

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^{1}, Л.В. Лютова², Ю.А. Руденская¹, В.А. Исаев², С.С. Андина¹,
Л.В. Козлов³, Г.Н. Руденская¹*

¹МГУ 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

²Биологический факультет МГУ, НПО Тринита, Москва

³ФГУН 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 С1s (“С1 эстераза”) и показана его способность конкурировать с С1-ингибитором плазмы крови.

Хотя ингибитор краба не действует на плазмин и слабо влияет на активность тромбина, константа ингибирования С1s 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 С1-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 ингибирующие 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 пламиногена 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 (НТИ), трипсин, химотрипсин (“Reanal”, Венгрия), папаин (“Merck”, Германия) и субтилизин (“Sigma”, США). Конъюгат мышинных моноклональных антител против С1-ингибитора человека брали из коммерческого набора “Тест-система иммуноферментная для определения С1-ингибитора комплемента человека” производства ООО “Цитокин” (Санкт-Петербург). Плазмин получали активацией пламиногена, 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-НСl буфере рН 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 α – 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 (Ac-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	Субтилizin	Z-Ala-Ala-Leu-pNA	1:5	10
6	Субтилizin	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 ₄₁₀ (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 – γ – 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 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 γ , 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 γ , 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 С1 – 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. С1-ингибитор известен как ингибитор активирующей сериновой протеиназы С1s 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. С1-ингибитор является важным регулятором воспалительной реакции и системы свёртывания-противосвёртывания крови.

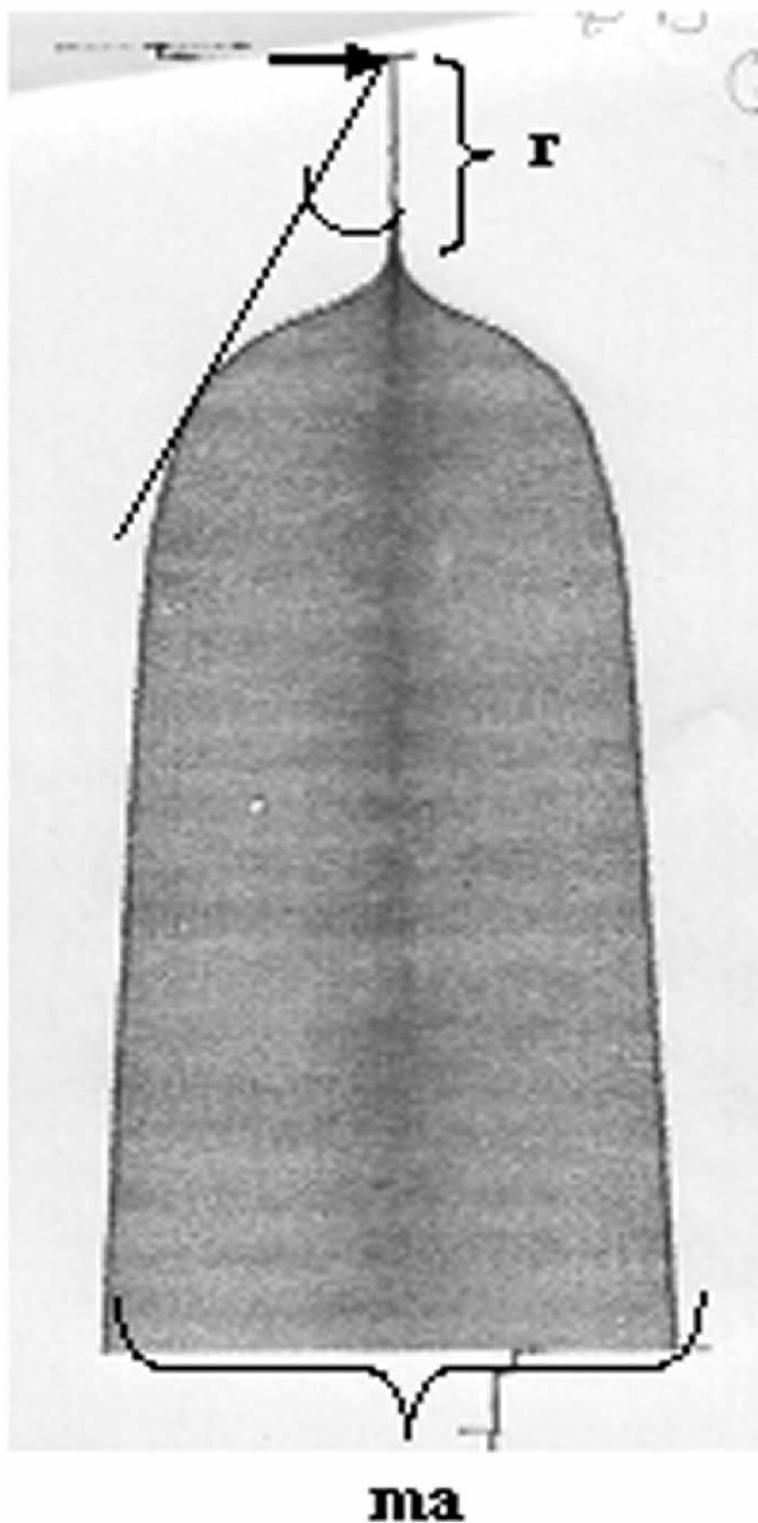


Рисунок 1.
Вид тромбозластограммы при нормальном процессе коагуляции.

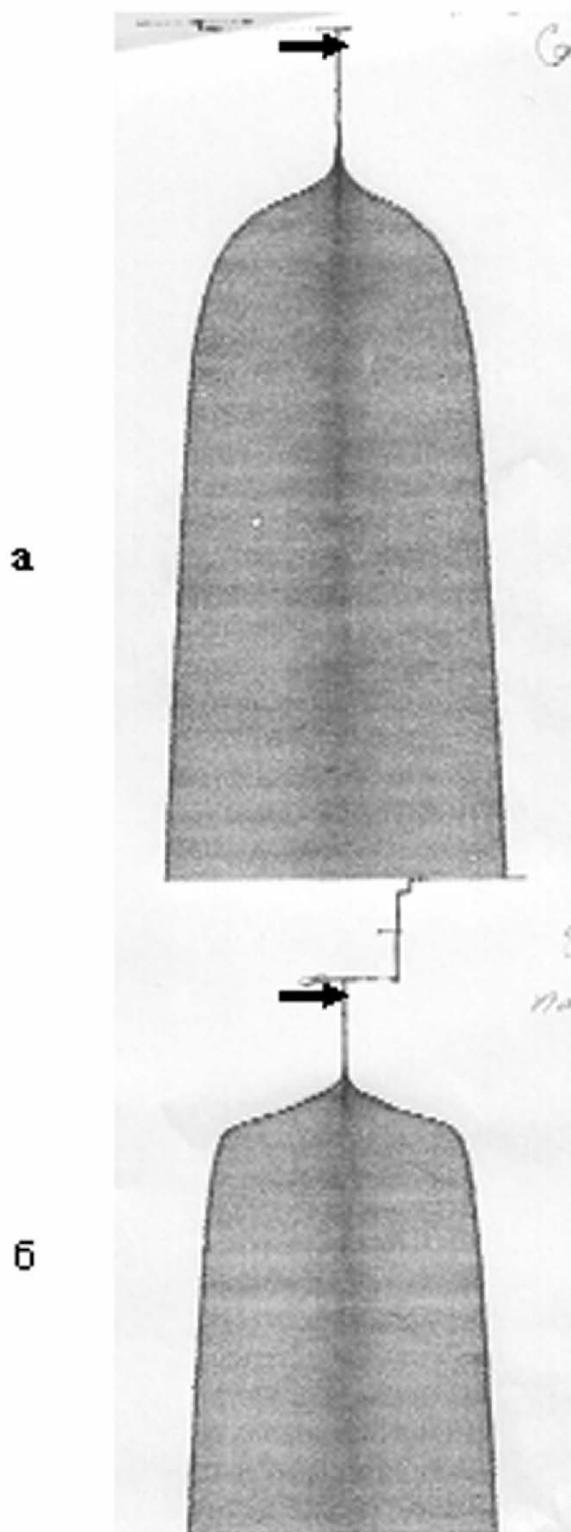


Рисунок 2.
Контроль на буфер (сверху) и действие препарата ингибитора на процесс коагуляции без инкубации.

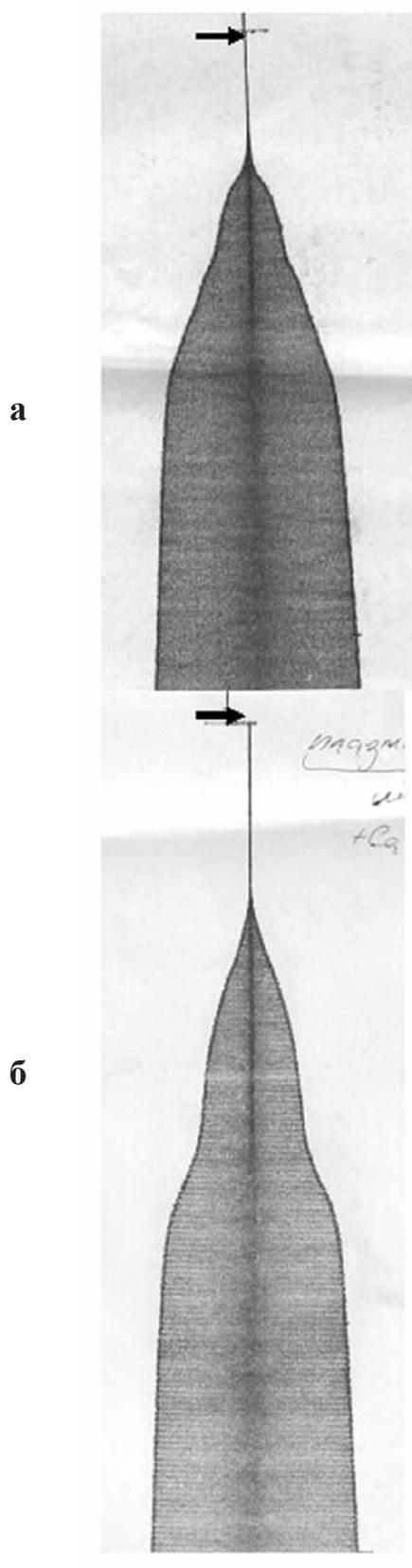


Рисунок 3.
Влияние препарата ингибитора на коагуляцию плазмы крови при предварительной инкубации 30 (а) и 60 (б) мин.

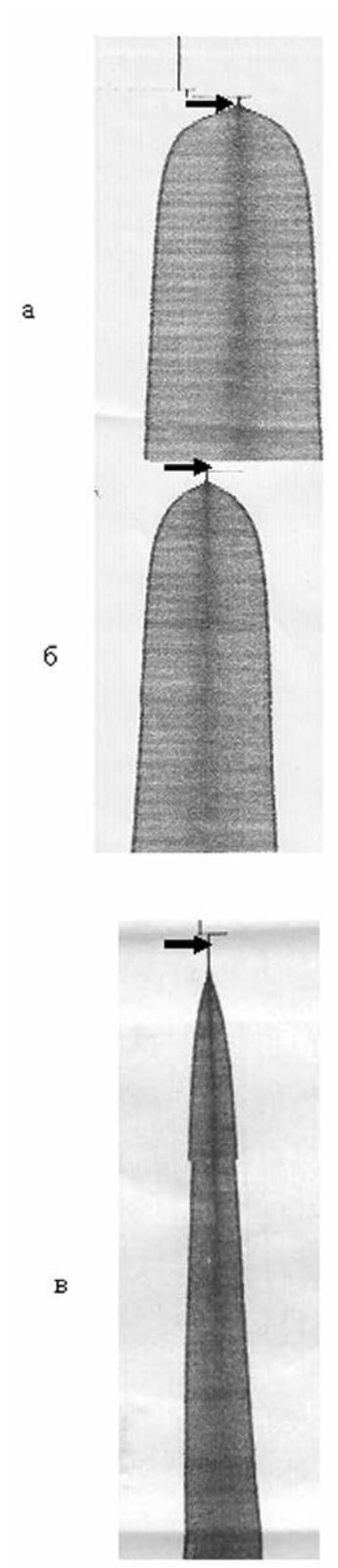


Рисунок 4.

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.

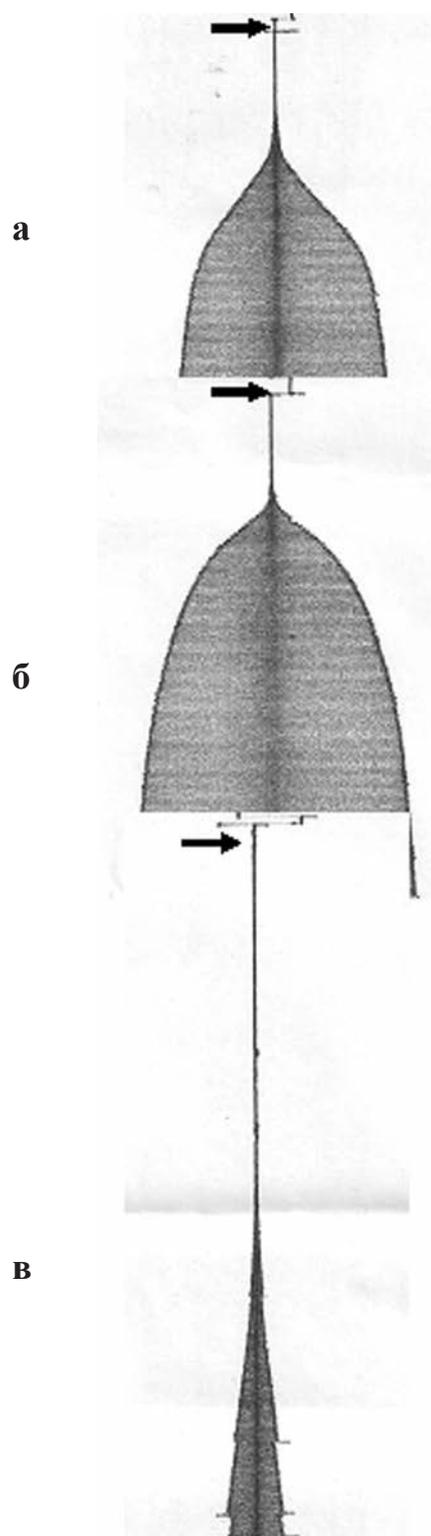


Рисунок 5.

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).

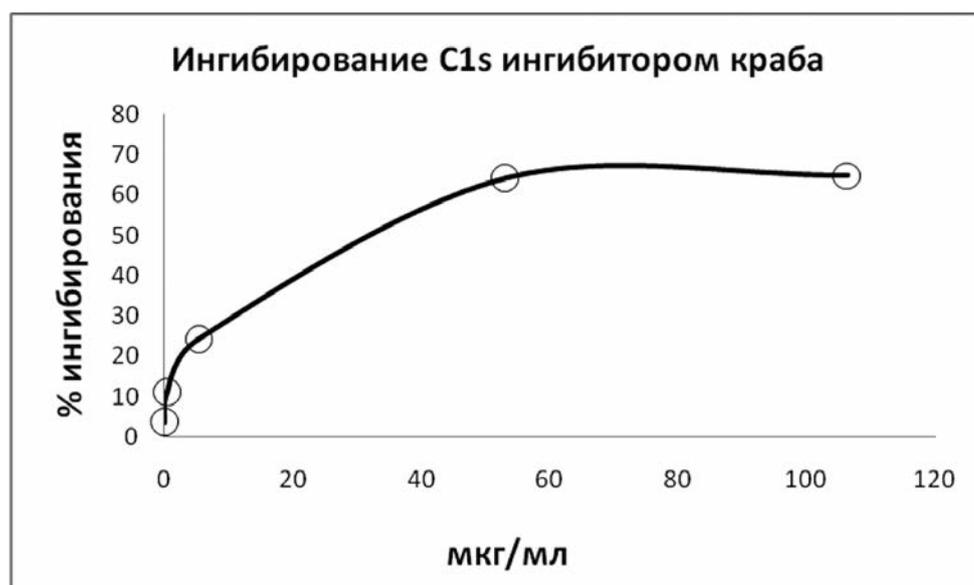


Рисунок 6.

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

ЭНДОГЕННЫЙ ИНГИБИТОР ИЗ ГЕПАТОПАНКРЕАСА КАМЧАТСКОГО КРАБА

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., Hungtington J.A.* (2001) *J. Biol. Chem.*, **278**, 27541-27547.
15. *Lutz J., Thurmel 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. Balashova¹, L.V. Lyutova², Yu.A. Rudenskaya¹, V.A. Isayev², S.S. Andina¹,
L.V. Kozlov³, G.N. Rudenskaya¹*

¹Lomonosov 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

²Lomonosov Moscow State University, Biology department, "Trinita" corporation, Russia

³Gabrichevsky 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.