

**СУББОТИНА Т. Ф., ЖЛОБА А. А.,
ЛУПАН Д. С., БОГОВА В. А., КУШЕЛЕВА О. А.**
Модулирование фибринолиза основными

карбоксипептидазами крови

Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова
e-mail:

Реферат

Основные карбоксипептидазы крови, включая активируемый тромбином ингибитор фибринолиза (ТАИФ), модулируют процесс фибринолиза путем отщепления С-концевых остатков аргинина и лизина от частично деградированного фибрина. Целью работы являлась разработка методики выявления активации карбоксипептидаз крови в процессе коагуляции/фибринолиза. Исследованы образцы плазмы крови пациентов с артериальной гипертензией. Коагуляцию и последующий фибринолиз инициировали добавлением стандартных количеств тромбина и тканевого активатора плазминогена. Карбоксипептидазную активность регистрировали по нарастанию количеств аргинина и лизина после завершения фибринолиза. Параметры фибринолиза оценивали турбидиметрически. После завершения фибринолиза отмечается достоверное и существенное (приблизительно двукратное) увеличение концентраций основных аминокислот, которое достоверно и отрицательно коррелирует с временем инициации фибринолиза. Это позволяет рассматривать зарегистрированную активность как один из факторов модулирования фибринолиза.

Ключевые слова: фибринолиз, основные карбоксипептидазы, аргинин, лизин.

**Subbotina T. F., Zhloba A. A., Lupan D. S.,
Bogova V. A., Kusheleva O. A.**
The modulation of fibrinolysis by blood basic carboxypeptidases
State Pavlov Medical University, Saint-Petersburg
e-mail:

Abstract

Blood basic carboxypeptidases including thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) can modulate fibrinolysis by removing C-terminal arginine and lysine residues from partially degraded fibrin. The goal of this investigation was the elaboration of the detection method for blood carboxypeptidase activity associated with coagulation/fibrinolysis. Plasma samples from patients with arterial hypertension were investigated. The coagulation and subsequent fibrinolysis were initiated by addition of standard doses of thrombin and tissue plasminogen activator, respectively. The carboxypeptidase activity was measured by increased levels of arginine and lysine after fibrinolysis was completed. The parameters of fibrinolysis were evaluated by clot turbidity assay. Fibrinolysis led to a large (approximately twofold) and significant increase in concentrations of basic amino acids arginine and lysine, which negatively correlated to the time of fibrinolysis initiation. Thus, the carboxypeptidase activity which we registered can be considered as one of factor modulating fibrinolysis.

Keywords: fibrinolysis, basic carboxypeptidases, arginine, lysine.

Введение

Плазмин — главный фермент системы фибринолиза — является сериновой малоспецифичной эндопротеиназой, которая атакует пептидные связи своего естественного субстрата, фибрина, гидролизую преимущественно связи Арг-Х и Лиз-Х. Таким образом, продукты деградации фибрина плазмином характеризуются большим количеством С-концевых остатков лизина и аргинина. Активация предшественника плазмина — плазминогена — в естественных условиях инициируется в ранний период плазменной коагуляции при появлении первых нитей фибрина. Фибрин обладает участками специфической сорбции плазминогена и его

главнейшего активатора — тканевого активатора плазминогена (ТАП). Связывание плазминогена происходит по лизиновым остаткам фибрина [6]. По мере начинающегося разрушения фибрина появляются дополнительные участки связывания (становятся доступными новые лизиновые остатки), и процесс фибринолиза ускоряется. Считается, что этими дополнительными участками связывания могут быть С-концевые остатки лизина в составе продуктов деградации фибрина [4]. Поэтому основные карбоксипептидазы крови, отщепляя от белков С-концевые мономеры лизина и аргинина, могут существенным образом модифицировать фибринолиз. Одной из

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

наиболее изученных карбоксипептидаз является активируемый тромбином ингибитор фибринолиза (ТАИФ), или карбоксипептидаза U. ТАИФ находится в крови в виде неактивного предшественника, который активируется тромбином, комплексом «тромбин – тромбомодулин» или плазмином. Чистый тромбин является «плохим» активатором ТАИФ, но в комплексе с тромбомодулином активация усиливается в 1250 раз [8]. Показано, что ТАИФ замедляет фибринолиз путем отщепления С-концевых остатков лизина, тем самым лишая плазмин дополнительных участков связывания. ТАИФ отличается крайней нестабильностью и при 37 °С утрачивает активность через 10–20 минут [4]. Обычно определяют ТАИФ либо иммуноферментным методом, либо весь имеющийся в образце профермент переводят в активную форму и тестируют с использованием низкомолекулярного синтетического субстрата [9]. Эти методики оценивают концентрацию ТАИФ, но не могут дать представление о его реальном вкладе в ингибирование фибринолиза, которое может лежать в основе некоторых тромбофилий.

Цель исследования

Целью нашей работы являлась разработка методики определения ассоциированной с фибринолизом карбоксипептидазной активности с использованием естественного субстрата, фибрина, и определения продуктов реакции, основных аминокислот лизина и аргинина, в среде, максимально приближенной к условиям *in vivo*. Принимая во внимание то, что ВЭЖХ-анализ — наиболее точный метод определения аминокислот — является относительно труднодоступным в клинической лаборатории, мы решили параллельно определить концентрацию аргинина в образцах с помощью реакции Сакагучи.

Материалы и методы исследования

В работе использованы коммерческие белковые препараты: тромбин человека (ООО «Технология-Стандарт», Барнаул) и тканевой активатор плазминогена (тАП) (Actilyse). Вероналовый буфер содержал 0,02 М барбитурат натрия (веронал), 0,13 М NaCl и 1 мМ CaCl₂, pH доводили до 7,4 с помощью HCl. Все остальные реагенты имели квалификацию не ниже ч.д.а.

Исследованы образцы бедной тромбоцитами цитратной плазмы крови, полученной из локтевой вены натощак у 10 пациентов с артериальной гипертензией (4 мужчины и 6 женщин, средний возраст — 54 года), находящихся под наблюдением в поликлинике № 31 Санкт-Петербурга. Исследование проводили в течение 1 часа после забора крови.

Моделирование фибринолиза. К 0,3 мл плазмы добавляли 0,5 мкг тАП в объеме 0,05 мл вероналового буфера и через 1 минуту после этого — 0,05 мл раствора тромбина (0,125 ед. NIH). Образовавшийся фибриновый сгусток инкубировали на водяной бане при 37°C. После завершения лизиса (45–120 мин), который регистрировали визуально, среду депротеинизировали добавлением 0,4 мл 5 %- сульфосалициловой кислоты с последующим центрифугированием

(4000 g, 20 мин). Контролем служил образец той же плазмы, инкубированный параллельно с 0,05 мл буфера. Непосредственно перед депротеинизацией к нему добавляли 0,05 мл тАП.

Определение лизина и аргинина проводили на хроматографе Agilent методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с дериватизацией ортофталевым альдегидом на колонке Zorbax Eclipse AAA C18 (200x2,1) мм. После нанесения на колонку 1 мкл супернатанта, проводили элюцию при 40 °С в 40 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 7,8, градиентом ацетонитрила и метанола в соответствии с рекомендациями фирмы *Agilent Technologies* [7]. При расчете концентраций использовали внешний стандарт. Параллельно в тех же пробах определяли концентрацию аргинина одной из модификаций метода Сакагучи [5].

Параметры тромбининдуцированного фибринообразования и фибринолиза, активируемого тАП, регистрировали турбидиметрическим методом [3] с использованием спектрофотометра СФ2000 на длине волны 340 нм в образце плазмы, разведенной в 20 раз вероналовым буфером. Данный метод позволяет оценить не только суммарное время фибринолиза, но и дифференцировать его, с одной стороны, на лаг-период, когда на кривой оптической плотности наблюдается плато, соответствующее сорбции плазминогена и тАП на фибрине, по начальной активации плазминогена и началу деградации фибрина, и, с другой стороны, время наблюдаемого лизиса, которое сопровождается снижением оптической плотности. Важным параметром является также величина максимальной оптической плотности, которая тесно коррелирует с концентрацией фибриногена в образце.

Статистическую обработку проводили методами непараметрической статистики с использованием программы Statistica 7.0. Оценку достоверности различий проводили с помощью критерия Вилкоксона для парных наблюдений. При корреляционном анализе вычисляли ранговый коэффициент корреляции Спирмена.

Результаты исследования и их обсуждение

Из данных, приведенных в таблице, видно, что почти по всем оцениваемым показателям отмечаются значительные индивидуальные вариации. После завершения цикла коагуляции/фибринолиза отмечается достоверное увеличение концентраций аргинина и лизина в инкубационной среде. Это возрастание регистрируется не только с помощью ВЭЖХ-анализа, но и более простой реакцией Сакагучи, причем результаты этих методов достоверно коррелируют между собой ($r_s=0,697$; $p<0,05$). Увеличение концентраций аминокислот после фибринолиза весьма значительно: по данным ВЭЖХ-анализа оно составляет 114 и 87 % для аргинина и лизина соответственно. Определение аргинина методом Сакагучи дает несколько меньший относительный прирост — 79 %, хотя все концентрации, определенные этим методом, значительно выше, чем по данным ВЭЖХ. Исходные концентрации аргинина и лизина не коррелируют достоверно с их приростами после завершения лизиса ($r_s=0,042$ и $0,383$ для аргинина и лизина, соот-



Рис. 1. Активная форма эндотелиальной синтазы оксида азота регулируется путем: 1) — активации мембранного у⁺транспорта аргинина из плазмы крови; 2) — ресинтеза аргинина из цитруллина, образующегося в клетке; 3) — ослабления фиксации энзима кавеолином за счет повышения в цитозоле концентрации ионов кальция; 4) — ослабления гидрофобной сорбции энзима из-за отщепления в тиоэстеразной реакции ацильных остатков пальмитиновой жирной кислоты от eNOS; 5) — поддержания пула кофакторов NO-синтазной реакции: тетрагидробиоптерина (BH₄), NADPH, FADH₂, FMN, Fe²⁺; 6) — повышения концентрации ионов кальция в области кавеол эндотелиоцита вызывает сближение редуктазного и оксигеназного доменов eNOS; 7) — поддержания низкой концентрации эндогенного конкурентного ингибитора NOS (АДМА) и различных форм внутриклеточного гомоцистеина, в том числе S-аденозилгомоцистеина (SAH)

Варьирование параметров фибринолиза и концентраций основных аминокислот в образцах плазмы крови (n=10)

Таблица 1		Среднее и ошибка средней (M + m)	Минимум	Максимум
Параметр				
Лат-период фибринолиза, с		526+127	84	1343
Время наблюдаемого лизиса, с		704+139	150	1207
Общее время фибринолиза, с		1230+240	256	2580
Максимальная оптическая плотность сгустка, о. е.		0,197+0,015	0,141	0,265
Концентрация аргинина (реакция Сакагучи), мкМ	контроль	280,8+46,9	160,8	489,6
	после лизиса	503,7+84,6*	220,8	754,0
	прирост	222,9+56,7	0	593,2
Концентрация аргинина (ВЭЖХ-анализ), мкМ	контроль	82,7+12,8	41,6	171,7
	после лизиса	176,9+70,8*	63,0	792,2
	прирост	94,2+67,0	2,3	692,1
Концентрация лизина (ВЭЖХ-анализ), мкМ	контроль	114,1+11,8	62,4	160,3
	после лизиса	213,3+53,2*	81,5	609,1
	прирост	99,2+48,7	19,1	479,4

Примечания: показаны концентрации аминокислот приведены в расчете на цельную плазму; * — достоверное отличие от уровня контроля (p<0,01).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ветственно), что позволяет более уверенно судить о выявленном эффекте как о результате активируемого в ходе фибринолиза ферментативного процесса. В то же время не выявлено ни одной достоверной корреляции максимальной оптической плотности сгустка, отражающей концентрацию фибриногена, с другими регистрируемыми параметрами.

Из параметров фибринолиза, оцениваемых турбидиметрическим методом, тесные и высокодостоверные корреляционные связи с приростом основных аминокислот (но не с их исходными концентрациями) обнаруживаются только для показателя длительности лаг-периода: $r_s = -0,733$ и $-0,761$ для аргинина и лизина ($p < 0,05$). Следует подчеркнуть, что эти связи отрицательные; иными словами, чем быстрее запускается процесс фибринолиза, тем выше регистрируемая экзопептидазная активность.

Наиболее интересным результатом настоящего исследования следует считать регистрацию ассоциированного с фибринолизом освобождения значительных количеств основных аминокислот — аргинина и лизина. Выраженность этого явления достоверно коррелирует с эффективностью начальной фазы фибринолиза. По всей вероятности, эти аминокислоты появляются в результате действия карбоксипептидаз, активирующихся в ходе фибринолиза и субстратом которых является частично деградированный фибрин. По направленности выявленного эффекта эта карбоксипептидазная активность не может быть приписана ТАИФ, поскольку в последнем случае корреляции с активностью фибринолиза были бы обратными. Возможно, в небольшой группе пациентов, обследованных нами, не встретилось таких, у которых активность ТАИФ имела бы существенное патогенетическое значение. Таким образом, короткое плато на кривой оптической плотности в сочетании с выраженным возрастанием концентрации основных аминокислот можно считать достоверным маркером активации фибринолиза, а разработанный нами метод — пригодным для дальнейшего использования. Результаты, полученные с использованием метода Сакагучи, тесно и достоверно коррелируют с данными ВЭЖХ-анализа, поэтому данный метод также можно использовать, однако следует учитывать его

недостатки: для получения надежных результатов необходимо большое количество материала для анализа, кроме того, этот метод всегда дает завышенные результаты. Последнее объясняется недостаточной специфичностью реакции Сакагучи: она положительна не только с аргинином, но и с другими метаболитами, содержащими гуанидиновую группу, а также с аргинином в составе коротких неосаждаемых пептидов. Следует отметить, что средние концентрации аргинина и лизина в контрольных образцах, определенные методом ВЭЖХ, соответствуют референтному интервалу нормы: аргинин — 21–138 мкМ, лизин 83–38 мкМ [2].

Зарегистрированные нами в ходе фибринолиза увеличения концентраций аргинина оказались столь значительными (в среднем двукратными), что это дает основания предположить, что в ходе фибринолиза может появляться существенная прибавка субстрата для эндотелиальной NO-синтазы (eNOS). Доступность аргинина для eNOS из системного кровотока может быть существенно ограничена [1]. Дополнительное выделение аргинина в ходе фибринолиза, происходящего на поверхности эндотелия, возможно, является дополнительным источником субстрата для eNOS (рис. 1). Таким образом, возможно, что активно протекающий фибринолиз обеспечивает не только лизис тромба, но и способствует вазодилатации, а это является дополнительным фактором хорошего восстановления кровообращения.

Прибавка лизина в ходе фибринолиза также достаточно велика. Следует помнить о том, что лизин — незаменимая аминокислота, использующаяся, в частности, наряду с метионином, для синтеза карнитина — переносчика жирных кислот в митохондрии, что чрезвычайно важно для энергетического обеспечения клеток.

Таким образом, проведенное нами исследование приводит к предварительным выводам о том, что возникающая в ходе фибринолиза карбоксипептидазная активность может иметь положительное значение, обеспечивая местную поставку незаменимых аминокислот, источником которых является деградирующий фибриновый сгусток.

Литература

1. 1. Жлоба, А. А. Роль АДМА в качестве эндогенного ингибитора eNOS и одного из медиаторов развития вазомоторной эндотелиальной дисфункции / А. А. Жлоба // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. — 2007. — № 3. — С. 4–14.
2. Клиническая оценка лабораторных тестов / под ред. Н. У. Тица ; пер. с нем. — М. : Медицина, 1986. — 480 с.
3. Субботина, Т. Ф. Сорбция плазминогена на фибрине как одно из условий эффективного фибринолиза / Т. Ф. Субботина // Вопросы биол., мед. и фармацевт. химии. — 2006. — № 1. — С. 24–29.
4. Bajzar, L. Both cellular and soluble forms of thrombomodulin inhibit fibrinolysis by potentiating the activation of thrombin-activable fibrinolysis inhibitor / L. Bajzar [et al] // J. Biol. Chem. — 1998. — Vol. 273. — P. 2792–2798.
5. Ceriotti, G. An improved method for the microdetermination of arginine by use of 8-hydroxyquinoline / G. Ceriotti, L. Spandrio // J. Biochem. — 1957. — Vol. 66. — P. 603–607.
6. Medved, L. Molecular mechanisms of initiation of fibrinolysis by fibrin / L. Medved, W. Nieuwenhuisen // Thromb. Haemost. — 2003. — Vol. 89. — P. 409–419.
7. Mengerink, Y. Advances in the evaluation of the stability and characteristics of the amino acid and amine derivatives obtained with the o-phthalaldehyde/3-mercaptopropionic acid and o-phthalaldehyde/N-acetyl-L-cysteine reagents : High-performance liquid chromatography-mass spectrometry study / Y. Mengerink [et al] // J. Chromatogr. — 2002. — Vol. 949. — P. 99–124.
8. Mosnier, L. O. Regulation of fibrinolysis by thrombin activatable fibrinolysis inhibitor, an unstable carboxypeptidase B that unites the pathways of coagulation and fibrinolysis / L. O. Mosnier, B. N. Bouma // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. — 2006. — Vol. 26. — P. 2445–2453.
9. Willemse, J. L. Measurement of procarboxypeptidase U (TAFI) in human plasma : a laboratory challenge / J. L. Willemse, D. F. Hendriks // Clin. Chem. — 2006. — Vol. 52. — P. 30–36.