

ВЕСЦІ

НАЦЫЯНАЛЬНАЯ АКАДЭМІЯ НАВУК БЕЛАРУСІ

СЕРЫЯ МЕДЫЦЫНСКІХ НАВУК 2008 № 1

ИЗВЕСТИЯ

НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

СЕРИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК 2008 № 1

ЗАСНАВАЛЬНІК – НАЦЫЯНАЛЬНАЯ АКАДЭМІЯ НАВУК БЕЛАРУСІ

Часопіс выдаецца са студзеня 2004 г.

Выходзіць чатыры разы ў год

В журнале публикуются работы, представленные на Международной научной конференции
«Протеолиз, механизмы его регуляции и его роль в физиологии и патологии клетки»
(Минск, 25–26 октября 2007 г.)

ЗМЕСТ

Никандров В. Н., Пыжова Н. С. Протеолиз как универсальный механизм регуляции биохимических и биологических процессов. Дискуссионные аспекты	4
Одинцов С. Г., Лапко А. Г., Сабала И., Бохтлер М. Структурно-функциональное исследование, классификация и механизм активации бактериальных аминопептидаз S и T	23
Румш Л. Д., Лихарева В. В., Михайлова А. Г., Горбачева Л. Р., Струкова С. М. Пути реализации уникальной специфичности энтеропептидазы. Физиологическая роль энтеропептидазы	31
Голубович В. П. Комплексный подход к получению синтетических пептидных ингибиторов эластазы	38
Плетень А. П. Устойчивость к протеиназам различных типов амилоидных структур, формируемых из пептидов β-амилоида ₁₋₄₂	43
Платонова Т. Н., Чернышенко Т. М., Савчук А. Н. Активация протромбина в присутствии высокомолекулярного E-фрагмента и стрептокиназы	48
Кирпиченок Л. Н. Белковый ингибитор цистеиновых протеиназ как активатор протеолиза	52
Домаш В. И., Шарпио Т. П., Забрейко С. А. Растительные ингибиторы протеолиза и перспективы их использования в медицине	58
Бондарева Л. А., Немова Н. Н., Кяйвярйнен Е. И., Токарева Н. П. Внутриклеточные Ca ²⁺ -зависимые протеиназы млекопитающих	64
Никандров В. Н., Жук О. Н., Пыжова Н. С., Гронская Р. И., Полукошко Е. Ф., Романовская А. А. Значение плазминогена как фактора трофического характера для культур клеток нервной ткани	85

УДК 57+577.1]:577.156.1

В. Н. НИКАНДРОВ^{1,2}, Н. С. ПЫЖОВА^{1,2}**ПРОТЕОЛИЗ КАК УНИВЕРСАЛЬНЫЙ МЕХАНИЗМ РЕГУЛЯЦИИ
БИОХИМИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ.
ДИСКУССИОННЫЕ АСПЕКТЫ**¹Институт физиологии НАН Беларуси, Минск,²Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

(Поступила в редакцию 25.07.2007)

Протеолиз – явление расщепления пептидной (амидной) связи в белках и полипептидах известен издавна. О трипсине сообщал еще J. Purkinje в 1836 г., в том же году Schwann открыл пепсин [1]. С тех пор первоначальные представления о протеолизе как о механизме, носящем главным образом характер деградации, претерпели существенные изменения. Сегодня он считается одним из ведущих путей регуляции биохимических процессов. Особенно мощный пласт исследований о сущности и роли протеолиза выполнен в последние 40 лет. В настоящее время он объединяет огромное количество частных проблем, разрабатываемых в рамках химических, биологических, физических, медицинских и ряда других наук. Причем границы протеолиза постоянно расширяются – он вовлекает ряд проблем и вопросов, которые изначально, казалось бы, не имеют к нему отношения. Практически ежегодно мы узнаем о новых энзимах – пептидазах, их субстратах, ингибиторах, мишенях этих пептидаз и т. д.

Здесь достаточно упомянуть два, может быть, имеющих частное значение момента. В 1980 г. А. J. Barrett [2], характеризуя четыре известных типа протеиназ (сериновые, цистеиновые, аспартильные и металлопротеиназы), выдвинул предположение о существовании пятого типа этих энзимов, содержащих каталитически активные ионы металлов и свободные SH-группы. В последующем подобные протеиназы были найдены. В частности, ею оказалась так называемая Pz-пептидаза (EC 3.4.99.31), широко распространенная в тканях животных. Исследования показали, что, с одной стороны, она идентична Cys-протеиназе – эндомегапептидазе А (EC 3.4.22.19), а с другой – металлопротеиназе – эндопептидазе 24.15 (EC 3.4.24.15). Этот энзим содержит каталитически значимые Zn и свободные SH-группы, представляя собою тиолзависимую металлоэндопептидазу – тиметпептидазу [3].

В 1982 г. на втором симпозиуме по стрептокиназе нами также был выдвинут и опубликован тезис о существовании иного механизма катализа, чем у известных четырех групп протеиназ (сериновых, тиоловых, карбоксильных, металлоэнзимов), например с особой ролью остатков His и карбоксигрупп [4]. Прошло около 20 лет, и было доказано существование так называемых гистидин-аспартильных протеиназ, к которым, в частности, принадлежат две гемоглобиндеградирующие протеиназы малярийного плазмодия [5].

Признанием огромного значения протеолитических процессов стал факт присуждения в 2004 г. Нобелевской премии по химии А. Ciechanover, А. Hershko, I. Rose за исследование механизма АТР-зависимого кверцетин-опосредованного пути протеолитической деградации внутриклеточных белков – безусловно чрезвычайно важного, но не единственного пути протеолиза.

Совокупность множества фактов свидетельствует о том, что без участия протеолитических реакций невозможна реализация большинства процессов жизнедеятельности, а также инициация и генезис всех основных патологических процессов. В частности, это наглядно демонстрирует проблематика 5-й Генеральной конференции Международной ассоциации по изучению

протеолиза (5th General Meeting of the International Proteolysis Society), прошедшей 20–24 октября 2007 г. в Патрасе (Греция):

протеолитические каскады в нормальной физиологии и патофизиологии (физиологические процессы и механизмы генезиса болезней);

развитие, дифференциация, апоптоз;

процессинг и деградация (убиквитин и протеасомы);

мембранно-ассоциированный (внутриклеточный) протеолиз;

внутриклеточный и внеклеточный шеддинг («слушивание») мембранных белков;

старение и нейродегенерация;

рецепторы, активируемые протеиназами, и сигналинг;

иммунная система и воспаление;

инвазия патогенного начала и защитные системы хозяина;

протекторное действие протеаз и ингибиторов на прогрессию опухолей;

метастазирование рака и микроокружение опухоли, роль протеолиза в прогрессии опухолей;

ангиогенез и ремоделирование ткани;

функциональная геномика, протеомика и деградомика (протеомика и геномика протеаз);

современные методологии;

открытие и разработка лекарственных препаратов: лекарственный дизайн на основе структуры;

молекулярная диагностика и целевые лекарственные препараты: новые технологии;

модели на животных;

биотехнология протеаз и ингибиторов, трансгенные животные и растения;

специфичность, механизмы и регуляция протеиназ.

В целом же установлено, что примерно 2% всех генов кодируют пептидазы и их гомологии. В человеческом геноме закодировано более 550 активных и предполагаемых пептидаз, а также 105 белков – ингибиторов протеиназ и, кроме того, 176 гомологичных последовательностей, ингибиторная природа которых пока не установлена [6]. Только у человека известно более 70 болезней, обусловленных мутацией протеазокодирующих генов [7]. Так, делеция в гене, кодирующем нейротрипсин, ведет к развитию аутосомной рецессивной бессиндромной умственной отсталости, а мутация в гене белка ингибитора протеиназ – нейросерпина проявляется в виде врожденной деменции (семейной энцефалопатии с тельцами включения нейросерпина) [8].

Достаточно красноречива роль нарушения протеолитических процессов в патогенезе приобретенных болезней, например болезни Альцгеймера, которая, как установлено в последние годы, обусловлена дисбалансом протеолитических реакций образования β -амилоида и реакций дальнейшего его распада и выведения из тканей мозга [7, 9].

Остановимся на основных проблемах протеолиза, включая наиболее близкие нам по опыту работы в области его изучения начиная с 1975 г.

Именно в русле фундаментальных исследований, развернутых нами уже с 1980 г., были получены материалы о конформации стрептокиназы, ее функциональных групп, сравнительной конформации плазминогенов. В результате, на 5–6 лет опережая зарубежных авторов, в 1986 г. мы вплотную подошли к изучению этих молекул методами ЯМР-спектроскопии и рентгеноструктурного анализа. Экспериментальные работы проводили на базе организованного в те годы центра РСА исследований в Институте биорганической химии АН БССР. Совместно с группой Н. М. Галицкого уже были начаты опыты по кристаллизации стрептокиназы. Однако изменения в Минздраве БССР, последовавшая ломка научной тематики «заморозили» проведение исследований в этом направлении, и к настоящему времени они, к сожалению, уже выполнены в зарубежных научных центрах.

Краеугольные проблемы протеолиза принципиально остаются прежними:

механизм разрыва пептидной связи в ходе энзиматического катализа;

механизмы регуляции протеолитических процессов на всех уровнях;

функциональная целевая значимость протеолитических реакций и их компонентов.

Говоря об энзиматическом катализе разрыва пептидных связей, следует отметить, что в деталях он по-прежнему остается неясным. Как уже неоднократно подчеркивалось, свободная энергия гидролиза внутренней пептидной связи большого пептида при pH 7.0 соответствует $500 \text{ кал} \cdot \text{М}^{-1}$ [10]. Однако в протеиназах – белковых молекулах отсутствуют функциональные группы, наделенные химической «агрессивностью» по отношению к субстрату. В связи с этим предложен ряд гипотез, объясняющих каталитическую способность протеиназ «энергизацией» определенных функциональных групп в молекуле энзима – пептидазы и/или молекулы связанной ею воды. Они достаточно подробно изложены В. К. Антоновым в его монографии [11] – наиболее капитальном труде в бывшем СССР по протеолизу, не утратившем своей ценности по сей день.

Здесь следует сказать о так называемом кислородзависимом протеолизе. Этот термин был впервые введен нами в 1986–1987 гг. на основании изучения механизма активации плазминогена стрептокиназой – белком гемолитических стрептококков, лишенным собственной гидролазной активности. В частности, отправным моментом послужило заметное угнетение инициированного стрептокиназой лизиса фибринового геля при удалении растворенного кислорода из растворов и восстановление скорости фибринолиза при оксигенировании (но не нитрогенировании дегазированных растворов) [12]. Вторым моментом явились обнаружение у стрептокиназы явной супероксидконвергирующей активности и подавление ее плазминогенактиваторной способности перехватчиками супероксидного радикала – нитротетразолиевым синим и адреналином [13, 14]. Результаты по изучению значения активных форм кислорода в активации зимогенов протеиназ и в протеолитической функции этих энзимов обобщены нами ранее [15–19]. Здесь мы не останавливаемся подробно на их содержании.

На основании этих фактов была выдвинута концепция кислородзависимого протеолиза, сущность которой состоит в том, что (ауто)активация зимогенов протеиназ и каталитическая функция данных энзимов определяются собственными эндогенно генерируемыми молекулами зимогенов, протеиназ и/или системой протеиназа–белок–субстрат активными формами кислорода [18–21]. Возникает закономерный вопрос об источнике генерируемых активных форм кислорода, в частности супероксидного радикала, потому что этот механизм вообще предполагает существование в протеиназах и их зимогенах сайтов, содержащих металл переменной валентности. Пока мы не располагаем такими данными, за исключением стрептокиназы и плазминогена, в очищенных образцах которых методами химического анализа и атомно-адсорбционной спектроскопии обнаружено присутствие железа: 1 атом/1 молекула белка [22–24]. Не все полученные результаты однозначно укладываются в данную концепцию. Судя по динамике расщепления фибрина трипсином и химотрипсином в 8 М мочевины, ингибиторное действие нитротетразолиевого синего наиболее отчетливо проявляется в начальную фазу протеолиза (рис. 1). 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.

Вопрос об участии активных форм кислорода в протеолизе разрабатывался и до нас. Однако в этих работах было продемонстрировано расщепление активированным кислородом белков на фрагменты [25, 26] или модификация его формами белковой молекулы, что облегчает последующее действие протеиназ [27], а также инактивация белков ингибиторов протеиназ [28, 29]. В 1986 г. была описана активация латентной коллагеназы при вызванном супероксидным ради-

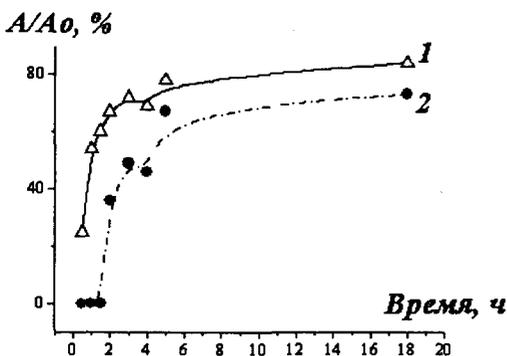


Рис. 1. Особенности динамики лизиса пластины фибринового геля, катализируемого трипсином (1) или α -химотрипсином (2), при воздействии нитротетразолиевого синего (0.01 М) в присутствии 8 М мочевины. Фибриновые пластины приготовлены на 0.05 М трис-НСI буфере (pH 7.5), содержащем 8 М мочевины, так же как и все растворы. Концентрация протеиназ – 1 мг/мл. Инкубация при 37 °С, $n = 4$

калом разрушении гликозаминогликана, образующего неактивный комплекс с этой протеиназой [30].

Результаты наших исследований выявили совершенно новую и неожиданную сторону данного вопроса, что нашло выражение в предлагаемой нами авторской концепции. Попытка прояснить эту сторону методом ингибиторного анализа с использованием стандартного набора металлсвязывающих реагентов показала, что в водно-солевом растворе фибринолитическая активность папаина существенно подавляется о-фенантролином, в меньшей степени – диэтилдитиокарбаматом и 8-оксихинолином, причем в присутствии последнего фибринолитическая активность пепсина, наоборот, возрастает [31]. В 8 М растворе мочевины наблюдалось лишь небольшое увеличение фибринолитической активности трипсина под действием феррицианида и ферроцианида и более заметный рост такой активности у пепсина в присутствии феррицианида, ЭДТА, о-фенантролина и диэтилдитиокарбамата, но в то же время отмечалось подавление катализируемого пепсином фибринолиза в присутствии ферроцианида (рис. 2). Фибринолитическая активность папаина в этих условиях возрастала при добавлении ЭДТА, диэтилдитиокарбамата, но подавлялась о-фенантролином. Все это позволяет предположить, что по крайней мере в пепсине и папаине присутствуют функционально активные металлы. В связи с этим необходимо проведение дальнейших исследований.

Приведем несколько примеров реализации протеолиза по кислородзависимому пути.

1. В очищенных частицах оболочечного вируса чумы птиц – FPV группы вирусов гриппа нами обнаружен белок, способный разлагать H_2O_2 по радикальному механизму и проявляющий свойства белка с Fe-S-центром: его пероксидазоподобная функция активировалась о-фенантролином, но на 80–90% подавлялась антимицином А [32]. Очищенный вирус FPV способен *in vitro* активировать плазминоген, инкубация с которым вирусных частиц увеличивала инфекционность вируса с нерасщепленным гемагглютинином. Эта способность, аналогично описанной выше, усиливалась о-фенантролином и подавлялась антимицином А. Кроме того, как и повышение инфекционности вируса, она угнеталась перехватчиками активных форм кислорода [33, 34].

2. Методом фибриновых пластин было показано [35], что очищенные образцы лактатдегидрогеназы (ЕС 1.1.1.27), малатдегидрогеназы (ЕС 1.1.1.37), каталазы (ЕС 1.11.1.6) и пируваткиназы (ЕС 2.7.1.40), а также NAD или NADH сами по себе не способны вызывать фибринолиз. Кратковременное УФ-облучение фибриновых пластин в присутствии этих энзимов также не сопровождалось фибринолизом,

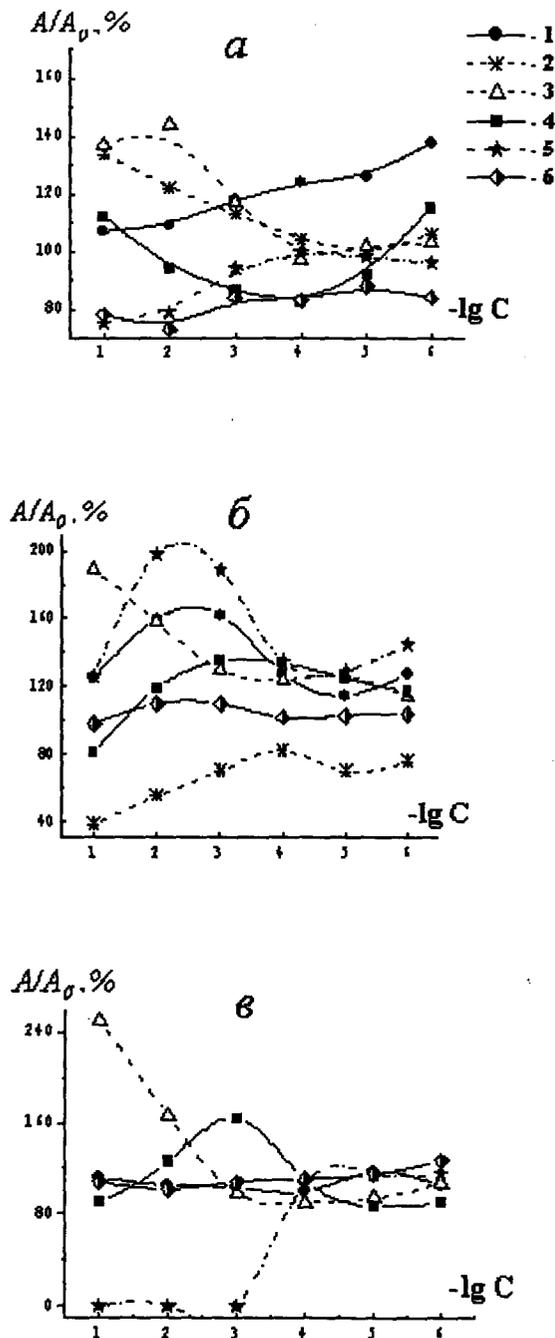


Рис. 2. Влияние феррицианида калия (1), ферроцианида калия (2), ЭДТА (3), диэтилдитиокарбамата натрия (4), о-фенантролина (5), 8-оксихинолина (6) на фибринолитическую активность (% к контролю) трипсина (а), пепсина (б) и папаина (в) в присутствии 8 М мочевины, $n = 5$ [31]

Таблица 1. Возможность инициации лизиса плазминогенсодержащих фибриновых пластин при добавлении NAD(H) и УФ-облучении ($n=6$) [35]

Вариант эксперимента	Площадь зон фибринолиза, мм ²
Контроль	0
+ NADH, 10^{-2} М + $h\nu$	60 ± 4
10^{-3} М + $h\nu$	49 ± 7
10^{-4} М + $h\nu$	30 ± 3
+ NAD, 10^{-2} М + $h\nu$	7.2 ± 8.0
10^{-3} М + $h\nu$	60 ± 5
10^{-4} М + $h\nu$	30 ± 4
Предварительное дегазирование проб	
+ NADH, 10^{-2} М + $h\nu$	0
10^{-3} М + $h\nu$	0
10^{-4} М + $h\nu$	0
+ NAD, 10^{-2} М + $h\nu$	0
10^{-3} М + $h\nu$	0
10^{-4} М + $h\nu$	0

однако он четко проявлялся при добавлении к энзимам NAD или NADH [35]. Известно, что в кислородной среде при таком воздействии на NADH-лактатдегидрогеназу генерируются активные формы кислорода, включая супероксидный радикал, – запускается «цикл Бельского» [36]. Интенсивность фибринолиза зависела от концентрации нуклеотида и времени облучения. Исключение энзимов из смеси энзим–нуклеотид не блокировало УФ-иницированный фибринолиз, хотя и уменьшало его интенсивность (табл. 1). Предварительное дегазирование растворов компонентов системы, а также воздействие перехватчиков активных форм кислорода (нитротетразолиевого синего и азид натрия) и фенилметилсульфонилфторида полностью подавляли фибринолиз (табл. 2) [35].

Таблица 2. Влияние перехватчиков активных форм кислорода и фенилметилсульфонилфторида на инициированный NADH + УФ-облучение лизис плазминогенсодержащих фибриновых пластин ($n=6$) [35]

Вариант эксперимента	Площадь зон фибринолиза, мм ²
Контроль	0
+ NADH, 10^{-3} М + $h\nu$	92 ± 8
+ NADH + $h\nu$ + D-маннит, 10^{-2} М	112 ± 9
+ NADH + $h\nu$ + формиат натрия, 10^{-2} М	110 ± 7
+ NADH + $h\nu$ + L-гистидин, 10^{-2} М	118 ± 7
+ NADH + $h\nu$ + DL-метионин, 10^{-2} М	103 ± 5
+ NADH + $h\nu$ + азид натрия, 10^{-2} М	0
+ NADH + $h\nu$ + нитротетразолиевый синий, 10^{-2} М	0
+ NADH + $h\nu$ + фенилметилсульфонилфторид, 10^{-3} М	0

3. На образцах очищенного дифтерийного токсина, выделенного из культуральной жидкости штамма PW-8, продемонстрирована способность этого белка медленно активировать растворимый очищенный плазминоген человека, которая усиливалась в присутствии ADP или NADH. Вместе с тем в системе генерирования супероксидного радикала NADH–феназинметосульфат установлено резкое усиление редукции нитротетразолиевого синего, что свидетельствует о способности белка токсина опосредовать взаимодействие генерируемого O_2^- со специфическим перехватчиком [37].

На наш взгляд, все это открывает перспективы создания ингибиторов протеолиза нетрадиционного плана, т. е. не по типу квазисубстратов пептидного характера. Это имеет важное значение для коррекции протеолиза при целом ряде патологических состояний. Более того, в настоящее время крайне мало или практически нет данных о воздействии на протеолитиче-

ские системы тех лекарственных средств, лавина которых буквально хлынула в клиническую медицину в последние десятилетия. В свое время нами были начаты исследования действия отдельных лекарственных препаратов на инициированный стрептокиназой фибринолиз. Оказалось, что последний нечувствителен к анальгину, но угнетается в присутствии 0.5 М антипирина или амидопирина на 29 или 33% соответственно и в присутствии 0.035 М аминазина – на 67%. Кроме того, он был нечувствителен к эфедрину, но подавлялся 0.5 М кофеином или димедролом на 30 или 100% соответственно [17]. Однако это лишь первый шаг.

Вопрос о возможной инициации «непротеиназного» протеолиза возникал и ранее. Одной из попыток объяснения механизма активации по данному пути явилось предположение, что действие хлороформа и других органических растворителей на плазму крови денатурирует белковые ингибиторы протеиназ или разрушает комплексы протеиназа–ингибитор [38]. Действительно, уровень активности ингибиторов протеиназ при такой обработке сразу же резко падал. Но активация сывороточных протеиназ была максимальна лишь через 10 дней и наблюдалась только в крови человека, но не животных [39]. Активация плазминогена достигалась и при обработке его очищенных образцов, что легло в основу способа получения плазмина [40], а также после воздействия на плазму крови анионных детергентов, метанола, пропанола, мочевины, бензоата [40, 41]. Считалось, что такая обработка удаляет ингибиторы фибринолиза.

Однако анионные детергенты активируют некоторые ингибиторы протеиназ: додецилсульфат натрия переводит ингибитор I тканевого активатора плазминогена в активную форму [42]. Описан лизис пластин «сшитого» фактором XIII фибрина, т. е. имеющего перекрестные ϵ -(γ -глутамил)лизиновые сшивки, под действием додецилсульфата натрия [43]. Этот факт непонятен с позиции инактивации ингибиторов протеиназ, тем более что взаимодействие плазмина и с фибрин(оген)ом, и с этими ингибиторами может реализоваться за счет одних и тех же лизинсвязывающих центров энзима [44]. Трудно представить сорбированный на фибриновых нитях комплекс плазмин–антиплазмин из-за конкуренции фибрина и ингибиторов за связывание с плазмином.

Вместе с тем известна способность белков солюбилизовать даже неполярные органические растворители типа гептана, бензола [45]. Отделяемый в водную фазу «солюбилизиат» может воздействовать на зимоген более сложно, чем только денатурируя ингибиторы протеиназ. Но до сих пор механизм активации плазминогена детергентами и органическими растворителями не исследован обстоятельно, его сущность остается неясной.

Если уж говорить о сторонах, которые до сих пор остаются нераскрытыми, то достаточно упомянуть, что в литературе много сказано о том, что молекулы плазминогена как в растворе, так и «сидящие» на нитях фибрина отличаются конформационно, однако исчерпывающей ясности в этих отличиях нет.

Регуляция протеолиза также имеет множество «белых пятен». Она осуществляется на ряде уровней:

биосинтеза (пре)зимогенов, белков-ингибиторов, контролируемого на уровнях транскрипции и трансляции и побудительные механизмы которого в эукариотах по большей части неясны. Причем известно, что завершенная транскрипция гена протеиназы не всегда реализуется в успешной трансляции молекулы белка: в ряде случаев иммунохимическими методами установлено образование в мозге транскриптов мРНК тканевого активатора плазминогена, но синтеза протеиназы не происходило [8];

активации презимогенов и зимогенов, процессинга их молекул, протеиназ и белков-ингибиторов;

взаимодействия с природными ингибиторами протеиназ, включая белки-ингибиторы; метаболической (метаболической) регуляции протеолиза.

Учитывая разнообразие протеиназ и их субстратов, каждый из этих уровней открывает достаточно широкие возможности для исследований.

Так, говоря о роли активных форм кислорода в протеолитических реакциях, следует отметить, что в литературе пока крайне мало данных об участии в регуляции протеолиза активных форм азота и углерода. Известно, что NO[•], например, вызывает нитрозилирование кальпаинов клеток почки эмбриона человека и нейронов коры больших полушарий головного мозга, что ве-

дет к резкому угнетению активности этих протеиназ [46]. Перехватчик этого радикала – комплекс Fe^{2+} -диэтилдитиокарбамат (0.01 М) на 40% подавлял активацию плазминогена, инициированную стрептокиназой, урокиназой или тканевым активатором [47]. Воздействие источников монооксида азота – $NaNO_2$ в кислой среде или нитропрусида натрия – само по себе не вызывало активации плазминогена или трипсиногена, но вело к лизису фибриновой пластины при воздействии химотрипсиногена А. Вместе с тем инициируемая H_2O_2 активация плазминогена или химотрипсиногена при добавлении нитропрусида натрия усиливалась на 200 или 157% соответственно, тогда как присутствие нитрита натрия или комплекса Fe^{2+} -диэтилдитиокарбамат полностью подавляло активацию химотрипсиногена. Этот же комплекс и нитропруссид угнетали инициируемую H_2O_2 активацию трипсиногена на 65 и 80% соответственно, тогда как активацию плазминогена использованные перехватчики NO^{\cdot} усиливали на 26–40% [47]. На этом небольшом примере достаточно хорошо видно, что эффект, который NO^{\cdot} может оказывать на реакции протеолиза, зависит от характера компонентов реакции, а следовательно, неоднозначен.

Более того, что касается особенностей реализации протеолиза конкретными протеиназами, *можно столкнуться с весьма необычной ситуацией*. Начиная исследования с помощью метода лизиса фибриновых пластин, мы не нашли в литературе конкретной информации о рН-оптуме расщепления белков субстратов трипсином (казалось бы, достаточно хорошо и давно известной протеиназе). В ходе проведенных экспериментов установлено, что его фибринолитическая активность сохраняется в достаточно широком диапазоне рН – от 2.0 до 12.0, причем при этих значениях расщепление фибрина трипсином составляет 65 и 81% соответственно от его величины при рН 6.8 (рис. 3). Эта картина не является следствием ограничения данного метода, поскольку в целом рН-зависимость расщепления фибрина пепсином [22, 31] согласуется с имеющимися данными литературы о расщеплении этой протеиназой белков [48].

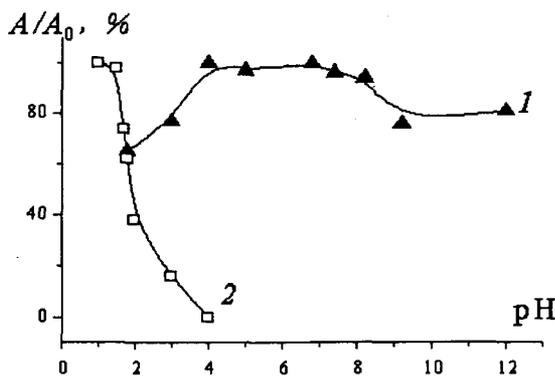


Рис. 3. Влияние рН на фибринолитическую активность трипсина (1) и пепсина (2) (фибриновые пластины приготовлены на 0.15 М NaCl) [22, 31]. В качестве растворителя протеиназ использованы 0.1 М цитрат натрия-HCl, рН 1.04–4.96; 0.1 М фосфатный буфер, рН 5.8–8.2; 0.1 М Na_3BO_4 -HCl, рН 9.0; 0.1 М Na_3BO_4 -NaOH, рН 12.0, $n = 4$

Способность отдельных протеиназ расщеплять конкретные белки-субстраты во многом зависит от конформации последних, поэтому те факторы, которые определяют в растворе эту конформацию в данных условиях, играют важную роль в регуляции протеолиза.

Несколько слов следует сказать о белках – ингибиторах протеиназ. Как весьма справедливо, на наш взгляд, отмечал В. В. Мосолов [49], истинная функция этих белков остается недостаточно ясной. Тем более что некоторые из них представляют собой сложные субъединичные структуры, имеющие довольно большую молекулярную массу и нередко содержащие, например, ионы металлов (никель и др.). Примером такого ингибитора является α_2 -макроглобулин. Эти белки находятся в сложных взаимодействиях с целым рядом других белков, которые, казалось бы, не имеют к ним отношения. Так, биосинтез ингибитора I активатора плазминогена индуцируется интерлейкином-1, фактором роста тромбоцитов- $\beta 1$, фактором некроза опухолей- α . Роль этого белка ингибитора рассматривают даже при метаболических нарушениях типа резистентности к инсулину и триглицеридемии [50].

В настоящее время в ряде белков, не являющихся ингибиторами протеолиза, выявлено наличие структурных элементов, обладающих протеиназоингибиторными свойствами. Так, ингибиторы «домен I типа» тироглобулина (тиропины), способные подавлять активность Cys-протеиназ

и ряда других эндопептидаз, являются структурными доменами тиреоглобулина, белков, связывающих инсулиноподобный фактор роста и ряд других [51].

Проведенные нами исследования четырех коммерческих образцов белков ингибиторов – соевого ингибитора трипсина (SBTI, 20 кДа, фирм Reanal и Sigma), овомукоида (ОМ, 27 кДа, Sigma, США) и овоингибитора (ОІ, 46–49 кДа, Reanal, Венгрия) показали, что ни один из них не обладает плазминогенактиваторной способностью даже при длительном контакте с субстратом [52, 53]. В отсутствие нативного плазминогена SBTI (Reanal) медленно гидролизует фибрин. Такой же активностью при определенной концентрации обладал ОІ, но ее полностью были лишены SBTI (Sigma) и ОМ (табл. 3). Последний гидролизует фибриноген в тонком слое агара. Более того, все четыре белка ингибитора расщепляли протамин-сульфат.

Таблица 3. Влияние группоспецифических ингибиторов протеиназ (10^{-3} М) на протеолитическую активность (в мм² зон лизиса белкового субстрата) образцов белков – ингибиторов протеиназ ($n=4$; 0.06 М фосфатный буфер, рН 7.4; конечная концентрация исследуемого образца 5 мг/мл; 37 °С) [52, 53]

Вариант эксперимента	SBTI ^a (Reanal)	SBTI ^a (Sigma)	ОМ ^a	ОІ ^a	
				без стрептокиназы	+ стрептокиназа **
Контроль (без добавок)	189 ± 10	218 ± 11	126 ± 6	0	150 ± 7
+ р-хлормеркурибензоат	0*	182 ± 14	11 ± 4*	0	70 ± 3*
+ ЭДТА	0*	210 ± 5	13 ± 5*	0	0*
+ стрептокиназа, 5000 МЕ	106 ± 5*	181 ± 16	120 ± 10	319 ± 11*	–
+ этанол, 25% (контроль)	0*	189 ± 10	15 ± 3*	91 ± 7*	0*
+ фенилметилсульфонилфторид	0	289 ± 17*	12 ± 5	89 ± 4	160 ± 9*
+ о-фенантролин	0	218 ± 3	16 ± 5	0*	0

Примечание. а – протеолитическая активность SBTI (Reanal) и ОІ исследована по лизису фибриновых пластин, не содержащих активируемого плазминогена, протеолитическая активность SBTI (Sigma) – по лизису протамин-сульфата, а протеолитическая активность ОМ – по лизису фибриногена, 0.5 мг/мл в 1%-ном геле агара; аа – добавлено 2000 МЕ стрептокиназы. Здесь и далее * – $P \leq 0.05$.

Эффекторный анализ протеолиза, инициируемого образцами SBTI, ОІ и ОМ, дал несколько неожиданные результаты. Фибринолитическая активность SBTI (Reanal) полностью блокировалась р-хлормеркурибензоатом, ЭДТА, этанолом и частично (на 44%) стрептокиназой. Сходные изменения наблюдались со стороны фибринолитической активности ОМ. При этом ингибирование было неполным, а стрептокиназа влияния не оказывала. На расщепление протамин-сульфата образцами SBTI (Sigma) большинство эффекторов не влияло, протеолиз заметно усиливался при действии фенилметилсульфонилфторида. В отличие от SBTI (Reanal) и ОМ протеолитическая активность ОІ по обоим субстратам резко возрастала в присутствии стрептокиназы, а также при добавлении этанола. Этанолиндуцированная фибринолитическая активность была нечувствительна к фенилметилсульфонилфториду, но полностью подавлялась о-фенантролином. Индуцированная же стрептокиназой активность угнеталась в присутствии р-хлормеркурибензоата, ЭДТА, этанола. Однако протеолиз, инактивированный при добавлении последнего, полностью восстанавливался в присутствии фенилметилсульфонилфторида. Более того, индуцируемая добавлением стрептокиназы протеолитическая активность ОІ не расщепляла хромогенный субстрат S-2251 (H-D-Val-Leu-Lys-pNa), специфичный для плазмина [52, 53]. Совокупность этих фактов позволяет предположить, что образцы ОІ имеют латентную этанол- или стрептокиназоиндуцируемую протеиназу, не являющуюся плазмином. В целом вопрос о протеолитической активности белков-ингибиторов нуждается в дальнейшем изучении.

С необычным эффектом – активацией протеолиза в присутствии фенилметилсульфонилфторида мы сталкиваемся не впервые. Ранее, при изучении расщепления белков субстратов протеиназами разрушенных клеток *Corynebacterium diphtheria* токсигенного штамма PW-8 установлено, что в условиях, оптимальных для токсигенеза, протеолитическая активность резко подавляется р-хлормеркурибензоатом и о-фенантролином, но не фенилметилсульфонилфторидом. Более

того, в присутствии последнего она даже возрастает. Ничего подобного не наблюдалось в условиях, не являющихся оптимальными для токсиногенеза [54].

К настоящему времени достаточно хорошо известно, что даже такие сильные энзимные яды, как диизопропилфторфосфат, могут метаболизироваться в биосистемах [55]. Вполне возможно, что мембранные системы разрушенных клеток коринебактерий имеют механизмы разрушения фенилметилсульфонилфторида. Однако сходную картину увеличения фибринолитической активности мы наблюдали и при изучении супернатантов культуральной жидкости различных штаммов коринебактерий дифтерии (табл. 4) [56], что еще более примечательно в отношении белков – ингибиторов протеиназ. В данном случае даже не столь важно, обусловлена ли их протеиназная активность примесями или нет. Полученные результаты дают основание предполагать существование еще ряда протеиназ с необычными свойствами в растительных, микробных и животных клетках.

Таблица 4. Влияние ингибиторов на фибринолитическую активность (в присутствии 0.005 М ортофосфата) супернатантов культуральной жидкости при выращивании штаммов коринебактерий дифтерии на бульоне Лингуда ($n = 5$) [56]

Штамм	Время роста, сут	Исследуемый ингибитор, 0.001 М					
		Без добавок	ЭДТА	ПХМБ	Этанол*	о-фенантролин ^б	ФМСФ ^б
4895	1	0	0	0	0	0	0
	2	64 ± 6	0*	0*	0*	0	25 ± 4*
	3	256 ± 14	110 ± 7*	0*	0*	0	0
10648	1	39 ± 3	0*	0*	42 ± 4	0*	500 ± 30*
	2	144 ± 10	0*	0*	0*	0	960 ± 52*
	3	42 ± 3	49 ± 5	0*	0*	0	0
PW-8	1	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	33 ± 4*	0*	49 ± 4
	3	53 ± 6	0*	0*	20 ± 2*	0*	22 ± 5
BB-1-9	1	56 ± 3	33 ± 0*	0*	77 ± 4	0*	68 ± 4
	2	60 ± 6	49 ± 3	0*	64 ± 5	0*	81 ± 4
	3	210 ± 11	100 ± 6*	0*	138 ± 7*	0*	176 ± 10

Примечание. а – концентрация этанола 25%; б – сравнение с этанолом в качестве контроля.

Появились сведения о возможности выполнения в определенных условиях белками – ингибиторами протеиназ противоположной функции – активации протеолиза, что наглядно продемонстрировано на примере ингибитора цистеиновых протеиназ из почки человека [57].

Особенно сложная и многоплановая область – метаболическая (метаболическая) регуляция протеолиза. Метаболитов огромное множество, об их влиянии на протеолитические процессы мы имеем довольно ограниченные представления. Это касается и тех из них, к которым в последние десятилетия приковано пристальное внимание – нуклеозидфосфатов, включая АТР (аденозин-5'-трифосфат). Кроме раскрытого механизма АТР-зависимого кверцетин-опосредованного пути расщепления белков [58] существуют протеолитические реакции, также активируемые АТР, но не требующие участия кверцетина. Например, протеиназный комплекс из скелетных мышц кролика и т. д. [59]. В механизме активации таких протеолитических реакций также еще не все ясно. Полной неожиданностью для нас явилась стимуляция АТР расщепления белков стандартными, хорошо известными протеиназами – трипсином, α -химотрипсином, субтилизином, металлопротеиназой бацилл. Причем эффект в значительной степени зависел от используемого белка. Так, АТР в концентрации 10^{-5} – 10^{-4} М усиливал расщепление казеина трипсином, но не фибриногена, гемоглобина, сывороточного альбумина и желатина [60, 61]. До сих пор в литературе имелось сообщение об активации в присутствии АТР протеолитической активности лишь папаина [62]. Поскольку в литературе пока нет сведений о способности исследуемых протеиназ к аутофосфорилированию, полученные материалы дают лишь повод для размышлений о возможных механизмах такого эффекта. Известно, что в составе ряда протеиназ содержатся остатки фосфата: например, пепсин А свиньи фосфорилирован по Ser⁶⁸, но дефосфорилирование не отражается на энзиматических свойствах образующегося пепсина D [11].

Здесь следует отметить весьма сложные протеиназные комплексы – мультимеры. Одним из них является комплекс (~2000 кДа), реализующий уже упомянутый выше АТФ-зависимый кверцетин-опосредованный путь расщепления белков (UCDEN), как правило, поврежденных, аномальных, стареющих. По поводу этого комплекса – протеосомы мнения были разноречивы [59, 106, 107]. В настоящее время принято считать, что он состоит из шапероновой части и протеиназного кора, наделенного несколькими пептидазными активностями [109]. Шапероны разупорядочивают макромолекулы белка до полипептидной цепи, которая затем подвергается деградаци. Казалось бы, в данном случае уже нет необходимости в механизмах реализации третичной и четвертичной специфичности протеиназ. Сейчас протеосома является предметом интенсивных исследований многих научных центров. Тем не менее вся цепь событий, осуществляемых этой внутриклеточной молекулярной «машиной», далека от полной ясности. Протеосомы гетерогенны. Вопросы протеосомогенеза, особенно иммунных протеосом, изучены крайне недостаточно. Регуляция организации и функционирования таких мультимеров является самостоятельной проблемой, учитывая возможности изменений взаимодействий протомеров. Но сколь бы важной не представлялась функция протеосомы, она – не единственный путь внутриклеточного протеолиза.

Протеосомы не единственные мультимеры протеиназной природы. Цинксодержащие протеиназы – меприны, локализующиеся в мембранах щеточного края почек, эпителиоцитах кишечника человека, а при определенных условиях экспрессируемые лейкоцитами и раковыми клетками и состоящие из α - и β -субъединиц, формируют гомо- и гетеродимеры. Последние способны к образованию тетрамеров, а α -гомодимеры формируют декамерные комплексы (900 кДа) и мультимеры (до 6 мДа) [108]. Свойства и регуляция активности этих комплексов, а также факторы, определяющие их образование, изучены крайне недостаточно.

20 лет назад на молекулярной модели (инициируемый стрептокиназой фибринолиз) нами было зарегистрировано подавление протеолитического процесса АТФ [63]. В 1993 г. нами же было установлено угнетение фибринолитической активности протеиназами гриба *Arthrobotrys longa* [64]. В последующем уже на субъединицах фактора роста нервов установлено, что подавление их плазминогенактиваторной способности происходит при концентрации АТФ порядка 10^{-4} М [65, 66]. **Таким образом, обнаружен новый феномен – АТФ-ингибируемые реакции протеолиза.** После нас лишь в 2000 г. группа аргентинских исследователей сообщила об аналогичном эффекте АТФ на расщепление инсулина протеиназой инсулизином [67]. Наличие такого эффекта оспаривалось группой исследователей из США [68]. Однако эти две группы использовали неидентичные субстраты и различные препараты протеиназы. Между тем при систематических исследованиях на образцах стандартных протеиназ нами установлено ингибирование АТФ протеолитической активности трипсина, α -химотрипсина, субтилизина, папаина, металлопротеиназы бацилл в диапазоне концентрации нуклеотида 10^{-3} – 10^{-2} М [60, 61], также зависящее от белка субстрата.

На наш взгляд, концентрационный диапазон эффекторов должен рассматриваться в двух аспектах. С одной стороны, 10^{-2} – 10^{-1} М – это сверхфизиологические концентрации АТФ. Однако мы излагаем данные, полученные в гомогенных модельных системах. «Ситуация» в организме иная: многие процессы идут на мембранах, рецепторах. Молярное соотношение протеиназа:эффектор может в конкретное время вполне соответствовать 1:1 или превалировать в сторону эффектора.

Выявленные эффекты могут быть использованы в качестве своеобразных зондов дифференциально-диагностического плана. Так, при исследовании активности внеклеточных протеиназ пяти госпитальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* (предоставлены нам сотрудниками лаборатории внутрибольничных инфекций ЦНИЛ Белгосмедуниверситета, штаммы получены от больных различных стационаров г. Минска) по восьми белкам субстратам в ряде случаев была выявлена практически одинаковая активность. Однако картина резко изменялась в присутствии АТФ [69].

Проведенные совместно с НИИ пульмонологии и фтизиатрии Минздрава Республики Беларусь исследования показали [70], что по изменению желатинолитической активности плазмы при добавлении АТФ в концентрациях 10^{-5} , 10^{-4} и 10^{-3} М образцы плазмы крови доноров могут

быть разделены на три группы. При исследовании образцов плазмы пациентов, страдающих бронхо-легочными заболеваниями, установлено, что в восьми случаях добавление АТФ в указанном диапазоне концентраций вызывает угнетение желатинолитической активности.

Сопоставление характера влияния АТФ на желатинолитическую активность плазмы крови доноров и больных бронхо-легочными заболеваниями наводит на мысль либо о нескольких типах «организации» протеолиза у клинически здоровых людей, либо о наличии у части из них скрытых отклонений от нормы, не выявляемых при обычном лабораторном обследовании. Это достаточно сложный вопрос, на прояснение которого нацелены наши исследования в перспективе.

Еще одним своеобразным явлением в регуляции протеолиза явился так называемый **«фосфатный» эффект в протеолизе, который впервые был зафиксирован нами в 1998 г. при изучении фибринолитической активности субклеточных фракций гомогенатов печени и головного мозга мышей** [71]. Дальнейшие исследования показали существенную стимуляцию ряда протеолитических реакций неорганическим ортофосфатом [61, 72]. Судя по имеющейся литературе, ранее систематических исследований влияния неорганического ортофосфата на процессы протеолиза не проводилось. В то же время хорошо известно о регуляторной роли неорганических полифосфатов в протеолитических процессах прокариотической клетки [73].

Важным аспектом регуляции протеолитических реакций является **взаимодействие протеиназ и их зимогенов со специфическими рецепторами**. В данном случае мы имеем в виду не последствия возбуждения такого рецептора для клетки, а значение для самой протеиназы и зимогена. В таком связанном состоянии функциональные свойства белка лиганда могут существенно изменяться. Более того, пространственная фиксация молекулы может обеспечивать ее взаимодействие с конкретными метаболитами или генерирующими эти метаболиты сайтами. Структура подобных рецепторов и их природа представляет собой также весьма обширную и сложную проблему. В настоящее время, например, известно, что рецепторами плазмин(оген)а на мембранах нейронов и ряда патогенных микроорганизмов являются α -энолаза или глицераль-3-фосфатдегидрогеназа [74, 75]. Какова природа подобных рецепторов на других клетках, остается неясным.

10–15 лет назад нами продемонстрировано образование эквимольных комплексов плазминогена и его активатора – стрептокиназы с лактатдегидрогеназой (EC 1.1.1.27), малатдегидрогеназой (EC 1.1.1.37), каталазой (EC 1.11.1.16) и пируваткиназой (EC 2.7.1.40) животных тканей [76, 77]. Эти комплексы довольно прочны: устойчивы к экстремальному сдвигу pH, присутствию мочевины. Равновесные и кинетические параметры их образования, рассчитанные из данных дифференциальной спектроскопии, принципиально не отличаются от таковых взаимодействия плазминоген–стрептокиназа [78], которое считают одним из самых быстрых и селективных белок-белковых взаимодействий.

Нами получены результаты, свидетельствующие о том, что кратковременная (20 мин) экспозиция клеток феохромоцитомы РС12 со стрептокиназой в концентрации 10^{-8} М ведет к явному метаболическому эффекту: существенному изменению уровня внутриклеточного протеолиза [79]. Между тем стрептокиназа – 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 энзимов углеводно-энергетического метаболизма, встроенными в мембрану.

Бурно развивающимся направлением в протеолизе является раскрытие **функциональной значимости отдельных реакций и их компонентов** в физиологии и патологии практически всех биологических систем. Тем не менее, несмотря на огромный прогресс в этом направлении, остается и множество вопросов.

Пока практически нет или очень мало данных о **роли протеолитических процессов в генезисе разнообразных рецепторов** (мы не имеем в виду рецепторы, активируемые протеиназами, – это особая проблема), **каналовых белков и систем направленного транспорта, в регуляции аквапориновой системы, в образовании и распаде шаперонов**.

Особо следует сказать о **прионах**. Как стало ясно в последние десятилетия, заболевания прионовой этиологии у человека и животных (например, губчатая энцефалопатия крупного рогатого

скота) обусловлены превращением постоянно синтезируемого тканью головного мозга белка PrP^C, необходимого для нормального функционирования нервной системы, в аномальный белок PrP^{Sc}, обладающий инфекционными свойствами и способный к амплификации [80]. Механизмы этих процессов, особенно приобретения инфекционности и амплификации, пока неизвестны. В то же время показано, что обычный белок PrP, имеющий мембранную локализацию, при старении разрушается протеасомой цитозоля клетки. Если же функция протеасомы заблокирована с помощью специфических ингибиторов, в цитозоле накапливается дериват с измененными физико-химическими и биохимическими свойствами и высокой цитотоксичностью [81, 82]. Однако полной ясности нет и здесь. Более того, основную причину необычных биологических свойств PrP^{Sc} усматривают лишь в изменении конформации макромолекулы: так, вторичная структура PrP^C представлена 42% α -спиралей и 3% β -структур, в инфекционной же патогенной форме PrP^{Sc} вторичная структура включает 30% α -спиралей и 43% β -структур [80]. Однако это совершенно не проясняет причин и механизмов столь катастрофических последствий в изменении биологической активности белка.

Здесь следует отметить, что существенные изменения конформации белка вовсе не всегда сопряжены с изменениями его функции. Так, при взаимодействии плазминогена или стрептокиназы с митохондриальной малатдегидрогеназой в водно-солевом растворе методом спектроскопии кругового дихроизма нами обнаружены резкие изменения вторичной и третичной структуры компонентов комплекса (рис. 4, табл. 5). Однако это не вело к каким-либо заметным изменениям каталитических свойств дегидрогеназы, активаторной функции стрептокиназы или активированности плазминогена [78]. Вместе с тем молекулы плазминогена и плазмина могут иметь идентичную аминокислотную последовательность и близкую пространственную структуру, однако их протеолитическая активность принципиально различна. **Мы считаем, что прионовый агент PrP^{Sc} имеет собственный инструмент «агрессии»,** который и позволяет ему переводить популяцию молекул PrP^C в патологическую конформацию. Этим инструментом должен быть каталитический центр и, весьма вероятно, именно протеолитический. Хотя прионовые болезни пока не столь часты, есть основания предполагать возможность увеличения удельной доли такой патологии, тем более что при некоторых заболеваниях назначают как раз препараты, ингибирующие активность протеасом [110]. В известной мере наша позиция находит подтверждение в том, что плазминоген селективно преципитирует с инфекционным PrP^{Sc}, выделенным из мозга индивидуумов с болезнью Крейцфельдта–Якоба, а также у животных с губчатой энцефалопатией или скрепи. Функции плазминогена в таких комплексах неясны.

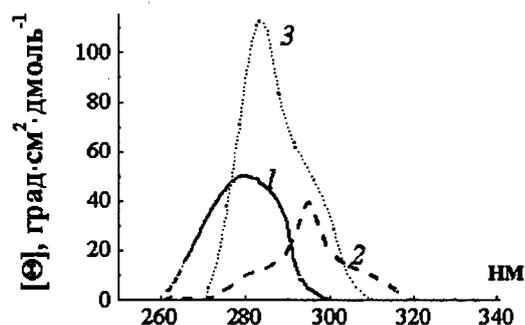


Рис. 4. Спектры кругового дихроизма в ближней ультрафиолетовой области плазминогена (1), малатдегидрогеназы (2), а также комплекса плазминоген–малатдегидрогеназа (3) в 0.06 М фосфатном буфере, pH 7.4 [78]

Таблица 5. Изменения вторичной структуры (в % от числа аминокислотных остатков, включенных в различные ее элементы) стрептокиназы, плазминогена, оксидоредуктаз и пируваткиназы при образовании устойчивых эквимольных комплексов стрептокиназа–энзим или плазминоген–энзим в 0.06 М фосфатном буфере, pH 7.4 (расчет проведен по реперным спектрам согласно И. А. Болотиной и соавт.)

Образец	α -спираль	β -структуры		β -изгибы	Неупорядоченный клубок
		антипараллельные	параллельные		
Стрептокиназа	36.3	2.3	16.2	24.7	20.4
Плазминоген	6.4	16.4	1.1	20.2	55.9
Малатдегидрогеназа	18.6	0	19.7	22.3	39.4
Стрептокиназа–малатдегидрогеназа	46.9	0.5	22.8	25.9	3.9
Плазминоген–малатдегидрогеназа	5.7	0	14.1	16.3	63.8

Установлено, что RgP^c стимулирует активацию плазминогена, а мутант RgP^c с утраченным октапептидом повторяющейся области не способен к активации зимогена. Взаимодействие RgP^c и плазминогена зависит от уровня меди и может быть вовлечено в патогенез прионовых болезней [83].

Колоссальное значение в исследовании роли протеолиза представляет изучение **расщепления белков, образующихся продуктов расщепления и их биологического действия**. В организме человека более 100 тыс. различных белков [84]. Вполне понятно, что деградация их изучена недостаточно, особенно характер и свойства продуктов протеолиза. К этому следует добавить, что при патологии структура белка может изменяться, следствием чего будут изменения характера протеолитической деградации и биологической активности образующихся пептидов. О роли продуктов протеолитической деградации белков свидетельствует, в частности, образование ангиостатина – одного из мощных регуляторов роста кровеносных сосудов в тканях, представляющего собой фрагмент плазминогена. Одним из частных вопросов этой области является **образование нейропептидов**, основная масса которых – продукты протеолитического расщепления высокомолекулярного белка-предшественника типа проопиомеланокортина. Пути протеолитической деградации предшественников с образованием нейропептидов и регуляция этих путей на молекулярном, клеточном и прочих уровнях также далеки от исчерпывающей ясности. Следует отметить, что в настоящее время доминирует представление о том, что всасывание в кишечнике продуктов переваривания белков происходит в виде аминокислот. По-видимому, этот момент также нуждается в дальнейшей проработке и уточнении. Напомним, что существуют и белковые субстанции, которые всасываются стенкой кишечника, а возможно, и захватываются нервными окончаниями. Таковы иммуноглобулины молозива или токсины. Нейротоксин *Clostridium botulinum* имеет молекулярную массу 86–170 кДа [85], поэтому вполне логично допустить, что продукты переваривания белков в кишечнике могут всасываться не только в виде аминокислот, но и олиго- и полипептидов. Характер соединений пептидной природы всецело определяется составом пищи (корма), видом ее обработки, а также конкретной «ситуацией» в кишечнике.

Широкое поле деятельности представляет изучение **биологических эффектов компонентов протеолитических реакций, включая протеиназы, их зимогены, белки активаторы и ингибиторы**. В этом плане нами впервые было зафиксировано действие плазминогена на клетки симпатических и чувствительных ганглиев [86], а также нейротропный эффект стрептокиназы [87]. Учитывая колоссальную морфологическую, функциональную и метаболическую гетерогенность клеточных элементов нервной ткани, нами сделаны лишь первые шаги.

Достаточно важным моментом стали полученные совместно с нейрофизиологами данные о том, что суперфузия понтобульбоспинального препарата крысы искусственным ликвором с добавлением плазминогена через 10 мин вызывает необратимую блокаду электрической активности нейронов дыхательного центра [88]. Между тем в литературе практически отсутствуют данные об изменениях уровня плазминогена и его биосинтеза в нервной ткани при патологии.

Одна из глобальных задач современной биологии, биотехнологии и инженерии клетки – наработка значительной массы (масштабирование) жизнеспособных клеток различных тканей человека и животных, в том числе таких высококодифференцированных, как нервная и ткань миокарда, для получения целевых продуктов биосинтеза, специфических для данных клеток, производства вирусных вакцин и т. д., а также для трансплантации. Применительно к данным высококодифференцированным тканям особенно важным является обеспечение масштабной технологии факторами трофической поддержки, без которых невозможно получить высокопродуктивные жизнеспособные культуры и устранить действие повреждающих факторов. Для роста и дифференциации клеток нервной ткани особое значение имеет ряд белковых факторов, включая фактор роста эпидермиса EGF (6 кДа), фактор роста нервов NGF, продуцируемый головным мозгом фактор BDNF, CNTF, продуцируемый глией фактор GDNF, нейротрофины NT-3, NT-4 (13.6–28.0 кДа). Однако эти белки чрезвычайно дороги, что создает ряд трудноразрешимых проблем при использовании их очищенных образцов для биотехнологических целей. В связи с этим целесообразно изыскание новых регуляторного типа белков, обладающих трофическим действием на клетки нервной ткани.

На основании полученных данных нами были предложены приемы культивирования клеток нервной ткани (на дефицитной по белкам сыворотке крови питательной среде: 0.5% сыворотки крови вместо 15–25%), обеспечивающие ускорение созревания, улучшение адгезии, высокую выживаемость, увеличение количества и длины отростков, их арборизацию. В частности, такой результат получен на культурах ткани неокортекса и мозжечка [89]. В присутствии плазминогена общее число клеток глиомы С6 возрастало в несколько раз [90], а стрептокиназа позволяла вести культуру феохромоцитомы РС12 на дефицитной по белкам сыворотки крови среде практически без потери числа клеток и с выживаемостью их не менее 95% в сравнении с контролем [91]. В целом предложенные решения позволяют отказаться от использования насыщенных белками сыворотки крови сред при наращивании клеток или ограничить использование подобных сред. Более того, такой подход существенно облегчает выделение целевых белков метаболитов из культуральной жидкости (кондиционированной питательной среды).

В рамках представленных работ продемонстрировано четкое кардиотропное действие стрептокиназы на культуре ткани миокарда [92].

Боковой ветвью этих работ явилось обнаружение факта резкого подавления роста глиомы С6 [93]. Известно, что 70% опухолей головного мозга имеют глиальное происхождение, а локализация их вблизи структур мозга, контролирующих жизненно важные функции, делает хирургическое вмешательство не только рискованным, но часто и безрезультатным.

В биосистемах существует множество белков, не являющихся, по существующим представлениям, энзимами как таковыми, но наделенных каталитическими сайтами, в том числе протеиназоподобными. К ним, в частности, относятся абзимы [94]. Назначение функциональных сайтов, способных расщеплять пептиды и белки, остается пока неясным, так же как и природа этих сайтов.

Другой группой подобных белков являются **факторы роста и дифференциации**. В их изучении пока сделаны лишь первые шаги. Так, например, при исследовании свойств субъединиц фактора роста нервов (NGF) нами неожиданно обнаружены их новые функциональные свойства. Известно, что γ -субъединица наделена активным сайтом сериновой протеиназы, активирует плазминоген, но не расщепляет фибрин, казеин, гемоглобин. Мы нашли белок-субстрат, который достаточно хорошо расщепляется γ -субъединицей [95]. Однако полная неожиданность состояла в том, что β -субъединица, которую считают носителем специфической нейротрофической функции, также способна активировать плазминоген и расщеплять тот же белок-субстрат, что и γ -субъединица [65, 96, 97].

На наш взгляд, это не только позволяет переосмыслить механизм биологического действия NGF, но и создает перспективу направленного создания так называемых «миметиков» NGF и подобных ему факторов. Этот вопрос имеет чрезвычайно большое значение, учитывая тенденции в последние десятилетия к клеточной и тканевой терапии. Например, трансплантация высокодифференцированных тканей типа нервной или миокарда практически невозможна без обеспечения трофической поддержки специфическими белково-пептидными факторами роста. Направленная дифференциация стволовых клеток также обеспечивается специфическими белковыми факторами. Однако они чрезвычайно дороги, что и диктует насущную потребность создания «миметиков».

К данной проблеме тесно примыкает другая. Принято считать, что **действие белково-пептидных эффекторов на клетку реализуется через специфический рецептор**. До сих пор считается, что возбуждение рецептора происходит вследствие конформационных изменений, вызванных всецело физическим контактом белка рецептора и белка лиганда.

В последнее десятилетие описаны рецепторы, активируемые протеиназами – тромбином, трипсином и другими эндонептидазами [98]. Следует отметить, что в силу существования специфических рецепторов протеиназы, подобные трипсину и тромбину, способны выполнять гормоноподобные функции, осуществляя аутокринную и апокринную регуляцию жизнедеятельности клеток и тканей.

Сами по себе вопросы природы, структуры, биоспецифических эффекторов взаимодействия рецептор–лиганд уже формируют сложную многоплановую проблему. Но дело еще и в другом.

Исследуя свойства субъединиц NGF, мы обнаружили, что они не только обладают протеолитическими свойствами, но и способны генерировать и конвергировать активные формы кислорода (в частности, супероксидный радикал), расщеплять ДНК и РНК [53, 96, 97]. Это позволило нам сформулировать гипотезу: *возбуждение белка рецептора или взаимодействие с белковым лигандом является следствием конформационных изменений в рецепторе, вызванных воздействием функционально активных каталитических сайтов лиганда, что может обуславливать определенную химическую модификацию белка рецептора* [53]. Но для подтверждения данного предположения требуется проведение многочисленных целенаправленных исследований.

Важным вопросом в рамках протеолиза является отношение к внутриклеточным и внеклеточным протеолитическим системам организма-мишени **белков токсинов**. Так, целый ряд токсинов патогенных микроорганизмов имеет белковую природу. По странной и пока не вполне ясной причине они резистентны к мощному протеолитическому арсеналу инфицируемого организма и практически беспрепятственно оказывают свое летальное действие.

Исследования очищенных образцов дифтерийного токсина штамма PW-8 показали, что токсин способен не только подавлять активность α -химотрипсина и папаина [37, 53], но и, как отмечалось выше, медленно активировать плазминоген. Анализируя молекулярные механизмы агрессии патогенных микроорганизмов, следует особое внимание обратить на их собственный набор протеиназ и способность продуцировать ингибиторы протеолиза. Патогенетическая роль этих двух групп белков остается еще мало изученной, не говоря уже о структурно-функциональной специфике. *Нам представляется, что протеиназы патогенных микроорганизмов во многих случаях, если не во всех, способны играть роль истинного фактора патогенности или, во всяком случае, кофактора* [99]. В литературе можно встретить данные о кардиопатогенном действии очищенных образцов протеиназы гемолитических стрептококков группы А [100] или о патогенном действии протеиназ *Pseudomonas aeruginosa*, способных расщеплять иммуноглобулины, а также вызывать распад коллагена и эластина [101] и, соответственно, построенных из этих белков анатомических образований. Однако в целом этот вопрос представляется изученным крайне недостаточно. Упомянув об образовании патогенными микроорганизмами ингибиторов протеолиза, мы пока не рассматриваем вопросы воздействия этих субстанций на клетки инфицируемого организма. Между тем и здесь есть пища для размышлений. Дело в том, что сам дифтерийный токсин обладает протеолитической активностью, причем, судя по данным ингибиторного анализа, последняя отличается от внутриклеточных протеиназ коринебактерий дифтерии [102].

Из культуральной жидкости *Corynebacterium diphtheriae* штамма PW-8, выращиваемой в отсутствие сыворотки крови, путем кислотной преципитации и диализа нами выделены осаждаемые трихлоруксусной кислотой субстанции, заметно подавляющие активность α -химотрипсина, плазмина, папаина, пепсина, но потенцирующие плазминоген-активаторную способность γ -субъединицы NGF, тканевого активатора плазминогена [103, 104]. Пока о природе и роли подобных соединений информации нет.

Токсины патогенных микроорганизмов имеют двойное значение. С одной стороны, являясь мощным инструментом «агрессии» возбудителя инфекции, они – составляющая бактериологического оружия. Самые сильные из природных токсинов – именно микробного происхождения. С другой стороны, известны попытки использования таких токсинов для разработки целевых лекарственных препаратов, например, туморолитического действия. Раскрытие свойств этих токсинов – залог успешной разработки средств защиты.

Мы часто увлекаемся данными литературы и поэтому, изучая те или иные протеиназы склонны рассматривать их функции в фарватере уже существующих представлений. Иногда это оказывается лишь «надводной частью айсберга». Так, у известных протеиназ семейства каспаз существует, по-видимому, неапоптозная функция. Последняя, в частности, продемонстрирована у каспазы-8, которая способна выполнять роль негативного кофактора рецептора андрогенов путем физического взаимодействия [105].

В связи с тем обстоятельством, что протеолитические энзимы используют в качестве средств заместительной и патогенетической терапии, в том числе при системном введении, встает вопрос о регуляции действия данных протеиназ *in vivo* в каждом конкретном случае.

А поскольку последние, по-видимому, достаточно разнообразны, именно этим объясняется не всегда ожидаемый эффект от использования протеиназосодержащих препаратов (типа вобэнзима, например).

Заключение. Итак, проблема протеолиза представляет собой, по сути дела, конгломерат проблем и одно из наиболее бурно развивающихся направлений физико-химической биологии и молекулярной медицины. Ежегодно в научной печати публикуется огромное количество материалов, в той или иной мере касающихся разных аспектов протеолиза и иллюстрирующих важность проблемы и достигнутые успехи.

Анализ тематики 5-й Генеральной конференции международной ассоциации по протеолизу (октябрь 2007 г., Греция), материалов VI симпозиума по химии протеолитических ферментов (апрель 2007 г., Москва) [111], симпозиума по протеолизу (который по просьбе Международной ассоциации один из авторов настоящей статьи имел честь организовать и возглавить в качестве председателя-модератора) в рамках 4-го Международного конгресса по клеточной и молекулярной биологии (октябрь 2005 г., Франция) [112] позволяет считать, что основные работы ведутся как раз в области роли протеолитических реакций в физиологии и патологии клетки, организма.

Это не означает, что проблемы протеиназного катализа, регуляции протеолитических процессов решены. Ознакомление с литературой дает основание констатировать, что принципиально новые идеи сейчас отсутствуют. Такое положение дел обусловлено и ограничениями на современном этапе возможностей экспериментальной техники физической химии, биофизики макромолекул и биохимии.

Обобщенный в настоящей статье и прежних наших публикациях фактический материал позволил выдвинуть несколько авторских концепций как раз в отношении реализации протеолиза и его регуляции, что открывает достаточно широкие перспективы дальнейшей плодотворной работы с получением результатов фундаментальной и практической значимости.

Ни в коей мере не покушаясь на основную парадигму протеолиза – осуществление его реакций посредством специфического энзиматического катализа, мы не можем оставлять без внимания круг вопросов, не совсем укладывающихся в рамки классических представлений. По-видимому, это имеет место на всех уровнях организации биосистем, но, как представляется, чаще всего у низших организмов.

Одним из принципов реализации протеолитических реакций является единство структурно-функциональных свойств белковых молекул и взаимообусловленность их структуры и функций. Этот, казалось бы, давно известный и очевидный принцип не всегда принимается в целом. Результатом является некоторая разобщенность и оторванность представлений об этих двух сторонах макромолекулы, что, на наш взгляд, не способствует адекватному видению общей картины ряда явлений, включая, например, генезис агрессивных прионовых молекул, их аутоамплификации, ряд других событий, затрагивающих нативные молекулы белка в ходе протеолиза.

Достижению дальнейших успехов в разрешении ряда частных проблем протеолиза несомненно будет препятствовать отсутствие четкого представления о механизме реализации протеолитической реакции, во многом остающимся пока *terra incognita*.

Литература

1. Самнер Дж. Б., Сомерс Г. Ф. Химия ферментов и методы их исследования. М., 1948.
2. Barrett A. J. // Protein degradation in health and disease. Amsterdam, 1980. P. 1–13.
3. Tisljar U., Barrett A. J. // Biochem. J. 1990. Vol. 267. P. 531–533.
4. Никандров В. Н. // Энзимология тромболизиса и стрептокиназа. Минск, 1982. С. 3–11.
5. Vanerje R., Liu J., Beatty W., Pelosot L. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. Vol. 99, N 2. P. 990–995.
6. Rawling N. D., Morton F., Barrett A. J. // Nucl. Acids Res. 2006. Vol. 34. P. D270–D272.
7. Turner A. J., Nalivaeva N. N. // Cel. Mol. Biol. 2006. Vol. 52, N 4. P. 40–48.
8. Madani R., Nef S., Vassalli J.-D. // Trends Mol. Med. 2003. Vol. 9(5). P. 183–185.
9. Наливаева Н. Н. Роль гипоксии и ишемии мозга в метаболизме амилоидного пептида и патогенезе болезни Альцгеймера: Автореф. ... дис. д-ра биол. наук. СПб., 2006.
10. Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э. И. др. Основы биохимии. М., 1981. Т. 1.
11. Антонов В. К. Химия протеолиза. М., 1991.

12. Никандров В. Н., Пыжова Н. С., Судник Ю. М. // Докл. АН БССР. 1986. Т. 30, № 6. С. 558–560.
13. Никандров В. Н., Пыжова Н. С., Вотяков В. И., Клингер Ю. Е. // Докл. АН БССР. 1986. Т. 30, № 11. С. 1033–1036.
14. Никандров В. Н., Пыжова Н. С., Вотяков В. И., Клингер Ю. Е. // Докл. АН БССР. 1987. Т. 31, № 4. С. 375–378.
15. Nikandrov V. N., Pyzhova N. S. // *Folia Haematol.* 1988. Vol. 115, N 4. P. 557–561.
16. Nikandrov V. N. // *Intern. J. Biochem.* 1992. Vol. 24, N 1. P. 47–53.
17. Никандров В. Н. // Профилактика и лечение инфекционных и паразитарных заболеваний: Материалы юбил. конф. БелНИИ эпидемиологии и микробиологии. Минск, 1995. С. 274–286.
18. Никандров В. Н., Пыжова Н. С. // *Весті НАН Беларусі. Сер. мед.-біял. навук.* 2001. № 1. С. 54–60.
19. Nikandrov V. N., Pyzhova N. S. // *Cel. Mol. Biol.* 2006. Vol. 52, N 4. P. 30–39.
20. Nikandrov V. N. // 14th International Congress of Biochemistry: Abstracts. Prague, 1988. Vol. 1. P. 60.
21. Pyzhova N. S., Nikandrov V. N. // *Thromb. Res.* 1996. Vol. 82, N 4. P. 303–312.
22. Никандров В. Н. Стрептокиназа. Структурные и функциональные свойства: Дис. ... д-ра биол. наук. Минск, 1988.
23. Никандров В. Н. // *Биорг. химия.* 1994. Т. 20, № 2. С. 169–181.
24. Никандров В. Н. // *Новости мед.-биол. наук.* 2004. № 3. С. 127–146.
25. Dean R. T., Roberts G. S., Jessup W. // *Progr. Clin. Biol. Res.* 1985. Vol. 180. P. 341–350.
26. Wolf S. P., Dean R. T. // *Biochem. J.* 1986. Vol. 234, N 2. P. 399–403.
27. Davies K. J. A. // *J. Biol. Chem.* 1987. Vol. 262, N 20. P. 9895–9901.
28. Lawrence D. A., Loskutoff D. J. // *Biochemistry.* 1986. Vol. 25, N 21. P. 6351–6355.
29. Stief Th. W., Heimburger N. // *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* 1988. Vol. 369. P. 1337–1342.
30. Burkhardt H., Hartmann F., Schwingel M. L. // *Enzyme.* 1986 (1987). Vol. 36, N 4. P. 221–231.
31. Пыжова Н. С. Участие активных форм кислорода в процессах протеолиза: Дис. ... канд. биол. наук. Минск, 1990.
32. Судник Ю. М., Клингер Ю. Е., Черенкевич С. Н. и др. // *Бюл. эксперим. биол. мед.* 1985. Т. 101, № 12. С. 688–690.
33. Судник Ю. М., Никандров В. Н. // VII съезд гигиенистов и сан. врачей, VII съезд микробиологов, эпидемиологов и паразитологов, II съезд инфекционистов Белоруссии: Материалы объедин. съезда науч. обществ. Минск, 1984. С. 213–214.
34. Судник Ю. М., Никандров В. Н., Пыжова Н. С. и др. // Молекулярно-клеточные основы функционирования биосистем: Тез. докл. Второго съезда Белорус. о-ва фотобиологов и биофизиков. Минск, 1996. С. 179.
35. Никандров В. Н., Пыжова Н. С., Воробьева Г. В. // *Химия протеолитических ферментов: Тез. докл. и стенд. сообщ. IV симп. М., 1997. С. 108.*
36. Bielski V. H. J., Chan Ph. C. // *J. Biol. Chem.* 1974. Vol. 250, N 1. P. 318–321.
37. Никандров В. Н., Пыжова Н. С., Малевич Т. М. и др. // Инфекция и иммунитет: Материалы респ. науч.-практ. конф. Минск, 1999. С. 161–176.
38. Christensen L. R., MacLeod C. M. // *J. Gen. Physiol.* 1945. Vol. 28, N 6. P. 559–583.
39. Christensen L. R. // *J. Gen. Physiol.* 1946. Vol. 30, N 2. P. 149–157.
40. Loomis E. C. US Patent N 2624691. 1953.
41. Berger P., Viasher T. L., Micheli A. // *Experientia.* 1983. Vol. 39, N 10. P. 1109–1111.
42. Kruithof E. K. O. // *Enzyme.* 1988. Vol. 40. P. 113–121.
43. Chakrabarty S. // *Thromb. Res.* 1989. Vol. 55, N 4. P. 511–519.
44. Collden D. // *Thromb. Haemost.* 1980. Vol. 43, N 4. P. 77–89.
45. Измайлова В. Н., Ребиндер П. А. Структурообразование в белковых системах. М., 1974.
46. Tenneti L., D'Emilia D. M., Lipton St. A. // *Neurosci. Lett.* 1997. Vol. 236. P. 136–142.
47. Пыжова Н. С., Никандров В. Н. Роль монооксида азота в процессах жизнедеятельности. Минск, 1998. С. 227–230.
48. Мосолов В. В. Протеолитические ферменты. М., 1971.
49. Мосолов В. В. Белковые ингибиторы как регуляторы процессов протеолиза: 36-е Баховское чтение. М., 1983.
50. Binder V. R., Christ G., Gruber F. et al. // *News Physiol. Sci.* 2002. Vol. 17. P. 56–71.
51. Lenarđić V., Turk V. // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274, N 2. P. 563–566.
52. Никандров В. Н., Пыжова Н. С. // *Достижения мед. науки Беларуси.* Минск, 2002. Вып. VII. С. 48–49.
53. Никандров В. Н., Пыжова Н. С. // *Весті НАН Беларусі. Сер. мед.-біял. навук.* 2003. № 3. С. 75–89.
54. Никандров В. Н., Пыжова Н. С., Шапчиц Н. С. // Докл. НАН Беларуси. 2007. Т. 51, № 3. С. 92–97.
55. Ефременко Е. Н., Варфоломеев С. Д. // *Успехи биол. химии.* 2004. Т. 44. С. 302–340.
56. Никандров В. Н., Пыжова Н. С., Шатило Н. Л. // Роль антропогенных и природных патогенов в формировании инфекционных и неинфекционных болезней человека. Медико-экологические аспекты проблемы: Материалы междунар. конф. Минск, 2002. С. 326–342.
57. Кирпиченко Л. Н. // Протеолиз, его регуляция и роль в физиологии и патологии клетки: Тез. докл. Междунар. конф. Минск, 2007. С. 13–14.
58. Ciechanover A. // *Exp. Biol. Med.* 2004. Vol. 231. P. 1197–1211.
59. Driscoll J., Goldberg A. L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989. Vol. 86. P. 787–791.

60. Никандров В. Н., Пыжова Н. С. // XI съезд Белорус. о-ва физиологов: Тез. докл. Минск, 2006. С. 103–104.
61. Пыжова Н. С., Никандров В. Н. // Химия протеолитических ферментов: Тез. докл. и стенд. сообщ. VI симп. М., 2007. С. 44–45.
62. Pillai S., Zull J. E. // *J. Biol. Chem.* 1985. Vol. 260, N 14. P. 8384–8389.
63. Никандров В. Н., Пыжова Н. С., Вотяков В. И. // *Бюл. эксперим. биол. и мед.* 1987. Т. 104, № 7. С. 49–51.
64. Цыманович С. Г., Никандров В. Н., Максимова Р. А. и др. // *Вопр. мед. химии.* 1992. Т. 38, № 3. С. 44–45.
65. Никандров В. Н., Пыжова Н. С. // *Проблемы медицинской энзимологии: Тр. Всерос. конф. М., 2002.* С. 163–164.
66. Никандров В. Н., Пыжова Н. С. // *Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: Сб. ст. VI съезда Белорус. обществ. объединения фотобиологов и биофизиков. Минск, 2004. Ч. I.* С. 236–238.
67. Camberos M. C., Perez A. A., Udrişar D. P. et al. // *Exp. Biol. Med.* 2001. Vol. 226. P. 334–341.
68. Song E. S., Juliano M. A., Juliano L. et al. // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279. P. 54216–54220.
69. Никандров В. Н., Пыжова Н. С., Скороход Г. А. // *Молекулярная диагностика инфекционных болезней: Материалы Междунар. науч.-практ. конф. Минск, 2007.* С. 217–218.
70. Пыжова Н. С., Никандров В. Н., Лаптева И. М., Жук О. Н. // *Протеолиз, его регуляция и роль в физиологии и патологии клетки: Тез. докл. Междунар. конф. Минск, 2007.* С. 65–66.
71. Никандров В. Н., Пыжова Н. С. // *Актуальные вопросы гепатологии: Материалы III симп. гепатологов Беларуси. Минск, 1998.* С. 39.
72. Никандров В. Н., Пыжова Н. С. // *Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: Сб. ст. VII съезда БООФиБ. Минск, 2006. Т. 1. С. 114–116.*
73. Nomura K., Kato J., Takiguchi N. et al. // *Cel. Mol. Biol.* 2006. Vol. 52, N 4. P. 23–29.
74. Bergmann S., Rohde M., Hammerschmidt S. // *Infect. Immun.* 2004. Vol. 72, N 4. P. 2416–2419.
75. Nakajima K., Nagato K., Hamanoue M. et al. // *FEBS Lett.* 1993. Vol. 333, N 3. P. 223–228.
76. Никандров В. Н., Воробьева Г. В., Мурашко О. Н. и др. // *Докл. АН Беларуси.* 1997. Т. 41, № 3. С. 69–75.
77. Nikandrov V. N., Murashko O. N., Vorobyova G. V. et al. // *Lett. Pept. Sci.* 1997. Vol. 4, N 4–6. P. 497–502.
78. Мурашко О. Н. Особенности образования и свойства комплексов плазминогена, стрептокиназы с оксидоредуктазами и пируваткиназой: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Гомель, 2004.
79. Никандров В. Н., Петрусенко Г. П., Гронская Р. И. // *Весці НАН Беларусі. Сер. мед.-біял. навук.* 2003. № 4. С. 84–87.
80. Шкундия Н. С., Тер-Аванесян М. Д. // *Успехи биол. химии.* 2006. Т. 46. С. 3–42.
81. Ma J., Wollmann R., Lindquist S. // *Science.* 2002. Vol. 298. P. 1781–1785.
82. Ma J., Lindquist S. // *Science.* 2002. Vol. 298. P. 1785–1788.
83. Schwengler F. Prion diseases: a genetic perspective: Diss. ... Doctor in Veterinary Biology. München, 2005.
84. Березов Т. Т., Коровкин Б. Ф. *Биологическая химия.* 3-е изд., перераб. и доп. М., 2002.
85. Далин М. В., Фиш Н. Г. *Белковые токсины микробов.* М., 1980.
86. Жук О. Н., Никандров В. Н. // *Механизмы функционирования висцеральных систем: Тез. докл. Междунар. конф., посвящ. 75-летию со дня рожд. А. М. Уголева.* СПб., 2001. С. 129–130.
87. Никандров В. Н., Жук О. Н. // *Морфология.* 2005. Т. 128, № 5. С. 33–36.
88. Никандров В. Н., Пятин В. Ф., Алексеева А. С. и др. // *Весці НАН Беларусі. Сер. мед.-біял. навук.* 2003. № 2. С. 40–43.
89. Жук О. Н., Никандров В. Н. Пат. ВУ № 8301, 04.04.2006.
90. Лукашевич В. С., Лукашевич И. Б., Никандров В. Н. Положительное решение от 21.09.2006 по заявке на изобретение № 20040411 от 10.05.2004.
91. Гронская Р. И., Никандров В. Н. Положительное решение от 01.09.2006 по заявке на изобрет. № 2004410 от 10.05.2004.
92. Полукошко Е. Ф., Никандров В. Н. Заявка на изобрет. № 20051100 от 15.11.2005.
93. Романовская А. А., Никандров В. Н. Заявка на изобрет. № 20070079 от 29.01.2007.
94. Невинский Г. А., Канышкова Т. Г., Буневич В. Н. // *Биохимия.* 2000. Т. 65, № 11. С. 1473–1487.
95. Никандров В. Н., Пыжова Н. С. Заявка на изобрет. № 20061234 от 21.12.2006.
96. Nikandrov V. N., Puzhova N. S., Lukashevitch V. S. et al. // *18th Intern. Congr. Biochem. Mol. Biol.: Abstract Book. Birmingham, 2000.* P. 317.
97. Никандров В. Н., Пыжова Н. С., Лукашевич В. С. и др. // *Достижения медицинской науки Беларуси. Минск, 2000. Вып. V. С. 104–105.*
98. Böhm St. K., McConalogue K., Kong W., Bunnett N. W. // *News Physiol. Sci.* 1998. Vol. 13. P. 222–240.
99. Никандров В. Н., Пыжова Н. С. // *Здравоохранение.* 2006. № 11. С. 4–9.
100. Белецкая Л. В., Верболович П. А., Полосухина Т. Я. *Экспериментальная стрептококковая инфекция.* Алма-Ата, 1978.

101. Синегнойная инфекция / Под ред. А. Ф. Мороз. М., 1988.
102. Никандров В. Н., Пыжова Н. С. // Достижения медицинской науки Беларуси. Минск, 2005. Вып. X. С. 42–43.
103. Никандров В. Н., Пыжова Н. С., Шатило Н. Л., Шапчиц Н. С. // Проблемы инфекционной патологии XXI века: Материалы юбил. конф., посвящ. 80-летию НИИЭМ. Минск, 2004. С. 177–191.
104. Никандров В. Н., Пыжова Н. С. // Достижения медицинской науки Беларуси. Минск, 2004. Вып. IX. С. 64–65.
105. Qi W., Wu H., Yang L. et al. // EMBO J. 2007. Vol. 26. P. 65–75.
106. Pacifici R. E., Solo D. S., Davies K. J. A. // Free Radical Biol. Med. 1989. Vol. 7. P. 521–536.
107. Kuehn L., Dahlmann B., Gauthier F., Neubauer H. P. // Biochim. Biophys. Acta. 1989. Vol. 991, N 2. P. 263–271.
108. Ishmael F. T., Shier V. K., Ishmael S. S., Bond J. S. // J. Biol. Chem. 2005. Vol. 280, N 14. P. 13895–13901.
109. Horwich A. L., Weber-Ban E. U., Finley D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. Vol. 96. P. 11033–11040.
110. Lightcap E. S., McCormack T. A., Pien Ch. S., Chan V. et al. // Clin. Chem. 2000. Vol. 46, N 5. P. 673–683.
111. Химия протеолитических ферментов: Тез. докл. и стенд. сообщений. VI симп. М., 2007.
112. Proteolysis, its regulation and role in physiology and pathology of cells (Prof. Nikandrov) // 4th World Congr. of Cell. and Molec. Biol.: Abstracts book. Poitiers-France, 2005. P. 65–68.