т. е. около 10^{-6} М) [21].

Степень гидролиза субстрата при этом вычисляется по формуле

$$[P]_{t_{99}}/[S]_0 = k_{кат}/K_m \cdot [E]_0 \cdot t_{99}/5.$$

В случае аprotинина терапевтическая концентрация поддерживается на уровне 20—40 КИЕ/мл (калликреиновая международная единица в 1 мл жидкости), т. е. около 10^{-7} М. Воспользовавшись для расчета значениями констант ингибирования из табл. 4 [21], получим, что при терапии аprotинином острого панкреатита достаточно 5 с, чтобы полностью остановить патологический протеолиз в кровотоке.

Низкая молекулярная масса аprotинина способствует высокой скорости выведения его почками, поэтому терапия проводится путем внутривенной инфузии. Это обстоятельство увеличивает стоимость и усложняет процесс лечения. Нашей группой предприняты исследования в области создания пролонгированных и направленных форм аprotинина [22], а также содержащих аprotинин препаратов для наружного применения. Результаты этих исследований докладывались на III симпозиуме «Химия протеолитических ферментов» и будут опубликованы в журнале «Вопросы медицинской химии» [23].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bikfalvi A., Beress L.//Comp. Biochem. and Physiol. 1987. V. 37B. № 3. P. 435—441.
2. Bieth J., Aubry M., Travis T.//Proteinase Inhibitors./Ed. H. Fritz, H. Tschesche, L. J. Greene, E. Truscheit. Bayer Symposium V, Springer Verlag, 1974. P. 53—62.
3. Cummings H. S., Castellino F. J.//Biochemistry. 1983. V. 23. P. 105—111.
4. Березин Н. В., Казанская Н. Ф., Ларионова Н. И.//Биохимия. 1970. Т. 35. № 2. С. 261—269.
5. Bieth J., Metais P., Warter J.//Clin. chim. acta. 1968. V. 20. № 1. P. 69—80.
6. Hercz A.//Biol. Chem. Hoppe-Seyler's. 1987. B. 368. № 1. S. 77—84.
7. Bloom J. W., Hunter M. J.//J. Biol. Chem. 1978. V. 253. P. 547—559.
8. Kress L. F.//Acta biochim. pol. 1983. V. 30. P. 159—164.
9. Catanese J. J., Kress L. F.//Comp. Biochem. and Physiol. 1985. V. 80B. № 3. P. 507—512.
10. Reisinger P., Hochstrasser K., Albrecht G. Y., Lempert K., Sabrer Ph.//Biol. Chem. Hoppe-Seyler's. 1985. B. 366. S. 479—483.
11. Matsuda K., Ogawa M., Kitahara T., Ishida M., Mori T.//Enzyme. 1985. V. 34. P. 129—139.
12. Cunningham M. T., Nelsestuen G. L.//Biochim. et biophys. acta. 1987. V. 911. P. 56—70.
13. Stiko-Rahm A., Wiman B., Hamsten A., Nilsson J.//Arteriosclerosis. 1990. V. 10. № 6. P. 1067—1073.
14. Duffy M. J., Crady P. O., Devaney L., O'Siosain L., Fennelly J. J., Lijnen H. Y.//Cancer. 1987. V. 62. P. 531—533.
15. Blasi F., Wassali J.-D., Danf K.//J. Cell Biol. 1987. V. 104. P. 801—804.
16. Okumichi T., Nishiki M., Taxasugi S., Toki N., Ezaki H.//Cancer Res. 1984. V. 44. P. 2011—2015.
17. Vira C. D., Travis J.//J. Biol. Chem. 1984. V. 259. P. 8870—8878.
18. Masson C., Angles-Cano E.//Biochem. J. 1988. V. 256. P. 237—244.
19. Yoshida E., Sumi H., Maruyama M., Tsushima H., Matsuoka Y., Sugiki M., Mihara H.//Cancer. 1989. V. 64. № 3. P. 860—869.
20. Verstraete M.//Drugs. 1985. V. 29. P. 236—261.
21. Ларионова Н. И. Нативные и иммобилизованные белковые ингибиторы протеиназ для биомедицинского применения. Дис. ... д-ра хим. наук. М.: МГУ, 1991.

22. Larionova N. I., Mityushina G. V., Kazanskaya N. F., Blidchenko Y. A., Berezin I. V. // *Biol. Chem. Hoppe-Seyler's*. 1985. В. 366. № 7. S. 743—748.
23. Ларионова Н. И., Балабушевич Н. Г., Гладышева И. П., Мороз Н. А., Казанская Н. Ф., Полехина О. В., Донецкий Н. А. // *Вопр. мед. химии*. 1994. В печати.

Поступила в редакцию
6.VII.1993

N. F. Kazanskaya

INHIBITORS AS FACTORS OF PROTEOLYSIS REGULATION

Department of Chemistry, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

Functions of proteinase inhibitors, connected with their ability to normalise proteolysis, are reviewed briefly. Arguments are suggested on favour of using the inhibitors as drugs for treatment of some diseases.