

ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ И ФАРМАКОКИНЕТИКА РИЦИНА

Резюме

В статье рассмотрены особенности строения рицина и его цитотоксической активности.

Сокурова А.М. Особенности строения и фармакокинетика рицина // Психофармакол. биол. наркол. — 2007. — Т. 7, № 1. — С. 1484–1487.

Очищенный ричин (R 60) представляет собой белый порошок без запаха, хорошо растворимый в воде. Молекулярная масса рицина равна 62 056 Да (в 440 раз больше, чем молекулярная масса зарина). Ричин — гликопротеин с глобулярной структурой. Белковая часть молекулы состоит из 560 аминокислотных остатков (их последовательность установлена) и построена из двух субъединиц (доменов) А и В. Субъединица А (каталитическая, или RTA) с молекулярной массой 30 625 Да — это высокоспецифичная эндонуклеаза, модифицирующая 28 S РНК 60 S субъединицы рибосомы. Субъединица В (лектиновая, или RTB) с молекулярной массой 31 431 Да — лектин, имеющий два центра связывания галактозы [1].

38 % триптофановых остатков В-цепи рицина расположены на поверхности белковой глобулы [7]. Субъединицы соединены между собой дисульфидной связью. Их пространственные структуры стабилизированы внутридоменными дисульфидными связями — одной в домене А (Cys259—Cys4) и четырьмя в домене В (Cys20—Cys39, Cys63—Cys80, Cys151—Cys164, Cys190—Cys207). Полисахаридная часть (D-галактоза, глюкоза, N-ацетил-D-глюкозамин, α-D-манноза) составляет около 20 % от молекулярной массы рицина [1].

Ричин транспортируется в организме с кровью. Затем токсин в составе везикул проходит компартменты клетки, аппарат Гольджи и достигает эндоплазматического ретикулума, где происходит его диссоциация на отдельные субъединицы. Сами по себе они не токсичны, токсическое действие проявляется только при условии кооперативного действия обеих субъединиц в составе молекулы рицина. Однако, будучи порознь введенными в организм, субъединицы самопроизвольно соединяются, и молекула рицина реконструируется, проявляя весь спектр токсического действия нативного токсина [6, 8]. Сродство субъединиц рицина друг к другу увеличивается при понижении pH [2].

Токсин содержит одну ферментативно активную А-субъединицу (*active*) и одну В-субъединицу, обеспечивающую связывание токсина с клеткой (*binding*). Домен В выполняет транспортные и рецептофильные функции: он связывается с галактозилированными рецепторами на поверхности клетки-мишени и вызывает структурную перестройку мембраны с образованием трансмембранного канала [7]. Конечной стадией транспорта является трансмембранный переход каталитической А-субъединицы в цитозоль путем рецепторопосредованного эндоцитоза и (благодаря N-гликозидазной активности) инактивирование ферментов рибосом. Субъединицы рибосоминактивирующих белков во вре-

мя прохождения через мембрану могут находиться в состоянии расплавленной глобулы. Это состояние характеризуется частичным разворачиванием белка с последующим восстановлением нативной структуры в присутствии эукариотических рибосом *in vitro* [8]. При такой конформации возможно проявление скрытых ранее эпитопов [7].

Механизм действия RTA заключается в избирательном выщеплении остатка аденина из 28 S рРНК эукариот, вследствие чего нарушается внутриклеточный синтез белков (трансляция) и происходит гибель клетки. Для этого достаточно попадания одной молекулы в цитозоль [3, 5, 8].

В работах, где В-цепь была модифицирована термической обработкой (1 мг/мл В-цепи рицина переводили в боратный буфер и инкубировали 18 ч при 37 °С), чтобы уменьшить связывание с галактозой, показано, что галактозосвязывающий центр и участок В-цепи, ответственный за усиление эффекта А-цепи, структурно разделены. Также произошла частичная денатурация белка, характеризующаяся нарушением третичной структуры [7].

Поликлональные антитела связываются с модифицированной цепью нативной, что указывает на сохранение основных антигенных детерминант, но галактозосвязывающая активность уменьшается в 10 раз, и сродство к А-цепи рицина резко падает. Не наблюдается кооперативного перехода при денатурации белка гуанидингидрохлоридом. Можно предположить, что при таких условиях В-субъединица переходит в состояние «расплавленной глобулы», и в этом состоянии В-цепь обеспечивает трансмембранный перенос А-цепи [7].

Ключевым моментом проявления цитотоксической активности является доставка токсина или его каталитической субъединицы к цитоплазматической мишени — рибосоме. Такая доставка осуществляется в результате интернализации и последующего ретроградного транспорта токсина из эндосомального компартмента в аппарат Гольджи и далее в эндоплазматический ретикулум [4].

В ходе транспорта рицина во внутриклеточных компартментах происходит диссоциация субъединиц рицина. Отделение RTA может сопровождаться ее конформационными перестройками, связанными с экспонированием в водную фазу гидрофобных участков, экранированных в голотоксине RTB. Предполагается, что эти перестройки принципиально важны как для транслокации RTA в цитоплазму, используя механизмы экспорта дефектных белков, так и для осуществления ею ферментативного катализа. Область контакта субъединиц рицина довольно велика (1600 Å²) [6, 8].

Ретроградный транспорт обусловлен способностью токсина взаимодействовать за счет лектиновой активности с рецепторами, рециркулирующими между внутриклеточными компартментами [4].

Рецепторы, расположенные на различных участках клеточной мембраны, в результате интернализации могут оказываться в различных участках эндосомального компартмента. Эндосомальный компартмент является неоднородным образованием, и ретроградный транспорт в аппарат Гольджи возможен только из отдельных его участков. Существуют также рецепторы, которые в норме направляются в аппарат Гольджи или в эндоплазматический ретикулум после связывания с лигандом [4].

На трехдневной культуре мышинных фибробластов линии 3ТЗ рицин связывался преимущественно с участками мембраны, расположенными в центре клетки и практически не взаимодействовал с периферической частью мембраны. Места связывания рицина в основном располагались на части мембраны вокруг клеточного ядра и редко непосредственно над ядром. Диффузного окрашивания тела клетки рицином не наблюдалось. Выявлялись отдельные ярко окрашенные кластеры. Некоторые кластеры были компактно расположены над поверхностью мембраны и выявлялись на уровне 3–5 мкм над ядром, при этом их размер достигал 6 мкм. Другая часть кластеров, по-видимому, представляла собой впячивания клеточной мембраны [4].

ЛИТЕРАТУРА

1. Антонов Н.С. Химическое оружие на рубеже двух столетий. — М.: Прогресс, 1994. — 173 с.
2. Бушуева Т.Л., Урошевич О.И., Майсурян Н.А. и др. // Мол. биология. — 1991. — Т. 25, Вып. 2. — С. 422–429.
3. Мойсенович М.М., Агапов И.И., Егорова С.Г. и др. Внутриклеточные антитела не оказывают влияния на транспорт белковых токсинов // ДАН. — 2001. — Т. 379, № 3. — С. 406–410.
4. Мойсенович М.М., Демина И.А., Агапов И.И. и др. Рицин и вискумин связываются с разными участками клеточной мембраны // ДАН. — 2002. — Т. 383, № 6. — С. 822–825.
5. Мойсенович М.М., Челнокова О.В., Солопова О.Н. и др. Свойства общего для А-субъединиц рицина и вискумина антигенного эпитопа // Биотехнология. — 1999. — № 4. — С. 9–14.
6. Попова Е.Н. Взаимодействие рицина с клетками гибридом, секретирующих антитела против его каталитической субъединицы: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М., 2004. — 24 с.
7. Тоневицкий А.Г., Мириманова Н.В., Бушуева Т.Л. и др. Структурные и функциональные особенности термически обработанной связывающей субъ-

диницы растительного токсина рицина // Мол. биология. — 1991. — Т. 25, Вып. 2. — С. 451–461.

8. Челнокова О.В. Конформационные изменения растительных токсинов в ходе внутриклеточного транспорта: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М., 2004. — 28 с.

Sokurova A.M. Peculiarities of structure and pharmacokinetics of ricin // Psychopharmacol. Biol. Narcol. — 2007 — Vol. 7, N 1. — P. 1484–1487.

Military Medical Academy, Department of Pharmacology; 6 Lebedev acad. str., Saint-Petersburg, 194044, Russia.