



УДК 577.152.02

## ПОРОГОВЫЙ МЕХАНИЗМ КОНТРОЛЯ КАСКАДНОГО ПРОТЕОЛИЗА

© 1998 г. И. Г. Щербак\*

*Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова,  
кафедра биохимии*

*197022, филиал 1, Санкт-Петербург, ул. Л.Толстого, 6/8*

*Поступила в редакцию 04.12.97 г. Принята к печати 22.01.98 г.*

Исследована зависимость скорости иммунного лизиса эритроцитов от концентрации отдельных компонентов системы комплемента. Установлено, что для компонента C1 (но не C3), факторов В и D лизис клеток наступает только после превышения некоторой “пороговой” концентрации исследуемого компонента в пробе. Установлено, что в экспериментальных условиях пороги для факторов D и В в молярном исчислении соответственно в 5 и 20 раз превышают пороговую концентрацию для компонента C1. Множественность и различная высота порогов создают возможность фрагментарной активации каскадного протеолиза на участке между соседними порогами, без достижения конечного эффекта системы в целом (лизис клеток, формирование тромба и т.д.). Образующиеся при этом продукты (“побочные” пептиды) могут обладать собственной биологической активностью. По-видимому, именно продуцирование различных биорегуляторов является главным предназначением каскадных протеолитических систем при функционировании их в допороговом режиме.

*Ключевые слова: протеолиз, регуляция; система комплемента; гемокоагуляция; фибринолиз.*

Известно, что контроль метаболической цепи основан обычно на регуляторных свойствах лимитирующего (ключевого) фермента, особенно на его чувствительности к аллостерическим эффектам собственного субстрата и/или продукта, — непосредственного либо отдаленного. Это позволяет, в частности, математически просчитывать параметры системы в различных условиях, моделируя ее функциональное состояние в тех или иных физиологических или экстремальных ситуациях (например, [1, 2]).

Эта общая закономерность не может быть распространена на каскадные протеолитические системы, так как в них субстратами протеиназ являются белки самого каскада, и прежде всего его проферментные звенья. Поэтому такие каскады в отличие от иных мультиферментных систем реализуют свою физиологическую функцию не иначе, как путем саморазрушения, т.е. истощения собственных проферментных компонентов (образующиеся из них активные формы протеиназ тоже обычно очень недолговечны [3–6]).

К наиболее изученным протеолитическим каскадам относятся системы свертывания крови, фибринолиза, комплемента. Их конечной функцией принято считать соответственно защиту от

кровопотерь, предотвращение внутрисосудистого тромбообразования и иммунный лизис чужеродных клеток. Истощение таких систем в процессе функционирования (“активации”) — давно известный факт [7]. Однако его роль в механизмах (само)регуляции оставалась недооцененной. Между тем феномен истощения делает для систем каскадного протеолиза неприемлемым понятие “ключевой фермент” в его обычной трактовке. Именно это стало одной из причин того, что в очень обстоятельной работе [8] применение традиционных приемов не позволило явственно выявить “лимитирующие” звенья в системе комплемента.

Сам принцип каскадности обеспечивает возможность быстрого усиления первоначально слабого “сигнала” с лавинообразным нарастанием количества активных протеиназ на каждой ступени каскада. В результате на последней из них “вдруг” возникает конечный эффект (например, превращение фибриногена в фибрин и формирование кровяного сгустка). Очевидно, должны существовать какие-то механизмы, которые защищали бы каскад от безудержного саморазрушения. Их можно представить себе в виде барьера на пути лавинообразного усиления каскадного процесса. Такого рода препятствия призваны “гасить” процесс при умеренной степени его активации, но пропускать достаточную часть лавины дальше, если ее мощность превзойдет контроль-

\* Тел.: 238-71-53; факс: (812) 234-01-25, e-mail: igshc@spmu.rssi.ru.

ную отметку. Целесообразно назвать такие барьеры порогами, попытаться их выявить и по возможности количественно оценить.

В качестве объекта исследования была избрана система комплемента. Ее преимущества состоят в том, что конечный эффект – лизис эритроцитов – достаточно просто регистрировать в динамике и с высокой точностью, используя фотометрическую аппаратуру. Очищенные препараты отдельных компонентов альтернативного пути активации комплемента выделяли в нашей лаборатории из сыворотки крови человека известными методами [9–11]. Из нее же получали и реагенты – путем избирательного удаления соответствующего компонента комплемента [11, 12]. Динамику комплементзависимого лизиса клеток регистрировали по изменению светопоглощения при 800 нм в термостатированной (37°C) инкубационной смеси, содержащей мидиналовый буфер (рН 7.4), точно отмеренные количества изучаемого компонента, заведомый избыток остальных компонентов комплемента (в определенном объеме соответствующего реагента), а также стандартную порцию эритроцитов кролика или сенсibilизированных эритроцитов барана [10]. Скорость лизиса оценивали по тангенсу угла наклона касательной, проведенной в точке наибольшей крутизны графика убыли клеток.

Первые эксперименты были проведены с очищенными факторами В и D альтернативного пути активации комплемента. Зависимость скорости лизиса эритроцитов кролика от количества добавленного в среду фактора в обоих случаях оказалась нелинейной и похожей на кривую с насыщением, не проходящую через начало координат [12]. При экстраполяции каждая из кривых отсекала на оси абсцисс отрезок, характеризующий то минимальное количество исследуемого фактора в пробе, превышение которого является необходимым условием для начала эффективной работы всей системы комплемента в целом. Этот параметр мы назвали “пороговой” концентрацией исследуемого фактора [12], поскольку при более низких его количествах в испытуемой смеси комплементзависимый лизис вообще не обнаруживается даже при очень продолжительной инкубации.

Аналогичные результаты получены и в опытах с очищенным препаратом первого компонента системы комплемента (C1). На рис. 1 представлены данные двух серий экспериментов, проведенных с применением одного препарата C1, но двух разных реагентов к нему: R(C1) – полученного в нашей лаборатории (кривая 1) и коммерческого (кривая 2). В качестве инициатора активации комплемента по классическому пути были использованы сенсibilизированные эритроциты барана. Как видно, в каждой из серий отчетливо

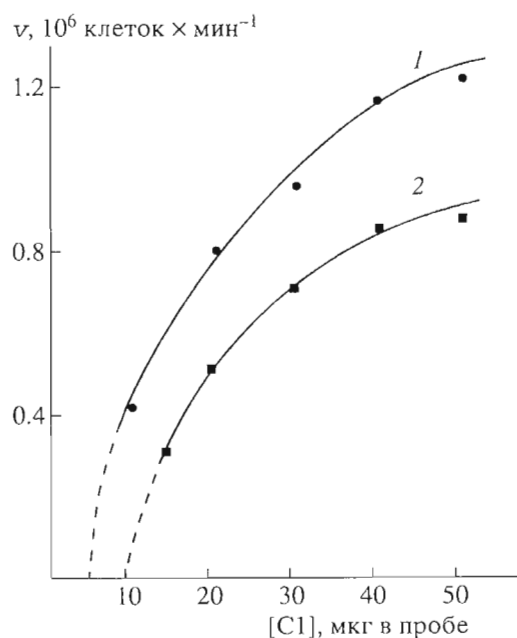


Рис. 1. Зависимость скорости иммунного лизиса эритроцитов барана ( $v$ ) от концентрации компонента C1 системы комплемента человека в присутствии R(C1) – реагента собственного приготовления (1) или коммерческого реагента R(C1) (2). Условия см. в “Экспер. части”.

выявляется пороговая концентрация компонента C1, которую можно оценить экстраполяцией кривых к абсциссе. Вместе с тем разные реагенты давали различающиеся значения величины пороговой концентрации компонента C1. Такой же эффект отмечен и при определении пороговой концентрации фактора В с помощью разных реагентов R(B), а также фактора D – с разными реагентами к нему [12].

Эффект влияния способа приготовления реагента (и его источника) на регистрируемую величину пороговой концентрации изучаемого компонента каскада вполне понятен, так как высоту порога (его мощность) определяет не собственно исследуемый компонент, а набор всех тех элементов, которые способны блокировать определенное количество активной протеиназы и сосредоточены, по условиям эксперимента, именно в реагенте. К их числу относятся прежде всего соответствующие ингибиторы и инактиваторы, т.е., строго говоря, внекаскадные факторы [13, 14]. Именно их совокупный потенциал и определяет в основном мощность (высоту) порога для исследуемого компонента, который является лишь мерилем высоты порога (его мощности). Иными словами, если для какого-то компонента каскадного процесса регистрируется пороговая концентрация, то она является количественной характеристикой суммарного потенциала (совокупной мощ-

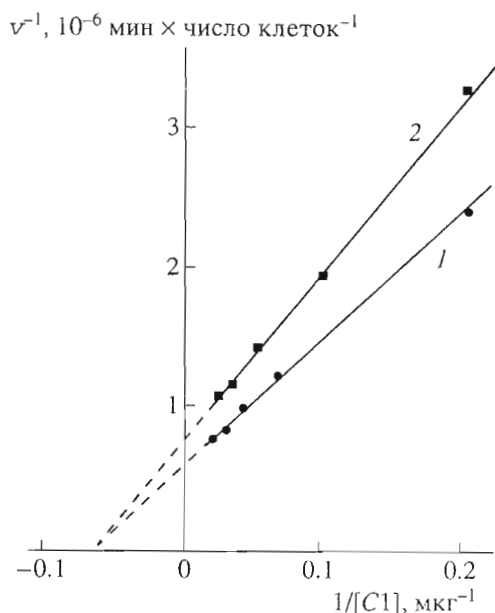


Рис. 2. Данные рис. 1 в системе двойных обратных величин, рассчитанных после внесения поправки на пороговую концентрацию для каждой кривой.

ности) соответствующих ингибиторов и ингибиторов. А этот потенциал, естественно, может быть различным в разных препаратах реагента к данному компоненту каскада, что и подтверждается в эксперименте.

Следует отметить, что пороговая концентрация выявляется не для каждого компонента каскада комплемента. В частности, график зависимости скорости лизиса эритроцитов кролика от концентрации компонента С3 во всех случаях экстраполируется к началу координат [12].

Обнаружение пороговых концентраций позволило разработать новые подходы к энзимологической характеристике каскадных протеолитических систем. Один из них основан на внесении поправки на пороговую концентрацию. Если вычесть ее из общей концентрации изучаемого компонента в среде, то получим величину, которую можно обозначить как его эффективную концентрацию. По существу эта процедура означает смещение ординаты на рис. 1 к точке пересечения абсциссы с экстраполированным графиком. Тогда экспериментальные кривые могут быть линеаризованы в координатах двойных обратных величин. Это показано на рис. 2, где представлены данные рис. 1 (после внесения поправки на пороговую концентрацию для каждой кривой). Аналогичная линеаризация получена и при обработке экспериментальных данных для факторов В и D, описанных в предыдущей публикации [12].

Линейность полученных графиков свидетельствует в пользу корректности осуществленных

подходов. В частности, она подтверждает сам факт наличия пороговых концентраций факторов В и D, а также компонента С1. Более того, становится возможным по конечному эффекту протеолитического каскада в целом характеризовать изучаемое пороговое звено такими константами, как максимальная скорость процесса ( $V_{\max}$ ) и условная константа Михаэлиса ( $K_m$ ). В наших экспериментах количество клеток-мишеней (10–20 млн. эритроцитов в пробе) на несколько порядков уступало числу мембраноатакующих комплексов, которое могло формироваться в используемом растворе при избытке реагента (0.2 мл) даже при минимальных (пороговых) концентрациях изучаемого компонента комплемента. Это соответствует условиям значительного преобладания начальной концентрации фермента над концентрацией конечного субстрата (эритроцитов). В такой ситуации кинетические зависимости становятся симметричными классическому уравнению Михаэлиса–Ментен относительно концентраций реагирующих веществ [15]. Линейные графики на рис. 2 отсекают на оси ординат величину, обратную значению  $V_{\max}$ , которое характеризует максимально возможную скорость лизиса в системе, не лимитируемую исследуемым фактором (в данном случае компонентом С1) и зависящую от особенностей состава реагента к нему. С другой стороны, точка пересечения графиками абсциссы позволяет рассчитать значение кажущейся  $K_m$ . Оно, как видно из рис. 2, не зависит от используемого реагента и характеризует только свойства изучаемого компонента (здесь – С1) – очевидно, степень его сродства к тем белкам сыворотки, взаимодействие с которыми вносит определяющий вклад в реализацию конечного эффекта (лизис эритроцитов).

Оценка пороговых концентраций и определение на этой основе кинетических характеристик исследуемого компонента каскадной протеолитической системы позволяют осуществлять стандартизацию очищенных препаратов и реагентов к ним. Кроме того, изучение влияния различных веществ на величины  $K_m$  и  $V_{\max}$  позволяет уточнить механизм действия различных эффекторов и давать ему количественную оценку [16].

Каскадные протеолитические системы уникальны в том, что их естественный катаболизм и реализация их физиологической функции в виде конечного эффекта представляют собой один и тот же процесс молекулярных превращений. Разница лишь в интенсивности этого процесса. Пороговый механизм разграничивает два уровня активации каскадного протеолиза. При достаточно выраженном сигнале со стороны инициирующего фактора степень активации системы превзойдет критическую отметку мощности порога, благодаря чему возможна реализация конечной функции – такой, как лизис чужеродных клеток или

гемокоагуляция. Допороговый же уровень активации ведет к распаду всех компонентов каскада, компенсируемому их ресинтезом в рибосомах. Такое непрерывное обновление макромолекул протеолитической системы, очевидно, необходимо для обеспечения ее постоянной готовности к срочному срабатыванию с последующим быстрым восполнением израсходованных белков.

Для отграничения допорогового уровня активности каскадного протеолиза (естественный катаболизм системы) от интенсивности, необходимой для реализации конечного эффекта, достаточно было бы одного порога для каждой системы. Однако обнаруженная нами множественность порогов в рамках одного протеолитического каскада наводит на мысль, что допороговый режим нужен не только для обновления системы и поддержания ее в состоянии "свежей" готовности. Очевидно, возможна фрагментарная активация системы на участке между двумя соседними порогами. Поэтому интересно сопоставить мощность разных пороговых звеньев. В таблице даны результаты соответствующих расчетов, сделанных на основе наших экспериментов с одним и тем же препаратом каждого исследованного компонента комплемента и разными реагентами к нему.

Как видно из таблицы, в расчете на молярные концентрации величина порога оказалась наименьшей для компонента C1. Для фактора D она была в среднем в 5 раз выше, а для фактора B это различие достигало примерно 20-кратного уровня. Однако гораздо интереснее сопоставление с известными из литературы данными о концентрациях компонентов комплемента в сыворотке крови здоровых доноров. Для компонента C1 она составляет в среднем 0.28 мкМ [17], для фактора B – 2.2 мкМ [18], для фактора D – около 0.1 мкМ [19]. Следовательно, чтобы преодолеть порог и обеспечить конечный эффект в виде комплементзависимого лизиса клеток, необходимо достаточно быстро проактивировать 10–20% имеющихся в сыворотке предшественников активного компонента C1 и в то же время почти половину присутствующего в ней фактора B. Что же касается фактора D, который циркулирует в плазме крови только в активной форме [20], то его пороговая концентрация ориентировочно вдвое выше реального содержания в крови. Следовательно, степень активации альтернативного пути комплемента, которая достаточна для обеспечения иммунного лизиса клеток, может быть достигнута только посредством снижения порогов, сдерживающих эффекты тех продуктов, образование которых катализирует фактор D. К такому результату может приводить, например, известная стабилизация конвертазных комплексов альтернативного пути активации комплемента [4, 21].

Мощность выявленных пороговых звеньев системы комплемента

Единицы измерения пороговых концентраций	Компоненты комплемента		
	C1	Фактор B	Фактор D
мкг в пробе	5–10 (по рис. 1)	16.8–19.2 [12]	0.88–1.32 [12]
нмоль/мл сыворотки-реагента	0.034–0.067	0.93–1.07	0.18–0.27
$C_n/C_c^*$ , %	12–24	42–49	170–260
Соотношение молярных пороговых концентраций	1	~20	5

\* Отношение пороговой концентрации компонента комплемента и его средней концентрации в нативной сыворотке.

Приведенные в таблице количественные параметры не следует абсолютизировать. Они получены в конкретных условиях наших экспериментов (4-кратное разведение сыворотки крови, применение стандартной порции эритроцитов и т.д.) и вряд ли могут быть прямо экстраполированы, например, к цельной сыворотке или плазме крови. Тем не менее сам факт существования весо-вых различий в мощности выявленных пороговых звеньев представляется вполне достоверным.

Можно утверждать, что каскадный протеолиз – это каскад порогов. Множественность и разная мощность пороговых звеньев единого каскада открывают возможность изолированной активации фрагмента, заключенного между соседними порогами. Такая фрагментарная активация, осуществляемая в допороговом режиме работы системы в целом, не приводит к реализации конечной функции всего каскада и может быть названа незавершенной (прерванной) активацией. При этом неизбежно появляются соответствующие продукты протеолиза. Изначально они были названы побочными пептидами. Со временем некоторые из них удалось идентифицировать в качестве носителей уже известной биологической активности, как это произошло с анафилатоксинами. Весьма вероятно, что и многим другим продуктам "незавершенной" активации присущи свои специфические функции. Об этом могут свидетельствовать, в частности, результаты последних исследований системы пламиноген/плазмин. Как оказалось, помимо общеизвестной "конечной" функции, заключающейся в расщеплении фибрина, эта система участвует также в реализации столь различных процессов, как ремоделирование костной ткани [22], инвазия раковых клеток [23, 24], прорастание кровеносных сосудов [25]. Для комплемента тоже обнаруживаются новые проявления его функциональной активности. Так, установлено, что клетки нейроглии вырабатывают полный набор компонентов комплемен-

та, который вносит свой вклад в патогенез таких неврологических расстройств, как рассеянный склероз и болезнь Альцгеймера, причем для этого не обязательно участие иммуноглобулинов [26].

Обобщая вышеизложенное, можно заключить, что допороговый режим является не просто отражением естественного метаболизма (обновления) компонентов протеолитического каскада, а выполняет целый спектр специальных функций, реализуемых посредством активации межпороговых фрагментов системы.

В ходе эволюции закрепился определенный темп обновления элементов каждого протеолитического каскада, учитывающий некий средний уровень расхождений на защиту от кровопотери при травмах, на "обезвреживание" чужеродных антигенов, на предотвращение внутрисосудистого тромбообразования, стимулируемого интенсивной мышечной работой и другими экстремальными ситуациями. Блага цивилизации в значительной мере ограждают современного человека от воздействия таких факторов. Тем самым создаются условия для развития состояния невосприимчивости защитных протеолитических систем. Не расходуясь по прямому назначению, эти каскады могут срабатывать на более слабые и менее специфичные стимулы. Тем самым создаются предпосылки для возникновения различных патологических процессов, включая реакции, которые принято относить к аллергическим.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы диэтилбарбитуровая кислота и ее натриевая соль (Serva, ФРГ); этиленгликоль-бис(β-аминоэтиловый эфир)-N,N'-тетрауксусная кислота (EGTA) (Sigma, США); CM-сефадекс С-50, DEAE-сефадекс А-50, ультрагели АсА 34 и АсА 22 (Pharmacia, Швеция); TSK Gel HW 60 (Toyo Soda, Япония); трис (Merck, ФРГ); набор реактивов для электрофореза в ПААГ (Reanal, Венгрия); ε-аминокапроновая кислота производства Олайнского завода химреактивов. Остальные применявшиеся реактивы были отечественного производства квалификации х.ч. или ч.д.а.

Суспензии эритроцитов кролика, сенсibilизированных эритроцитов барана, реагенты R(B) и R(D), вероналовые буферные системы готовили согласно методикам, приведенным в работах [9–11].

Получение факторов В и D из одной порции (около 200 мл) свежей донорской сыворотки крови производили методом Л.С.Солякова и Л.В. Козлова [11] с небольшими модификациями, описанными нами ранее [12]. Гомогенность полученных препаратов проверяли электрофорезом в ПААГ.

**Очистка нативного компонента С1 комплекса.** 100–200 мл свежей донорской сыворотки

подвергали диализу против 0.02 М трис-НСl-буфера (рН 7.4), содержащего 2 мМ CaCl<sub>2</sub>, в течение 18–24 ч на холоду. Образующийся осадок эуглобулиновой фракции отделяли центрифугированием при 10000g в течение 30 мин, а затем ресуспендировали в 0.02 М ацетатном буфере (рН 5.0), содержащем 1 мМ CaCl<sub>2</sub>. Полученную взвесь сразу же вновь центрифугировали 30 мин при 10000g. Осадок, остающийся после удаления жидкости, растворяли в небольшом объеме 0.02 М ацетатного буфера (рН 5.0), содержащего 1 мМ CaCl<sub>2</sub> и 0.2 М NaCl, центрифугировали (20000g, 30 мин), надосадочную жидкость подвергали гelfильтрации в том же буфере на колонке с ультрагелем АсА 22 (1.6 × 60 см) со скоростью 5–10 мл/ч или на колонке с TSK Gel HW 60 (2.6 × 60 см) со скоростью, в 2–4 раза большей. Выход составлял 30–45%, степень очистки – 720–940 при оценке ее по гемолитической активности в расчете на 1 мг белка. Препарат не содержал С4br-связывающего белка (судя по отсутствию угнетающего действия на классический путь активации компонента в донорских сыворотках) и не обнаруживал активности α-2-макроглобулина. Обработка его 10 мМ EDTA с последующей рехроматографией на колонке с ультрагелем АсА 22 в присутствии 10 мМ EDTA давала на хроматограмме только такие пики, которые соответствуют субкомпонентам С1.

**Получение реагента R(C1).** Надосадочную жидкость после отделения эуглобулиновой фракции при очистке С1 (первое центрифугирование) выдерживали при 0–2°C и подвергали двукратному центрифугированию (10000g, 30 мин) с интервалами 18–24 ч. Конечный супернатант был полностью лишен гемолитической активности и восстанавливал ее при добавлении препарата С1. В части экспериментов применяли коммерческий препарат R(C1) производства Кировского НИИ гематологии и переливания крови (НИИГПК).

**Определение гемолитической активности** производили кинетическим методом [27], основанным на регистрации динамики светопоглощения при 800 нм в ходе иммунного лизиса эритроцитов, осуществляемого в термостатированной (37°C) кювете спектрофотометра. При оценке гемолитической эффективности препаратов С1 инкубационную смесь готовили из 2.5 мл вероналового буфера, содержащего ионы кальция и магния [10]; 5–50 мкг очищенного препарата нативного С1 в 0.2 мл того же буфера, а также 0.2 мл реагента R(C1). После 3 мин прогревания начинали процесс лизиса добавлением 0.1 мл стандартной взвеси сенсibilизированных эритроцитов барана (22 млн. клеток). В экспериментах по изучению скорости альтернативного пути активации компонента инкубационную смесь готовили из 0.4 мл вероналового буфера, содержащего EGTA и ионы магния [9]; 0.1 мл того же буфера, содер-

жащего разные количества факторов В или D комплемента; 0.2 мл реагента, дефицитного по исследуемому компоненту (соответственно R(B) или R(D)). Лизис клеток запускали после 3 мин прогревания смеси добавлением 0.1 мл стандартной смеси эритроцитов кролика (около 10 млн. клеток).

**Скорость иммунного лизиса ( $v$ )** оценивали по величине тангенса угла наклона касательной в точке наибольшей крутизны сигмоидной кривой динамики убыли клеток во времени и выражали в млн. клеток/мин.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Heinrich R., Rapoport T.A. // Eur. J. Biochem. 1974. V. 42. P. 89–95.
2. Гачок В.П. Странные аттракторы в биосистемах. Киев: Наук. думка, 1989. 240 с.
3. Ziccardi R.J. // Springer-Semin. Immunopathol. 1983. V. 6. P. 213–230.
4. Fishelson Z., Muller-Eberhard H.J. // Mol. Immunol. 1983. V. 20. P. 309–315.
5. Fishelson Z., Muller-Eberhard H.J., Pangburn M.K. // J. Immunol. 1984. V. 132. P. 1430–1434.
6. Nagasawa S., Kobayashi C., Maki-Suzuki T., Yamashita N., Koyama J. // J. Biochem. 1985. V. 97. P. 493–499.
7. Кэбот Е.А., Мейер М.М. Экспериментальная иммунохимия. М.: Медицина, 1968. 684 с.
8. Nielsen H., Larsen S.O., Vikingsdottir T. // Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. 1992. V. 100. P. 1053–1060.
9. Козлов Л.В., Соляков Л.С. // Биоорган. химия. 1982. Т. 8. С. 342–348.
10. Козлов Л.В., Крылова Ю.И., Чих В.П., Молчанова Н.Н. // Биоорган. химия. 1989. Т. 8. С. 652–659.
11. Соляков Л.С., Козлов Л.В. // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. С. 462–469.
12. Галевская Л.В., Щербак И.Г., Бельтюков П.П., Рюмина Е.В., Соловцова И.Л. // Биохимия. 1993. Т. 58. С. 1796–1800.
13. Галевская Л.В., Щербак И.Г., Бельтюков П.П., Дорофейков В.В. // Биохимия. 1995. Т. 60. С. 668–677.
14. Галевская Л.В. // Укр. биохим. журн. 1996. Т. 68. С. 26–35.
15. Березин И.В., Клесов А.А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. Изд. Моск. ун-та, 1976. 320 с.
16. Бельтюков П.П. Исследование ферментативных свойств факторов В и D альтернативного пути активации комплемента. Автореф. дис. канд. мед. наук. Л.: I Ленингр. мед. ин-т, 1988. 18 с.
17. Cooper N.R. // Adv. Immunol. 1985. V. 37. P. 151–216.
18. Ogtesby T.J., Ueda A., Volanakis J.E. // J. Immunol. Meth. 1988. V. 110. P. 55–62.
19. Truedsson L., Sturfelt G. // J. Immunol. Meth. 1983. V. 63. P. 207–214.
20. Kim S., Narajana S.V.L., Volanakis J.E. // Biochemistry. 1994. V. 33. P. 14393–14399.
21. Галевская Л.В., Рюмина Е.В., Бельтюков П.П., Щербак И.Г., Власова Т.В., Богомаз Т.А. // Иммунология. 1991. № 3. С. 45–47.
22. Allan E.H., Martin T.J. // Clin. Orthopaed. Rel. Res. 1995. V. 313. P. 54–63.
23. Moller L.B. // Blood Coagul. Fibrinol. 1993. V. 4. P. 293 – 303.
24. Rappot H., Brunner N. // Lung Cancer. 1995. V. 12. P. 1 – 12.
25. Thorgeirsson U.P., Lindsay C.K., Cottam D.W., Gomez D.E. // J. Neuro-Oncology. 1993. V. 18. P. 89–193.
26. Barnum S.R. // Crit. Rev. Oral Biol. Med. 1995. V. 6. P. 132 -146.
27. Халяпин Б.Д., Прокопьев А.А. // Иммунология. 1986. № 3. С. 66–69.

## The Threshold Mechanism of the Cascade Proteolysis Control

I. G. Shcherbak\*

*Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Department of Biochemistry,  
ul. L. Tolstogo 6/8, St. Petersburg, 197022 Russia*

The immune lysis rate of erythrocytes vs. the concentration of particular complement components was studied. It was found that in the presence of component C1 (but not C3) and factors B and D, the cells undergo lysis after the concentration of these compounds exceeds a "threshold" value. The threshold molar concentrations of factors D and B exceeded 5- and 20-fold, respectively, that of component C1. The multiplicity and different capacities of the thresholds allow the fragmentary activation of cascade proteolysis at stretches between neighboring thresholds without the total realization of the final effect of the system (cell lysis, clot formation, etc.). The resulting peptideby-products (bypass peptides) may possess their own biological activity. It is the generation of various bioregulators that appears to be the main function of the cascade proteolytic systems functioning in the subthreshold regime.

*Key words: proteolysis, regulation, complement, blood clotting, fibrinolysis*

\* Phone: (+7-812) 238-7153; fax: (+7-812) 234-0125; e-mail: igshc@spmu.rssi.ru.