

ФУНКЦИЯ МОЛЕКУЛЫ СТРЕПТОКИНАЗЫ И НЕОБЫЧНЫЕ ФЕНОМЕНЫ ПРОТЕОЛИЗА

В.Н. Никандров, Н.С. Пыжова

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии Минздрава Республики Беларусь,

Институт физиологии НАН Беларуси, Беларусь

40 лет назад, в 1975 году в Минске, тогда в Белорусском НИИ эпидемиологии и микробиологии Минздрава БССР по заданию ГКНТ СССР по науке и технике была начата разработка отечественного лечебного препарата стрептокиназы (сильнейшего активатора плазминогена – препарата тромболитического действия) для внутрисосудистого применения, названного «целиазой», создание и освоение производства которого были реализованы в период 1975–1984 годы. На первом этапе работ эти изыскания имели чисто прикладной характер. Однако довольно быстро стало ясно, что без раскрытия метаболических особенностей продуцента и структурно-функциональной специфики молекулы стрептокиназы разработка препарата не будет иметь перспективы.

Результаты работ позволили описать несколько необычных феноменов, прежде всего, **кислородзависимый протеолиз**, представления о котором основаны на следующих результатах:

- активация плазминогена (Pg) стрептокиназой (СК) блокируется перехватчиками супероксидного радикала ($O_2^{\cdot-}$) – следовательно, она зависит от этого радикала;
- Pg человека, кролика (но не быка) способен генерировать активные формы кислорода в т.ч. и такой радикал;
- СК обладает $O_2^{\cdot-}$ -конвергирующей способностью в модельных системах образования $O_2^{\cdot-}$;
- Pg человека можно превратить в активную протеиназу при обработке источниками активных форм кислорода в отсутствие СК.

В дальнейшем была также продемонстрирована активация зимогенов других протеиназ: трипсиногена, α -химотрипсиногена А, пепсиногена при обработке их источниками активных форм кислорода. Практически во всех случаях H_2O_2 -индуцируемую активацию перечисленных зимогенов эффективно ингибировал перехватчик $O_2^{\cdot-}$ – нитротетразолиевый синий (NBT).

Именно NBT полностью подавлял активность плазмина, папаина, пепсина, металлопротеиназы *Staphylococcus aureus* и умеренно угнетал также активность урокиназы, субтилизина, металлопротеиназ *Bacillus megaterium* и змеиного яда. Действие этого перехватчика на активность трипсина и α -химотрипсина проявлялось в условиях лабилизации структуры протеиназ 8 М мочевиной. Это наводит на мысль о достаточно сложных внутримолекулярных путях участия супероксидного радикала в протеолизе и наличии неких «обходных» реакций. Остаются неясными пути конкретного участия супероксидного радикала в расщеплении целевой пептидной связи.

Дополнительно обнаруженная способность зимогенов и протеиназ генерировать в водно-солевом растворе активные формы кислорода и наличие у протеиназ небольшой $O_2^{\cdot-}$ -конвергирующей способности позволили сформулировать гипотезу **кислородзависимого протеолиза**, сущность которой состоит в том, что активация зимогенов протеиназ и реализация каталитической функции последних обусловлены прямым участием собственных генерируемых этими белками активных форм кислорода.

Оказалось, что как раз при участии кислородзависимого протеолиза происходит аутоактивация вируса гриппа. Предлагаемая концепция также позволяет наметить пути создания нетрадиционных ингибиторов протеолиза, которые не являются псевдосубстратами пептидной природы.

Исходя из указанной гипотезы, были проведены исследования широкого плана и выявлены следующие аспекты:

- принципиально новые функциональные свойства (в т.ч. в отношении протеолитических реакций) белков регуляторного типа: фактора роста нервов и его α -, β - и γ -субъединиц, дифтерийного токсина, белков-ингибиторов протеолиза (соевого ингибитора

трипсина– SBTI, овомукоида – OM, овоингибитора – OI). Была сформулирована гипотеза о реализации биологического действия белков регуляторного типа за счет многопланового арсенала собственных функциональных возможностей его молекулы. Выдвинута идея о существовании нескольких типов активируемых рецепторов, активация которых возможна разнообразными путями: протеолитическим, действием активных форм кислорода или продуктов их трансформации, эндонуклеазным и т.д.;

– раскрыт ряд ранее неизвестных особенностей специфики протеолитических систем возбудителя дифтерии (судя по расщеплению пяти белков субстратов и ингибиторному анализу, в оптимальных для токсиногенеза условиях происходит перестройка внутриклеточной системы реакций протеолиза) и патогенных для человека штаммов псевдомонад (синегнойной палочки), предложены способы подавления активности внеклеточных протеиназ этих микроорганизмов;

– в 1989–2012 годы в лаборатории регуляторных белков и пептидов Института физиологии НАН Беларуси велись многоплановые исследования роли компонентов (Pg и SK) и реакций перикеллюлярного протеолиза в жизнедеятельности клеток нервной ткани. Впервые доказаны трофическое и протекторное действие Pg и SK на клетки нервной ткани при повреждающем действии H_2O_2 , NH_4^+ , глутамата, дефиците белков в питательной среде, резком охлаждении, обезвоживании и избыточной гидратации клеток осмотического и токсического характера и предложены принципиально новые методы культивирования клеток нервной ткани на дефицитных по содержанию белков питательных средах, а также дано экспериментально-теоретическое обоснование применения лечебных препаратов Pg и SK по новому назначению – при патологии нервной системы.

В научных трудах этого времени изложены также следующие ранее неизвестные результаты:

– впервые описаны феномены АТФ-ингибируемых протеолитических реакций (1987), фосфатного эффекта в протеолизе (1996);

– впервые описаны способность молекул Pg и SK образовывать достаточно устойчивые комплексы с ферментами углеводно-энергетического обмена, структурно-функциональные особенности этих комплексов (1997), а также принципиально новые функциональные свойства молекул стрептолизина O (1993), дифтерийного токсина (1999), фактора роста нервов (2000), пиоцианина и пиовердина патогенных псевдомонад (2007);

Кратковременная (20 мин) экспозиция клеток феохромоцитомы PC12 с SK в концентрации 10^{-8} M ведет к явному метаболическому эффекту: существенному изменению уровня внутриклеточного протеолиза. Между тем, SK – ксеногенный белок для млекопитающих, и теоретически на мембранах их клеток вряд ли возможны специфические белки рецепторы. Однако нет никаких препятствий к выполнению этой функции молекулами ферментов углеводно-энергетического метаболизма, встроенными в мембрану.

Исходя из проявления каталитических свойств рядом регуляторных белков, а также структурно-функциональной специфики комплексов Pg (SK), мы полагаем, что прионовый агент PrP^{Sc} должен иметь собственный «инструмент агрессии», который и позволяет ему переводить популяцию «нормальных» молекул PrP^C в патогенную конформацию PrP^{Sc}. Этим инструментом должен быть каталитический центр и, весьма вероятно, именно протеолитический.

Раскрытие механизмов кратко перечисленных эффектов составляет, образно выражаясь, конгломерат частных сложных задач, решение которых требует в дальнейшем проведения широкого фронта многоплановых исследований специалистами различного профиля.