



НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
ЕЖЕМЕСЯЧНЫЙ ЖУРНАЛ

ИЗДАЕТСЯ С СЕНТЯБРЯ 1924 г.

ОРГАН МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

№11/2006

Главный редактор
Н. Ф. СОРОКА

Редакционная коллегия:

БЕЛОЕНКО Е. Д.
БРОНОВЕЦ И. Н.
ВАСИЛЕВСКИЙ И. В.
ГЕРАСИМОВИЧ Г. И.
ГРИГОРЬЕВА Г. Ф.
ЖАРКО В. И.
ЗАЛУЦКИЙ И. В.
КЕВРА М. К.
КАРПОВ И. А.
КУБАРКО А. И.
ЛОБКО П. И.
МАНАК Н. А.
ПОСТОЯЛКО Л. А.
РИМЖА М. И.
СМЫЧЕК В. Б.
ТЕРНОВ В. И.
ТИТОВ Л. П.
УЛАЩИК В. С. (зам. гл. редактора)
УСС А. Л.
ФЕДОТОВА Л. А. (отв. секретарь)
ХОЛОДОВА Е. А.
ЧЕРСТВЫЙ Е. Д.
ШОТТ А. В.

Редакционный совет:

БЕЛЬСКАЯ Е. В. (Минск)
БЕСПАЛЬЧУК П. И. (Минск)
ВАСИЛЬКОВ Н. А. (Гомель)
ГАРЕЛИК П. В. (Гродно)
ЖАВОРОНОК С. В. (Гомель)
КОЛБАНОВ В. В. (Минск)
КОСИНЕЦ А. Н. (Минск)
ЛИПНИЦКИЙ И. Э. (Минск)

МАЛАШКО В. А. (Могилев)
МИЛОШЕВСКИЙ В. С. (Брест)
ПИНЕВИЧ Д. Л. (Минск)
ХОДЖАЕВ В. А. (Витебск)
ХУЛУП Г. Я. (Минск)
ЦЫБИН А. К. (Минск)
ЧАСНОЙТЬ Р. А. (Гродно)





В. Н. НИКАНДРОВ, Н. С. ПЫЖОВА

РЕАЛИЗАЦИЯ И РЕГУЛЯЦИЯ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ НА МОЛЕКУЛЯРНОМ И КЛЕТОЧНОМ УРОВНЕ

НИИ эпидемиологии и микробиологии Минздрава Республики Беларусь, Институт физиологии НАН Беларуси

Среди универсальных механизмов регуляции метаболизма и функций организма важное место занимают реакции протеолиза. Тотальный протеолиз (расщепление белка до малых пептидов и аминокислот) обычен для пищеварения, разрушения удаляемых из биосистемы белков, а ограниченный (расщепление в белке немногих пептидных связей, часто даже одной) типичен для регуляции целого ряда биохимических процессов.

Фактически во всех основных патологических процессах реакции протеолиза играют ключевую роль. Например, болезнь Альцгеймера — нейродегенеративное заболевание с тяжелыми нарушениями функции мозга — сопряжена с накоплением в ткани мозга агрегатов так называемого β -амилоидного пептида. Он образуется в ходе ограниченного протеолиза из трансмембранного белка-предшественника (β -APP), синтезируемого клетками нервной ткани и обладающего нейротрофическими и нейропротективными свойствами. β -APP участвует в развитии возбудимости нервных клеток, процессов обучения и памяти, роста нервных окончаний и синаптогенеза, синаптической пластичности. В здоровом мозге образующийся β -амилоидный пептид подвергается протеолитическому расщеплению, продукты которого выводятся из ткани [5]. Но при патологическом течении протеолитических процессов образования амилоида (активность α - и β -секретаз) и его деградации (активность металлопротеиназы неприлизина, эндотелинконвертирующего энзима, пламина) амилоидный пептид накапливается и развивается тяжелое заболевание. Регуляция процессов образования и распада амилоида до сих пор окончательно не выяснена. В связи с этим нет четкой концепции патогенеза заболевания и адекватных подходов к его лечению.

Международная ассоциация по изучению протеолиза (IPS) регулярно проводит симпозиумы и конференции, посвященные данной проблеме. Некоторые вопросы протеолиза проанализированы на симпозиуме «Протеолиз, его регуляция и роль в физиологии и патологии клеток», прошедшем в Пуатье (Франция) в рамках IV Всемирного конгресса по клеточной и молекулярной биологии [37].

Однако, несмотря на громадную значимость протеолиза, структурно-функциональная организация его системы, регуляция на молекулярном, клеточном и системном уровнях, механизм самой химической трансформации субстрата (разрыва пептидной связи) далеки от ясности [28]. Это стимулирует дальнейшие исследования механизмов регуляции протеолиза, прежде всего на молекулярном и клеточном уровне.

В инфекционной патологии человека и животных протеолитические процессы проявляются в следующих формах:

1. Протеиназы как облигатные факторы патогенности, поражающие клетки и ткани животных и человека:

протеиназа гемолитического стрептококка группы А обладает собственной кардиотоксичностью и нефротоксичностью [2].

2. Протеиназы как факторы, модифицирующие межклеточный матрикс и обеспечивающие проникновение инфекции: коллагеназы клостридий.

3. Комплекс протеиназ (их три) *Pseudomonas aeruginosa* разрушает IgA и IgG плазмы крови, ряд факторов гемостаза, вызывает инактивацию системы комплемента [1].

4. Протеиназы участвуют в репродукции вирусов, например собственная аспартильная протеиназа ВИЧ.

5. Микроорганизмы синтезируют субстанции, активирующие реакции протеолиза (стрептокиназа гемолитических стрептококков, стафилокиназа и стафилокоагулаза патогенных стафилококков) или ингибирующие протеолитические реакции (например, из культуральной жидкости *Corynebacterium diphtheriae* получены белковые фракции, способные подавлять и потенцировать протеолитическую активность ряда протеиназ) [23].

6. Протеолитические процессы как звенья патогенеза могут вести к образованию продуктов гидролиза белков макроорганизма в виде так называемых «средних» молекул или других соединений пептидного характера, обладающих выраженным действием на функции ряда тканей и органов. Вместе с тем остаются совершенно неясными причины чрезвычайно высокой устойчивости к протеолитическим системам тканей ряда белковых токсинов, например, дифтерийного, белков регуляторного плана, прионов.

7. Протеолитические процессы организма — важный механизм его реактивности и защиты от инвазии патогенной субстанции, например фагоцитоз.

8. Протеиназы и эфторы протеолиза как факторы заместительной или патогенетической терапии (активаторы пламиногена, ингибиторы протеолиза и т. д., сами протеиназы). Например, препарат «Вобэнзим» включает четыре сериновые и цистеиновые протеиназы.

9. Проявление протеолитической активности белками, в том числе токсинами микроорганизмов, не являющимися протеиназами как таковыми [13].

На протяжении ряда лет в лаборатории биохимии НИИ эпидемиологии и микробиологии ведутся исследования ряда необычных проявлений протеолитических реакций и их регуляции. Эти исследования начались с разработки отечественного препарата стрептокиназы (одного из сильнейших активаторов пламиногена и, следовательно, системы фибринолиза) — «целиазы», создание и освоение производства которого было начато в 1975—1984 гг. [3].

Результаты работ позволили выявить несколько необычных феноменов.

Представления о кислородзависимом протеолизе базируются на экспериментах, демонстрирующих снижение скорости инициированного стрептокиназой лизиса фибринового геля при удалении из реакционной смеси растворенного кислорода [21]. Механизм, объясняющий активацию пламиногена стрептокиназой, обстоятельно рассмотрен в ряде публикаций [31]. Здесь будет акцентировано внимание на четырех основных положениях:

— активация пламиногена стрептокиназой блокируется перехватчиками супероксидного радикала, следовательно, она зависит от этого радикала;

— плазминоген человека, кролика (но не быка) способен генерировать активные формы кислорода, в том числе и такой радикал;

— стрептокиназа обладает супероксидконвергирующей способностью в модельных системах образования супероксидного радикала;

— плазминоген человека можно превратить в активную протеиназу при обработке источниками активных форм кислорода в отсутствие стрептокиназы.

Итак, активация плазминогена стрептокиназой включает генерирование плазминогеном O_2 и конверсию этого радикала стрептокиназой. Пока неясно, что является продуктом конверсии.

Была также продемонстрирована активация зимогенов и других протеиназ: трипсиногена, α -химотрипсиногена А, пепсиногена [11, 25] — при обработке их источниками активных форм кислорода (химическими системами генерирования супероксидного радикала H_2O_2 или ионами Fe^{2+}). Практически во всех случаях H_2O_2 -индуцируемую активацию перечисленных зимогенов эффективно ингибировал перехватчик супероксидного радикала нитротетразолиевый синий (NBT) [16], лишь действие на активацию трипсиногена было менее резким.

Исследование влияния различных перехватчиков активных форм кислорода (синглетного, гидроксильного, супероксидного) на фибринолитическую активность сериновых, цистеиновой, аспартильной и металлопротеиназ показало [35, 36], что именно NBT полностью подавлял активность плазмина, папаина, пепсина, металлопротеиназы *Staphylococcus aureus* и умеренно угнетал также активность урокиназы, субтилизина, металлопротеиназ *Bacillus megaterium* и змеиного яда. Он был не эффективен лишь в опытах с трипсином и α -химотрипсином. Это, конечно, не абсолютный аргумент в пользу участия активных форм кислорода в каталитической функции протеиназ. Однако весьма примечательна сходная чувствительность к данному перехватчику протеиназ различной структуры, субстратной специфичности, типа активного центра, постулируемого механизма катализа. Действие перехватчика зависит от способности его довольно объемной молекулы проникать в каталитические области молекулы протеиназы, по-видимому, это не всегда возможно.

Обнаруженная способность зимогенов и протеиназ генерировать в водно-солевом растворе активные формы кислорода и наличие у протеиназ небольшой супероксидконвергирующей способности [19, 27] косвенно подтверждают гипотезу кислородзависимого протеолиза, сущность которой состоит в том, что активация зимогенов и протеиназ и реализация каталитической функции последних обусловлены прямым участием собственных генерируемых этими белками активных форм кислорода [7, 12, 16].

Продемонстрирована возможность реализации подобных реакций в клетке. На субклеточных фракциях (ядерная, митохондриальная, тяжелых мембран) головного мозга и печени мышей была установлена [26] их плазминогенактиваторная способность, которая умеренно (на 20—27%) угнеталась перехватчиками O_2 -радикала (NBT) или даже Cu , Zn -супероксиддисмутазой. Добавки НАДФ усиливали активацию плазминогена некоторыми субклеточными фракциями на 31—45%, но на их фоне ингибиторный эффект NBT возрастал до 43%. Во всех случаях протеолиз был резистентен к цианиду, а значит, не зависел от функции дыхательной цепи.

Фибринолитическая активность лимфобластов человека Molt-4, Molt-4/8 и Jurkatt-tat в присутствии цитрата полностью ингибировалась NBT [16].

Эти результаты дают основания считать, что реализация кислородзависимых процессов по предложенному выше механизму имеет место и *in situ*.

Выше уже упоминалась устойчивость к тканевым системам протеолиза ряда белков, в том числе дифтерийного токсина. Авторы уже сообщали о способности очищенных образцов этого токсина подавлять активность α -химотрипсина, папаина и существенно усилить восстановление NBT супероксидным радикалом в модельной системе [13]. Вместе с тем на образцах растворимого плазминогена зафиксирована медленная трансформация его в активную протеиназу. При сопоставлении со способностью токсина участвовать в супероксидопосредованных процессах это наводит на мысль о принципиальной возможности активации плазминогена токсином по кислородзависимому пути.

Оказалось, что как раз при участии кислородзависимого протеолиза происходит аутоактивация вируса гриппа [29]. Оболочка этого вируса содержит железосерный белок, способный генерировать активные формы кислорода, вызывающие превращение плазминогена в плазмин, и запускает механизм протеолитической активации, необходимой для продуктивного инфекционного процесса в клетке. Эта цепочка блокируется перехватчиками активных форм кислорода. Предлагаемая концепция позволяет наметить пути создания нетрадиционных ингибиторов протеолиза, которые не являются псевдосубстратами пептидной природы [33].

Исходя из гипотезы кислородзависимых реакций протеолиза, с 1999 г. в лаборатории регуляторных белков и пептидов Института физиологии НАН Беларуси ведутся многоплановые исследования роли компонентов (плазминоген, стрептокиназа) и реакций перичеллюлярного протеолиза в жизнедеятельности клеток нервной ткани и функциональных свойств регуляторных белков.

Так, на полученных в этой лаборатории образцах фактора роста нервов (NGF) показано [17], что очищенная и гомогенная (по данным электрофореза и изоэлектрофокусирования) не только молекула NGF и ее γ -, но и β -субъединицы обладали плазминогенактиваторной способностью, подавляемой NBT на 47%, 40% и 100% соответственно. Такая способность β -(но не γ -)субъединицы угнеталась добавками α -субъединицы NGF. При pH 7,6 NGF его α -, β - и γ -субъединицы ингибировали восстановление NBT в модельной системе генерирования супероксидного радикала на 40%, 60%, 28% и 41—52% соответственно.

Это позволяет несколько иначе взглянуть на проблему регуляторных белков, особенно механизма их действия. Уже вряд ли достаточным будет тезис о том, что, взаимодействуя с рецептором клеточной (субклеточной) мембраны, они индуцируют конформационную перестройку рецептора и участка мембраны. Весьма привлекательной в этом аспекте выглядит способность их модифицировать процессы опосредуемыми активными формами кислорода и вмешательство в протеолитические реакции. Сформулирована гипотеза о реализации биологического действия белков регуляторного типа за счет многопланового арсенала собственных функциональных возможностей его молекулы. Выдвинута идея [13] о существовании нескольких типов активируемых рецепторов, активация которых возможна разнообразными путями: протеолитическим, действием активных форм кислоро-

да или продуктов их трансформации, эндонуклеазным и т.д., выливающаяся в самостоятельную проблему. Совокупность полученных оригинальных данных нужна для создания миметиков NGF и других подобных белковых факторов. Это чрезвычайно важный вопрос не только в теоретическом аспекте, учитывая сложности регенерации и трансплантации нервной ткани.

Установлено также [8], что в концентрации 10^{-10} — 10^{-7} М плазминоген предупреждает гибель клеток глиомы С6 при депривации белков сыворотки крови в питательной среде, оказывает защитное действие при деструкции клеток краниально-шейного и шейно-грудных симпатических ганглиев гидропероксидом в конечной концентрации 0,01 М, хлоридом аммония или глутаматом. Однако добавки плазминогена усиливают повреждающее действие гидропероксида и глутамата на культуры чувствительных спинномозговых ганглиев.

На органотипической культуре неокортекса показано, что стрептокиназа способна нивелировать деструкцию клеток, вызванную АТФ [6]. При длительном воздействии стрептокиназы (2000 МЕ/мл) на органические культуры спинномозговых (чувствительных) симпатических ганглиев наблюдалась тенденция к прогрессирующему увеличению зоны роста для всех типов ганглиев.

Впервые на культуре клеток феохромоцитомы РС12 показано, что краткая (20 мин) экспозиция с плазминомом или стрептокиназой в концентрации 10^{-10} — 10^{-7} М вызывает изменения внутриклеточного АТФ-активируемого и Ca^{2+} -активируемого протеолиза, в ряде случаев нивелируемые добавкой NGF [8].

Впервые установлены изменения электрической активности нейронов при суперфузии понтобульбоспинального препарата крысы растворами плазминогена, стрептокиназы, пируваткиназы и комплексами плазминоген (стрептокиназа)-пируваткиназа. Оказалось, что воздействие плазминогена свыше 10 мин ведет к необратимой блокаде активности дыхательного центра [24].

Предложены оригинальные решения стимуляции пролиферации культур клеток, которые могут быть пригодны для подготовки трансплантатов [9].

В последние десятилетия интенсивно исследуются механизмы АТФ-стимулируемого протеолиза. Описаны протеиназы, которые активируются в присутствии АТФ, причем замена его нуклеотидом, содержащим меньшее число макроэргических связей, снижает такой эффект [30]. Механизм этого явления пока остается до конца не выясненным, поскольку имеются АТФ-активируемые реакции, не опосредуемые кверцетином.

Описано противоположное действие: АТФ при концентрации 0,1 М подавлял инициированную стрептокиназой активацию плазминогена на 50% [20, 31]. Эффект не связан с числом макроэргических связей в нуклеотиде — активация зимогена стрептокиназой была вообще нечувствительна к АДФ, ГТФ, ЦТФ и подавлялась лишь циклическим АМФ.

Второй пример — подавление АТФ в концентрации 0,01 М фибринолитической активности протеиназы несовершенного гриба *Arthrotrichy longia* [18].

Дальнейшие исследования плазминогенактиваторной способности β - и γ -субъединиц NGF показали, что эффективная концентрация нуклеотидов может находиться в пределах 0,0001 М. Этот процесс чувствительнее к нуклеотидам, чем стрептокиназозависимый, а β -субъединица чувствительнее γ -субъединицы. Так, АТФ в концентрации 0,001 М подавлял плазминогенактиваторную способность

на 30% у γ -субъединицы и на 60% у β -NGF. Увеличение концентрации нуклеотида до 0,01 М вело к угнетению активности на 50 и 100% соответственно. АДФ практически не влиял на функцию γ -субъединицы, но при концентрации 0,01 М подавлял таковую β -NGF на 25%. АМФ (0,0001—0,01 М) увеличивал активность обеих субъединиц NGF на 20—25%. Отличительной особенностью от ранее приведенных белков является также подавление активаторной функции β - (но не γ -) субъединицы добавками ГТФ и ГДФ при концентрациях 0,0001 М, 0,001 М и 0,01 М на 20%, 55% и 100% [18].

Фибриногенолитическая активность разрушенных клеток *Corynebacterium diphtheriae* шт. PW-8, выращенных на бульоне Лингуда с сывороткой крови, подавлялась на 45%, 20%, 35% и 30% под действием соответственно АТФ, АДФ, АМФ и ГТФ в концентрации 0,01 М [18].

Причины подобного эффекта, который может быть рассмотрен как противоположность АТФ-стимулируемому протеолизу, пока неясны. Вполне вероятно, что действие нуклеотидов обусловлено наличием специфических пуриновсвязывающих центров в молекулах плазминогена, стрептокиназы и упомянутых протеиназ, что тоже совершенно не изучено. Косвенным указанием на такую возможность, по-видимому, стоит рассматривать факты защитного действия некоторых пуриновых нуклеотидов (АДФ, АМФ, 3,5-АМФ, ГДФ) в концентрации 0,001 М при УФЛ-инактивации плазминогена, прочно сорбированного на фибриновой сети. При этом не установлено зависимости между числом макроэргических связей в нуклеотиде и его эффективности [16].

Эти факты поднимают новые вопросы о регуляторном действии системы нуклеотидов на протеолитические процессы. Как показали проведенные исследования [14], действие нуклеотидов зависит от используемого белка субстрата (рис. 1). Так, АТФ при концентрации 10^{-3} М стимулировал расщепление казеина сериновыми протеиназами (например, трипсином), а в диапазоне концентраций 10^{-7} — 10^{-5} М — расщепление ряда белков пепсином, казеина и альбумина — металлопротеиназой. В настоящее время в литературных источниках отсутствует информация о возможности аутофосфорилирования указанных энзимов. По-видимому, АТФ-активируемый протеолиз — явление, более широко распространенное и реализующееся по нескольким механизмам.

При концентрации 10^{-2} М АТФ подавлял расщепление ряда белков трипсином, химотрипсином, папаином, металлопротеиназой, а в более низкой концентрации (10^{-3} М) угнетал альбуминолитическую активность протеиназ, расщепление белков (кроме фибриногена) металлопротеиназой бацилл.

Влияние на протеолиз, хотя и более слабое, наблюдалось при добавках АДФ: лишь при концентрации 10^{-2} М возрастала казеино(желатино)литическая активность трипсина и субтилизина. Но при концентрации АДФ 10^{-4} М расщепление гемоглобина субтилизином подавлялось.

Эти новые факты диктуют необходимость изучения взаимодействия нуклеотидов и их структурных компонентов с макромолекулами протеиназ.

Еще при исследовании активирующего действия ионов Fe на зимогены протеиназ было установлено, что в ряде случаев оно проявляется лишь в присутствии неорганического ортофосфата. Дальнейшие работы показали, что фибринолитическая активность отмытых клеток лимфобластных линий человека Molt-4 и Molt-4/8 также проявляется лишь в присутствии ортофосфата [16].

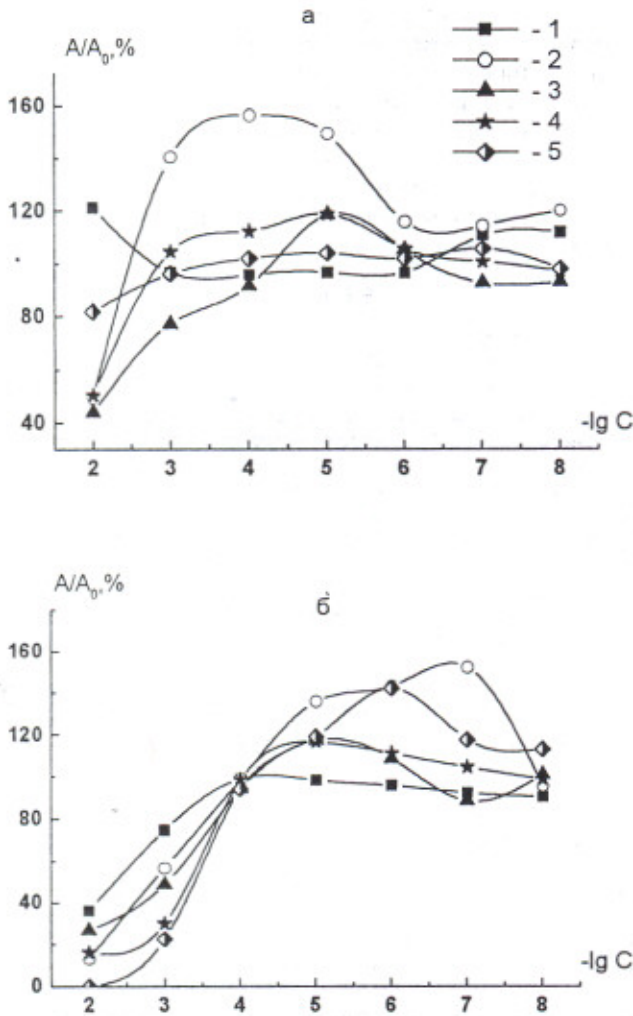


Рис. 1. Влияние АТФ на расщепление фибриногена (1), казеина (2), гемоглобина (3), желатина (4) и сывороточного альбумина (5) трипсином (а) или металлопротеиназой *Bacillus megaterium* (б) в тонком слое агарового геля (концентрация белков — 10 мг/мл, бактоагара «Difco» — 10 мг/мл, растворитель — 0,05 М трис-НСl буфер рН 7,4). Изменения представлены в % к контролю, принятому за 100%

Можно предположить, что подобный эффект обусловлен ресинтезом АТФ и отражает случай АТФ-зависимого протеолиза. Однако этот эффект ортофосфата не изменялся существенно в присутствии ингибиторов АТФ-азы [16] и подавляющих АТФ-зависимый протеолиз. По-видимому, увеличение протеолитической активности ортофосфатом не связано с ресинтезом АТФ. Если же к клеткам добавить еще и цитрат (как субстрат дыхания), указанные соединения вызывают увеличение протеолитической активности на 19—37%. Все это создает предпосылки для идеи о самостоятельном «фосфатном эффекте» в регуляции протеолиза [15, 16]. Данный вопрос требует углубленной проработки и ставит ряд конкретных задач.

Методом лизиса белков-субстратов (желатин, казеин, гемоглобин, фибриноген, сывороточный альбумин) в тонком слое агара показано [15], что ионы ортофосфата (0,001—0,06 М), например, резко повышали гемоглоблинолитическую активность трипсина, α -химотрипсина, субтилизина (в 2—12 раз), желатинолитическую активность трипсина и α -химотрипсина (на 50—350%), альбуминолитическую активность субтилизина, усиливали расщеп-

ление гемоглобина, казеина и сывороточного альбумина папаином на 70—80%. Протеолиз пепсином фосфат-ионами усиливался в 3—4 раза при их концентрации 10^{-3} — $5 \cdot 10^{-3}$ М. Ионы ортофосфата также вызвали рост плазминогенактиваторной способности стрептокиназы, тканевого активатора в 1,5—3,3 раза.

Межбелковые взаимодействия в регуляции протеолитических процессов традиционно рассматривались в трех аспектах: взаимодействие протеиназы с белком-субстратом, взаимодействие протеиназы с белком-ингибитором, взаимодействие протеиназы или зимогена с рецептором клеточной поверхности.

Установлено, что в водно-солевых растворах довольно быстро образуются эквимольные устойчивые комплексы стрептокиназы или плазминогена с ферментами углеводно-энергетического метаболизма: лактатдегидрогеназой, малатдегидрогеназой, каталазой или пируваткиназой [32]. Это принципиально новый факт, ранее не описанный в литературе. До этого лишь сообщалось об образовании комплексов стрептокиназы и М-субъединицы лактатдегидрогеназы, а из крови больных, подвергнутых внутривенным инъекциям стрептокиназы, были выделены устойчивые комплексы «стрептокиназа—лактатдегидрогеназа» [34]. Значение этого явления пока абсолютно неясно.

Эквимольные комплексы «стрептокиназа(или плазминоген)-энзим» не разрушались при добавках 6 М мочевины (кроме комплексов «плазминоген—дегидрогеназа»), нейтральных солей, ϵ -аминокапроновой кислоты, ряда углеводов, субстратов и кофакторов указанных дегидрогеназ и пируваткиназы, резком сдвиге рН раствора. Они не образовывались в присутствии 0,01 М додецилсульфата натрия или 0,001 М галактозамина [4]. В образовании комплексов маловероятно участие Lys-связывающих сайтов молекулы плазминогена, хотя принято считать, что именно за счет них зимоген взаимодействует с рядом белков и клеточных поверхностей. Учитывая эффект галактозамина, можно допустить, что взаимодействие белков идет по углевод-углеводным контактам.

Смысл образования подобных комплексов для биосистем пока неизвестен. По-видимому, необходимы исследования биологического действия комплексов. Плазминогенактиваторная функция стрептокиназы и способность плазминогена активироваться в составе эквимольных комплексов с ферментами принципиально не менялись. Исключение составлял комплекс «стрептокиназа—пируваткиназа», проявляющий плазминогенактиваторную способность примерно на 30% выше в сравнении с нативной стрептокиназой [4]. В то же время в литературе имеются указания, что функции рецептора плазминогена на поверхности нейрона выполняет один из гликолитических ферментов — α -эндолаза, а целый ряд патогенных микроорганизмов имеет рецептор плазмина, в роли которого выступает другой гликолитический фермент — глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа.

Обнаружены и иные необычные и ранее не описанные феномены:

— при исследовании белка, ингибитора протеолиза (овоингибитора) из куриных яиц оказалось, что в присутствии стрептокиназы или этанола проявляется фибринолитическая активность. Образующаяся протеиназа не способна расщеплять специфический хромогенный субстрат плазмина — S-2251, то есть активированная стрептокиназой протеиназа не является плазмином [13];

— парадоксальный эффект фенилметилсульфонилфторида — группоспецифического ингибитора сериновых и

цистеиновых протеиназ. Так, фибринолитическая активность супернатантов культуральной жидкости отдельных штаммов коринебактерий дифтерии резко возросла при добавке этого соединения в концентрации 0,001 М [22];

— неожиданный эффект NBT: расщепление белков внеклеточными протеиназами культуральной жидкости выделенного от больного штамма *Pseudomonas aeruginosa* подавлялось при добавках этого реагента, особенно четко при использовании в качестве субстрата фибриногена (рис. 2). Однако в диапазоне концентраций NBT 10^{-4} — 10^{-3} М умеренно стимулировалось расщепление желатина и казеина. Пока нет никакого объяснения этого явления. Оно нуждается в детальном и всестороннем изучении.

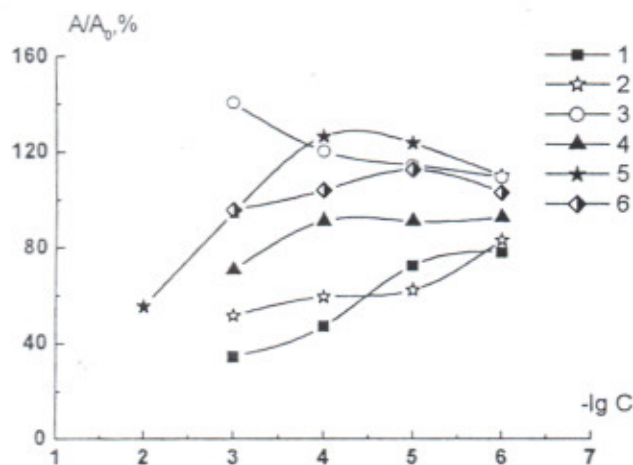


Рис. 2. Вызванные нитротетразолиевым синим изменения (% к контролю) расщепления фибриногена человека (1), фибриногена быка (2), казеина (3), гемоглобина (4), желатина (5) или сывороточного альбумина (6) супернатантом культуральной жидкости выделенного от больного штамма 23/2-госп. 1 *Pseudomonas aeruginosa*

Изложенные материалы ярко иллюстрируют новые стороны проблемы протеолиза, впервые раскрытые в ходе работ упомянутых научных коллективов. Причем каждый ракурс выливается в самостоятельную проблему со своими теоретическими и прикладными аспектами.

Кратко прикладные следствия для ряда направлений экспериментальной, клинической, профилактической медицины и медицинской биотехнологии сводятся к следующему:

— создание (изыскание) нетрадиционных ингибиторов протеолиза, в том числе антивирусных препаратов, и оценка влияния известных фармацевтических препаратов на протеолитические системы организма. Авторами работы уже была предпринята такая попытка в отношении активируемого стрептокиназой фибринолиза [7];

— проработка подходов к созданию миметиков белков регуляторного плана (типа NGF, к ним следует отнести также токсины и прионы), учитывая чрезвычайную дороговизну этих белков и все большую очевидность необходимости их использования при лечении ряда заболеваний и в биотехнологических целях;

— разработка дифференциально-диагностических тестов на основе обнаруженных феноменов для штаммов патогенных микроорганизмов и патологического материала при лабораторной диагностике заболеваний;

— оптимизация энзиматического гидролиза белковой сырья в гетерогенной системе как процесса мацераци-

онно-экстракционно-гидролитического характера [10] при получении основ микробиологических питательных сред, усовершенствование стандартизации сред, содержащих энзиматические гидролизаты белков и экстракты тканей, учитывая обнаруженную в таких средах остаточную энзиматическую активность [22]; оценка влияния последней на жизнеспособность и продуктивность микробной клетки;

— оптимизация применения лекарственных препаратов протеиназного характера.

ЛИТЕРАТУРА

- Баскакова Н. В. // Синегнойная инфекция / Под ред. А. Ф. Мороз.— М., 1988.— С. 30—54.
- Белецкая Л. В., Верболович П. А., Полосухина Т. Я. Экспериментальная стрептококковая инфекция.— Алма-Ата, 1978.
- Машковский М. Д. Лекарственные средства: Пособие для врачей.— М., 2005.
- Мурашко О. Н. Особенности образования и свойства комплексов плазминогена, стрептокиназы с оксидоредуктазами и пируваткиназой: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Гомель, 2004.
- Наливаева Н. Н. Роль гипоксии и ишемии мозга в метаболизме амилويدного пептида и патогенезе болезни Альцгеймера: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук.— СПб., 2006.
- Никандров В. Н. // Науч. тр. I съезда физиологов СНГ.— Т. 2.— М., 2005.— С. 48.
- Никандров В. Н. // Профилактика и лечение инфекционных и паразитарных заболеваний: Материалы юбилейной конф. БелНИИ эпидемиологии и микробиологии.— Минск, 1995.— С. 274—286.
- Никандров В. Н., Володкович О. И., Гронская Р. И. и др. // Достижения медицинской науки Беларуси.— Вып. VII.— Минск, 2002.— С. 49—50.
- Никандров В. Н., Гронская Р. И., Жук О. Н. и др. // Перспективы и проблемы развития биотехнологии в рамках единого экономического пространства стран содружества: Материалы Междунар. науч.-практ. конф.— Минск, 2005.— С. 153—154.
- Никандров В. Н., Колос В. А., Кулченко О. К. и др. // Достижения медицинской науки Беларуси.— Вып. VI.— Минск, 2001.— С. 86.
- Никандров В. Н., Пыжова Н. С. // Докл. НАН Беларуси.— 2001.— Т. 45, N 3.— С. 67—70.
- Никандров В. Н., Пыжова Н. С. // Изв. НАН Беларуси. Серия мед.-биол. наук.— 2001.— N 1.— С. 54—60.
- Никандров В. Н., Пыжова Н. С. // Изв. НАН Беларуси. Серия мед.-биол. наук.— 2003.— N 3.— С. 75—89.
- Никандров В. Н., Пыжова Н. С. // XI съезд Белорусского общества физиологов: Тез. докл.— Минск, 2006.— С. 59.
- Никандров В. Н., Пыжова Н. С. // Седьмой съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков: Сб. статей.— Ч. I.— Минск, 2006.— С. 236—238.
- Никандров В. Н., Пыжова Н. С. // Современные проблемы инфекционной патологии человека (вирусология, микробиология, иммунология, эпидемиология, клиника): Материалы II науч.-практ. конф.— Минск, 2001.— С. 318—338.
- Никандров В. Н., Пыжова Н. С. // Тр. Всерос. конф. «Проблемы медицинской энзимологии».— М., 2002.— С. 163—164.
- Никандров В. Н., Пыжова Н. С. // Учен. записки Витебской гос. академии ветеринарной медицины.— 2005.— Т. 41, вып. 2, часть 2.— С. 105—106.
- Никандров В. Н., Пыжова Н. С. // IV симпозиум «Химия протеолитических ферментов»: Тез. докл. и стендовые сообщения.— М., 1997.— С. 30.
- Никандров В. Н., Пыжова Н. С., Вотяков В. И. // Бюл. эксп. биологии и медицины.— 1987.— Т. 104, N 7.— С. 49—51.
- Никандров В. Н., Пыжова Н. С., Судник Ю. М. // Докл. АН БССР.— 1986.— Т. 30, N 6.— С. 558—560.
- 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.

Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней 9

23. Никандров В. Н., Пыжова Н. С., Шатило Н. Л., Шапчиц Н. С. // Проблемы инфекционной патологии XXI века: Материалы юбилейной конф., посвященной 80-летию НИИЗМ.— Минск, 2004.— С. 177—191.

24. Никандров В. Н., Пятин В. Ф., Алексеева А. С. и др. // Изв. НАН Беларуси. Серия мед.-биол. наук.— 2003.— N 2.— С. 40—43.

25. Пыжова Н. С., Никандров В. Н. // Докл. АН БССР.— 1991.— Т. 35, N 12.— С. 1130—1133.

26. Пыжова Н. С., Никандров В. Н. // Докл. НАН Беларуси.— 1998.— Т. 42, N 4.— С. 94—99.

27. Пыжова Н. С., Никандров В. Н., Судник Ю. М. // Докл. АН Беларуси.— 1992.— Т. 36, N 11—12.— С. 1039—1044.

28. V симпозиум «Химия протеолитических ферментов»: Тез. докл. и стендовые сообщения.— М., 2002.

29. Судник Ю. М., Никандров В. Н., Пыжова Н. С. и др. // Второй съезд Белорусского об-ва фотобиологов и биофизиков «Молекулярно-клеточные основы функционирования биосистем»: Тез. докл.— Минск, 1996.— С. 179.

30. Ishiura Sh., Tsukahara T., Sugita H. // Intern. J. Biochem.— 1990.— Vol. 22.— P. 1195—1201.

31. Nikandrov V. N. // Intern. J. Biochem.— 1992.— Vol. 24, N 1.— P. 47—53.

32. Nikandrov V. N., Murashko O. N., Vorobyova G. V. et al. // Lett. Pept. Sci.— 1997.— Vol. 4, N 4—6.— P. 497—502.

33. Nikandrov V. N., Pyzhova N. S., Boreko E. I. // XVth EFMC Intern. Symp. on Medicinal Chem. Abstracts.— Edinburgh, 1998.— P. 84.

34. Podlasek S. J., Dufour D. R., Mc Pherson R. A. // Clin. Chem.— 1989.— Vol. 35.— P. 1763—1766.

35. Pyzhova N. S., Nikandrov V. N. // Thromb. Res.— 1996.— Vol. 82, N 4.— P. 303—312.

36. Pyzhova N. S., Nikandrov V. N. // Bull. Philippine Soc. Biochem. Mol. Biol.: 25th Anniv. FAOBMB symp.— 1997.— Vol. 16.— PR 5.

37. 4th World Congress of Cellular and Molecular Biology: Abstr. Book.— Poitiers, 2005.

PROTEOLYTIC PROCESSES REALIZATION AND REGULATION ON MOLECULAR AND CELLULAR LEVEL

V. N. Nikandrov, N. S. Pyzhova

The results of own investigations of long standing of proteolysis reactions are summarized. The phenomenology of the unusual proteolysis manifestations (oxygen-dependent proteolysis, ATP-inhibited reactions, «phosphate effect», protein-protein interactions, etc.) which have been discovered by authors are stated briefly. The prospects of further theoretical and applied studies of proteolysis are discussed.