УДК 577.151.042 : 577.334

НЕТРИВИАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ПРОТЕОЛИЗА

Никандров В.Н., Пыжова Н.С.
Институт физиологии НАН Беларуси, НИИ эпидемиологии и микробиологии Минздрава Республики Беларусь

Реакции протеолиза играют важную роль в реализации функции клеток, тканей, организма в целом (гистогенез, овуляция, имплантация яйцеклетки, пищеварение, свертывание крови и т.д.) и генезисе ряда патологических процессов (воспаление, малигнизация и метастазирование опухолей, инвазия в организм патогенной биосубстанции, дегенерация ряда клеток и тканей, иммунопатологические нарушения и ряд других). Однако, механизмы регуляции протеолитических реакций на молекулярном и клеточном уровнях все еще далеки от полной ясности.

Нами обнаружена зависимость активации плазминогена (Pg) – предшественника сериновой протеиназы плазмина (ЕС 3.4.21.7) стрептокиназой (SK, белком β-гемолитических стрептококков группы С), от образования в системе супероксидного радикала (O_2^-) Pgом и конверсии его SKой, что, по-видимому, сопряжено с дестабилизацией и последующим расщеплением пептидной связи в зимогене [1]. Учитывая это, а также частичную активацию Pg источниками активных форм кислорода (H_2O_2, системами генерирования O_2^--радикала, ионами Fe^{2+}), наличие атома Fe в молекулах Pg и стрептокиназы, мы выдвинули положение о кислородзависимом пути активации Pg, реализующемся без участия специфических Pg-активаторов протеиназного характера вследствие O_2^--генерирующей способности зимогена и последующей конверсии радикала [1,2]. Принципиальная возможность реализации такого механизма была продемонстрирована в экспериментах с фракциями (ядерной, тяжелых мембран, митохондриальной) гомогенатов мозга и печени мышей при добавках субстратов окисления – НАДН [3] или цитрата.

Оказалось, что активность протеиназ, различающихся по структуре, специфичности, типу катализа, подавляется веществами-перехватчиками O_2^--радикала, что зимогены трипсиноген, химотрипсиноген, пепсиноген могут быть частично активированы при обработке указанными выше источниками активных форм кислорода, что трипсиноген, трипсин, пепсин, папаин способны медленно генерировать эти формы в растворе и что трипсин и пепсин обладают определенной O_2^--конвергирующей способностью. Обобщение всех этих результатов позволило сформулировать гипотезу кислородзависимых реакций протеолиза, суть которой заключается в том, что аутоактивация зимогенов протеиназ и каталитическая функция этих энзимов реализуются при участии собственных для данных белков, эндогенных активных форм кислорода [4,5].

Последующая разработка этой авторской концепции привела к нескольким «ответвлениям». Так, обнаружена способность Pg и SK образовывать устойчивые эквимолярные комплексы с тканевыми энзимами (лактат- и малатдегидрогеназами, каталазой, пируваткиназой), описаны параметры взаимодействия белков, устойчивости комплексов, характер изменений вторичной и третичной структур и функциональных свойств белков в составе комплексов [5].

С 1999 года в Институте физиологии НАН Беларуси на основе описанных выше свойств Pg и SK ведутся комплексные исследования их влияния на структуру, функциональные и метаболические особенности клеток нервной ткани с использованием органных и первичнодиссоциированных культур симпатических и чувствительных ганглиев, коры головного мозга, перевиваемых культур глиомы С6 и феохромоцитомы РС12 [6]. Установлен сложный характер изменений, зависящих от концентрации исследуемого белка, экспозиции и типа клеток и предполагающих регуляторную триггерного типа роль данных компонентов протеолиза в жизнедеятельности клеток.

У белков регуляторного типа (стрептолизина О, дифтерийного токсина, фактора роста нервов - NGF, ингибиторов протеиназ, интерлейкина-1β) найдены способность воздействовать на реакции протеолиза (в ряде случаев показаны наличие собственной протеиназной и/или п-Pg-активаторной способности), генерирования и трансформации активных форм кислорода, эндонуклеазная активность. Это позволило высказать идею о «возбуждении» метаботропного рецептора белком лигандом из-за конформационной перестройки не только за счет физического контакта комплементарных центров рецептора и лиганда, но и прямой химической «атаки» рецептора лигандом [7].

В 1987 году было обнаружено специфическое подавление Pg-активаторной функции SK АТФом и 3,5-АМФ: процесс угнетался на 50% при концентрации нуклеотидов, приближающейся к 0,1М [8]. Другие нуклеотиды (АДФ, АМФ, 2,3-АМФ, ГТФ, УТФ, ЦТФ) эффекта не дали. При изучении протеиназ гриба Arthrobothrys longa – "лонголитин" оказалось, что его фибринолитическая активность на 75% угнеталась в присутствии АТФ (0,01М) [9]. Это также достаточно высокая концентрация АТФ. Однако исследования Pg-активаторной способности β- и γ-субъединиц NGF показали, что эффективная концентрация нуклеотидов может находиться в пределах 0,0001М. Так, АТФ подавлял Pg-активаторную способность при концентрации 0,001М на 30% в случае γ-субъединицы и на 60% у β-NGF. Увеличение концентрации нуклеотида до 0,01М вело к угнетению активности на 50% и 100% соответственно. АДФ практически не влиял на функцию γ-субъединицы, но при концентрации 0,01М подав-лял таковую β-NGF на 25%. АМФР (0,0001-0,01М) увеличивал активность обеих субъединиц NGF на 20-25%. Отличительной особенно-

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

стью от выше упомянутых белков является также подавление активаторной функции β(но не γ)-субъединицы добавками ГТФ: при концентрациях 0,0001М, 0,001М и 0,01М на 20%, 55% и 100%, а ГДФ действовал даже несколько сильнее [10]. Фибриногенолитическая активность разрушенных клеток Corynebac-terium diphtheriae шт. PW-8, выращенных на бульоне Лингуда с сывороткой крови, подавлялась на 45%, 20%, 35% и 30% под действием соответственно АТФ, АДФ, АМФ и ГТФ в концентрации 0,01М [10].

На модели активации зимогенов протеиназ, протеолитической активности человеческих лимфобластов линий Jurkatt-tat, Molt-4, Molt-4/8 и рабдомиосаркомы RD, крысиных феохромоцитомы PC12, глиомы C6, диссоциированных эмбриональных β-клеток панкреаса, а также на культурах Pseud. aeruginosa, Corynebact. diphtheriae установлено триггерного характера действие неорганического ортофосфата на протеолитические реакции. Ингибиторный анализ позволяет думать, что стимуляция в этих клетках протеолиза фосфатом в ряде случаев не связана с ресинтезом АТФ [5, 11].

Обнаруженные феномены открывают перспективы проработки и обоснования путей решения частных вопросов дифференциальной диагностики заболеваний (и разработки таксономических тестов), фармакологии, биотехнологии, а также уяснения генеза ряда патологических процессов.

Литература. 1. Nikandrov V.N. // Int. J. Biochem., 1992, **24**, № 1, 47-53. 2. Никандров В.Н., Пыжова Н.С. // Известия НАН Беларуси, сер. мед-биол. наук, 2001, № 1, 54-60. 3. Пыжова Н.С., Никандров В.Н. // Доклады НАН Беларуси, 1998, т. 42, № 4, 94-99. 4. Nikandrov V.N., Pyzhova N.S. // Thromb. Res., 1996, **88**, № 4, 303-312. 5. Никандров В.Н., Пыжова Н.С. // Современные проблемы инфекционной патологии человека. Матер II научно-практ. конфер., Мн., 2001, 319-339. 6. Никандров В.Н., Володкович О.И., Гронская Р.И., Жук О.Н., Шпак Г.А.., Лукашевич И.Б., Полукошко Е.Ф., Петрусенко Г.П., Тумилович М.К. // В кн.: "Достижения медицинской науки Беларуси", вып. VII. Рецензир. научно-практ. ежегодник, Минск, 2002, 49-50. 7. Никандров В.Н., Пыжова Н.С. // Известия НАН Беларуси, сер. мед-биол. наук, 2003, № 3, 75-89. 8. Никандров В.Н., Пыжова Н.С., Вотяков В.И. // Бюлл. эксперим. биол. мед. 1987, т. 103, № 7, 49-57. 9. Цыманович С.Г., Никандров В.Н., Максимова Р.А., Шаркова Т.С., Андреенко Г.В., Серебрякова Т.Н. // Вопр. мед. химии. 1992, т. 38, № 3, 44-45. 10. Протекторное действие пуриновых нуклеотидов на плазминоген человека. В кн. "Фукциональная роль монооксида азота и пуринов. Сборник статей конфер."Минск, Бизнесофсет, 2001, с. 142-146. 11. Никандров В.Н., Пыжова Н.С. // В кн.: "Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биоситем: Междунар. конфер.: Шестой съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков. Сб. статей. Часть I". Минск, 2004, 236-238. 12. Никандров В.Н., Пыжова Н.С., Шатило Н.Л. // В кн. "Инфекция и иммунитет. Матер., приуроченные к V междунар. форуму по глобальной вакцинологии "Вакцины и иммунизация", Несси, Минск, 2001, с. 193-202.

УДК: 619:616.98:615.37:635:5

ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ОРГАНОВ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

Прудников В.С., Гуков Ф.Д., Луппова И.М., Грушин В.Н.
УО «Витебская государственная академия ветеринарной медицины», Республика Беларусь.

Ответная защитная реакция иммунной системы, возникающая при внедрении в организм животных различных антигенов, проявляется, как правило, однотипными иммуноморфологическими процессами: микро– и макрофагоцитозом, бласттрансформацией и пролиферацией Т- и В-лимфоцитов, плазмоцитозом и др. Все иммунные реакции, направленные на нейтрализацию антигена, обнаруживаются, главным образом, в ее периферических органах: в Т- и В-зависимых зонах лимфатических узлов, в селезенке, в лимфоидных образованиях, ассоциированных с органами других систем, в крови и лимфе. У птиц такие же реактивные изменения обнаруживаются и в одном из центральных органов иммунной системы - фабрициевой бурсе. [1]

Для облегчения поиска схем интерпретации иммуноморфологических изменений, происходящих в организме животных, приводим упрощенную схему динамики иммунного ответа.

Первыми распознают экзо- и эндоантигены и фагоцитируют их микрофаги – нейтрофилы (у птиц псевдоэозинофилы) и эозинофилы, а затем макрофаги: моноциты крови и их производные - тканевые макрофаги. В процессе фагоцитоза антиген частично лишается вирулентных (патогенных) свойств, а кроме того, в цитоплазме макрофагов с помощью ферментов лизосом антиген расщепляется до иммуногенной формы, доступной к распознаванию иммунорецепторами Т- и В-лимфоцитов. [3]

Для выполнения своих функций Т- и В-лимфоциты дифференцируются дважды. Свою первичную антигеннезависимую дифференциацию они проходят в центральных органах иммунной системы (в тимусе и красном костном мозге – у млекопитающих, в тимусе и фабрициевой бурсе - у птиц), в результате которой клетки приобретают способность распознавать антигены, образуя на своей поверхности иммунорецепторы. [4]

В периферических органах иммунной системы, после представления (презентации) антигена макрофагами, Т и В-лимфоциты подвергаются дедифференциации, что сопровождается их антигензависимой бласттрансформацией. При этом малые лимфоциты превращаются в большие незрелые бластные формы (Т- и В-иммунобласты), способные к интенсивной пролиферации (размножению).

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ