

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.152+ 612.115  
©Коллектив авторов

### АНТИКОАГУЛЯЦИОННОЕ И АНТИКОМПЛЕМЕНТАРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРЕПАРАТА ЭНДОГЕННОГО ИНГИБИТОРА ИЗ ГЕПАТОПАНКРЕАСА КАМЧАТСКОГО КРАБА НА КРОВЬ ЧЕЛОВЕКА

*М.В. Балашова<sup>1\*</sup>, Л.В. Лютова<sup>2</sup>, Ю.А. Руденская<sup>1</sup>, В.А. Исаев<sup>2</sup>, С.С. Андина<sup>1</sup>,  
Л.В. Козлов<sup>3</sup>, Г.Н. Руденская<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>МГУ им. М.В. Ломоносова, Химический факультет, 119991, Москва,  
Ленинские горы, 1, стр. 3; тел.: (495)939-55-41; факс: (495)939-31-81;  
эл. почта: laboratoriahps@hotmail.com

<sup>2</sup>Биологический факультет МГУ, НПО Тринита, Москва

<sup>3</sup>ФГУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии  
им. Г.Н. Габричевского, Москва

Серпины – суперсемейство белковых ингибиторов сериновых и цистеиновых протеиназ (SERPIN: SERine Protease INhibitor), работающих по суицидному механизму. Из гепатопанкреаса камчатского краба (*Paralithodes camtschaticus*) был выделен ингибитор, относящийся к суперсемейству серпинов, и изучено его действие на процесс свертывания плазмы крови человека. Исследованный серпин обладает значительным антикоагуляционным действием, резко возрастающим при совместном применении с гепарином. Изучено действие серпина из краба на C1s (“C1 эстераза”) и показана его способность конкурировать с C1-ингибитором плазмы крови.

Хотя ингибитор краба не действует на плазмин и слабо влияет на активность тромбина, константа ингибирования C1s составляет  $2,02 \pm 0,71 \cdot 10^{-7}$  М. В связи с этим отсутствие у ингибитора из краба способности ингибировать фибринолиз, в отличие от C1-ингибитора, с сохранением способности ингибировать свертывание крови создает определенные клинические перспективы.

**Ключевые слова:** ингибитор камчатского краба, серпин, гепарин, тромбоэластография, антикоагуляционный эффект, система комплемента.

**ВВЕДЕНИЕ.** Несмотря на значительные успехи в лечении и профилактике тромбофилических состояний, проблема поиска новых лекарственных средств коррекции и терапии нарушений гемостаза остается актуальной. В течение последний лет лаборатории химии природных соединений и ферментативного фибринолиза Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова совместно с фирмой Тринита изучают фибринолитические и протеолитические свойства препаратов, выделенных из морских видов рыб и животных. Из гепатопанкреаса камчатского краба *Paralithodes camtschaticus* нами был получен и охарактеризован препарат, обладающий свойствами ингибитора сериновых протеиназ, относящегося к семейству серпинов. Серпины – суперсемейство

\* - адресат для переписки

## ЭНДОГЕННЫЙ ИНГИБИТОР ИЗ ГЕПАТОПАНКРЕАСА КАМЧАТСКОГО КРАБА

белковых ингибиторов сериновых и цистеиновых протеиназ (SERPIN: SERine Protease INhibitor). Изначально этим термином обозначали класс белков, специфически необратимо ингибирующих соответствующие сериновые протеиназы (например, антитромбин – серпин, специфически ингибирующий сериновую протеиназу тромбин). Однако, позже оказалось, что серпины также ингибируют цистеиновые протеиназы, а некоторые белки, структурно сходные с серпинами, вовсе не обладают ингибиторной активностью (например, основной протеин яичного белка овальбумин). Тем не менее, они также отнесены к серпинам. Серпины, как ингибиторы протеиназ, вовлечены в такие важные биологические процессы, как коагуляция, фибринолиз, активация системы комплемента, воспалительные реакции различного рода, метастазирование опухолей, формирование внеклеточного матрикса [2]. В плазме крови человека найдено как минимум 9 различных серпинов, влияющих на эти процессы. Большинство описанных в литературе представителей данного семейства являются секретируемыми внеклеточными белками, но некоторые, например, ингибитор активатора плазминогена 2 (PAI-2) и ингибитор протеиназы-6, являются внутриклеточными белками. Серпины найдены практически у всех живых организмов (в том числе и у некоторых вирусов), за исключением грибов [3]. Интересно отметить, что серпины членистоногих характеризуются 12-30% гомологией аминокислотной последовательности с серпинами млекопитающих [4]. Поэтому нами было выдвинуто предположение, что некоторые серпины членистоногих (в частности, серпины камчатского краба), могут ингибировать сериновые протеиназы млекопитающих, в том числе и человека. Целью настоящего исследования было получение характеристик выделенного препарата ингибитора сериновых протеиназ и изучение его действия на некоторые показатели систем гемостаза и комплемента.

### МЕТОДИКА.

*Реагенты.* В работе использовали тромбин (HTI), трипсин, химотрипсин (“Reanal”, Венгрия), папаин (“Merck”, Германия) и субтилизин (“Sigma”, США). Конъюгат мышиных моноклональных антител против C1-ингибитора человека брали из коммерческого набора “Тест-система иммуноферментная для определения C1-ингибитора комплемента человека” производства ООО “Цитокин” (Санкт-Петербург). Плазмин получали активацией плазминогена, очищенного аффинной хроматографией на сорбенте с иммобилизованным лизином по методу [5].

*Определение активности протеиназ в присутствии ингибитора.* Ферментативную активность по гидролизу хромогенных *p*-нитроанилидных субстратов определяли по методу [6]. Субстраты синтезировали по методам, описанным в статьях [7, 8]. За единицу активности принимали количество фермента, которое в условиях эксперимента гидролизует 1 мкмоль субстрата за 1 мин. К раствору фермента в 0,05 М Трис-HCl буфере pH 8,0 прибавляли раствор ингибитора в том же буфере, содержащем 0,2 М NaCl и инкубировали в течение 2 ч при 37°C. Остаточную активность определяли по гидролизу соответствующих хромогенных субстратов.

Действие ингибитора на процесс коагуляции плазмы крови человека исследовали методом тромбоэластографии, используя тромбоэластограф австрийской фирмы “Hellige” [9]. Было проведено несколько серий экспериментов, в которых предварительно перед рекальцификацией 0,25 мл цитратной плазмы крови человека смешивали и инкубировали с 0,05 мл различных компонентов: с ингибитором, с гепарином, смесью гепарина с ингибитором. К плазме крови добавляли тромбин (20 ед./мл) один или в смеси с ингибитором после инкубации. Процесс коагуляции плазмы крови оценивался по изменению следующих параметров: *r* - время реакции, соответствующее фазе тромбопластино- и тромбинообразования, которое измеряется от точки начала записи до начала расхождения кривых в 1 мм (уменьшение данного параметра связано

с гипертромбопластинемией);  $ma$  - максимальная амплитуда расхождения кривых, зависящая от количества тромбоцитов и уровня фибриногена;  $E$  - эластичность сгустка, также зависит от количества тромбоцитов и концентрации фибриногена;  $E = (100 \times ma) / (100 - ma)$ .  $I$  – общий индекс коагуляции.  $I = 160 \times \operatorname{tg} \alpha$ , где  $\alpha$  – угол между касательной к тромбоэластограмме из точки начала записи.

*Получение активированного первого субкомпонента компонента C1s [10].*

Для получения очищенного активного субкомпонента первого компонента комплемента C1s использовали метод аффинной хроматографии на IgG-стекле. На аффинный сорбент наносили сыворотку крови человека для полного связывания C1. Затем сорбент промывали 0,01 М калий-фосфатным буфером, собирая фракцию несвязавшихся белков. C1 связанный с IgG-стеклом, активировали путем прогревания. Для элюирования C1s использовали буфер 0,01М трис, 0,15М NaCl, 0,05М ЭДТА, pH 7,4 для хелатирования ионов  $Ca^{2+}$ , стабилизирующих комплекс C1. Элюирование C1q с аффинного сорбента проводили повышением pH и ионной силы буфера 0,01М трис, 1М NaCl, 0,05М ЭДТА, pH 8,5).

*Определение активности C1-ингибитора [11].* 100 мкл раствора активированного субкомпонента C1s (1 мкг/мл в 0,05 М натрий-карбонатном буфере, pH 9,5) вносили в каждую лунку плоскодонного полистиролового 96-луночного планшета и инкубировали 18 ч при 4°C. Затем трижды отмывали планшет 0,12 М вероналовым буферным раствором, pH 7,4, по 300 мкл в каждую лунку, затем планшет осушали путем вытряхивания остатка жидкости. В лунки планшета каждого ряда вносили по 100 мкл раствора, содержащего определяемый C1 ингибитор, в виде прогрессивных двукратных разведений. После инкубации в термостате в течение 1 ч при 37°C, трехкратной отмывки физраствором на 0,02 М фосфатном буфере с 0,15 М NaCl и 0,05% твин-20, pH 7,4, и осушения планшета в каждую лунку вносили по 100 мкл конъюгата пероксидазы с антителами против C1 ингибитора человека в том же буфере в подобранном разведении. После инкубации в термостате в течение 1 ч при 37°C, пятикратной отмывки буфером от несвязавшегося конъюгата и осушения планшета в каждую лунку вносили по 100 мкл субстратного буфера с ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин в 15 мл 0,02 М цитратно-фосфатного буфера, pH 5,0, и 50 мкл 3% пероксида водорода). После 30 мин инкубации в темноте реакцию останавливали внесением в каждую лунку 50 мкл 14% серной кислоты. Результаты реакции учитывали с помощью спектрофотометра с вертикальным лучом измерением светопоглощения при 450 нм. Функциональную активность препарата C1-ингибитора рассчитывали по стандартной кривой, полученной в результате проведения такого же эксперимента со стандартным раствором с известной активностью C1-ингибитора.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Нами была дана характеристика препарата эндогенного ингибитора коллагенолитических ферментов, выделенного из гепатопанкреаса камчатского краба (*Paralithodes camtschaticus*) по способу [1]. Константа ингибирования сериновой коллагеназы 1 камчатского краба составляет  $3,1 \times 10^{-7}$  М.

Ингибитор уменьшает активность сериновых и цистеиновых протеиназ из различных источников. Из таблицы 1 видно, что наибольшую активность препарат проявляет в отношении савиназы, ингибируя ее на 92% и смеси тромбина с гепарином, хотя на один тромбин действует слабо. Последнее подтверждается и данными, приведенными в таблице 2. Влияние препарата ингибитора на процесс коагуляции плазмы крови человека исследовался методом тромбоэластографии. Процесс тромбообразования в цитратной плазме крови можно запустить двумя способами – добавлением экзогенного тромбина, превращающего фибриноген в фибрин и активирующего факторы XIII, V (Ас-глобулин) и VIII (антигемофильный глобулин) или добавлением ионов  $Ca^{2+}$ . Ионы  $Ca^{2+}$  необходимы для придания активной конформации протромбинкиназе, участвующей в превращении протромбина в тромбин и фибриногена в фибрин, а также для активации других факторов свертывания крови, находящихся в плазме (XIa, III, VIIa, X).

## ЭНДОГЕННЫЙ ИНГИБИТОР ИЗ ГЕПАТОПАНКРЕАСА КАМЧАТСКОГО КРАБА

Таблица 1. Ингибирование сериновых протеиназ и папаина ингибитором из камчатского краба.

№	Фермент	Субстрат	Соотношение Фермент/ Ингибитор	Ингибирование, %
1	Тромбин	Gly-Arg-pNA	1: 16	15
2	Тромбин с гепарином	Gly-Arg-pNA	1:16:32	89,5
3	Трипсин	Bz-Arg-pNA	1:3	50,7
4	Химотрипсин	Ac-Phe-pNA	1:5	64
5	Субтилизин	Z-Ala-Ala-Leu-pNA	1:5	10
6	Субтилизин	Z-Ala-Ala-Leu-pNA	1:10	25,8
7	Савиназа	Glp-AlaAla-Leu-pNA	1:10	92
8	Папаин	Glp-Phe-Ala-pNA	1:20	77,3

Таблица 2. Воздействие ингибитора на систему тромбин-гепарин.

	A <sub>410</sub> (субстрат Gly-Arg-pNA)	% ингибирования
Тромбин – 24,9 мкг Физраствор – 797 мкл	0,249	–
Тромбин – 24,9 мкг Гепарин – 50 мкг Физраствор – 787 мкл	0,246	–
Тромбин – 24,9 мкг Препарат ингибитора – 400 мкг Физраствор – 697 мкл	0,216	14
Тромбин – 24,9 мкг Гепарин – 50 мкг Препарат ингибитора – 400 мкг Физраствор – 687 мкл	0,023	89,5

Примечание: t инкубации - 25 мин; гепарин - 10 мкл (5 мг/мл); тромбин - 3 мкл (8,3 мг/мл); ингибитор - 100 мкл (4 мг/мл).

На рисунке 1 приведён вид стандартной тромбоэластограммы (ТЭГ), полученной добавлением 1,25% хлорида кальция и физиологического раствора к цитратной плазме. На рисунке 2а при записи ТЭГ физиологический раствор был заменён буфером, являющимся растворителем для ингибитора. Они практически не отличаются друг от друга, хотя на последней прослеживается слабая тенденция к гиперкоагуляции. Все последующие ТЭГ мы будем сравнивать с ней. На рисунке 2б видно, что добавление к плазме крови ингибитора даже без предварительной инкубации практически не меняет показатель  $r$ , уменьшает максимальную амплитуду на 12%, плотность сгустка и общий индекс коагуляции на 17% и 34% соответственно, что свидетельствует о начавшейся гипокоагуляции.

30-минутная инкубация ингибитора с плазмой усиливает эту тенденцию (рис. 3а). ТЭГ меняет свой вид – латентный период коагуляции –  $\tau$  – увеличивается уже на 61%, на 79% падает значение индекса коагуляции, на 24% максимальной амплитуды и на 32% плотности сгустка. Ещё более выраженная гипокоагуляция отмечается после 60-ти минутной инкубации (рис. 3б): в 3 раза удлиняется время тромбопластино-и тромбинообразования, в 6 раз уменьшается индекс коагуляции и в 2 раза плотность сгустка. При этом наглядно видно, что помимо замедления начала свертывания значительно растягивается во времени процесс формирования фибриновых нитей, что доказывает выраженное торможение гемокоагуляции в присутствии ингибитора и зависимость этого процесса от времени взаимодействия компонентов плазмы с ингибитором.

Известно, что добавление к цитратной плазме ионов  $\text{Ca}^{2+}$  запускает каскад реакций с вовлечением в него многих факторов. На какие из них оказывает большее ингибирующее действие препарат предстоит выяснить в дальнейших исследованиях, используя выделенные и очищенные факторы свёртывания. В настоящей работе мы проверили влияние ингибитора на конечный продукт превращения протромбина – на тромбин. Для этого к цитратной плазме мы добавили раствор тромбина и ингибитора (рис. 4а), а затем раствор тромбина, в течение 30 минут инкубированный с ингибитором (рис. 4б). После добавления к плазме тромбина на ТЭГ отсутствовал показатель  $\tau$ , т.к. добавлением этого фермента мы миновали стадию тромбопластино- и тромбинообразования (рис. 4а). Внесение в смесь ингибитора вдвое уменьшает максимальную амплитуду и плотность сгустка. А индекс коагуляции падает в 3 раза. После 30-минутной инкубации тромбина с ингибитором (рис. 4в) появляется показатель  $\tau$ , равный 5 мм, значительно уменьшается амплитуда записи, что свидетельствует о том, что в данных условиях эксперимента длительное взаимодействие ингибитора с тромбином приводит к снижению его активности.

В следующей серии мы проводили запись ТЭГ в присутствии гепарина. Мы исходили из того, что гепарин, являясь прямым антикоагулянтом и кофактором антитромбина III (АТIII), в десятки раз усиливает активность последнего, а поскольку АТIII также относится к семейству серпинов, предположили, что он может активировать и исследуемый ингибитор. На ТЭГ (рис. 5в) видно, что 30-минутная инкубация плазмы, гепарина и ингибитора почти полностью блокирует процесс образования сгустка: более чем в 4 раза удлиняется время тромбинообразования, в 6 раз уменьшается амплитуда и в 10 раз индекс коагуляции. Увеличение времени инкубации до 60 минут полностью блокирует процесс тромбообразования. Активирующая ингибитор роль гепарина подтверждена и в эксперименте с использованием хромогенного субстрата (табл. 2). Если ингибитор инактивирует только 14% тромбина, то в присутствии гепарина этот процент увеличивается до 89%.

Известны 3 серпина, которые играют ключевую роль в регуляции действия тромбина: антитромбин III, гепарин кофактор II, которые ингибируют тромбин в его прокоагулянтной роли, и протеин C1 – ингибитор, который ингибирует комплекс тромбин-тромбомодулин. Главным свойством этих серпинов является то, что они находятся под контролем глюкозаминогликанов (например, гепарина), которые ускоряют реакцию ингибирования на 1-2 порядка [14]. Таким образом, эндогенный ингибитор камчатского краба можно отнести к глюкозамингликан-зависимым серпинам.

Мы исследовали также влияние ингибитора на некоторые компоненты системы комплемента. C1-ингибитор известен как ингибитор активирующей сериновой протеиназы C1s классического пути комплемента. Он является главным ингибитором фактора FXII (FXIIa), который связывает контактную систему активации, где он известен как ингибитор калликреина и активатора XI (FXIa), с системой каскада коагуляции. C1-ингибитор является важным регулятором воспалительной реакции и системы свёртывания-противосвёртывания крови.



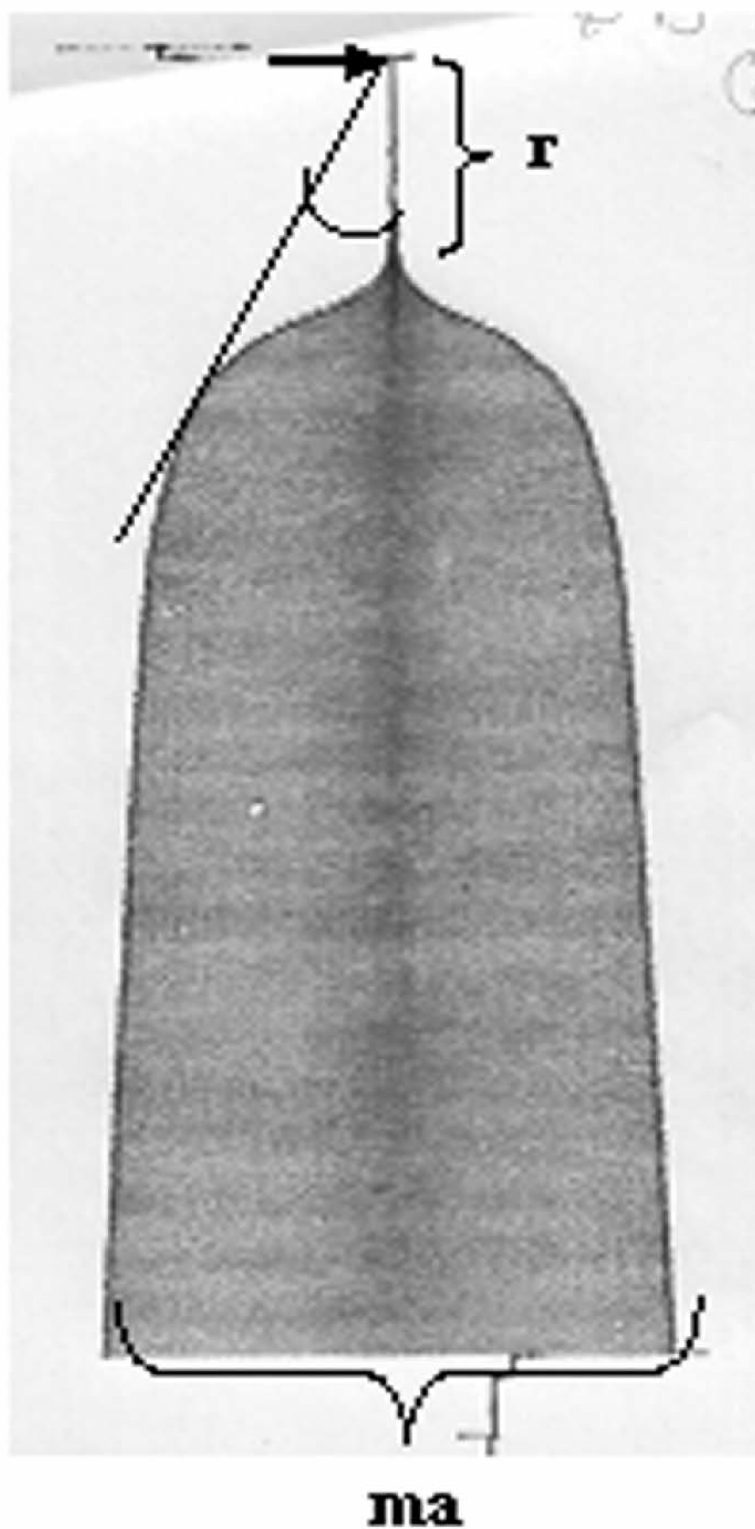
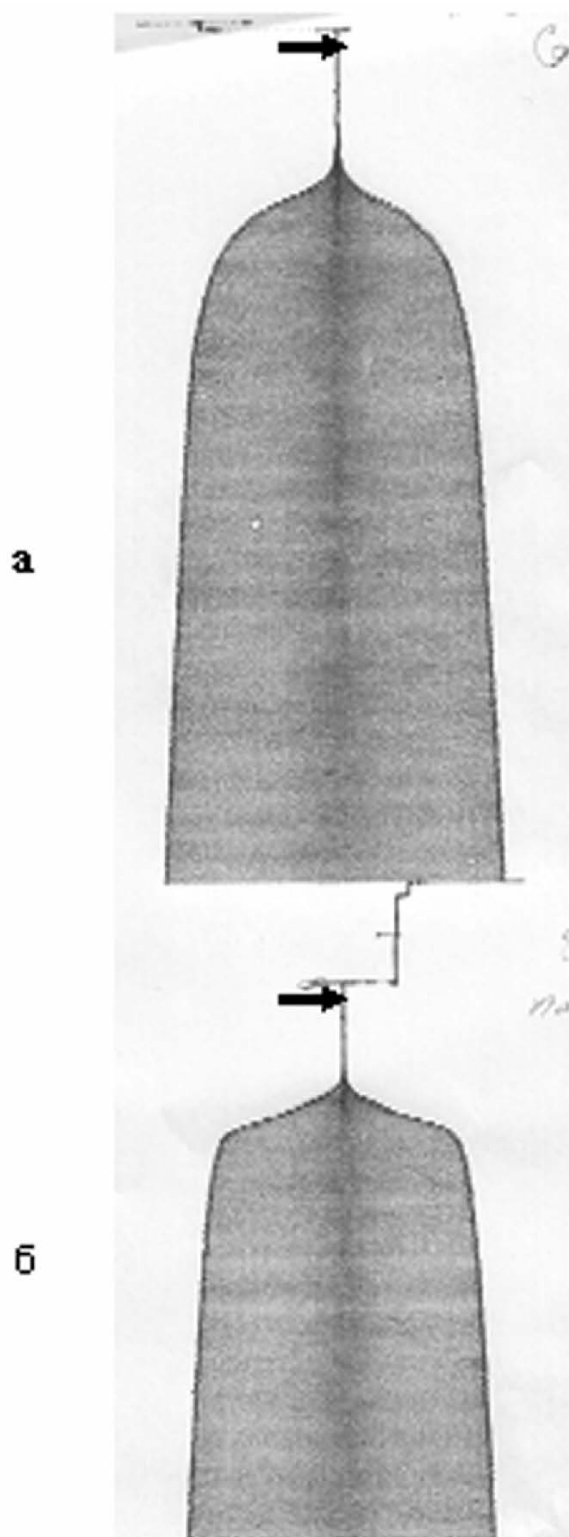
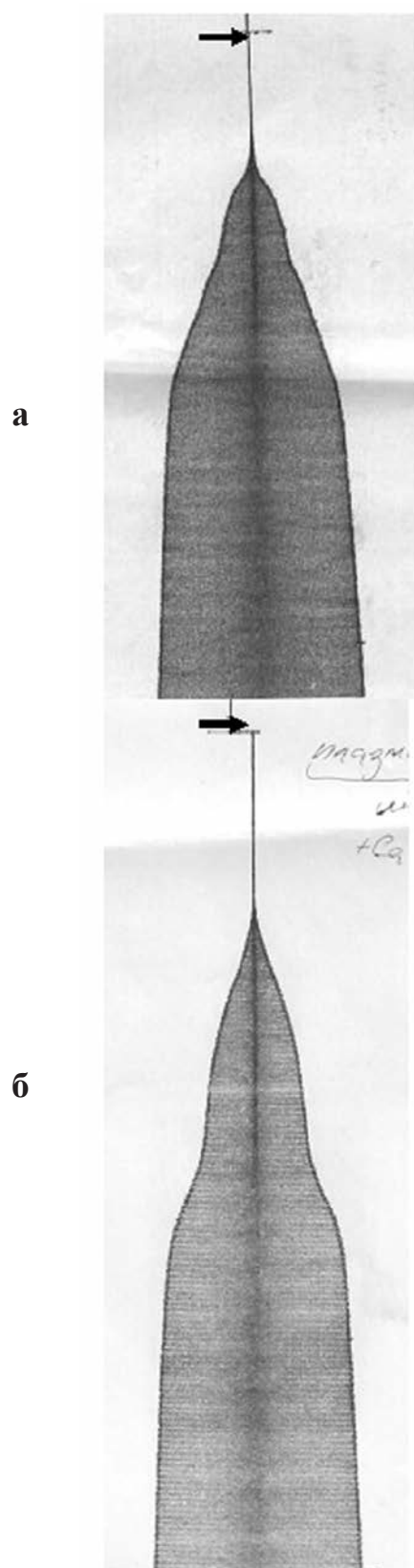


Рисунок 1.  
Вид тромбозластограммы при нормальном процессе коагуляции.



**Рисунок 2.**

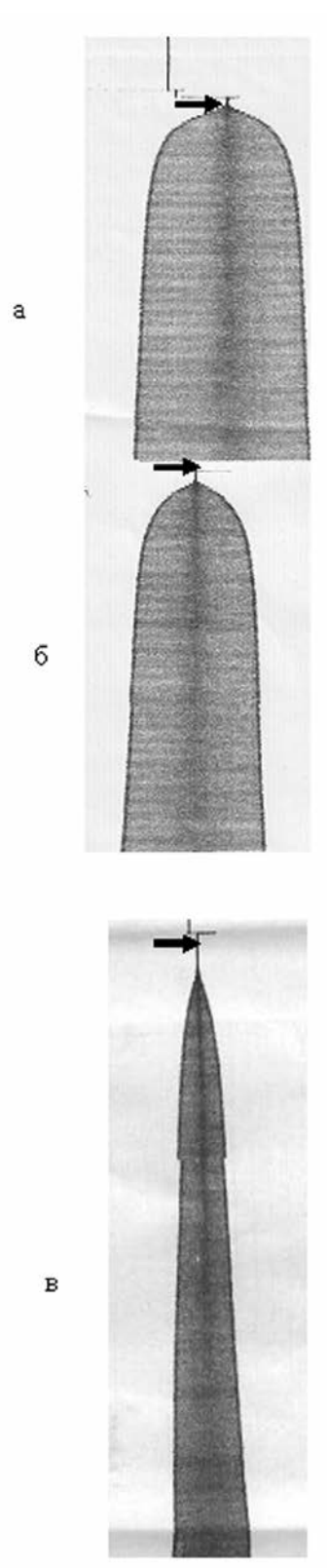
Контроль на буфер (сверху) и действие препарата ингибитора на процесс коагуляции без инкубации.



**Рисунок 3.**

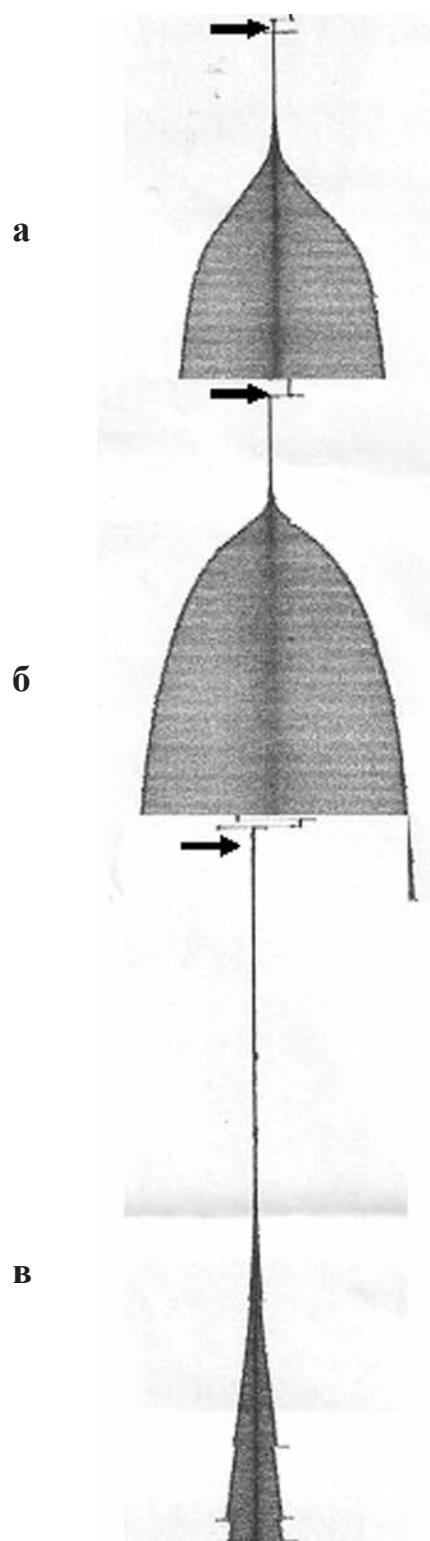
Влияние препарата ингибитора на коагуляцию плазмы крови при предварительной инкубации 30 (а) и 60 (б) мин.





**Рисунок 4.**

Влияние препарата ингибитора на экзогенный тромбин. Сверху вниз:  
нормальное тромбообразование при добавлении в плазму крови экзогенного тромбина;  
влияние препарата ингибитора без предварительной инкубации;  
влияние препарата ингибитора с предварительной инкубацией 30 мин.



**Рисунок 5.**

Совместное действие препарата ингибитора и гепарина на коагуляцию плазмы крови. Сверху вниз:  
а - влияние на коагуляцию гепарина без предварительной инкубации с плазмой крови;  
б - влияние гепарина на коагуляцию с предварительной инкубацией 30 мин;  
в - совместное действие препарата ингибитора и гепарина на коагуляцию без предварительной инкубации.

Для исследования действия ингибитора из гепатопанкреаса камчатского краба как ингибитора C1s ("C1 эстеразы") мы использовали оригинальный метод [11], позволяющий исследовать конкуренцию ингибитора краба с C1-ингибитором. Для этого изучали связывание C1-ингибитора из сыворотки крови человека с препаратом C1s (выделенным из сыворотки крови человека), сорбированным на полистироловых микропанелях для иммуноферментного анализа, в присутствии различных концентраций ингибитора из краба. По уменьшению сорбции C1-ингибитора в присутствии препарата из краба определяли % ингибирования связывания C1-ингибитора с C1s и вычисляли константу ингибирования для серпина из краба. На рисунке 6 представлена зависимость связывания C1-ингибитора на C1s от концентрации препарата ингибитора из краба. Расчёт показал, что константа ингибирования C1s препаратом ингибитора из краба составляет  $9,09 \pm 3,20$  мкг/мл или  $(2,02 \pm 0,71) \times 10^{-7}$  М. Таким образом, мы можем предположить, что механизм действия ингибитора из гепатопанкреаса камчатского краба аналогичен действию вышеуказанных глюкозамингликан-зависимых серпинов. Следует отметить, что подавления активности ингибитором из краба плазмينا человека мы не наблюдали. Опыты были проведены аналогично предыдущим, с заменой сорбированного C1s плазмином. Плазмин прекрасно связывает C1-ингибитор, однако препарат из краба на это связывание влияния не оказывал. Это отличие, возможно, зависит от строения активного центра серпина краба – R-петли, состоящей из 15-20 аминокислотных остатков. Суть ингибирования серпинами сводится к формированию стабильного комплекса путем взаимодействия активного центра протеиназы с пептидной связью, которая находится в пределах R-петли, в результате происходит расщепление пептидной связи между остатками P1 и P1'. Для нормального протекания механизма ингибирования исключительно важна как аминокислотная последовательность R-петли, так и её длина [12, 13]. Точечная мутация в области R-петли оказывается способной изменить специфичность серпина. Так, у антитромбина и C1-ингибитора в положении P1 находится заряженная аминокислота аргинин, поэтому такой серпин узнается как тромбином, так и плазмином. В альфа-антитрипсине в P1 находится метионин. При замене на аргинин, ингибитор перестаёт узнавать эластазу [14]. Возможно, ингибирование C1s, но не плазмينا, а также эффективное связывание ингибитором тромбина только в присутствии гепарина, объясняется тем, что петля активного центра ингибитора краба содержит метионин (табл. 2).

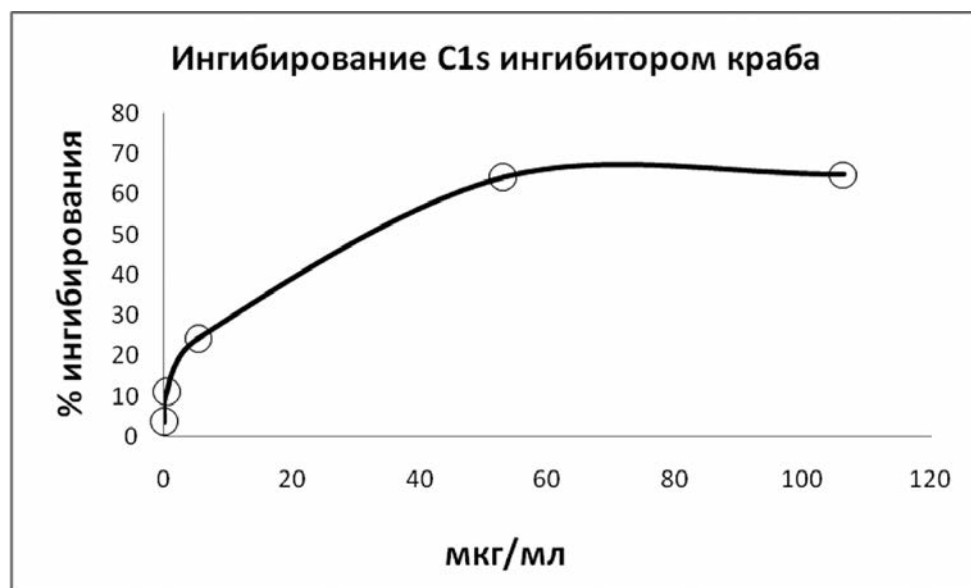


Рисунок 6.

Ингибирование препаратом ингибитора из гепатопанкреаса камчатского краба (*P. camtschaticus*) связывания C1-ингибитора с компонентом C1s ("C1 эстеразой").

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Из полученных данных можно сделать заключение, что ингибитор из гепатопанкреаса камчатского краба, проявляет заметную антикоагулянтную активность, блокируя процесс образования фибринового сгустка в условиях *in vitro*. Гепарин значительно усиливает антикоагулянтное действие ингибитора, особенно при увеличении времени инкубации. Ингибитор оказывает также тормозящее действие на компонент системы комплемента. В настоящее время важной медицинской проблемой является реперфузионный синдром, возникающий при восстановлении нарушенного кровоснабжения в постишемический период и сопутствующий огромному числу острых и хронических патологий. Имеется большое число работ, подтверждающих полезность ингибирования системы комплемента для снижения повреждения тканей [15]. Выявленные нами свойства ингибитора создают определённые клинические перспективы.

Настоящая работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 12-04-00709-а).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Исаев В.А., Руденская Г.Н., Руденская Ю.А., Лютова Л.В., Балашова М.В. Патент "Способ получения ингибитора коллагеназы с антикоагуляционным действием из гепатопанкреаса камчатского краба" № 2009143587, положительное решение от 1.06.2010
2. Silverman G.A., Bird P.I., Carrell R.W., Church F.C., Coughlin P.B., Gettins P.G., Irving J.A., Lomas D.A., Luke C.J., Moyer R.W., Pemberton P.A., Remold-O'Donnell E., Salvesen G.S., Travis J., Whisstock J.C. (2001) J. Biol. Chem., **276**(36), 33293-33296.
3. Law R.H.P., Zhang Q., McGowan Sh., Bucke A.M., Silverman G.A., Wong W., Rosado C.J., Langendorf Ch.G., Pike R.N, Bird J.C., Whisstock R.N. (2006) Genome Biology, **7**(5), 216-225.
4. Tesch L.D., Raghavendra M.P., Bedsted-Faarvang T., Gettins P.G., Olson S.T. (2005) Protein Sci, **14**(2), 533-542.
5. Deutsch D.G., Mertz E.T. (1970) Science, **170**, 1095-1096.
6. Erlanger B.F., Kokowsky N., Cohen W. (1961) Arch. Biochim. Biophys., **95**, 271-278.
7. Stepanov V.M., Terent'eva E., Voyushina T.L., Gololobov M. (1995) Bioorg. Med. Chem., **3**, 479-485.
8. Filippova I.Yu., Lysogorskaya E.N., Oksenoit E.S., Rudenskaya G.N., Stepanov V.M. (1984) Anal. Biochem., **143**, 293-297.
9. Deutsch D.G., Mertz E.T. (1970) Science, **170**, 1095-1096.
10. Козлов Л.В., Шайбанов Б.Б., Иванов А.Е., Зубов В.П., Антонов В.К. (1989) Биохимия, **54**(10)Б, 1754-1760.
11. Андина С.С., Козлов Л.В., Дьяков В.Л. (2004) Биомед. химия, **50**, 86-91.
12. Rezaie A.R. (1998) J. Biol. Chem., **273**, 16824-16827.
13. Potempa J., Korzuz E., Travis J. (1994) J. Biol. Chem., **269**, 15957-15960.
14. Zhou A., Robin W.C., Huntington J.A. (2001) J. Biol. Chem., **278**, 27541-27547.
15. Lutz J., Thurm K., Heemann U. (2010) J. Inflamm. (Lond), **7**, 27.

Поступила: 01. 09. 2010.

ANTICOAGULATIVE AND ANTICOMPLEMENTARY ACTIVITY OF ENDOGENOUS  
INHIBITOR PREPARATION FROM HEPATOPANCREAS OF RED KING CRAB  
(*PARALITHOSED CAMTSCHATICUS*) TOWARDS HUMAN BLOOD

M.V. Balashova<sup>1</sup>, L.V. Lyutova<sup>2</sup>, Yu.A. Rudenskaya<sup>1</sup>, V.A. Isayev<sup>2</sup>, S.S. Andina<sup>1</sup>,  
L.V. Kozlov<sup>3</sup>, G.N. Rudenskaya<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lomonosov Moscow State University, Chemistry department, Leninskie Gory 1/3, Moscow, 119991 Russia; tel.: +7(495)939-55-41; fax: (495)939-31-81; e-mail: laboratoriahps@hotmail.com

<sup>2</sup>Lomonosov Moscow State University, Biology department, "Trinita" corporation, Russia

<sup>3</sup>Gabrichevsky research Institute for Microbiology and Epidemiology, Moscow, Russia

Serpins (SERine Protease INhibitors) – is large and diverse group of proteins with similar structures, which can inhibit both serine and cysteine proteases by an irreversible suicide mechanism. A novel serpin from hepatopancreas of Red King Crab (*Paralithosed camtschaticus*) was obtained and was studied its effect on the process of human blood plasma clotting. The investigated serpin shows a noticeable anticoagulative activity, which increases dramatically in the combined action with heparine. Though the inhibitor has almost no effect on thrombin, it inhibits C1s (C1-esterase). We studied the action of the serpin from *P. camtschaticus* on C1s via its competitive inhibition by C1 inhibitor and the novel enzyme. The calculated inhibition constant of the serpin from *P. camtschaticus* towards C1s is  $2,02 \pm 0,71$  M. Unlike C1 inhibitor, the novel serpin from *P. camtschaticus* doesn't suppress fibrinolysis and at the same time prevents blood clotting. These features may be of interest for medical purposes.

**Key words:** inhibitor from red king crab, serpin, heparine, tromboelastography, anticoagulative activity, complement system.