

vail (1999), Alan MacDiarmid (2000). У загради је наведена година додељивања Нобелове награде.

Међутим, има и друкчијих примера. Мађарски хемичар Ђерђ фон Хевеши (G. von Hevesy), добитник Нобелове награде за хемију 1943. године за откриће коришћења изотопа као обележивача у хемијским истраживањима, третира се као мађарски нобеловац, иако је највећи део својих истраживања урадио ван Мађарске, и умро у Немачкој 1966. године; холандски физичар и хемичар П. Дебај (Petrus Josephus Wilhelmus Debye), који је као професор универзитета свој радни век провео на универзитетима у Немачкој, Швајцарској и САД и за истраживања која је тамо урадио добио Нобелову награду за хемију 1936. године, за проучавања диполних момената као и дифракције X-зрака и електрона у гасовима, третира се као холандски нобеловац.

ЛИТЕРАТУРА

1. Z. Dizdar, Nobelove nagrade za nauku - lice i naličje; Glo-sarijum, Beograd 1991.
2. S. Ivezić, Nobel i nobelovci, Epoha, Zagreb, 1965.
3. Britannica CD-ROM, Edition 1996.
4. Nobelovska predavanja: *Hem. pregled* **8** (1967) 8-11, 29-39, 59-68, 88-97, 106-119; **9** (1968) 10-17, **10** (1969) 122-139; **11** (1970) 34-40, 56-62, 78-87, 111-116; **12** (1971) 65-73, 82-93; **14** (1973) 95-113; **15** (1974) 8-14, 38-41. *Važniji članci o Nobelovcima i njihovim delima, pisani od strane raznih autora u Hem. pregledu možete naći u:* **6** (1955) 16; **13** (1972) 4-20; **14** (1973) 82-94; **15** (1974) 88-95; **17** (1976) 26-34; **18** (1977) 8-32; **20** (1979) 75-84; **21** (1980) 128-141; **25** (1984) 39-41; **26** (1985) 45-47; **27** (1986) 95-98; **28** (1987) 56-64, 143-147, 148-151; **29** (1988) 35-41, 139-148; **31** (1990) 124-126; **34** (1993) 28-36, 37-38; **35** (1994) 76-78; **36** (1995) 11-12, 21-23, 60-63, 105 -111; **37** (1996) 20-27, 69-73, 124-126; **38** (1997) 34-35, 36-39, 83-87, 128-136; **39** (1998) 62- 64; **40** (1999) 26-31, 64-68; **41** (2000) 114-120.



ЛИДИЈА ИЗРАЕЛ, Хемијски Институт, Медицински факултет, Београд

ГОРДАНА ГОЈГИЋ-ЦВИЈОВИЋ, ИХТМ – Центар за хемију, Београд

ИВАНКА КАРАЦИЋ, Хемијски Институт, Медицински факултет, Београд (ivanka@eunet.yu)

НИСКОМОЛЕКУЛСКИ ИНХИБИТОРИ ПРОТЕАЗА МИКРОБНОГ ПОРЕКЛА

Само у току лета 2000. г. одржано је 5 интернационалних конгреса посвећених протеазама и њиховим инхибиторима: „2000 GRC on Proteolytic Enzymes and Inhibitors” (New London, England), „International Symposium on Proteases” (Chateau Montebello, Quebec), „Cysteine Proteinase and their Inhibitors: The New Millenium” (Portorož, Slovenia), „International Conference on Cell Surface Aminopeptidases” (Nagoya, Japan), „Proteinase Inhibitors & Activators” (Oxford, England). Сведоци смо обиља информација и огромног интересовања за протеазе и њихове инхибиторе: од софистицираних биохемијских и биофизичких експеримената до најновије стратегије у лечењу ХИВ инфекција, карцинома, хипертензије, алкохолизма, патолошких промена у трудноћи...

Чини се да поред истраживања NO и апоптозе, протеазе и њихови инхибитори данас представљају трећи корпус заиста актуелних истраживања, као и да би резултати истраживања која су у замаху могли бити драгоцени у миленијуму који је пред нама.

Микроорганизми су јефтин и релативно лако доступан извор читавог низа ензима, посебно хидролаза, а међу њима протеаза и њихових инхибитора. Сем тога изгледа да по могућностима примене микробне протеазе и њихови инхибитори нимало не заостају за протеазама биљног и животињског порекла, те је стога овај преглед литературе фокусиран пре свега на нискомолекулске инхибиторе микробног порекла, као потенцијалне лекове у борби против тако тешких болести као што су СИДА и канцер.

ИНХИБИТОРИ ПРОТЕАЗА

Актуелна истраживања

Протеазе и њихови инхибитори у последњих двадесетак година привлаче изузетну пажњу истраживача широм света. Кроз проучавање особина, механизма деловања и посебно регулације протеаза од појединачних протеаза до протеазома¹, долази се до резултата који дају потпуне или делимичне одговоре на питања: како протеазе² функционишу у физиолошким али и у патолошким процесима. Посебан

1 Комплекси протеиназа који садрже различите типове каталитичких центара; нпр. квашчеви протеозоми [1] садрже по 7 различитих α и β подјединица организованих у комплексном димеру.

2 Постоји извесна конфузија у употреби термина протеаза и протеиназа. Тако је, нпр. протеаза синоним за пептидазу (у значењу хидролаза пептидне везе), док је протеиназа искључиво ендопептидаза специфична за интактни протеин. Како, међутим, неке пептидазе показују и ендо и егзопептидазну активност (нпр. катепсин) то би по овом критеријуму она била протеаза иако је истовремено и протеиназа. Термин протеаза се, поред тога, у неким новијим радовима, користи када је специфичност и механизам хидролизе непознат. Када је специфичност и механизам познат говори се о протеиназама. Препорука је да се оба термина, дакле и протеаза и протеиназа не употребљавају, него радије рационалнији термин- пептидаза тј. егзо и/или ендопептидаза.

сегмент чине истраживања протеолизе на површини ћелије која је критична у процесу раста, активације и ослобађања секреторних протеина, деградацији биолошки активних пептида, хормона и екстрацелуларних протеина. Процеси протеолизе су укључени у сложене феномене као што су: раст, метастаза, интеракција ћелија-ћелија, инфламација, контрола крвног притиска, коагулација крви итд. Потпуно је јасно да наведени процеси захтевају врло прецизну и строгу регулацију.

Ево неких заиста важних односа протеаза-инхибитор који су мета актуелних истраживања:

- Фактор некрозе тумора α (ТНФ- α) ослобађа се из прекурсора везаног за мембрану под утицајем металопроотеиназе ТАЦЕ (ТНФ- α конвертујући ензим) за који се сматра да је одговоран и за ослобађање растворног α -амилоид прекурсорског протеина, који се јавља код Алцхајмерове болести. Модулација активности ТАЦЕ се може вршити синтетским инхибиторима, што је од изузетног значаја будући да очување активности ТНФ- α обезбеђује организму заштиту од инфекције, тумора и сл. [2]

- Цистеинске протеазе (ЦП): катепсини Б, Х, Ј учествују у процесу раста тумора, инвазије и метастазе. Њихова активност је регулисана цистеин протеиназа инхибиторима (СРIs) и то интрацелуларно стефинима и екстрацелуларно цистатинима и кининовима. Изразита експресија и секреција ЦП у ћелијама тумора није праћена одговарајућим повећањем СРIs, што за последицу има, између осталог, деградацију екстрацелуларног матрикса који окружује туморозно ткиво [3];

- Бестатин, инхибитор LAPaze (Леуцил Амино-Пептид-аза) сигнификантно снижава ХИВ инфекцију, редукујући број позитивних имунофлуоресцентних ћелија, активност реверзне транскриптазе, број копија вируса. LAPaza у инфицираним ћелијама има знатно већу активност него у здравим ћелијама и чини се да управо она игра важну улогу у раним фазама ХИВ инфекције, управо када је употреба бестатина и најефикаснија [4];

- Аминопептидаза А (АРА) је мембранска цинк металопроотеаза која преводи ангиотенсин II у ангиотенсин III. Њена активност је изузетно повишена у стању хипертензије због чега се сматра да регулација активности АРА може да буде начин регулације снижавања крвног притиска [5]. Употребом селективног инхибитора ЕС 33, активност АРА је смањена.;

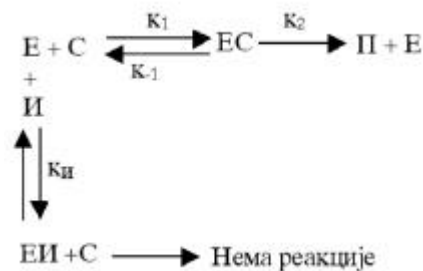
Бестатин, инхибитор LAPaze (окситоциназе) појачава фоликуларни раст и регенерише инхибирани одговор оваријума на гонадотропин [6].

Овом низу би се свакако могли додати и бројни други аспекти истраживања која су посвећена протеазама и њиховим инхибиторима.

ОСНОВНО О МЕХАНИЗМУ

Иако врло хетерогена група једињења, инхибитори протеаза су једињења која имају једну заједничку особину, а то је да компетитивно инхибирају

одговарајући ензим. Механизам компетитивне инхибиције приказан је следећом једначином:



Где је Е- ензим; П- производ; И- инхибитор; ЕС-комплекс ензим-супстрат; ЕИ- комплекс ензим-инхибитор.

У табели I. су дате константе инхибиција неких нискомолекулских инхибитора

Табела I. Константе инхибиције нискомолекулских инхибитора

Инхибитор	Ензим	K_i ($10^{-7}M$)	Врста инхибиције
Леупептин	Трипсин	1,3	Компетитивна
Еластатинал	Еластаза	2,4	Компетитивна
Пепстатин	Пепсин	0,001	Компетитивна
Фосфорамидон	Термолизин	0,28	Компетитивна
Амастатин	Аминопептидаза А	1,5	Компетитивна
Бестатин	Аминопептидаза Б	0,6	Компетитивна

На основу молекулске масе инхибитори протеаза се деле на високомолекулске и нискомолекулске. Многи микробни инхибитори протеаза, екстрацелуларно ослобођени, представљају нискомолекулске пептиде необичне структуре. Нискомолекулски инхибитори протеаза класификовани су у три посебне групе [7]:

- инхибитори серин и тиолпротеаза
- инхибитори карбоксипротеаза
- инхибитори металопроотеаза.

НИСКОМОЛЕКУЛСКИ ИНХИБИТОРИ ПРОТЕАЗА

Још седамдесетих година овога века је уочено да у ферментационој течности актиномицета постоје инхибитори ендопептидаза: трипсина, плазмина, папаина, хомотрипсина. С друге стране показало се да су пептидазе на површини ћелије укључене у различите феномене, па је стога контрола њихове активности инхибиторима од изузетног биолошког значаја. Тако је, имајући ова два момента у виду, проф. токијског универзитета, Хамао Умегава [Намао Уме-

zawa], започео тестирање ферментационих течности актиномицета на присуство инхибитора протеаза [12]. Најважнији подаци везани за нискомолекулске инхибиторе углавном су резултати истраживачког тима проф. Умезаве.

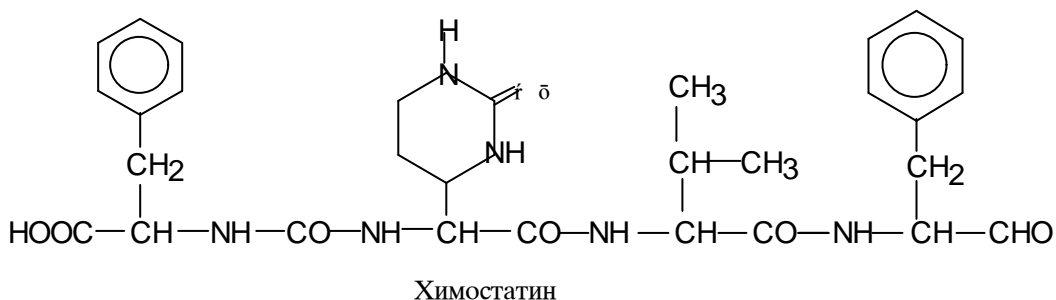
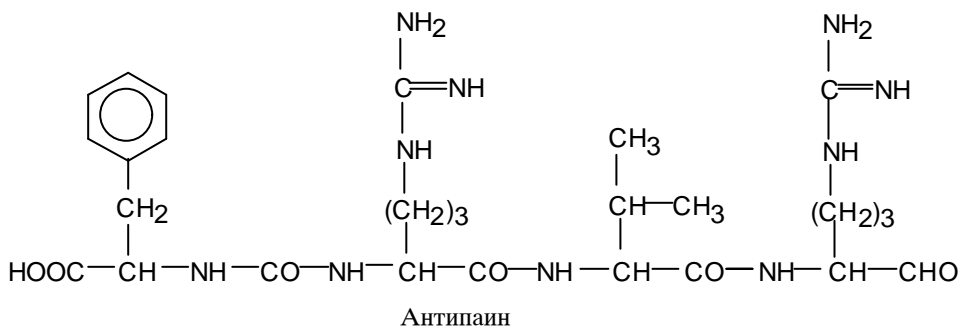
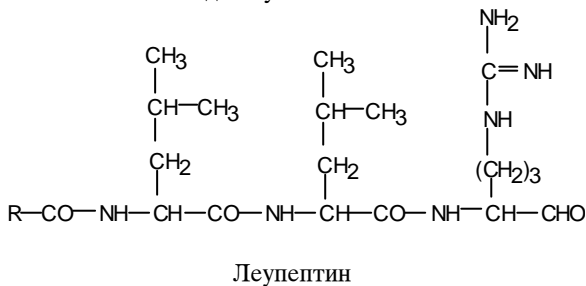
Инхибиџори серин и тиолпротеаза

Најраније откривен инхибитор серин и тиол протеаза је леупептин. Већ 1969.г. било је познато да леупептин инхибира плазмин, трипсин, папаин, катепсин В [8].

Како трипсин хидролизује аргинил или лизил пептидну везу, леупептин садржи аргининал групу (уместо карбоксилне групе на С-терминалу се налази алдехидна група). Алдехидну групу на С терминалу поседују и други инхибитори серин и тиол-протеаза.

Леупептин продукује 11 сојева рода *Streptomyces*, што указује на чињеницу да је ген одговоран за синтезу леупептина широко распрострањен међу различитим врстама рода *Streptomyces*.

Проучавање синтезе леупептина довело је до изоловања мултифункционалног ензима који катализује синтезу леупептина. Секвенца синтезе леупептинске киселине је: ацетил-леуцин→ацетил-леуцил-леуцин→ацетил-леуцил-леуцил-аргинин. Леупептинска киселина се затим редукује помоћу веома осетљивог ензима до леупептина.



Проучавање расподеле леупептинске киселине и леупептина у ћелији и медијуму показало је да се леупептинска киселина (која регулише антипротеазну активност) продукује у ћелији, одакле се након редуције, у облику леупептина брзо екстрацелуларно издаваја [9].

Продукција леупептина повезана је са растом микробне ћелије. Леупептин је неактиван када га деактивира леупептин-деактивирајући-протеин (LIP). Леупептин, LIP и трипсину сличне протеазе (TLP) имају важну улогу у регулисању раста мицелијума и његове хидролизе. LIP деактивира леупептин када је активност TLP пожељна а TLP функционишу као ензими укључени у хидролизу протеина мицелијума [20].

Антипаин, химостатин и еластатинал су инхибитори серин и тиолпротеаза које, такође, продукују бактерије рода *Streptomyces*. Антипаин инхибира папаин, трипсин, катепсин Б; химостатин инхибира хитотрипсин; еластатинал инхибира еластазу панкреаса. Сви ови инхибитори на С-терминалу имају алдехидну групу као и леупептин.

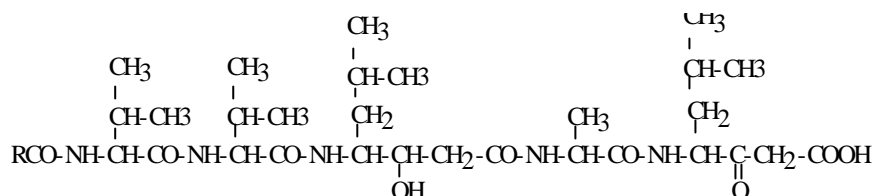
Поменути инхибитори имају ниску токсичност. Леупептин, антипаин и химостатин инхибирају индуковани едем (отицање ткива). Леупептин употребљен као 1% маст одмах након задобијања опекотине смањује бол и формирање плика. Потенцијална примена леупептина у третирању мишићне дистрофије предложена је након ефекта који је изазван код дистрофије мишева. Објављено је да леупептин инхибира карциногенезу коже пацова (изазвану дибензантраценом) и метастазу на експерименталним животињским моделима [10].

Инхибиџори карбоксипротеаза

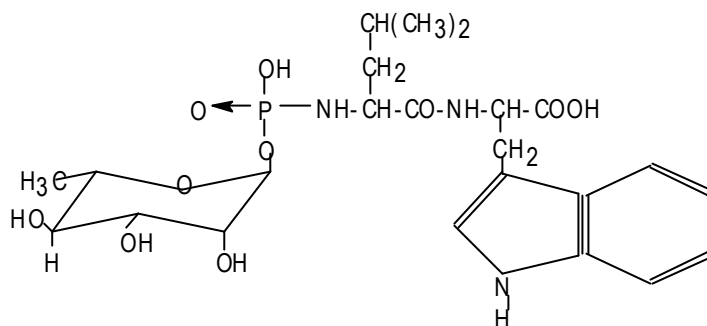
Специфични инхибитор пепсина дуго је био непознат, иако се претпостављало да би такав инхибитор био користан у третирању гастричног улцера.



Пепстатин



Пепстанон



Фосфорамидон

Истерирањем антипепсинске активности, пепстатин је пронађен у културама различитих сојева актиномицета [7]. Инхибитори пепсина продуковани од стране рода *Streptomyces* разликују се по ланцу масне киселине, што се из њихових формула може видети. У биохемијским изучавањима најчешће употребљавани су пепстатин, пепстанон и хидроксипепстатин. Сва три поменути инхибитора имају готово исту активност према пепсину и катепсину D.

Пепстатин јаче инхибира ренин него пепстанон и хидроксипепстатин. Инхибиторна активност пепстатина према ренину расте како се повећава број C атома у ланцу масне киселине, па су синтетисани аналози пепстатина који су растворљивији у води а имају готово исту активност према пепсину и катепсину D као пепстатин.

Пепстатин инхибира отицање ткива. Такође се проучавају терапеутска дејства на стомачни чир човека. Објављено је да пепстатин има ефекат на мишићну дистрофију и појачава дејство леупептина. Такође инхибира фокусно формирање вирусног саркома мурина [11].

Инхибитори металопротеаза

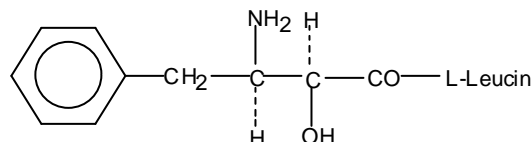
Фосфорамидон, инхибитор металопротеаза, продукује *Streptomyces tanashiensis*.

Фосфорамидон инхибира термолизин, металоендопептидазу бактерија *Bacillus subtilis*, а такође и металопротеазе еластазе из *Pseudomonas aeruginosa* [7].

Инхибитори аминокиселиназа лоцираних на површини ћелије

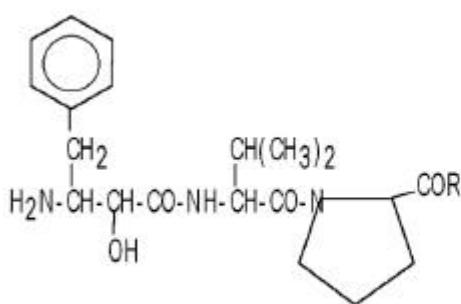
Показано је да су аминокиселиназе, поред алкалних фосфатаза и естераза, лоциране на површини ћелија различитих организама. Јасно је да ензимска активност на површини ћелије има једну од кључних улога у њеном функционисању. Како би се испитала и анализирао биолошка улога ових ензима у различитим ћелијским функцијама, започела је потрага за инхибиторима аминокиселиназа. Показано је да се ови инхибитори везују за површину ћелије и модификују имунолошки одговор ћелије и представљају имуномодулаторе.

Бестатин је нискомолекулски инхибитор (дипептид) изолован из супернатанта соја *Streptomyces olivoleticuli*. Инхибира аминокиселиназу В и леуцил-аминокиселиназу [12].

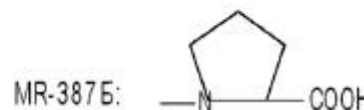
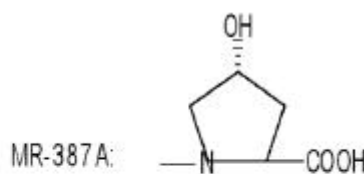


Бестатин

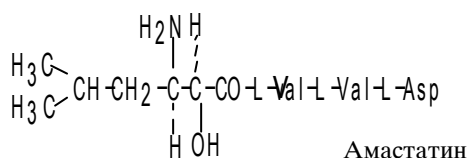
Бестатин је добро проучен као инхибитор-имуномодулатор. При ниским концентрацијама повећава хиперсензитивност а при већим, повећава број насталих антитела у ћелијама слезине. С друге стране, амастатин који инхибира аминокиселиназу А, утиче и на повећање броја антитела.



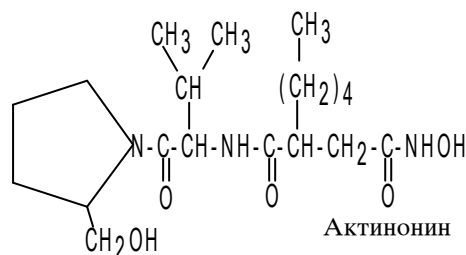
Инхибитори MR-387 А и В



Бестатин и амастатин се полако и чврсто везују за аминокептидазу. Кинетичким методама одређене су K_i . Везивање бестатина за *Aeromonas* аминокептидазу и леуцил аминокептидазу је споро са K_i $1,8 \times 10^{-8}$ и $5,8 \times 10^{-10}$ М. Амастатин инхибира *Aeromonas* аминокептидазу и леуцил аминокептидазу са K_i вредностима у интервалу од $3,0 \times 10^{-8}$ до $2,5 \times 10^{-10}$ М [14].



Амастатин



Актинонин

Бестатин показује неколико биолошких ефеката као што су имуномодулација [15], инхибиција хуманог реналног карцинома [16], такође стимулише пролиферацију Т ћелија у слезини путем активације макрофага. Показано је да се много већа количина бестатина веже за макрофаге него за Т лимфоците, и да је леуцил аминокептидаза везана за површину ћелије циљ бестатина. Бестатин показује директну антитуморску активност према ћелијама плућног карцинома а објашњење ове активности је индукција апоптозе. Резултати праћења фрагментације DNK показују да бестатин индукује апоптозу у року од 24 часа од тренутка третирања ћелија [17]. Бестатин се користи као допуна хемотерапији и радиотерапији карцинома плућа. У концентрацијама од 30-60 mg дневно повећава проценат Т ћелија и природно умирање ћелија, које је код пацијената са канцером смањено.

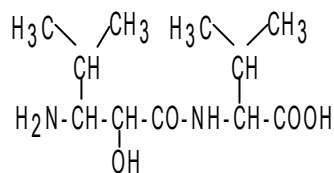
Вредност терапије бестатином уз хемотерапију потврђена је повећањем времена живота пацијената

са леукемијом у поређењу са контролним. Бестатин, такође, изазива директан антилеукемијски ефекат индукујући апоптозу у хуманим ћелијама леукемије.

Актинонин, инхибитор аминокептидазе М, пронађен је у супернатанту бактерије *Streptomyces hygroscopicus*. У концентрацијама од 0,01 до 1 mg по мишу подстиче хиперсензитивниост, а такође утиче на повећање броја антитела.

Како се показало да актинонин и бестатин могу бити лекови у третману канцера, тражени су и нађени, инхибитори аминокептидазе N (APN), ензима који игра значајну улогу у инактивацији енкефалина и идентичан је плазма-мембранском гликопротеину CD13, који се експресира при леукемији. За APN је нешто касније утврђено да има важну улогу у метастази тумора и деградацији екстрацелуларног матрикса, *in vitro*. Скринингом нових инхибитора APN добијених помоћу врста рода *Streptomyces* пронађена су, а затим и идентификована два инхибитора: MR-387 А и Б ис *Streptomyces neyagawaensis* SL-387 [21]

Недавно је из ферментационе течности *Streptomyces rimosus* изолован и идентификован лапстатин- још један инхибитор LAP. Лапстатин је аутогени инхибитор LAP из *S.rimosus*, али инхибира и друге LAP [13].



Лапстатин

ЗАКЉУЧАК

Будући да је употреба инхибитора аминокептидаза у лечењу СИДЕ, такође и канцера различитих врста, тзв. нова стратегија у лечењу ових болести [18] то је у току тражење нових инхибитора AP а посебно LAP као производа метаболизма микроорганизама, али и стереоселективна синтеза једињења која су им слична [19]. Може се претпоставити да ће следећих година напредак у биохемији патолошких процеса бити под великим утицајем напретка у

истраживању нискомолекулских инхибитора које продукују микроорганизми али и напретка у синтези аналога ових једињења.

Abstract

LOW-MOLECULAR-WEIGHT PROTEASE INHIBITORS OF MICROBIAL ORIGIN

Lidija Izrael¹, Gordana Gojgić-Cvijović², Ivanka Karadžić¹

¹School of Medicine, Department of Chemistry, ²ICTM, Department of Chemistry, Belgrade

We have witnessed an explosion of informations about properties, also mode of action and regulation of proteases from the metalloproteases at the cell surface to the AIDS protease. Protease inhibitors have a great importance in mechanism of proteolysis. One of the latest strategies to combat diseases like AIDS and cancer is to use proteinase inhibitors as drugs. Especially good source of protease inhibitors are microorganisms. A few low-molecular-weight protease inhibitors of microbial origin, as a potential drugs, was described.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rivett J., VIth International Symposium on Proteinase Inhibitors and Biological Control, Ljubljana, Slovenija, 1999, Book of Abstracts, p.42
2. Bode W., C. Fernandez-Catalan, R. Huber, G. Buernikov, H. Bartunik, R. Black, K. Maskos, *ibid.*, p.4
3. Kos J., M. Karasovec, I. Zore, N. Cimerman, B. Werle, H. Jorgen Nielsen, N. Bruner, *ibid.*, p.13

4. Pulido-Cesudo G., B. Conway, P. Proulx, R. Brown, CA. Izaguirre, *Antiviral. Research.* **36** (1997) 167-177
5. Zini S., P. Masdehors, Z. Lenkei, MC Fourniezaslowski, BP. Roques, P. Corvol, C. Lorenscoptes, *Neuroscience* **78** (1997) 1187-1193
6. Nakamura K., H. Fujiwara, T. Higuchi, T. Honda, S. Yamada, T. Nakayama, J. Fujita, M. Maeda, T. Tachibana, H. Suginami, *Endocrine Journal.* **45** (1998) 547-553
7. Umezawa H., *Ann. Rev. Microbiol.* **36** (1982) 75-99
8. Aoyagi T., Takeuchi T., Matsuzaki A., J. Kawamura K., Kondo S., Hamada M., Maeda K., Umezawa H., *J. Antibiot.* **22** (1969) 283-286
9. Suzukake K., *J. Antibiot.* **33** (1980) 1172 - 76
10. Hozumi M., *Cancer Res.* **32** (1972) 1725 - 28
11. Yuasa A., *J. Natl. Cancer Inst.* **54** (1975) 1255-56
12. Umezawa H., *J. Antibiot.* **29** (1976) 97-99
13. Lampert R. B., Kidric J., Kralj B., Vitale Lj., Pokorny M., Renko M., *Arch. Microbiol.* **191** (1999) 397-404
14. Wilkes S.H., *J. Biol. Chem.*, **260** (1985) 13154-13162
15. Mathe G., *Biomed. Pharmacother* **45** (1991) 45-49
16. Yoneda J., Saiki I., Fujii H., Abe F., Kojima Y., Azuma I., *Clin. Exp. Metastasis* **10** (1992) 49-59
17. Ezawa k., Minato K., Dobashi K., *Biomed & Pharmacother.* **50** (1996) 283-289
18. <http://www.iapac.org/clinmgt/avtherapies/patient/proinbk.html>
19. Lui Q.Y., Marchington A.P., Rayner C.M., *Tetrahedron* **53** (1997) 15729-15742
20. Kim I.S., Lee K.J., *Microbiology*, 141 (1995) 1017-1025
21. Chung M. C., Chun H. K., Han K. H., Lee H. J., Lee C. H., Kho Y. H., *J. Antibiotics.* **49** (1996) 99-102



СЛАВИЦА СТЕВАНОВИЋ, Технолошко-металуршки факултет, Универзитет у Београду, Карнегијева 4, Београд, Југославија (rlift@infosky.net)

ПРИМЕНА МЕМБРАНСКИХ ТЕХНИКА У МЕТОДАМА ХЕМИЈСКЕ АНАЛИЗЕ II ДЕО: ТЕХНИКЕ У РАЗВОЈУ

У раду су описане две потпуно нове мембранске технике: мембранска екстракција и мембранска адсорпција. Обе методе показују велику могућност примене у свим аналитичким методама које користе екстракцију за концентрисање анализата, као што су УВ-, видљива спектрофотометрија, ИЦ и АА спектрометрија гасна и течна хроматографија.

МЕТОДА МЕМБРАНСКЕ ЕКСТРАКЦИЈЕ

Мембранска екстракција је један од новијих мембранских процеса који се интензивно развија на Катедри за аналитичку хемију ТМФ-а, Универзитета у Београду, нарочито у правцу примене у аналитичкој хемији. Овај процес се заснива на принципима екстракције течно-течно где су фазе раздвојене чврстом порозном мембраном¹. Са једне стране

мембране налази се напојни раствор који садржи компоненте које се екстрахују. Са друге стране мембране налази се раствор екстракционог средства. Контакт између напојног и екстракционог раствора остварује се у порама мембране или на једној од површина мембране, у зависности од особина мембране.

Процес мембранске екстракције има бројне предности у односу на екстракцију течно-течно, с обзиром да елиминише многе проблеме везане за директно мешање воденог и органског раствора. Предности су: занемарљив губитак органске фазе, мања количина екстракционог средства, елиминирана је могућност формирања стабилних емулзија, могуће је третирање веома разблажених раствора и