

УДК 577.152.344.037:612.82:613.863

КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КАТЕПСИНА D ИЗ БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ПЕРЕНЕСЕННОМ СТРЕССЕ

ЯКУШЕВ В. С., КРИСАНОВА Н. В.

Запорожский государственный медицинский институт

Методом аффинной хроматографии из больших полушарий головного мозга были выделены препараты катепсина D (К.Ф. 3.4.23.5) у здоровых животных и у крыс, перенесших эмоциональный стресс. В опытах *in vitro* установлено, что при перенесенном стрессе увеличивается сродство катепсина D к субстрату. Однако увеличение отношения K_m/V препаратов фермента, выделенных у крыс, перенесших эмоциональный стресс, свидетельствует о том, что протеолитическая функция катепсина D при перенесенном стрессе не реализуется полностью. В работе обсуждается вопрос о регуляторном воздействии на фермент со стороны кальция и cAMP.

В настоящее время известно, что различные виды стрессорного воздействия на организм приводят к изменению активности лизосомного аппарата клетки [1, 2]. Исследуемые факторы воздействия: облучение [3] и локальное охлаждение [4], кратковременная гипотермия [5], ионизирующая радиация [6], эмоционально-болевого стресс [7] приводят к лабильзации лизосомных мембран клеток тканей различных органов и выходу кислых гидролаз в цитозоль клетки, активации протеолиза. Стрессовые воздействия, повышающие функциональную активность лизосомных протеиназ, могут привести к изменению их физико-химических свойств.

Предметом проведенного нами исследования стало изучение кинетических свойств одного из наиболее активных протеолитических ферментов лизосом — катепсина D в больших полушариях мозга при эмоциональном стрессе, который является фактором риска в развитии ряда заболеваний стрессорной природы [1, 8].

Целью работы явилось, во-первых, изучение кинетических свойств катепсина D, выделенного из больших полушарий головного мозга здоровых животных и крыс, перенесших эмоциональный стресс; во-вторых, исследование активности препаратов катепсина D из больших полушарий головного мозга здоровых крыс и перенесших эмоциональный стресс при влиянии *in vitro* регуляторов активности фермента кальция и cAMP.

Материалы и методы

Опыты проводили на 40 крысах линии *Wistar* массой 150—200 г из больших полушарий головного мозга методом аффинной хроматографии выделяли препараты катепсина D. Аффинную хроматографию [6, 9] осуществляли с использованием сорбента гемоглобин-бюгеля-Р300, который синтезировали как описано Руослахти [10]. В качестве лиганда использовали перекристаллизованный бычий сывороточный гемоглобин [11]. Десорбцию фермента с колонки проводили со скоростью 8—10 мл/ч 0,1 М боратым буфером pH 8,6 с 1 М NaCl. Фракции, обладавшие активностью катепсина D, соединяли и диализовали против 0,1 М трис-HCl буфера с pH 7,2. Диализат концентрировали против полиэтиленгликоля ($M_r = 15000$), концентрат разводили 2 мл 0,1 М трис-HCl буфера с pH 7,2. Полученные препараты использовали для дальнейших исследований. Активность фермента определяли по методу Anson [12]. За единицу активности принимали количество фермента, вызывающего прирост экстинкции ТХУ-центрифугата на 1,0 в течение 1 ч [6, 9, 13]. Количественное определение белка проводили по методу Lowry и соавт. [14]. В методе определения эффективной величины K_m и V использовали концентрации гемоглобина 18, 40, 55, 92, 185 мкМ/л. Под эффективной K_m понимали сумму констант гидролиза всех пептидных связей, которые атакуются в составе полипептидных цепей гемоглобина и образуют ТХУ-растворимые продукты гидролиза. При данной заданной концентрации субстрата $[S]$, рассчитывали начальную скорость ферментативной реакции V_i , под которой понимали изменение оптической плотности ТХУ-центрифугата в единицу времени (мин). Затем, имея пары значений $[S]$ и V_i методом Эйзеншталь-Корниша-Бюудена [15] рассчитывали K_m и V .

В определении оптимума pH препаратов катепсина D использовали 50 мМ цитратный буфер в диапазоне 3,0—4,0. При изучении влияния кальция и cAMP на активность препаратов катепсина D из больших полушарий головного мозга использовали $[Ca^{2+}] = 10^{-6}$; 10^{-5} моль/л и $[cAMP] = 10^{-7}$; 10^{-6} моль/л.

Всех животных разделяли на группы: I—интактные животные; II—крысы, подвергнутые стрессу по Desiderato и соавт. [16] (OC); III—крысы, исследованные на 2-е сутки после перенесенного стресса (ПС); IV—животные, исследованные на 7-е сутки после ПС.

Результаты, полученные в работе, обрабатывали статистически.

Результаты и обсуждение

Степень очистки препарата катепсина D из больших полушарий головного мозга здоровых крыс по отношению к гомогенату составила 540. Величина У.А. препарата 59,5 ед/мг, выход по белку относительно гомогената—0,2%. 50%-ное ингибирование активности фермента пепстатином наблюдали при добавлении 0,9 мкг пепстатина в расчете на 1 мкг препарата фермента в 1 мл инкубационной смеси. Полученные данные согласуются с указанными в литературе [6, 17].

Данные по кинетическим свойствам препарата катепсина D из больших полушарий головного мозга интактных и перенесших стресс животных представлены в таблице. Указанные значения K_m и V препарата фермента соответствуют литературным данным [6, 17]. Оптимальный pH препарата фермента, по нашим данным, составляет для интактных животных 3,4. Эти результаты свидетельствуют об адекватности использованных методических подходов, предложенных в ряде работ [6, 9, 17].

Таблица
Константы Михаэлиса (K_m), максимальные скорости ферментативной реакции (V), отношение K_m/V для препаратов катепсина D, выделенных из больших полушарий головного мозга крыс в условиях остро перенесенного стресса ($n=8-10$)

Показатель	Интактные животные	ОС	ПС 2 суток	ПС 7 суток
$K_m \times 10^{-6} \text{ М}$	$37,3 \pm 3,8$	$9,7 \pm 1,8$	$16,8 \pm 2,3$	$13 \pm 1,6$
$V \times 10^{-4} \text{ М} \cdot \text{мин}^{-1}$	$72,4 \pm 2$	$11,3 \pm 0,6$	$10,8 \pm 0,3$	$5,6 \pm 0,2$
$K_m/V \times 10^{-2}$	0,51	0,86	1,55	2,32

Примечание. $p < 0,05$ по отношению к сроку ОС.

Анализ результатов по очистке методом аффинной хроматографии катепсина D из больших полушарий головного мозга крыс, перенесших эмоциональный стресс, дает возможность сопоставить и оценить кинетические свойства полученных препаратов фермента только в указанных условиях эксперимента. Это связано с тем, что степень очистки препаратов катепсина D из больших полушарий головного мозга крыс, перенесших стресс, варьировала от 43 до 97 по отношению к гомогенату. Выход фермента по белку по отношению к гомогенату составлял 0,66—1%. Величина У.А. препаратов фермента примерно на порядок ниже по сравнению с значением, указанным для препарата катепсина D, полученного от интактных животных. В условиях соблюдения аналогии в выполнении методических требований к очистке фермента по каждой серии эксперимента данные факты, возможно, объясняются тем, что при стрессе наблюдается перестройка в лизосомном аппарате клетки (увеличение числа и размеров лизосом) [18] в сочетании с активацией синтеза белков и уменьшением седиментирующей активности катепсина D в головном мозгу [18, 19].

Результаты по K_m свидетельствуют об увеличении сродства фермента к субстрату (гемоглобину) в период после ПС (III и IV группы) при сравнительно близких значениях V . Наиболее показательным является отношение K_m/V , которое при малых концентрациях субстрата является величиной, обратной кажущейся константе скорости взаимодействия субстрата с ферментом [20]; чем меньше отношение, тем быстрее вступает во взаимодействие фермент с субстратом. При ОС (II) отношение K_m/V в 1,4 раза меньше соответствующего значе-

ния для животных III группы, в 1,8 раза меньше соответствующего значения для IV группы. Данные соотношения свидетельствуют о более высоком уровне протеолитической активности катепсина D из больших полушарий головного мозга при остром стрессе по сравнению с постстрессорным периодом.

Именно в острый период стресса в условиях возрастания уровня ПОЛ в головном мозгу, значение которого для процесса активации протеолитических ферментов в клетке доказано [21, 1], возможно, увеличивается сродство катепсина D к нативным растворимым белкам головного мозга [22], к основному белку миелина, β -эндорфину, энкефалинам [23], субстанции P [24], тубулину головного мозга, белкам цитоскелета нейрофиламентов [25]. Постстрессорный период харак-

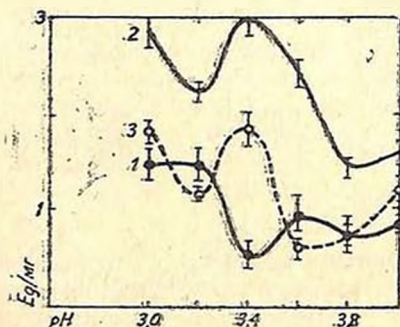


Рис. 1. Оптимум pH препаратов катепсина D из больших полушарий головного мозга, выделенных после перенесенного стресса. 1—острый стресс, 2—перенесенный стресс (2 суток), 3—перенесенный стресс (7 суток).

теризующийся изменением условий нейрогуморальной регуляции [1] по сравнению с ОС, способствует снижению каталитической активности катепсина головного мозга, что подтверждается данными таблицы и результатами авторов [19], полученных при изучении динамики изменения активности фермента в субклеточных фракциях при ОС и после него.

Из рис. 1 следует, что оптимум pH препарата катепсина D из больших полушарий головного мозга крыс, перенесших острый стресс, лежит в диапазоне 3,0–3,2, а оптимум pH препаратов фермента, полученных из головного мозга крыс, подвергнутого исследованию в постстрессорный период (2-е, 7-е сутки) лежит в более широких пределах: 3,0–3,4. В настоящее время считают, что регуляция активности аспарагиновых протеиназ (в том числе и катепсина D) осуществляется в клетке путем изменения pH и концентрации белковых субстратов [26]. Очевидно, что катепсин D из больших полушарий головного мозга крыс в условиях острого эмоционального стресса должен быть более чувствительным к изменению внутриклеточного pH, что действительно имеет место при эмоциональном стрессе [19].

Вместе с тем известно, что при перенесенном стрессе в больших полушариях головного мозга увеличивается содержание ионов кальция и уменьшается концентрация cAMP [27]. Интересно было установить, могут ли данные факторы оказывать влияние на активность

препаратов катепсина D из больших полушарий головного мозга крыс, выделенных в условиях перенесенного стресса.

Данные по изучению влияния Ca^{2+} на препараты катепсина D из больших полушарий головного мозга крыс представлены на рис. 2, а. При изменении концентрации Ca^{2+} от 10^{-6} моль/л до 10^{-5} моль/л наблюдалось значительное ингибирование (от 54 до 87%) активности препарата фермента, полученного от интактных животных. Эти данные противоречат результатам [28], полученным при исследовании препаратов катепсина D из селезенки крыс. Такое противоречие можно было бы объяснить возможным присутствием в полученном нами

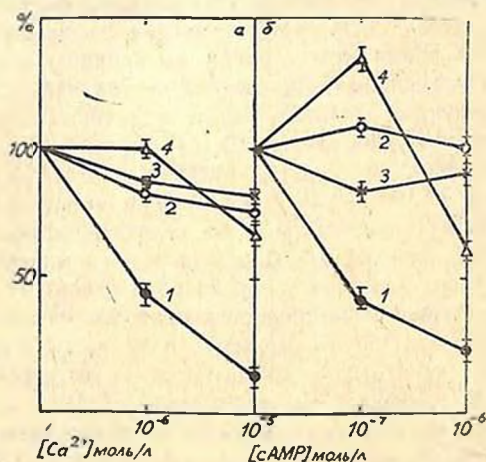


Рис. 2. Влияние кальция (а) и cAMP (б) на активность препаратов катепсина D из больших полушарий головного мозга после перенесенного стресса. 1—интактные животные, 2—острый стресс, 3—перенесенный стресс (2 суток), 4—перенесенный стресс (7 суток)

препарате малых количеств Ca^{2+} -зависимой протеиназы, способной подвергнуть эндогенному протеолизу катепсин D. Однако известно, что оптимум pH Ca^{2+} -зависимых протеиназ (кальпаинов) лежит в области нейтральных и слабо-щелочных значений [29], что позволяет сделать заключение о невозможности такого опосредованного влияния со стороны Ca^{2+} на катепсин D при соблюдении методических условий в проведенной нами работе. Для уточнения полученного эффекта, очевидно, необходимы дополнительные эксперименты.

В то же время, при таких же концентрациях Ca^{2+} активность препаратов катепсина D, выделенных при ОС и после его воздействия, уменьшается незначительно (рис. 2), хотя степень очистки препаратов значительно ниже, и примесь в виде других протеиназ должна быть значительно больше. Возможно, что в реальных условиях избытка кальция в цитозоле при ПС [27] данный фактор не оказывает влияния на неседиментирующую активность катепсина D головного мозга.

Данные по изучению влияния концентраций сАМР (10^{-7} и 10^{-6} моль/л) на препараты катепсина D из больших полушарий головного мозга крыс представлены на рис. 2, б. Изменение концентрации сАМР от 10^{-7} до 10^{-6} моль/л оказывало ингибирующее влияние (от 54 до 72%) на активность препарата фермента, полученного от здоровых животных. Препараты катепсина D, выделенного при ОС и на 2-е сутки после него, фактически не чувствительны к этим же концентрациям сАМР, что подтверждается динамикой изменения активности фермента, выделенного в указанные сроки (рис. 2).

На 7-е сутки после ПС наблюдается парадоксальная ситуация: [сАМР] = 10^{-7} моль/л увеличивает активность фермента на 36%, а [сАМР] = 10^{-6} моль/л уменьшает эту активность на 40%.

В настоящее время исследования по влиянию циклических нуклеотидов на лизосомальный аппарат клеток различных тканей ведутся достаточно интенсивно, однако работ, в которых рассматривается влияние этих веществ на катепсин D, не так уж много, а результаты противоречивы. Так, в работе Watabe, Terada и соавт. [30] изучено влияние сАМР, АМР, АДР, АТР в концентрациях 2 мМ и 10 мМ на активность катепсина D из селезенки быка (в норме) по отношению к БСА при pH 4,6. Для всех указанных нуклеотидов наблюдали увеличение активности препарата фермента, причем концентрация 10 мМ оказывала более выраженное влияние, а [АТР] = 10 мМ увеличила активность фермента в 17 раз. Не доказано влияние циклических нуклеотидов на катепсин D из печени и семенных пузырьков. Было показано, что добавление сАМР к суспензии лизосом оказывает стабилизирующее влияние на лизосомальные мембраны, но угнетает лизосомальную активность катепсина D. Очевидно, что в решении вопроса о влиянии циклических нуклеотидов (даже в норме) на катепсин D важное значение имеют величины используемых концентраций сАМР, характер источника для получения препарата, методическая постановка эксперимента.

Известно, что протеолиз, осуществляемый катепсином D, является первичным звеном распада белков в клетке, после чего в этот процесс включаются катепсины В, Н, L [23]. Полученные нами данные позволяют сделать вывод о том, что каталитическая функция катепсина в больших полушариях головного мозга после перенесенного стресса в целом снижена, что, по нашему мнению, имеет определенное значение в молекулярных механизмах нарушения белкового обмена в структурах головного мозга.

KINETIC PROPERTIES OF CATHEPSIN D FROM CEREBRAL HEMISPHERES OF RATS AFTER EMOTIONAL STRESS

YAKUSHEV B. S., KRISANOVA N. V.

Medical Institute, Zaporozhye

Preparations of Cathepsin D were isolated by affinity chromatography from cerebral hemispheres of healthy rats and rats subjected to

emotional stress. The affinity of Cathepsin D to its substrate increased after stress (K_m of the enzyme decreases). However, the increased K_m/V_{max} ratio characteristic of enzyme preparations isolated from rats subjected to the stress points out that proteolytic properties of Cathepsin D cannot be realized to a full extent after stress. We discuss the regulatory effect of Ca^{2+} and cAMP on Cathepsin D activity.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Паник Л. Е. Биохимические механизмы стресса, Новосибирск, 1983.
2. Розанов А. Я., Трецинюкий А. И., Хмелевский Ю. В. Ферментативные процессы и их коррекция при экстремальных состояниях, Киев, Здоров'я, 1985.
3. Ломакина Л. В., Шугалей В. С. Физиол. журн. СССР, т. 66, № 3, с. 400—403, 1980.
4. Белоусова Е. В., Сандомирский Б. П. Тезисы докл. 2-го Всесоюз. симпозиума «Структура и функции лизосом», с. 27—28, Новосибирск, 1980.
5. Forencikova J., Kolesar J. Allergie und Immunol. № 1, S. 122—128, 1982.
6. Березин В. А., Лоханская Н. И., Рева А. Д., Сенюк В. Н. Укр биохим. журн., т. 53, № 1, с. 54—59, 1981.
7. Меерсон Ф. З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца, М., Медицина, 1984.
8. Wattiax R., Wattiax-De Coninck S. Internat. Rev. Exper. Pathology (eds. Richter G., Epstein M.), N. Y., v. 26, p. 85—107, 1984.
9. Михеев А. А. Роль катепсина D в деградации белков. Автореф. канд. дисс. Киев, 1986.
10. Руослаhti Э. Иммуносорбенты в очистке белков, с. 45—49, М., Медицина, 1979.
11. Доорникова П. Д., Гулый М. Ф., Печенова Т. М., Укр. биохим. журн., т. 38, № 1, с. 100—104, 1966.
12. Anson M. L. J. Gen. Physiol., v. 22, p. 79—89, 1935.
13. Березин В. А., Рева А. Д., Шматченко Н. А., Коробов В. И. Биохимия, т. 44, № 6, с. 1030—1035, 1979.
14. Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1951.
15. Корниш-Бовден Э. Основы ферментативной кинетики, М., Мир, 1, 1979.
16. Desiderato A., Mackinnon I., Hisson H. J. Comp. Physiol. and Psychol., v. 87, № 1, p. 208—214, 1974.
17. Седых Н. И. Катепсин D головного мозга в норме и после рентгеновского облучения. Автореф. канд. дисс., Киев, 1984.
18. Паник Л. Е., Маянская Н. Н. Успехи соврем. биол., т. 92, вып. 1 (4), с. 64—77, 1981.
19. Меерсон Ф. З., Пшеничкова М. Г. Адаптация к стрессорным ситуациям и физическим нагрузкам, М., Медицина, 1988.
20. Диксон М., Узбб Э. Ферменты, т. 1, с. 104—105, М., Мир, 1982.
21. Богданова Е. Д., Каган В. Е., Кулиса И. Я. и др., Иммунология № 2, с. 65—66, 1981.
22. Оганисян А. И., Акопян Т. Н., Геворкян Г. А., Галоян А. А. Биол. журн. Армении, т. 32, № 8, с. 735—740, 1979.
23. Barret A. J. Fed. Proc., v. 39, № 1, p. 9—14, 1980.
24. Акорян Г. Н., Аргутинян А. А., Лаitha H., Galoyan A. A. Neurochem. Res., v. 3, № 1, p. 89—99, 1978.
25. Zuzuki H., Takeda M., Nakamura Y., Kato Y. et al. Neurosci. Lett., v. 89, № 2, p. 240—245, 1988.

26. Kay J., Valler M. J., Duhn B. M. Proteinase Inhibitors: Medical and Biological Aspects (eds. Katunuma N. et al.), p. 201—210, Jap. Sci. Soc. Press., Tokyo, 1983.
27. Якушев В. С., Курипка В. И., Давыдов В. В., Миронова Е. В. Вopr. мед. химии, т. 32, № 6, с. 93—96, 1986.
28. Yamamoto K., Katsuda N., Kato K. J. Eur. Biochem. v. 92, № 2, p. 499—508, 1979.
29. Suruki K., Ohno S., Emori V. et al. Intracellular protein catabolism: Abstracts of the 6th Symp. (eds. Aurich H. et al.), 141, p. 218—219. Haag, 1986.
30. Watake S., Terada A., Ikeda T., Kouryama H. et al. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 89, № 4, p. 1161—1167, 1979.
31. Строев Е. А., Дмитриев А. В., Макарова В. Г. Механизмы регуляции ферментов лизосом. Тезисы докл. V Всесоюзн. биохим. съезда, т. 2, с. 228—229, М., 1986.

Получила 7 V 1990

Neurotransmitters and Epilepsy (Eds. R. S. Fisher and J. T. Goyle), J. Wiley, Chichester, England, 270 p., 1991.

Нейротрансмиттеры и эпилепсия.

Книга имеет двойное назначение. Она предоставляет данные фундаментальных нейронаук клиницистам, желающим ознакомиться с научным обоснованием выбора путей лечения тех или иных заболеваний мозга. С другой стороны, она корректирует работу исследователей, нуждающихся в определенных критериях для точной диагностики наблюдаемой ими картины тех или иных клинических нарушений (например, эпилепсии). Оба рассматриваемых в книге объекта—нейротрансмиттеры и эпилепсия—затрагивают практически все разделы нейронаук, но основное внимание в ней уделяется следующим направлениям: «Вторичные мессенджеры и эпилепсия», «Механизмы антиэпилептического действия лекарственных препаратов», «Глутаматная система и рецепторы NMDA (N-метил-D-аспартата)», «Система ГАМК», «Адреналин, ацетилхолин, серотонин и опиаты». Книга содержит следующие главы: «Клинический обзор эпилепсии», «Механизмы действия рецепторов нейротрансмиттеров», «Возбудимость нейронов: роль систем вторичных мессенджеров», «Эффекторы действия системы вторичных мессенджеров», «Модели эпилепсии у животных», «ГАМК-ергическая функция, связь с феноменом припадков», «Ацетилхолин и эпилепсия», «Роль центральной норадренергической системы в возникновении припадков», «Глутамат и эпилепсия», «Рецепторы NMDA и ионные каналы», «Внеклеточные уровни аминокислот при эпилепсии», «Опиоидные пептиды и припадки», «Нейротрансмиттерные маркеры припадков у человека», «Локализация и количественная характеристика рецепторов нейротрансмиттеров в случае эпилепсии», «Действие антиэпилептических препаратов на рецепторы нейротрансмиттеров и ионные каналы».

Книга является очередным выпуском в серии «Новые области клинических нейронаук» («Frontiers of Clinical Neuroscience», т. 11).