

УДК 612+574/578:599.9

## ТРИПСИНОПОДОБНЫЕ ПРОТЕИНАЗЫ В ФИЗИОЛОГИИ И БИОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

**Михальчук В.Н.**

*Украинский НИИ медицины транспорта, Одесса*

Сериновые протеиназы широко распространены в природе и выполняют самые разнообразные функции. При идентичном механизме действия активного центра сериновые протеиназы (СП) имеют большие отличия в специфичности, которые обусловлены биологической функцией каждого отдельного фермента. СП действуют на физиологических уровнях начиная от внутриклеточного (протеиназы лизосом) до организменного (протеиназы, которые модифицируют нейропептиды). Исследования всего многообразия функций СП дало возможность понять механизмы таких болезней, как панкреатиты, гемофилия, эмфизема, что усовершенствовало теоретический базис для их лечения. СП играют также важную роль в иммунной и гормональной системах и детальное исследование этих специфических СП, несомненно, может дать практические результаты.

Наиболее изученными на сегодняшний день сериновыми протеиназами являются химотрипсин, трипсин и эластаза. Они выделены в чистом виде и интенсивно изучаются на протяжении более чем полувека, что привело к накоплению огромного массива информации, которая имеет как теоретическое, так и осязаемое, практическое значение. Это особенно касается трипсина и химотрипсина, которые получили широкое применение в медицине, фармакологии, легкой и пищевой промышленности, аналитической биохимии и в самых разнообразных отраслях биотехнологии.

Подобно большинству биологически активных белков, СП синтезируются в виде неактивных предшественников (проформ, зимогена). Процесс активации носит характер ограниченного про-

теолиза и сводится к расщеплению небольшого числа пептидных связей (иногда – даже одной) в молекуле белка-предшественника. Ключевое положение в системе активации зимогена поджелудочной железы имеет трипсин, который активизирует все без исключения зимогены поджелудочной железы – химотрипсиногены А, В, С, проэластазу, прокарбокисипептидазы А и В, зимоген фосфолипазы и проформы многих других биологически активных белков. Известно также, что трипсин может активировать проренин и генерировать Анг II из ангиотензиногена [1]. Arakawa и др. [1980] выделили сосудосуживающее вещество из плазмы крови человека, образующееся под действием трипсина, очистили его до гомогенного состояния и доказали его идентичность ангиотензину II .

Сам же трипсиноген может превращаться в трипсин как автокаталитически – под действием трипсина, так и под действием своего физиологического активатора - энтерокиназы (энтеропептидазы, К.Ф.З.21.9), которая осуществляет активацию трипсиногена сока поджелудочной железы при его поступлении в двенадцатиперстную кишку. Если активация энтерокиназой происходит еще тогда, когда панкреатический сок находится в поджелудочной железе, то преждевременно срабатывают все протеолитические и липолитические ее ферменты, из-за чего происходит расщепление структурных компонентов тканей – развивается острый панкреатит. Трипсиноген превращается в трипсин в результате единственного расщепления связи Lys6-Ile 7 и отщепления N-концевого гексапептида (преактивационного пептида). Строение преактивационных пептидов разных организмов достаточно подобно

и характеризуется наличием кластера из четырех аспарагиновых кислот, которые играют роль “ионного замка”, который удерживает профермент в неактивном состоянии. В результате отщепления в молекуле происходят конформационные изменения, что приводит к формированию активного центра фермента.

Особый интерес в изучении протеолитической системы в организме представляют собой трипсиноподобные сериновые протеиназы [2, 3], одной из функций которых является активация как зимогенов, секретлируемых поджелудочной железой, так и других проферментов. Это объясняется способностью трипсина расщеплять пептидные связи, образованные карбоксильными группами основных аминокислот [4, 5, 6].

Трипсин – (КФ 3.4.21.20) - эндогенный протеолитический фермент, разрывающий пептидные связи в молекуле белка. Расщепляет также высокомолекулярные продукты распада белков, полипептиды типа пептонов, а также некоторые низкомолекулярные пептиды, содержащие определенные аминокислоты (аргинин, лизин). В частности, трипсин активизирует следующие зимогены: проэластазу, которая образуется в значительных количествах лейкоцитами и некоторыми линиями клеток карциномы и может играть определенную роль в их миграции, т.к. в активной форме эластазы способна деградировать эластин, коллагены типа III и IV, протеогликаны, т.е. может участвовать в гидролизе межклеточного матрикса при метастазировании [7, 8]; прокарбоксипептидазу А, прокарбоксипептидазу В [9], которые, участвуя в биогенезе гормонов, нейропептидов и других веществ, могут стимулировать ранние этапы развития онкопроцессов в организме [10].

Трипсиноподобные протеиназы, участвуя в лизисе белков внеклеточного матрикса: коллагена, эластина, фибрина, миозина и т. д. тем самым способствуют инвазии и метастазированию опухоли.

Трипсин представляет собой белок с относительной молекулярной массой 21 000. Фермент активен при pH 5,0-8,0 с оптимумом активности при pH 7,0. Образуется в поджелудочной железе млекопитающих, где содержится в виде неактивного трипсиногена; переход последнего в трипсин происходит под влиянием другого фермента - энтерокиназы, а также под воздействием самого образовавшегося трипсина.

Трипсины ряда животных получены в кристаллическом виде (впервые в 1932) [11]. Молекула бычьего трипсина (молекулярная масса около 24000) состоит из 223 аминокислотных остатков, образующих одну полипептидную цепь, и содержит 6 дисульфидных связей; его изоэлектрическая точка лежит при pH 10,8, а оптимум каталитической активности — при pH 7,8-8,0 [12]. С помощью рентгеноструктурного анализа установлена третичная структура трипсина.

Активность трипсина в дуоденальном содержимом впервые была идентифицирована с помощью хромогенного субстрата N-Bz-Arg-pNA (ВАПНА) [13], однако чаще используют другой хромогенный субстрат Bz-Ile-Glu-(i l-0+l- -OR)-Gly-Arg-pNA [14], поскольку ему свойственна большая селективность.

Активность трипсина подавляется фосфорорганическими соединениями, некоторыми металлами, а также рядом высокомолекулярных белковых веществ — ингибиторов трипсина, содержащихся в тканях животных, растений и микроорганизмов [12]. Ионы  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  повышают гидролитическую активность трипсина [15, 16]. Ферменты, аналогичные трипсину млекопитающих, обнаружены у представителей других классов позвоночных, а также у некоторых беспозвоночных, микроорганизмов и в некоторых высших растениях [11]. У человека и ряда млекопитающих обнаружены также так называемые анионные трипсины, напоминающие трипсин по ряду свойств, но с изоэлектрической точкой в более кислой среде (табл.).

Таблица

Содержание трипсиноподобной протеиназы, ее ингибитора, гемагглютинирующей активности и белка в крови белых мышей, зараженных вирусом гриппа A/PR/8/34, (n = 3).

№ п/п	Наименование групп сывороток	Белок	Протеиназа	Ингибитор	ГА
1	2	3	4	5	6
1.	Вирус гриппа	1,660 ± 0,154	2,012 ± 0,198	904,1 ± 88,14	1:8
2.	Сыворотка крови мышей зараженных вирусом гриппа через:				
	15'	1,960 ± 0,191	1,540 ± 0,148	834,0 ± 82,8	1:8
3.	30'	2,000 ± 0,192	1,487 ± 0,137	632,3 ± 61,4	1:4
4.	1 ч	1,940 ± 0,186	1,242 ± 0,119	705,8 ± 69,24	1:2
5.	6 ч	1,840 ± 0,165	1,587 ± 0,139	893,0 ± 86,32	1:4
6.	24 ч	1,580 ± 0,142	1,118 ± 0,111	852,9 ± 82,34	1:8
7.	48 ч	1,000 ± 0,096	1,769 ± 0,163	735,2 ± 71,24	1:4
8.	72 ч	0,800 ± 0,076	1,228 ± 0,114	742,6 ± 72,31	1:4
9.	96 ч	2,120 ± 0,206	0,946 ± 0,092	808,8 ± 79,30	1:2
10.	120 ч	1,700 ± 0,154	2,093 ± 0,192	759,2 ± 74,31	1:2
11.	144 ч	1,160 ± 0,109	2,204 ± 0,197	727,9 ± 71,30	1:2
12.	Нормальная сыворотка крови белых мышей	1,760 ± 0,164	1,920 ± 0,191	727,2 ± 71,42	0,0

ствии некротизированные ткани и фибринозные образования, разжижать вязкие секреты, экссудаты, сгустки крови. [17]. По отношению к здоровым тканям фермент не активен и безопасен в связи с наличием в них ингибиторов трипсина (специфического и неспецифических). Применяют его как вспомогательное средство для облегчения удаления вязких секретов и экссудатов при воспалительных заболеваниях дыхательных путей (трахеиты, бронхиты, бронхоэктатическая

Как видно из таблицы содержание трипсиноподобной протеиназы в организме белых мышей, предварительно зараженных смертельной дозой вируса гриппа А, достигает своего максимума к 5 - 6 суткам после заражения. В этот период происходит гибель животных, т.к. снижается количество  $\pm I-\$ \% I-$  - анти-трипсина - ингибитора трипсиноподобных протеиназ, который мог бы защитить организм от вируса.

Для применения в медицинской практике трипсин получают из поджелудочной железы крупного рогатого скота. Основным лекарственным препаратом является трипсин кристаллический (*Trypsinum crystallisatum*). Этот препарат до-пущен как для местного, так и для парентерального применения. Трипсин амор-фный и химопсин (смесь трипсина с химотрипсином) допускаются только для местного применения [11].

Применение трипсина в медицинской практике основано на его способности, расщеплять при местном воздей-

болезнь, пневмонии, послеоперационный ателектаз легких и др.). В этих случаях препарат применяют для ингаляции (в виде аэрозоля) и внутримышечно. Трипсин вызывает разжижение мокроты и облегчает ее выделение. При экссудативном плеврите и эмпиеме плевры трипсин можно вводить внутривлевро-ально для разжижения экссудата, гноя и облегчения их эвакуации. При туберкулезной эмпиеме следует соблюдать осторожность, учитывая, что рассасывание экссудата может в некоторых случаях способствовать развитию бронхоплевральной фистулы.

В связи с противовоспалительным действием применяют также трипсин кристаллический для внутримышечных инъекций при тромбофлебитах, воспалительно-дистрофических формах пародонтоза, остеомиелите, гайморите, отите и других воспалительных заболеваниях. Прием препарата приводит к уменьшению отека и должен рассматриваться как одно из мероприятий комплексной

терапии этих заболеваний. При тромбозах и флеботромбозах трипсин не заменяет антикоагулянтов. При пародонтозе внутримышечные инъекции рекомендуется сочетать с поднадкостничным введением раствора трипсина в пародонт.

При ирите, иридоциклите, кровоизлияниях в переднюю камеру глаза, отеках окологлазных тканей после операций и травм применяют внутримышечно и местно в виде глазных капель и ванночек.

Для лечения ожогов, пролежней, гнойных ран трипсин применяют местно.

В медицине широко используется электрофорез с протеолитическими ферментами. Такой способ введения позволяет достичь большей продолжительности действия при малой дозе и значительно меньшей концентрации вещества, чем при других методах применения [18].

Успешно используется электрофорез при различных видах иридоциклитов, гифем, эндофтальмитов, хориоретинитов, ретинальных геморрагий, дегенерации сетчатки и атрофии зрительного нерва [19, 20].

Вызванная трипсином активация химотрипсиногена происходит по похожему, хотя и более сложному, механизму. Активация химотрипсиногена А в активный фермент происходит за счет конформационных изменений, вызванных триптическим расщеплением связи Arg15-Ile16. В отличие от трипсина активационный пептид остается в составе молекулы из-за дисульфидной связи, образованной его N-концевым цистеином. Автокаталитическое расщепление ведет к накоплению А-химотрипсина – трехцепочечного белка, прошитого пятью дисульфидными связями.

Специфичность химотрипсина изучена с помощью 39 трипептидов р-NA-содержащих хромогенных субстратов [21]. Приоритетными являются субстраты, содержащие тирозин (MeO-Suc-Arg-Pro-Tyr-p-NA).

Активация проэластазы в эластазу

достаточно подобна активации трипсиногена в трипсин и происходит после триптического отщепления маленького N-концевого пептида. Панкреатические СП после поступления в тонкий кишечник осуществляют гидролиз пептидов, образованных в результате действия пепсина в желудке. Хотя гидролиз осуществляется разными протеиназами по разным аминокислотным остаткам, узкой специфичности эта функция не требует – трипсин, химотрипсин и эластаза, расщепляют пептидные цепи независимо от конформации, если, конечно, те имеют соответствующие аминокислотные остатки, которые подходят к “гидрофобному карману” фермента. Исключение составляют лишь нативные белковые ингибиторы, которые связываются с другим участком межмолекулярного взаимодействия СП.

Наименее изучены являются сериновые протеиназы и их ингибиторы. Между тем, именно они участвуют в сложном взаимодействии организма человека с микромиром. Так, нами показано, что сериновые протеиназы и их ингибиторы находятся как в тканях человеческого организма, так и в вирусах, в частности, гриппа. При этом во взаимодействии вирусов гриппа с организмом человека играет роль как вирусные системы протеолиза, так и те, которые находятся в организме человека, т.е. имеет место взаимодействие на биохимическом уровне. Последнее указывает на общебиологическую роль трипсиноподобных протеиназ и их ингибиторов. Познание биологических и физиологических закономерностей функционирования СП углубит теоретические представления и может привести к значимым практическим результатам.

#### Выводы

1. Трипсиноподобные протеиназы и их ингибиторы составляют систему, которая участвует в реализации многих функций организма.
2. Трипсиноподобные протеиназы и антипротеиназы имеют общебиоло-

гическое значение, участвуя во взаимодействии организма человека с микромиром.

### Литература

1. Arakawa K., Yuki M., Ikeda M. Chemical identity of trypsin with angiotensin. // *Biochem. J.* – 1980. – V. 187. – P. 647-653.
2. Ткачук В. А., Плеханова О. С. Соломатина М. А. и др. Активаторы плазминогена в процессах ангиогенеза и ремоделирования сосудов. // *Вопр. мед. хим.* – 2000. – Т. 46, № 5. – С. 483-484.
3. Краснобрига Э. М. Вплив стрептокінази на активаційну ланку системи фібрінолізу: Автореф. дис...-канд. біол.наук. – Київ. – 2004. – 22 с.
4. Веремеенко К. Н., Голобородько О. П., Кизим А. И. Протеолиз в норме и при патологии. – Киев: Здоровье, 1988. – 200 с.
5. Оглоблина О. Г., Арефьева Т. И. Роль протеолитических ферментов и их ингибиторов в инвазии злокачественных опухолей // *Биохимия.* – 1989. – Т. 59, Вып.3. – С. 340-352.
6. Сологуб Л.И., Пашковская И.С., Антоняк Т.Л. Протеїнази клітин та їх функції. //К.: Наукова думка, 1992. – 194 с.
7. Nozawa F., Hirota M., Okabe A. et al. Elastase activity enhances the adhesion of neutrophil and cancer cells to vascular endothelial cells // *J. Surg. Res.* – 2000. – Vol. 94, № 2. – P. 153-158.
8. Kao R. T., Stem R. Collagenases in human breast carcinoma cells lines // *Cancer Res.* – 1986. – Vol. 46, № 5. – P. 1355-1364.
9. Worowski K. Biologiczne znaczenie ograniczonej proteolizy // *Post. Hig. Med. Dosw.* – 1975. – Vol. 29, № 5. – P. 619-664.
10. Мишин Ю. Б. Влияние ингибитора протеиназ на прививаемость и рост солидной карциномы Эрлиха у мышей // *Вопр. онкол.* – 1982. – № 1. – С. 73-75.
11. Нортроп Д., Кунитц М., Херриотт Р. Кристаллические ферменты, пер. с англ., М.: Наука, 1950.
12. Мосолов В. В. Протеолитические ферменты, М: Наука, 1971. – 414 с.
13. Bergstrom L., Lundh G. Determination of trypsin in duodenal fluid as a test of pancreatic function. A methodological note // *Scand J. Gastroent.* - 1970. – N 5. - P. 533-536.
14. Bergstrom K. Determination of trypsin in duodenal fluid using a new chromogenic substrate and a reaction rate instrument // *LKB Application Note.* - 1976. - P. 211.
15. Антонов В.К. Химия протеолиза. – М.: Наука, 1983. – 367 с.
16. Schwartz, M.K., Fleisher, M. Diagnostic biochemical methods in pancreatic disease // *Adv. Clin. Med.* - 1970. – V. 13. – P. 113-159.
17. Пиментел Дж., Кунрод Дж. Возможности химии сегодня и завтра. Пер. с англ. М.: Мир, 1992. - 288 с.
18. Машковский М.Д. Лекарственные средства. В двух частях. Ч. 1. — 12-е изд., перераб. и доп. —М.: Медицина, 1998. — 736 с.
19. Бедило В.Я. Офтальмологический журнал. - 1966. - № 2. - С. 120- 125.
20. Ершкович И.Г. Офтальмологический журнал. - 1965. - № 7. - С. 515 – 522.
21. Tozser J., Szabo G., Pozsgay M et al. Active center studies on bovine pancreatic chymotrypsin with tripeptidyl-p-nitroanilide substrate // *Acta Bio-chim Biophys Hung.* - 1986. – N 21. - P. 335-348.

### Резюме

ТРИПСИНОПОДІБНІ ПРОТЕЇНАЗИ У ФІЗІОЛОГІЇ ТА БІОЛОГІЇ ЛЮДИНИ

Михальчук В.М.

Дослідження різноманітних функцій серинових протеїназ надало можливість

зрозуміти механізми таких захворювань, як панкреатити, гемофілії, емфіземи, що удосконалило теоретичну основу для їх лікування.

Ферменти, подібні трипсину ссавців, виявлені у представників інших класів хребетних, мікроорганізмів та у деяких вищих рослин. Проникнення вірусу до клітини та його розмноження залежить від розщеплення білка-попередника вірусу трипсиноподібними протеїназами серинового типу.

### Summary

#### TRYPSIN-LIKE PROTEINASES IN A HUMAN'S BIOLOGY AND PHYSIOLOGY

*Mikhailchuck V.M.*

They have investigated the functions of serine proteinases. The results obtained

allowed to understand mechanisms of several diseases, such as pancreatitis, hemophilia, emphysema and improve the theoretical basis for their treatment. In other classes of vertebra, microorganisms and some higher plants they have discovered enzymes typical for trypsin of mammalia. Intervention of viruses in cells and its reproduction depends on splitting of a virus protein – predecessor by trypsin-like proteinases of serine type.

*Впервые поступила в редакцию 23.06.2008 г. Рекомендована к печати на заседании ученого совета НИИ медицины транспорта (протокол № 4 от 27.06.2008 г.).*

УДК 613.656

## КРИТЕРІЇ ОЦІНКИ БІОЛОГІЧНОГО ЗАБРУДНЕННЯ НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА

**Думський В.П.**

*Державний заклад «Санітарно-епідеміологічна станція на Львівській залізниці», Львів, Україна*

Львівська залізниця має могутній рухомий та стаціонарний потенціал, що забезпечує стабільне перевезення пасажирів і різноманітних вантажів. З огляду на те, що вона є прикордонною, зберігається небезпека транскордонного переносу і поширення вірусно-бактеріальних інфекцій і паразитів на територію України, поряд із можливістю забруднення навколишнього середовища. Підтвердженням цього є численні літературні дані про поширення захворювань, зв'язаних із занесенням збудників різними транспортними засобами на великі відстані (1-6).

Санітарна охорона кордонів України ґрунтується на поглибленому вивченні міжнародних торгових, економічних, культурних зв'язків і епідеміологічної обстановки по карантинних і інших природно-осередкових хворобах, як за кордоном, так і в нашій країні, а також можливі шляхи заве-

знення цих хвороб, які пов'язані з міжнародними повітряними, морськими і сухопутними сполученнями (7-9).

З огляду на обсяг і інтенсивність вантажних і пасажирських перевезень різними видами транспорту, безсумнівно, актуально залишається задача санітарної охорони прикордонних територій України.

В даний час санітарно-епідеміологічна ситуація у відношенні інфекційних і паразитарних інфекцій, як у масштабах країни, так і на прикордонних територіях України, залишається дуже напруженою. Інтенсивні перевезення через прикордонні станції, що зв'язують Україну з країнами Європи, Азії, зростають. Як джерела завезення засобами транспорту збудників особливо небезпечних і інших інфекцій несуть загрозу епідемічно небезпечні вантажі, гризуни і їх ектопаразити, худоба, вовна.