



СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ МЕДИЦИНСКИХ НАУК
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

СИБИРСКИЙ НАУЧНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ЖУРНАЛ

НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ
ПЕРИОДИЧНОСТЬ 1 РАЗ В 2 МЕСЯЦА
ОСНОВАН В 1981 ГОДУ

Главный редактор — Л.И. Афтанас, д.м.н., проф., академик РАН
Отв. секретарь — М.И. Воевода, д.м.н., проф., член-кор. РАН

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

С.В. Васильев, д.м.н., профессор
А.М. Дыгай, академик РАН
Ю.М. Захаров, академик РАН
А.М. Караськов, академик РАН
Р.С. Карпов, академик РАН
В.А. Козлов, академик РАН
С.И. Колесников, академик РАН
В.И. Коненков, академик РАН
А.Л. Кривошапкин, член-кор. РАН
В.В. Ляхович, академик РАН
В.Т. Манчук, член-кор. РАН
И.О. Маринкин, д.м.н., профессор
В.П. Пузырев, академик РАН
В.А. Труфакин, академик РАН
Е.Л. Чойнзонов, академик РАН
В.А. Шкурупий, академик РАН

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

Л.С. Барбараш, академик РАН (Россия)
Н.А. Бохан, член-кор. РАН (Россия)
Н.Н. Беседнова, академик РАН (Россия)
Ю.И. Бородин, академик РАН (Россия)
В.В. Власов, академик РАН (Россия)
В.Л. Зельман, профессор (США)
Н. Мерфи, профессор (США)
В.С. Рукавишников, член-кор. РАН (Россия)
М.Б. Штарк, академик РАН (Россия)
С.Е.О. Эббессон, иностр. член РАН (США)

№ 3

ТОМ 36

МАЙ · ИЮНЬ

НОВОСИБИРСК
2016

Учредители: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Сибирское отделение медицинских наук», Федеральное государственное бюджетное учреждение «Сибирское отделение Российской академии наук»

Establishers: Federal State Budgetary Institution «Siberian Branch of Medical Sciences», Federal State Budgetary Institution «Siberian Branch of Russian Academy of Sciences»

Свидетельство о регистрации средства массовой информации ПИ № ФС77-63144 от 18 сентября 2015 г.

Registration certificate – ПИ № ФС77-63144 of September 18, 2015 registered by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology and Mass Media of the RF

До января 2015 г. название журнала «Бюллетень СО РАМН» ISSN 1815-6703

Till 2015 January the journal former title was «Bulletin of SB RAMS» ISSN 1815-6703

Адрес редакции:
630117, Новосибирск, ул. Тимакова, 2
Федеральное государственное бюджетное учреждение «Сибирское отделение медицинских наук» (СО медицинских наук)

Address:
Russia 630117
Novosibirsk, Timakov str., 2
Federal State Budgetary Institution «Siberian Branch of Medical Sciences»

Зав. редакцией Г.К. Евлоева
Тел.: 8 (383) 306-44-31
E-mail: evloeva@soramn.ru
journal@soramn.ru

Managing editor G.K. Evloeva
Telephone: +7 (383) 306-44-31
E-mail: evloeva@soramn.ru
journal@soramn.ru

Сайт журнала:
<http://sibmed.net>

Web site
<http://sibmed.net>

Подписаться на журнал можно по каталогу Агентства Роспечать «Газеты и журналы 2016 г.», индекс 46816, или в Отделе маркетинга Издательства СО РАН, справки по тел. (383) 330-17-58

Журнал можно получить наложенным платежом или по предоплате. Заказы отправляйте:

- через интернет-магазин Издательства СО РАН: <http://www.sibran.ru>
- по почте: Издательство СО РАН, Отдел маркетинга, а/я 187, Морской просп., 2, г. Новосибирск, 630090
- по электронной почте: sprice@sibran.ru

Подписано в печать 21.06.2016. Формат 60×84/8.
Усл. печ. л. 13,4. Уч.-изд. л. 11,5. Тираж 200 экз. Заказ № 139.

Оригинал-макет подготовлен в Издательстве СО РАН
630090, Новосибирск, Морской просп., 2
E-mail: psb@sibran.ru
Тел.: (383) 330-80-50
Отпечатано в Издательстве СО РАН
Интернет-магазин Издательства СО РАН
<http://www.sibran.ru>

МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

Курьянова Е.В., Жукова Ю.Д., Трысучев А.В., Горст Н.А.

Влияние скополамина, галантамина и их сочетаний с гексаметонием и атропином на спектральные характеристики сердечного ритма нелинейных крыс

Мадонов П.Г., Мишенина С.В., Киншт Д.Н., Кикхтенко Н.В.

Химические и фармакологические свойства субтилизинов

КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА

Грицан А.И., Кротов М.В., Бичурин Р.А.

Сравнительный анализ параметров внешнего дыхания в процессе анестезии на основе севофлюрана и десфлюрана при малоинвазивных вмешательствах

Филимонов Е.С., Мулерова Т.А., Огарков М.Ю., Цыганкова Д.П., Епифанцева Н.Н., Болдина В.Р., Вялова В.Н., Херингсон Л.Г.

Состояние ренальной функции и артериальная гипертензия у жителей Горной Шории

Чепелева М.В., Кузнецова Е.И., Карасев А.Г.

Иммунологический профиль пациентов с замедленной консолидацией костной ткани в отдаленные сроки после закрытой травмы длинных трубчатых костей

Медведев Б.И., Сяндюкова Е.Г., Сашенков С.Л., Захаров Ю.М.

Об уровне эритропоэтина в крови беременных женщин с преэклампсией в разные сроки ее манифестации

Омельченко А.Ю., Горбатов Ю.Н., Соинов И.А., Войтов А.В., Кулябин Ю.Ю., Корнилов И.А., Горбатов А.В., Богачев-Прокофьев А.В.

Оценка функции правого желудочка после коррекции тетрады Фалло

Леонова О.Н., Волков А.В., Агеева Т.А., Кайдорин А.Г., Атаманов К.В.

Морфофункциональная характеристика подкожных вен конечностей в норме и при хронической болезни почек 5 стадии

Цеймах И.Я., Тимофеев А.В., Толстихина Т.А., Дронов С.В., Шойхет Я.Н.

Влияние обострения хронической обструктивной болезни легких на течение ишемической болезни сердца у госпитализированных в кардиологическое отделение пациентов

Колесникова Л.И., Рашидова М.А., Даренская М.А., Шолохов Л.Ф., Гребенкина Л.А., Семенова Н.В.

Параметры окислительного стресса у пациенток с парентеральными вирусными гепатитами

MEDICAL-BIOLOGICAL SCIENCES

5 **Kuryanova E.V., Zhukova Yu.D., Tryasuchev A.V., Horst N.A.**

Influence of scopolamine, galantamine and their combination with hexametonium and atropine on the spectral characteristics of heart rhythm of nonlinear rats

13 **Madonov P.G., Mishenina S.V., Kinsht D.N., Kikhtenko N.V.**

Chemical and pharmacological properties of subtilisins

CLINICAL MEDICINE

23 **Gritsan A.I., Krotov M.V., Bichurin R.A.**

Comparative analysis of parameters of external respiration in the process of anaesthesia with sevoflurane and desflurane by minimally invasive interventions

28 **Filimonov E.S., Mulerova T.A., Ogarkov M.Yu., Tsygankova D.P., Epifantseva N.N., Boldina V.R., Vyalova V.N., Kheringson L.G.**

The status of renal function and arterial hypertension among residents of Mountain Shoria

34 **Chepeleva M.V., Kuznetsova E.I., Karasev A.G.**

Immunological profile of patients with delayed bone tissue consolidation at long term after closed long bone injuries

41 **Medvedev B.I., Syundyukova E.G., Sashenkov S.L., Zakharov Yu.M.**

On the blood erythropoietin level of pregnant women with preeclampsia in different terms of its manifestation

48 **Omelchenko A.Yu., Gorbatykh Yu.N., Soynov I.A., Voitov A.V., Kulyabin Yu.Yu., Kornilov I.A., Gorbatykh A.V., Bogachev-Prokofiyev A.V.**

Assessment of right ventricular function after surgical repair of tetralogy of Fallot

55 **Leonova O.N., Volkov A.V., Ageeva T.A., Kaidorin A.G., Atamanov K.V.**

Morphofunctional characteristic of the superficial veins of limbs in normal and in chronic kidney disease patients

60 **Tseymakh I.Ya., Timofeev A.V., Tolstikhina T.A., Dronov S.V., Shoykhet Ya.N.**

Influence of chronic obstructive pulmonary disease exacerbation on the course of acute forms of coronary artery disease in patients hospitalized in coronary care unit

69 **Kolesnikova L.I., Rashidova M.A., Darenskaya M.A., Sholokhov L.F., Grebenkina L.A., Semenova N.V.**

Parameters of oxidative stress of patients with parenteral viral hepatitis

Крылова И.А.

Несколько клинических случаев ретиальной артериальной макроаневризмы

Ярин Г.Ю., Юданов А.В., Боденко О.С.

Каскад осложнений после радикальной цистэктомии с ортотопической энтероцистопластикой (клинический случай)

ПРОФИЛАКТИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА**Иванова Я.А., Водяницкий С.Н., Урюмцев Д.Ю., Кривошеков С.Г., Гришин О.В., Даниленко К.В.**

Немедленное действие яркого света на потребление кислорода в покое при сезонном аффективном расстройстве

Янькова В.И., Веремчук Л.В., Виткина Т.И., Гвозденко Т.А., Голохваст К.С.

Ответная реакция системы «перекисное окисление липидов–антиоксидантная защита» на комплексное воздействие природно-экологических факторов при заболеваниях органов дыхания

Бережнюк И.В., Момот А.П., Меркулов И.В., Осипова И.В.

Прогнозирование венозных тромбоэмболических осложнений после эндопротезирования тазобедренного сустава на фоне современной тромбопрофилактики

Поляков Л.М., Розуменко А.А., Русских Г.С., Биушкина Н.Г., Потеряева О.Н., Гольцова Т.В., Чуркина Т.В., Осипова Л.П.

Эндокринный статус у женщин – представительниц коренного и пришлого населения Ямало-Ненецкого автономного округа

ЮБИЛЕЙ**Манчук Валерий Тимофеевич
(к 75-летию со дня рождения)**75 **Krylova I.A.**

Several clinical cases of retinal artery macro aneurysm

81 **Yarin G.Yu., Yudanov A.V., Bodenko O.S.**

Cascade of complications following a radical cystectomy with orthotopic bladder substitution

PREVENTIVE MEDICINE89 **Ivanova Ya.A., Vodyanitskiy S.N., Uryumtsev D.Yu., Krivoshchyokov S.G., Grishin O.V., Danilenko K.V.**

Immediate effect of bright light on rest-state oxygen consumption in seasonal affective disorder

94 **Yan'kova V.I., Veremchuk L.V., Vitkina T.I., Gvozdenko T.A., Golokhvast K.S.**

The response of the lipid peroxidation–antioxidant protection system on the complex impact of the environmental factors in respiratory diseases

103 **Berezhnyak I.V., Momot A.P., Merkulov I.V., Osipova I.V.**

Prognosis of venous thromboembolic complications after the hip joints endoprosthesis replacement againsts the background of modernt thromboprophylaxis

109 **Polyakov L.M., Rozumenko A.A., Russkikh G.S., Biushkina N.G., Poteryaeva O.N., Goltzova T.V., Churkina T.V., Osipova L.P.**

Endocrine status of women – representatives of indigenous and alien population of Yamal-Nenets autonomous okrug

ANNIVERSARY114 **Manchuk Valeriy Timofeevich
(to the 75th anniversary)**

ХИМИЧЕСКИЕ И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СУБТИЛИЗИНОВ

Павел Геннадиевич МАДОНОВ^{1,2}, Светлана Владимировна МИШЕНИНА¹,
Дмитрий Николаевич КИШТ^{1,2}, Наталья Владимировна КИХТЕНКО²

¹ Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России
630091, г. Новосибирск, Красный пр., 52

² ООО «Саентифик Фьючер Менеджмент»
630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово. ул. Технопарковая, 10

Субтилизины являются протеолитическими ферментами класса гидролаз, продуцируемыми бактериями *Bacillus subtilis*. Изучение химических и фармакологических свойств субтилизинов активно ведется последние 20 лет. Интерес вызван наличием у ферментов фибринолитического, тромболитического и антикоагулянтного действия. При этом выделенные субтилизины проявляют разную фибринолитическую активность, а некоторые из них даже более активны, чем урокиназа. Действие субтилизинов не имеет сайт-специфичности и направлено на те белки, которые утратили нативную глобулярную структуру (например, фибриноген, превратившийся в фибрин). Известно, что популяции Японии, Китая и Северо-Восточной Индии характеризуются наименьшим риском сердечно-сосудистых заболеваний и деменции, возможно, это обусловлено высоким содержанием фибринолитических ферментов в продуктах традиционной пищи (наттокиназа из соевых бобов). Несмотря на наличие большого количества экспериментальных исследований, практическое использование субтилизинов в медицине до настоящего времени остается ограниченным. Единственным зарегистрированным препаратом для лечения тромбозов остается созданный в 2009 г. российский препарат на основе иммобилизованных субтилизинов Тромбовазим®.

Ключевые слова: протеолитические ферменты, субтилизины, сериновые протеазы, фибринолитическая активность, антикоагуляционный потенциал.

Протеолитические ферменты (ПФ) используются человеком многие столетия, но научно обоснованное их применение началось с начала XX в. после публикаций фундаментальных работ Э. Фишера. ПФ могут быть получены из растительного сырья (например, папаин), из животного сырья (например, трипсин) или из микроорганизмов. Основными микроорганизмами-продуцентами являются бактерии родов *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas* и микроскопические грибы родов *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium* и др.

По строению активного центра ПФ делятся на сериновые протеазы (трипсин, химотрипсин, субтилизин, протеиназа К), аспартатные протеазы (пепсин, ренин, микробные аспартатные протеазы), цистеиновые протеазы (папаин, фицин, бромелаин), металлопротеазы (коллагеназа, эластаза, термолизин). Субтилизины относятся к классу гидролаз, группе сериновых протеаз и классифицируются по родам в соответствии с го-

мологией аминокислотной последовательности. Свое название субтилизины получили в связи с тем, что большинство из них продуцируется бактериями *Bacillus subtilis*. В научной литературе часто используется термин не «субтилизин», а «субтилизиноподобная протеиназа», что по сути одно и то же. Такого рода терминологическая вольность является традиционной уже многие годы и не вызывает неприятия как со стороны химиков, так и со стороны медиков и биологов.

Из всего многообразия ПФ субтилизины выделяются двумя свойствами. Первое, субтилизином не присуща так называемая сайт-специфичность, они не обладают выраженной тропностью по отношению к сочетанию аминокислот в белковой молекуле, которая, в свою очередь, существенно ограничивает возможности применения ПФ. Например, сериновая протеиназа плазмин – достаточно активный ПФ, но только в отношении группировок «лизин–лизин». Второе, субтилизины

Мадонов П.Г. – д.м.н., проф., зав. кафедрой фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины, e-mail: madonov@scrb.ru

Мишенина С.В. – к.м.н., доцент кафедры фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины

Кишт Д.Н. – к.м.н., доцент кафедры фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины

Кихтенко Н.В. – научный работник

преимущественно гидролизуют те белковые молекулы, которые утратили свою нативную глобулу, либо вследствие разрушения четвертичной и третичной структуры и превращения в белковый детрит, либо вследствие полимеризации, как, например, фибриноген, превратившийся в фибрин.

Установленные протеолитические свойства субтилизинов в настоящее время активно используются человеком. Однако спектр их применения в большей степени смещен в промышленность, нежели чем в медицинскую практику. Субтилизины используют в пищевой промышленности для устранения нежелательных белковых осадков, в легкой промышленности как премиксы к синтетическим моющим средствам [20, 25], для тонкой выделки кожи, в химической аналитике для определения структуры белков и т. д.

В медицинском сообществе интерес к субтилизином активно проявился в последние 20 лет. Детальное исследование гомогенных субтилизиноподобных протеиназ *B. intermedius* и *B. amyloliquefaciens* выявило тот факт, что они проявляют фибринолитическую, тромболитическую и антикоагулянтную активность. Субтилизиноподобная протеиназа *B. pumilus* обладает большей тромболитической активностью, чем протеиназы *B. intermedius* и *B. amyloliquefaciens*, так как она в более низких концентрациях способна лизировать образованный тромб. Этот факт имеет большое значение с точки зрения уменьшения побочных эффектов. Новые протеиназы QK-1 и QK-2 из *B. subtilis* QK02 и субтилизиноподобная протеиназа из *B. subtilis* TP-6 имеют высокий уровень фибринолитической активности и перспективны в тромболитической терапии. У субтилизиноподобной протеиназы *B. subtilis* DC33 уровень протеолитической активности в 6 раз выше, чем у субтилизина Карлсберг [1].

В исследовании, проведенном Majumdar et al. [22], сообщается о биохимических и фармакологических характеристиках бревитромболазы (brevithrombolase), фибринолитической сериновой протеазы, выделенной из штамма FF02B *Brevibacillus brevis*, для которой проведена оценка тромболитической активности. Молекулярная масса мономерной протеазы, измеренная с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (SDS-PAGE) и масс-спектрометрии MALDI-TOF, составляет 55 и 56 кДа соответственно. Обнаружено, что N-концевая последовательность бревитромболазы блокирована, однако анализ массы пептида методом отпечатков и анализ аминокислотного состава показали ее сходство с эндопептидазами в процессинге серина в их каталитической триаде. Этот вывод был подтвержден тем, что ингибиторы сериновой протеазы уменьшают

каталитическую (фибринолитическую) активность фермента. Вторичная структура бревитромболазы на 30 % представлена альфа-спиралями и на 69,4 % – спиралями, образованными случайным образом. Протеаза проявляла оптимальную фибринолитическую активность при pH 7,4 и 37 °C и минимальную гидролитическую активность в отношении глобулина, казеина и фибриногена. Установлено, что бревитромболаза обладает наибольшей фибринолитической активностью *in vitro* и, соответственно, тромболитическим потенциалом среди трех ферментов – бревитромболаза, плазмин и стрептокиназа. ВЭЖХ и SDS-PAGE подтвердили сходную картину деградации фибрина бревитромболазой и плазмином, указывая на то, что она является плазминоподобной фибринолитической сериновой протеазой.

В работе Singh et al. [32] исследована фибринолитическая активность традиционной ферментированной пищи Северо-Восточной Индии и связанных с ней микроорганизмов. Установлен эндогенный источник фибринолитической активности ферментированных рыбных продуктов. Идентификация 85 фибринолитических изолятов путем анализа рестрикции амплифицированной рибосомальной ДНК и сиквенса рибосомальной ДНК выявили 15 флотипов, при этом 55 изолятов принадлежат к видам *Bacillus*. Разработан более простой и надежный, в сравнении с традиционным методом фибриновых пластин, спектрофотометрический метод количественной оценки фибринолитической активности. Из 31 вида различных исследованных ферментированных продуктов фибринолитическую активность проявляли богатые протеином в основном соевые и рыбные продукты. Фибринолитическая активность была выше в ферментированных продуктах из рыбы *Puntius sophore* Ham., чем в ферментированных соевых продуктах. Зимограмма фибрина на основе кластерного анализа показала фибринолитическую активность эндогенного происхождения в ферментированных рыбных продуктах и микробного происхождения в ферментированных соевых продуктах. Ферментированный соевый продукт Hawaigar проявил более высокую специфичность по отношению к фибрину (отношение фибринолитической к казеинолитической активности $3,8 \pm 0,21$). Были также идентифицированы молочно-кислые бактерии с фибринолитической активностью, а именно – *Vagococcus carniphilus*, *Vagococcus lutrae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus gallinarum* и *Pediococcus acidilactici*. *B. subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *V. carniphilus*, *V. lutrae* и *Proteus mirabilis* были очень перспективными продуцентами фибринолитических

ферментов с показателем более чем 350 единиц плазмина/мл. Высокое содержание фибринолитического *P. mirabilis* найдено в ферментированных продуктах из сои и свинины, что может представлять серьезную проблему для здравоохранения. Фибринолитическая активность ферментированных продуктов частично может быть обусловлена выделенными микроорганизмами. Выявлены некультивированные протеолитические бактерии как в исходном сырье, так и в ферментированных рыбных продуктах. Такая пища с содержанием ПФ и связанные с ней микроорганизмы в дальнейшем могут использоваться для новых видов фибринолитической терапии. Однако высокое содержание *P. mirabilis* в ферментированных продуктах вызывает обеспокоенность относительно безопасности их применения.

В работе Vi et al. [13] проведена оценка антитромботического действия новой фибринолитической протеазы UFEIII, выделенной из морских червей *Urechis uncinatus* методами анионообменной и гель-фильтрационной хроматографии. Определялись молекулярная масса, фибринолитическая активность и модель фибринолизиса UFEIII. SDS-PAGE очищенного фермента показал единственную полипептидную цепь с молекулярной массой 20,8 кДа. С помощью анализа на фибриновых пластинах установлено, что UFEIII может напрямую разрушать фибрин, но также активирует плазминоген. Модель фибринолизиса для UFEIII выглядит следующим образом: A α -цепи > B β -цепи > γ -цепь. Антитромботическое действие UFEIII исследовалось *in vivo* на моделях электрически индуцированного тромбоза сонной артерии у крыс, FeCl₃-индуцированного тромбоза сонной артерии у кроликов и стаз-индуцированного тромба полый вены у крыс. После введения UFEIII как кроликам, так и крысам наблюдался лизис тромба. Однако введение UFEIII не только пролонгировало активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) и тромбиновое время (ТВ), но также понижало содержание фибриногена, что потенциально ограничивает его применение в связи с угрозой геморрагического синдрома.

Из бурых водорослей *Costaria costata* выделена антитромботическая сериновая протеаза прямого действия, обозначенная как ССР [16]. Масс-спектрометрия показала, что ССР – мономерная протеаза с молекулярной массой 60,5 кДа. N-концевая последовательность выглядит как SCNSCLDKVDADGLN. Протеолитическая активность ингибируется фенолметилсульфонилфторидом, подтверждая, что очищенный фермент является сериновой протеазой. Результаты анализа на фибриновых пластинах и фибриновой зи-

мографии выявили, что ССР способна разрушать непосредственно фибриновые сгустки. Она специфически гидролизует A α - и α -, и B β - и β -цепи с последующими γ - и γ -цепями человеческого фибриногена и фибрина соответственно. Расщепление фибриновых сгустков и фибриногена подтверждается изменением вторичной структуры, наблюдаемым при FTIR-спектроскопии. Морфологические изменения фибринового сгустка также доказаны наблюдениями при флуоресцентной микроскопии. ССР эффективно уменьшает тромб *in vitro*. Наблюдения *in vivo* показали, что ССР препятствует/уменьшает образование тромбов на каррагинан-индуцированной хвостовой модели у мышей. ССР пролонгирует АЧТВ и оказывает небольшое влияние на протромбиновое время. Тесты на анализаторе функции тромбоцитов PFA-100 показали, что ССР пролонгирует «время закрытия». Эти данные свидетельствуют о том, что ССР может обладать терапевтическим потенциалом для лечения тромбозов.

Выделены и очищены до гомогенного состояния глутамилэндопептидаза, субтилизиноподобная протеиназа и металлоэндопептидаза *Bacillus pumilis*, секретируемые рекомбинантным штаммом *B. subtilis* JB 2036 [5]. Проведен анализ тромболитических, фибринолитических и антикоагулянтных свойств рекомбинантных ферментов. Показано, что все исследуемые протеиназы способны эффективно лизировать тромб. В условиях *in vitro* субтилизиноподобная протеиназа и глутамилэндопептидаза рекомбинантного штамма *B. subtilis* обладают антикоагулянтной активностью. Металлопротеиназа же не способна повлиять на процесс тромбообразования. Субтилизиноподобная протеиназа и глутамилэндопептидаза обладают фибринолитической активностью и активаторной способностью по отношению к плазминогену, металлопротеиназа не проявляет фибринолитических свойств.

Из Douchi, традиционной китайской еды на основе ферментированной сои, выделен новый фибринолитический фермент субтилизин FS33, который проявляет более высокую активность при разрушении фибрина, чем урокиназа [37]. Для увеличения таргетного воздействия на тромб были приготовлены субтилизин FS33, меченный ФИТЦ, и поверхностно модифицированные липосомы, в которые были инкапсулированы субтилизин FS33 и ФИТЦ с синтетическим пептидом Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS), который предположительно является специфическим антагонистом фибриногеновых рецепторов на мембране тромбоцитов. Эти конструкции были использованы для оценки терапевтической эффективности на модели тромбоза сонной артерии у кроликов, ко-

торый индуцировали применением двух кусочков фильтровальной бумаги, насыщенных 10%-м раствором хлорида железа. Через яремную вену кроликам вводили либо липосомы, несущие бычий сывороточный альбумин, либо RGDS-липосомы, несущие субтилизин FS33, в дозе 2000 или 4000 ЕД/кг массы тела. Через 15–120 мин после введения плазма крови кроликов, получивших RGDS-липосомы, показала более высокую анти-тромботическую и фибринолитическую активность, чем плазма контрольной группы, эффект прямо зависел от дозы. АЧТВ, протромбиновое и тромбиновое время значительно увеличилось, так же как и содержание продуктов деградации фибриногена, в то время как время лизиса эу-глобулинового сгустка заметно снизилось. Содержание ФИТЦ в сердце и мозге достоверно увеличилось, и результаты всех тестов D-димера были положительными. Кроме того, как показало вскрытие, венозные тромбы в мозге и почках были растворены полностью или частично. Все это показывает, что субтилизин FS33 обладает анти-тромботической и фибринолитической активностью.

В исследовании Yuan et al. [42] системно изучено тромболитическое действие фермента Douchi – DFE из *B. subtilis* LD-8547 *in vitro* и *in vivo*. Установлено, что DFE играет значительную роль в тромболлизисе и антикоагуляции *in vitro*, эффект зависит от дозы. Анализ острой токсичности на мышах показал ее отсутствие. Обнаружено, что DFE значительно препятствует каррагинан-индуцированному тромбозу хвоста на мышинной модели, а также обладает тромболитическим действием при тромбозе сонной артерии у кроликов. Другие исследования *in vivo* показали, что DFE может заметно увеличивать кровотечение и время свертывания. После курса лечения в течение недели тремя дозами DFE (2206, 4412 и 8824 МЕ) мышам подкожно вводили каррагинан и затем через 24 ч измеряли длину хвостового тромба. Показано, что DFE может значительно ингибировать образование тромба: его средняя длина в группе, получавшей физиологический раствор, составила 3,7 см и резко снизилась до 2 и 0,4 см в группах, получавших 2051 и 4103 МЕ DFE соответственно. У мышей, получавших 8206 МЕ DFE, тромб практически исчез. Результаты подтверждают, что DFE может предотвращать хвостовой тромбоз, индуцированный каррагинаном, и этот эффект усиливается с увеличением дозы DFE.

Из штамма *Streptomyces* выделен и охарактеризован тромболитический фермент [10]. Первые 15 аминокислот N-конца очищенного фермента представляют собой последовательность

IAGGQAIYAGGGRRS, которая значительно отличается от опубликованных последовательностей фибринолитических ферментов. Энзим обладает тромболитическим действием в 14 раз более сильным, чем плазмин. На модели каррагинан-индуцированного тромбоза хвоста у мышей фермент дозозависимо уменьшал частоту тромбообразования и длину тромба.

В публикации Mahajan et al. [21] сообщается о выделении, скрининге и идентификации морских культур для получения фибринолитических ферментов. Выделена бактерия – мощный производитель фибринолитического фермента – которая в результате генного секвенирования 16S рНК и исследования биохимических свойств была идентифицирована как *B. subtilis* ICTF-1. Кроме того, оптимизация среды методом L18-ортгональных матриц дала увеличение продукции фибринолитического фермента до 8814 ЕД/мл, что в 2,6 раза больше, чем в неоптимизированной среде (3420 ЕД/мл). Исследование *in vitro* позволило установить способность фермента эффективно катализировать лизис кровяного сгустка, что указывает на возможность его использования в качестве тромболитического агента. Фибринолитический фермент был очищен из культурального супернатанта до гомогенности тремя последовательными процедурами с увеличением специфической активности в 34,42 раза и выходом 7,5 %, он обладал молекулярной массой 28 кДа, оптимальными температурой и рН (50 °С и 9 соответственно) и был стабилен при рН 5,0–11,0 и температуре 25–37 °С. Активность фермента активируется Ca^{2+} и заметно ингибируется Zn^{2+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} и фенилметилсульфонилфторидом. Очищенный фибринолитический фермент потенциально может использоваться не только как тромболитик. Выделен кодирующий его ген и определена последовательность ДНК. Сравнение полной последовательности ДНК с таковой в базе данных NCBI показало, что фермент принадлежит к субтилизин-подобным сериновым протеазам.

В публикации Siritapetawee et al. [33] сообщается о выделении из индийского хлебного дерева и очистке новой микробной протеазы AMP48 с молекулярной массой 48 кДа, охарактеризованы ее биохимические и медицинские свойства. Ферментативная активность AMP48 значительно ингибируется фенилметансульфонилфторидом и соевым ингибитором трипсина, что указывает на принадлежность фермента к растительным сериновым протеазам. N-концевая последовательность аминокислот AMP48 (AQEGGKDDDDGG) не имеет совпадающих последовательностей в базе данных по поиску BLAST и другими рас-

тительными сериновыми протеазами. Вторичная структура АМР48 представлена α -спиралями (51 %) и β -листами (9 %). Фибринолитическая активность АМР48 была максимальной при температуре от 55 до 60 °С и рН 8. Фермент эффективно гидролизует α - и частично β - и γ -субъединицы человеческого фибриногена. Кроме того, фибринолитическая активность зарегистрирована наличием продуктов распада при SDS-PAGE и усилением активности фермента – путем мониторинга изменения вторичной структуры фибринового сгустка после расщепления АМР48 с использованием инфракрасной Фурье-спектроскопии. Эта работа показывает потенциальную возможность использования АМР48 в качестве антитромботического средства при лечении тромбоземболических расстройств, таких как инсульт, легочная эмболия и тромбоз глубоких вен.

Из штамма AS-S20-I *Bacillus* sp. выделена бафибриназа (bafibrinase) – фибринолитическая протеаза прямого действия, обладающая тромболитическими и антикоагулянтными свойствами [26]. Бафибриназа – мономерный фермент с молекулярной массой 32,3 кДа. Две новые пептидные последовательности, полученные после ее обработки трипсином, показали высокое сходство с эндопептидазами, имеющими серин в их каталитической триаде. Кроме того, каталитическая активность бафибриназы угнеталась ингибитором сериновой протеазы, подтверждая тот факт, что новый фермент – это субтилизин-подобная сериновая протеаза. Кажущиеся значения K_m и V_{max} по отношению к фибрину определены как 0,24 мкМ и 2,8 мкмоль/мин соответственно. Величина K_m по отношению к хромогенному субстрату для плазмина (D-Val-Leu-Lys-p-нитроанилида дигидрохлорид) составила 0,139 мМ, а оптимальная активность наблюдалась при физиологических условиях (37 °С и рН 7,4). Исходя из модели расщепления фибрина и фибриногена, бафибриназа может быть классифицирована как α , β -фибриногеназа. Фермент не разрушал коллаген и был не токсичен для клеток НТ29 и эритроцитов человека. Кроме того, бафибриназа в дозе 2 мг/кг была не токсична и не проявляла геморрагической активности на мышах линии BALB/c, что подтверждает возможность ее использования для создания лучших и более безопасных тромболитических препаратов. *In vitro* бафибриназа также превосходила человеческий плазмин по разрушению тромба.

Из плодовых тел корейского гриба *Cordyceps militaris* выделен фибринолитический фермент [14]. Методами SDS-PAGE, фибрин-зимографии и гель-фильтрационной хроматографии установ-

лено, что молекулярный вес фермента составляет 34 кДа. N-концевая последовательность из 15 аминокислот APVEQCDAVGLARL отличается от последовательностей фибринолитических ферментов из других грибов. Оптимальные величины температуры и рН составляют 7,0 и 40 °С соответственно. Активность фермента полностью ингибируется фенолметилсульфонилфторидом, 1,10-феналинтролином, Cu^{2+} и Ba^{2+} , в значительной степени – аprotинином, этилендиаминтетрауксусной кислотой и этиленгликолем тетрауксусной кислоты. Фермент демонстрирует более высокую специфичность в отношении синтетического субстрата, N-сукцинил-Ala-Ala-Pro-Phe-p-нитроанилида, что подтверждает его принадлежность к химотрипсин-подобным сериновым металлопротеазам. Фермент преимущественно гидролизует фибриноген А α -, далее В β -цепи и γ -цепь. Им также разрушаются А-, β - и γ - γ -цепи фибрина.

Из многощетинкового червя *Neanthes japonica* (Izuka) комбинацией фракционирования сульфатом аммония, гидрофобной хроматографии, ионообменной хроматографии и гель-фильтрации выделена новая протеаза с фибринолитической активностью, названная NJP [39]. По оценке, сделанной с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF и SDS-PAGE, которые выявили мономерную форму NJP, ее молекулярная масса составляет около 28,6–33,5 кДа. Изоэлектрическая точка NJP, определенная 2-DE, равняется 9,2. NJP стабильна в диапазоне рН 7,0–11,0 с максимумом ферментативной активности при 40 °С и рН 9,0. Гидролизующее действие NJP на фибриноген начинается с А α -цепи, далее В β -цепь и в последнюю очередь γ -цепь. NJP обладает также более высокой специфичностью для хромогенного субстрата S-2238 для тромбина. Активность NJP полностью ингибируется фенолметилсульфонилфторидом. Анализ части аминокислотной последовательности показал, что NJP обладает очень низкой гомологией с другими известными фибринолитическими ферментами, указывая на то, что NJP является новой щелочной тромбин-подобной сериновой протеазой. Таким образом, NJP потенциально может использоваться для профилактики и лечения тромбозов.

Из выделенной *Streptomyces* sp. CS624 получен протеолитический фермент с фибринолитической активностью – FES624 [23]. SDS-PAGE показал, что фермент состоит из единственной полипептидной цепи с молекулярной массой 18 кДа – наименьшей среди известных фибринолитических ферментов, выделенных из *Streptomyces* к настоящему времени. В анализе фибриновых пластин FES624 показал более сильную фибринолитиче-

скую активность, чем плазмин. Активность фермента была оптимальной и высокостабильной при pH 7,0, подтверждая, что это – нейтральный фермент. Более того, активность была максимальной при 60 °С и стабильной при 50 °С или ниже. Фермент гидролизует Аα-, Вβ- и γ-цепи фибриногена в течение 5, 10 и 150 минут соответственно. FES624 показал более высокую специфичность в отношении N-сукцинил-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, субстрата для химотрипсина. Активность фермента подавлялась ингибитором сериновой протеазы Pefabloc®, а также ингибиторами металлопротеазы этилендиаминтетрауксусной кислотой и этиленгликолем тетрауксусной кислоты. Кроме того, ионы металлов оказывали различное влияние на активность FES624. В совокупности полученные данные подтверждают, что FES624 является химотрипсин-подобной сериновой металлопротеазой. Для субстрата N-сукцинил-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA K_m составила 0,218 мМ, V_{max} – 84,03 мМ/(мин × мг). Первые пятнадцать аминокислотных остатков N-концевой последовательности – APNVDAILYPQYRLS, что значительно отличается от ранее опубликованных последовательностей фибринолитических ферментов; таким образом, FES624 может оказаться в своем роде новым ферментом.

Из *B. subtilis* A26 выделен и охарактеризован новый фибринолитический фермент, а также выделен и секвенирован его ген [12]. Субтилизин BSF1 очищен до гомогенности в процедуре, состоящей из пяти этапов, с увеличением специфической активности в 4,97 раза и выходом 6,28 %, с помощью SDS-PAGE и гель-фильтрации установлена его молекулярная масса (28 кДа). Очищенный фермент проявлял высокую фибринолитическую активность на пластинах фибринового агара. Интересно, что BSF1 был высокоактивным в диапазоне pH от 7,0 до 12,0, с оптимумом при pH 9,0; относительные активности при pH 10,0 и 11 – соответственно 97,8 и 85,2 % от активности при pH 9,0. Оптимальная температура для активности данного фермента составляла 60 °С. Активность субтилизина BSF1 полностью терялась в присутствии фенолметилсульфонилфторида. Первые 11 аминокислот N-концевой последовательности очищенного фибринолитического фермента – AQSVPYGISQI. Выделен ген *bsf1*, кодирующий субтилизин BSF1, и определена последовательность ДНК. Ген *bsf1* состоит из 1146 пар нуклеотидов, кодирующих пре-про-протеин из 381 аминокислоты, объединенных в сигнальный пептид (29 аминокислот), про-пептид (77 аминокислот) и зрелый домен (275 аминокислот). Логически выведенная аминокислотная последовательность зрелого фермента BSF1 от-

личается от последовательности наттокиназы из *B. subtilis* natto и субтилизина DFE из *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 пятью и 39 аминокислотами соответственно.

Новый фибринолитический фермент, субтилизин QK, может расщеплять непосредственно сшивки фибрина *in vitro* [41]. При исследовании тромболитического действия субтилизина QK *in vivo* на модели тромба хвоста у мышей установлено, что после введения каррагинана тромб в группе, получавшей субтилизин QK, был короче, чем в группе, получавшей физиологический раствор, эффект зависел от дозы (тромб практически исчезал при дозе субтилизина QK 12000 МЕ). Это исследование заложило основу для дальнейшей разработки субтилизина QK в качестве нового бифункционального тромболитика.

В одном из ранних исследований [34] обнаружена и очищена до гомогенности эндопротеаза Agr – щелочная протеаза *Rhizopus* из культурального супернатанта изолята *Rhizopus microspores* вариант ризоподиоформиса, полученного от нефатального случая риноорбитального мукормикоза. Определено 20 аминокислот N-концевой последовательности зрелого нативного фермента и выявлена высокая гомология с сериновыми протеазами подсемейства субтилизинов. SDS-PAGE показал, что молекулярная масса Agr составляет 33 кДа, а pI – 8,8. Agr протеолитически активна в отношении разнообразных субстратов, включая эластин, в широком диапазоне pH – от 6 до 12 – с оптимумом при pH 10,5. После инвазивного мукормикоза в образцах сыворотки от пациента, от которого был получен штамм *R. microspores* для данного исследования, определялись специфические антитела. Более того, при поисках факторов, участвующих в тромбозе как типичном осложнении мукормикоза, недавно продемонстрировано прокоагуляторное действие Agr. В совокупности эти данные подтверждают экспрессию Agr при риноорбитальном мукормикозе и подтверждают роль фермента в патогенезе данного заболевания.

Из Ба-бао Douchi, традиционной китайской пищи, получаемой на основе ферментированных соевых бобов, выделен *B. subtilis* DC33, продуцирующий новый фибринолитический фермент [38]. Используя комбинацию различных хроматографических стадий, новый фибрин-специфический фермент – субтилизин FS33 – был очищен до электрофоретической гомогенности. Оптимум температуры, pH и pI составляют 55 °С, 8,0 и 8,7 соответственно. Молекулярная масса, измеренная методом SDS-PAGE в восстановительных и невосстановительных условиях, составила 30 кДа. Уровень фибринолитической активности фермента примерно в шесть раз выше, чем у

субтилизина Карлсберг. Первые 15 аминокислотных остатков N-концевой последовательности – AQSVPYGIPQIKAPA – отличаются от последовательности других известных фибринолитических ферментов. Амидолитическая активность субтилизина FS33 полностью ингибировалась 5 мМ фенолметансульфонилфторида и 1 мМ ингибитора соевого трипсина, однако 1,4-дифторотриптол, бетамеркаптоэтанол и р-гидроксимеркурийбензоат на активность фермента никак не влияли, что указывает на важность серина и триптофана в активном центре фермента. Наибольшая аффинность субтилизина FS33 была в отношении N-Succ-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA. Таким образом, этот фермент может быть отнесен к субтилизин-подобным сериновым протеазам. FS33 обладал наивысшей расщепляющей способностью в отношении Вβ- и Аα-цепей фибрина и фибриногена и также воздействовал на тромботические и фибринолитические факторы крови, такие как плазминоген, урокиназа, тромбин и калликреин. Таким образом, субтилизин FS33 способен расщеплять сгустки фибрина двумя способами: как образуя активный плазмин из плазминогена, так и путем прямого фибринолиза. Однако его безопасность в части развития геморрагического синдрома весьма сомнительна.

В одной из ранних работ [17] показано, как из Темпе, индонезийской ферментированной сои, была выделена бактерия TP-6, которая вырабатывает сильную фибринолитическую протеазу и, как было установлено, является *B. subtilis*. Эта протеаза TPase была очищена до гомогенности фракционированием сульфатом аммония и хроматографией на октилсефарозе и SP-сефарозе. Определена молекулярная масса этого фермента (27,5 кДа), N-концевая аминокислотная последовательность, а кодирующий ее ген был клонирован и секвенирован. В результате установлено, что TPase является сериновой протеазой семейства субтилизина, в зрелой форме состоящей из 275 аминокислотных остатков. Его кажущиеся K_m и V_{max} для синтетического субстрата N-сукцинил-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA составила 259 мкМ и 145 мкмоль/(мг × мин) соответственно. Схема расщепления фибриногена, обусловленного TPase, как функция от времени была схожа с наблюдаемой для плазмина. Кроме того, анализ N-концевой аминокислотной последовательности продуктов расщепления фибриногена показал, что TPase расщепляет Glu (или Asp) рядом с гидрофобными кислотами, такими как сайт P1 в α- и β-цепях фибриногена, с образованием фрагментов D', E' и D', аналогичных образуемым плазмином. На богатых плазминогеном фибриновых пластинах TPase не активировала лизис фибрино-

вого сгустка. Более того, фермент конвертировал активный ингибитор-1 активатора плазминогена в латентную форму.

Интерес к субтилизином обнаруживается и в фундаментальных биологических науках, особенно в части изучения регенеративных и репродуктивных феноменов. Показано, что старение предполагает повышенную экспрессию протеаз, которые могут участвовать в кругообороте азота или проведении сигналов в клетке. В работе Martinez et al. [24] изучены 2D-зимограммы, на которых выявлены два вида белка, увеличивающих протеолитическую активность в стареющих листьях *Arabidopsis thaliana*.

В 80-х годах прошлого столетия стали появляться статьи японских ученых об изучении субтилизинов, полученных путем ферментации бобов штаммом *B. subtilis*, вариант patto, который в Японии называется натто-кин. В процессе ферментации происходит наработка протеолитических ферментов, наиболее важным из которых является сериновая протеиназа – наттокиназа [15, 35]. В исследовании [40] установлено, что *B. subtilis* TKU007 продуцирует наттокиназу, которая может рассматриваться как новая основа для тромболитических препаратов. Из культурального супернатанта *B. subtilis* TKU007 выделена наттокиназа BSN1, очищенная до гомогенности трехступенчатой процедурой с 515-кратным увеличением специфической активности и 12%-м выходом. Молекулярная масса BSN1, определенная SDS-PAGE и методом гель-фильтрации, составила около 30 кДа. Результаты пептидного картирования показали, что четыре триптических пептида BSN1 идентичны наттокиназе из *B. subtilis* (GenBank gi14422313) с 37%-м покрытием последовательности. N-концевая аминокислотная последовательность из 12 остатков представляет собой AQSVPYGISQIK. Оптимальный pH, оптимальная температура, pH-стабильность и термальная стабильность BSN1 составили 8, 40 °C, 4–11 и менее 50 °C соответственно. Фермент полностью ингибировался фенолметилсульфонилфторидом, указывая на то, что BSN1 – это сериновая протеаза.

В работах, опубликованных более 10 лет назад, уже есть сообщения о перспективах использования субтилизинов в медицине [2, 6, 8, 10, 15, 18, 19, 27–30, 36]. Однако экспериментальные исследования не перешли к практическому применению. Первые публикации о медицинском применении субтилизинов относятся к 2009 г. [4, 3, 7, 9, 11], в них представлены доклинические и клинические исследования тромболитического действия субтилизина, входящего в состав инновационного отечественного лекарственного препарата Тромбовазим®.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балабан Н.П., Шарипова М.Р. Практическое применение бациллярных протеаз // Учен. зап. Казан. гос. ун-та. сер. Естеств. н. 2011. 153. (2). 29–40.
2. Балабан Н.П., Шарипова М.Р., Ицкович Е.Л. и др. Секретируемая сериновая протеиназа спорообразующих бактерий *Bacillus intermedius* 3-19 // Биохимия. 1994. 52. (9). 1093–1099.
3. Верецагин Е.И., Кинит Д.Н., Мадонов П.Г. и др. Клиническая эффективность нового отечественного тромболитического препарата Тромбовазим // Человек и лекарство: сб. мат. XVI Рос. конгр. М., 2009. 629.
4. Верецагин Е.И., Кинит Д.Н., Мадонов П.Г. и др. Фармакокинетика, антитромботический и тромболитический эффект нового отечественного перорального препарата Тромбовазим // Человек и лекарство: сб. мат. XVI Рос. конгр. М., 2009. 629–630.
5. Данилова Ю.В., Черемин А.М., Замалева А.И. и др. Тромболитическая и фибринолитическая активность бактериальных протеаз // Клеточ. трансплантол. и тканев. инженерия. 2012. 7. (3). 49–51.
6. Ицкович Е.Л., Лютова Л.И., Балабан Н.П. и др. Тромболитические и антикоагулянтные свойства тиолзависимой сериновой протеиназы *Bacillus intermedius* 3-19 // Вопр. мед. химии. 1998. (3). 288–291.
7. Кинит Д.Н., Верецагин Е.И., Мадонов П.Г. и др. Эффективность препарата Тромбовазим в лечении хронической венозной недостаточности // Человек и лекарство: сб. мат. XVI Рос. конгр. М., 2009. 127–128.
8. Лютова Л.В., Андреев Г.В., Карабасова М.А. и др. Исследование тромболитических свойств тиолзависимой сериновой протеиназы (ТСП) из *Thermoactinomyces vulgaris* in vivo // Прикл. биохимия и микробиол. 1990. 26. (5). 623–628.
9. Плотников М.Б., Дыгай А.М., Алиев О.И. и др. Анти тромботический и тромболитический эффект нового отечественного протеолитического препарата Тромбовазим // Бюл. эксперим. биол. и мед. 2009. 147. (4). 418–421.
10. Руденская Г.Н., Лютова Л.В., Андреев Г.В. и др. Исследование фибринолитических и тромболитических свойств тиолзависимой сериновой протеиназы из *Thermoactinomyces vulgaris* in vitro // Прикл. биохимия и микробиол. 1987. 23. (6). 754–760.
11. Трофимов А.О., Кравец Л.Я. К вопросу о фибринолизе при внутричерепных кровоизлияниях // V съезд нейрохирургов России: матер. съезда. Уфа: Здравоохранение Башкортостана. 2009. 464.
12. Agrebi R., Haddar A., Hmidet N. et al. SF1 fibrinolytic enzyme from a marine bacterium *Bacillus subtilis* A26: Purification, biochemical and molecular characterization // Process Biochem. 2009. 44. (11). 1252–1259.
13. Bi Q., Han B., Feng Y. et al. Antithrombotic effects of a newly purified fibrinolytic protease from *Urechis unicinctus* // Thromb. Res. 2013. 132. (2). e135–e144.
14. Choi D.B., Cha W.-S., Park N. et al. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from fruiting bodies of Korean *Cordyceps militaris* // Bioresour. Technol. 2011. 102. (3). 3279–3285.
15. Fujita M., Nomura K., Hong K. et al. Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto, a popular soybean fermented food in Japan // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1993. 197. (3). 1340–1347.
16. Kim D.-W., Sapkota K., Choi J.-H. et al. Direct acting anti-thrombotic serine protease from brown seaweed *Costaria costata* // Process Biochem. 2013. 48. (2). 340–350.
17. Kim S.B., Lee D.W., Cheigh C.I. et al. Purification and characterization of a fibrinolytic subtilisin-like protease of *Bacillus subtilis* TP-6 from an Indonesian fermented soybean, Tempeh // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2006. 33. (6). 436–444.
18. Kim W., Choi K., Kim Y. et al. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4 screened from chungkookjang // Appl. Environ. Microbiol. 1996. 62. (7). 2482–2488.
19. Ko J.H., Yan J.P., Zhu L. et al. Identification of two novel fibrinolytic enzymes from *Bacillus subtilis* QK02 // Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 2004. 137. (1). 65–74.
20. Kotb E. Activity assessment of microbial fibrinolytic enzymes // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2013. 97. (15). 6647–6665.4
21. Mahajan P.M., Nayak S., Lele S.S. Fibrinolytic enzyme from newly isolated marine bacterium *Bacillus subtilis* ICTF-1: Media optimization, purification and characterization // J. Biosci. Bioeng. 2012. 113. (3). 307–314.
22. Majumdar S., Sarmah B., Gogoi D. et al. Characterization, mechanism of anticoagulant action, and assessment of therapeutic potential of a fibrinolytic serine protease (Brevithrombolase) purified from *Brevibacillus brevis* strain FF02B // Biochimie. 2014. 103. 50–60.
23. Mander P., Cho S.S., Simkhada J.R. et al. A low molecular weight chymotrypsin-like novel fibrinolytic enzyme from *Streptomyces* sp. CS624 // Proc. Biochem. 2011. 46. (7). 1449–1455.
24. Martinez D.E., Borniego M.L., Battchikova N. et al. SASP, a Senescence-Associated Subtilisin Protease, is involved in reproductive development and determination of silique number in *Arabidopsis* // J. Exp. Bot. 2015. 66. (1). 161–174.
25. Montriwong A., Rodtong S., Yongsawatdigul J. Detergent-Stable Salt-Activated Proteinases from *Virgibacillus halodenitrificans* SK1-3-7 Isolated from

- Fish Sauce Fermentation // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2015. 176. (2). 505–517.
26. Mukherjee A.K., Rai S.K., Thakur R. et al. Bafibrinase: A non-toxic, non-hemorrhagic, direct-acting fibrinolytic serine protease from *Bacillus* sp. strain AS-S20-I exhibits in vivo anticoagulant activity and thrombolytic potency // *Biochimie.* 2012. 94. (6). 1300–1308.
27. Peng Y., Huang Q., Zhang R. et al. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 screened from douchi, a traditional Chinese soybean food // *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 2003. 134. (1). 45–52.
28. Peng Y., Yang X., Zhang Y. Microbial fibrinolytic enzymes: an overview of source, production, properties, and thrombolytic activity in vivo // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2005. 69. (2). 126–132.
29. Peng Y., Yang X.-J., Xiao L. et al. Cloning and expression of a fibrinolytic enzyme (subtilisin DFE) gene from *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 in *Bacillus subtilis* // *Res. Microbiol.* 2004. 155. (3). 167–173.
30. Popović T., Puizdar V., Brzin J. A novel subtilase from common bean leaves // *FEBS Lett.* 2002. 530. (1-3). 163–168.
31. Simkhada J.R., Cho S.S., Mander P. et al. Purification, biochemical properties and antithrombotic effect of a novel *Streptomyces* enzyme on carrageenan-induced mice tail thrombosis model // *Thromb. Res.* 2012. 129. (2). 176–182.
32. Singh T.A., Devi K.R., Ahmed G. et al. Microbial and endogenous origin of fibrinolytic activity in traditional fermented foods of Northeast India // *Food Res. Int.* 2014. 55. 356–362.
33. Siritapetawee J., Thumanu K., Sojikul P. et al. A novel serine protease with human fibrino(geno)lytic activities from *Artocarpus heterophyllus* latex // *Biochim. Biophys. Acta.* 2012. 1824. (7). 907–912.
34. Spreer A., Rüchel R., Reichard U. Characterization of an extracellular subtilisin protease of *Rhizopus microsporus* and evidence for its expression during invasive rhinoorbital mycosis // *Med. Mycol.* 2006. 44. (8). 723–731.
35. Sumi H., Hamada H., Tsushima H. et al. A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto; a typical and popular soybean food in the Japanese diet // *Experientia.* 1987. 43. (10). 1110–1111.
36. Suzuki Y., Kondo K., Matsumoto Y. et al. Dietary supplementation of fermented soybean, natto, suppresses intimal thickening and modulates the lysis of mural thrombi after endothelial injury in rat femoral artery // *Life Sci.* 2003. 73. (10). 1289–1298.
37. Wang C., Ji B., Cao Y. et al. Evaluating thrombolytic efficacy and thrombus targetability of RGDS-liposomes encapsulating subtilisin FS33 in vivo // *Xue Gong Cheng Xue Za Zhi.* 2010. 27. (2). 332–336. [In Chinese].
38. Wang C.T., Ji B.P., Li B. et al. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme of *Bacillus subtilis* DC33, isolated from Chinese traditional Douchi // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2006. 33. (9). 750–758.
39. Wang S., Deng Z., Li Q. et al. A novel alkaline serine protease with fibrinolytic activity from the polychaete, *Neanthes japonica* // *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 2011. 159. (1). 18–25.
40. Wang S.-L., Wu Y.-Y., Liang T.-W. Purification and biochemical characterization of a nattokinase by conversion of shrimp shell with *Bacillus subtilis* TKU007 // *New Biotechnol.* 2011. 28. (2). 196–202.
41. Yan F., Yan J., Sun W. et al. Thrombolytic effect of subtilisin QK on carrageenan induced thrombosis model in mice // *J. Thromb. Thrombolysis.* 2009. 28. (4). 444–448.
42. Yuan J., Yang J., Zhuang Z. et al. Thrombolytic effects of Douchi fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis* LD-8547 in vitro and in vivo // *BMC Biotechnol.* 2012. 12. 36–45.

CHEMICAL AND PHARMACOLOGICAL PROPERTIES OF SUBTILISINS

**Pavel Gennadievich MADONOV^{1,2}, Svetlana Vladimirovna MISHENINA¹,
Dmitri Nikolaevich KINSHT^{1,2}, Nataliya Vladimirovna KIKHTENKO²**

¹ *Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia
630091, Novosibirsk, Krasny av., 52*

² *LLC «Scientific Future Management»
630559, Novosibirsk district., settlement Koltsovo, Tekhnoparkovaya str., 10*

Subtilisins are a class of hydrolases proteolytic enzymes produced by the bacteria *Bacillus subtilis*. The study of the chemical and pharmacological properties of subtilisin has been actively conducted the last 20 years. The interest has been caused by the presence of subtilisin fibrinolytic, thrombolytic and anticoagulation action. In this case, separated subtilisins show different fibrinolytic activity, and some of them are even more active than urokinase. Subtilisins effect does not have site-specificity and is directed to those proteins that have lost native globular structure (e.g., fibrinogen, into fibrin turned). It is known that the population of Japan, China and North East India are characterized by the lowest risk of heart diseases and dementia, perhaps this is due to the high content of fibrinolytic enzymes in traditional food (nattokinase from soybeans). Despite the large number of experimental studies, the subtilisins practical use in medicine remains limited. The only registered drug for thrombosis treatment is Russian medicine Trombovazim® created in 2009 and based on immobilized subtilisin.

Key words: proteolytic enzymes, subtilisins, serine proteases, fibrinolytic activity, anticoagulant potential.

Madonov P.G. – doctor of medical sciences, professor, head of the chair for pharmacology, clinical pharmacology and evidentiary medicine, e-mail: madonov@scpb.ru

Mishenina S.V. – candidate of medical sciences, associated professor of the chair for pharmacology, clinical pharmacology and evidentiary medicine

Kinsht D.N. – doctor of medical sciences, professor, head of the chair for pharmacology, clinical pharmacology and evidentiary medicine

Kikhtenko N.V. – researcher