

УДК 577.152.344 : 577.151.042

В.Н. НИКАНДРОВ, д-р биол. наук, профессор
профессор кафедры биотехнологии
Полесский государственный университет,
г. Пинск, Республика Беларусь

Н.С. ПЫЖОВА, канд. биол. наук,
старший научный сотрудник
РНПЦ «Институт эпидемиологии и микробиологии»,
г. Минск, Республика Беларусь

Статья поступила 4 марта 2019г.

ВОЗДЕЙСТВИЕ ОКСИДОРЕДУКТАНТОВ НА ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ *IN VITRO*

Обобщены результаты собственных многолетних исследований. На основе выдвинутой нами концепции «кислород-зависимого протеолиза» исследовано воздействие соединений окислительно-восстановительного характера на протеолитические реакции.

*Установлено что в присутствии *p*-бензохинона, K_3FeCN_6 , метиленового синего, феназинметосульфата, *NAD*, рибофлавина в концентрации 10^{-6} – $1M$ изменяются плазминоген-активаторная функция стрептокиназы, урокиназы (ЕС 3.4.21.73), фибринолитическая активность трипсина (ЕС 3.4.21.4), α -химотрипсина (ЕС 3.4.21.1), папаина (ЕС 3.4.22.2), пепсина (ЕС 3.4.23.1). Характер изменений зависит от конкретного энзима и оксидоредуктанта. *NAD* и рибофлавин могут, в известной мере, рассматриваться специфическими ингибиторами стрептокиназы. Однако их эффект проявился в концентрациях, превосходящих реально существующие в организме.*

*Изучено действие систем Cu^{2+} -лиганд (2-метил-1,4-нафтохинон-3-сульфонат *Na*, никотиновая кислота, *Gly-Gly*, лизин, рибофлавин). Все использованные лиганды снимали ингибиторный эффект меди. Более того, комплекс ионов меди с *Gly-Gly* в концентрации $10^{-4} M$ вызвал увеличение активности стрептокиназы на 18%. Следует полагать, что создание специфических ингибиторов стрептокиназы на основе ее функциональной модели вряд ли целесообразно в дальнейшем.*

Низкомолекулярные соединения фенольной природы слабо влияли на активаторную функцию стрептокиназы. Лишь фенол и гидрокситриптамин угнетали ее на 28 и 91–100% соответственно.

Соединения полифенольной природы: 6 образцов диазолигнина и 3 образца лигносульфонатов являлись эффективными ингибиторами стрептокиназы и пепсина. На фибринолитическую активность трипсина и α -химотрипсина они существенно не влияли, Сдвиги активности папаина и урокиназы зависели от конкретного образца и проявились лишь при действии диазолигнинов. В присутствии лигносульфонатов резко возрастала фибринолитическая активность образцов трипсиногена. Степень активации его не уступала описанной ранее в присутствии ионов Ca^{2+} или при обработке H_2O_2 .

Проведенные исследования также четко демонстрируют возможность создания нетрадиционных ингибиторов протеолиза, о которой впервые было заявлено ранее в наших кратких сообщениях в 1991–1998 годах.

Ключевые слова: протеиназы, стрептокиназа, фибринолитическая активность, плазминоген-активаторная способность, низкомолекулярные оксидоредуктанты, комплексы Cu^{2+} -лиганды, фенольные соединения, водоростровимые производные лигнина

NIKANDROV V.N., Doctor of Biol. Sc. Habil., Professor of Biochemistry
Professor of Department of Biotechnology,
Polesky State University, Pinsk, Republic of Belarus

PYZHOVA N.S., Cand. of Biol. Sc.,
Senior Researcher
The Republican Research and Practical Center
for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Republic of Belarus

EFFECT OF OXIDOREDUCTANS ON PROTEOLYTIC PROCESSES IN VITRO

Results of own long-term researches are generalized. On the basis of the "oxygen-dependent proteolysis" concept which was put forward by us, the effect of the number of oxido-reductants on proteolytic reactions was studied.

*It was established that in the presence of 10^{-6} – $1M$ of *n*-quinone, K_3FeCN_6 , methylene blue, phenazinemethosulfate, NAD, riboflavin the plasminogen-activating function of streptokinase, urokinase (EC 3.4.21.73), fibrinolytic activity of trypsin (EC 3.4.21.4), α -chymotrypsin (EC 3.4.21.1), papain (EC 3.4.22.2), pepsin (EC 3.4.23.1) were changed. The change nature was depended on concrete enzyme and the oxido-reductant. Riboflavin and NAD can be considered as specific streptokinase inhibitors, to a certain extent. However, their effect was shown in the concentration which are surpassing real-life in the organism.*

The action of Cu^{2+} ligand (2-methyl-1.4-naphthoquinone-3-sulphonate Na, nicotinate, Gly-Gly, lysine, riboflavin) systems was studied. All used ligands removed the inhibitory effect of copper. Moreover, the complex of copper ions-Gly-Gly in 10^{-4} M concentration was caused the increase of streptokinase activity by 18%. It is necessary to believe that creation of streptokinase specific inhibitors on the basis of its functional model is hardly expediently in future.

The phenolic low-molecular weight compounds were poorly influenced on the streptokinase activating function. Only phenol and hydroxitryptamin oppressed it for 28 and 91–100% respectively.

The polyphenolic compounds: 6 samples of a diazolignin and 3 samples of lignosulfonates were effective inhibitors of streptokinase and pepsin. They didn't significantly affect fibrinolytic activity of trypsin and α -chymotrypsin. And the shifts of papain and urokinase activity depended on a concrete sample and only under diazolignins action were shown. In the presence of lignosulfonates the fibrinolytic activity of trypsinogen was sharply increased. The activation extent of it didn't concede like in the presence of Ca^{2+} ions or at H_2O_2 processing as it was described earlier

The conducted researches also legibly show a possibility for creation of nonconventional inhibitors of a proteolysis/ Such possibility for the first time it was stated in our short communications earlier, in 1991–1998.

Keywords: *proteinases, streptokinase, fibrinolytic activity, plasminogen-activating ability, low-molecular oxido-reductants, Cu^{2+} -ligand complexes, phenolic compounds, water-soluble lignin derivates*

Введение. В обеспечении жизнедеятельности и ее регуляции практически всех живых организмов чрезвычайно важную роль играют протеолитические реакции, по своему значению не уступая окислительно-восстановительным процессам. Даже целый ряд так называемых автономных нуклеопротеинов–вирусов наделен протеолитическими ферментами.

В основе фактически всех основных патологических процессов также лежат протеолитические реакции, играющие иницирующую

роль или обеспечивая развертывание комплекса патогенетических механизмов. Здесь следует напомнить также о ряде патогенных микроорганизмов, протеолитические ферменты которых выполняют функции факторов патогенности.

Во многих сферах деятельности человека, включая фармацию, медицину, ветеринарию, сельское хозяйство, перерабатывающую промышленность и ряд других, препараты протеолитических ферментов используются в возрастающих объемах.

Тем не менее, природа протеиназного катализа, а также многие аспекты регуляции остаются далекими от полной ясности.

В период 1983–2010 годов нами была развита концепция кислород-активируемого протеолиза, суть которой заключалась в непосредственном участии в протеиназном катализе собственных генерируемых молекулой протеиназы активных форм кислорода (в частности, супероксидного радикала – O_2^-), а аутоактивация зимогенов – также в способности их молекул генерировать указанный радикал. Эти результаты обобщены в наших статьях [1–6].

Впервые термин «**кислород-зависимый путь активации плазминогена**» был использован нами при трактовке плазминоген-активаторной функции стрептокиназы [7, 8]. Основанием послужили:

- резкое замедление иницируемого стрептокиназой лизиса фибринового сгустка при удалении кислорода;
- обнаружение у стрептокиназы супероксид-конвергирующей активности;
- полное подавление ее плазминоген-активаторной способности перехватчиками супероксидного радикала;
- возможность активации плазминогена источниками активных форм кислорода;
- способность молекулы зимогена генерировать супероксидные радикалы.

Дальнейшее развитие этой идеи при изучении других зимогенов и протеиназ позволило распространить ее на протеолитические реакции в целом, и в 1988 году нами был впервые введен термин «**кислород-зависимый протеолиз**» [9].

Кратко изложенная здесь концепция явилась толчком к исследованию воздействия соединений окислительно-восстановительного характера на протеолитические реакции. До начала наших работ в литературе практически отсутствовали сообщения о действии оксидоредуктантов на эти реакции.

Нами были предприняты многоплановые исследования, результаты которых отражены лишь в ряде кратких сообщений [10–14], тем не менее позволивших утверждать о возможности создания нетрадиционных ингибиторов протеолиза, по своей природе отличающихся от пептидов-квасисубстратов протеиназ и специфических ингибиторов активного

центра типа фосфорорганических соединений, тяжелых металлов и белков-ингибиторов.

В настоящей статье подробно представлены экспериментальные результаты этих работ (детали методического плана были описаны ранее [2, 15,16]).

Результаты и их обсуждение. Из использованных оксидоредуктантов наиболее сильное влияние на активаторную функцию стрептокиназы оказал бензохинон. В концентрации 10^{-2} М он вызвал полное подавление иницируемого стрептокиназой лизиса фибринового геля. Угнетение этого процесса обусловило и добавление метиленового синего, феназинметосульфата и никотинамиддениндинуклеотида (NAD) в конечной концентрации 10^{-1} М – на 37, 65 и 80% соответственно (таблица 1).

Нужно отметить, что никотинамид не оказывал действие на активаторную функцию стрептокиназы:

<u>Исследуемый образец (n= 5)</u>	<u>Площадь зон фибринолиза, мм²</u>
Стрептокиназа (контроль)	515 ± 32
+ никотинамид,	
10 ⁻² М	541 ± 25 P > 0,5
10 ⁻³ М	462 ± 19 P > 0,1

Ранее же было показано, что другой структурный компонент NAD – ADP (или AMP) также не изменял ее активаторную функцию [20]. Следовательно, ингибирующее действие NAD обусловлено свойствами молекулы нуклеотида в целом.

Увеличение концентрации метиленового синего до 1 М вело к подавлению указанного процесса на 90%. Добавление в реакционную систему рибофлавина в концентрации 10^{-4} и 10^{-3} М также сопровождалось снижением плазминоген-активаторной функции стрептокиназы на 33 и 52% соответственно. Дальнейшее увеличение концентрации рибофлавина было ограничено его недостаточной растворимостью. Феррицианид не оказал заметного изменения активаторной функции стрептокиназы даже в максимальной концентрации (таблица 1).

В этом плане бензохинон представляется нам не столько проявляющим свойства оксидоредуктанта, как модифицирующим функциональные группы.

Таблица 1 – Изменения иницированного стрептокиназой фибринолиза при добавлении оксидоредуктантов ($n=5$; метод лизиса фибриновых пластин) по [10,17,18]

Исследуемые соединения, М	Площадь зон фибринолиза, мм ²	Исследуемые соединения, М	Площадь зон фибринолиза, мм ²
Стрептокиназа (контроль)	482 ± 20	+ феназинметосульфат, ($E^1_0 = + 0,080$ В)	
+ <i>n</i> -бензохинон, ($E^1_0 = + 0,285$ В)		10^{-4}	496 ± 15
10^{-4}	480 ± 11	10^{-3}	506 ± 19
10^{-3}	434 ± 15	10^{-2}	530 ± 35
10^{-2}	0*	10^{-1}	169 ± 9*
+ K_3FeCN_6 , ($E^1_0 = + 0,360$ В)		+ <i>NAD</i> , ($E^1_0 = - 0,320$ В)	
10^{-3}		10^{-4}	490 ± 16
10^{-2}	485 ± 12	10^{-3}	503 ± 16
10^{-1}	479 ± 19	10^{-2}	475 ± 21
+ метиленовый синий, ($E^1_0 = + 0,011$ В)	460 ± 21	10^{-1}	96 ± 4*
10^{-4}		+ рибофлавин, ($E^1_0 = - 0,208$ В)	
10^{-3}	465 ± 20	10^{-6}	435 ± 32
10^{-2}	434 ± 29	10^{-5}	386 ± 18
10^{-1}	430 ± 21	10^{-4}	323 ± 12*
1	308 ± 21*	10^{-3}	231 ± 17*
	50 ± 3*		

Примечание – Здесь и далее * – изменения статистически достоверны при $P \leq 0,05$; значения E^1_0 приведены по [19]

Было установлено, что модификация части свободных H_2N -групп молекулы стрептокиназы ведет к ее инактивации [21, 22].

Последующие эксперименты на протеиназах различного типа показали (в тексте ниже приведены только статистически достоверные изменения, $P \leq 0,05$), что добавление **бензохинона** в концентрации 10^{-2} М сопровождалось полным подавлением фибринолитической активности папаина (ЕС 3.4.22.2), а плазминоген-активаторной функции урокиназы (ЕС 3.4.21.73) и фибринолитической активности трипсина (ЕС 3.4.21.4), α -химотрипсина (ЕС 3.4.21.1) на 70, 29 и 53% соответственно, практически не оказав влияния на активность пепсина (ЕС 3.4.23.1) (в контроле величина фибринолитической активности составила – мм², $n=5$: трипсина – 534 ± 24, α -химотрипсина – 445 ± 18, папаина – 257 ± 17, пепсина – 1078 ± 32, плазмина – 482 ± 19; активаторной функции урокиназы – 639 ± 25). Активность папаина полностью подавлялась уже при концентрации эфффектора 10^{-2} М. При этой концентрации бензохинона активность остальных протеиназ снижалась лишь частично в последовательности:

пепсин < трипсин < α -химотрипсин < урокиназа. Однако активность и этих протеиназ полностью угнеталась бензохиноном в концентрации 10^{-1} М (рисунок 1). Действие бензохинона, по-видимому, может быть обусловлено его способностью достаточно легко взаимодействовать с HS-группами [23]. Тогда понятно более сильное действие на активность папаина. Однако это не объясняет ингибирование функции стрептокиназы, которая вообще лишена остатков цистеина.

Внесение в реакционную систему **феррицианида калия** вело к полному подавлению фибринолитической активности лишь папаина также при концентрации 10^{-2} М, тогда как даже в максимальной концентрации не изменяло фибринолитическую активность трипсина и α -химотрипсина, а активность пепсина и активаторную функцию урокиназы угнетало только частично – на 47 и 41% соответственно. Фибринолитическая же активность плазмина (ЕС 3.4.21.7) при добавлении этого эфффектора даже возросла на 22% (рисунок 1).

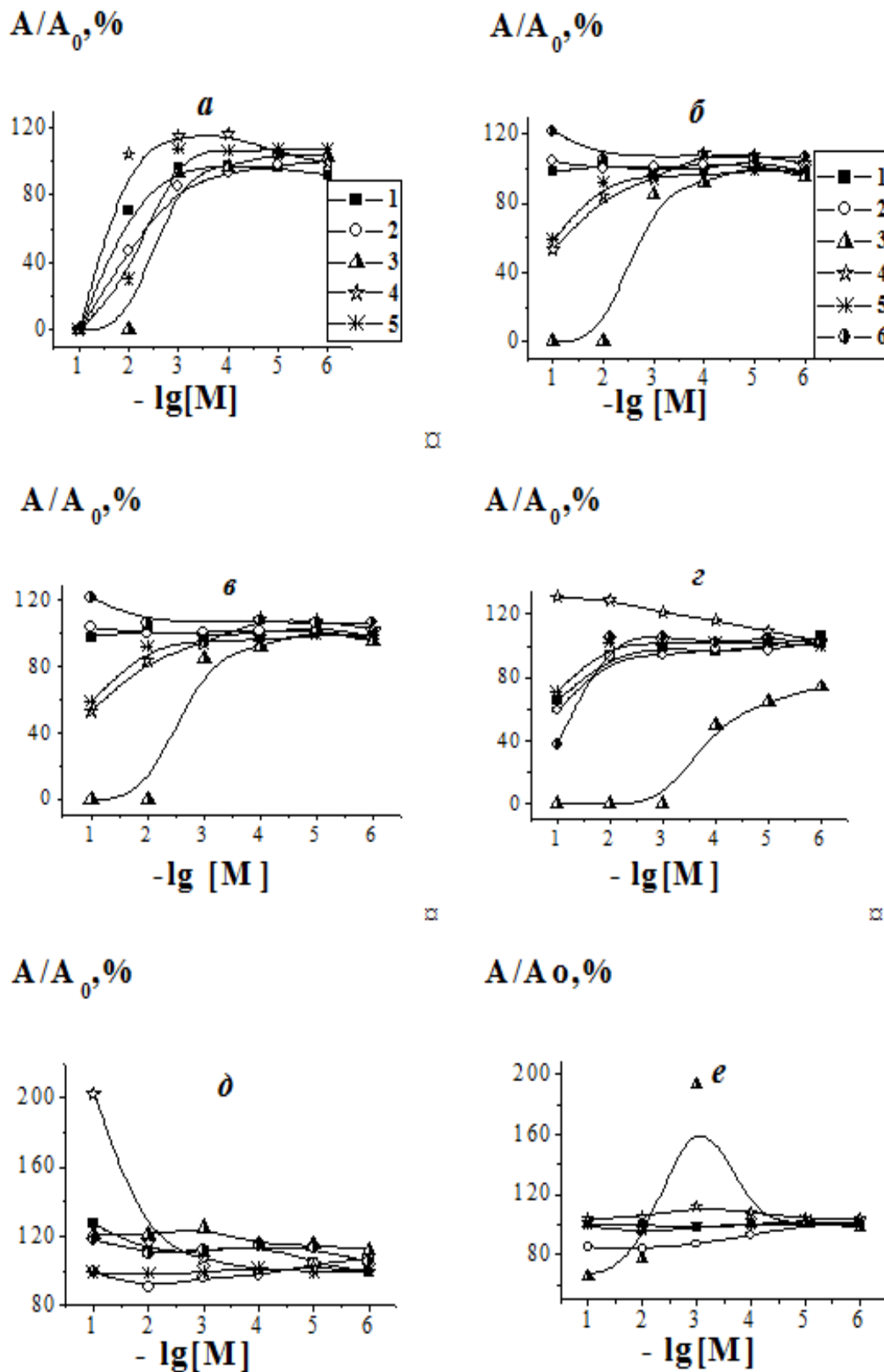


Рисунок 1 – Изменения (% к контролю, принятому за 100%) фибринолитической активности трипсина (1), α -химотрипсина (2), папаина (3), пепсина (4), плазмина (5) и плазминоген-активаторной функции урокиназы (6) при добавлении *n*-бензохинона (а), K_3FeCN_6 (б), метиленового синего (в), феназинметосульфата (г), NAD (д) и рибофлавина (е); по [14, 17, 18]

Эффект **метиленового синего** на активность протеиназ был схожим с таковым феррицианида. Полное подавление фибринолитической активности папаина наблюдалось в присутствии данного эффектора также в конечной концентрации 10^{-2} М. Активаторная функция урокиназы и фибринолитическая активность пепсина при максимальной концентрации оксидоредуктанта снизились лишь частично: на 46 и 42% соответственно, а изменения активности сериновых протеиназ не превышали 12%.

Несколько иная картина проявилась при действии **феназинметосульфата**. Наиболее чувствительным к нему был по-прежнему папаин – его действие полностью подавлялось эффектором уже в конечной концентрации 10^{-3} М. Активность остальных протеиназ (за исключением пепсина) при максимальной концентрации оксидоредуктанта угнеталась на 35–41%. Наиболее сильное действие эффектора проявилось на активность плазмينا: подавление достигало 73%. По-видимому, угнетение данным эффектором активаторной функции стрептокиназы и урокиназы обусловлено, скорее изменениями активности образующегося плазмينا. Вместе с тем, феназинметосульфат в диапазоне концентраций 10^{-4} – 10^{-1} М повышал активность пепсина на 16–31%.

Эффект *NAD* был иного плана. За исключением α -химотрипсина и урокиназы – нечувствительных к данному соединению, активность остальных протеиназ возрастала на 18–25%, а пепсина – в 2 раза.

Добавление **рибофлавина** к протеиназам вызвало заметные сдвиги активности лишь со стороны папаина: увеличение ее в 1,9 раза при концентрации 10^{-3} М и снижение на 23 и 34% при концентрациях эффектора 10^{-2} и 10^{-1} М соответственно, тогда как сдвиги активности остальных протеиназ не превышали 15%.

В этой части исследований нами было обращено внимание, прежде всего, на специфичность эффекта оксидоредуктантов на стрептокиназу. Результаты свидетельствуют о том, что *NAD* и рибофлавин могут, в известной мере, рассматриваться специфическими ее ингибиторами. Однако их эффект проявился в концентрациях, намного превосходящих реально существующие в организме. Вместе с тем, нужно учесть, что в клетках

стрептококка активная стрептокиназа обнаружена лишь во фракции мембран [24,25]. Поэтому исключить влияние *NAD* на активность стрептокиназы *in situ* нельзя.

Как было упомянуто выше по тексту, нами была обнаружена супероксид-конвергирующая функция стрептокиназы и представлены доказательства существенности супероксидного радикала для активации плазминогена [26]. В этой связи исследовано **действие систем Cu^{2+} -лиганд**. Как известно, ионы меди входят в состав *Cu,Zn*-супероксиддисмутазы, и они способны с высокой скоростью взаимодействовать с супероксидным радикалом [27]. Вместе с тем, нами была установлена неэффективность данной супероксиддисмутазы как ингибитора функции стрептокиназы [26]. Прежде всего, это может быть обусловлено высокой агрессивностью протеолитической системы по отношению к такой дисмутазе.

Исследование влияния на плазминоген-активаторную функцию стрептокиназы Cu^{2+} и избранных лигандов показали, что лишь ионы меди в концентрации 10^{-2} и 10^{-1} М подавляли активность стрептокиназы на 50 и 100% соответственно (таблица 2). Лизин также не оказал влияния. В более низкой концентрации ионы меди были неэффективны вследствие связывания значительной части катионов белками реакционной системы.

Однако полученные системы Cu^{2+} -лиганд никакого ингибиторного действия на активность стрептокиназы не оказали (таблица 3).

Во всех случаях использованные лиганды снимали ингибиторный эффект меди. Кроме того, комплекс ионов меди с глицином в концентрации 10^{-4} М вызвал увеличение активности стрептокиназы на 18%. Между тем, в литературе имеются сообщения о наличии у комплексов меди с лизином и глицил-глицином супероксиддисмутазной активности: 90 мкМ комплекса *Cu(Lys)₂* ингибировали восстановление нитротетразолиевого синего на 50% в системе, содержащей в 2,5 мл реакционной смеси 100 мкл насыщенного раствора KO_2 в диметилсульфоксиде [30].

Эти результаты могут свидетельствовать также в пользу весьма эффективного взаимодействия стрептокиназы с супероксидным радикалом, весьма возможно, способного конкурировать с супероксиддисмутазой.

Таблица 2 – Влияние ионов меди (II) и ее лигандов на инициированный стрептокиназой фибринолиз ($n = 6$; метод лизиса фибриновых пластин), по [10,11,17,18]

Исследуемые соединения, М	Площадь зон фибринолиза, мм ²
Стрептокиназа (контроль)	445 ± 19
+ Cu^{2+} , ($E^1_0 = + 0,153$ В)	
	10^{-4} 427 ± 23
	10^{-3} 436 ± 25
	10^{-2} 223 ± 15*
	10^{-1} 0*
+ 2-метил-1,4-нафтохинон-3-сульфонат Na (вика-сол), ($E^1_0 = + 0,463$ В)	
	$5 \cdot 10^{-3}$ 409 ± 31
	10^{-2} 444 ± 22
+ никотиновая (пиридин-карбоновая) кислота,	
	10^{-4} 441 ± 22
	10^{-3} 441 ± 36
	10^{-2} 446 ± 29
	+ <i>Gly-Gly</i> , 467 ± 40
	10^{-4} 445 ± 18
	10^{-3} 498 ± 24
	10^{-2}

Примечание – Значения E^1_0 приведены по [19, 23, 28, 29]

Таблица 3 – Изменения активаторной функции стрептокиназы при добавлении ионов меди (II) с ее лигандами ($n = 6$; метод лизиса фибриновых пластин), по [10,11,17,18]

Исследуемые соединения, М	Площадь зон фибринолиза, мм ²
Стрептокиназа (контроль)	490 ± 19
+ $Cu(Lys)_2$,	
	10^{-3} 441 ± 22
+ $Cu(Gly-Gly)$,	
	10^{-4} 578 ± 30*
	10^{-3} 515 ± 25
	10^{-2} 534 ± 30
+ (Cu^{2+} , 10^{-6} + викасол, $5 \cdot 10^{-3}$),	559 ± 27
	495 ± 22
+ (Cu^{2+} , 10^{-5} никотиновая кислота, 10^{-5}),	515 ± 18
+ (Cu^{2+} , 10^{-3} никотиновая кислота, 10^{-3}),	491 ± 24
+ (Cu^{2+} , 10^{-2} никотиновая кислота, 10^{-2}),	
+ (Cu^{2+} , 10^{-6} + рибофлавин, 10^{-4})	481 ± 17

Более того, ионы Cu^{2+} полностью снимали в столь небольшой концентрации ингибиторный эффект рибофлавина. Это вряд ли обусловлено функционированием редокс-пары, хотя E_0 для $Cu^{2+}/Cu^{+} = 0,153$ В, а E_0 взаимодействия рибофлавина с электроном – $0,167$ В [28,31]. Более вероятно образование комплексов Cu^{2+} с рибофлавином [31], что изменяет свойства его молекулы, или же взаимодействие ионов меди с молекулой стрептокиназы и локальные перестройки ее структуры, возможно, делающие активацию плазминогена индифферентной к рибофлавину.

Можно полагать, что попытки создания специфических ингибиторов стрептокиназы на основе функциональной модели стрептокиназы вряд ли целесообразны в дальнейшем.

Поскольку использованный *n*-бензохинон способен с высокой скоростью взаимодействовать с супероксидными радикалами, дальнейшие исследования были проведены с

рядом соединений фенольной природы, в том числе полимерного характера – **лигнинна**.

Низкомолекулярные соединения, за исключением фенола и гидрокситриптамина, слабо влияли на активаторную функцию стрептокиназы. Лишь **фенол и гидрокситриптамин** угнетали ее на 28 и 91– 100% соответственно (таблица 4).

По-видимому, воздействие эффекторов на функцию стрептокиназы зависит не только от взаимодействия с супероксидным радикалом, но и от возможности проникновения в функционально значимые области молекулы белка – стрептокиназы и (или) плазминогена. Косвенно это подтверждается в экспериментах с трипсином и α -химотрипсином, частично лабильзованными 8 М мочевиной, фибринолитическая активность которых в начальный период фибринолиза подавлялась нитротетразолиевым синим, тогда как нативные протеиназы были нечувствительны к этому перехватчику супероксидного радикала [5].

Таблица 4 – Влияние соединений фенольной природы и биогенных аминов на инициированный стрептокиназой фибринолиз ($n = 6$; метод лизиса фибриновых пластин), по [10,17,18]

Исследуемые соединения, М	Площадь зон фибринолиза, мм ²
Стрептокиназа (контроль)	464 ± 28
+ фенол, 0,3	334 ± 15*
+ DL-тирозин, 10 ⁻³	492 ± 30
+ гидрохинон, 10 ⁻²	441 ± 25
+ пирокатехин, 10 ⁻²	404 ± 32
+ 3-гидрокситирамин, 10 ⁻¹	399 ± 37
+ гистамин, 10 ⁻²	436 ± 21
+ серотонин-креатинсульфат, 10 ⁻¹	427 ± 25
	43 ± 5*
	0*
	478 ± 25
	487 ± 22
	492 ± 31
	427 ± 29
	459 ± 10

Поскольку тирамин является биогенным амином, проведено сравнение его эффекта с гистамином и серотонином. Однако эти амины не были эффективны.

Дальнейшие исследования были проведены с лигнином. Известно, что он нерастворим в воде и некоторых относительно гидрофильных растворителях. Это ограничение было снято путем диазотирования лигнина и приготовления лигносульфонатов. Исследованы 6 образцов диазолигнина и 3 образца лигносульфонатов, любезно предоставленных доктором хим. наук профессором М.А. Зильберглейтом и, однако, принципиально имевших близкие характеристики (таблица 5).

Несмотря на близость состава и свойств образцов, их эффекторная способность различалась. Так, образцы диазолигнина № 1 и № 2 резко угнетали активность пепсина и

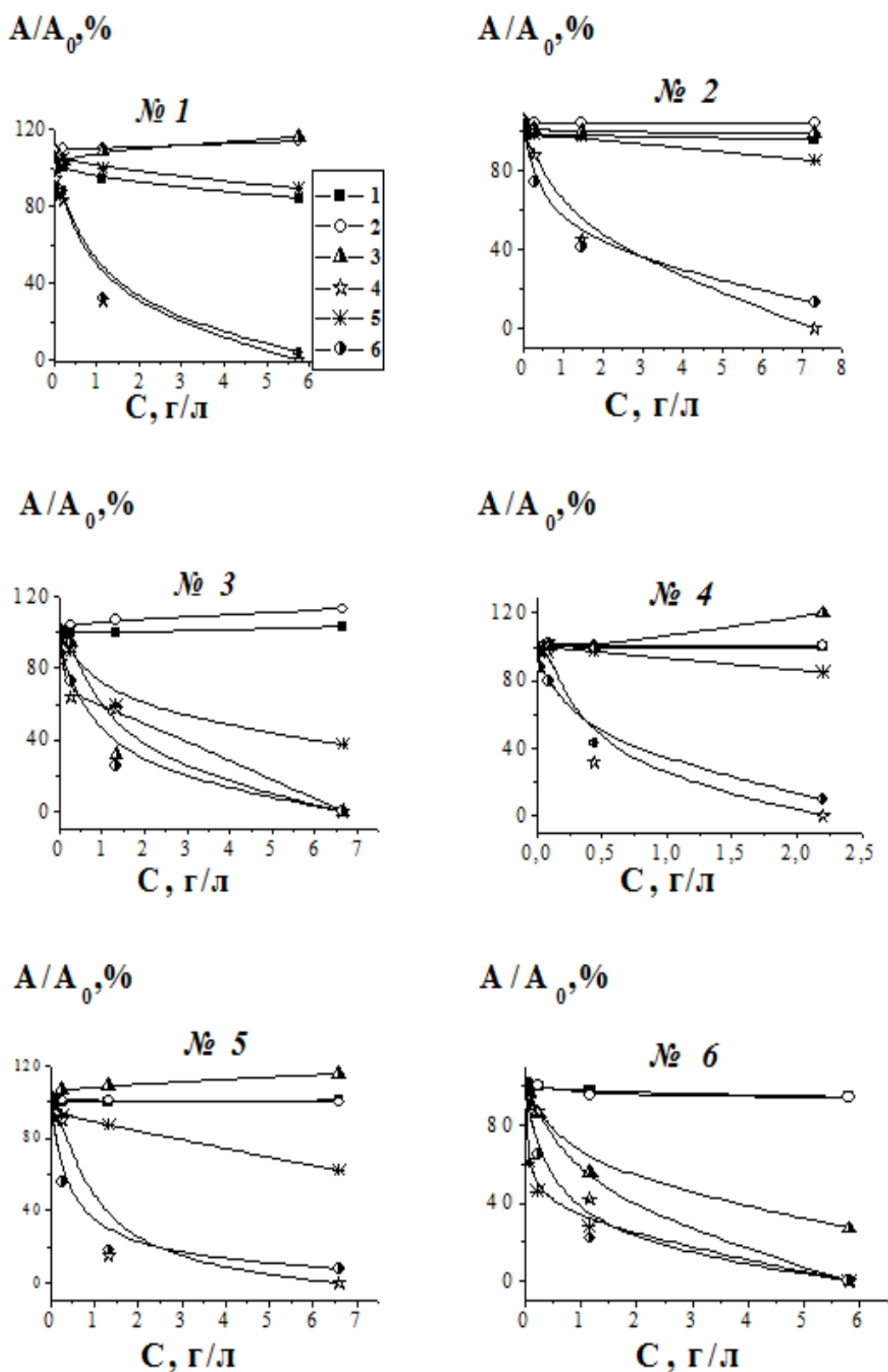
активаторную функцию стрептокиназы, начиная с концентрации 1 г/л, и до полного подавления при более высоких концентрациях. При этом образец № 1 отличался более сильным действием. Активность остальных энзимов изменялась мало: даже при максимальной концентрации сдвиги не превышали 16 % (рисунок 2).

Образец № 3 вызвал полное угнетение активности пепсина и, кроме того, существенное (на 41–63%) снижение активаторной функции урокиназы. Отличительной особенностью образца № 4 оказалось, пожалуй, самое сильное ингибиторное действие на пепсин и стрептокиназу – оно достигало максимума уже при концентрации 2 г/л ($4 \cdot 10^{-4}$ М). При этом активаторная функция урокиназы снижалась лишь на 15%, а активность папаина возрастала на 20%.

Таблица 5 – Химический состав и молекулярная масса образцов химически модифицированного лигнина, по [17,31]

Об-разец №	Элементный состав, %					М. мас. кДа	Функциональные группы, %			
	C	H	N	S	O		HO ₃ S-	HO-	H ₃ CO-	$\frac{HCOO-}{-C=O}$
Диазотированный лигнин										
1	52,6	4,4	7,8	8,9	26,3	5,0	22,5	4,6	9,9	<u>3,0</u> 3,0
2	52,6	4,4	7,8	8,9	26,3	5,0	22,5	4,6	9,9	<u>3,0</u> 3,0
3	52,6	4,0	10,0	8,0	25,4	5,0	22,3	4,7	10,0	<u>3,0</u> 3,0
4	52,6	4,4	8,0	8,7	26,3	5,0	22,3	4,6	10,0	<u>3,1</u> 3,0
5	52,6	4,0	10,0	8,0	25,4	5,0	22,5	4,7	9,8	<u>3,0</u> 3,0
6	52,6	4,0	10,0	8,0	25,4	5,0	22,5	4,7	9,8	<u>3,0</u> 3,0
Полисульфонаты лигнина										
A	66,4	6,0	0	0,5	27,1	4,0	1,6	10,4	15,1	<u>1,5</u> 2,4
Б	66,4	6,0	0	0,5	27,1	4,0	1,6	10,5	15,0	<u>1,6</u> 2,3
В	66,4	6,0	0	0,5	27,1	4,0	1,6	10,3	15,2	<u>1,5</u> 2,4

Примечание – Элементный состав определен после сжигания в токе N₂ путем волюметрического определения CO₂ и H₂O, азот – по Кьельдалю, серу – по Шенигеру, кислород – расчетным методом [33,34]; мол. массу определяя гель-хроматографией на Сефадексе G-75 [35], содержание функциональных групп – в соответствии с рекомендациями [36].



Рисунк 2 – Змяненні (% к кантролю, прынятому за 100%) фібрыналітычнай актывнасці трыпсіна (1), α -хіматрыпсіна (2), папаіна (3), пепсіна (4), плазміноген-актывацыйнай функцыі урокіназы (5) і стрептокіназы (6) пры дабаўленні апрабкоў №№ 1–6 дыазатыраванага лігніна; по [1, 10, 14, 17, 18, 32]

Действие образца № 5 было схожим с таковым образца № 3. Однако добавление его не сопровождалось угнетением активности папаина (она даже увеличилась на 16%), а снижение активности урокиназы составило 38%.

Полное угнетение активности урокиназы (как пепсина и стрептокиназы) наблюдалось лишь при действии образца № 6, вызвавшего при двух максимальных концентрациях диазолигнина также снижение активности папаина на 44 и 72%.

Как видно, диазотированные лигнины мало влияли на активность трипсина и α -химотрипсина. Применительно к стрептокиназе, наибольшая специфичность, на наш взгляд, присуща образцам №№ 1, 2 и 4. Соединение № 4 обладало наиболее сильным действием (здесь следует отметить, что концентрация диазолигнина в образцах составляла, г/л: № 1 – 11,5, № 2 – 14,6, № 3 – 13,3, № 4 – 4,4, № 5 – 13,2, № 6 – 11,6).

Все образцы диазотированного лигнина принципиально не различались по мол. массе, элементному составу и содержанию функциональных групп. Однако образцы №№ 1, 2 и 4 имели несколько меньше азота и

получены при соотношении лигнин: соль диазония на 20% большем в сравнении с остальными образцами. Это позволило обосновать режимы получения специфических ингибиторов стрептокиназы [37]. Все образцы являлись также эффективными ингибиторами пепсина.

Исследованные образцы лигносульфонатов имели практически идентичные элементный состав, молекулярную массу и содержание функциональных групп (таблица 5). Образцы *Б* и *В* являлись *H*-формами лигносульфоната, полученными соответственно с использованием смолы КАУ-2 или подкисления с последующим диализом. Образец *А* – натриевая соль лигносульфоната.

Все три образца лигносульфонатов практически в одинаковой мере подавляли активаторную функцию стрептокиназы (рисунок 3). В максимальной концентрации угнетение функции стрептокиназы образцами *А*, *Б* и *В* составило, соответственно, 88–86%. На фибринолитическую активность трипсина и активаторную функцию урокиназы лигносульфонаты влияния практически не оказали – сдвиги не превышали 15–17%.

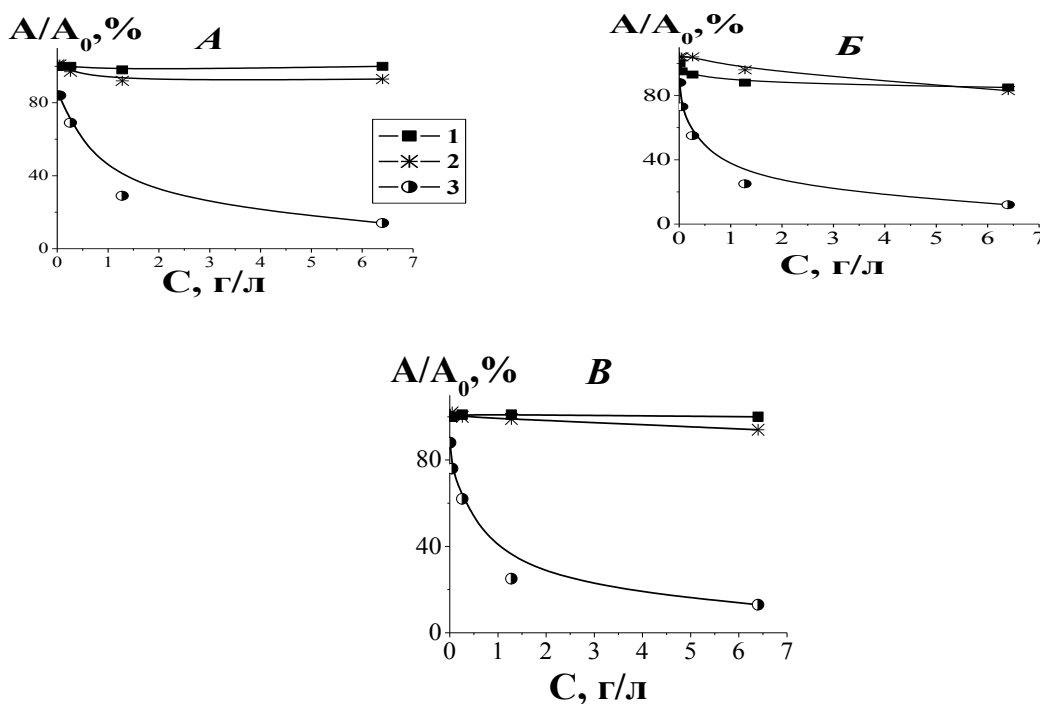


Рисунок 3 – Изменения (% к контролю, принятому за 100%) фибринолитической активности трипсина (1), плазминоген-активаторной функции урокиназы (2) и стрептокиназы (3) при добавлении образцов №№ А–В полисульфонатов лигнина; по [17, 18, 38]

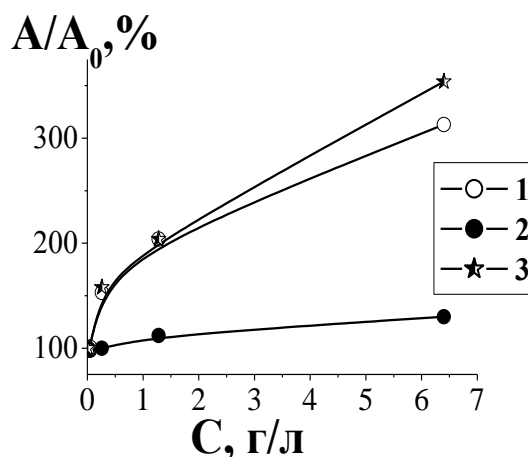


Рисунок 4 – Изменения (% к контролю, принятому за 100%) фибринолитической активности трипсиногена при воздействии лигносульфонатов в натриевой (1) или H-форме (2,3); по [17]

Мы не проводили специальных исследований влияния лигносульфонатов на активность пепсина. Однако вся совокупность изложенных выше по тексту материалов позволяет думать, что эти соединения являются и эффективными ингибиторами пепсина.

Вместе с тем, оказалось, что в присутствии лигносульфоната резко возрастала фибринолитическая активность образцов трипсиногена (рисунок 4). Причем степень активации не уступала таковой, которая описана нами ранее в присутствии ионов Ca^{2+} или при обработке H_2O_2 [15].

Этот эффект нуждается в дальнейшем изучении. Вместе с тем, производные лигнинов имеют достаточно сложную структуру, что создает ряд возможностей для генерирования активных форм кислорода, способных, как было показано ранее, активировать ряд зимогенов протеиназ, включая трипсиноген [38].

Заключение. Итак, представленные результаты являются косвенным свидетельством реализации окислительно-восстановительных процессов, участия активных форм кислорода в каталитической функции протеиназ. Проведенные исследования также четко демонстрируют возможность создания нетрадиционных ингибиторов протеолиза, о которой впервые было заявлено ранее в наших кратких сообщениях [10–14] и основанной на концепции кислород-зависимого протеолиза. Мы полагаем, что

это направление в дальнейшем получит развитие в нескольких аспектах.

Судя по более поздней литературе, эта идея нашла воплощение при создании ингибиторов полифенольного типа аспартильной протеиназы вируса иммунодефицита человека (ЕС 3.4.23.16), являющейся близким структурным аналогом пепсина [39].

Одним из них является также выяснение действия лекарственных препаратов различных групп на процессы протеолиза. Этот вопрос возникал и раньше, на нескольких хорошо известных лекарственных препаратах такая возможность была продемонстрирована [1]. Однако эта сторона их воздействия на протеолитические системы организма остается пока неизученной.

Авторы выражают глубокую благодарность доктору хим. наук, профессору М.А. Зильберглейту за оказанную помощь в работе, а также доктору хим. наук, профессору Д.И. Метелице, доктору хим. наук, профессору Б.И. Курганову и доктору хим. наук, профессору М.А. Розенфельду за плодотворную дискуссию.

Список литературы

1. Никандров, В. Н. Кислородзависимые реакции протеолиза: сущность гипотезы, теоретические и прикладные аспекты / В. Н. Никандров // Профилактика и лечение инфекционных и паразитарных заболеваний: матер. юбилейной конф. БелНИИ

- эпидемиологии и микробиологии / Наука и техника; редкол. П.Г. Рытик [и др.]. – Минск, 1995. – С. 274–286.
2. Nikandrov, V. N. Effect of active oxygen species scavengers on fibrinolytic activity of some proteinases / V. N. Nikandrov, N. S. Pyzhova // *Thrombosis Res.* – 1996. – Vol. 88, No 4. – P. 303–312.
 3. Никандров, В. Н. Кислородзависимый путь активации плазминогена и новые физико-химические механизмы протеолиза / В. Н. Никандров, Н. С. Пыжова // *Известия НАН Беларуси. Серия мед.-биол. наук.* – 2001. – № 1. – С. 54–60.
 4. Nikandrov, V. N. Some unusual manifestation of proteolysis / V. N. Nikandrov, N. S. Pyzhova // *Cell. and Mol. Biol.* – 2006. – Vol. 52, No 4. – P. 30–39.
 5. Никандров, В. Н. Протеолиз как универсальный механизм регуляции биохимических и биологических процессов. Дискуссионные аспекты / В.Н. Никандров, Н. С. Пыжова // *Известия НАН Беларуси. Серия мед. наук.* – 2008. – № 1. – С. 4–22.
 6. Никандров, В. Н. Нетривиальные проявления протеолиза на молекулярном и клеточном уровнях, их фундаментальное и прикладное значение / В. Н. Никандров, Н.С. Пыжова // *Новости мед.-биол. наук.* – 2010. – № 3. – С. 14–28.
 7. Nikandrov, V. N. Activation of plasminogen by streptokinase: the aspects of fibrinolysis regulation / V. N. Nikandrov, N. S. Pyzhova // *Vth International Meeting of the Danubian League against Thrombosis and Haemorrh. Diseases: Abstracts.* Erfurt, May, 20–22; 1987. – Erfurt, 1987. – P. 76.
 8. Nikandrov, V. N. The oxygen-dependent pathway of human plasminogen activation / V. N. Nikandrov, N. S. Pyzhova // *18th FEBS Meeting: Abstracts.* Ljubljana, June 28 – July 3, 1987. – Ljubljana, 1987. – P. 84.
 9. Nikandrov, V. N. Oxygen-dependent processes of proteolysis / V. N. Nikandrov // *14th Intern. Congress of Biochemistry. Abstracts.* – Prague, 1988 – Vol. 1. – P. 60.
 10. Pyzhova, N. S. The conception of oxygen-dependent pathway of plasminogen activation and the streptokinase (SK) inhibitors creation / N. S. Pyzhova, V. N. Nikandrov // *Second Internat. Sumposium on Biochemical Engineering: Abstracts.* Stuttgart, 5–7 March 1991. Stuttgart, 1991. – P. 50.
 11. Никандров, В. Н. Влияние супероксиддисмутазы и Cu^{2+} -содержащих систем, включающих лиганды, на активаторную функцию стрептокиназы / В. Н. Никандров, Н. С. Пыжова // *Актуальные проблемы современной биохимии: сборник материалов конференции; редкол. А. Т. Пикунев [и др.].* – Минск, 1991. – С. 43–44.
 12. Nikandrov, V. N. Oxidoreductants influence on the fibrinolytic activity of proteinases / V. N. Nikandrov, N. S. Pyzhova // *15th Intern. Congress of Biochemistry: Abstracts.* – Jerusalem, 1991. – P. 100.
 13. Nikandrov, V. N. Peculiarities of plasminogen activation by subcellular particles of mouse brain and live / V. N. Nikandrov, N. S. Pyzhova // *Biology of Proteolysis: Abstracts of paper at meeting Cold Spring Harbour Laboratory.* – New York, 1997. – P. 116.
 14. Pyzhova, N. S. Hypothesis of oxygen-dependent proteolysis and a possibility of new approaches to proteolysis inhibitor search / N. S. Pyzhova, V. N. Nikandrov, E. I. Boreko // *XVth EFMC Intern. Sympos. on Medicinal Chemistry: Abstracts.* – Edinburgh, 6–10 September, 1998. – Edinburgh, 1998. – P. 84.
 15. Пыжова, Н. С. Активация трипсиногена быка в присутствии активных форм кислорода / Н. С. Пыжова, В. Н. Никандров // *Докл. АН БССР.* – 1991. – Т. 35, № 12. – С. 1130–1133.
 16. Никандров, В. Н. Роль супероксидного радикала в реализации активаторной функции стрептокиназы / В. Н. Никандров, Н. С. Пыжова, В.И. Вотяков, Ю. Е. Клиггер // *Докл. АН БССР.* – 1987. – Т. 31, № 4. – С. 375–378.
 17. Пыжова, Н. С. Участие активных форм кислорода в процессах протеолиза: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.04 / Н. С. Пыжова; Институт эксп. ботаники им. В.Ф. Купревича АН Белоруссии. – Минск, 1991. – 20 с.
 18. Пыжова, Н. С. Участие активных форм кислорода в процессах протеолиза: ... дис. канд. биол. наук: 03.00.04 / Н. С. Пыжова. – Минск, 1990. – 193 с.
 19. Мецлер, Д. Биохимия / Д. Мецлер. – пер. с англ. под ред. А.Е. Браунштейна. – М.: Мир, 1980. Т.1. – 231 с., Т. 2 – 606 с.
 20. Никандров, В. Н. Влияние адениловых нуклеотидов на активаторную функцию стрептокиназы / В. Н. Никандров, Н. С. Пыжова, В. И. Вотяков // *Бюлл. эксп. биол. мед.* – 1987. – Т. 103, № 7. – С. 49–51.

21. Nikandrov, V. N. Investigation of functional groups of streptokinase molecule / V. N. Nikandrov, O.A. Kazyuchits // 13th Intern. Congress. on Biochemisry: Abstracts. – Amsterdam, 1985. – Vol. 11. – P. 302.
22. Nikandrov, V. N. Chemical modification of streptokinase functional groups / V. N. Nikandrov // Chemical Modification of Enzymes; Eds. V.I. Kurganov et al.: Nova Sci. Publ. Inc. – New York, 1996. – P. 567–614.
23. Физер, Л. Органическая химия. Т. 2 / Л. Физер, М. Физер. – пер. с англ. под ред. С.Н. Вульфсона. – М.: Химия. – 799 с.
24. Никандров, В. Н. Стрептокиназная активность мембран клеток β -гемолитических стрептококков группы С / В. Н. Никандров, Л.С. Рудницкая, Н.Н. Полещук, Г.С. Давыдова // Журнал микроб. эпидемиол. иммунобиол. – 1990. – № 1. – С. 98–100.
25. Никандров, В. Н. Стрептокиназная активность мембран клеток β -гемолитического стрептококка группы С / В. Н. Никандров, Л. С. Рудницкая, Н. Н. Полещук, Г. С. Давыдова // Изв. АН БССР. Сер. биол. наук. – 1990. – № 1. – С. 49–53.
26. Nikandrov, V. N. On the plasminogen-activating function of streptokinase // V.N. Nikandrov// Intern. J. Biochem. – 1992. – Vol. 24, No. 1. – P. 47–53.
27. Пикаев, А. К. Современная радиационная химия. Радиолит газы и жидкостей / А. К. Пикаев. – М.: Наука, 1986. – 440 с.
28. Рабинович, В.А. Краткий химический справочник / В.А. Рабинович, З.Я. Хавин. – Л.: Химия, 1978. – 392 с.
29. Калинин, Ф. Л. Справочник по биохимии / Ф. Л. Калинин, В. П. Лобов, В. А. Жидков. – Киев: Наукова думка, 1971. – 1015 с.
30. Yones, M. Inhibition of nitroblue tetrazolium reduction by cuprein (superoxide dismutase), Cu(lyr)₂ and Cu(lys)₂ / M. Yones, U. Weser // FEBS Lett. – 1976. – Vol. 61, No. 2. – P. 209–212.
31. Ксенжек, О. С. Электрохимические свойства обратимых биологических редокс-систем / О. С. Ксенжек, О. С. Петрова. – М.: Наука, 1986. – 152 с.
32. Зильберглейт, М. А. Исследование делигнификации древесины водными растворами уксусной кислоты. 11. Потребительские свойства уксуснокислых лигнинов / М. А. Зильберглейт [и др.] // Химия древесины. – 1989. – № 6. – С. 43–48.
33. Лебедев, П. Т. Методы исследования кормов, органов и тканей животных. 2-е изд./ П. Т.Лебедев, А. Т. Усович. – М.: Россельхозиздат, 1969. – 467 с.
34. Губен-Вейль, И. Методы органической химии / И. Губен-Вейль. – М.: Химия, 1967. – 1032 с.
35. Соколов, О. М. Определение молекулярных масс лигнинов на ультрацентрифуге и методом гель-фильтрации: учебное пособие / О. М. Соколов. – Л.: 1978. – 76 с.
36. Закис, Г. Ф. Функциональный анализ лигнинов и их производных / Г. Ф. Закис. – Рига: Зинатне, 1981. – 230 с.
37. Способ получения ингибитора стрептокиназы: а. с. 1631982 СССР, МКИ5 С 07 G 1/00, А 61К 31/47 / В.Н. Никандров, М.А. Зильберглейт, Н.С. Пыжова, В.М. Резников, В.С. Лисова, Т.И. Корнейчик; Бел. НИИ эпидемиологии и микробиологии и Бел. технологич. ин-т им. С.М.Кирова – № 4645424; заявл. 02.02.89; опубл. 01.11.90 // Открытия. Изобрет. –1991.– № 45. – С. 28.
38. Средство для ингибирования стрептокиназы: пат. 5821 Респ. Беларусь, МПК7 C12N 9/70, С 07G 1/00 / В.Н. Никандров, М.А. Зильберглейт, Н.С. Пыжова, В.С. Лисова; заявитель ГУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии» – № а 19981180; заявл. 28.12.1998; опубл. 30.12.2003 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр. інтэлектуал. уласнасці. – 2003. – № 3. – С. 174.
39. Ghosh, A. K. Design and development of highly potent HIV-1 protease inhibitors with a crown-like oxotricyclic core as the P2-ligand to combat multidrug-resistant HIV variants / A.K. Ghosh, K.V. Rao et al. // J. Med. Chem. – 2017. – Vol. 60, No.10. – P. 4267-4278.

References

1. Nikandrov V.N. Kislorodzavisimyie reaktsii proteoliza: suschnost gipotezyi, teoreticheskie i prikladnyie aspekty [Oxygen-dependent proteolysis reactions: the essence of the hypothesis, theoretical and applied aspects]. *Profilaktika i lechenie infektsionnyih i parazitarnyih zabolevaniy: materialy. yubileynoy konferentsii BelNII epidemiologii i mikrobiologii. Nauka i tehnika*. Ed. Rytik P.G. et al. Minsk, 1995, pp. 274–286. (In Russian)
2. Nikandrov V.N., Pyzhova N.S. Effect of active oxygen species scavengers on fibrinolytic activity of some proteinases.

- Thrombosis Res, 1996, vol. 88, no. 4, pp. 303–312.
3. Nikandrov V.N., Pyizhova N.S. Kislorodzavisimyy put aktivatsii plazminogena i novyye fiziko-himicheskie mehanizmy proteoliza [Oxygen-dependent plasminogen activation pathway and new physicochemical mechanisms of proteolysis]. *Izvestiya natsionalnoy akademii nauk Belarusi. Seriya mediko-biologicheskikh nauk*. [News of the National Academy of Sciences of Belarus. Series: Biomedical Sciences], 2001, no. 1, pp. 54–60. (In Russian)
 4. Nikandrov V.N., Pyzhova N.S. Some unusual manifestation of proteolysis. *Cellular and Molecular Biology*, 2006, vol. 52, no. 4, pp. 30–39.
 5. Nikandrov V.N., Pyzhova N.S. Proteoliz kak universalnyy mehanizm regulyatsii biohimicheskikh i biologicheskikh protsessov. Diskussionnyye aspekty [Proteolysis as a universal mechanism of regulation of biochemical and biological processes. Discussion aspects]. *Izvestiya natsionalnoy akademii nauk Belarusi. Seriya meditsinskikh nauk* [News of the National Academy of Sciences of Belarus. Series: Medical Sciences]. 2008, no. 1, pp. 4–22. (In Russian).
 6. Nikandrov V.N., Pyzhova N.S. Netrivialnyye proyavleniya proteoliza na molekulyarnom i kletochnom urovnyah, ih fundamentalnoe i prikladnoe znachenie [Nontrivial manifestations of proteolysis at the molecular and cellular levels, their fundamental and applied importance]. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk* [News of Biomedical Sciences], 2010, no. 3, pp. 14–28. (In Russian)
 7. Nikandrov V.N., Pyzhova N.S. Activation of plasminogen by streptokinase: the aspects of fibrinolysis regulation. Vth International Meeting of the Danubian League against Thrombosis and Haemorrh. Diseases: Abstracts. Erfurt, May, 20–22; 1987. Erfurt, 1987, p. 76.
 8. Nikandrov V.N., Pyzhova N.S. The oxygen-dependent pathway of human plasminogen activation. 18th FEBS Meeting: Abstracts. Ljubljana, June 28 – July 3, 1987. Ljubljana, 1987, p. 84.
 9. Nikandrov, V.N. Oxygen-dependent processes of proteolysis. 14th Intern. Congress of Biochemistry. Abstracts. Prague, 1988, vol. 1, p. 60.
 10. Pyzhova N.S., Nikandrov V.N. The conception of oxygen-dependent pathway of plasminogen activation and the streptokinase (SK) inhibitors creation. Second Internat. Symposium on Biochemical Engineering: Abstracts. Stuttgart, 5–7 March, 1991. Stuttgart, 1991, p. 50.
 11. Nikandrov V.N., Pyzhova N.S. Vliyanie superoksiddismutazy i Cu^{2+} -soderzhaschih sistem, vklyuchayuschih ligandy, na aktivatornuyu funktsiyu streptokinazy [Effect of superoxide dismutase and Cu^{2+} -containing systems, including ligands, on the activator function of streptokinase]. *Aktualnyye problemy sovremennoy biohimii: sbornik materialov konferentsii*. Ed. Pikulev A.T. et al. Minsk, 1991, pp. 43–44. (In Russian)
 12. Nikandrov V.N., Pyzhova N.S. Oxidoreductants influence on the fibrinolytic activity of proteinases. 15th Internet Congress of Biochemistry: Abstracts. Jerusalem, 1991, p. 100.
 13. Nikandrov V.N., Pyzhova N.S. Peculiarities of plasminogen activation by subcellular particles of mouse brain and live. *Biology of Proteolysis: Abstracts of paper at meeting Cold Spring Harbour Laboratory*. New York, 1997, p. 116.
 14. Pyzhova N.S., Nikandrov V.N., Boreko E.I. Hypothesis of oxygen-dependent proteolysis and a possibility of new approaches to proteolysis inhibitor search. XVth EFMC Internet Symposium on Medicinal Chemistry: Abstracts. Edinburgh, 6–10 September, 1998. Edinburgh, 1998, p. 84.
 15. Pyzhova N.S., Nikandrov V.N. Aktivatsiya tripsinogena byika v prisutstvii aktivnykh form kisloroda. *Doklad Akademiya Nauk BSSR*, 1991, vol. 35, no. 12, pp. 1130–1133. (In Russian)
 16. Nikandrov V.N., Pyzhova N.S., Votyakov V.I., Klinger Yu.E. Rol superoksidnogo radikala v realizatsii aktivatornoy funktsii streptokinazy. *Doklad Akademiya Nauk BSSR*, 1987, vol. 31, no. 4, pp. 375–378. (In Russian)
 17. Pyzhova N.S. *Uchastie aktivnykh form kisloroda v protsessah proteoliza* [Participation of reactive oxygen species in the process of proteolysis]. Abstract of Ph. D. thesis. Minsk, 1992. 20 p. (In Russian)
 18. Pyzhova N.S. *Uchastie aktivnykh form kisloroda v protsessah proteoliza* [Participation of reactive oxygen species in

- the process of proteolysis]. Cand. sci. diss. Minsk, 1990, p. 193. (In Russian)
19. Metsler D. *Biohimiya* [Biochemistry]. Ed. Braunshteyna A.E.. Moscov, Mir, 1980, vol. 1, 231 p., vol. 2, 606 p. (In Russian)
20. Nikandrov V.N., Pyizhova N.S., Votyakov V.I. Vliyanie adenilovyih nukleotidov na aktivatornuyu funktsiyu streptokinazy [Effect of adenylic nucleotides on the activator function of streptokinase]. *Byulleten eksperimentalnoy biologicheskoy meditsiny* [Experimental Biological Medicine Newsletter], 1987, vol. 103, no. 7, pp. 49–51. (In Russian)
21. Nikandrov V.N., Kazyuchits O.A. Investigation of functional groups of streptokinase molecule. 13th Internet Congress on Biochemisry: Abstracts. Amsterdam, 1985, vol. 11, p. 302.
22. Nikandrov V.N. Chemical modification of streptokinase functional groups. *Chemical Modification of Enzymes*; Eds. B.I. Kurganov et al.: Nova Science Publishers Inc., New York, 1996, pp. 567–614.
23. Fizer L., Fizer M. *Organicheskaya himiya* [Organic chemistry]. Vol. 2 Ed. Vulfsona S.N.. Moscov, Himiya, 799 p. (In Russian).
24. Nikandrov V.N., Rudnitskaya L.S., Poleschuk N.N., Davyidova G.S. Streptokinaznaya aktivnost membran kletok β -gemoliticheskikh streptokkov gruppyi S [Streptokinase activity of cell membranes of β -hemolytic streptococcus group C]. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*, 1990, no. 1, pp. 98–100. (In Russian)
25. Nikandrov V.N., Rudnitskaya L.S., Poleschuk N.N., Davyidova G.S. Streptokinaznaya aktivnost membran kletok β -gemoliticheskikh streptokkov gruppyi S [Streptokinase activity of cell membranes of β -hemolytic streptococcus group C]. *Izvestiya Akademii Nauk BSSR. Seriya biologicheskikh nauk* [News of the Academy of Sciences of the BSSR. Series: Biological Sciences]. 1990, no. 1, pp. 49–53. (In Russian)
26. Nikandrov V.N. On the plasminogen-activating function of streptokinase. *Internet Journal of Biochem*, 1992, vol. 24, no.1, pp. 47–53.
27. Pikaev A.K. *Sovremennaya radiatsionnaya himiya. Radioliz gazov i zhidkostey* [Modern radiation chemistry. Radiolysis of gases and liquids]. Moscov, Nauka, 1986, 440 p. (In Russian)
28. Rabinovich V.A., Havin. Z.Ya. *Kratkiy himicheskiy spravochnik* [Brief Chemical Reference]. Leningrad, Himiya, 1978, 392 p. (In Russian)
29. Kalinin F.L., Lobov V.P., Zhidkov V.A. *Spravochnik po biohimii* [Biochemistry Handbook]. Kiev, Naukova dumka, 1971, 1015 p. (In Russian).
30. Yones M., Weser U. Inhibition of nitroblue tetrazolium reduction by cuprein (super-oxide dismutase), Cu(lyr)₂ and Cu(lys)₂. *FEBS Lett.*, 1976, vol. 61, no. 2, pp. 209–212.
31. Ksenzhe, O.S., Petrova. O.S. *Elektrohimicheskie svoystva obratimyyih biologicheskmyh redoks-sistem* [Electrochemical properties of reversible biological redox systems]. Moscov, Nauka, 1986, 152 p. (In Russian)
32. Zilbergleyt M.A. et al. *Issledovanie delignifikatsii drevesinyi vodnyimi rastvorami uksusnoy kislotyi. 11. Potrebitelskie svoystva uksusnokislyih ligninov* [The study of wood delignification with aqueous solutions of acetic acid. 11. Consumer properties of acetic acid lignins]. *Himiya drevesinyi* [Wood chemistry], 1989, no. 6, pp. 43–48. (In Russian)
33. Lebedev P.T., Usovich A.T. *Metodyi issledovaniya kormov, organov i tkaney zhivotnyih* [Methods for the study of feed, organs and tissues of animals]. Moscov, Rosselhozizdat, 1969, 467 p. (In Russian).
34. Guben-Veyl I. *Metodyi organicheskoy himii* [Organic Chemistry Methods]. Moscov, Himiya, 1967, 1032 p. (In Russian)
35. Sokolov O.M. *Opredelenie molekulyarnyyih mass ligninov na ultratsentrifuge i metodom gel-filtratsii* [Determination of molecular masses of lignins on an ultracentrifuge and gel filtration method]. Leningrad, 1978, 76 p. (In Russian).
36. Zakis G.F. *Funktsionalnyiy analiz ligninov i ih proizvodnyih* [Functional analysis of lignins and their derivatives]. Riga, Zinatne, 1981, 230 p. (In Russian)
37. *Sposob polucheniya inhibitora streptokinazy* [The method of obtaining streptokinase inhibitor]. Author's license no. 1631982 SSSR, MKI5 S 07 G 1/00, A 61K 31/47, 1991. (In Russian)
38. Nikandrov V.N., Zilbergleyt M.A., Pyizhova N.S., Lisova V.S. *Sredstvo dlya ingibirovaniya streptokinazy* [Means for

- inhibiting streptokinase]. Patent RB no. 5821, MPK7 S12N 9/70, C 07G 1/00, 2003. (In Russian)
39. Ghosh A. K., Rao K.V. et al. Design and development of highly potent HIV-1 protease inhibitors with a crown-like oxotricyclic core as the P2-ligand to combat multidrug-resistant HIV variants. *Journal of Medical Chemistry*, 2017, vol. 60, no.10, pp. 4267-4278.

Received 4 March 2019