

УДК 547.66+577:612.115.1

©Коллектив авторов

АРГИНИН И ЛИЗИН – ПРОДУКТЫ КАРБОКСИПЕПТИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ, АССОЦИИРОВАННОЙ С ФИБРИНОЛИЗОМ

А.А. Жлоба, Т.Ф. Субботина, Д.С. Лупан, В.А. Богова, О.А. Кушелева*

Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
им. акад. И.П. Павлова, 197022 Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, д.6/8;
эл. почта: subbotina2002@mail.ru

Карбоксипептидазы крови являются одним из факторов регуляции фибринолиза. Разработана методика определения ассоциированной с коагуляцией/фибринолизом карбоксипептидазной активности с использованием естественного субстрата – фибрина – и определением продуктов реакции – основных аминокислот лизина и аргинина, – в среде, максимально приближенной к условиям *in vivo*. Исследование выполнено на 15 образцах плазмы крови пациентов с артериальной гипертензией. Коагуляцию и последующий фибринолиз в образцах плазмы инициировали добавлением стандартных количеств тромбина и тканевого активатора плазминогена. Концентрации аргинина и лизина до, в процессе и после завершения фибринолиза определяли ВЭЖХ-анализом. Параметры фибринолиза оценивали турбидиметрически.

После завершения цикла коагуляции/фибринолиза отмечено достоверное и весьма значительное увеличение концентраций аргинина и лизина в инкубационной среде, которое составило в среднем 101 и 81% для аргинина и лизина, соответственно. Длительность инициации фибринолиза достоверно коррелирует со степенью прироста этих аминокислот: $r_s = -0,733$ и $-0,761$ ($p < 0,05$). Генерация аргинина имеет два максимума – в начале процесса лизиса сгустка и в его конце, тогда как лизин высвобождается преимущественно в середине процесса. Таким образом, появляющаяся в ходе фибринолиза карбоксипептидазная активность может иметь положительное значение, обеспечивая местную поставку незаменимых аминокислот, источником которых является деградирующий фибриновый сгусток.

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

ВВЕДЕНИЕ. Плазмин – главный фермент системы фибринолиза – является сериновой эндопроотеиназой с широкой специфичностью, которая атакует пептидные связи своего естественного субстрата, фибрина, гидролизует 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 [1]. По мере начинающегося разрушения фибрина становятся доступными новые лизиновые остатки, и процесс фибринолиза ускоряется. Считается, что этими

* - адресат для переписки

АРГИНИН И ЛИЗИН КАК ПРОДУКТЫ КАРБОКСИПЕПТИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ

дополнительными участками связывания могут быть С-концевые остатки лизина в составе продуктов деградации фибрина [2]. Основные карбоксипептидазы крови, которые отщепляют от белков С-концевые лизин и аргинин, могут, по мнению некоторых исследователей, нарушать связывание плазминогена с фибрином и таким образом тормозить фибринолиз. В частности, в крови человека присутствуют несколько ферментов, обладающих подобной активностью [3]. Из них наиболее известны карбоксипептидаза N (CpN, КФ 3.4.17.3) и карбоксипептидаза U (CpU, КФ 3.4.17.20), чаще обозначаемая как активируемый тромбином ингибитор фибринолиза (TAFI – thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor). В небольших, но измеряемых, количествах в крови здорового человека также присутствует карбоксипептидаза В тканевого происхождения (CpB, КФ 3.4.17.2); активность этого фермента резко возрастает при остром панкреатите [4]. CpN обладает конститутивной активностью, тогда как CpU присутствует в крови в виде неактивного предшественника, который активируется тромбином, комплексом тромбин-тромбомодулин или плазмином. Чистый тромбин является “плохим” активатором CpU, но в комплексе с тромбомодулином активация усиливается в 1250 раз [5]. CpU отличается крайней нестабильностью и при 37°C утрачивает активность через 10-20 минут [2]. Обычно определяют CpU либо иммуноферментным методом, либо весь имеющийся в образце профермент переводят в активную форму и тестируют с использованием низкомолекулярного синтетического субстрата [6]. Эти методики оценивают концентрацию CpU, но не могут дать представление о его реальном вкладе в ингибирование фибринолиза, которое лежит в основе некоторых тромбофилий. Относительно CpN известно, что эта карбоксипептидаза сохраняет активность в процессе и после завершения фибринолиза; эта активность может быть зарегистрирована с помощью синтетического субстрата. По имеющимся данным, CpN уменьшает связывание плазмينا с фибрином, но не тормозит фибринолиз [7]. В литературе отсутствуют данные о связи между активностью карбоксипептидаз и протеканием фибринолиза, а также сведения о нем, как о процессе, генерирующем существенные количества основных аминокислот.

Нашей целью являлась разработка методики определения ассоциированной с фибринолизом экзопептидазной активности с использованием естественного субстрата – фибрина – и определением 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.

МЕТОДИКА. В работе использованы коммерческие белковые препараты: тромбин человека (ООО “Технология-Стандарт”, Барнаул) и тканевой активатор плазминогена (тАП, Actilyse), (Boehringer Ingelheim, Германия). Вероналовый буфер содержал 0,02 М барбитурат натрия (веронал), 0,13 М NaCl и 1 мМ CaCl₂, рН 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 15 пациентов с артериальной гипертензией (4 мужчины и 9 женщин, средний возраст 54 года), давших информированное согласие на участие в данном исследовании и находящихся под наблюдением в поликлинике № 31 г. Санкт-Петербурга. Исследование проводили в течение 1 часа после забора крови.

Моделирование фибринолиза. К 0,3 мл плазмы добавляли 0,5 мкг тАП в объёме 0,05 мл вероналового буфера, и через 1 минуту после этого – 0,05 мл раствора тромбина (0,125 ед. НИН). Образовавшийся фибриновый сгусток инкубировали на водяной бане при 37°C. После завершения лизиса (45 – 120 мин), который регистрировали визуально, среду депротенизировали добавлением 0,4 мл 5% сульфосалициловой кислоты с последующим центрифугированием (4000 g, 20 мин). Контролем служил образец той же плазмы, который инкубировали параллельно с 0,05 мл буфера и 0,05 мл тАП. Таким образом получали образцы для анализа совокупного результата карбоксипептидазной активности, включая активность CpU, за время, превышающее как его “быструю” активацию с участием тромбина и тромбомодулина, так и “медленную” активацию с участием только тромбина. Оценку карбоксипептидазной активности определяли за дискретные промежутки времени или за весь период опыта по приросту концентрации лизина и аргинина. Подобный методический подход, но с использованием синтетического субстрата [3, 7], позволил выявить в ходе фибринолиза два вида карбоксипептидазной активности – чувствительной к специфическому ингибитору CpU и нечувствительной. С целью оценки кинетики накопления аминокислот, в отдельной серии экспериментов, проведённых на 3 образцах пуловых плазм, через 5-минутные интервалы из инкубационной среды отбирали по 0,02 мл и депротенизировали равным количеством сульфосалициловой кислоты.

Определение лизина и аргинина проводили на хроматографе Agilent методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с дериватизацией орто-фталевым альдегидом на колонке Zorbax Eclipse AAA C18 (200×2,1) мм. После нанесения на колонку 1 мкл супернатанта, проводили элюцию при 40°C в 40 мМ натрий-фосфатном буфере, рН 7,8, градиентом ацетонитрила и метанола с УФ-детектированием (338 нм) в соответствии с рекомендациями фирмы “Agilent Technologies” [8]. Концентрации аминокислот рассчитывали на мл плазмы с использованием введенного в пробу внутреннего стандарта – норвалина. Параллельно в тех же пробах определяли концентрацию аргинина одной из модификаций метода Сакагучи [9].

Параметры тромбин-индуцированного фибринообразования и фибринолиза, активируемого тАП, регистрировали турбидиметрическим методом [10] при 340 нм с использованием спектрофотометра СФ2000 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, начальной активации плазминогена и началу деградации фибрина, и, с другой стороны, время наблюдаемого лизиса, которое сопровождается снижением оптической плотности. Продолжительность цикла коагуляции/фибринолиза, согласно данной методике, составляет 5-10 мин. Величина максимальной оптической плотности 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. Критический уровень значимости (p) при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимался равным 0,05.

АРГИНИН И ЛИЗИН КАК ПРОДУКТЫ КАРБОКСИПЕПТИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Из данных, представленных 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, причём 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 101 и 81% для аргинина и лизина, соответственно. Определение аргинина методом Сакагучи дает несколько меньший относительный прирост – 62%, 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, соответственно), 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.

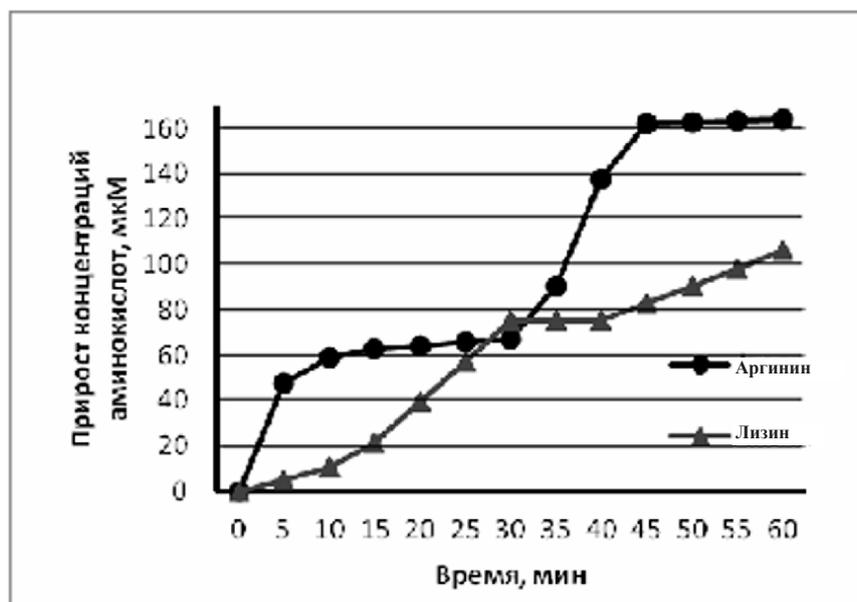
Таблица. Варьирование параметров фибринолиза и концентраций основных аминокислот в образцах плазмы крови ($n = 15$).

Название параметра		Среднее \pm ошибка средней	Минимум	Максимум
Лаг-период фибринолиза, с		526 \pm 88	174	1452
Время наблюдаемого лизиса, с		560 \pm 98	150	1207
Общее время фибринолиза, с		1086 \pm 180	324	2659
Максимальная оптическая плотность сгустка, о.е.		0,170 \pm 0,015	0,060	0,270
Концентрация аргинина (реакция Сакагучи), мкМ	Контроль	307,6 \pm 31,8	160,8	508,8
	После лизиса	496,8 \pm 46,9*	220,8	754,0
	Прирост	189,2 \pm 37,6	0	593,2
Концентрация аргинина (ВЭЖХ анализ), мкМ	Контроль	94,5 \pm 13,7	41,6	217,3
	После лизиса	190,4 \pm 54,1*	63,0	792,2
	Прирост	95,8 \pm 49,5	2,3	692,1
Концентрация лизина (ВЭЖХ анализ), мкМ	Контроль	116,8 \pm 8,3	62,4	160,3
	После лизиса	211,3 \pm 36,6*	81,5	609,1
	Прирост	94,5 \pm 33,6	19,1	479,4

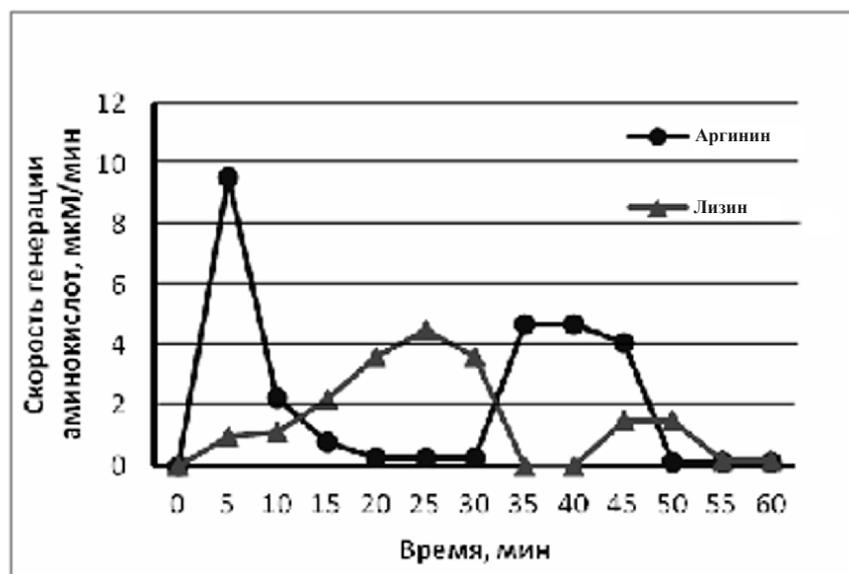
Примечание: концентрации аминокислот приведены в расчёте на цельную плазму; * - достоверное отличие от уровня контроля ($p < 0,01$).

Из параметров фибринолиза, оцениваемых турбидиметрическим методом, тесные и высоко достоверные 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, то есть длительность лаг-периода меньше, тем выше регистрируемая экзопептидазная активность.

В отдельной серии экспериментов, проведенной на трёх образцах объединённой плазмы пациентов, мы попытались выяснить, каким этапам фибринолиза соответствует наиболее интенсивное образование лизина и аргинина. Данные, приведенные на рисунке (А, Б), показывают, что скорости высвобождения аминокислот в ходе фибринолиза изменяются по-разному: генерация аргинина имеет два максимума – в начале процесса лизиса сгустка и в его конце, тогда как лизин высвобождается преимущественно в середине процесса – через 30-40 мин после формирования сгустка.



А



Б

Рисунок.

Динамика (А) и средние скорости (Б) прироста концентраций аргинина и лизина в процессе фибринолиза (n=3).

АРГИНИН И ЛИЗИН КАК ПРОДУКТЫ КАРБОКСИПЕПТИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ

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. Несмотря на то, что условия модельного эксперимента соответствовали оптимальным для нормального функционирования CrU [3], и использовался тест на карбоксипептидазную активность не с синтетическим, а с эндогенным белковым субстратом, торможения образования продуктов реакции в виде аргинина или лизина, свойственного проявлению активности, CrU [6] не обнаружено. По всей вероятности, эти аминокислоты появляются в результате действия карбоксипептидаз на пептидные субстраты, образующиеся в результате лизиса фибрина плазмином. По направленности выявленного эффекта эта карбоксипептидазная активность не может быть приписана CrU, поскольку в последнем случае корреляции с активностью фибринолиза были бы обратными. Учитывая зарегистрированное нами относительно позднее высвобождение лизина, можно предположить, что активация CrU в данной экспериментальной системе задерживается и происходит тогда, когда удаление С-концевых лизиновых остатков уже не имеет значения для успешного завершения фибринолиза. По-видимому, CrU-активность, изученная в системах с синтетическим субстратом, не может быть перенесена на активность по отношению к дериватам фибрина. Возможно, в небольшой группе пациентов, обследованных нами, не встретилось таких, у которых активность CrU 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 при тестировании суммарной активности карбоксипептидаз, но не индивидуальной активности CrU. Не ясным остается вопрос о более специфичных субстратах для CrU – это фрагменты фибрина или производные основных аминокислот, подобные гиппурил-L-Аргинину? Результаты, полученные с использованием метода Сакагучи, тесно и достоверно коррелируют с данными ВЭЖХ анализа, поэтому более простой метод Сакагучи также можно использовать. При этом следует учитывать его недостатки: для получения надежных результатов необходимо большое количество материала для анализа, кроме того, этот метод всегда даёт 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 83–238 мкМ [11]. Повышение положительно заряженных аминокислот в крови (соответственно приведенным данным) может увеличивать их транспорт не только в эндотелиоциты, но и в макрофаги, где они образуют производные, модулирующие свойства этих клеток. Аргинин и лизин являются предшественниками биологически активных полиаминов, регулирующих дифференцировку макрофагов. Кроме того, из лизина может образовываться промежуточный метаболит – триметиллизин, необходимый для синтеза карнитина. Следует также отметить,

что метилирование лизина происходит только после его включения в состав белков, которые в большинстве своем относятся к регуляторным белкам внутриклеточных сигнальных систем. Синтез карнитина в организме существенно ограничен протеолизом этих белков. Обычно пищевые источники карнитина не вполне удовлетворяют потребности организма в этом переносчике жирных кислот.

Зарегистрированное нами в ходе фибринолиза увеличение концентрации аргинина оказалось значительным, в среднем, примерно двукратным. Это даёт основание предположить, что в ходе фибринолиза появляется существенная прибавка субстрата эндотелиальной NO-синтазы (eNOS). Доступность аргинина для eNOS из системного кровотока может быть существенно ограничена [12]. Известно, что аргинин, полученный перорально, обладает вазодилатирующим эффектом при нарушениях кровообращения [13]. Возникновение из аргинина ингибитора этого эффекта – известного асимметричного диметил-аргинина (АДМА) происходит не сразу после повышения уровня аргинина. В связи с этим, ингибирующий эффект за счёт свободного аргинина не может быть обусловлен накоплением АДМА. Напротив, известно, что лучше всего вазодилатирующий эффект аргинина наблюдается при высоком содержании АДМА. Из работы [13] следует, что вазодилатирующий и другие опосредованные эндотелием реакции за счёт добавок аргинина в кровоток существенны у лиц, имеющих исходный высокий уровень АДМА. Для образования АДМА требуется длинный метаболический путь. Сначала в клетках должно произойти включение аргинина в белки, затем – постсинтетическое образование их метилированных производных, затем – их ограниченный протеолиз и лишь после деструктивного протеолиза могут высвободиться метилированные производные аминокислот. Использование аргинина в качестве субстрата eNOS происходит после его транспорта в область кавеол эндотелиоцитов и может ингибироваться за счёт гомоцистеина (и его окисленных форм) [14] или АДМА [12]. Значительное выделение аргинина в ходе фибринолиза, происходящего на поверхности эндотелия, может рассматриваться в качестве дополнительного источника субстрата для eNOS. Таким образом, активно протекающий фибринолиз, возможно, обеспечивает не только лизис тромба, но и может способствовать вазодилатации и восстановлению кровообращения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Методы определения аргинина и лизина, предложенные в данной работе, использованы для оценки суммарной карбоксипептидазной активности сопутствующей фибринолизу. Эта методика, в отличие от известных методов оценки сопутствующей фибринолизу карбоксипептидазной активности с синтетическими низкомолекулярными субстратами, содержащими одну аминокислоту, основана на использовании в качестве субстрата пептидного материала, нарастающего в модельной системе при фибринолизе. Пополнение заряженными аминокислотами пула плазмы крови положительно коррелировало со скоростью фибринолиза. Контроль за карбоксипептидазной активностью по отношению к временной кривой тромбообразования и лизиса сгустка, позволил выявить отрезки времени, на которых происходит быстрое накопление основных аминокислот, а также потенциал их прироста по отношению к исходному. В работе показано, что в ходе фибринолиза, изученного *in vitro*, могут высвободиться значительные количества аргинина и лизина.

Предложенная методика оценки суммарной карбоксипептидазной активности пригодна для тестирования генерации дополнительных количеств основных аминокислот в образцах крови при тромболитической терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Medved L., Nieuwenhuisen W.* (2003) *Thromb. Haemost.*, **89**(3), 409-419.
2. *Bajzar L., Nesheim M., Morser J., Tracy P.B.* (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 2792-2798.
3. *Redlitz A., Tan A.K., Eaton D.L., Plow E.F.* (1995) *J. Clin. Invest.*, **96**, 2534-2538.
4. *Borgström A., Regnér S.* (2005) *Pancreatology*, **5**(6), 530-536.
5. *Mosnier L.O., Bouma B.N.* (2006) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **26**(11), 2445-2453.
6. *Willemse J.L., Hendriks D.F.* (2006) *Clin. Chem.*, **52**(1), 30-36.
7. *Plow E.F., Allampallam K., Redlitz A.* (1997) *Trends in Cardiovasc. Med.*, **7**(3), 71-75.
8. *Mengerink Y., Kutlán D., Tyth F., Csámpai A., Molnár-Perl I.* (2002) *J. Chromatogr. A*, **949**(1-2), 99-124.
9. *Cerioti G., Spandrio L.* (1957), *J. Biochem.*, **66**(4), 603-607.
10. *Субботина Т.Ф., Галевская Л.В.* (2005) *Биомед. химия*, **51**, 60-65.
11. *Туз Н.У.* (1986) *Клиническая оценка лабораторных тестов (пер. с нем.)*, Медицина, М.
12. *Жлоба А.А.* (2007) *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*, **6**(3), 4-14.
13. *Böger R.H.* (2007) *J. Nutr.*, **137**(6), 1650S-1655S.
14. *Jin L., Caldwell R.B., Li-Masters T., Caldwell R.W.* (2007) *J. Physiol. Pharmacol.*, **58**(2), 191-206.

Поступила: 07. 02. 2011.

ARGININE AND LYSINE AS PRODUCTS OF BASIC CARBOXYPEPTIDASE ACTIVITY ASSOCIATED WITH FIBRINOLYSIS

A.A. Zhloba, T.F. Subbotina, D.S. Lupan, V.A. Bogova, O.A. Kusheleva

St.-Petersburg State I.P. Pavlov Medical University, ul. L. Tolstogo, 6/8, Saint-Petersburg, 197022 Russia; e-mail: subbotina2002@mail.ru

Blood carboxypeptidases play an important role in the regulation of fibrinolysis. We have proposed here the method for the assay of blood carboxypeptidase activity associated with coagulation/fibrinolysis using the natural substrate fibrin and the detection of basic amino acids arginine and lysine as products in the conditions close to those *in vivo*. Plasma samples from 15 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. Arginine and lysine concentrations before, during, and after completion of fibrinolysis were determined using HPLC. The parameters of fibrinolysis were evaluated by clot turbidity assay. Fibrinolysis led to a large and significant increase in concentrations of arginine and lysine in the incubation mixture by 101 and 81%, respectively. The duration of fibrinolysis initiation significantly correlated to the degree of increase of these amino acids: $r_s = -0.733$ и -0.761 for arginine and lysine, respectively ($p < 0.05$). The rates of amino acids liberation during fibrinolysis demonstrate different pattern: arginine generation had two maximums: at the beginning of clot lysis and at his end, whereas the liberation of lysine occurred mainly at the middle of fibrinolysis. Thus, the carboxypeptidase activity associated with fibrinolysis can be considered as a local source of the essential aminoacids.

Key words: fibrinolysis, basic carboxypeptidases, arginine, lysine.