

УДК 57 + 577.1] : 577.156.1

В. Н. НИКАНДРОВ<sup>1,2</sup>, Н. С. ПЫЖОВА<sup>1,2</sup>

## НЕТРИВИАЛЬНЫЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ПРОТЕОЛИЗА НА МОЛЕКУЛЯРНОМ И КЛЕТОЧНОМ УРОВНЯХ, ИХ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЕ И ПРИКЛАДНОЕ ЗНАЧЕНИЕ

<sup>1</sup> – Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь;

<sup>2</sup> – НИИ эпидемиологии и микробиологии Министерства Здравоохранения  
Республики Беларусь, Минск, Беларусь

Обобщены результаты многолетних исследований авторов. Изложена сущность впервые описанных феноменов: кислородзависимого протеолиза, АТР-ингибируемых реакций протеолиза, фосфатного эффекта в протеолизе, образования устойчивых эквимольных комплексов стрептокиназы (плазминогена) с тканевыми оксидоредуктазами и пируваткиназой, протекторного действия нуклеозидфосфатов на УФ-инактивацию плазминогена, парадоксального эффекта фенилметилсульфонилфторида на протеолитические реакции. Показано более широкое распространение АТР-активируемых реакций протеолиза, чем принято считать. Охарактеризована фундаментальная и прикладная значимость этих открытых феноменов.

*Ключевые слова:* протеолиз, участие активных форм кислорода, ингибирование протеолитических реакций АТР, фосфатный эффект, межбелковые комплексы, парадоксальный эффект фенилметилсульфонилфторида.

Протеолиз относится к числу универсальных механизмов регуляции метаболизма и многих функций организма. Тотальный протеолиз (расщепление белка до малых пептидов и аминокислот) в физиологическом состоянии организма обычен для пищеварения, разрушения элиминированных из биосистемы белков, ограниченный (расщепление весьма немногих пептидных связей, нередко – даже одной), типичен для регуляции целого ряда биохимических процессов. Практически во всех основных патологических процессах реакции протеолиза играют ключевую роль. Существует достаточно большое количество заболеваний, обусловленных дефектом генов, кодирующих образование в организме компонентов протеолиза. В предыдущих статьях [1–3] мы уже кратко останавливались на этих аспектах проблемы.

Однако несмотря на чрезвычайно большую ее значимость, структурно-функциональная организация системы протеолиза, регуляция ее на молекулярном, клеточном и системном уровнях далеки от решения. Это логически стимулирует дальнейшие исследования механизмов регуляции протеолиза, прежде всего на молекулярном и клеточном уровнях.

Основными механизмами такой регуляции следует считать:

- а) уровень биосинтеза энзимов (часто в виде зимогенов и презимогенов);
- б) постсинтетический процессинг, включающий гликозилирование, ограниченный протеолиз (в ряде случаев активация зимогенов осуществляется именно так) и др.;
- в) взаимодействие с эндогенными ингибиторами;
- г) метаболитная регуляция (например, в случае АТР-зависимого протеолиза, Ca<sup>2+</sup>-активируемых протеиназ и т. д.);
- д) конформационные изменения молекулы протеиназы, зависящие, например, от локального окружения, а также рецепторных взаимодействий;
- е) изменения взаимодействия со специфическими рецепторами клеточных и субклеточных мембран;

ж) изменения физико-химических свойств молекулы белка субстрата вследствие замены аминокислотных остатков, гидратации и других причин.

В патологии человека и животных протеолитические процессы проявляются не только в виде реакций иммунитета, некротической и апоптотической гибели клеток, вспомогательного механизма в распространении патогенной субстанции (например, коллагеназы клостридий). Накоплен обширный материал о роли в репродукции ряда вирусов собственных протеиназ вириона и протеиназ объекта инвазии [например, 4, 5]. Вне сомнения, протеолитические реакции важны для «созревания» ряда микробных токсинов, например, дифтерийного. Вместе с тем остаются совершенно неясными причины чрезвычайно высокой устойчивости к протеолитическим системам тканей целого ряда белковых токсинов, белков регуляторного плана, прионов.

Тридцать лет назад в лаборатории биохимии Белорусского НИИ эпидемиологии и микробиологии (теперь, к сожалению, уже несуществующей) были начаты и велись исследования ряда необычных проявлений природы протеолитических реакций и их регуляции. С 1999 эти работы осуществлялись также совместно с лабораторией регуляторных белков и пептидов Института физиологии НАН Беларуси. Полученные результаты позволили описать несколько новых феноменов, суть которых кратко обобщена в настоящей статье.

**Кислородзависимый протеолиз.** До сих пор в интерпретации механизма активации плазминогена (Pg) специфическим белком активатором из гемолитических стрептококков – стрептокиназой (SK) доминирующее положение занимает гипотеза так называемого «активаторного комплекса» [6, 7], являющегося эквимольным устойчивым комплексом Pg и SK. Этот комплекс наделен эстеразной активностью и, по мнению сторонников гипотезы, способен активировать Pg.

Образование эквимольного устойчивого комплекса SK–Pg доказано многократно физико-химическими методами и никаких сомнений не вызывает. Его формирование, в частности, зарегистрировано методом дифференциальной спектроскопии [8]. Тем не менее до сих пор нет прямых доказательств, что при молярном избытке Pg именно некий специфический каталитический центр гидролазного (эндопептидазного) типа Pg-части комплекса SK–Pg осуществляет трансформацию свободных молекул зимогена. Более того, исходя из общепринятой доктрины катализа сериновыми протеиназами, в этом случае должна образовываться временная форма (SK–Pg)•Pg, в которой вторая молекула «субстратного» Pg присоединена к активаторному комплексу по раскрывающемуся гидролитическому центру Pg-части комплекса SK–Pg. Однако до настоящего времени никому не удалось получить подобный комплекс. Ситуацию принципиально не изменяют и работы последнего десятилетия об особенностях взаимодействия зимогена и SK [9, 10].

Нельзя игнорировать изложенные в литературе факты, в том числе полученные в нашей лаборатории, о способности SK активировать Pg в условиях, в которых присутствие устойчивого эквимольного комплекса SK–Pg физико-химическими методами не зафиксировано (табл.1).

**Табл. 1.** Влияние физико-химических факторов на образование эквимольных комплексов «стрептокиназа–плазминоген» (SK–Pg) и активаторную функцию стрептокиназы

Условия эксперимента	Комплекс «SK–Pg»	Активаторная функция стрептокиназы, %	Литературная ссылка
0,06 М фосфатный буфер pH 7,4, 25 °С	образуется	100	[8,11]
Добавка мочевины, 6М	отсутствует	101	[8,11,12]
pH 1,8	отсутствует	99	[8,11]
Йодирование стрептокиназы, молярное соотношение I <sub>2</sub> :SK= 6:1	отсутствует	82	[13]
Модификация 38 COOH-групп и 8 NH <sub>2</sub> -групп стрептокиназы в системе водорастворимый «карбодиимид-нуклеофил»	отсутствует	55	[13]

Таким образом, сформировавшиеся представления о кислородзависимом протеолизе явились, прежде всего, альтернативой гипотезе «активаторного комплекса».

Термин «кислородзависимый протеолиз» предложен нами, исходя из экспериментов, демонстрирующих резкое снижение скорости SK-индуцированного лизиса фибринового геля при удалении из компонентов реакционной смеси растворенного кислорода [14]. Механизм, объяс-

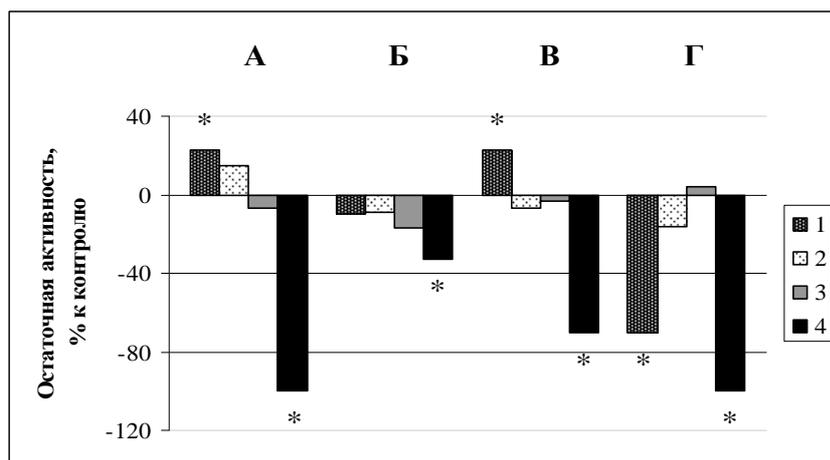
няющий активаторную функцию SK, рассмотрен нами в ряде публикаций [15–17]. Он зиждется на четырех основных положениях:

- 1) активация Pg стрептокиназой блокируется перехватчиками супероксидного радикала, необратимо связывающими этот радикал;
- 2) Pg человека, кролика способен в водно-солевом растворе генерировать активные формы кислорода, в том числе и супероксидный радикал;
- 3) SK обладает супероксидконвергирующей способностью в модельных системах генерирования супероксидного радикала;
- 4) при обработке Pg человека источниками активных форм кислорода проявляется четкая фибринолитическая активность.

Следовательно, предлагаемый механизм включает генерирование  $O_2^-$  Pg-ом и конверсию радикала SK-ой. Характер продукта, образующегося при такой конверсии  $O_2^-$ , еще не выяснен. Здесь необходимы дальнейшие исследования.

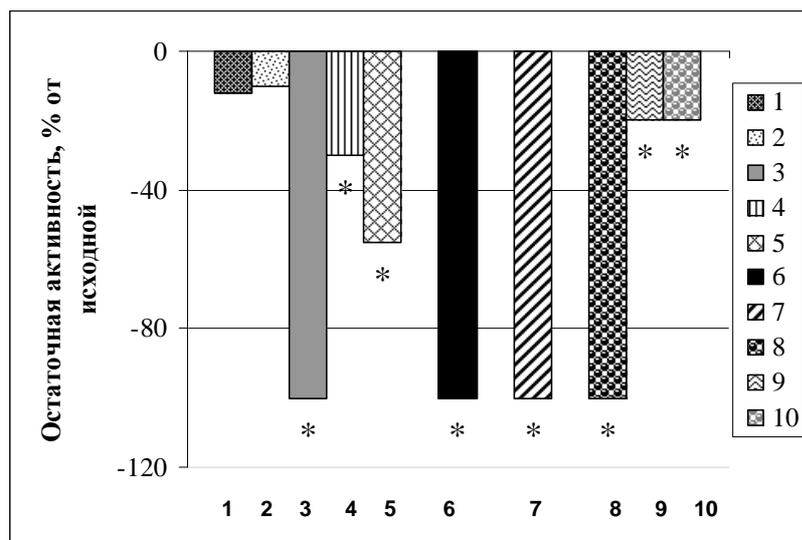
Однако активация Pg стрептокиназой – не единственный пример такого необычного участия активных форм кислорода в протеолизе. Нами продемонстрирована возможность активации при обработке источниками активных форм кислорода также трипсиногена,  $\alpha$ -химотрипсиногена А, пепсиногена [18, 19]. В экспериментах с этими зимогенами достигнуты разные результаты, что объясняется, по-видимому, спецификой структурной организации их молекул. Наиболее демонстративные результаты получены при воздействии  $H_2O_2$  или ионов Fe на очищенные образцы трипсиногена [18, 20]. Следует отметить, что сопоставление результатов, полученных в экспериментах на очищенных образцах перечисленных зимогенов, с характером воздействия источников активных форм кислорода и ионов железа на активность соответствующих протеиназ (плазмина, трипсина,  $\alpha$ -химотрипсина и пепсина) позволяет с большой долей уверенности полагать, что при подобном воздействии имеет место именно активация зимогенов.

Исследование влияния перехватчиков активных форм кислорода на  $H_2O_2$ -индуцируемую активацию перечисленных зимогенов показало, что практически во всех случаях наиболее эффективно ингибировал процесс перехватчик супероксидного радикала нитротетразолиевый синий (NBT) (рис. 1). Лишь в случае пепсиногена заметное действие оказал и азид натрия. И только на активацию трипсиногена ингибирующее действие NBT было менее резким. Это позволяет думать, что в случае трипсиногена и пепсиногена активация может быть опосредована другими активными формами кислорода. Для трипсиногена таковой может быть, например, так называемый «криптогидроксильный» радикал.



**Рис. 1.** Влияние перехватчиков активных форм кислорода (1 – азид натрия, 2 – гистидин, 3 – маннит, 4 – нитротетразолиевый синий) на индуцированную  $H_2O_2$  активацию плазминогена (А), трипсиногена (Б), химотрипсиногена А (В), пепсиногена (Г) [18, 20]

Было также установлено, что фибринолитическая активность ряда сериновых, цистеиновой, аспартильной и металлопротеиназ оказалась мало чувствительной к перехватчикам синглетного кислорода и гидроксильного радикала, однако NBT полностью подавлял активность плазмина, папаина, пепсина и стафилококковой металлопротеиназы (рис. 2). Этот перехватчик умеренно угнетал также активность урокиназы, субтилизина. Он был практически неэффективен лишь в опытах с трипсином и  $\alpha$ -химотрипсином.



**Рис. 2.** Ингибирование фибринолитической активности трипсина (1), химотрипсина (2), плазмина (3), урокиназы (4), субтилизина (5), папаина (6), пепсина (7), металлопротеиназ *Staph. aureus* (8), *Bac. subtilis* (9), *Crotalus atrox* (10) перехватчиком  $O_2^-$ -нитротетразолиевым синим в конечной концентрации 0,01M [3, 16, 20]

Изложенные факты, конечно, не являются абсолютным аргументом в пользу участия активных форм кислорода в реализации каталитической функции протеиназ. Тем не менее нельзя не согласиться с примечательностью сходной чувствительности к NBT протеиназ различной структуры, субстратной специфичности, типа активного центра, постулируемого механизма катализа. Точно так же индифферентность протеиназ к перехватчику еще не является абсолютным отрицательным доводом. Действие перехватчика зависит от способности его довольно объемной молекулы проникнуть в каталитически значимые области молекулы протеиназы. По-видимому, это не всегда возможно. Лишь в последующий период нами была обнаружена чувствительность трипсина и  $\alpha$ -химотрипсина к ингибиторному действию NBT в присутствии мочевины [1]. Этот момент свидетельствует о том, что супероксидгенерирующие сайты протеиназ могут локализоваться в достаточно узких щелях глобулы энзима, в которые перехватчик не способен проникнуть из-за достаточно больших размеров молекулы.

Выявленная способность зимогенов и протеиназ генерировать в водно-солевом растворе активные формы кислорода, как и наличие у протеиназ небольшой супероксидконвергирующей способности [20–23], дополнительно подкрепляют гипотезу кислородзависимого протеолиза. Сущность этой гипотезы состоит в том, что активация зимогенов протеиназ и реализация каталитической функции последних обусловлены прямым участием собственных генерируемых этими белками активных форм кислорода [16, 17, 20].

О способности активных форм кислорода активировать протеолиз, модифицируя белок-субстрат или вызывая инактивацию белков-ингибиторов протеолиза известно, достаточно давно [24–26]. Более того, работами ряда авторов показано, что в искусственной системе генерирования активных форм кислорода может достигаться фрагментация молекулы белка [27].

Нами же впервые поставлен вопрос в совершенно новом ракурсе: о реализации протеолитического катализа через собственные, генерируемые молекулами протеиназ или зимогенов активные формы кислорода, прежде всего – супероксидные радикалы. Конечная стадия расщепления белка в таком случае остается гидролитической, ибо процесс завершается присоединением молекулы воды. Однако суть внутреннего механизма в предлагаемой концепции совершенно иная.

Логичен вопрос о возможности реализации подобных реакций в клетке. В экспериментах с субклеточными фракциями гомогенатов головного мозга и печени мышей была установлена P<sub>g</sub>-активаторная способность этих фракций, которая в отдельных случаях умеренно угнеталась перехватчиками  $O_2^-$ -радикала – NBT или даже Cu, Zn-супероксиддисмутазой (SOD), а также изменялась в присутствии одного из метаболических ядов – p-хлормеркурибензоата (PCMB) и акцептора электронов – 2,6-дихлорфенолиндофенола (DCIP) [28, 29]. Фибринолитическая активность плазмина, урокиназы, тканевого активатора P<sub>g</sub> из сердца свиньи была индифферентна к PCMB (а плазмина – также и к DCIP). Это позволяет считать, что оба соединения воздействовали именно на активацию P<sub>g</sub> через редокс-процессы. NADH умеренно усиливал эту активацию отдельными

субклеточными фракциями, причем в его присутствии существенно возрастал ингибиторный эффект NBT. Особенно демонстративным было резкое угнетение РСМВ P<sub>g</sub>-активаторной функции тяжелых мембран печени и усиление ее – DCIP. В ходе этих экспериментов было впервые показано, что DCIP и метаболические яды изменяют P<sub>g</sub>-активаторную функцию субклеточных фракций мозга и печени, а NADH в ряде случаев увеличивает эту способность. Присутствие нуклеотида модифицировало действие DCIP, РСМВ и перехватчиков супероксидного радикала.

Поскольку проницаемость мембран для NADH ограничена, в качестве субстрата окисления был использован цитрат. Полученные данные свидетельствуют о росте в присутствии цитрата P<sub>g</sub>-активаторной способности всех фракций гомогената головного мозга и печени на 20–170% (табл. 2). В присутствии цитрата P<sub>g</sub>-активаторная функция всех трех фракций гомогената печени на 65–100% подавлялась добавками NBT, а ядерной – также на 90–100% триптофаном и формиатом натрия. P<sub>g</sub>-активаторная функция фракций гомогената головного мозга даже в присутствии цитрата была нечувствительна к формиату и триптофану, но на 44–68% ингибировалась NBT.

**Табл. 2.** Особенности влияния цитрата натрия на активацию связанного плазминогена человека ( $\text{мм}^2$  зон фибринолиза) фракциями гомогенатов головного мозга и печени мышей ( $n = 5$ ) [28]

Эффектор	Фракции гомогената					
	головного мозга			печени		
	ядерная	тяжелых мембран	митохондриальная	ядерная	тяжелых мембран	митохондриальная
Контроль (0,15 М NaCl)	118 ± 4	156 ± 9	129 ± 5	83 ± 3	72 ± 4	85 ± 4
+ цитрат, 0,01 М	<b>147 ± 8*</b>	<b>214 ± 10*</b>	<b>152 ± 7*</b>	<b>124 ± 7*</b>	<b>118 ± 4*</b>	<b>135 ± 10*</b>
+ цитрат, 0,001 М	<b>144 ± 4*</b>	138 ± 8	121 ± 7	<b>110 ± 5*</b>	<b>102 ± 3*</b>	<b>185 ± 8*</b>
+ цитрат, 0,0001 М	135 ± 20	127 ± 12	<b>156 ± 11*</b>	<b>100 ± 6*</b>	<b>121 ± 4*</b>	<b>232 ± 12*</b>

Примечание: \* – здесь и далее статистически достоверные изменения,  $P \leq 0,05$

Фибринолитическая активность трех различных линий лимфоцитов человека в присутствии цитрата натрия полностью ингибировалась добавками NBT (табл. 3). Судя по чувствительности к глутамату и ионам цинка, лимфоциты различных линий продуцировали протеиназы с различными свойствами, однако эффект NBT от этого не изменялся. Эти пока немногочисленные данные дают основания считать, что реализация кислородзависимых процессов по предложенному выше механизму имеет место и *in situ*.

**Табл. 3.** Влияние NBT на фибринолитическую активность (по лизису пластины человеческого фибрина; содержащийся плазминоген предварительно инактивирован) различных линий лимфоцитов человека ( $n = 5$ ; отмытые от питательной среды клетки суспендировали в 0,03М фосфатном буфере рН 7,4, содержащем  $10^{-3}$ М цитрата натрия) [3]

Линии лимфоцитов	Площадь зон лизиса ( $\text{мм}^2$ ) пластины приготовленной на					
	0,15 М растворе NaCl		$10^{-3}$ М растворе глутамата натрия		$10^{-3}$ М растворе ZnSO <sub>4</sub>	
	контроль	+ NBT	контроль	+NBT	контроль	+ NBT
Molt 4	102 ± 5	0	6 ± 1	0	54 ± 3	0
Molt 4/8	135 ± 11	0	110 ± 6	0	53 ± 2	0
Jurkatt-tatt	62 ± 2	0	0	0	46 ± 3	0

В работе [1] были рассмотрены ранее описанные нами примеры активации P<sub>g</sub> в присутствии дифтерийного токсина или очищенного вируса чумы птиц, ингибиторный анализ которых позволяет считать достаточно вероятной реализацию активации зимогена именно по кислородзависимому механизму.

На полученных в лаборатории регуляторных белков и пептидов Института физиологии НАН образцах фактора роста нервов (NGF) показано, что очищенные и гомогенные (по данным электрофореза и изоэлектрофокусирования) не только олигомер NGF (7S) и  $\gamma$ -, но и  $\beta$ -

субъединица обладала P<sub>g</sub>-активаторной способностью. В отличие от SK, урокиназы, тканевого активатора эта способность характеризуется длительным lag-периодом. В сравнении с  $\gamma$ -субъединицей  $\beta$ -субъединица практически не гидролизовала синтетический нитроанилидный субстрат – VAPNa, однако обе эти субъединицы расщепляли протамин-сульфат [53]. P<sub>g</sub>-активаторная функция 7S и обеих субъединиц ( $\gamma$  и  $\beta$ ), как и их прямая протеиназная активность, существенно подавлялись NBT. При pH 7,6 7S,  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -субъединицы ингибировали восстановление NBT в модельной системе генерирования супероксидного радикала на 40, 60, 28 и 41–52% соответственно [30, 31].

Мы также достаточно подробно останавливались на обнаруженных в образцах белков-ингибиторов протеиназ – соевого ингибитора трипсина, овомукоида и овоингибитора протеолитической активности, способности разлагать H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, индуцируя медленно затухающую вспышку люминолзависимой хемилюминесценции, конверсии супероксидных радикалов в химических системах их генерирования [1, 32].

Эти результаты позволяют несколько иначе взглянуть на проблему регуляторных белков (границы этого термина сейчас все более размываются), особенно на механизм их действия. На наш взгляд, тезис о том, что взаимодействуя с рецептором клеточной (субклеточной) мембраны, эти белки индуцируют «чисто» конформационную перестройку рецептора и участка мембраны, уже недостаточен. По-видимому, они должны обладать и другими способностями, в частности, энзиматической активностью. Весьма привлекательными в этом аспекте выглядят их способность модифицировать процессы опосредуемыми активными формами кислорода и вмешательство в протеолитические реакции. В этом плане открывается широкая перспектива дальнейших исследований. Кстати, в настоящее время остается совершенно неясным механизм спонтанной трансформации нормальной формы белка приона, обеспечивающей функции клеток нервной ткани, в инфекционную цитотоксическую, как и способности патологической формы его молекулы осуществлять конверсию молекул нормальной формы в себе подобные. Принципиально представленные в литературе модели подобных превращений сводятся к изменениям конформации [33]. Мы уже отмечали, что существенные изменения конформации белка вовсе не всегда сопряжены с изменениями его функции. С другой стороны, известны примеры, когда относительно небольшие изменения структуры белка сопровождаются принципиальными изменениями функциональных свойств молекулы. Мы выдвинули предположение, что прионовый агент имеет собственный инструмент «агрессии», который и позволяет ему переводить популяцию нормальных молекул белка в патологическую конформацию. Этим инструментом должен быть каталитический центр и, весьма вероятно, протеолитический [1].

С другой стороны, именно концепция кислородзависимого протеолиза дала мощный импульс исследованиям воздействия P<sub>g</sub> и SK на клетки нервной ткани, развернутым в лаборатории регуляторных белков и пептидов Института физиологии НАН Беларуси и с 1999 года вылившимся в совокупность пионерских результатов абсолютной мировой новизны, в том числе доказательство нейротрофических свойств SK и P<sub>g</sub>. Эти результаты вносят крупный вклад в нейробиологию, они частично обобщены в ряде крупных статей [34–36].

Более того, настоящая концепция создает основу для разработки нетрадиционных ингибиторов протеолиза, исходя из значимости для протеиназного катализа собственных активных форм кислорода.

Наконец, приобретает особый смысл в аспекте патогенеза заболеваний накопление в организме метаболитов или ксенобиотиков, способных эффективно связывать супероксидный радикал и иные формы активированного кислорода, что принципиально может сопрягаться с блокадой определенных протеолитических реакций, и, как следствие, накопление избытка нежелательных белковых субстанций.

**АТР-ингибируемый протеолиз.** В последние десятилетия во всем мире интенсивно исследуются механизмы АТР-активируемого протеолиза. Именно за открытие АТР-активируемого убиквитин-опосредованного протеолиза и его роли в физиологии клетки в 2007 А. Цехановеру, А. Гершко и И. Розе присуждена Нобелевская премия по химии. Описан ряд протеиназ, которые активируются добавлением АТР, причем замена его нуклеотидом с меньшим количеством макроэргических связей ведет к снижению такого эффекта [37–39]. Механизм этого явления пока остается неясным.

В 1987 г. нами был обнаружен и описан эффект противоположного плана. АТФ оказался способным подавлять SK-зависимую активацию Pg. При концентрации 0,1 М достигалось 50%-ное угнетение процесса [40]. Этот эффект не зависел от количества макроэргических связей в нуклеотиде – SK-зависимая активация зимогена оказалась индифферентной к ADP, GTP, CTP и подавлялась еще лишь 3',5'-AMP. Попытки связать феномен с возможными O<sub>2</sub><sup>-</sup>-перехватывающими свойствами нуклеотида не имели успеха. В экспериментах на нескольких O<sub>2</sub><sup>-</sup>-генерирующих модельных системах было действительно зафиксировано существенное ингибирование восстановления NBT рядом нуклеотидов: например, уже в концентрации 0,01 М ADP ингибировал этот процесс на 70, а AMP – на 40% [41]. Однако даже увеличение их концентрации на порядок не выявило изменений SK-индуцируемой активации Pg [40].

Затем было обнаружено подавление АТФ в концентрации 0,01М фибринолитической активности протеиназы гриба *Arthrobotrys longa* [42].

Более обстоятельные исследования влияния нуклеотидов на активность ряда протеиназ и функцию активаторов Pg позволили выяснить два момента [43]:

1. В ряде случаев зафиксировано ингибирование АТФ в концентрации 10<sup>-3</sup> М протеолитической активности пепсина, металлопротеиназы бацилл, а при большей концентрации нуклеотида – активности трипсина, химотрипсина, пепсина. Направленность и сила эффекта существенно зависели от белка-субстрата. Это расширяет представления о феномене АТФ-ингибируемых реакций протеолиза, но его природа остается нераскрытой. Мы полагали, что действие нуклеотидов может быть обусловлено наличием в молекулах протеиназ специфических пуринсвязывающих сайтов [3]. Однако как уже указано выше, например, активаторная функция SK нечувствительна к иным нуклеотидам, кроме АТФ. К тому же полученные данные свидетельствуют о различной эффективности, например, АТФ, ADP и 5'-AMP на лизис желатина протеиназами. Можно было бы думать, что угнетение активности протеиназ АТФ в концентрации более 10<sup>-3</sup> М вызвано усилением аутолиза протеиназ, учитывая достаточно длительный период контакта эффектора с ферментами (24 ч). Однако это не согласуется с тем, что эффект ингибирования АТФ проявлялся далеко не на всех субстратах.

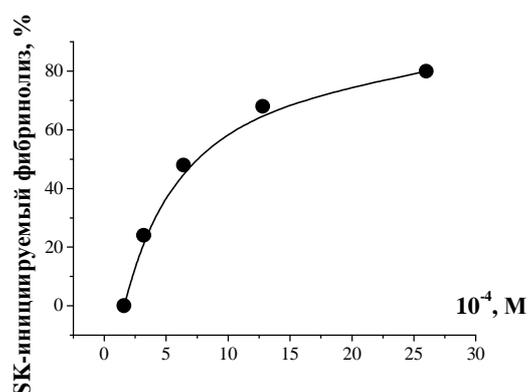
2. Оказалось, что феномен АТФ-активированного и непосредственного убиквитинотом протеолиза распространен шире, чем это принято считать. Фактически до наших исследований активация протеолиза АТФ в подобной ситуации была показана только в отношении папаина [44]. Мы же наблюдали этот эффект при расщеплении белков трипсином, химотрипсином, субтилизином, пепсином, а также металлопротеиназой бацилл. Механизм такой стимуляции также нуждается в проведении дальнейших исследований, тем более, что в литературе нет сообщений о возможности аутофосфорилирования молекул использованных нами протеиназ.

Проведенные исследования позволили также установить протекторное действие ряда нуклеотидов на молекулу Pg. Для инактивации сорбированного на нитях фибрина Pg нами было использовано ультрафиолетовое облучение [45]. Такой фибрин не лизируется в присутствии SK. Однако добавки отдельных нуклеотидов частично защищали зимоген от ультрафиолетовой радиации (табл. 4).

**Табл. 4.** Влияние пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов (0,001М) на инициированный стрептокиназой лизис плазминогенсодержащих фибриновых пластин после их УФ-облучения (растворитель – 0,15 М раствор NaCl, pH 7,0; n = 5) [46]

Исследуемый нуклеотид	Стрептокиназоиндуцированный фибринолиз, мм <sup>2</sup>	
	нативных фибриновых пластин	пластин после УФ-облучения, 50 мин
Без добавок	457 ± 15	0*
+ АТФ	395 ± 10	0*
+ ADP	420 ± 20	163 ± 7*
+ 5-AMP	415 ± 17	272 ± 11*
+ 3,5-AMP	436 ± 20	193 ± 10*
+ 2,3-AMP	431 ± 18	0*
+ ATetr.P	380 ± 15	0*
+ GTP	390 ± 14	0*
+ GDP	436 ± 22	169 ± 8*
+ CTP	169 ± 8*	0*

На примере АМР исследована концентрационная зависимость остаточного СК-инициированного лизиса фибриновой пластины, содержащей Fg, после ее УФ-облучения. Результаты демонстрируют четкую концентрационную зависимость защитного действия нуклеотидов в этих условиях (рис. 3). Причем не установлено никакой связи между количеством макроэргических связей в нуклеотиде и его протекторной эффективностью. Многие соли, включая неорганические фосфаты, подобного защитного эффекта не дали. Вместе с тем приведенные факты ставят новые вопросы о регуляторном действии системы нуклеотидов на протеолитические процессы. Они прежде всего выдвигают проблему взаимодействия нуклеозидфосфатов с протеиназами, что выливается в многоплановые исследования.

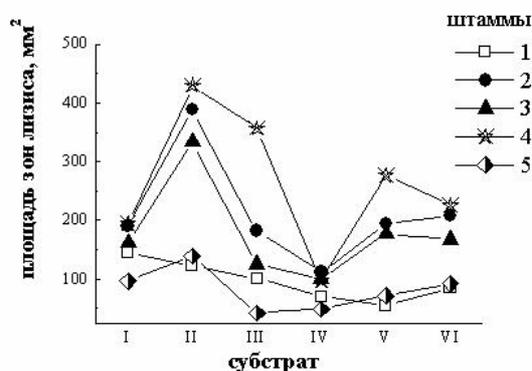


**Рис. 3.** Влияние концентрации АМР в фибриновом геле на активируемость плазминогена стрептокиназой после УФ-облучения фибриновых пластин (% к нативной необлученной пластине) [46]

Отметим, что в целом ряде случаев протеиназы патогенных микроорганизмов могут выступать в качестве фактора или «кофактора» патогенности. Мы уже останавливались на этом вопросе в предыдущей статье [2]. Но этот вопрос остается непроработанным.

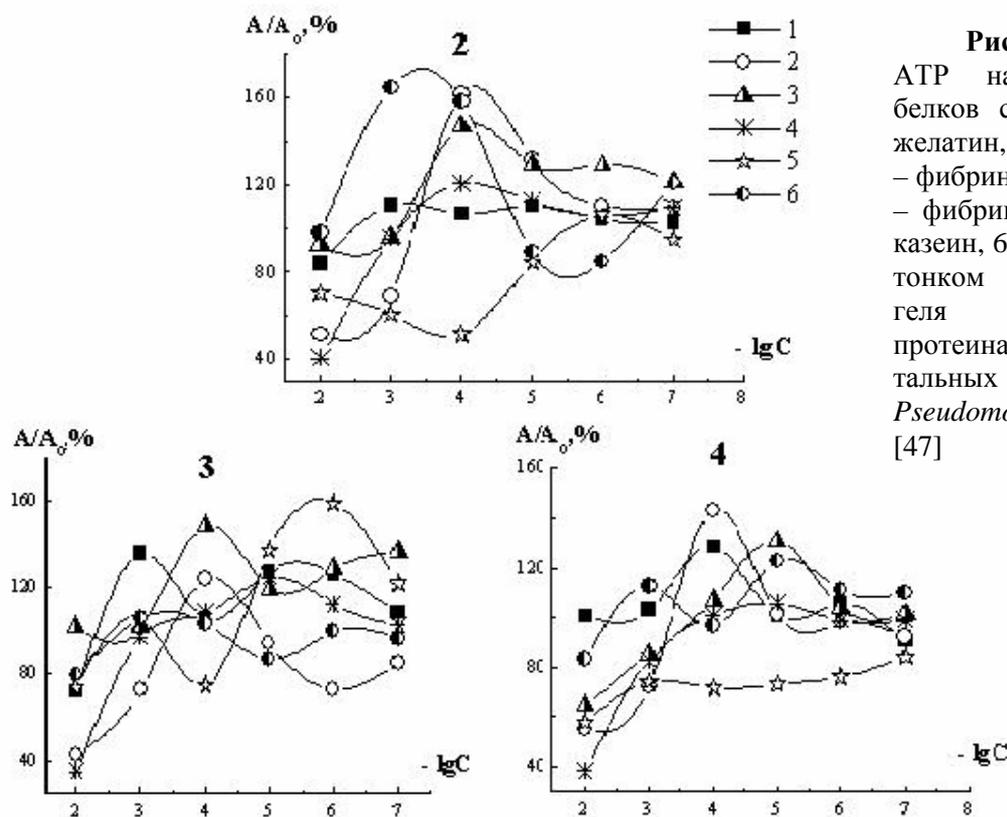
Полученные материалы позволили продемонстрировать целесообразность и полезность использования АТР в качестве своего рода «зонда» для более тонкой дифференциации особенностей штаммов таких микроорганизмов. Известно, что высокая изменчивость патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, появление атипичных форм и новых ранее неизвестных вариантов, проявляющих нередко сходную энзиматическую активность, выдвигают проблему использования новых подходов к дифференциации штаммов.

Проведенные нами исследования на пяти госпитальных штаммах *Pseudomonas aeruginosa* (1 – 92/1<sub>г061</sub>, 2 – 74/5<sub>г064</sub>, 3 – 23/2<sub>г061</sub>, 4 – 23/2<sub>г062</sub> и 5 – 74/5<sub>г063</sub>) из коллекции лаборатории внутрибольничных инфекций ЦНИЛ Белгосмедуниверситета показали, что супернатанты суточных бульонных культур этих штаммов по активности расщепления желатина и фибриногена быка различались в 2,0–2,5 раза, по расщеплению фибриногена человека – в 7 раз, по расщеплению казеина – в 4 раза. Супернатанты же штаммов 2, 3, 4 практически в одинаковой мере расщепляли желатин (180 ± 6, 160 ± 10 и 180 ± 9 мм<sup>2</sup>) и фибриноген быка (100 ± 7, 110 ± 5 и 100 ± 5 мм<sup>2</sup>) [47]. Вместе с тем, штамм 4 обладал протеиназами, более интенсивно расщепляющими фибриноген человека: в 2,0–2,8 раза и казеин – в 1,6 раза (рис. 4).



**Рис. 4.** Расщепление белков субстратов (I – желатин, II – сывороточный альбумин, III – фибриноген человека, IV – фибриноген быка, V – казеин, VI – гемоглобин) в тонком слое агарового геля супернатантами бульонных культур пяти внутрибольничных штаммов *Pseudomonas aeruginosa*. Растворитель для белок-агаровых пластин – 0,02 М трис-НСl буфер рН 7,4 [47]

Однако АТФ расщепление белка протеиназами штамма **2** при концентрации  $10^{-4}$  М усиливал на 20%, а при концентрации  $10^{-2}$  М – угнетал на 60% (рис. 5). У штамма **3** отмечены однотипные по направленности изменения протеолиза: +50 и –70% соответственно. Активность внеклеточных протеиназ штамма **4** по этому субстрату подавлялась добавками АТФ в концентрации  $10^{-3}$  и  $10^{-2}$  М на 20 и 70% соответственно. Весьма заметна разница реакции протеиназ штаммов **2, 3** и **4** на добавку АТФ при расщеплении фибриногена человека, а также желатина [47].



**Рис. 5.** Влияние АТФ на расщепление белков субстратов (1 – желатин, 2 – альбумин, 3 – фибриноген человека, 4 – фибриноген быка, 5 – казеин, 6 – гемоглобин) в тонком слое агарового геля внеклеточными протеиназами госпитальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* [47]

Эти результаты выявили также в целом ряде случаев достаточно выраженное угнетение протеолитической активности в присутствии АТФ, причем в концентрации  $10^{-5}$ – $10^{-3}$  М.

Нами была предпринята попытка использования данного феномена при анализе плазмы крови и бронхо-альвеолярной лаважной жидкости пациентов при бронхо-легочной патологии. Эти материалы представлены в предыдущей статье [48], они – лишь первый шаг в приложении эффекторного действия АТФ на протеолитические реакции к лабораторной диагностике заболеваний.

Кроме того, наблюдающиеся при физиологических и патологических состояниях колебания уровня внутриклеточного АТФ и других нуклеозидфосфатов несомненно отражаются не только на интенсивности АТФ-активируемого убиквитин-опосредованного протеолиза. Однако эта сторона проблемы пока остается практически нераскрытой.

**Фосфатный эффект в протеолизе.** Еще при исследовании активирующего действия ионов Fe на зимогены протеиназ было установлено, что в ряде случаев оно проявляется лишь в присутствии в растворе неорганического ортофосфата [49].

Дальнейшие исследования показали, что фибринолитическая активность отмытых клеток лимфобластных линий человека зависит от присутствия ортофосфата [3, 50].

Можно было думать, что подобный эффект обусловлен ресинтезом АТФ и отражает случай АТФ-активируемого протеолиза. Однако с этим не согласуется слабое ингибиторное действие на указанный эффект ортофосфата 0,001 М молибдата натрия (~20%) и 0,001 М метаванадата натрия, являющихся ингибиторами АТФ-азы [39] и подавляющих АТФ-активируемый протеолиз. Точно так же лишь на линии Molt 4 проявилось заметное (на 43%) ингибиторное действие 0,001

М фторида натрия. Эти обстоятельства свидетельствуют против возможной связи рассматриваемого феномена с ресинтезом АТФ. В случае же добавления к клеткам еще и субстрата дыхания – цитрата указанные соединения даже способствовали увеличению протеолитической активности на 19–37%. Все это создало предпосылки для высказывания идеи о самостоятельном «фосфатном эффекте» в регуляции протеолиза [51].

На субклеточных фракциях гомогенатов головного мозга и печени белых мышей было установлено, что добавление ортофосфата натрия заметно увеличило P<sub>g</sub>-активаторную способность практически всех фракций (табл. 5).

**Табл. 5.** Особенности влияния неорганического ортофосфата на активацию связанного плазминогена человека (мм<sup>2</sup> зон лизиса плазминогенсодержащих фибриновых пластин) фракциями гомогенатов головного мозга и печени мышей (n = 5) [51]

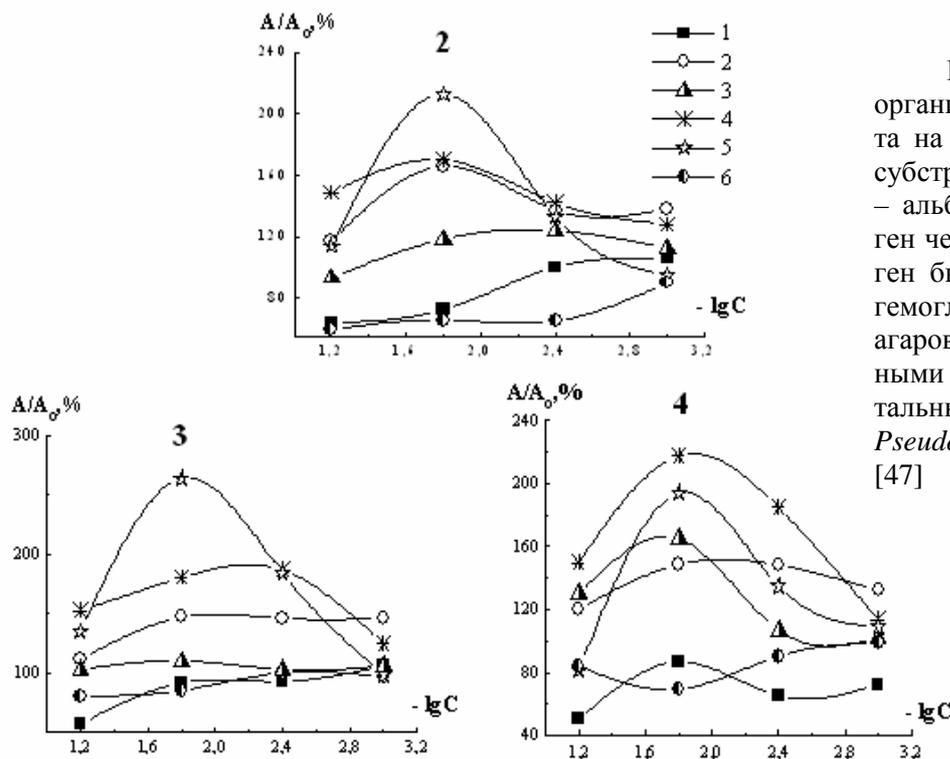
Эффектор	Фракции гомогената					
	головного мозга			печени		
	ядерная	тяжелых мембран	митохондриальная	ядерная	тяжелых мембран	митохондриальная
Контроль (0,15 М NaCl)	70 ± 3	100 ± 9	105 ± 7	60 ± 4	60 ± 3	85 ± 4
+ ортофосфат, 0,006 М	<b>273 ± 19*</b>	<b>200 ± 11*</b>	<b>206 ± 13*</b>	<b>94 ± 4*</b>	<b>90 ± 7*</b>	<b>102 ± 5*</b>
+ АТФ, 0,001 М	56 ± 4	42 ± 3	108 ± 10	58 ± 3	<b>74 ± 4*</b>	<b>50 ± 3*</b>
+ ADP, 0,001 М + ортофосфат	<b>203 ± 20*</b>	<b>184 ± 9*</b>	<b>186 ± 12*</b>	<b>115 ± 6*</b>	<b>98 ± 5*</b>	<b>104 ± 5*</b>
+ ортофосфат + ванадат, 0,001 М	<b>86 ± 4*</b>	<b>145 ± 7*</b>	<b>232 ± 15*</b>	<b>93 ± 5*</b>	<b>112 ± 6*</b>	<b>138 ± 10*</b>
+ ортофосфат + молибдат, 0,001 М	<b>98 ± 5*</b>	<b>129 ± 6*</b>	<b>267 ± 15*</b>	<b>86 ± 3*</b>	<b>87 ± 5*</b>	<b>144 ± 11*</b>
+ ортофосфат + фторид, 0,001 М	<b>99 ± 5*</b>	<b>198 ± 10*</b>	<b>281 ± 11*</b>	74 ± 4	<b>106 ± 6*</b>	<b>150 ± 9*</b>

Поскольку такое увеличение могло быть обусловлено ресинтезом АТФ, изучено влияние на P<sub>g</sub>-активаторную способность АТФ, ADP+ортофосфата, а также ингибиторов АТФ-деградирующих энзимов: ванадата натрия, молибдата натрия и фторида натрия. Судя по полученным данным, АТФ не влиял или угнетал P<sub>g</sub>-активаторную функцию. Нужно учесть, что проницаемость биомембран для экзогенного АТФ ограничена. ADP + ортофосфат обуславливали увеличение активаторной функции, близкое ортофосфату. Однако ни в одном случае эффект этой смеси принципиально не превышал действие одного ортофосфата. Это не позволяет считать, что влияние неорганического ортофосфата опосредуется именно ресинтезом АТФ. Более того, добавление метаболических ядов, ингибирующих АТФ-деградирующие энзимы, в целом ряде случаев не влияло на действие ортофосфата либо даже усиливало его. Эти материалы позволяют считать, что неорганический ортофосфат влияет на P<sub>g</sub>-активаторную способность субклеточных фракций, по-видимому, без опосредования ресинтезируемым АТФ. Такое заключение подтверждается и результатами исследования влияния на прямую фибринолитическую активность митохондриальной фракции гомогенатов головного мозга и печени мышей (она проявляется только в присутствии ортофосфата) цианида и разобщителя окислительного фосфорилирования – 2,4-динитрофенола: эти яды не снимали активирующий эффект фосфата [20].

Дальнейшие исследования расщепления ряда белков-субстратов протеиназами различных групп (сериновыми, цистеиновыми, аспартильными, металлопротеиназами), а также P<sub>g</sub>-активаторной способности SK, урокиназы и тканевого активатора P<sub>g</sub> из сердца свиньи выявили

сильное воздействие ионов неорганических орто- или пирофосфата – во многих случаях стимуляцию расщепления белков протеиназами [43]. Эффект зависел не только от природы катализатора или концентрации иона, но в значительной мере определялся использованным белком субстратом. Этот момент имеет методическое значение. Однако данному вопросу в литературе уделяется недостаточно внимания. Следовательно, описанный ранее «фосфатный эффект» в протеолизе может реализоваться уже на уровне взаимодействия «энзим–субстрат», но механизм реализации пока неясен. Ионы ортофосфата являются одними из основных в живых организмах, образуют одну из буферных систем тканей и клеток. Выяснение механизма «фосфатного эффекта» требует в перспективе специальных исследований взаимодействия ионов фосфата с сайтами молекулы протеиназы или активатора Pg, а также с макромолекулой белка субстрата. Это объемная задача, которая внешне выглядит вполне стандартной, однако может быть сопряжена с целым рядом неожиданных моментов.

В присутствии неорганического ортофосфата расщепление сывороточного альбумина протеиназами патогенных штаммов **2** и **3** *Pseudomonas aeruginosa* усиливалось на 20–60% во всем концентрационном диапазоне аниона (рис. 6). Близкая картина отмечена у протеиназ этих двух штаммов в отношении фибриногена быка, тогда как расщепление этого белка протеиназами штамма **4** при концентрации ортофосфата 0,03 М достигало уже 220% в сравнении с контролем. Для протеиназ штаммов **2** и **3** фосфатный эффект был максимальным при расщеплении казеина: последнее при концентрации фосфат-ионов 0,03 М возрастало в 2,1–2,7 раза. Лишь штамм **4** продуцировал протеиназы, активность которых существенно возрастала (на 30–70%) в присутствии неорганического ортофосфата при использовании в качестве субстрата фибриногена человека.



**Рис. 6.** Влияние неорганического ортофосфата на расщепление белков субстратов (1 – желатин, 2 – альбумин, 3 – фибриноген человека, 4 – фибриноген быка, 5 – казеин, 6 – гемоглобин) в тонком слое агарового геля внеклеточными протеиназами госпитальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* [47]

Мы полагаем, что значение фосфатного эффекта заключается также в возможности использования неорганических фосфатов в качестве «зондов» при исследовании особенностей перестроек системы протеолиза в организме, а также для стимуляции солями фосфатов протеолитических процессов в случае такой необходимости. Кроме того, колебания уровня ортофосфата в клетках и тканях неизбежно сопровождаются изменениями интенсивности определенных протеолитических реакций. Этот аспект – самостоятельная проблема не только протеолиза, но и биохимической регуляции в целом.

На основании фосфатного эффекта, нами предложен способ ведения панкреатического гидролиза белкового сырья [52].

Неожиданные взаимодействия компонентов протеолиза с тканевыми белками. До сих пор межбелковые взаимодействия в регуляции протеолитических процессов рассматривались в трех аспектах: взаимодействие протеиназы с белком-субстратом, взаимодействие протеиназы с белком-ингибитором, взаимодействие протеиназы или зимогена с рецептором клеточной поверхности.

Методами гель-хроматографии и дифференциальной спектроскопии нами было установлено, что в водно-солевых растворах образуются эквимоллярные устойчивые комплексы SK или Pg с лактат-, малатдегидрогеназами, каталазой или пируваткиназой [54, 55]. Это принципиально новый факт, ранее не описанный в литературе.

Эквимоллярные комплексы «SK(или Pg) –энзим» оказались весьма устойчивыми. Они сохранились при добавках 6 М мочевины (кроме комплексов «Pg–дегидрогеназа»), резком сдвиге pH раствора, добавках нейтральных электролитов,  $\epsilon$ -аминокапроновой кислоты, ряда углеводов, субстратов и кофакторов указанных дегидрогеназ и пируваткиназы. Такие комплексы не образовывались в присутствии 0,01 М додецилсульфата натрия или 0,001 М галактозамина. Комплексы не выявлялись при предынкубации дегидрогеназ с NAD (но не NADH) в соотношении энзим:NAD=1:1 или при предынкубации пируваткиназы с фосфоенолпируватом [56]. Изложенные материалы позволяют думать, что в образовании комплексов маловероятно участие Lys-связывающих сайтов молекулы Pg. Между тем принято считать, что именно за их счет зимоген взаимодействует с целым рядом белков и клеточных поверхностей. Учитывая эффект галактозамина, можно допустить, что взаимодействие белков осуществляется по углевод-углеводным контактам. В принципе все перечисленные белки являются гликопротеинами. Исключение составляет SK, в которой не обнаружено углеводов. Действие NAD или фосфоенолпирувата, предотвращающее формирование комплексов (при предынкубации) дегидрогеназ или пируваткиназы с Pg(SK), вряд ли объяснимо участием в таком взаимодействии белков субстрат(или коэнзим)связывающих сайтов. Как показали исследования каталитических свойств дегидрогеназ или пируваткиназы, в составе указанных комплексов значения  $K_m$  и  $k_1$  катализируемых ими реакций принципиально не изменялись [56]. Более вероятным является возникновение локальных изменений в сайте(ах) межбелкового взаимодействия вследствие конформационных перестроек молекулы соответствующего энзима при связывании низкомолекулярных лигандов. Этот момент нуждается в экспериментальной проверке. Образование рассматриваемых комплексов – достаточно быстрый процесс. Судя по кинетике дифференциальных спектров, не существует принципиальной разницы в кинетических и равновесных параметрах ( $k_1$ ,  $k_b$ ,  $k_{-1}$ ,  $K_a$ ,  $K_d$ ) взаимодействия SK или Pg с каждым из четырех энзимов, с одной стороны, и взаимодействия SK с Pg (его считают одним из самых быстрых взаимодействий белков) – с другой [57].

Смысл образования подобных комплексов для биосистем остается пока неизвестным. По-видимому, здесь необходимы исследования биологического действия комплексов. Это создает достаточно широкий фронт работ. Pg-активаторная функция SK и способность Pg активироваться в составе эквимоллярных комплексов со всеми энзимами принципиально не менялись. Исключение составлял комплекс «SK-пируваткиназа», проявляющий Pg-активаторную способность ~ на 30% выше в сравнении с нативной SK [54, 55].

Именно данное обстоятельство обусловило проведение исследований влияния SK, Pg и их комплексов с пируваткиназой на жизнедеятельность клеток нервной ткани и электрическую активность нейронов ствола головного мозга. Среди наиболее демонстративных результатов – блокада электрической активности нейронов дыхательного центра при продолжительной суперфузии понтобульбоспинального препарата раствором Pg [58], стимуляция пируваткиназой пролиферации и дифференциации клеток нейробластомы IMR-32 и деструкция клеток глиомы С6 [59, 60].

Парадоксален эффект фенилметилсульфонилфторида. Необычные эффекты этого ингибитора сериновых и цистеиновых протеиназ – активация протеолиза впервые замечены нами при изучении расщепления белков-субстратов протеиназами разрушенных клеток *Corynebacterium diphtheria* токсигенного штамма PW-8. Оказалось, что в условиях, оптимальных для токсигенеза, протеолитическая активность их резко подавлялась р-хлормеркурибензоатом и о-

фенантролином, но не фенилметилсульфторидом. Более того, в присутствии последнего она даже возрастала. Ничего подобного не наблюдалось в условиях, не являющихся оптимальными для токсиногенеза [61].

Хорошо известно, что даже такие сильные энзимные яды, как диизопропилфторфосфат, могут метаболизироваться в биосистемах [62]. 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 [63]. Тем более примечательно, что расщепление протамина-сультата ингибитором трипсина соевых бобов заметно возрастало в присутствии фенилметилсульфонилфторида. Такой же эффект выявлен в отношении фибринолитической активности овоингибитора [1]. Полученные результаты дают основание предполагать существование еще ряда протеиназ с необычными свойствами в растительных, микробных и животных клетках.

*Еще раз о непротеиназном протеолизе.* Существующая парадигма биологии и биохимии постулирует расщепление белков при участии специфических энзимов – пептидаз. В экспериментах *in vitro* возможность расщепления молекулы белка неэнзиматическим путем продемонстрирована неоднократно. Кратко о примерах мы упоминали в предыдущей статье [1]. Возможность реализации подобного процесса в биосистемах пока остается более предметом дискуссий. Тем не менее, нельзя не упомянуть об обнаруженном в экспериментах с супернатантами культуральной жидкости патогенных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* значительном снижении их протеолитической активности при отделении на колонке с сефадексом G-25 низкомолекулярной фракции сине-зеленых пигментов, а также о проявлении этой фракцией протеиназных свойств [64]. Этому аспекту несомненно следует посвятить отдельные исследования, поскольку они могут весьма существенно изменить наши представления о протеолизе.

**Заключение.** Довольно конспективно изложенные факты и положения иллюстрируют новые ракурсы проблемы протеолиза, раскрытые при нашем непосредственном участии. Каждый из них выливается в самостоятельную проблему со своими теоретическими и прикладными аспектами. Одним из важных прикладных сторон описанных феноменов для патологии человека является разработка дифференциально-диагностических тестов на основе проявлений кислородзависимого протеолиза и эффектов фосфатов. Кроме того, открываются возможности нетрадиционных подходов к разработке ингибиторов протеолитических реакций, в том числе катализируемых протеиназами вирионов. Тем более, что вирусы способны инициировать протеолитические реакции по кислородзависимому механизму [1]. Создается основа для принципиально нового подхода к проблеме ряда специфических белков, наделенных функцией регуляции биологических процессов. К ним следует отнести также токсины и прионы. Наконец, материалы о быстром процессе формирования устойчивых комплексов белков различного функционального плана могут оказаться полезными для понимания белок-рецепторных взаимодействий, что имеет исключительное значение для физиологии и патологии эукариотической и прокариотической клетки.

### Литература:

- [1]. Никандров В. Н., Пыжова Н. С. // Весці НАН Беларусі. Сер. мед. навук. 2008. № 1. С. 4–22.
- [2]. Никандров В. Н., Пыжова Н. С. // Здравоохранение. 2006. № 11. С. 4–9.
- [3]. Никандров В. Н., Пыжова Н. С. // Современные проблемы инфекционной патологии человека (вирусология, микробиология, иммунология, эпидемиология, клиника)»: Матер. II научно-практ. конфер. Минск, 2001. С. 318–338.
- [4]. Журнов О. П. // Мол. биология. 1988. Т. 22, № 3. С. 581–600.
- [5]. Dreyer G. B., Metcalf B. W., Tomaszek Th. A. Jr. et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. 1989. Vol. 86. P. 9752–9756.
- [6]. Castellino F. J. // Trans. Int. Biol. Soc. 1979. Vol. 1. P. 1–5.
- [7]. Reddy K. N. N. // Enzyme. 1988. Vol. 40. P. 79–89.
- [8]. Nikandrov V. N., Vorobyova G. V., Yankovskaya G. S., Demidchik N. V. // Int. J. Biol. Macromol. 1992. Vol. 14. P. 229–234.
- [9]. Sazonova I. Y., Houng A. K., Chowdhry S.A. et al // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276, No 16. P. 12609–12613.
- [10]. Wu D. H., Shi G. Y., Chuang W. J. et al // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276, No 18. P. 15025–15033.

- [11]. Никандров В. Н., Воробьева Г. В., Янковская Г. С. и соавт. // Весці АН БССР. Сер. біял. навук. 1986. № 6. С. 47–52.
- [12]. Heimburger N., Schwick G. // *Arzneimittel-Forsch.* 1971 Vol. 21. P. 1439–443.
- [13]. Nikandrov V.N. // *Chemical modification of enzymes.* New York, 1996. P. 567–614.
- [14]. Никандров В. Н., Пыжова Н. С., Судник Ю. М. // Докл. АН БССР. 1986. Т. 30, № 6. С. 558–560.
- [15]. Nikandrov V. N. // *Intern. J. Biochem.* 1992. Vol. 24, No 1. P. 47–53.
- [16]. Pyzhova N. S., Nikandrov V. N. // *Thromb. Res.* 1996. Vol. 82, N 4. P. 303–312.
- [17]. Никандров В. Н., Пыжова Н. С. // Весці НАН Беларусі. Сер. мед.-біял. навук. 2001. № 1. С. 54–60.
- [18]. Пыжова Н. С., Никандров В. Н. // Докл. АН БССР. 1991. Т. 35, № 12. С. 1130–1133.
- [19]. Пыжова Н. С., Никандров В. Н. // Доклады НАН Беларусі. 2001. Т. 45, № 3. С. 67–70.
- [20]. Nikandrov V. N., Pyzhova N. S. // *Cel. Mol. Biol.* 2006. Vol. 52, N 4. P. 30–39.
- [21]. Никандров В. Н., Пыжова Н. С. // IV симпоз. «Химия протеолитических ферментов». Тез. докл. и стенд.сообщен., М., 1997. С. 30.
- [22]. Пыжова Н. С., Никандров В. Н., Судник Ю. М. // Докл. АН Беларусі. 1992. Т. 36, № 11–12. С. 1039–1044.
- [23]. Pyzhova N. S., Nikandrov V. N. // 11<sup>th</sup> International Confer. On Proteolysis and Protein Turnover. Abstracts. Turku, 1996. P. 187.
- [24]. Phelps R. A., Neet K. E., Lynn L. T., Putnam F. W. // *J. Biol. Chem.* 1961. Vol. 236, No 1. P. 96–105.
- [25]. Oliver C. N., Ahn B., Wittenberger M. E., Stadtman E. R. // *Cell. Regulat. Malign. Growth.* Berlin, 1985. P. 320–331.
- [26]. Stief Th. W., Heimburger N. // *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* 1988. Vol. 369. P. 1337–1342.
- [27]. Dean R. T., Roberts G., Jessup W. // *Clin. Biol. Res.* 1985. Vol. 180. P. 341–350.
- [28]. Pyzhova N. S., Nikandrov V. N. // *Biology of Proteolysis. Abstracts of paper at meeting.* Cold Spring Harbour Laboratory. New York, 1997. P. 116.
- [29]. Пыжова Н. С., Никандров В. Н. // Докл. НАН Беларусі. 1998. Т. 42, № 4. С. 94–99.
- [30]. Nikandrov V. N., Pyzhova N. S., Lukashevitch V. S. et al. // 18 Intern. Congress Biochem. Mol. Biol. Abstract Book. Birmingham, 2000. P. 317.
- [31]. Никандров В. Н., Пыжова Н. С. // Проблемы медицинской энзимологии: Тр. Всерос. конф. М., 2002. С. 163–164.
- [32]. Никандров В. Н., Пыжова Н. С. // Весці НАН Беларусі. Сер. мед.-біял. навук. 2003. № 3. С. 75–89.
- [33]. Григорьев В. Б., Подкидышев А. Н., Кальнов С. Л. // *Усп. соврем. биол.* 2010. Т. 130, № 3. С. 227–236.
- [34]. Никандров В. Н., Жук О. Н., Гронская Р. И. и др. // *Materials, methods and technology. Scientific articles 2007*. Sci. Invest. LTD–branch Bourgas. Bulgaria, 2007. P. 48–66.
- [35]. Никандров В. Н., Жук О. Н., Пыжова Н. С. и др. // Весці НАН Беларусі. Сер. мед. навук. 2008. № 1. С. 85–97.
- [36]. Никандров В. Н., Жук О. Н., Гронская Р. И. и др. // *Биомед. химия*, 2008. Т. 54, № 2. С. 192–200.
- [37]. Ishiura Sh., Tsukahara T., Sugita H. // *Intern. J. Biochem.* 1990. Vol. 22. P. 1195–1201.
- [38]. Pillai S., Botti R., Zull J. E. // *J. Biol. Chem.* 1983. Vol. 258. P. 9724–9728.
- [39]. Reider R. F., Ibrahim A., Etlinger J. D. // *J. Biol. Chem.* 1985. Vol. 260. P. 2015–2018.
- [40]. Никандров В. Н., Пыжова Н. С., Вотяков В. И. // *Бюлл. экспер. биол. мед.* 1987. Т. 104, № 7. С. 49–51.
- [41]. Никандров В. Н., Пыжова Н. С., Клинггер Ю. Е. // Докл. АН БССР. 1987. Т.31, № 11. С. 1045–1048.
- [42]. Цыманович С. Г., Никандров В. Н., Максимова Р. А. и др. // *Вопр. мед. химии.* 1992. Т. 38, № 3. С. 44–45.
- [43]. Пыжова Н. С., Никандров В. Н. // *Биоорг. химия.* 2008. Т. 34. С. 382–391.
- [44]. Pillai S., Zull J.E. // *J. Biol. Chem.* 1985. Vol. 260, N 14. P. 8384–8389.
- [45]. Никандров В. Н., Пыжова Н. С. А. с. СССР № 1472508 // Б.И. 1989, №14.
- [46]. Пыжова Н.С., Никандров В.Н. // *Функциональная роль монооксида азота и пуринов.* Сб. статей. Минск: 2001. С. 142–146.
- [47]. Никандров В. Н., Пыжова Н. С., Скороход Г. А. // *Молекулярная диагностика инфекционных болезней.* Междунар. научно-практ. конфер. Материалы конф. Минск, 2007. С. 217–218.
- [48]. Никандров В. Н., Пыжова Н. С., Жук О. Н. // *Новости медико-биол. наук.* 2010. № 1. С. 30–34.
- [49]. Пыжова Н.С. *Участие активных форм кислорода в процессах протеолиза:* Дисс. ... канд. биол. наук., Минск, 1990. 193 с.

- [50]. Никандров В. Н., Пыжова Н. С., Шатило Н. Л. // Инфекция и иммунитет. Матер., приуроченные к V междунар. форуму по глобальной вакцинологии «Вакцины и иммунизация». Минск, 2001. С. 193–202.
- [51]. Никандров В. Н., Пыжова Н. С. // Актуальные вопросы гепатологии. Третий симпозиум гепатологов Белоруссии. Минск, 1998. С. 39.
- [52]. Никандров В. Н., Пыжова Н. С., Шатило Н. Л., Шнып И. В. Патент ВУ № 11529, 27.10.2008.
- [53]. Никандров В. Н., Пыжова Н. С. Патент ВУ № 11953, 30.06.2009
- [54]. Никандров В. Н., Воробьева Г. В., Мурашко О. Н. и др. // Докл. АН Беларуси. 1997. Т. 41, № 3. С. 69–75.
- [55]. Nikandrov V. N., Murashko O. N., Vorobyova G. V. et al. // Lett. Pept. Sci. 1997. Vol. 4, No 4–6. P. 497–502.
- [56]. Никандров В. Н., Мурашко О. Н. // Тез. докл. IV съезда Белорусск.обществ.объединения фото-биол. биофиз. «Молекулярно-клеточные основы функционирования биосистем». Минск, 2000. С. 170.
- [57]. Никандров В. Н., Мурашко О. Н., Воробьева Г. В., Пыжова Н. С. // Проблемы медицинской энзимологии: Тр. Всерос. конф. М., 2002. С. 165.
- [58]. Никандров В. Н., Пятин В. Ф., Алексеева А. С. и др. // Весці НАН Беларусі. Сер. мед.-біял. навук. 2003. № 2. С. 40–43.
- [59]. Романовская А. А., Никандров В. Н. // Весці НАН Беларусі. Сер. мед. навук. 2008. № 3. С. 28–33.
- [60]. Романовская А. А., Никандров В. Н. // Цитология. 2007. Т. 49, № 8. С. 656–663.
- [61]. Никандров В. Н., Пыжова Н. С., Шанчиц Н. С. // Докл. НАН Беларусі. 2007. Т. 51, № 3. С. 92–97.
- [62]. Ефременко Е. Н., Варфоломеев С. Д. // Успехи биол. химии. 2004. Т. 44. С. 302–340.
- [63]. 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.
- [64]. Никандров В. Н., Пыжова Н. С., Пыж А. Э. // Материалы Международного Евро-Азиатского конгресса по инфекционным болезням. Том 1. Актуальные вопросы инфекционной патологии». Витебск, 2008. С. 24–26.

Поступила в редакцию: 30. 07. 2010 г.

V. N. NIKANDROV<sup>1,2</sup>, N. S. PYZHOVA<sup>1,2</sup>

## NON-TRIVIAL MANIFESTATIONS OF PROTEOLYSIS ON MOLECULAR AND CELLULAR LEVELS, THEIR FUNDAMENTAL AND APPLIED IMPORTANCE

<sup>1,2</sup> – *Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus;*

<sup>1,2</sup> – *Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health, Minsk, Belarus*

### Summary

Results of own long-term researches are generalized. The essence of the first time described phenomena is briefly stated: oxygen-dependent proteolysis, ATP-inhibited proteolytic reactions, phosphate effect in proteolysis, formations of stable equimolar complexes of streptokinase (plasminogen) with cellular oxidoreductases and pyruvate kinase, protective effect of nucleoside phosphates on UV-inactivation of plasminogen, paradoxical effect of phenylmethanesulfonyl fluoride on proteolytic reactions. It was demonstrated, that ATP-activated proteolytic reactions are more widespread, than it was considered. The fundamental and applied importance of these opened phenomena is characterized.

*Key words:* proteolysis, participation of active oxygen species, inhibition of proteolytic reactions by ATP, phosphate effect, inter-protein complexes, paradoxical effect of phenylmethanesulfonyl fluoride.