

ПРОТЕОЛІТИЧНО УШКОДЖЕНІ ПОХІДНІ ПЛАЗМІНОГЕНУ ЗА НОВОУТВОРЕНЬ ВЕРХНІХ ДИХАЛЬНИХ ШЛЯХІВ

Ю. Г. КЛИСЬ

ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка,
03127, Київ-127, просп. акад. Глушкова, 2
e-mail: yulya.klys@mail.ru

Невід’ємна ознака запальних та онкологічних захворювань – надмірна активація протеолітичних процесів, що зумовлює виникнення значної кількості протеолітично ушкоджених білків. Утворення цих похідних істотно впливає на перебіг та регуляцію різноманітних фізіологічних процесів. Зокрема, структурно ушкоджені похідні протеолітичних ферментів та їх проформ, що тою чи іншою мірою зберегли гідролітичну дію, здатні до розщеплення інших білків. На відміну від нативного протеолізу, подібна гідролітична дія не є регулярним процесом і відрізняється широкою різноманітністю виниклих білкових фрагментів. Через ту ж структурну неповноцінність ушкоджені протеїнази не піддаються інактивації наявними в кровообігу інгібіторами серпінового ряду. Тому утворення та накопичення в кровообігу фрагментів білків, утворених унаслідок нефункціонального протеолізу, становить вагомий складову патологічного процесу.

Методом ензимофорезу досліджено вміст протеолітичних фрагментів плазміногену в плазмі крові хворих із новоутвореннями ЛОР-органів порівняно до крові здорових осіб. Показано наявність фрагментів, які містять SP-домен та за активації стрептокіназою виявляють фібринолітичну дію. Тобто на додачу до давно відомих крингл-вмісних фрагментів плазміногену (ангіостатинів) доведено утворення фрагментів, які містять гідролітичний центр. Йдеться також про можливу роль продуктів нефункціонального протеолізу за норми та в перебігу патологічного процесу.

Ключові слова: плазміноген, протеоліз, запалення, онкологія.

Вступ. Протеолітичні процеси беруть участь у забезпеченні різноманітних фізіологічних та патофізіологічних процесів. Компоненти протеолітичної системи забезпечують гомеостаз за норми та під час розвитку адаптаційно-захисних реакцій організму. Порушення рівноваги в системі фермент-інгібітор притаманне багатьом запальним та онкологічним захворюванням, за яких відбувається надмірна активація протеїназ, що належить до провідних чинників канцерогенезу (Rakashanda S., 2012; Вовчук І.Л., 2010; Foidart J., Muschel R., 2004). Показано, що злоякісні клітини продукують протеолітичні ферменти, котрі впливають на локальний і системний гемостаз, а безпосередньо забезпечують процеси інвазії та метастазування, а також на взаємодію злоякісних клітин із нормальними прилеглими тканинами (Mc Intyre J., Matrisian L., 2003; Mignatti P., Rifkin D.B., 1993). Згідно з даними літератури та результатів наших власних досліджень, вміст білкових інгібіторів протеїназ у крові зазнає певних змін, однак виснаження інгібіторного потенціалу крові не відбувається (Голобородько О. та ін., 2010; Клись Ю. та ін., 2011; De Clerk Y., Imren S., 1994). Цим зумовлено перспективність досліджень молекулярних механізмів перебігу протеолітичних процесів під час злоякісних

процесів за умов збереження інгібіторного потенціалу крові. Невід’ємною ознакою онкозахворювань є ендогенна інтоксикація, за якої в тканинах та рідинах організму зростає вміст проміжних продуктів обміну речовин та відбувається накопичення продуктів патологічного обміну. До останніх належать нетипові метаболіти, насамперед, низько- та середньомолекулярні пептиди, численні пошкоджені похідні білків) (Клись и др., 2010).

При цьому особливу увагу привертають протеолітичні ферменти системи гемостазу, активність яких зазнає певних змін за норми та патології. Так, основний фермент фібринолітичної системи – плазмін (К.Ф.3.4.21.7) – циркулює в кровотоці у формі неактивного проферменту – плазміногену. Це поліфункціональний білок, задіяний у регуляції численних фізіологічних та патофізіологічних процесів: ремоделюванні тканин, репродукції, ангиогенезі, запаленні, інвазії пухлинних клітин та багатьох інших. Зокрема, за онкологічних захворювань функціонально необумовлена активація плазміногену та гідролітична дія утвореного плазміну становлять ключову ланку патофізіологічного процесу (Айсина Р., Мухаметова Л., 2014).

Плазміноген – одноланцюговий глікопротеїд із молекулярною масою близько 92 кДа. Його активація в плазміногені опосередкована розщепленням пептидного зв'язку Arg₅₆₁-Val₅₆₂ [13]. При цьому утворюються важкий та легкий ланцюги плазміну, з'єднані двома дисульфідними зв'язками. Легкий ланцюг (SP-домен) містить активний центр ферменту. Основу важкого ланцюга становлять п'ять високотомологічних доменів (кринглів). Взаємодія плазміногену з комплементарними білками опосередкована високоспецифічними ділянками зв'язування, основні з яких розміщені у кринглах важкого ланцюга і забезпечують зв'язування плазміногену з фібриновою сіткою та задіяні в активації плазміну. Ці ж ділянки відповідають за швидку інактивацію плазміну, що вивільнився після розщеплення фібрину, білковим інгібітором – α 2-антиплазміном. Вони гарантують сорбцію плазміногену/плазміну на компонентах міжклітинного матриксу та поверхні клітин, що захищає фермент від дії інгібіторів та дає змогу виявляти протеолітичну та активаторну активність у мікрооточенні, не зважаючи на присутність інгібіторів. Рецептори плазміногену виявлені на поверхні багатьох клітин, зокрема – ендотеліальних клітинах, лімфоцитах та моноцитах. Це призводить до формування клітинних поверхонь із широким спектром протеолітичної активності плазміну. Утворення плазміну на поверхні клітин регулюється кількістю ділянок зв'язування плазміногену, які виникають за дії серинових протеїназ на білкові компоненти клітинних мембран (Жерносеков Д. и др., 2012; Verevka S., Grinenko T., 2011). Показано здатність сорбованого лізин-зв'язувальними ділянками плазміну до протеолітичного ушкодження та активації розчинних білків крові, зокрема активацію протромбіну в тромбін та його протеолітичне ушкодження, що виключає або значно обмежує його інгібування наявним у плазмі антитромбіном III (Верьовка С. та ін., 2014). Водночас за онкологічних захворювань відбувається зростання тромбін-подібної амідолітичної активності, при тому, що рівень антитромбіну III не зазнає суттєвих змін (Голобородько О. та ін., 2010; Клись Ю. та ін., 2011).

Із наведених міркувань нами визнано за доцільне дослідити вміст протеолітичних ферментів у плазмі крові за норми та патології методом ензимелектрофорезу, що помагає не

тільки виявити протеолітичні ферменти, але й охарактеризувати їх за молекулярною вагою.

Матеріали та методи. Досліджено плазму крові пацієнтів із захворюванням ЛОР-органів. Доброякісні новоутворення порожнини носа і навколоносових пазух виявлено в 11 пацієнтів, 10 пацієнтів мали передракові захворювання гортані, ще 10 хворих – злоякісні новоутворення гортані або носа та біля носових пазух III стадії, а 5 осіб – II стадії. Контрольну групу становили 6 практично здорових людей (донорів).

Бідну на тромбоцити плазму одержували зі свіжої цитратної крові шляхом центрифугування протягом 20-ти хв. у центрифугі ОПН-8 із частотою обертання 4000 об/хв., заморожували та зберігали до аналізу при -25°C .

Для ідентифікації активних протеолітичних ферментів у плазмі застосовували метод ензимелектрофорезу, який базується на проведенні вертикального електрофорезу у ПААГ, кополімеризованому з фібриногеном у ролі субстрату в концентрації 1 мг/мл (Савчук О.М., 2010). Герметично зібрану камеру заповнювали 12%-відсотковим розділювальним гелем, після закінчення полімеризації якого поверх нашарували 4%-відсотковий концентрувальний гель. Після електрофорезу ДСН видаляли з гелю промиванням у 2,5%-му розчині тритону X-100. Потім гель залишали в 0,05М трис-НСІ буфері рН 7.4 протягом 12 год. Гель забарвлювали Coomassie R-250 упродовж 40 хв. та виявляли зони протеолітичної активності за безбарвними смугами на гелі. Для ідентифікації відповідних ділянок лізису застосовували маркерні білки. Одержані ензімограми переводили в електронний формат за допомогою цифрової камери.

Результати та їх обговорення. Відомо, що плазма крові виявляє досить значні рівні активності за гідролізом протаміну та специфічного для тромбіну синтетичного субстрату Tos-Gly-Pro-Arg-паранітроаніліду, що свідчить про існування латентних, протеолітично ушкоджених форм протеїназ, здатних гідролізувати тільки високоспецифічні субстрати (Клись Ю. и др., 2010). При проведенні ензим-електрофорезу всіх зразків за відсутності активаторів зон протеолізу не виявлено. За наявності ж стрептокінази картина ензим-електрофорезів якісно змінювалася (Рис. 1). Наведено типові ензімофореграми зразків плазми крові хворих зі злоякісними, доброякісними та передраковими новоутвореннями верхніх дихальних шляхів.

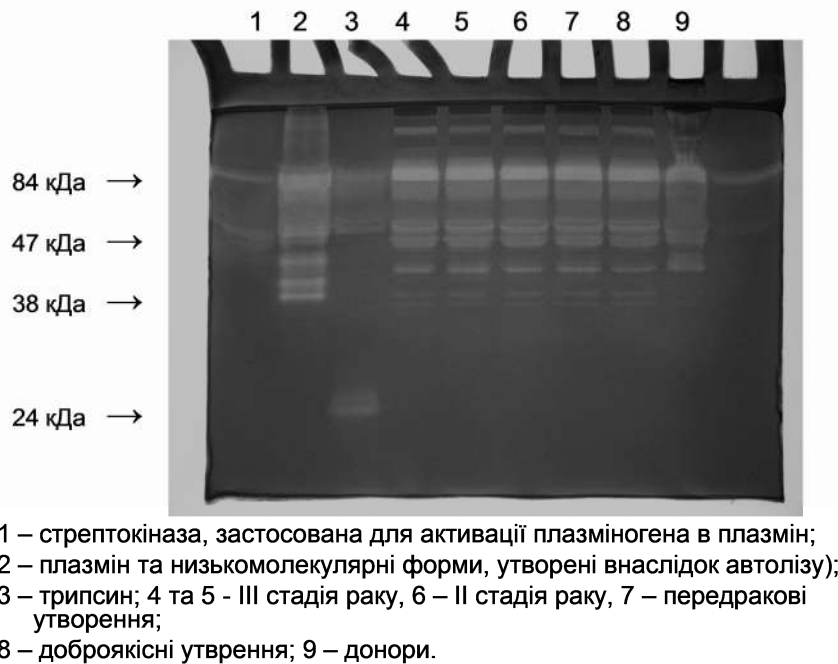


Рис. 1. Ензимелектрофореграми типових зразків плазми хворих на новоутворення верхніх дихальних шляхів порівняно з типовим зразком здорової особи та маркерних білків

Fig. 1. Typical enzyme-electrophoregrams of the blood plasma of patients with tumors of upper respiratory tract in compare to typical to healthy donor and marker proteins

Також представлено типовий зразок плазми здорових осіб, препаратів плазміну, трипсину та стрептокінази, взятих у ролі маркерів молекулярної маси. Як і очікувалося, сама стрептокіназа не виявила протеолітичної дії, оскільки не має ферментативної активності і забезпечує формування активного центру плазміну внаслідок конформаційних перетворень за асоціації з плазміногеном (Voxrud P., Block P., 2000).

На ензімофорезі препарату плазміну виявлено значну кількість низькомолекулярних протеїназ, які утворилися внаслідок деградації схильного до автолізу плазміну. Під час порівняння треків плазм хворих на новоутворення верхніх дихальних шляхів та треків донорів з'ясовано, що низькомолекулярні похідні плазміну зтрапляються як за норми, так і за патології, однак ензімофорези хворих суттєво відрізняються від норми як за кількісним, так і за якісним вмістом низькомолекулярних похідних. Тобто процеси обміну білка за норми також містять утворення деградованих форм плазміногену.

Подібний висновок не є несподіваним, оскільки утворення непротеолітичних фрагментів плазміногену (ангіостатинів) показано як для норми, так для патології, втім відрізняються вони між собою як за кількісним, так і за якісним складом (Wahl M., 2005).

Відомо, що якісні та кількісні відмінності в пептидному складі плазми крові онкологічних хворих мають настільки виражений характер, що можуть слугувати діагностичним показником (Ocak S. et al., 2010). Оскільки в нашому дослідженні за активатор обрано стрептокіназу, то можна однозначно стверджувати про належність виявлених протеолітичних похідних саме до плазміногену/плазміну. Тим самим в даній роботі показано, що розвиток новоутворень пов'язаний із формуванням достатньо значних кількостей протеолітично ушкоджених похідних ферментів системи гемостазу. Тобто за онкологічних захворювань протеолітичного ушкодження зазнають й самі ферменти, що цей протеоліз опосередковують. Отримані експериментальні дані дають змогу зробити такі висновки:

Висновки

1. Показано, що за норми та досліджуваних патологій у крові утворюються SP-вмісні фрагменти плазміногену, здатні виявляти протеолітичну активність після специфічної активації.
2. Виявлено кількісні та якісні відмінності SP-вмісних фрагментів плазміногену, утворених у плазмі крові здорових донорів та хворих на доброякісні, передракові і злоякісні новоутворення верхніх дихальних шляхів.

Список літератури:

1. Айсина Р.Б., Мухаметова Л.И. Структура и функции системы плазминоген/плазмин – Биоорганическая химия. – 2014. – Т. 6. – С. 642–657.
2. Верьовка С.В., Ракша Н.Г., Савчук О.М. Активация для сорбованого плазміну. Моделювання *in vitro* // Науковий вісник Чернівецького університету. Біологічні системи. – 2014. – Т.6, № 1. – С.16–19.
3. Вовчук И.Л. Роль сериновых протеиназ и их эндогенных ингибиторов при неопластической трансформации / Вовчук И.Л. // Лабораторна діагностика. – 2010. – Т. 4 (54). – С. 52–59.
4. Голобородько О.П., Кизим О.Й., Клись Ю.Г., Верьовка С.В., Зайцева Н.В., Кікоть Ю.В., Савченко Т.Д. Дослідження компонентів протеолітичної, коагуляційної та фібринолітичної систем плазми крові пацієнтів з різною патологією ЛОР-органів // Журн. вушних, носових і горлових хвороб. – 2010. – № 5. – С.34–39.
5. Жерносеков Д.Д., Юсова Е.И., Гриненко Т.В. Роль плазминоген/плазмина в функционировании клеток крови // Укр. біохім. журн. – 2012. – Т.84, № 4. – С. 5-19.
6. Клись Ю.Г., Кизим О.Й., Голобородько О.П., Зайцева Н.В., Кікоть Ю.В., Савченко Т.Д., Верьовка С.В. Скринінг показників гемостатичної системи як можливих первинних маркерів онкогенезу // Лаб. діагн. – 2011. – 2 (56). – С.20–25.
7. Клись Ю.Г., Зайцева Н.В., Кизим А.И., Веревка С.В. Протеолитические производные плазминогена при развитии злокачественных новообразований // Онкология. – 2010. – Т. 12, № 1. – С. 17-21.
8. Савчук О. М. Вивчення білок-білкових взаємодій у системі гемостазу з використанням методу ензимелектрофорезу // Медична хімія. – 2010. – Т. 12, №1. – С. 60–67.
9. Boxrud P., Block P. Streptokinase binds preferentially to the extended conformations of plasminogen through lysine binding sites and catalytic domain interactions // Biochemistry. – 2000. – Vol.39, № 45. – P. 13974-13981.
10. De Clerk Y., Imren S. Protease inhibitors: role and potential therapeutic use in human cancer // Eur.J.Cancer. – 1994. – 30A.- № 14. – P. 2170-2180.
11. Foidart J.-M. Proteases and their inhibitors in cancer metastasis / Foidart J.-M., Muschel R.// Kluwer Academic Publishers, New York 2004. – 263 p.
12. Mc Intyre J., Matrisian L. Molecular imaging of proteolytic activity in cancer // J. Cell. Biochem. – 2003. – Vol.90, № 6. – P.1087-1097.
13. Mignatti P., Rifkin D.B. Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion // Physiol.Rev. – 1993. – Vol.73, №1. – P. 161-195.
14. Ocak S., Stuart S., Ausborn J., Friedman D., Massion P. Identification of membrane-associated proteins as a new candidate biomarkers of small-cell lung cancer // Abstracts of 20th ERS Annual Congress. Barcelona, Spain, 18-22 september 2010, № 1944 // Eur. Respiratory Journ. – 2010. – 36, Suppl. 54
15. Rakashanda S., Rana F., Rafiq S. Role of proteases in cancer: A review // Biotechnology and Molecular Biology Review. – 2012. – Vol. 7, № 4. – P. 90-101.
16. Verevka S.V., Grinenko T.V. Pseudo-functional interactions of plasminogen: molecular mechanisms and pathologic appearance / in: Advances in Medicine and Biology (Berhardt L.V., Ed.), NY- Nova Science Publishers, – 2011, Vol. 34. – P.35-62.
17. Wahl M., Kenan D., Gonzalez-Gronow M, Pizzo S. Angiostatin's molecular mechanism: aspects of specificity and regulations elucidated // J. Cell. Biochem. – 2005. - Vol. 96, P. 242-261.

References:

1. Aisina R. B. and Mukhametova L. I. Structure and functions of plasminogen/plasmin system // Bioorganic chemistry. – 2014. – Vol. 6. – P.642-657.
2. Verevka S. V., Raksha N. G., Savchuk A. N. Activation effect of the sorbed plasmin. Modelling in vitro // Biological systems. – 2014. - Vol. 6, Is. 1. – P. 16-19.
3. Vovchuk I.L. Role of serinic proteinases and their endogenous inhibitors at neoplastic transformation // Lab. diagn. – 2010. – Vol. 4 (54). – P. 52-59.
4. Goloborod'ko O.P., Kizim A.I., Klys' Yu.G., Verevka S.V., Zayceva N.V., Kikot' Yu.V., Savchenko T.D. // The investigation of proteolytic, coagulation and fibrinolytic systems of blood plasma patients with different ENT-pathology. // Zhurnal vushnych, nosovyh i gorlovyh chvorob – 2010. - № 5. – P.34-39.
5. Zhernossekov D. D., Yusova E. I., T. V. Grinenko Role of plasminogen/plasmin in functional activity of blood cells // Ukrainian biochemical journal – 2012. – V.84, № 4. – P. 5-19.
6. Klys' Yu.G., Kizim A.I., Goloborod'ko O.P. Zayceva N.V., Kikot' Yu.V., Savchenko T.D., Verevka S.V. Indices of haemostatic system as possible primary oncogenic markers // Lab. diagn. – 2011. – 2 (56). – P.20-25.
7. Y.G. Klys', N.V. Zajtseva, A.I. Kizim, S.V. Verevka Proteolytic derivatives of plasminogen as a factor in malignancy development // Oncology. – 2010. – Vol. 12, № 1. – P. 17-21.
8. Savchuk E. M. Study of protein-protein interactions in hemostasis system using the method of enzyme-electrophoresis // Medical chemistry. – 2010. – Vol. 12, №1. – P. 60–67
9. Boxrud P., Block P. Streptokinase binds preferentially to the extended conformations of plasminogen through lysine binding sites and catalytic domain interactions // Biochemistry. – 2000. – Vol.39, № 45. – P. 13974-13981.
10. De Clerk Y., Imren S. Protease inhibitors: role and potential therapeutic use in human cancer // Eur.J.Cancer. – 1994. – 30A.- № 14. – P. 2170-2180.
11. Foidart J.-M. Proteases and their inhibitors in cancer metastasis / Foidart J.-M., Muschel R.// Kluwer Academic Publishers, New York 2004. – 263 p.
12. Mc Intyre J., Matrisian L. Molecular imaging of proteolytic activity in cancer // J. Cell. Biochem. – 2003. – Vol.90, № 6. – P.1087-1097.

13. Mignatti P., Rifkin D.B. Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion // *Physiol.Rev.* – 1993. – Vol.73, №1. – P. 161-195.
14. Ocak S., Stuart S., Ausborn J., Friedman D., Massion P. Identification of membrane-associated proteins as a new candidate biomarkers of small-cell lung cancer // *Abstracts of 20th ERS Annual Congress. Barcelona, Spain, 18-22 september 2010, № 1944* // *Eur. Respiratory Journ.* – 2010. – 36, Suppl. 54
15. Rakashanda S., Rana F., Rafiq S. Role of proteases in cancer: A review // *Biotechnology and Molecular Biology Review.* – 2012. – Vol. 7, № 4. – P. 90-101.
16. Verevka S.V., Grinenko T.V. Pseudo-functional interactions of plasminogen: molecular mechanisms and pathologic appearance / in: *Advances in Medicine and Biology* (Berhardt L.V., Ed.), NY- Nova Science Publishers, – 2011, Vol. 34. – P.35-62.
17. Wahl M., Kenan D., Gonzalez-Gronow M, Pizzo S. Angiostatin's molecular mechanism: aspects of specificity and regulations elucidated // *J. Cell. Biochem.* – 2005. - Vol. 96, P. 242-261.

PROTEOLYTICALLY ALTERED DERIVATIVES OF PLASMINOGEN AT TUMORS OF UPPER RESPIRATORY TRACT

Yu. G. Klys'

The excessive activation of proteolytic processes is an integral feature of inflammation and cancer. This process leads to the formation of a significant amount of proteolytically damaged proteins. The formation of such derivatives affects noticeably on the course of various physiological processes. In particular, structurally damaged proteolytic enzymes and their pro-forms keep some part of their hydrolytic action and capacity for splitting of other proteins. Contrary to the native proteolysis, such hydrolytic action is not a regular process and lead to generation of the wide variety of proteins' fragments. Because of their structural imperfection, damaged proteases are not subjected to the inactivation by serpin-family inhibitors from blood circulation. On these reasons the formation and accumulation of such protein fragments poses an important component in the pathology.

The examples of blood plasma of patients with tumors of the upper respiratory tract and healthy donors were studied by the method of enzyme-phoresis. The existence of SP-domain containing fragments, that at streptokinase activation exhibit fibrinolytic activity, was proved. Formation of such derivatives is the reasonable addition to the formation of well-known kringle-containing fragments of plasminogen (angiostatins). The possible role of such fragments and their possible role in pathologic process are discussed.

Key words: plasminogen, proteolysis, inflammatory, oncology.

Одержано редколлегією 22.04.2016