

УДК 577.112 : 577.151

Н.С. ПЫЖОВА, канд. биол. наук
старший научный сотрудник
РНПЦ эпидемиологии и микробиологии
Минздрава Республики Беларусь,
г. Минск, Республика Беларусь

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

Статья поступила 3 октября 2022 г.

ЭНЗИМАТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФАКТОРА РОСТА НЕРВОВ (NGF) И ЕГО СУБЪЕДИНИЦ

Изучены энзиматические свойства образцов высокой степени чистоты олигомера NGF и его субъединиц. Обнаружено наличие у β -субъединицы плазминоген-активаторной способности, а у β - и γ -субъединиц – прямой протеолитической активности в отношении основного белка – протамина. Ингибиторный анализ свидетельствует о «сернистой» природе этой активности, в молекуле β -субъединицы вероятно наличие функционально значимых металл-содержащих сайтов. Все три субъединицы наделены супероксид-конвергирующей способностью, но только β - и γ -субъединицы, по данным биохемилюминесценции, способны разлагать H_2O_2 с генерированием активных форм кислорода. Плазминоген-активаторная способность β - и γ -субъединиц резко – на 70–100% – угнеталась АТФ, не изменялась при добавлении 3',5'-АМР, умеренно – на 18–40% – снижалась в присутствии АДФ и на 40% возрастала в присутствии АМР. Активность β -субъединицы и γ -субъединицы угнеталась в присутствии GTP на 100 и 40% соответственно. У всех трех субъединиц обнаружена способность к расщеплению ДНК и РНК. Эффекторный анализ и концентрационная зависимость дают основание считать, что субъединицы самостоятельны в этой активности и нет каких-либо взаимопримесей. Обработка α -субъединицы источниками активных форм кислорода не привела к проявлению протеолитической активности. Вместе с тем ее молекула имеет активный центр, наделенный активностью нуклеазной.

Ключевые слова: фактор роста нервов, субъединицы, плазминоген-активаторная способность, протеолитическая активность, разложение H_2O_2 , конверсия супероксидного радикала, пуриновые нуклеотиды, нуклеазная активность

PYZHOVA Nelly S. PhD in Biol. Sc.
RSPC of Epidemiology and Microbiology,
Senior Researcher
Minsk, Republic of Belarus

NIKANDROV Vitaliy N., Doctor of Biol. Sc. Habil., Professor of Biochemistry,
Professor of the Department of Biotechnology,
Polesky State University, Pinsk, Republic of Belarus
E-mail: nikandrov.vitaly@gmail.com.

ENZYMATIC PROPERTIES OF NERVE GROWTH FACTOR (NGF) AND ITS SUBUNITS

The enzymatic properties of high purity samples of the NGF oligomer and its subunits were studied. The presence of plasminogen-activating ability in the β -subunit, and direct proteolytic activity in relation to

the basic protein, protamine, in the β - and γ -subunits was found. The inhibitory analysis indicates the "serine" nature of this activity; the presence of functionally significant metal-containing sites in the β -subunit molecule is likely. All three subunits are endowed with the superoxide-converging ability, but only β - and γ -subunits, according to biochemiluminescence data, are able to decompose H_2O_2 with the generation of reactive oxygen species. The plasminogen-activating ability of β - and γ -subunits was sharply - by 70-100% - inhibited by ATP, did not change with the addition of 3',5'-AMP, moderately - by 18-40% - decreased in the presence of ADP and by 40% increased in the presence of AMP. The activity of the β -subunit and γ -subunit was inhibited in the presence of GTP by 100 and 40%, respectively. All three subunits were found to be able to cleave DNA and RNA. Effector analysis and concentration dependence give reason to believe that the subunits are independent in this activity, and there are no mutual impurities. Treatment of the α -subunit with sources of reactive oxygen species did not lead to the manifestation of proteolytic activity. At the same time, its molecule has an active center endowed with nuclease activity.

Keywords: nerve growth factor, subunits, plasminogen-activating ability, proteolytic activity, H_2O_2 degradation, superoxide radical conversion, purine nucleotides, nuclease activity

Введение. Фактор роста нервов (NGF) – один из нейроспецифических белков регуляторного типа. Его считают ответственным за дифференцировку и пролиферацию адренергических симпатических и сенсорных нейронов периферической нервной системы, холинергических нейронов базальных ядер переднего мозга, регенерацию нервов, нейронов развивающейся нервной системы, включая ноцицепторы. Установлено участие его в симпатической передаче возбуждения, Ca^{2+} -зависимой стимуляции выхода ацетилхолина, дифференцировку, пролиферацию и биосинтетические свойства клеток иммунной системы [1–4].

Было установлено, что NGF – основной белок-олигомер 118 аминокислотных остатков общей молекулярной массы 131 кДа, содержащий 1–2 атома цинка. Олигомер 7S NGF состоит из двух α -субъединиц, двух β -субъединиц (они образуют димер в составе олигомера NGF) и двух γ -субъединиц. Плазминоген-активаторная активность присуща олигомеру фактора 7S и его γ -субъединице, тогда как α - и β -субъединицы ее лишены [5, 6]. Протеиназой является γ -субъединица, принадлежащая к калликреиновому семейству сериновых протеиназ, тогда как α -субъединица – неактивная протеиназа [7] и лишена специфической биологической активности [8].

Активность γ -субъединицы ингибируется диизопропилфторфосфатом, она неспособна расщеплять фибрин или казеин, при этом гидролизует синтетические эфиры аргинина [9].

Γ -субъединица NGF катализирует расщепление N-бензоил-L-аргинин-этилового эфира, причем добавление к ней очищенных α - или β -субъединиц существенно не отражалось на этой активности в 0,05 М трис-буфере при pH 7,0, 8,0 и 9,0, тогда как активность смеси (γ - + α - + β -)субъединиц снижалась при pH 7,0 и 8,0 (но не при pH 9,0) на 80 и 49% соответственно. Расщеплялся также и TAME, но гораздо слабее. По расщеплению BAEE и TAME при pH 7,0 γ -субъединица превосходила трипсин в 6,7 и 2,1 раза соответственно [10].

Однако, несмотря на многолетние исследования свойств молекулы NGF и его субъединиц, до сих пор остается не совсем ясной природа его биологической активности на молекулярном уровне. Среди данных литературы о функциональных свойствах NGF и его субъединиц примечательным было обнаружение у γ -субъединицы плазминоген-активаторной способности (см. выше по тексту). Вместе с тем, считали, что остальные субъединицы (β - и α -) лишены подобных свойств.

Таково было положение до начала наших работ.

В настоящей статье полностью раскрыты результаты проведенных нами экспериментальных исследований, основные результаты которых были получены в 1998–2001 годы. Эксперименты были проведены на базе лаборатории регуляторных белков и пептидов Института физиологии НАН Беларуси и лаборатории биохимии НИИ эпидемиологии и микробиологии Минздрава Республики Беларусь. Результаты их изложены в целом ря-

де тезисов и фрагментах статей [11–23], но по ряду причин в то время статья так и не была написана. Методическая сторона этих исследований раскрыта в ранее опубликованных нами статьях [24–27].

Образцы фактора роста нервов – 7S и его субъединиц выделены из подчелюстных слюнных желез белых мышей-самцов сотрудниками лаборатории регуляторных белков и пептидов Института физиологии НАН Беларуси и предоставлены старшим научным сотрудником В.С. Лукашевичем. Процесс выделения и очистки включал гомогенизирование, осаждение сульфатом аммония, хроматографию на сефакриле S-200, хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе, ультрафильтрацию и рехроматографию на сефакриле S-200 [28]. Полученные образцы имели активность 20 нг/биол. ед.

Субъединицы фактора выделяли как описано ранее методом диссоциации в кислой среде [1]. Их гомогенность подтверждена методами гель-хроматографии, электрофореза в полиакриламидном геле и изоэлектрофокусирования в системе амфолинов. Биологическая активность β-субъединицы оценена в тесте с трансформацией клеток феохромоцитомы РС12.

Результаты и их обсуждение. На первом этапе исследований было установлено, что α-либо γ-субъединицы в отсутствие

плазминогена не расщепляют фибрин (таблица 1). Правда, под действием γ-субъединицы частичный фибринолиз все же проявлялся, что совпадает с изложенным в литературе мнением о принадлежности ее к сериновым протеиназам. Нужно отметить, что урокиназа (ЕС 3.4.21.31) также обладает собственной фибринолитической активностью, которая уступает ее плазминоген-активаторной функции [29]. После добавления к образцам очищенного плазминогена под действием γ-субъединицы отмечен четкий фибринолиз, тогда как у α-субъединицы такая способность отсутствовала.

При использовании же плазминоген-содержащих фибриновых пластин был выявлен фибринолиз не только под действием γ-субъединицы, но и в присутствии β-субъединицы фактора (таблица 2). Этот процесс характеризовался продолжительной лаг-фазой в сравнении со стрептокиназой и урокиназой и уступал им по интенсивности. Однако так была впервые обнаружена в 2000–2002 годы плазминоген-активаторная способность β-субъединицы NGF [11–13,15 и др.]. Причем, в отличие от обычных активаторов плазминогена, эта способность NGF и субъединиц имела lag-период ≥ 4 час [12, 15 и др.].

Таблица 1. – Расщепление фибриновых пластин с инактивированным плазминогеном (мм² зон лизиса) субъединицами (0,06 М фосфатный буфер, рН 7,4, 37 °С, 20 час; n=5)

Образец	Размер зон лизиса, мм ²
α-субъединица, 0,1 мг/мл	0
γ-субъединица, 0,1 мг/мл	частичный лизис
α-субъединица + плазминоген, 0,2 мг/мл	0
γ-субъединица + плазминоген, 0,2 мг/мл	116 ± 9

Примечание – Плазминоген выделен методом аффинной хроматографии из отходов получения γ-глобулинов, на пластины наносили 15 мкл субъединиц или 15 мкл субъединиц + 15 мкл плазминогена, концентрация белков субъединиц – 0,1 г/мл, плазминогена – 0,2 мг/мл

Таблица 2. – Кинетика лизиса плазминоген-содержащих фибриновых пластин (мм^2 зон лизиса) различными активаторами плазминогена (0,06 М фосфатный буфер, pH 7,4, 37 °C; $n=5$)

Время инкубации, час	Стрептокиназа, 5 МЕ	Урокиназа, 63 мкг/мл	γ -субъединица NGF, 63 мкг/мл	β -субъединица NGF, 63 мкг/мл
0	0	0	0	0
1	33 ± 2	33 ± 2	0	0
2	52 ± 4	68 ± 5	0	0
4	68 ± 4	95 ± 5	0	0
18	400 ± 21	637 ± 32	39 ± 3	32 ± 2

Примечание – Использованы международный стандарт ВОЗ «Стрептокиназа» и урокиназа фирмы J.R.T., Япония.

Таблица 3. – Влияние олигомера NGF и его субъединиц на расщепление плазминоген-содержащих фибриновых пластин активаторами плазминогена (мм^2 зон лизиса, 0,06 М фосфатный буфер pH 7,4, 37 °C, 20 часов; $n=4$)

Варианты эксперимента	Стрептокиназа	Урокиназа	Тканевый активатор плазминогена
Контроль	340 ± 15	230 ± 12	233 ± 11
+ α -субъединица (0 мм^2)	289 ± 12	204 ± 10	227 ± 9
+ β -субъединица ($158 \pm 8 \text{ мм}^2$)	339 ± 17	297 ± 14	335 ± 16
+ γ -субъединица ($707 \pm 31 \text{ мм}^2$)	670 ± 25	599 ± 22	723 ± 27
+ 7S NGF ($468 \pm 20 \text{ мм}^2$)	442 ± 19	581 ± 24	395 ± 16

Примечание – В скобках указана собственная плазминоген-активаторная способность NGF и его субъединиц; частично очищенный тканевый активатор плазминогена получен из сердца свинки.

Следует заметить, что в работе [5] наличие плазминоген-активаторной функции у β -субъединицы отрицалось. Однако авторы не привели концентрацию образца, с которым проводилось исследование. Полученные же нами данные позволяют считать, что таковая у β -субъединицы лишь на 20% уступала плазминоген-активаторной способности γ -субъединицы.

Исследование совместного действия олигомера и его субъединиц с хорошо известными активаторами плазминогена не выявили аддитивности плазминоген-активаторной способности, а в случае α -субъединицы – при

смешивании ее со стрептокиназой или урокиназой некоторый тормозящий эффект (11–15%) (таблица 3).

Это дало основание для предположения, что молекулы β - и γ -субъединиц, а также олигомера фактора роста нервов не взаимодействуют с использованными активаторами плазминогена.

Примечательно действие α -субъединицы на плазминоген-активаторную способность β -субъединицы. При температуре 25 °C полное подавление указанной способности наблюдали уже при концентрации α -субъединицы 40 мкг/мл, тогда как при более

высокой температуре даже увеличение концентрации α -субъединицы почти на порядок угнетение плазминоген-активаторной способности β -субъединицы не превышало 40% [12,15] (рисунок 1). На наш взгляд, здесь возможны два варианта развития событий. Либо при более высокой температуре происходит быстрая ассоциация обеих субъединиц, только частично затрагивающая активный сайт β -субъединицы. Либо β -субъединица сама обладает все же протеолитической активностью, что ведет к деструкции молекулы α -субъединицы. Выяснение этих возможных путей требовало проведения дальнейших исследований.

На такую же способность γ -субъединицы α -субъединица практически не влияла:

$444 \pm 17 \text{ мм}^2$ в контроле против $454 \pm 13 \text{ мм}^2$ в опыте (не показано).

Использование группоспецифических ингибиторов протеиназ показало, что фенолметилсульфонилфторид умеренно (на 30%) угнетал плазминоген-активаторную способность олигомера NGF, полностью подавляя такую способность β -субъединицы и на 84% у γ -субъединицы ([12, 17], рисунок 2). Ингибиторное действие *p*-хлормеркурибензоата на действие β -субъединицы не превышало 34%, а в случае γ -субъединицы вообще не проявлялось. Примечательно также небольшое (на 20–26%) снижение плазминоген-активаторной способности только β -субъединицы в присутствии реагентов, связывающих металлы [12].

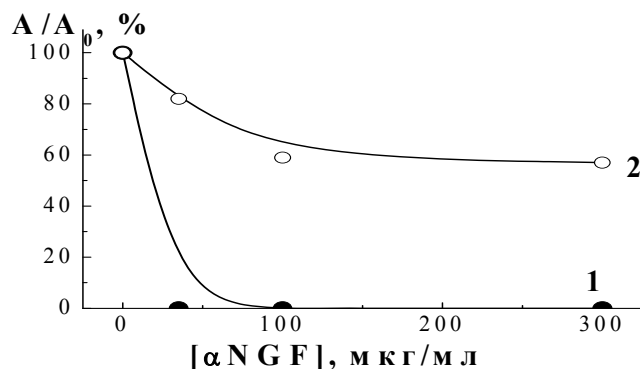


Рисунок 1. – Влияние добавок α -субъединицы NGF на плазминоген-активаторную способность β -субъединицы при 25 °С (1) и при 37 °С (2)

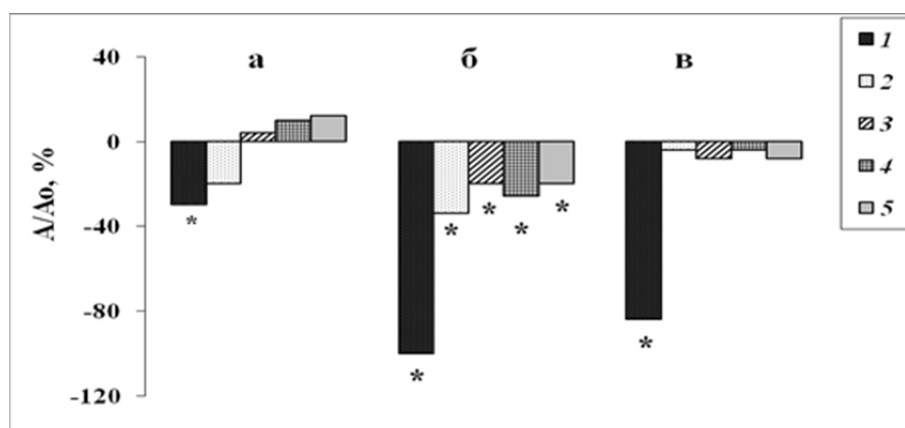


Рисунок 2. – Влияние группоспецифических ингибиторов (1 – фенолметилсульфонилфторид, 2 – *p*-хлормеркурибензоат, 3 – *o*-фенантролин, 4 – 8-гидроксихинолин, 5 – ЭДТА) протеиназ (10^{-3} М) на плазминоген-активаторную способность (% к контролю) олигомера фактора роста нервов (а), его β - (б) и γ - (в) субъединиц, $n = 4$

Примечание –*– Здесь и далее статистически достоверные изменения при $P \leq 0,05$.

Следовательно, плазминоген-активаторная способность исследуемых образцов, по-видимому, является обусловленной серин-содержащим активным центром. В случае β -субъединицы, возможно, имеет место участие или регуляторное действие металл-содержащих сайтов молекулы.

Поскольку активация плазминогена способна реализовываться при участии активных форм кислорода [30, 31], вполне естественно возникал вопрос о возможной взаимосвязи NGF и его субъединиц с реакциями генерирования и трансформации активных форм кислорода.

Прежде всего было изучено действие перехватчиков активных форм кислорода на плазминоген-активаторную функцию олигомера фактора роста нервов и его субъединиц.

Оказалось, что плазминоген-активаторная способность 7SNGF, β - и γ -субъединиц подавлялась нитротетразолиевым синим (0,001 М) на 47, 40 и 100% соответственно, но не перехватчиками $O_2^{\Delta 1}$ или HO^{\cdot} -радикала ([12, 15, 17], рисунок 3).

То обстоятельство, что олигомер NGF в ряде случаев менее чувствителен к эффекторам, чем субъединицы – один из моментов, позволивших предположить модель субъеди-

ничной организации NGF, согласно которой β -субъединица заметно экранирована от растворителя [32].

Дальнейшие исследования опосредованных $O_2^{\cdot -}$ процессов в действии субъединиц фактора роста нервов на биохемиллюминиметре БХЛ-01 (МП «Универсал», Минск) показали, что в системе «люминол- H_2O_2 » внесение β - и, особенно, γ -субъединицы вызывало вспышку хемиллюминесценции с последующим затуханием. Такой способности была лишена α -субъединица ([15, 17, 20, 21], рисунок 4).

Однако в системах генерирования супероксидного радикала редуция восстановления нитротетразолиевого синего наблюдалась в присутствии всех трех субъединиц: α -, β - и γ - на 55–62, 23–27 и 41–52% соответственно. Причем подавление реакции образования формазана α -субъединицей не отличалось от такового в присутствии γ -субъединицы и заметно превышало величину, наблюдавшуюся при внесении в системы β -субъединицы ([12, 17, 18, 20, 21], таблица 4).

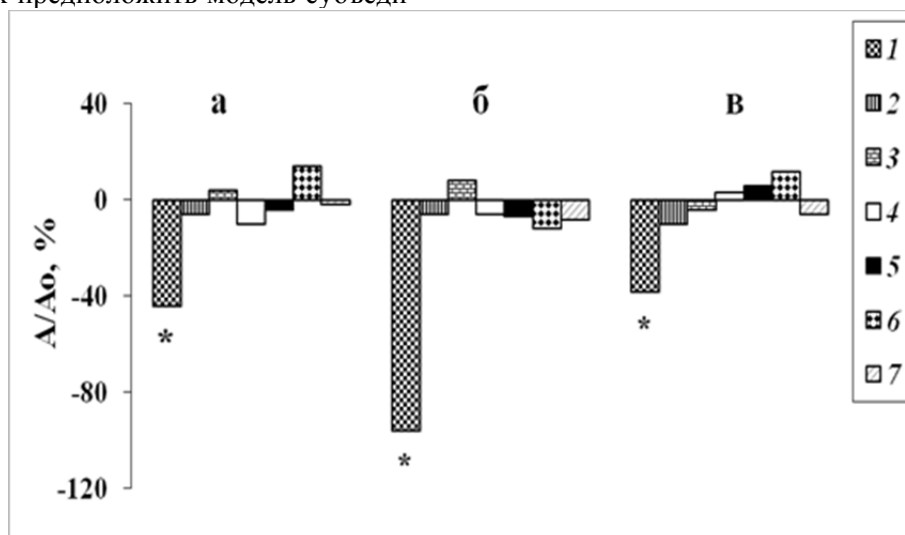


Рисунок 3. – Влияние перехватчиков активных форм кислорода (10^{-3} М, 1 – нитротетразолиевый синий; 2 – адреналин; 3 – манит; 4 – формиат; 5 – азид натрия; 6 – гистидин; 7 – триптофан) на плазминоген-активаторную способность (% к контролю) олигомера фактора роста нервов (а), его β - (б) и γ - (в) субъединиц

Примечание – $n=4$; метод лизиса фибриновых пластин; 0,006 М фосфатный буфер рН 7,4; 37 °С.

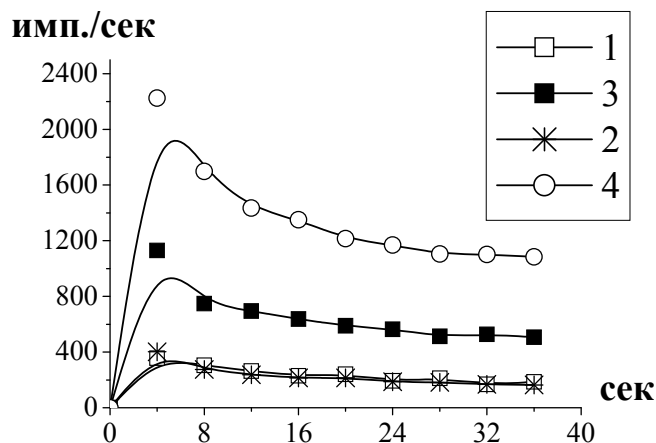


Рисунок 4. – Кинетика затухания хемилюминесценции в системе «люминол–H₂O₂», вызванной субъединицами фактора роста нервов

Примечание – n = 4; 0,06 М фосфатный буфер, pH 7,4; содержание в смеси люминола с концентрацией $1,2 \cdot 10^{-4}$ М – 1,0 мл, содержание в смеси H₂O₂ с концентрацией $3 \cdot 10^{-3}$ М – 0,1 мл, содержание субъединиц в реакционной смеси – 0,065 мг; 1 – фон; 2 – α-субъединица; 3 – β- субъединица; 4 – γ-субъединица; 25 °С.

Таблица 4. – Влияние олигомера 7S NGF и его субъединиц на восстановление нитротетразолиевого синего супероксидными радикалами в буферном растворе (n=4)

Исследуемый белок	Скорость реакции восстановления нитротетразолиевого синего, A ₅₆₀ • мин ⁻¹ в системах генерирования O ₂ ^{•-}	
	NADH-феназинмето-сульфат ^{a)}	Аскорбат-феназинмето-сульфат ^{b)}
Контроль	0,37 ± 0,03	0,54 ± 0,03
+ NGF	0,19 ± 0,02*	0,32 ± 0,02*
+ субъединицы:		
α-	0,17 ± 0,03*	0,21 ± 0,01*
β-	0,28 ± 0,02*	0,42 ± 0*
γ-	0,18 ± 0,03*	0,32 ± 0,03*

Примечание – a) 0,06 М фосфатный буфер pH 7,4, конечная концентрация NADH – $5,2 \cdot 10^{-5}$ М, феназинметосульфата – $6 \cdot 10^{-6}$ М, нитротетразолиевого синего – $5,5 \cdot 10^{-5}$ М; б) 0,052 М пирофосфатный буфер pH 8,3, конечная концентрация аскорбата – $7,6 \cdot 10^{-5}$ М, феназинметосульфата – $1,1 \cdot 10^{-5}$ М, нитротетразолиевого синего – $6,7 \cdot 10^{-5}$ М.

Изложенные материалы в достаточной степени свидетельствуют о том, что плазминоген-активаторная функция β-субъединицы NGF самостоятельна и не вызвана примесью γ-субъединицы. Дополнительным аргументом является действие на плазминоген-активаторную способность пуриновых нуклеотидов ([15, 22], рисунок 5).

Адениловые и гуаниловые нуклеотиды играют важную роль в регуляции протеолиза

[33, 34]. Действие пуриновых нуклеотидов на эти субъединицы отличалось от такового на стрептокиназу [33]. Активность обеих субъединиц как и стрептокиназы резко – на 70–100% – угнеталась АТР. Но в отличие от стрептокиназы, активаторная функция которой подавлялась 3',5'-AMP, но не AMP, ADP и GTP [34], активность обеих субъединиц не изменялась при добавлении 3',5'-AMP (не показано), умеренно – на 18–40% – снижа-

лась в присутствии ADP и на 40% возрастала в присутствии AMP. Наконец, активность β -субъединицы и γ -субъединицы угнеталась при добавлении GTP на 100 и 40% соответственно. Это дает основание считать, что плазминоген-активаторная функция β -субъединицы самостоятельна и не вызвана примесью γ -субъединицы.

В дальнейшем уже в 2010–2011 годы было установлено, что фактор роста нервов способен связывать 1–2 молекулы АТФ в гепарин-связывающем домене молекулы NGF и именно $8N_1$ ATP-NGF комплекс наделен нейропротекторной активностью [35, 36].

Как мы уже указывали во введении, принято считать, что истинной протеолитической активности β -субъединица лишена. В наших экспериментах методом фибриновых пластин с инактивированным плазминогеном, а также методом лизиса казеина и гемоглобина в тонком слое агарового геля было

также установлено, что ни фибрин, ни казеин, ни гемоглобин олигомер NGF и его субъединицы не расщепляли (не показано). Тем не менее, удалось подобрать белок-субстрат, который вполне демонстративно расщепляли γ - и β -субъединицы. Им оказался протамин-сульфат [24 и др.]. При этом протеолитическая активность β -субъединицы в четыре-пять раз уступала таковой γ -субъединицы (таблица 5).

Это дало косвенное подтверждение материалам рисунка 4 и допущению, что β -субъединица фактора роста нервов при определенных условиях способна расщеплять α -субъединицу.

Ингибиторный анализ показал, что протеолитическая активность β -субъединицы заметно угнеталась фенилметилсульфонил-фторидом и умеренно подавлялась *o*-фенантролином (рисунок 6).

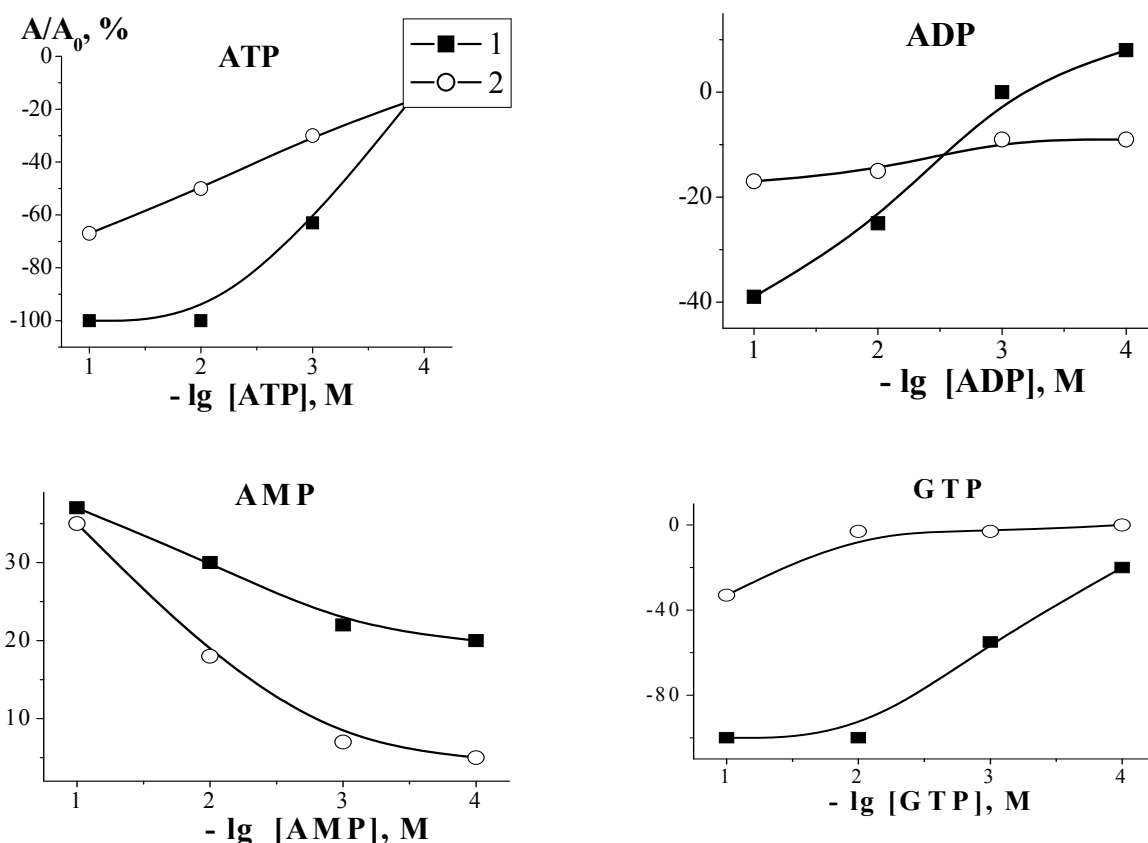


Рисунок 5. – Влияние пуриновых нуклеотидов на плазминоген-активаторную способность ($\%$ к контролю) β -(1) и γ -(2)субъединиц фактора роста нервов ($n=4$; метод лизиса плазминогенсодержащих фибриновых пластин)

Таблица 5. – Расщепление протамин-сульфата субъединицами NGF в тонком слое агарового геля (n=4)

Исследуемый образец, концентрация мг/мл	Размер зон лизиса, мм ²
<i>γ-субъединица,</i>	
1,25	855 ± 30
0,63	743 ± 23
0,31	600 ± 22
<i>β-субъединица,</i>	
0,50	182 ± 10
0,25	110 ± 8
0,12	0

Примечание – Метод лизиса белка-субстрата в тонком слое агарового геля; концентрация агара – 1%, протамин-сульфата – 2%, 0,06 М фосфатный буфер pH 7,4, объем образцов субъединиц – 15 мкл, инкубация при 37 °С 24 часа пластину 1 %-ого агара "Difco", приготовленную на 0,06 М фосфатном буфер pH 7,6.

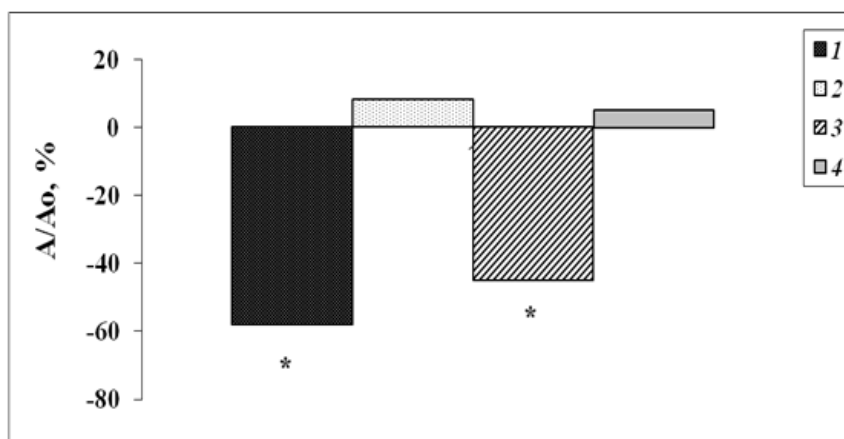


Рисунок 6. – Влияние группоспецифических ингибиторов протеиназ и комплексонов (10⁻³ М, 1 – фенилметилсульфонилфторид;

2 – *p*-хлормеркурибензоат; 3 – *o*-фенантролин, 4 – ЭДТА) на расщепление протамин-сульфата (% к контролю) в тонком слое агарового геля и β-субъединицей фактора роста нервов

Примечание – n=3; метод лизиса белок-агаровых пластин; 0,06 М фосфатный буфер pH 7,4; 37 °С.

Учитывая имеющееся в литературе мнение о зимогенном характере α-субъединицы [7], логична была попытка вызвать активацию этого «зимогена» при воздействиях, активирующих другие зимогены: плазминоген, трипсиноген, химотрипсиноген, пепсиноген – источниками активных форм кислорода прежде всего – супероксидного радикала [31,37,38].

Аликвоты α-субъединицы NGF обрабатывали ионами Fe²⁺ или Fe³⁺ в конечной концентрации 10⁻⁷–10⁻² М, системами генериро-

вания активных форм кислорода – CuSO₄+NADH+рибофлавин, CuCl₂+рибофлавин+аскорбат, FeSO₄+рибофлавин+аскорбат, ТЕ-МЕД+рибофлавин, феназинметосульфат+NADH, H₂O₂ в конечной концентрации 0,1–3,0 М, а также стрептокиназой. Методами лизиса фибриновых или протамин-агаровых пластин не было зафиксировано расщепление белков [12,22].

Следовательно, если α-субъединица и представляет собой зимоген, он активируется

путем, отличным от зимогенов других протеиназ.

Еще одной неожиданностью было установление у субъединиц NGF нуклеазной активности.

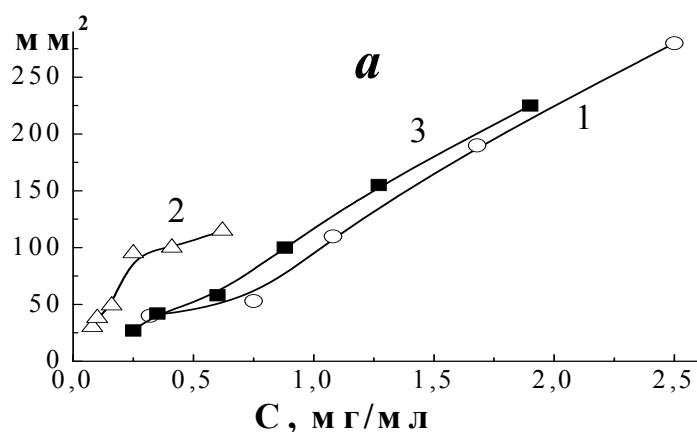
Методом лизиса ДНК селезенки или тРНК дрожжей в тонком агаровом слое с последующей визуализацией зон лизиса обработкой 2 н HClO₄ (как подробно описано ранее [13]) установлена эндонуклеазная активность при pH 7.4 по обоим субстратам у всех трех субъединиц (таблица 6 и [14, 17, 20 и др.], таблица 6).

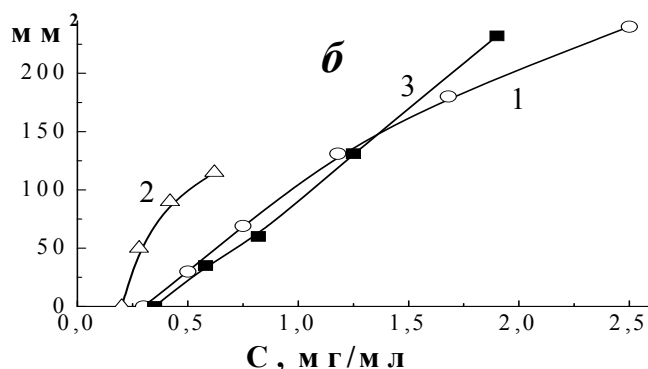
Концентрационная зависимость активности показала, что обе эндонуклеазные активности проявлялись у β -субъединицы при более низких ее концентрациях, чем у других субъединиц (рисунок 7). Однако эта зависимость у β -субъединицы в обоих случаях имела вид кривой с насыщением, тогда как активность α - и γ -субъединиц в широком диапазоне концентраций изменялась практически линейно (рисунок 7 и [17, 21]).

Таблица 6. – Расщепление ДНК и РНК в тонком слое агарового геля субъединицами NGF ($n=3$, инкубация при 37°C, 24 часа)

Исследуемый образец	Размер зон лизиса, мм ²	
	ДНК	РНК
α -субъединица, 2,5 мг/мл	224,9 ± 12,0	306,2 ± 9,3
β -субъединица, 0,63 мг/мл	199,9 ± 8,9	132,3 ± 10,5
γ -субъединица, 1,9 мг/мл	217,4 ± 16,2	214,0 ± 13,7

Примечание – 0,05 М трис-HCl буфер pH 7,6, содержащий 5 мМ MgSO₄, 5 мМ CaCl₂ и 1 мМ ЭДТА; концентрация агар-агара – 1,5%, концентрация ДНК – 20 мг/10 мл, концентрация тРНК – 30 мг/10 мл; фиксация – 1 н HClO₄.





Рисунік 7. - Завіскасць расщеплення ДНК (а) і РНК (б) ў тонкім слое агаровага геля α-(1), β-(2) і γ-(3) суб'ядзінкамі NGF

Примечание – n=4; 0,05 трис- HCl буфер pH, канцэнтрацыя агара – 1.5%, змяшчаючая ДНК селенкі ў пласціне – 20 мг ілі тРНК дрождзей – 30 мг; інкубацыя пры 37°C, 24 гадзіна [24].

Можна было думаць, што нуклеазная актывнасць α-суб'ядзінкі была вызвана магчымай прымессю γ-суб'ядзінкі. Аднак, як паказалі даследаванні дзейства традыцыйных эфектараў эндануклеаз, напрыклад, ДНК-азная актывнасць α-суб'ядзінкі ў 0,06М фосфатным буферы падаўлялася Ca²⁺, Co²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺ і аргінінам ў канцэнтрацыі 10⁻³ М на 50–65%, тады як гэтыя эфектары (за ісклученнем Cu²⁺) на такую актывнасць γ-суб'ядзінкі практычна не ўплывалі, а пад дзействам катіонаў Cu²⁺ яе актывнасць зростае [14,15,17,20].

Аналіз АТФ-азнай актывнасці γ- і α-суб'ядзінкі ў рэакцыйнай змешцы, уключаючай 0,05 М трис-НСІ буфер pH 7,4, 0,02 М КСІ, 0,003 М MgCl₂ + 0,003 М СаСІ₂ + 0,003 М NaHCO₃ і АТР– 0,006 М, паказала адсутнасць вызвалення неарганічнага ортофасфата ў рэакцыі з молибдатом амонія.

Заклученне. Ітак, изложенные результаты показывают, что в период 2000–2005 годы у олигомера NGF и его суб'ядзінкі нами было обнаружено ряд ранее неизвестных функциональных свойств. Это обстоятельство позволяет по-новому взглянуть на структурно-функциональную специфику данного регуляторного белка и на пути реализации его биологического действия.

Прежде всего, важным моментом является наличие у β-суб'ядзінкі плазминоген-активаторной способности, а у β- и γ-

суб'ядзінкі – прямой протеолитической активности в отношении основного белка – протамина. Ингибиторный анализ свидетельствует о «сериновой» природе этой активности. Причем, судя по всему, в молекуле β-суб'ядзінкі присутствуют функционально значимые металл-содержащие сайты. Это вызывает также логичный вопрос о способности данных суб'ядзінкі расщеплять и гистоны.

Все три суб'ядзінкі наделены супероксид-конвергирующей способностью, но только β- и γ-суб'ядзінкі способны расщеплять H₂O₂ с генерированием активных форм кислорода. Наличие O₂^{•-} - конвергирующей способности как и генерирование активных форм кислорода при расщеплении гидропероксида дают основание полагать наличие в молекулах суб'ядзінкі металлов с переменной валентностью – не Zn.

Плазминоген-активаторная способность β- и γ-суб'ядзінкі заметно изменялась в присутствии пуриновых нуклеотидов. Неожиданным явилось обнаружение у всех трех суб'ядзінкі нуклеазной активности – и по ДНК и по РНК. Причем эфакторный анализ и концентрационная зависимость дают полное основание считать, что суб'ядзінкі самостоятельны в этой активности, и нет каких-либо взаимопримесей.

Что касается α-суб'ядзінкі, обработка ее источниками активных форм кислорода не

привела к проявлению протеолитической активности. Вместе с тем ее молекула имеет активный центр, наделенный активностью нуклеазной. Этот момент является предметом дальнейшего отдельного изучения.

Ранее в литературе уже высказывались суждения относительно более сложного механизма действия NGF на клетку-мишень: не только путем взаимодействия со специфическим рецептором плазматической мембраны (хотя и характер этого взаимодействия остается недостаточно ясным), но и путем расщепления белка, связывающего инсулин-подобный фактор роста (IGFBP) [39], а также воздействия на цитоплазматический, включая p75^{NTR} и ядерный NGF-рецепторы [40–43]. Последний аспект в свете обнаружения у субъединиц NGF эндонуклеазной активности приобретает, на наш взгляд, особый смысл. Кроме того, изложенные факты создают предпосылки к проведению поисковых работ по созданию NGF-миметиков и, наконец, раскрытию структурных основ проявления обнаруженных функциональных особенностей.

Авторы выражают искреннюю благодарность светлой памяти В.С. Лукашевичу за предоставление образцов олигомера NGF и его субъединиц высокой степени чистоты.

Список литературы

1. Калюнов, В. Н. Фактор роста нервной ткани. Наука и техника / В. Н. Калюнов. – Минск, 1984. – 216 с.
2. Сукманский, О. И. Биологически активные вещества слюнных желез / О. И. Сукманский // Здоровья. – Киев, 1991. – 112 с.
3. Eibi, J.K. Structural, biological, and pharmacological strategies for the inhibition of nerve growth factor / J.K. Eibi, B.C. Strasser, G.M. Ross // *Neurochemistry international*. – 2012. – Vol. 61. – P. 1266–1275.
4. Исаев, Н. К. Роль фактора роста нервов в пластических перестройках холинергических нейронов базальных ядер переднего мозга / Н. К. Исаев, Е. В. Стельмашук, Е. Е. Генрихс // *Биохимия*. – 2017. – Т. 82, вып. 3. – С. 429–440.
5. Hiramatsu, M. Plasminogen activator activity in the subunits of mouse submandibular gland nerve-growth factor and epidermal growth factor / M. Hiramatsu, K. Hatakeyama, M. Kumegawa, N. Minami // *Arch. Oral Biol.* – 1982. – Vol. 27, No 6. – P. 517–518.
6. Ebendal, T. Function and evolution in the NGF family and its receptors / *J. Neurosci. – Res.* – 1992. – Vol. 32. – P. 461–470.
7. Bax, B. Structure of mouse 7S NGF: a complex of nerve growth factor with four binding proteins / B. Bax, T.L. Blundell, J. Murrey-Rust, N.Q. McDonald // *Structure*. – 1997. – Vol. 5, No 10. – P. 1275–1285.
8. Stach, R.W. The characterization of the α -subunits of 7S nerve growth factor / R.W. Stach, P.F. Pignatti, M.E. Baker, M.E. Shooter // *J. Neurochem.* – 1980. – Vol. 34, No 4. – P. 850–855.
9. Orenstein, N. S. Nerve growth factor: a protease that can activate plasminogen / N.S. Orenstein, H.F. Dvorak, M.H. Blanchard, M. Young // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1978. – Vol. 75, No 11. – P. 5497–5500.
10. Greene, L. A. Subunit interaction and enzymatic activity of mouse 7S nerve growth factor / L.A. Greene, E.M. Shooter, S. Varon // *Biochemistry*. – 1969. – Vol. 8, No 9. – P. 3735–3741. doi: 10.1021/bi00837a037.
11. Nikandrov, V.N. Functional properties of nerve growth factor molecule / V.N. Nikandrov [et al.] // 18 Intern. Congress of Biochem. Mol. Biol. Abstract Book. Birmingham, 2000. – P. 317 (No 1152).
12. Никандров, В.Н. Новые функциональные свойства молекулы фактора роста нервов и ее субъединиц / В. Н. Никандров [и др.] // *Достижения медицинской науки Беларуси*, вып. V. Рецензир. научно-практ. ежегодник. Минск, БелЦНМИ, 2000. – С. 104–105.
13. Никандров, В. Н. Регуляторные белки: молекулярные аспекты биологического действия и неожиданные функциональные свойства их молекул / В. Н. Никандров, Н. С. Пыжова // X съезд Белорусского общества физиологов. Тез. докл. Минск, Бизнес-офсет, 2001. – С. 113–114.
14. Никандров В. Н. Эндонуклеазная активность субъединиц фактора роста нервов / В.Н. Никандров, Н. С. Пыжова, В. С. Лукашевич // *Достижения медицинской науки Беларуси*, вып. VI. Рецензир. научно-практ. ежегодник, Минск, БелЦНМИ, 2001. – С. 87.
15. Никандров, В. Н. Энзиматические свойства фактора роста нервов и его субъеди-

- ниц / В. Н. Никандров, Н. С. Пыжова // Труды Всероссийской конфер. «Проблемы медицинск. энзимологии» «Соврем. технологии лаборат. диагностики нового столетия» «Международ. симпоз. «Пиридоксальфосфат-зависимые ферменты: структура, молекулярная патология и медицина»» М., 2002. – С. 163–164.
16. Никандров, В. Н. О полифункциональности белков регуляторного типа / В. Н. Никандров, Н. С. Пыжова // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: Международная конференция: Пятый съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков. Материалы докл. Минск, 2002. – Т-85.
17. Никандров, В. Н. Регуляторные белки: функциональные свойства молекул и механизмы их биологического действия / В. Н. Никандров, Н. С. Пыжова // Известия НАН Беларуси. Серия мед.-биол. наук. – 2003. – № 3. – С. 75–89.
18. Никандров, В. Н. Биотехнология клеток нервной ткани: проблема белковых трофических факторов / В. Н. Никандров [и др.] // Перспективы и проблемы развития биотехнологии в рамках единого экономического пространства стран содружества. Матер. Междунар. научно-практ. конф., Минск, 2005. – С. 153–154.
19. Никандров, В. Н. Перичеллюлярный протеолиз в жизнедеятельности нервных клеток: влияние плазминогена и стрептокиназы на культуры нервной ткани / В. Н. Никандров // Научные труды I съезда физиологов СНГ. Т. 2. – Медицина-Здоровье, М., 2005 – С. 48.
20. Никандров, В. Н. Проблемы биотехнологии клеток нервной ткани: исследования белковых факторов трофического характера / В.Н. Никандров [и др.] // Materials, methods and technology. Scientific articles 2007. Sci. Invest. LTD-branch Bourgas. Bulgaria, 2007. – P. 48–66.
21. Никандров, В. Н. Значение плазминогена как фактора трофического характера для культур клеток нервной ткани / В. Н. Никандров [и др.] // Известия НАН Беларуси. Серия мед. наук. – 2008. – № 1. – С. 85–97.
22. Никандров, В. Н. Протеиназная активность субъединиц белка-нейротрофина – фактора роста нервов / В. Н. Никандров, Н. С. Пыжова // IV Российский симпозиум «Белки и пептиды». Тезисы докл. Казань, 2009. – С. 254.
23. Способ определения протеолитической активности γ - или β -субъединицы фактора роста нервов: пат. № 11953 Респ. Беларусь / В. Н. Никандров, Н. С. Пыжова; заявитель ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси» – № а 20061234; заявл. 07.12.2006; опубл. 30.06.2009 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр. інтэлектуал.уласнасці. –
24. Никандров, В. Н. Методы исследования протеолиза. Глава 5 / В. Н. Никандров, Н. С. Пыжова // Современные проблемы биохимии. Методы исследований. Минск: Выш. шк., 2013. – С. 132–157.
25. Пыжова, Н. С. О возможности участия активных форм кислорода в расщеплении нуклеиновых кислот нуклеазами / Н. С. Пыжова, В. Н. Никандров // Новости медико-биол. наук. 2009. – № 4. – С. 57–62.
26. Никандров, В. Н. Обнаружение супероксидсмутазной активности у стрептокиназы / В. Н. Никандров, Н. С. Пыжова, В.И.Вотяков, Ю.Е. Клиндер // Доклады АН БССР. – 1986. –Т. 30, № 11. – С. 1033–1036.
27. Никандров, В. Н. Генерирование активных форм кислорода протеиназами и трипсиногеном в водно-солевых растворах / В.Н. Никандров, Ю.М. Судник, Н.С. Пыжова // Доклады АН Беларуси. – 1992. – Т. 36, № 11–12. – С. 1039–1044.
28. Буравский, В. А. Усовершенствованный метод выделения высокомолекулярной формы фактора роста нервов / В. А. Буравский [и др.] // Известия АН БССР. Сер. биол. наук. – 1984. – № 4. – С. 79–84.
29. Пыжова, Н. С. Участие активных форм кислорода в процессах протеолиза: ... дис. канд. биол. наук: 03.00.04 / Н. С. Пыжова. – Минск, 1990.
30. Nikandrov, V.N. The oxygen-dependent pathway of human plasminogen activation / V.N. Nikandrov, N.S. Pyzhova // 18th FEBS Meeting. Abstracts. – Ljubljana, 1987. – P. 84.
31. Никандров, В. Н. Кислородзависимый путь активации плазминогена и новые физико-химические механизмы протеолиза / В. Н. Никандров, Н. С. Пыжова // Изве-

- стия НАН Беларусі, сер. мед.-біол. наук. – 2001. – № 1. С. 54–60.
32. Lukashovich, V. S. Subunit organization of the complex form of nerve growth factor / V. S. Lukashovich, V. N. Nikandrov // *Protein Sci. The Proc. Soc. Thirteenth Sympos.* – 1999. – Vol. 8, suppl. 1, 301-S. – P. 121.
33. Никандров, В. Н. Влияние адениловых нуклеотидов на активаторную функцию стрептокиназы / В. Н. Никандров, Н. С. Пыжова, В. И. Вотяков // *Бюл. экспер. биол. мед.*. – 1987. – Т. 103, № 7. – С. 49–51.
34. Пыжова, Н. С. Влияние биогенных фосфатов на расщепление белков протеиназами и функцию активаторов плазминогена / Н. С. Пыжова, В. Н. Никандров // *Биорг. химия.* – 2008. – Т. 34, № 3. – С. 382–391.
35. Hasche, A. Binding of ATP to nerve growth factor: characterization and relevance for bioactivity / A. Hasche [et al.] // *Neurochem. Internat.* – 2010. – Vol. 56. – P. 276–284.
36. Ferenz, K. B. ATP–NGF-complex, but not NGF, is the neuroprotective ligand / K. B. Ferenz, K. Rose, S. König, J. Kriegelstein // *Neurochem. Internat.* – 2011. – Vol. 59. – P. 989–995.
37. Пыжова, Н. С. Активация трипсиногена быка в присутствии активных форм кислорода / Н. С. Пыжова, В. Н. Никандров // *Доклады АН БССР.* – 1991. – Т. 35, № 12. – С. 1130–1133.
38. Пыжова, Н. С. Активация химотрипсиногена и пепсиногена под действием активных форм кислорода / Н. С. Пыжова, В. Н. Никандров // *Доклады НАН Беларусі.* – 2001. – Т. 45, № 3. – С. 67–70.
39. Rajah, R. 7S nerve growth factor is an insulin-like growth factor-binding protein protease / R. Rajah [et al.] // *Endocrinology.* – 1996. – Vol. 137. – P. 2676–2682.
40. Rakowicz-Szulczyńska, E. M. Nerve growth factor receptors in chromatin of melanoma cells, proliferating melanocytes, and colorectal carcinoma cells in vitro / E. M. Rakowicz-Szulczyńska, M. Herlyn, H. Koprowski // *Cancer Res.* – 1988. – Vol. 48, No24 Pt 1. – P. 7200–7206.
41. Andres, R. Y. Nerve growth factor receptors: identification of distinct classes in plasma membranes and nuclei of embryonic dorsal root neurons / R. Y. Andres, I. Jeng, R.A. Bradshaw // *Proc. Nati. Acad. Sci. USA.* – 1977. – Vol. 74, No. 7. – P. 2785–2789.
42. Yankner, B. A. The biology and mechanism of action of nerve growth factor / B.A. Yankner, E. M. Shooter // *Ann. Rev. Biochem.* – 1982. – Vol. 51. – P. 845–868.
43. Underwood, C. K. The p75 neurotrophin receptor / C. K. Underwood, E. J. Coulson // *Int. J. Biochem. & Cell Biol.* – 2008. – Vol. 40. – P. 1664–1668.

References

1. Kalyunov V.N. Faktor rosta nervnoy tkani [Nerve growth factor]. *Nauka i tekhnika*. Minsk, 1984, 216 p. (In Russian)
2. Sukmanskiy O.I. Biologicheskii aktivnyye veshchestva slyunnykh zhelez [Biologically active substances of the salivary glands]. *Zdorov'ya*. Kiyev, 1991, 112 p. (In Russian)
3. Eibi J.K., Strasser B.C., Ross G.M. Structural, biological, and pharmacological strategies for the inhibition of nerve growth factor. *Neurochemistry international*. 2012. Vol. 61, pp. 1266–1275.
4. Isayev N.K., Stel'mashuk E.V., Genrikhs YE.YE. Rol' faktora rosta nervov v plasticheskikh perestroykakh kholinergicheskikh neyronov bazal'nykh yader perednego mozga [The role of nerve growth factor in plastic rearrangements of cholinergic neurons in the basal forebrain nuclei] *Biokhimiya* [Biochemistry]. 2017. T. 82, vyp. 3, pp. 429–440. (In Russian)
5. Hiramatsu M., Hatakeyama K., Kumegawa M., Minami N. Plasminogen activator activity in the subunits of mouse submandibular gland nerve-growth factor and epidermal growth factor. *Arch. Oral Biol.* 1982. Vol. 27, no 6, pp. 517–518.
6. Ebendal T. Function and evolution in the NGF family and its receptors. *Res.* 1992. Vol. 32. pp. 461–470.
7. Bax B., Blundell T.L., Murrey-Rust J., McDonald N.Q. Structure of mouse 7S NGF: a complex of nerve growth factor with four binding proteins. *Structure*. 1997. Vol. 5, no 10, pp. 1275–1285.
8. Stach R.W., Pignatti P.F., Baker M.E., Shooter M.E. The characterization of the α -subunits of 7S nerve growth factor. *J. Neurochem.* 1980. Vol. 34, no 4, pp. 850–855.
9. Orenstein N.S., Dvorak H.F., Blanchard M.H., Young M. Nerve growth factor: a pro-

- tease that can activate plasminogen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1978. Vol. 75, no 11, pp. 5497–5500.
10. Greene L.A., Shooter E.M., Varon S. Subunit interaction and enzymatic activity of mouse 7S nerve growth factor Biochemistry. 1969. Vol. 8, no 9, pp. 3735–3741. doi: 10.1021/bi00837a037.
 11. Nikandrov V.N. et al. Functional properties of nerve growth factor molecule. 18 Intern. Congress of Biochem. Mol. Biol. Abstract Book. Birmingham, 2000, no 1152, pp. 317.
 12. Nikandrov V.N., Pyzhova N.S., Lukashevich V.S., Lukashevich I.B., Agurkov A.V., Davydovskii A.G., Shpak G.A. Novye funktsional'nye svoistva molekuly faktora rosta nervov i ee sub"edinit [New functional properties of the nerve growth factor molecule and its subunits]. *Dostizheniia meditsinskoï nauki Belarusi* [Accomplishments of Medical Science in Belarus]. Ed. Gurmanchuk I. E. et.al. Minsk, 2000, iss. V, pp. 104-105. (In Russian)
 13. Nikandrov V.N., Pyzhova N.S. Regulatortnye belki: molekuliarnye aspekty biologicheskogo deistviia i neozhidannye funktsional'nye svoistva ikh molekul [Regulatory proteins: molecular aspects of biological action and unexpected functional properties of their molecules], *X s"ezd Belorusskogo obshchestva fiziologov* [X Congress of the Belarusian Society of Physiologists]. Ed. Kaliunov V.N. et.al. Minsk, 2001, pp. 113-114. (In Russian)
 14. Nikandrov V.N., Pyzhova N.S., Lukashevich V.S. Endonukleaznaia aktivnost' sub"edinit faktora rosta nervov [Endonuclease activity of nerve growth factor subunits]. *Dostizheniia meditsinskoï nauki Belarusi* [Accomplishments of Medical Science in Belarus]. Ed. Gurmanchuk I.E. et. al. Minsk, 2001, vol. VI, 87p. (In Russian)
 15. Nikandrov V.N., Pyzhova, N.S. Enzimatischeskie svoistva faktora rosta nervov i ego sub"edinit [Enzymatic properties of nerve growth factor and its subunits]. *Problemy meditsinskoï enzimologii: trudy Vseros. konf. «Sovremennye tekhnologii laboratornoi diagnostiki novogo stoletiiia» i Mezhdunarod. simpoziuma «Piridoksal'zavisimye fermenty: struktura, molekuliarnaia patologiia i meditsina»*. Moscow, 2002, pp. 163–164. (In Russian)
 16. Pyzhova N.S., Nikandrov, V.N. O poli-funkttsional'nosti belkov reguliatsionnogo tipa [On the polyfunctionality of regulatory proteins]. *Molekuliarnye, membrannye i kletochnye osnovy funktsionirovaniia biosistem: Mezhdunar. nauch. konf* [Molecular, membrane and cellular basis for the functioning of biosystems: Intern. scientific conf.]. Ed. Volotovskii I.D. et. al. Minsk, 2002. 85 p. (In Russian)
 17. Nikandrov V.N., Pyzhova, N.S., Regulatortnye belki: funktsional'nye svoistva molekuly i mekhanizmy ikh biologicheskogo deistviia [Regulatory proteins: functional properties of molecules and mechanisms of their biological action]. *Vestsi Natsyianal'nai akademii navuk Belarusi. Seryia medykal'biialagichnykh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical-biological series, 2003, no. 3, pp. 75-89 (In Russian)
 18. Nikandrov V.N., Gronskaiia R.I., Zhuk O.N., Lukashevich I.B., Polukoshko E.F., Petrusenko G.P., Pyzhova N.S. Biotekhnologiia kletok nervnoi tkani: problema belkovykh troficheskikh faktorov [Biotechnology of nervous tissue cells: the problem of protein trophic factors]. *Perspektivy i problemy razvitiia biotekhnologii v ramkakh edynogo ekonomicheskogo prostranstva stran sodruzhestva : mat. Mezhdunarodnoi nauch.-prakt. konf., 25-28 maia 2005 g., Minsk-Naroch'* Ed. A.N. Evtushenkova. Minsk, National Institute For Higher Education Publ, 2005, pp. 160-161
 19. Nikandrov V.N. Peritselliuliarnyi proteoliz v zhiznedeiatel'nosti nervnykh kletok: vliianie plazminogena i streptokinazy na kul'tury nervnoi tkani. [Pericellular proteolysis in the vital activity of nerve cells: the effect of plasminogen and streptokinase on nerve tissue cultures]. *Nauchnye trudy I s"ezda fiziologov SNG, Sochi, Dagomys, 19-23 sentiabria 2005 g.* Moscow, Medicine Publi., 2005, V. 1. 48 p.
 20. Nikandrov V.N., Zhuk O.N., Gronskaiia R.I., Polukoshko E.F., Pyzhova N.S., Petrusenko G.P., Romanovskaiia A.A. Problemy biotekhnologii kletok nervnoi tkani: issledovaniia belkovykh faktorov troficheskogo kharaktera [Problems of Biotechnology of Nervous Tissue Cells: Studies of Protein Factors of a

- Trophic Character]. *Materials, Methods and Technologies. Bulgaria*, 2007, pp. 48-66.
21. Nikandrov V.N., Zhuk O.N., Pyzhova N.S., Gronskaja, R.I., Polukoshko E.F., Romanovskaja A.A. Znachenie plazminogena kak faktora troficheskogo kharaktera dlja kul'tur kletok nervnoi tkani [The Significance of Plasminogen as a Trophic Factor for Nervous Tissue Cell Cultures]. *Vestsi Natsyianal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya medytsynskikh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, medical series], 2008, no. 1, pp. 85-97. (In Russian)
 22. Nikandrov V.N., Pyzhova N.S. Proteinaznaia aktivnost' sub"edinit belka-neirotrofina – faktora rosta nervov [Proteinase activity of subunits of neurotrophin protein - nerve growth factor]. *Belki i peptidy: IV Rossiiskii simpozium. Kazan'*, 2009, 254 p. (In Russian)
 23. Nikandrov V.N., Pyzhova N.S. *Sposob opredeleniia proteoliticheskoi aktivnosti γ - ili β - sub"edinit sy faktora rosta nervov* [Method for determining the proteolytic activity of the γ - or β -subunit of nerve growth factor]. Pat. BY no. 11953 S1, a 20061234, 2009, 3 p. (In Russian)
 24. Nikandrov V.N., Pyzhova N.S. Metodyi issledovaniya proteoliza. Glava 5. [Methods for the study of proteolysis. Chapter 5]. *Sovremennye problemy biokhimii. Metodyi issledovaniya* [Modern problems of biochemistry. Research methods]. Minsk: Visheyskaya shkola, 2013, pp. 132-157. (In Russian)
 25. Pyzhova N.S., Nikandrov, V. N O vozmozhnosti uchastiia aktivnykh form kisloroda v rasscheplenii nukleinykh kislot nukleazami [On the possibility of participation of reactive oxygen species in the cleavage of nucleic acids by nucleases]. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk* [News of biomedical sciences], 2009, no. 4, pp. 57-62 (In Russian)
 26. 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)
 27. Nikandrov V.N., Sudnik Iu.M., Pyzhova, N.S. Generirovanie aktivnykh form kisloroda proteinazami i tripsinogenom v vodno-solevykh rastvorakh [Generation of reactive oxygen species by proteinases and trypsinogen in aqueous salt solutions]. *Doklady Akademii nauk Belarusi*, 1992, vol. 36, no. 11-12, pp. 1039-1044 (In Russian)
 28. Buravskii V.A. et.al. Uovershenstvovannyi metod vydeleniia vysokomolekuliarnoi formy faktora rosta nervov [An improved method for isolating the high molecular weight form of nerve growth factor]. *Vestsi Akademii navuk BSSR. Seriya biialagichnykh navuk*, 1984, no 4, pp. 79-88 (In Russian)
 29. 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)
 30. Nikandrov V.N. The oxygen-dependent pathway of human plasminogen activation / V.N. Nikandrov, N.S. Pyzhova // 18th FEBS Meeting. Abstracts. – Ljubljana, 1987. – P. 84.
 31. Nikandrov V.N., Pyzhova N.S. Kislorodzavisimyy put aktivatsii plazminogena i novyye fiziko-himicheskie mekhanizmy 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)
 32. Lukashevich V.S., Nikandrov V.N. Subunit organization of the complex form of nerve growth factor. *Protein Sci. The Proc. Soc. Thirteenth Sympos.* 1999. Vol. 8, suppl. 1, 301-S, pp. 121.
 33. Nikandrov V.N., Pyzhova N.S., Votyakov V.I. Vliyanie adenilovykh 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)
 34. Pyzhova N.S., Nikandrov V.N. Vliyanie biogennykh fosfatov na rasscheplenie belkov proteinazami i funktsiiu aktivatorov plazminogena [The effect of biogenic phosphates on protein cleavage by proteinases and the function of plasminogen activators]. *Bioorganicheskaya khimiya* [Russian Journal

- of Bioorganic Chemistry], 2008, vol. 34, no 3, pp. 382-391 (In Russian)
35. Hasche A. Binding of ATP to nerve growth factor: characterization and relevance for bioactivity / A. Hasche [et al.] // *Neurochem. Internat.* – 2010. – Vol. 56. – P. 276–284.
36. Ferenz K.B., Ferenz K.B., Rose K., König S., Krieglstein J. ATP–NGF-complex, but not NGF, is the neuroprotective ligand. *Neurochem. Internat.* 2011. Vol. 59, pp. 989–995.
37. Pyzhova N.S., Nikandrov V.N. Aktivatsiya tripsinogena byika v prisutstvii aktivnykh form kisloroda [Activation of bovine trypsinogen in the presence of reactive oxygen species]. *Doklady Akademii Nauk BSSR* [Doklady of the National Academy of Sciences of BSSR]. 1991, vol. 35, no. 12, pp. 1130-1133. (In Russian)
38. Nikandrov V.N., Pyzhova N.S. Aktivatsiia khimotripsinogena i pepsinogena pod deistviem aktivnykh form kislorodarov [Activation of chymotrypsinogen and pepsinogen by reactive oxygen species]. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi* [Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus], 2001, vol. 45, no. 3, pp. 67-70 (In Russian)
39. Rajah R. et al. 7S nerve growth factor is an insulin-like growth factor-binding protein protease. *Endocrinology*. 1996. Vol. 137, pp. 2676–2682.
40. Rakowicz-Szulczyńska E.M., Herlyn M., Koprowski H. Nerve growth factor receptors in chromatin of melanoma cells, proliferating melanocytes, and colorectal carcinoma cells in vitro. *Cancer Res.* 1988. Vol. 48, no24, pt 1, pp.7200–7206.
41. Andres R.Y., Jeng I., Bradshaw R.A. Nerve growth factor receptors: identification of distinct classes in plasma membranes and nuclei of embryonic dorsal root neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977. Vol. 74, no. 7. pp. 2785–2789.
42. Yankner B.A., Shooter E.M. The biology and mechanism of action of nerve growth factor. *Ann. Rev. Biochem.* 1982. Vol. 51, pp. 845–868.
43. Underwood C.K., Coulson E.J. The p75 neurotrophin receptor. *Int. J. Biochem. & Cell Biol.* 2008. Vol. 40, pp. 1664–1668.

Received 3 October 2022