

# ВЕСЦІ

НАЦЫЯНАЛЬнай  
АКАДЭМІІ НАВУК БЕЛАРУСІ

Серыя  
медыка-біялагічных  
навук

# NEWS

OF BIOMEDICAL SCIENCES

АСОБНЫ АДЫТАК

3

2003

УДК 577.112:616.003.725

В. Н. НИКАНДРОВ<sup>1</sup>, Н. С. ПЫЖОВА<sup>2</sup>РЕГУЛЯТОРНЫЕ БЕЛКИ: ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА МОЛЕКУЛ  
И МЕХАНИЗМЫ ИХ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ<sup>1</sup>Институт физиологии НАН Беларуси, Минск,<sup>2</sup>НИИ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

(Поступила в редакцию 30.04.2003. Принята после рецензирования 07.05.2003)

Механизмы регуляции жизнедеятельности клеток, их ассоциаций и специализированных структур тканей представляют собой сложную и далекую от полной ясности проблему большой фундаментальной и прикладной значимости.

В осуществлении такой регуляции участвует обширная группа протеинов, воздействующих на биохимические и биофизические процессы не прямым каталитическим путем, а опосредованно через ряд звеньев и систем, следствием чего являются многоплановые и глубокие изменения метаболизма, функции и структуры клеток и тканей (регуляторные белки).

Говоря о регуляторных белках, следует отметить, что классификация протеинов по функциональным критериям (т. е. по биологическому предназначению) далека от идеальной, и границы классов в ней размыты. К регуляторным белкам можно отнести не только регуляторы активности генома (факторы инициации, элонгации), но и цитокины, а также токсины, ингибиторы энзимов, гормоны белковой природы и ряд других протеинов. Механизмы реализации их биологического действия во многом остаются неясными и служат предметом дискуссий. Классической схемой одного из механизмов, по которому развивается целая цепь событий, инициируемых регуляторным белком, является схема метаболитного рецептора [2]. Однако она не проработана во всех деталях. Более того, за последние годы и первичный контакт белка лиганда с рецептором приобретает новые ракурсы: например, таковы протеиназо-активируемые рецепторы [37]. Вполне возможно также, что регуляторные свойства присущи в той или иной мере большинству белков. Все эти вопросы пока совершенно не раскрыты.

Вместе с тем, потребность в подобной информации в последние десятилетия возрастает. Так, например, роль нейротрофинов велика при патологии эмбрионального развития нервной системы, ее злокачественных опухолях, регенерации нервов и нервной ткани, нейротрансплантации и т. д. [8, 47].

В настоящей статье предпринята попытка вычленить ряд тех новых особенностей молекул регуляторных белков, которые могут быть значимы для реализации их биологического действия на основе обобщения результатов многолетних исследований белков прокариотов и эукариотов, проведенных в лаборатории биохимии НИИ эпидемиологии и микробиологии Минздрава Республики Беларусь и в лаборатории регуляторных белков и пептидов Института физиологии НАН Беларуси.

**Стрептокиназа.** Одноцепочечный несубъединичный белок 47–55 кДа β-гемолитических стрептококков серологических групп А, С, G, являющийся сильнейшим активатором пламиногена человека и отдельных видов животных, но лишенный собственной протеолитической или иной гидролазной активности. Роль стрептокиназы для самого продуцента остается по-прежнему неясной. Материалы об особенностях структуры этого белка и его активаторной функции были обобщены в предыдущих статьях [16, 19, 44].

Полученные нами результаты свидетельствовали о том, что стрептокиназа обладает выраженной супероксидконвергирующей способностью в модельных системах генерирования супероксидного радикала, включая L-метионин + рибофлавин, NADH + феназинметосульфат, а также процесс аутоокисления пирогаллола [15, 44]. При этом белок отличается от класси-

ческих супероксиддисмутаз (Cu, Zn или Fe-содержащих) тем, что его функциональные свойства сохраняются при добавках  $H_2O_2$ , азиды натрия или цианида калия [15, 44].

Связь супероксидконвергирующей способности стрептокиназы с ее плазминогенактиваторной функцией представляется весьма вероятной, учитывая полное подавление последней перехватчиками супероксидного радикала, необратимо удаляющими последний из системы — нитротетразолиевым синим, адреналином [15, 44].

Исследования очищенных образцов стрептокиназы показали также неспособность ее генерировать активные формы кислорода в системе « $H_2O_2$ -люминол» или при восстановлении молекулярного кислорода. Она не проявляла каталазной активности, регистрируемой перманганатометрически, а также не обладала АТФ-азной активностью (в стандартных условиях [35]) при  $37^\circ C$  в течение 60 мин в присутствии  $0.0001-0.001 M Na^+ + K^+$  или  $Na^+ + K^+ + Mg^{2+}$  или  $Mg^+$  или  $Mg^{2+} + Ca^{2+}$  [15]. Вместе с тем достаточно примечательным моментом было подавление ее плазминогенактиваторной способности АТФ и 3',5'-АМР, остальные нуклеотиды были неэффективны [29]. Оказалось также, что в тесте аутоокисления пирогаллола (оно ингибировалась при добавлении стрептокиназы) добавка нитропруссид натрия существенно (в 2.5 раза) снижала супероксидконвергирующую способность этого белка (табл. 1). Такая картина свойственна известным типам супероксиддисмутаз, ее связывают с образованием свободного нитрооксидного радикала, конкурирующего с супероксидным [42]. Вместе с тем, это обстоятельство наводит на мысль о возможности участия стрептокиназы в трансформации активных форм не только кислорода. Это обстоятельство нуждается в специальном изучении.

Т а б л и ц а 1. Изменения  $O_2^-$  — конвергирующей активности стрептокиназы под влиянием нитропруссид натрия в тесте аутоокисления пирогаллола ( $n = 4$ ; пирогаллол —  $0.2 M$ ;  $0.05 M$  трис-НСI буфер рН 7.8 —  $2.0 M$ ; исследуемый образец —  $0.2 M$ ; атмосфера воздуха,  $25^\circ C$ ) [15]

Условия эксперимента	$\Delta E_{420}$	Степень подавления аутоокисления, %
Без добавок (контроль)	$0.173 \pm 0.005$	0
+ стрептокиназа, 1.7 мг	$0.110 \pm 0.009^*$	37
3.3 мг	$0.085 \pm 0.005^*$	51
+ нитропруссид натрия, $10^{-3}$ (контроль)	$0.240 \pm 0.010^*$	0
+ стрептокиназа, 3.3 мг + нитропруссид натрия	$0.190 \pm 0.007^*$	20

П р и м е ч а н и е: здесь и далее \* — изменения достоверны при  $P < 0.05$

Предположения относительно сложного регуляторного действия стрептокиназы возникли еще при исследовании ее эффекта на заживление осложненных длительно незаживающих ран. В отличие от препаратов типа «Солкосерил» или «Ируксол», мазь, содержащая стрептокиназу, вызывала не только очищение очага, но и оживление и рост грануляций, стягивание краев раны и резкое ускорение регенерации тканей [17].

В дальнейшем было установлено, что в монослойной культуре фибробластов эмбрионов кур стрептокиназа при концентрации  $(1.2-9.0) \cdot 10^{-7} M$  вызвала резкое (более чем на  $4.0 \lg$  БОЕ/мл) подавление репродукции вируса простого герпеса типа 1 ( $IC_{50}$  составляла менее  $3.0 \cdot 10^{-9} M$ ) и менее значительное подавление репродукции вируса гриппа А (FPV, Rostock, H7N1): на  $1.86 \lg$  БОЕ/мл при величине  $IC_{50} = 7.0 \cdot 10^{-8} M$  [46].

Получены результаты, свидетельствующие об угнетении синтеза ДНК и РНК в клетках глиомы  $C_6$  через 5 суток после добавки в питательную среду стрептокиназы в концентрации  $2 \cdot 10^{-9} M$ . Даже непродолжительная экспозиция клеток феохромоцитомы РС12 со стрептокиназой вызвала резкое снижение уровня АТФ-активируемого протеолиза [32].

Главными функциональными чертами молекулы стрептокиназы пока являются плазминогенактиваторная и супероксидконвергирующая способности, чувствительность к АТФ и сАМР. Регуляторные свойства белка остаются по сути не изученными глубоко.

В отличие от стрептокиназы, следующие два микробных протеина являются истинными токсинами.

**Стрептолизин О.** Один из экзотоксинов гемолитических стрептококков, белок  $60-61$  кДа, инактивируемый при действии окислителей и способный лизировать ряд клеток. Характеризуется отсутствием протеолитической и липолитической активности [5, 36]. Это послужило основанием для гипотезы детергентоподобного механизма цитолиза. Роль этого белка для гемолитических стрептококков неясна. Вместе с тем, инъекция в кровоток  $1-2$  мкг токсина вызывает гибель белой мыши весом  $20$  г в течение  $1-2$  мин от остановки сердца [4].

**Т а б л и ц а 2.** Изменение гемолитической активности стрептолизина О в присутствии перехватчиков активных форм кислорода, комплексонов и оксидоредуктантов [18]

Эффекторы	Гемолитическая активность, % к контролю
Контроль	100
Азид натрия, $10^{-3}$ М	68
L-гистидин, $10^{-2}$ М	32
L-триптофан, $10^{-2}$ М	39
Этанол, 1.7 М	38
D-маннит, $10^{-2}$ М	47
Нитротетразолиевый синий, $10^{-4}$ М	43
Стрептокиназа, 5000 МЕ	48
о-фенантролин, $6 \cdot 10^{-4}$ М	32
Диэтилдитиокарбамат натрия, $10^{-4}$ М	18
$K_3FeCN_6$ , $5 \cdot 10^{-5}$ М	21
Рибофлавин, $4 \cdot 10^{-6}$ М	31

Проведенные исследования [18] гемолиза эритроцитов 400-кратно очищенными (по удельной активности) образцами стрептолизина О штамма Н46А показали подавление цитолитического действия токсина всеми использованными перехватчиками активных форм кислорода, включая стрептокиназу, а также комплексонами и оксидоредуктантами (табл. 2).

Это позволяет считать, что действие стрептолизина О на клетки имеет сложную природу, зависящую от металлов переменной валентности и состояния окислительно-восстановительных процессов, включая генерирование и трансформацию активных форм кислорода. Однако, в целом, механизмы биологического действия стрептолизина О являются интересной проблемой, требующих глубоких и многоплановых исследований.

**Дифтерийный токсин.** Один из основных факторов патогенности *Corynebacterium diphtheriae*. Белок молекулярной массой 59—60 кДа, лишенный небелковых компонентов, включает 535 аминокислотных остатков. Зрелый дифтерийный токсин — гетеродимер, состоящий из соединенных S—S и нековалентными связями субъединиц 21—24 кДа и 34—38 кДа. В структуре токсина выделяют 3 домена. Данные литературы об особенностях структуры и токсического действия токсина обобщены в предыдущей статье [25]. Значение белка для продуцента остается неясным.

Основная гипотеза токсического действия, принятая в литературе, состоит в подавлении синтеза белков вследствие ADP-рибозилирования фактора элонгации EF-2, что приводит к гибели клетки. Между тем, для гибели последней достаточно проникновения нескольких и даже одной молекулы токсина. Эта гипотеза не согласуется с рядом экспериментальных данных и результатами расчетов ингибиторного эффекта токсина на белок-синтезирующий аппарат клетки [25]. Обнаружение у указанного белка собственной ДНК-азной активности послужило основой альтернативной гипотезы — запуска апоптоза в клетке [38].

Одним из интересных свойств токсина, пока еще недостаточно изученных, является необъяснимая устойчивость к действию протеиназ. Казалось бы, существование широкого арсенала внутриклеточных протеолитических энзимов различного типа и субстратной специфичности должно обеспечивать расщепление такого чужеродного белка. Однако этого не происходит. Частично эта особенность дифтерийного токсина объясняется связыванием им нуклеотидов [например, 56]. С другой стороны, в литературе фактически нет данных о влиянии этого белка на активность протеиназ.

Методом лизиса фибриновых пластин нами изучен эффект очищенных [26] образцов дифтерийного токсина штамма PW-8 на активность отдельных сериновых протеиназ (трипсина,  $\alpha$ -химотрипсина, субтилизина), цистеиновой (папаина) и аспартильной (пепсина) [25]. Токсин подавляет активность химотрипсина и папаина на 45 и 36% соответственно (рис. 1). Следовательно, он способен действовать как ингибитор протеолиза. В то же время токсин оказал весьма необычное действие на активность трипсина «Srofa». Возможно, увеличение его протеолитической активности обусловлено устранением ингибирующего действия примесей. Полученные образцы дифтерийного токсина не обладали ни собственной протеолитической активностью, ни плазминогенактиваторной способностью в отношении прочно сорбированного на фибрине плазминогена. Вместе с тем, на образцах растворимого плазминогена

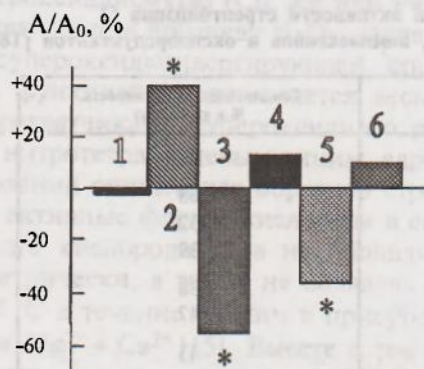


Рис. 1. Влияние дифтерийного токсина на фибринолитическую активность протеиназ (% к контролю): 1 — трипсин, Calbiochem; 2 — трипсин, Srofa; 3 — α-химотрипсин; 4 — субтилизин; 5 — папаин, Fluka; 6 — пепсин, Sigma ( $n = 5$ ; метод лизиса фибриновых пластин [50], 0.06 М фосфатный буфер pH 7.4; 0.2 М ацетатный буфер pH 5.9 — для папаина или pH 1.45 — для пепсина; концентрация токсина в пробе — 2.5 мг/мл, протеиназ — 0.5 мг/мл; \* — изменения, достоверные при  $P < 0.05$ ) [21, 25]

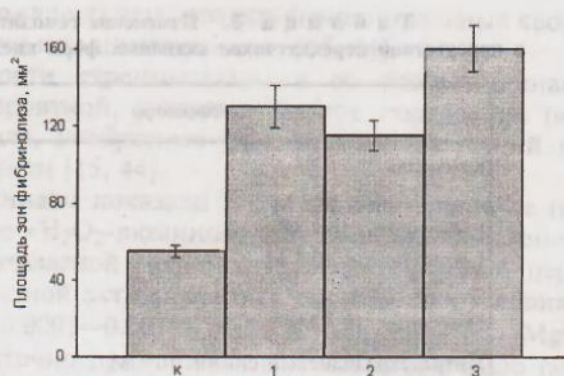


Рис. 2. Изменения активации ( $\text{мм}^2$  зон лизиса фибрина) растворимого плазминогена человека очищенным дифтерийным токсином (1) при добавках 0.001M NADH (2) или ADP (3) ( $n = 5$ ; пластины человеческого фибрина приготовлены на 0.15 М растворе NaCl pH 7.0; инкубация при 25 °C в течение 96 часов; концентрация плазминогена — 300 мкг/мл, токсина — 38 мкг/мл; растворитель 0.06 М фосфатный буфер pH 7.4) [21]

зафиксирована медленная трансформация его в активную протеиназу (рис. 2). Этот процесс заметно усиливался в присутствии ADP. Кроме того, установлено подавление эффекта ADP NADHом, что, учитывая известные данные о наличии ADP- и NAD-связывающих сайтов в молекуле дифтерийного токсина, позволяет думать о конкуренции данных нуклеотидов за соответствующий центр связывания.

Эти факты наводят на мысль о возможности активации токсином зимогенов и других протеиназ, в частности трипсиногена. В таком случае описанный выше эффект для образцов трипсина «Srofa» вполне логичен, если допустить наличие в нем части непроактивированного зимогена.

В тесте окисления адреналина нами была установлена генерация дифтерийным токсином адренохрома с весьма низкой скоростью [25]. Это может свидетельствовать об образовании супероксидного радикала. Проведенные расчеты показали, что в пересчете на 1 М токсина скорость образования не превышает  $0.07 \text{ M мин}^{-1}$ , что принципиально не отличается от супероксид-генерирующей способности плазминогена человека:  $0.12 \text{ M мин}^{-1}$  [44]. В этом плане заслуживает особого внимания сообщение о том, что токсин сильно активизирует генерирование  $\text{O}_2^-$  гранулоцитами, причем, человеческие клетки и клетки грызунов имеют сходную чувствительность [43].

Попытки выявить супероксидконвергирующую способность у дифтерийного токсина в системе NADH-феназинметосульфат (как подробно описано нами ранее [30, 31]) показали, что токсин способен резко ускорять восстановление нитротетразолиевого синего (NBT) в этой радикалгенерирующей системе (рис. 3). Данное свойство токсина зависит от нескольких условий. Увеличение концентрации NADH в системе, сопряженное, вполне естественно, с нарастанием концентрации активных форм кислорода, может вызывать окислительную модификацию белка. Поэтому при концентрации NADH  $10^{-5}$  М токсин, как правило, слабее активировал восстановление NBT, чем при меньшей концентрации NADH. Ускорение редукции NBT, катализируемое дифтерийным токсином, значительно демонстративнее в присутствии ионов фосфата в растворе. Замена фосфатного буфера трис-HCl (или пирофосфатным, не показано) препятствовала проявлению указанного свойства токсина. Более того, при pH 8.5 такая замена растворителя сопровождалась небольшим (до 30%) угнетением восстановления NBT в присутствии данного протеина (рис. 3). Пока нет абсолютно никаких фактов, раскрывающих эту особенность поведения белка токсина в присутствии неорганического фосфата. Оно выражается и в своеобразной pH-зависимости активации дифтерийным токсином восстановления NBT.

Итак, молекула дифтерийного токсина обладает не только ADP-рибозилтрансферезной активностью, но и эндонуклеазной. Протеин ингибирует активность отдельных протеиназ, в то же время обладая способностью медленной активации некоторых зимогенов, генерирования супероксидного радикала. В последнем процессе выражена триггерная функция токсиче-

ского белка в зависимости от pH и ионного состава растворителя. Эти факты позволяют, во-первых, по-новому взглянуть на механизмы токсического действия протеина на клетки мишени. Во-вторых, вне сомнения, данный протеин — мощный регулятор клеточных метаболических и функциональных процессов. Попытки использовать свойства дифтерийного токсина как регулятора пока прослеживаются лишь в создании противоопухолевых конъюгатов с системами направленного транспорта [например, 53].

**Плазминоген.** Плазминоген — зимоген сериновой протеиназы химотрипсинового семейства — плазмина (ЕС 3.4.21.7). Он является одноцепочечным (790 остатков) гликопротеином (обнаружены гексозы, гексозамины, сиаловые кислоты) молекулярной массой 75—93 кДа. В молекуле плазминогена 7 доменов, она включает 5 кринглов с лизин-связывающими сайтами (1 из них высокоаффинный, 4 — низкоаффинные), а также р-аминобензамидинсвязывающий сайт [15]. Потенциальный каталитически функционирующий центр имеет молекула так называемого миниплазминогена (Val<sub>442</sub> — Asp<sub>790</sub>, т. е. ~ 349 остатков) [49]. Традиционно плазминоген рассматривают лишь как предшественник плазмина.

Проведенные нами исследования очищенных методом аффинной хроматографии образцов Lys — плазминогена человека (85 кДа) показали способность зимогена генерировать активные формы кислорода при разложении H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и восстановлении молекулярного кислорода [44]. Оказалось также, что он может осуществлять конверсию супероксидного радикала в модельной системе генерирования (табл. 3). Эта способность с учетом молекулярной массы белка приблизительно в 6 раз уступает таковой стрептокиназы. Однако она, как нам представляется, при генерировании зимогеном O<sub>2</sub><sup>-</sup> — в значительной мере объясняет причины его аутоактивации в отсутствие каких-либо белков активаторов.

Таблица 3. Влияние стрептокиназы или плазминогена человека на восстановление нитротетразолиевого синего в системе NADH-феназинметосульфат (n = 4; 0.06 М фосфатный буфер pH 7.4; NADH — 234 мкМ; феназинметосульфат — 8 мкМ; нитротетразолиевый синий — 87 мкМ; атмосфера воздуха, 25 °С) [33]

Условия эксперимента	ΔE <sub>560</sub>	% к контролю
Без добавок (контроль)	0.475±0.021	100
+ стрептокиназа, 50 мг	0.240±0.014*	50
+ плазминоген, 200 мкг	0.400±0.009*	84
500 мкг	0.267±0.009*	54

По-видимому, существует сродство зимогена с пуриновыми и пиримидиновыми нуклеотидами. Так, присутствие пуриновых нуклеотидов частично защищает сорбированный на фибрине плазминоген от УФ-инактивации. Эффективны следующие нуклеотиды AMP>3',5'-AMP>ADP>GDP, тогда как CTP, ATP, 2',3'-AMP, GTP, ATetrP защитным действием не обладали [34]. Природа этого феномена остается пока неизученной.

Регуляторные свойства плазминогена предопределяются уже фактором наличия специфических рецепторов на мембранах ряда клеток [например, 54]. Более того, полученные коллективом японских исследователей [40] и независимо — в нашей лаборатории данные свидетельствуют о выраженном регуляторном действии зимогена на клетки нервной ткани. Показано, что плазминоген может синтезироваться непосредственно в мозгу клетками микроглии [40]. Клетки нервной ткани имеют низко и высокоаффинные сайты связывания плазминогена. Последний является промотором развития мезенцефальных дофаминэргических нейронов, нейронов гиппокампа и коры мозга [40].

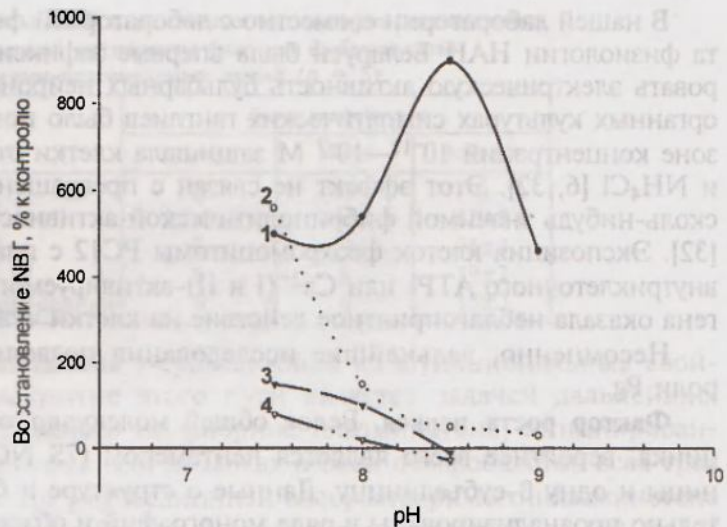


Рис. 3. Влияние дифтерийного токсина на изменения восстановления нитротетразолиевого синего в системе NADH-феназинметосульфат при различном pH (1, 2 — 0.06 М фосфатный буфер; 3, 4 — 0.05 М трис-НСl буфер; [NADH] — 5·10<sup>-5</sup> М — 1, 3 или 10<sup>-4</sup> М — 2, 4; [феназинметосульфат] — 3.0·10<sup>-5</sup> М; время инкубации 1 мин, объем реакционной смеси — 3 мл; атмосфера воздуха, 25 °С) [21, 25]

В нашей лаборатории совместно с лабораторией физиологии ствола головного мозга Института физиологии НАН Беларуси была впервые зафиксирована способность плазминогена модулировать электрическую активность бульбарных нейронов [10]. На первично диссоциированных и органных культурах симпатических ганглиев было показано, что добавка плазминогена в диапазоне концентраций  $10^{-11}$ — $10^{-7}$  М защищала клетки от повреждающего действия  $H_2O_2$ , глутамата и  $NH_4Cl$  [6, 32]. Этот эффект не связан с превращением зимогена в активную протеиназу, ибо сколь-нибудь значимой фибринолитической активности культуральной жидкости не обнаружено [32]. Экспозиция клеток феохромоцитомы PC12 с плазминогеном вела к существенным сдвигам внутриклеточного АТФ- или  $Ca^{2+}$  (I и II)-активируемого протеолиза. Вместе с тем добавка зимогена оказала неблагоприятное действие на клетки чувствительных спинальных ганглиев [3, 32].

Несомненно, дальнейшие исследования позволят выявить другие аспекты регуляторной роли Pg.

**Фактор роста нервов.** Белок общей молекулярной массы 131 кДа, содержащий 1—2 атома цинка, вероятнее всего является пентамером (7S NGF), включающим по две  $\alpha$ - и  $\gamma$ -субъединицы и одну  $\beta$ -субъединицу. Данные о структуре и биологических свойствах протеина обстоятельно проанализированы в ряде монографий и обзорных статей [7, 8, 48]. Фактор роста нервов (NGF) считают ответственным за дифференцировку и пролиферацию адренергических симпатических и сенсорных нейронов периферической нервной системы, холинергических нейронов базальных ядер переднего мозга, регенерацию нервов. Установлено участие его в симпатической передаче возбуждения,  $Ca^{2+}$ -зависимой стимуляции выхода ацетилхолина, дифференцировку, пролиферацию и биосинтетические свойства клеток иммунной системы [1, 7—9].

Несмотря на многолетние исследования свойств молекулы NGF, 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  $\gamma$ -субъединицы плазминогенактиваторной способности [например, 7]. Вместе с тем, считалось, что остальные субъединицы ( $\beta$ - и  $\alpha$ -) лишены подобных свойств.

Проведенные нами исследования образцов NGF и его субъединиц высокой степени чистоты (по данным электрофореза и изоэлектрофокусирования) показали наличие такой активности и у  $\beta$ -субъединицы (основного носителя нейроростовой активности). В отличие от истинных активаторов Pg, кинетика активации зимогена  $\gamma$ - и  $\beta$ -субъединицами характеризовалась весьма продолжительной lag-фазой. Плазминогенактиваторная способность  $\beta$ -субъединицы не превышала 42% таковой  $\gamma$ -субъединицы,  $\alpha$ -субъединица полностью лишена подобной способности. Группоспецифические ингибиторы протеиназ — р-хлормеркурибензоат, 8-оксихинолин и о-фенантролин умеренно угнетали активность лишь  $\beta$ -субъединицы: на 33% и на 22—25%. Перехватчик супероксидного радикала — NBT значительно уменьшал плазминогенактиваторную способность олигомера фактора и его субъединиц ( $\beta$ -субъединицы — полностью). Возможно, в плазминогенактиваторной функции NGF и его субъединиц участвует супероксидный радикал.

NGF, его  $\gamma$ -субъединица не расщепляют белки типа фибрина, гемоглобина, казеина. Вместе с тем, нами найден подходящий субстрат — белок с основными свойствами, эффективно расщепляемый при pH 7.4 не только  $\gamma$ -, но и  $\beta$ -субъединицей NGF [22, 27, 45].

Методом люминолзависимой хемилюминесценции на биохемилюминометре БХЛ-01 (МП «Универсал», Минск) показано, что в присутствии  $\gamma$ - и  $\beta$ -субъединиц (но не  $\alpha$ -) наблюдается резкая вспышка хемилюминесценции с последующим затуханием, свидетельствующим о разложении  $H_2O_2$  с образованием активных форм кислорода. В двух модельных системах генерирования супероксидного радикала установлено, что и олигомер и субъединицы подавляли редукцию нитротетразолиевого синего. При pH 7.6 7S NGF,  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -субъединицы ингибировали восстановление NBT в модельной системе генерирования супероксидного радикала на 40%, 60%, 28% и 41—52% соответственно [22].

Еще одной особенностью связи NGF с протеолитическими процессами явилось проявление протеолитической активности у перевиваемых культур лимфобластов человека (линии Jurkatt-tat, Molt-4, Molt-4/8) при обработке их  $\gamma$ -субъединицей фактора (табл. 4). В этих экспериментах лимфобласты различных линий культивировали на среде RPMI-1640 с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки, затем отделяли их от среды центрифугированием и промывали 0.06 М фосфатным буфером, содержащим 0.15 М хлорида натрия. Указанного эффекта не давали активаторы плазминогена, что наводит на мысль о независимости появляющейся протеолитической активности от возможных собственных резервов плазми-

Т а б л и ц а 4. Влияние  $\gamma$ -субъединицы NGF и различных активаторов плазминогена на проявление фибринолитической активности ( $\text{мм}^2$  зон фибринолиза) отмытыми лимфоцитами перевиваемых линий ( $n = 5$ )

Исследуемый белок	Линии лимфоцитов		
	Jurkat-tat	Molt-4	Molt-4/8
Контроль	0	0	0
+ $\gamma$ -субъединица NGF	526±25	38±4	62±7
+ стрептокиназа	0	0	25±3
+ урокиназа	0	0	19±2
+ тканевый активатор рг—Pg сердца свиньи	0	0	15±3

ногена в клетках. По-видимому, путь воздействия  $\gamma$ -субъединицы на функциональные свойства лимфоцитов совершенно иной, раскрытие этого пути является задачей дальнейших исследований. Активация прочно сорбированного на фибрине плазминогена, инициированная  $\gamma$ -субъединицей, практически не изменялась при добавках взвеси лимфоцитов всех трех указанных линий (не показано). Активация же  $\gamma$ -субъединицей водорастворимого плазминогена в присутствии лимфоцитов Molt-4/8 составила  $55 \pm 3 \text{ мм}^2$ , в отсутствие клеток была  $100 \pm 6 \text{ мм}^2$  (контроль): она подавлялась более, чем на 40%. Сходную картину наблюдали и в экспериментах с лимфоцитами остальных линий. Причины подобных различий по влиянию лимфоцитов на активацию двух форм зимогена требуют проведения углубленного изучения.

Методом лизиса ДНК селезенки или тРНК дрожжей в тонком агаровом слое с последующей визуализацией зон лизиса обработкой 2 н  $\text{HClO}_4$  (как подробно описано ранее [12]) установлена эндонуклеазная активность при рН 7.4 по обоим субстратам у всех трех субъединиц [28]. Обе эндонуклеазные активности  $\beta$ -субъединицы проявлялись при более низких ее концентрациях, чем других субъединиц (рис. 4). Однако эта зависимость у  $\beta$ -субъединицы в обоих случаях имела вид кривой с насыщением, тогда как активность  $\alpha$ - и  $\gamma$ -субъединиц в широком диапазоне концентраций изменялась практически линейно.

Исследования действия традиционных эффекторов эндонуклеаз — ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ , а также ЭДТА, цитрата, арсенита, L-лизина, L-гистидина и L-аргинина в конечной концентрации  $10^{-3}$  М показало, что ДНК-азную активность  $\alpha$ -субъединицы все эффекторы подавляли на 50—65% (рис. 5). ДНК-азная активность  $\beta$ -субъединицы повышалась при добавках цитрата, ЭДТА, арсенита или ионов  $\text{Cu}$ . Эта же активность  $\gamma$ -субъединицы почти всеми эффекторами подавлялась на 20—40% (кроме ионов  $\text{Ca}$ ,  $\text{Co}$ , аргинина), а ионами  $\text{Cu}$  стимулировалась.

РНК-азная активность  $\alpha$ -субъединицы лишь при добавке арсенита или лизина возрастала на 30—40%,  $\beta$ -субъединицы была мало чувствительна к эффекторам (лишь ЭДТА несколько

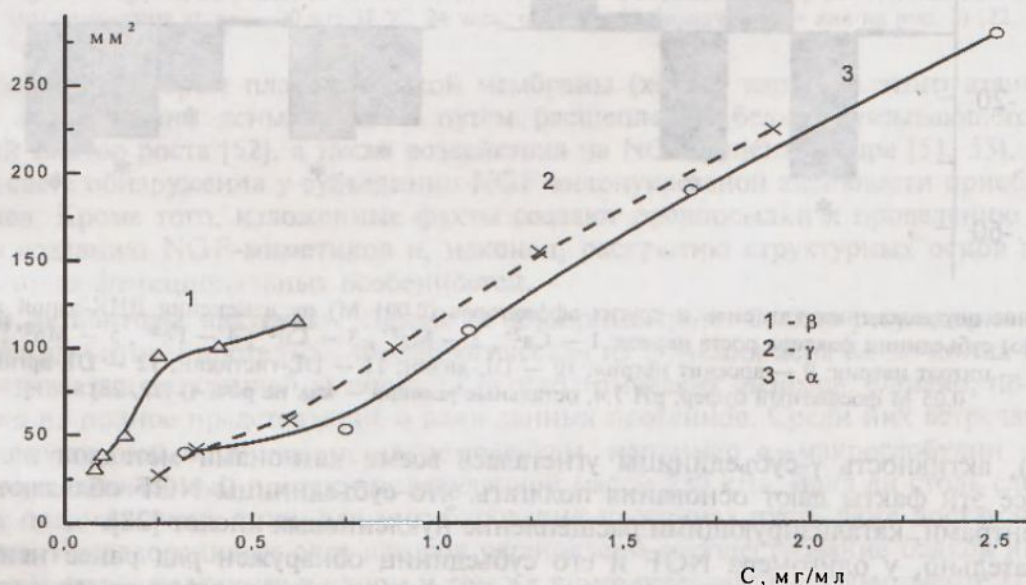


Рис. 4. Зависимость ДНК-азной активности ( $\text{мм}^2$  зон лизиса ДНК) субъединиц фактора роста нервов от их концентрации ( $n = 5$ ; 0.05 М трис-НСI буфер рН 7.6; пластина агара 1.5%, содержащая 20 мг ДНК селезенки; 37 °С, 24 часа) [22, 28]



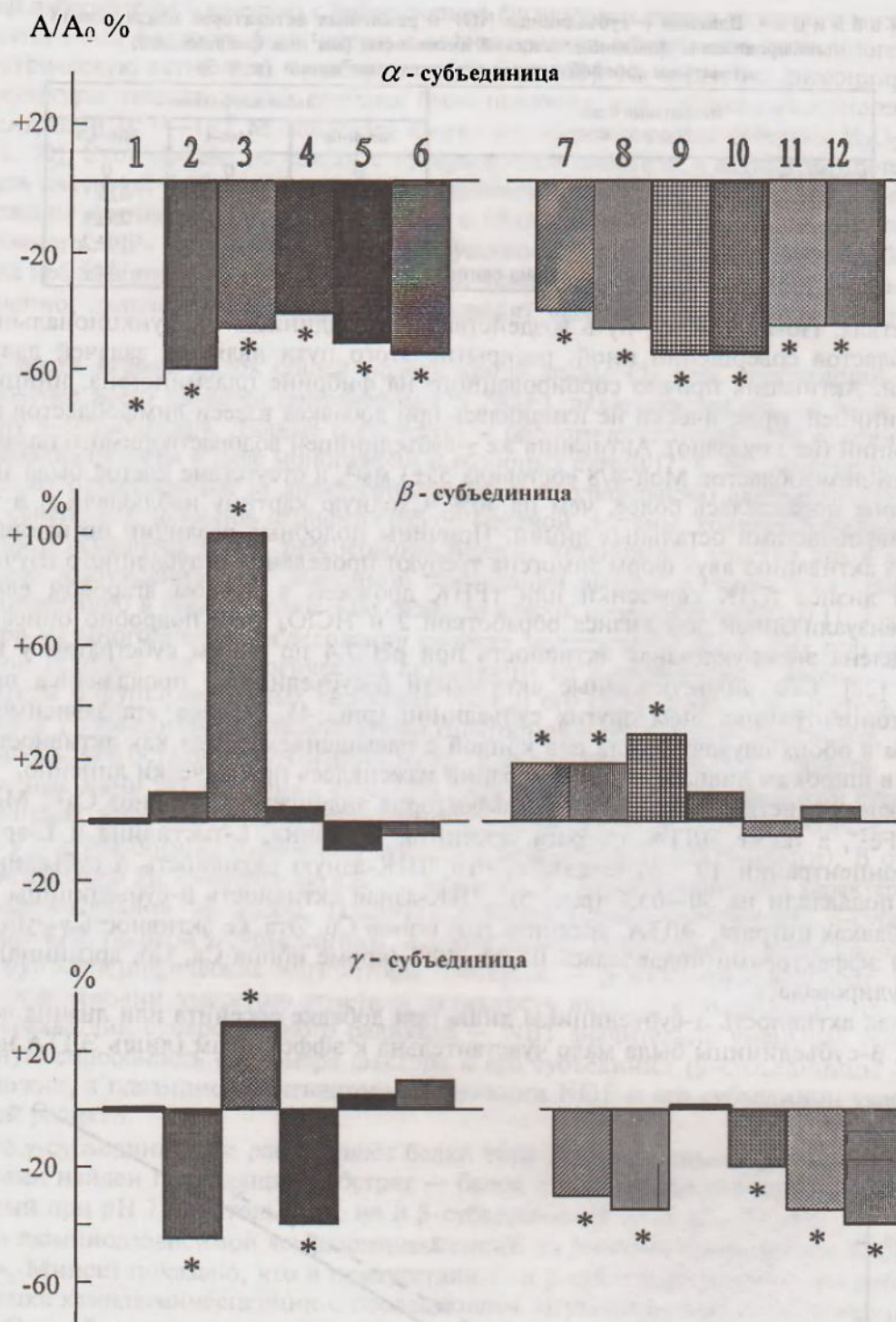


Рис. 5. Влияние двухвалентных катионов и других эффекторов (0.001 M) на изменения ДНК-азной активности (% к контролю) субъединиц фактора роста нервов: 1 — Ca<sup>2+</sup>; 2 — Mg<sup>2+</sup>; 3 — Cu<sup>2+</sup>; 4 — Fe<sup>2+</sup>; 5 — Mn<sup>2+</sup>; 6 — Co<sup>2+</sup>; 7 — ЭДТА; 8 — цитрат натрия; 9 — арсенит натрия; 10 — DL-лизин; 11 — DL-гистидин; 12 — DL-аргинин (n = 4; 0.05 M фосфатный буфер, pH 7.4, остальные условия — как на рис. 4) [22, 28]

угнетал ее), активность  $\gamma$ -субъединицы угнеталась всеми катионами металлов на 20—45% (рис. 6). Все эти факты дают основания полагать, что субъединицы NGF обладают независимыми центрами, катализирующими расщепление нуклеиновых кислот [28].

Следовательно, у олигомера NGF и его субъединиц обнаружен 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. Ранее в литературе высказывались суждения относительно более сложного механизма действия NGF на клетку-мишень: не только путем взаимодействия со спе-

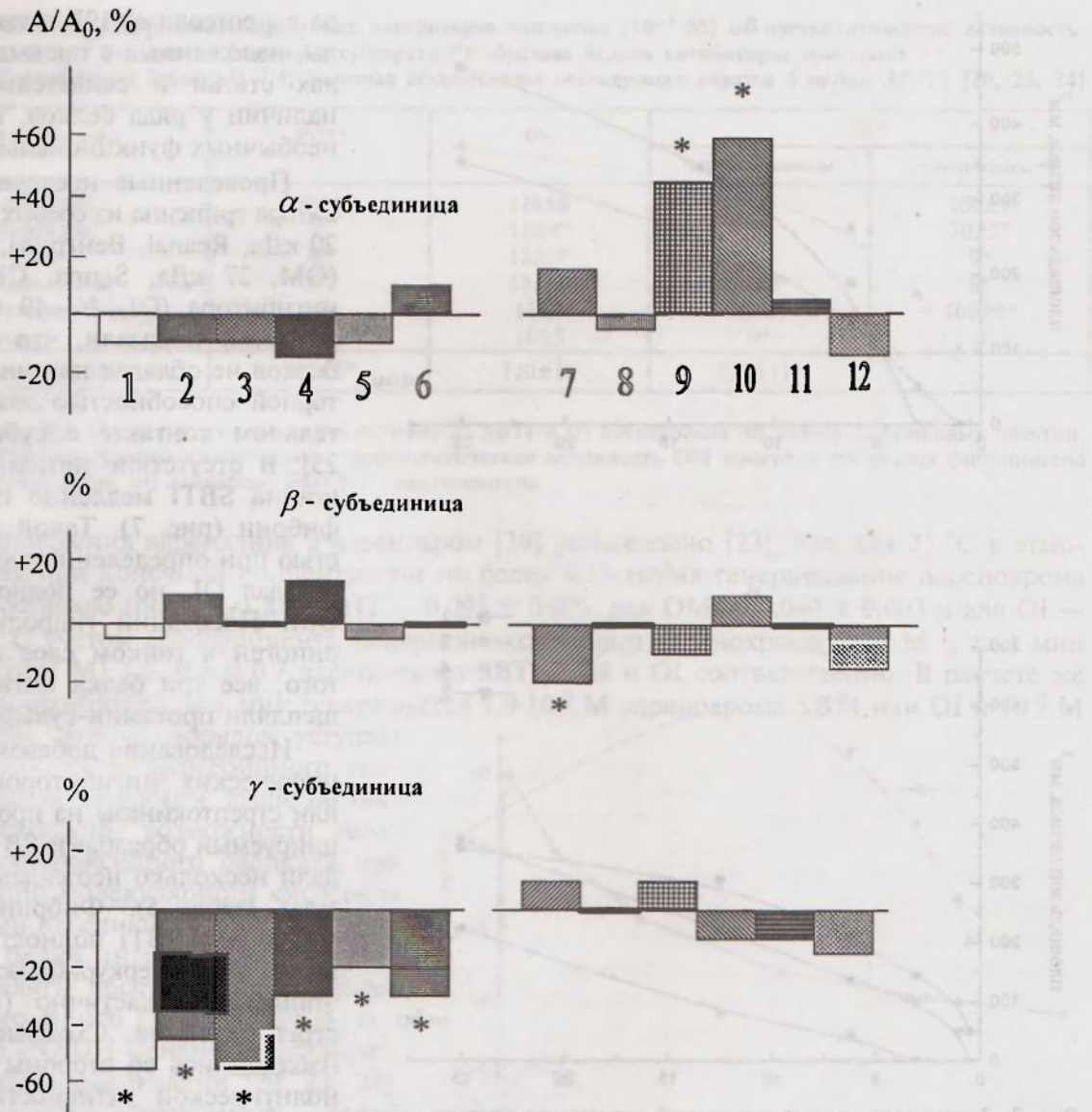


Рис. 6. Изменения РНК-азной активности (% к контролю) субъединиц фактора роста нервов при добавках двухвалентных катионов и других эффекторов (0.001 М) (n = 4; 0.06 М фосфатный буфер pH 7.4; содержание РНК дрожжей в пластине агара — 30 мг; 37 °С, 24 часа; остальные обозначения — как на рис. 5) [22, 28]

цифическим рецептором плазматической мембраны (хотя и характер этого взаимодействия остается недостаточно ясным), но и путем расщепления белка, связывающего инсулин-подобный фактор роста [52], а также воздействия на NGF-рецептор ядра [51, 55]. Последний аспект в свете обнаружения у субъединиц NGF эндонуклеазной активности приобретает 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.

**Белки ингибиторы протеиназ.** Одной из обширных групп белков регуляторного действия являются ингибиторы протеиназ. Физиологическая их функция ясна не до конца [13]. Обычно ее связывают с регуляцией активности протеолитических энзимов. Однако, по-видимому, это далеко не полное представление о роли данных протеинов. Среди них встречаются сложные по структурной организации макромолекулы, например  $\alpha_2$ -макроглобулин — субъединичный мультидоменный протеин молекулярной массы 730 кДа. Вряд ли столь сложная конструкция предназначена лишь для ингибирования протеиназ пусть даже достаточно обширного круга. Исследованиями ряда авторов установлено сосуществование белков ингибиторов протеиназ и самих протеиназ в одном и том же внутриклеточном компартменте [14], что еще более усложняет ситуацию. Стимулом к проведению наших исследований послужила авторская концепция кислородзависимого протеолиза, усматривающая участие собственных эндогенных для комплекса «протеиназа-белок субстрат» или зимогена активных форм кислоро-

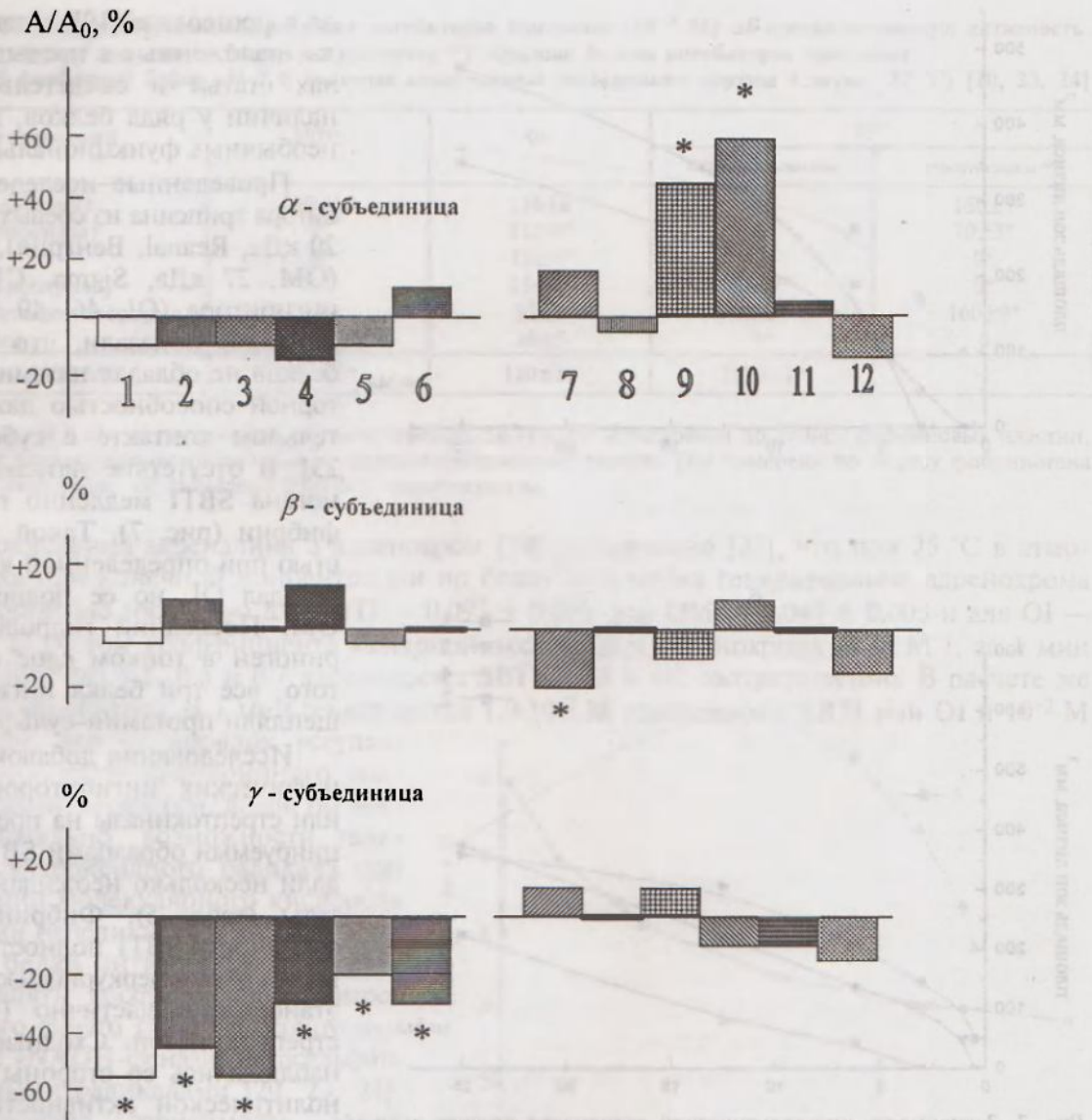


Рис. 6. Изменения РНК-азной активности (% к контролю) субъединиц фактора роста нервов при добавках двухвалентных катионов и других эффикторов (0.001 M) (n = 4; 0.06 M фосфатный буфер pH 7.4; содержание РНК дрожжей в пластине агара — 30 мг; 37 °С, 24 часа; остальные обозначения — как на рис. 5) [22, 28]

цифическим рецептором плазматической мембраны (хотя и характер этого взаимодействия остается недостаточно ясным), но и путем расщепления белка, связывающего инсулин-подобный фактор роста [52], а также воздействия на NGF-рецептор ядра [51, 55]. Последний аспект в свете обнаружения у субъединиц NGF эндонуклеазной активности приобретает 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.

**Белки ингибиторы протеиназ.** Одной из обширных групп белков регуляторного действия являются ингибиторы протеиназ. Физиологическая их функция ясна не до конца [13]. Обычно ее связывают с регуляцией активности протеолитических энзимов. Однако, по-видимому, это далеко не полное представление о роли данных протеинов. Среди них встречаются сложные по структурной организации макромолекулы, например  $\alpha_2$ -макроглобулин — субъединичный мультидоменный протеин молекулярной массы 730 кДа. Вряд ли столь сложная конструкция предназначена лишь для ингибирования протеиназ пусть даже достаточно обширного круга. Исследованиями ряда авторов установлено сосуществование белков ингибиторов протеиназ и самих протеиназ в одном и том же внутриклеточном компартменте [14], что еще более усложняет ситуацию. Стимулом к проведению наших исследований послужила авторская концепция кислородзависимого протеолиза, усматривающая участие собственных эндогенных для комплекса «протеиназа-белок субстрат» или зимогена активных форм кислоро-

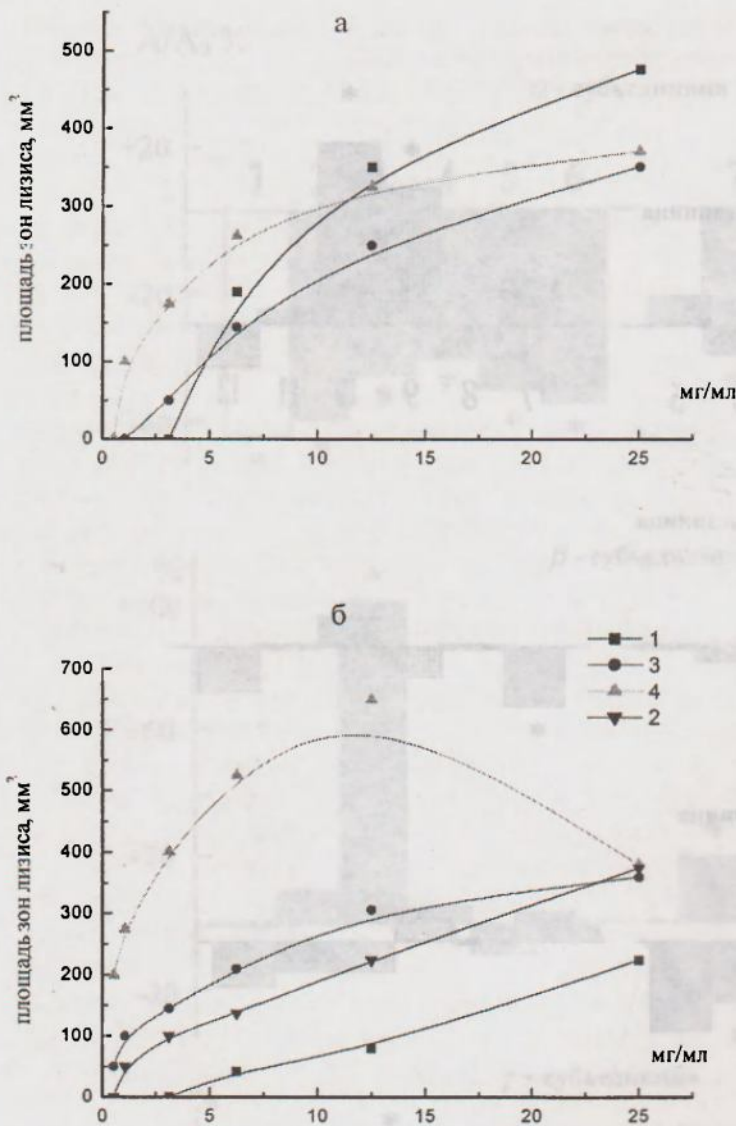


Рис. 7. Зависимость протеолитической активности соевого ингибитора трипсина (1), овоингибитора (2) или овомукоида (4) (мм<sup>2</sup> зон лизиса фибрина — а или протаминасульфата — б) от концентрации ингибиторов (n = 4; 0.06 М фосфатный буфер pH 7.4) 3 — овоингибитор + стрептокиназа (5000 ME) [23, 24]

им субстратам резко возрастала в присутствии стрептокиназы, а также при добавках этанола (рис. 7, табл. 5). Этанол-индуцированная фибринолитическая активность нечувствительна к фенолметилсульфонилфториду, но полностью подавлялась о-фенантролином. Индуцированная же стрептокиназой активность угнеталась при добавках р-хлормеркурибензоата, ЭДТА, этанола. Однако протеолиз, инактивированный при добавках последнего, полностью восстанавливался в присутствии фенолметилсульфонилфторида. Более того, индуцируемая добавкой стрептокиназы протеолитическая активность ОI не расщепляла хромогенный субстрат S—2251 (H-D-Val-Leu-Lys-pNa) специфичный для плазмина [23]. Совокупность этих фактов позволяет предположить, что образцы ОI имеют латентную этанол- или стрептокиназоиндуцируемую протеиназу, не относящуюся к плазмин(оген)у. В целом, вопрос о присутствии протеолитической активности в образцах исследованных белков ингибиторов нуждается в дальнейшем изучении. Следует отметить, например, белок ингибитор активаторов плазминогена (сериновых протеиназ) — нексин сам является протеиназой [41].

Методом биохемилюминесценции в системе «H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-люминол» установлено, что в нейтральном водно-солевом растворе белки ингибиторы протеиназ разлагали H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> с образованием активных форм кислорода [20, 23]. Кинетика хемилюминесценции во всех случаях представляла разной интенсивности вспышку с последующим достаточно медленным затуханием (рис. 8). По интенсивности вспышки белки можно расположить в следующий ряд: SBTI >> OI > OM. Пероксидазоподобная активность последнего не превышала 7% таковой SBTI.

да в протеолизе [19], а также материалы, изложенные в предыдущих разделах статьи и свидетельствующие о наличии у ряда белков, казалось бы, необычных функциональных свойств.

Проведенные исследования ингибитора трипсина из соевых бобов (SBTI, 20 кДа, Reanal, Венгрия), овомукоида (OM, 27 кДа, Sigma, США) и овоингибитора (OI, 46—49 кДа, Reanal, Венгрия) показали, что ни один из белков не обладал плазминогенактиваторной способностью даже при длительном контакте с субстратом [20, 23]. В отсутствие нативного плазминогена SBTI медленно гидролизировал фибрин (рис. 7). Такой же активностью при определенной концентрации обладал OI, но ее полностью лишен OM. Последний гидролизовал фибриноген в тонком слое агара. Более того, все три белка ингибитора расщепляли протамина-сульфат (рис. 7).

Исследования добавок группоспецифических ингибиторов протеиназ или стрептокиназы на протеолиз, инициируемый образцами SBTI, OI и OM дали несколько неожиданные результаты (табл. 5). Фибринолитическая активность SBTI полностью блокировалась р-хлормеркурибензоатом, ЭДТА, этанолом и частично (на 44%) — стрептокиназой. Сходные изменения наблюдались со стороны фибриногенолитической активности OM. При этом ингибирование было неполным, а влияние стрептокиназы отсутствовало. В отличие от SBTI и OM, протеолитическая активность OI по обо-

Т а б л и ц а 5. Влияние группоспецифических ингибиторов протеиназ ( $10^{-3}$  М) на протеолитическую активность (в мм<sup>2</sup> зон лизиса белкового субстрата <sup>а)</sup>) образцов белков ингибиторов протеиназ

■ = 4; 0.06 М фосфатный буфер рН 7.4; конечная концентрация исследуемого образца 5 мг/мл; 37 °С) [20, 23, 24]

Вещества эксперимента	SBTI <sup>а)</sup>	ОМ	ОI <sup>а)</sup>	
			без стрептокиназы	+ стрептокиназа <sup>аа)</sup>
Контроль (без добавок)	189±10	126±6	0	150±7
- хлормеркурибензоат	0*	11±4*	0	70±3*
- ЭДТА	0*	13±5*	0	0*
- этанол. 25% (контроль)	0*	15±3*	91±7*	0*
- метилсульфонилфторид	0	12±5	89±4	160±9*
- фенилтретонин	0	16±5	0*	0
- стрептокиназа, 5000 ME	106±5*	120±10	319±11*	-

Примечания: а) протеолитическая активность SBTI и ОI исследована по лизису фибриновых пластин, не содержащих активируемого плазминогена, протеолитическая активность ОМ измерена по лизису фибриногена 5.5 мг/мл в 1% геле агара; аа) добавлено 2000 ME стрептокиназы.

В тесте окисления адреналина в адренохром [39] установлено [23], что при 25 °С в атмосфере воздуха при конечной концентрации по белку 0.17 мг/мл генерирование адренохрома за 2.5 часа составило (по  $\Delta E_{480}$ ) для SBTI —  $0.095 \pm 0.005$ , для ОМ —  $0.040 \pm 0.003$  и для ОI —  $0.045 \pm 0.003$ . С учетом коэффициента молярной экстинкции адренохрома  $4020 \text{ M}^{-1}$ , за 1 мин образуется ( $10^{-7}$  М) 1.6, 0.6 и 0.7 адренохрома SBTI, ОМ и ОI соответственно. В расчете же на 1М белка ингибитора за 1 мин генерируется  $1.9 \cdot 10^{-2}$  М адренохрома SBTI или ОI и  $10^{-2}$  М ОМ. В целом, это на порядок уступает таковой способности дифтерийного токсина или плазминогена (см. выше по тексту). Следовательно, возможности генерирования супероксидного радикала при восстановлении молекулярного кислорода ингибиторами невелики.

Все три белка ингибитора способны также подавлять восстановление нитротетразолиевого синего (NBT) генерируемыми в системе «NADH-феназинметосульфат» с пероксидными радикалами [20, 23, 24]. Концентрационная зависимость такой СОД-подобной активности имеет сложный характер (рис. 9). Причем, SBTI обладал весьма слабой способностью, практически не достигая 50% ингибирования процесса. Заметную супероксидконвергирующую функцию проявляли лишь ОМ и ОI. Однако для достижения 50% ингибирования восстановления NBT в сравнении со стрептокиназой (см. табл. 3) требовалась концентрация белка практически на 3 порядка более высокая. Это свидетельствует об относительно слабой супероксидконвергирующей функции белков ингибиторов протеиназ, что, однако, еще не означает «бесполезность» подобного свойства. Напомним, что оно проявлялось в конкретных условиях в модельной системе определенного состава.

Наконец, методом лизиса в тонком слое агара установлена ДНК-азная и РНК-азная активности всех трех белков ингибиторов протеиназ [20, 23, 24]. В принципе, различия эндонуклеазной ак-

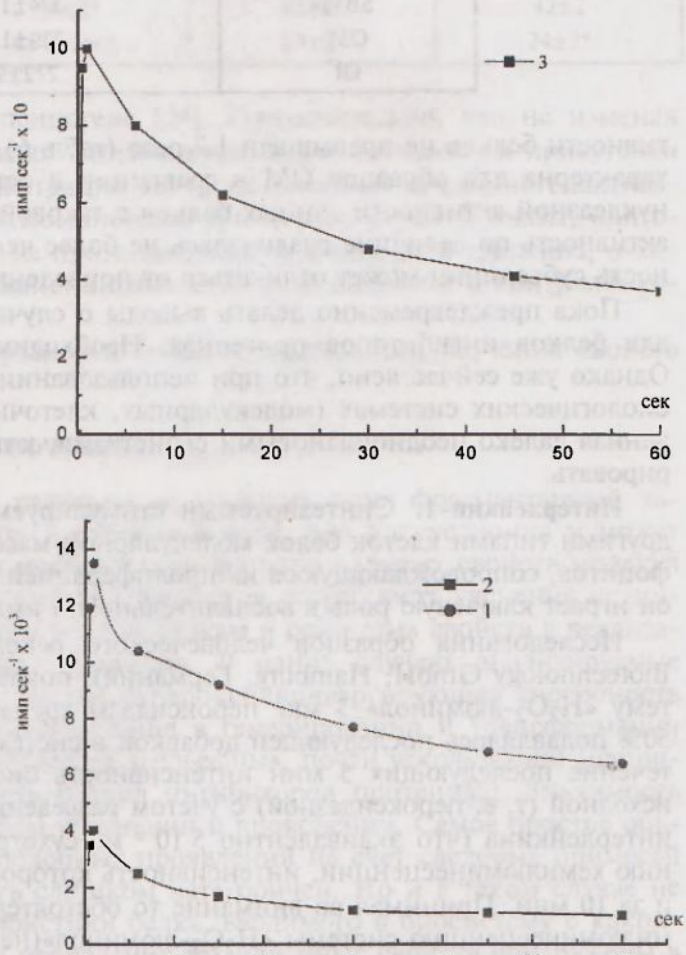


Рис. 8. Кинетика затухания хемилюминесценции в системе «H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-люминол», инициированной добавками соевого ингибитора трипсина (1), овоингибитора (2) или овомукоида (3). Состав инкубационной смеси: 0.2 мл раствора люминола  $6.6 \cdot 10^{-4}$  М; 0.1 мл раствора H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,  $3 \cdot 10^{-3}$  М; 3.0 мл 0.06 М фосфатного буфера рН 7.4, 0.1 мл раствора ингибитора, содержащего 0.5 мг белка; 25 °С [21,23]

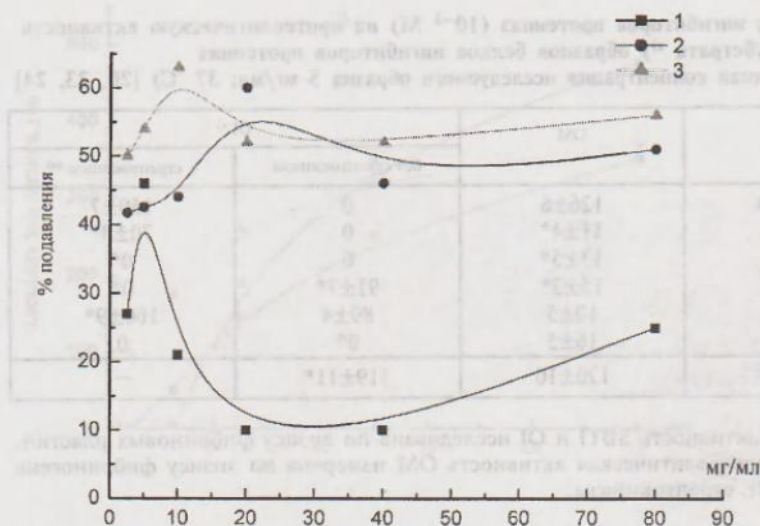


Рис. 9. Влияние концентрации соевого ингибитора трипсина (1), омовукоида (2) или овоингибитора (3) на подавление восстановления нитротетразолиевого синего в системе NADH-феназинметосульфат. Состав инкубационной смеси: 3.0 мл 0.06 М фосфатного буфера pH 8.3; NADH — 234 мкМ; феназинметосульфат — 8 мкМ; нитротетразолиевый синий — 87 мкМ; время инкубации 1 мин; 25 °С, атмосфера воздуха; n = 4 [20, 22–24]

Т а б л и ц а 6. Эндонуклеазная активность (мм<sup>2</sup> зон лизиса нуклеиновых кислот, 2 мг/мл в 1% геле агаре) образцов белков ингибиторов протеиназ (n=5; 0.05 М фосфатный буфер pH 7.4) [20, 23, 24]

Исследуемый белок, 0.5 мг/мл	РНК-азная активность	ДНК-азная активность
SBTI	374±11	144±8
OM	220±11	100±7
OI	272±9	156±10

тивности белков не превышали 1.7 раза (табл. 6). Тем не менее, меньшая активность нуклеаз характерна для образцов OM в сравнении с остальными ингибиторами. Сопоставление же нуклеазной активности данных белков с таковой субъединиц NGF показало, что ДНК-азная активность по величине различалась не более чем в 4 раза (см. рис. 4). РНК-азная же активность субъединиц может отличаться от приведенной в таблице 6 на порядок (не показано).

Пока преждевременно делать выводы о случайности или значимости описанных свойств для белков ингибиторов протеиназ. Необходимы систематически глубокие исследования. Однако уже сейчас ясно, что при использовании подобных агентов в качестве эффекторов в биологических системах (молекулярных, клеточных и т. д.) вносится макромолекула, наделенная далеко неодноплановыми свойствами, которые, по нашему мнению, не следует игнорировать.

**Интерлейкин-1.** Синтезируемый стимулируемыми макрофагами и моноцитами, а также другими типами клеток белок молекулярной массой 17 кДа, вызывающий активацию Т-лимфоцитов, сопровождающуюся их пролиферацией и секрецией интерлейкина-2. Полагают, что он играет ключевую роль в воспалительном и иммунном ответе.

Исследования образцов человеческого рекомбинантного интерлейкина-1 (IL-1 $\beta$ , AMS Biotechnology GmbH, Hamburg, Германия), показали [24], что индуцируемая добавкой в систему «H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-люминол» 3 мкг пероксидазы хрена (Sigma, США) биохемилюминесценция на 50% подавлялась последующей добавкой в систему 80 мкг стрептокиназы (рис. 10). Однако в течение последующих 5 мин интенсивность биохемилюминесценции восстанавливалась до исходной (т. е. пероксидазной) с учетом разведения. В этих условиях внесение в систему 5 ед. интерлейкина (что эквивалентно 5·10<sup>-6</sup> мг сухого вещества) вело к почти полному подавлению хемилюминесценции, интенсивность которой не восстанавливалась до исходного уровня и за 10 мин. Принимая во внимание то обстоятельство, что IL-1 $\beta$  резко угнетал фоновую хемилюминесценцию системы «H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-люминол» (не показано), изложенные материалы наводят на мысль, что подавление хемилюминесценции может быть обусловлено трансформацией активных форм кислорода в метаболиты, не реагирующие с люминолом.

Ранее нами была описана возможность активации ряда зимогенов протеина при обработке их H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [19, 21]. Исследования показали, что добавка 25 ед. IL-1 $\beta$  подавляла на 36% «спонтанную» активацию лишь пепсиногена (табл. 7). При обработке же зимогенов H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> добавка цитокина не отражалась на активации трипсиногена, но умеренно (на 24%) угнетала

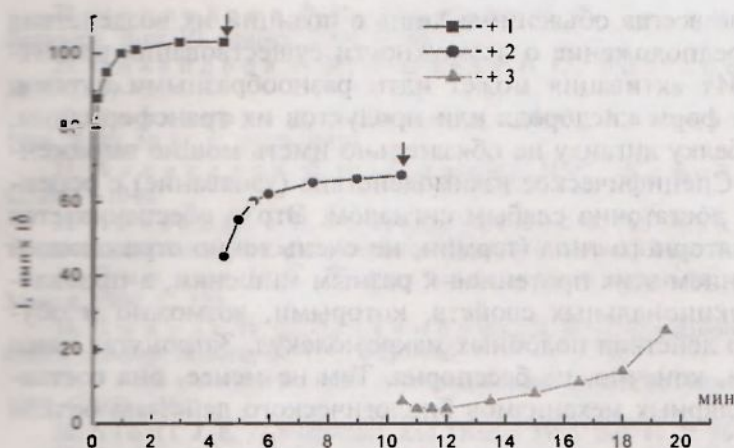


Рис. 10. Изменения хемилюминесценции в системе «H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-люминол», инициированной 3 мкг пероксидазы хрена, Sigma (1), после добавки 80 мкг стрептокиназы (2) или 5 ед IL-1β (3). Состав реакционной смеси и условия эксперимента как и на рис. 8 [24]

Таблица 7. Влияние IL-1β (25 ед.) на спонтанную и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-индуцированную фибринолитическую активность (зон лизиса фибринового геля) зимогенов протеиназ (n = 4; конечная концентрация зимогенов 1.7 мг/мл; конечная концентрация H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> — 4 М; 0.05 М фосфатный буфер pH 7.4 для трипсиногена или химотрипсиногена или 0.2 М ацетатный буфер pH 1.45 для пепсиногена) [24]

Варианты эксперимента	Трипсиноген	Химотрипсиноген А	Пепсиноген	Пепсин
Контроль (без добавок)	44±3	21±2	36±2	42±3
-IL-1β	36±3	18±3	23±1*	34±4
-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	70±4*	34±2*	43±2*	42±2
-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -IL-1β	80±4*	не исслед.	33±2*	24±2*

протеолитическую активность образцов пепсиногена [24]. Примечательно, что не изменяя активность нативного пепсина, IL-1β подавлял катализируемый им протеолиз в присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> почти вдвое. В использованной концентрации IL-1β не влиял на плазминогенактиваторную способность тканевого активатора плазминогена, урокиназы, стрептокиназы, олигомера NGF и его γ- и β-субъединиц, а также на протеолитическую активность трипсина, α-химотрипсина, субтилизина и папаина. Колебания активности по отношению к контролю составляли ± 2–8%.

Эти факты свидетельствуют о целесообразности более обстоятельного изучения свойств молекулы цитокина.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изложенная совокупность полученных результатов, носящих пока фрагментарный характер, имеет двойной смысл. Прежде всего, в известной мере, она дискуссионна и может служить отправной точкой систематических исследований функциональных свойств молекул белков регуляторного типа. Вместе с тем, логически диктуется потребность уяснения истинной принадлежности подобных свойств к конкретным белкам и роли этих свойств в реализации биологического действия регуляторных протеинов. В одних случаях анализируемые функциональные свойства ярко выражены: таковы супероксидконвергирующая способность стрептокиназы, триггерная роль дифтерийного токсина в генерировании и трансформации кислородных радикалов. В других случаях они менее «рельефны», почти ускользаючи (например, супероксидконвергирующая способность белков ингибиторов протеиназ). Значимость свойств этого второго рода нуждается в особом уточнении и прояснении. Самое простое объяснение может быть сведено к отнесению подобных проявлений на счет следовых примесей в образцах белков. На наш взгляд, этот путь слишком категоричен. Но и в таком случае не приходится игнорировать подобные характеристики белка, вводимого в биосистему с какой-либо целью. Важно также иметь в виду, что проявления тех или иных свойств обнаружены в модельных условиях, часто весьма далеких от имеющих *in situ*.

Взаимодействие белка регуляторного типа со специфическим рецептором рассматривают как цепь событий, начало которой считают чисто конформационными изменениями рецепторного участка при действии на него специфического лиганда. Однако уже к настоящему времени обнаружены протеиназо-активируемые рецепторы [37]. Еще в 80-е годы была выдвинута идея о существовании на мембранах клеток особого РНК-азного рецептора [11], ибо

биологические эффекты РНК-аз были не всегда объяснимы лишь с позиций их воздействия на РНК клетки. Позволим высказать предположение о возможности существования различных типов активируемых рецепторов. Их активация может идти разнообразными путями: протеолитическим, действием активных форм кислорода или продуктов их трансформации, эндонуклеазным и т. д. В таком случае белку лиганду не обязательно иметь мощно выраженную активность — одну из упомянутых. Специфическое взаимодействие (узнавание) с рецептором может вести к достижению цели достаточно слабым сигналом. Это и обеспечивается «полифункциональностью» белков регуляторного типа (термин, не очень точно отражающий суть свойства) [20, 24], т. е. не приложением этих протеинов к разным мишеням, а проявлением молекулой белка нескольких функциональных свойств, которыми, возможно и обусловливается реализация биологического действия подобных макромолекул. Затронутая нами проблема достаточно сложна, объемна и, конечно, не бесспорна. Тем не менее, она составляет один из путей в раскрытии молекулярных механизмов биологического действия белков регуляторного типа.

### Литература

1. Абрамчик Т. В., Буравский В. А., Вильнер Б. Я. и соавт. Морфо-функциональные и биохимические эффекты фактора роста нервов. Минск, 1987.
2. Биохимия мозга / Под ред. И. П. Ашмарина, В. П. Стуканова, Н. Д. Ещенко. СПб., 1999.
3. Володкович О. Н., Никандров В. Н. // Механизмы функционирования висцеральных систем. Междунар. конфер. Тез. докл. СПб., 2001. С. 65.
4. Далин М. В., Фиш Н. Г. Токсины микроорганизмов. Итоги науки и техники. Микробиология. Т. 6. М., 1977.
5. Далин М. В., Фиш Н. Г. Белковые токсины микробов. М., 1980.
6. Жук О. Н., Никандров В. Н. // Механизмы функционирования висцеральных систем. Междунар. конфер. Тез. докл. СПб., 2001. С. 129—130.
7. Калюнов В. Н. Фактор роста нервной ткани. Минск, 1984.
8. Калюнов В. Н. Биология фактора роста нервной ткани. Минск, 1986.
9. Калюнов В. Н., Горбунова Н. Б., Петрусенко Г. П., Тумилович М. К. // Известия НАН Беларуси. Сер. мед.-биол. наук. 2002. № 4. С. 85—99.
10. Кульчицкий А. В., Азев О. А., Никандров В. Н. // Докл. НАН Беларуси. 2000. Т. 44, № 3. С. 67—69.
11. Куриненко Б. М. Механизмы биологического действия РНК-азы *Vac. intermedius* и возможные области ее практического применения. Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 1988.
12. Мессина О. В., Юсупов В. Д., Шамсутдинов Н. С. // Журн. микробиол. эпидемиол. иммунобиол. 1963. № 1. С. 20—28.
13. Мосолов В. В. Белковые ингибиторы как регуляторы процессов протеолиза. 36-е Баховское чтение. М., 1983.
14. Мосолов В. В. // Успехи биол. химии. М., 1988. Т. 28. С. 125—144.
15. Никандров В. Н. Стрептокиназа. Структурные и функциональные свойства. Дис. ... д-ра биол. наук. Минск, 1988. С. 368.
16. Никандров В. Н. // Биоорг. химия. 1994. Т. 20, № 2. С. 169—181.
17. Никандров В. Н., Белоенко Е. Д., Казючиц О. А., Рытик П. Г., Старовойтов В. И. Мазь для лечения длительно незаживающих ран. РФ № 2027472 от 27.01.1995.
18. Никандров В. Н., Лапушкина Т. Н. // Бюлл. эксперим. биол. мед. 1993. Т. 105, № 3. С. 277—278.
19. Никандров В. Н., Пыжова Н. С. // Известия НАН Беларуси. Сер. мед.-биол. наук. 2001. № 1. С. 54—60.
20. Никандров В. Н., Пыжова Н. С. // X съезд Белорусского общества физиологов. Тез. докл. Минск, 2001. С. 113—114.
21. Никандров В. Н., Пыжова Н. С. // Современные проблемы инфекционной патологии человека (вирусология, микробиология, иммунология, эпидемиология и клиника). Минск, 2001. С. 318—338.
22. Никандров В. Н., Пыжова Н. С. // Труды Всерос. конфер. «Проблемы медицинской энзимологии», «Современные технологии лабораторной диагностики нового столетия». Междунар. Симпоз. «Пиридоксаль-фосфат-зависимые ферменты. Структура, молекулярная патология, медицина». М., 2002. С. 163—164.
23. Никандров В. Н., Пыжова Н. С. // Достижения медицинской науки Беларуси. Вып. VII. Минск, 2002. С. 48—49.
24. Никандров В. Н., Пыжова Н. С. // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем. Международн. конфер. Пятый съезд Белорусск. обществ. объедин. фотобиологов и биофизиков. Материалы докл. Минск, 2002. С. Т—85.
25. Никандров В. Н., Пыжова Н. С., Малевич Т. М., Шатило Н. Л. // Инфекция и иммунитет. Материалы Республ. научно-практ. конфер. Минск, 1999. С. 161—176.
26. Никандров В. Н., Пыжова Н. С., Шатило Н. Л., Мурашко О. Н. // Современные проблемы инфекционной патологии человека. (эпидемиология, клиника, микробиология, вирусология, иммунология). Минск, 1998. С. 490—491.
27. Никандров В. Н., Пыжова Н. С., Лукашевич В. С., Лукашевич И. Б. и соавт. // Достижения медицинской науки Беларуси. Вып. V. Минск, 2000. С. 104—105.



25. Никандров В. Н., Пыжова Н. С., Лукашевич В. С. // Достижения медицинской науки Беларуси. Вып. VI. Минск, 2001. С. 86.
26. Никандров В. Н., Пыжова Н. С., Вотяков В. И. // Бюлл. эксперим. биол. мед. 1987. Т. 103, № 7. С. 49—51.
27. Никандров В. Н., Пыжова Н. С., Вотяков В. И., Клиньгер Ю. Е. // Докл. АН БССР. 1986. Т. 30. № 11. С. 1033—1036.
28. Никандров В. Н., Пыжова Н. С., Клиньгер Ю. Е. // Докл. АН БССР. 1987. Т. 31, № 11. С. 1045—1048.
29. Никандров В. Н., Петрусенко Г. П., Жук О. Н., Полукошко Е. Ф. и соавт. // Достижения медицинской науки Беларуси. Вып. VII. Минск, 2002. С. 49—50.
30. Пыжова Н. С. Участие активных форм кислорода в процессах протеолиза. Дис. ... канд. биол. наук. Мн.-ск. 1990. С. 193.
31. Пыжова Н. С., Никандров В. Н. // Функциональная роль монооксида азота и пуринов. Сборн. статей конфер. Минск, 2001. С. 142—146.
32. Толстухина Т. И. // Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен). Л., 1982. С. 258—260.
33. Alouf J. E. // Pharmacol. and Therap. 1980. Vol. 11. P. 561—617.
34. Dery O., Corvera C. U., Steinhoff M., Bunnett N. W. // Am. J. Physiol. 1998. Vol. 274. P. C1429—C1452.
35. Chang M. P., Baldwin R. L., Bruce C., Wisniewski B. J. // Science. 1989. Vol. 246. P. 1165—1168.
36. Green S., Mazur A., Shorr T. // J. Biol. Chem. 1956. Vol. 220, N 1. P. 273—255.
37. Kohsaka Sh., Hamanoue M., Nakajima K. // Keio J. Med. 1996. Vol. 45, N 3. P. 263—269.
38. Laiho M., Keski-Oja J. // Cancer Res. 1989. Vol. 49. P. 2533—2553.
39. Misra H. P. // J. Biol. Chem. 1984. Vol. 259, N 20. P. 12678—12684.
40. Mookerjee B. K., Kanegasaki S., Kato I. // Dev. Comp. Immunol. 1982. Vol. 6, N 7. P. 161—170.
41. Nikandrov V. N. // Int. J. Biochem. 1992. Vol. 24, N 1. P. 47—53.
42. Nikandrov V. N., Pyzhova N. S., Lukashevitch V. S., Lukashevitch I. B. et al. // 18 Intern. Congress of Biochem. Mol. Biol. Abstract book. Birmingham. 2000. P. 317.
43. Pavlova N. I., Murashko O. N., Savinova O. V., Boreko E. I., Nikandrov V. N. // XVI Intern. Sympos. on Medicinal Chemistry. Abstracts. Bologna. 2000. P. 576.
44. Pincus D. W., Goodman R. R., Fraser R. A. R. et al. // Neurosurgery. 1998. Vol. 42, N 4. P. 858—868.
45. Pimentel E. Handbook of growth factors. Boca Raton. 1994.
46. Powell J. R., Castellino F. J. // J. Biol. Chem. 1980. Vol. 255, N 11. P. 5329—5335.
47. Pyzhova N. S., Nikandrov V. N. // Thromb. Res. 1996. Vol. 82, N 4. P. 303—312.
48. Rakowicz-Szulczynska E. M., Herlyn M., Koprowski H. // Cancer Res. 1988. Vol. 48. P. 7200—7206.
49. Rajah R., Bhalra A., Nunn St. E., Peehl D. M., Cohen P. // Endocrinology. 1996. Vol. 137. P. 2676—2682.
50. Samagh B. S., Gregory K. F. // Biochim. Biophys. Acta. 1972. Vol. 273. P. 188—198.
51. Testa J. E., Quigley J. P. // J. Natl. Cancer Inst. 1988. Vol. 80, N 10. P. 712—713.
52. Yankner B. A., Shooter E. C. // Ann. Rev. Biochem. 1982. Vol. 51. P. 845—868.
53. Zhao J.-M., London E. // Biochemistry. 1988. Vol. 27, N 9. P. 3398—3403.

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

REGULATORY PROTEINS: FUNCTIONAL PROPERTIES OF MOLECULES  
AND MECHANISMS OF THEIR BIOLOGICAL ACTION

<sup>1</sup>Institute of Physiology of NAS of Belarus, Minsk,

<sup>2</sup>Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Minsk, Belarus

Summary

The study of a number of proteins with regulatory effects (streptokinase, streptolysin O, diphtheria toxin, interleukin-1, plasminogen, nerve growth factor and its subunits, proteinase inhibitors: soybean trypsin inhibitor, ovomucoid, ovoinhibitor) demonstrated some new features, such as plasminogen-activating, proteolytic, endonuclease, oxygen-radical-generating and superoxide-converging abilities. The features of these proteins were exerted to a different extent. The study results are generalized, a possible significance of demonstrated features for realization of proteins' biological action is discussed.