

УДК 612.128:612.115.1:612.115

©Тимофеев

ОСНОВНЫЕ КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ КРОВИ – ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ КОАГУЛОЛОГИИ

А.В. Тимофеев

Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии,
91024, Санкт-Петербург, 2-ая Советская ул., д.16; тел.: +7(812)717-19-37; факс: +7(812)717-25-50;
эл. почта: antonvtimhaef@gmail.com

Рассмотрены металлосодержащие основные карбоксипептидазы крови человека, их вклад в развитие коагулологических расстройств. Представлены краткая история открытия и биологические характеристики потенциальных ферментов-регуляторов фибринолитического процесса: карбоксипептидазы U и карбоксипептидазы N. Обсуждаются биохимические механизмы и главные современные концепции антифибринолитических эффектов карбоксипептидаз.

Ключевые слова: основные карбоксипептидазы, фибрин, фибринолиз, плазмин, тромб

DOI: 10.18097/PBMC20166202141

ВВЕДЕНИЕ

Ферменты, гидролизующие пептидные связи субстрата, относятся к подклассу пептидаз (КФ 3.4). Катализируя разрыв пептидной связи в ходе пищеварения, резорбции и ремоделирования ткани, деградации патологически свёрнутых белков, пептидазы зачастую приводят к необратимым структурным и функциональным изменениям белков и пептидов. Эти ферменты также осуществляют высокоселективное расщепление специфических молекул в таких биологических процессах как активация и инактивация сигнальных молекул и пептидных гормонов, пребелков и зимогенов. Такие биологические функции пептидаз позволяют им управлять репликацией ДНК и апоптозом, эмбриональным развитием и морфогенезом, иммунными и воспалительными реакциями, гемокоагуляцией и фибринолизом. Пептидазы способны тонко воздействовать на биохимические процессы и регулировать их посредством своей избыточной или сниженной каталитической активности вызывая эмбриональную летальность, нейродегенеративные и другие заболевания ЦНС, тромбозы, воспаление и аутоиммунные состояния, остеопороз и рак [1, 2]. Глубокое понимание структуры и механизмов функционирования протеолитических ферментов как *in vivo* так и на молекулярном уровне является необходимой предпосылкой для клинико-лабораторной диагностики заболеваний, а также разработки терапевтических стратегий, направленных на изменение модулирующего потенциала протеиназ.

Карбоксипептидазы – это экзопептидазы, катализирующие реакцию гидролиза С-концевой пептидной связи субстрата. Они широко представлены в организме человека и животных. В настоящее время известно несколько десятков карбоксипептидаз. В зависимости от предполагаемого механизма каталитического действия они подразделяются на сериновые карбоксипептидазы, цистеиновые карбоксипептидазы и металлокарбоксипептидазы.

Сериновые карбоксипептидазы содержат в активном центре остаток серина, цистеиновые – остаток цистеина, а в качестве каталитически существенных функциональных групп в активных центрах металлокарбоксипептидаз выступают катионы двухвалентных металлов: преимущественно Zn^{2+} , а также Co^{2+} , Ni^{2+} и др. [2].

Члены многочисленного семейства металлокарбоксипептидаз (КФ 3.4.17) обладают различной субстратной специфичностью и идентифицированы в разных тканях у многих организмов [2]. Исторически в соответствии с субстратной специфичностью ферментов карбоксипептидазы подразделяются на две основные группы: А и В. Группа А включает в себя ферменты, преимущественно гидролизующие пептидные связи, образованные алифатическими (гидрофобными) аминокислотами (от англ. **Aliphatic**), а ферменты группы В (от англ. **Basic**) катализируют высвобождение с карбоксильного конца пептидов главным образом аминокислот с основными (положительно заряженными боковыми радикалами) (таблица). Из всей совокупности выделенных и изучаемых сейчас карбоксипептидаз, пожалуй, наибольший интерес для гемостазиологии представляют два плазменных фермента: карбоксипептидаза N (CPN, КФ 3.4.17.3) и карбоксипептидаза U (CPU, КФ 3.4.17.20). По-видимому, оба эти фермента способны участвовать в регуляции фибринолитического процесса.

1. ОСНОВНЫЕ КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ КАК УСИЛИТЕЛИ КОФАКТОРНОЙ ФУНКЦИИ ФИБРИНА

Содержащие белок поверхности, такие как поверхность фибрина или клеточная поверхность играют решающую роль в пролонгированной активации плазминогена – одного из центральных участников фибринолиза [3, 4]. Сорбированный на поверхности плазминоген является более специфичным субстратом для своих активаторов [3].

ОСНОВНЫЕ КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ КРОВИ – ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ КОАГУЛОЛОГИИ

Таблица. Некоторые основные карбоксипептидазы человека (СР)

Название фермента, его номер по классификации (КФ) и синонимичные варианты	Субстратная специфичность по отношению к С-концевым аминокислотам в составе низкомолекулярных синтетических субстратов	Тканевая локализация	Физиологические субстраты
СРВ, 3.4.17.2, PASP (pancreas-specific protein)	аргинин>лизин	Экзокринная часть поджелудочной железы; при панкреатите обнаруживается в сыворотке крови.	Участвует в пищеварении.
СРМ, 3.4.17.12	аргинин>лизин	Мембранно-связанный фермент – экспрессируется в почках, макрофагах, лёгких, плаценте, мозге, периферических нервах.	Вовлечена в процессинг пептидов на клеточной поверхности: брадикинин, энкефалин; инактивирует анафилотоксины; модулирует активность хемокинов CXCL12 и CCL1.
СРД, 3.4.17.22, Гликопротеин 180 кДа (gp 180)	аргинин>лизин	Мозг, плацента, почки, клетки кишечника.	Участвует в модификации белков и пептидов в аппарате Гольджи (секреторный путь).
СРЕ=СРН, 3.4.17.10, энкефалинконвертаза	аргинин, лизин	Нейроэндокринные клетки мозга.	Принимает участие в созревании ряда нейромедиаторов и гормонов: энкефалинов, эндорфинов, окситоцина, вазопрессина.
СРЗ, 3.4.17.-	аргинин>лизин	Плацента, эмбриональные ткани, яичники.	Участвует в регуляции wnt-сигнального пути, регулирующего эмбриогенез и дифференцировку клеток.

Примечание. Данные из [2]; [59-60].

Во многом сорбция плазминогена и плазмينا (КФ 3.4.21.7) на поверхности определяется взаимодействием между С-концевыми остатками лизина поверхности и лизин-связывающими участками крингловых структур молекул плазминогена [5]. Такое взаимодействие обеспечивает положительную обратную связь, при которой гидролиз плазмином белков клеточной поверхности или полимера фибрина способствует дальнейшему образованию самого плазмينا. С-концевые остатки лизина могут изначально существовать в белках и пептидах, а могут быть следствием ограниченного протеолиза пептидазами, в том числе и в результате воздействия плазмينا [6-8]. Основные карбоксипептидазы способны отщеплять С-концевые лизиновые остатки и тем самым влиять на кинетику связывания плазминогена с поверхностью клеток [5] и фибрина [8]. Аффинность плазминогена, продуктов деградации фибрина и интактного фибрина отличается на несколько порядков (250 нМ против 30 мкМ). Кофакторная роль С-концевых остатков лизина продуктов деградации фибрина в фибринолизе обусловлена следующим:

- связывание плазминогена с поверхностью увеличивает его количество на этой поверхности и индуцирует конформационные изменения в нём, делая его более удобным субстратом для тканевого активатора плазминогена (тАП) [8];

- кроме плазминогена с поверхностью сгустка связывается также и плазмин, тем самым приобретая защиту от инактивации α_2 -антиплазмином и α_2 -макроглобулином;

- под действием плазмينا и при участии С-лизинов ускоряется переход Glu¹-плазминогена в Lys⁷⁸-плазминоген – более специфичный субстрат для тАП.

Таким образом влияя на кофакторную активность фибрина основные карбоксипептидазы замедляют распространение фибринолиза приводя к сильному снижению фибринолитической эффективности тАП. В настоящее время описанный выше механизм влияния карбоксипептидаз на фибринолиз является главенствующим.

2. СРВ И СРУ: ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ, СТРУКТУРНАЯ БИОЛОГИЯ И ФИЗИОЛОГИЯ

СРВ (КФ 3.4.17.2) – панкреатическая Zn-содержащая карбоксипептидаза, открытая в 1958 году [9]. СРВ является ферментом пищеварительных соков, поэтому в сыворотке здорового человека почти не обнаруживается и только в случае панкреатитов активный фермент может выходить в кровь [10]. Время существования этого фермента в плазме крови составляет несколько минут. СРВ синтезируется

в поджелудочной железе в виде каталитически неактивного профермента (зимогена) с молекулярной массой 46 кДа. Структурно зимоген CPB (проCPB) имеет два домена: каталитический и активационный (рис. 1). В процессе активации трипсином (КФ 3.4.21.4) проCPB превращается в стабильно активный фермент CPB (35 кДа). В экспериментах *in vitro* экзогенная CPB способна тормозить фибринолиз и уже при концентрации 20 нМ полностью останавливать лизис (рис. 2).

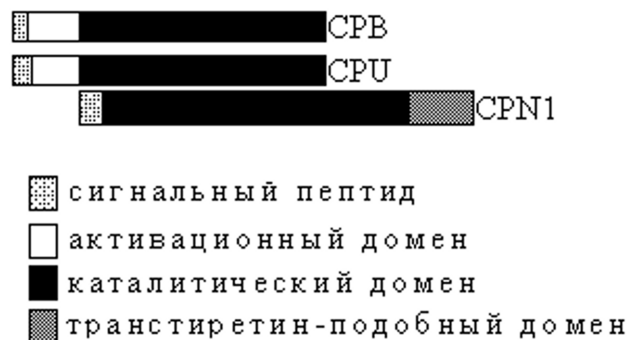


Рисунок 1. Схематическая доменная структура и сравнительные размеры карбоксипептидаз: В, U и CPN1-субъединицы.

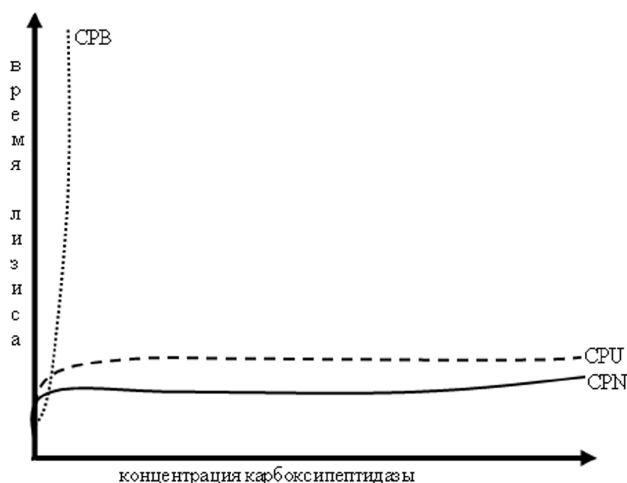


Рисунок 2. Сравнительный характер лизиса сгустка из плазмы крови в присутствии различных концентраций CPB, CPU и CPN - на основании турбидиметрии. На рисунке изображены дозозависимые кривые времени лизиса сгустков из CPU-обеднённой плазмы в условиях добавления экзогенных CPB, CPU и CPN относительно времён лизиса без добавления карбоксипептидаз в реакционную среду. Данная диаграмма отображает общие эффекты этих ферментов (с изменениями из [55]).

Антифибринолитическая эффективность CPB повышается при снижении концентрации тАП. CPB действует в синергизме с основными ингибиторами пламина. В отсутствие CPB ингибиторы пламина не способны в экспериментальной системе остановить фибринолиз. В виду особенностей физиологической функции, вероятно, *in vivo* CPB не оказывает существенного влияния на фибринолиз [11].

В 1989 году в сыворотке крови человека была обнаружена термолабильная основная карбоксипептидазная активность, биохимически отличная от изучаемой с 60-х годов 20 века активности CPN [12, 13]. Вследствие температурной нестабильности карбоксипептидаза, ответственная за данную активность, была названа как “нестабильная” (англ. Unstable – CPU). Несколькими месяцами спустя исследователи медицинской школы Нагойского университета сообщили об идентификации в крови новой аргинин-специфичной карбоксипептидазной активности схожей с известными карбоксипептидазами N и B, временно возникающей в результате свёртывания или воспаления и не связанной с форменными элементами крови. Биохимики из Японии назвали фермент аргининовой (R) карбоксипептидазой (CPR) [14]. Чуть позже из плазмы крови человека был выделен и клонирован неизвестный, как полагали учёные ранее, плазминоген-связывающий белок, обладающий карбоксипептидазной активностью, и по первичной структуре родственный тканевым карбоксипептидазам A и B. Белок обозначили как плазменная карбоксипептидаза В (pCPB), из-за основной карбоксипептидазной активности и высокой степени схожести первичной структуры с проCPB крысы (44%), в том числе наличия аспарагиновой кислоты в 257 позиции каталитического домена [15]. А в 1995 году канадская группа под руководством Nesheim выделила и охарактеризовала из плазмы крови человека зимоген, расщепляемый тромбином (КФ 3.4.21.5), по аминокислотной последовательности идентичный пробелку pCPB. Данный белок проявлял подобную CPB активность после активации тромбином и был назван TAFI (от англ. Thrombin-activable fibrinolysis inhibitor), поскольку пролонгировал время лизиса сгустка [16]. В этом исследовании впервые объяснили описанные ранее: антифибринолитический эффект возникающий при активации протромбина во время фибринолиза индуцированного тАП [17] присутствием TAFI, а профибринолитический эффект активированного протеина C [18, 19] через замедление активации TAFI [24]. Молекулярно-генетический анализ и сравнение данных N-концевого секвенирования CPU, CPR, pCPB, TAFI показали, что все они идентичны.

CPU синтезируется клетками печени в виде презимогена, состоящего из 423 аминокислотных остатков (а.о.); 22-х членный N-концевой сигнальный пептид отщепляется внутриклеточно и зимоген (проCPU), состоящий из активационного (92 а.о.) и каталитического (309 а.о.) доменов, попадает в циркуляцию. На основании результатов работы нескольких групп установлено, что концентрация проCPU в плазме крови варьирует в диапазоне 73-250 нМ (4,4-15 мкг/мл) [20].

В структуре белка и механизме катализа у CPU и CPB много общего (рис. 1). Активационный домен белка CPU имеет 5 потенциальных сайтов гликозилирования, четыре из которых гликозилированы у выделенного из плазмы фермента [15, 16]. Данный домен стабилизирует проCPU

от конформационных изменений в высокомолекулярном регионе белка 296-350 а.о., а также затрудняет доступ субстрата в активный центр фермента. Зимоген CPU активируется протеолитическим расщеплением связи Arg⁹²-Ala⁹³. Диссоциация активационного домена смещает изоэлектрическую точку проCPU с pH 5 до pH 8, делая фермент CPU менее растворимым. Активацию проCPU способны осуществлять тромбин и плазмин. Тромбин сам по себе является малоэффективным активатором проCPU и необходим в больших количествах ($K_M = 0,5-2,1$ мкМ; $K_{кат} = 0,0021$ с⁻¹), но в комплексе с трансмембранным белком тромбомодулином, экспрессируемым на поверхности эндотелиальных клеток, эффективность активации возрастает примерно в 1250 раз за счёт увеличения каталитической константы скорости гидролиза проCPU ($K_{кат} = 0,4-1,2$ с⁻¹). Взаимодействие с тромбомодулином изменяет субстратную специфичность тромбина. Комплекс тромбин-тромбомодулин (Т-Тм) плохо расщепляет фибриноген и другие субстраты-прокоагулянты, но способен генерировать естественный антикоагулянт из протеина С и активную CPU. Вследствие такой двойной активности, с одной стороны, регулируется масштаб свёртывания, а с другой, растущий кровяной сгусток предохраняется от стремительного лизиса. Плазмин является более эффективным активатором проCPU по сравнению с тромбином ($K_M = 55$ нМ; $K_{кат} = 0,0004$ с⁻¹) [21]. Скорость опосредованной плазмином активации зимогена CPU увеличивается приблизительно в 16 раз в присутствии анионных гликозаминогликанов (ГАГ), в частности гепарина ($K_M = 20$ нМ; $K_{кат} = 0,0026$ с⁻¹). Эти экспериментальные данные, вероятно, указывают на определённую роль гепарина и других ГАГ, в том числе присутствующих в субэндотелиальном внеклеточном матриксе и способствующих усилению активации проCPU в месте повреждения сосуда, что приводит к стабилизации тромба [22]. Другие участники коагуляционного и фибринолитического каскадов, такие как урокиназа, тАП, активированный протеин С, калликреин, VHa-ф., IXa-ф. и Ха-ф. – не способны активировать проCPU. Согласно современным представлениям, комплекс Т-Тм рассматривается в качестве основного физиологического активатора проCPU, так как его каталитическая эффективность приблизительно на порядок выше, чем таковая у плазмينا-гепарина. Более того, в исследованиях *in vivo* с антителами, избирательно ингибирующими вызванное Т-Тм превращение проCPU, также показана существенная роль Т-Тм [23]. Однако есть данные *in vitro* и *in vivo*, демонстрирующие существенный вклад и плазмينا в активацию зимогена CPU: при введении антител к CPU в плазме мышей с индуцированной тканевым фактором тромбоэмболией повышается уровень комплексов плазмин- α_2 -антиплазмин и лизируются тромбы [24]. Активный фермент CPU – Zn-зависимая карбоксипептидаза, проявляющая большую специфичность к С-концевому аргинину и каталитически нестабильная [26]. CPU характеризуется спонтанной потерей активности при изменении температуры: время полужизни

составляет около 8-9 мин при 37°C [25]. Конформационные изменения, возникающие в результате инактивации при температурной инкубации фермента, приводят к открытию стерического доступа к сайту расщепления в области остатка Arg³⁰² для тромбина и гидролизу CPU этой эндопептидазой до фрагментов с молекулярными массами 25 кДа и 11 кДа [26]. CPU проявляет стабильную ферментативную активность по отношению к синтетическим низкомолекулярным субстратам (гиппурил-L-аргинину и гиппурил-L-лизину) и более крупным производным фибриногена, влияя на связывание плазминогена *in vitro* [27]. Зимоген CPU имеет общий каталитический потенциал, измеренный соотношением $K_{кат}/K_M$ в 18 раз меньший чем у самой CPU; он не способен отщеплять С-концевые лизины от модифицированных плазмином продуктов деградации фибрина [27]. Ген, кодирующий CPU, – *CPB2* – картирован на 13-ой хромосоме (13q14.11) и содержит 11 экзонов [28]. В нём выявлено около двадцати однонуклеотидных полиморфизмов (SNP): десять в 5'-фланкирующем регионе, шесть в кодирующей части гена и три в 3'-нетранслируемой области. Некоторые из полиморфизмов в 3'-нетранслируемой области способны влиять на стабильность мРНК. Два из шести SNP в кодирующем регионе: +505G/T (147Ala/Thr) и +1040 C/T (325Thr/Ile) определяют существование четырёх функционально значимых изоформ белка CPU: **CPU-A147-T325**; **CPU-A147-I325**; **CPU-T147-T325**; **CPU-T147-I325**. Полиморфизм в позиции 147 полипептида CPU не оказывает значительного влияния на функциональные свойства, а полиморфизм в позиции 325 влияет на термостабильность активной формы и иммунореактивность, что частично объясняет широкий референтный интервал концентрации проCPU в плазме [20]. Остатки аминокислот в позиции 325 расположены в домене белка, ответственном за конформационные изменения при температурной инактивации. Время полужизни Ile325-изоформ CPU больше, чем Thr325-изоформ этого белка (приблизительно 15-16 мин против 8 мин), независимо от природы а.о. в 147-м положении белка.

В тромбоцитах обнаружена проCPU мегакариоцитарного происхождения не отличающаяся по своим биохимическим характеристикам от плазменного фермента. Концентрация проCPU внутри объёма кровяной пластинки – 7 мкг/мл, что сопоставимо с уровнем в плазме. Доля же концентрации проCPU во всех тромбоцитах от общей концентрации проCPU в плазме крови примерно 0,05-0,4% [(48±5) нг/1×10⁹ тромбоцитов]. Секреция проCPU из альфа-гранул происходит при активации тромбоцитов. Наличие в тромбоцитах собственного пула проCPU вносит вклад в феномен резистентности к фибринолизу богатых тромбоцитами тромбов [29, 30].

К настоящему времени в плазме не найдено ни одного физиологического ингибитора CPU. Возможно, внутренняя нестабильность молекулы CPU – это один из регуляторных механизмов её антифибринолитической активности. Согласно

выдвинутой гипотезе, в дальнейшем частично подтверждённой двумя независимыми группами исследователей, CPU замедляет фибринолиз при определённой пороговой концентрации: когда CPU присутствует выше порогового уровня фибринолиз остаётся в инициальной фазе [31, 32]. И только когда уровень CPU опускается ниже порогового, скорость фибринолиза возрастает за счёт экспоненциального увеличения С-концевых лизиновых остатков. Пороговая величина зависит от концентрации плазмينا, а концентрация плазмина определяется концентрациями тАП и α_2 -антиплазмينا. Время, в течении которого концентрация CPU поддерживается на надпороговом уровне, зависит:

1) от стабильности CPU, так как совсем малой концентрации CPU (около 1-2% от общего уровня белка проCPU) достаточно для полумаксимального снижения индуцированного тАП фибринолиза в системе чистых компонентов.

2) от концентрации проCPU в плазме и степени её активации, поскольку концентрация проCPU в плазме меньше величины K_M для активации проCPU тромбином ($K_M = 1$ мкМ) и комплексом Т-Тм [21, 25].

Поэтому, формирование поддерживаемого относительно низкого уровня CPU-активности выше пороговой величины – намного эффективнее, чем высокий, но короткий всплеск её активности.

Помимо продуктов протеолиза фибрина известно несколько естественных субстратов CPU. К их числу относятся: фибринопептид В, брадикинин, С3а- и С5а-компоненты комплемента, клеточные рецепторы плазминогена. Это предполагает участие CPU в воспалительных реакциях, процессах миграции клеток, ангиогенезе. Всё это может быть важно при понимании такого феномена как атеросклероз и вкладе воспалительных реакций и тромбоза на стадиях зрелого атеросклеротического процесса. Вследствие того, что активация зимогена CPU осуществляется тромбином, нарушения коагуляционного каскада могут приводить к формированию сгустков, “относительно незащищённых” от лизиса. Так, было высказано предположение, что кровотечения при гемофилии частично вызваны повышенным фибринолизом [33-35]. Недостаточность факторов VIII и IX ведёт к лизису незрелых сгустков, сформированных *in vitro*; предполагается, что кровотечения у пациентов с гемофилиями А и В связаны не только с недостаточностью в формировании сгустков, но и с неадекватной генерацией CPU [33, 34]. Пролонгирование лизиса сгустка CPU было качественно продемонстрировано в экспериментах с гемофильной плазмой, в которых ингибитор CPU вызывал небольшое но достоверное сокращение времени лизиса. Совсем недавно было показано, что “параметры активации проCPU” в цельной венозной крови от пациентов с гемофилией А соотносятся с клиническими фенотипами кровотечений (степенью тяжести) и вместе с исследованием генерации тромбина могут использоваться для оценки клинического течения гемофилии А. В частности, было продемонстрировано, что уровень CPU на 20-й

мин сильнее коррелировал с кровоточивостью, чем уровень значимого маркера тромбинемии – комплекса тромбин-антитромбин III [36]. В исследованиях *in vitro* плазма от пациентов с гипертромбинемией связанной с мутацией G20210A в гене протромбина обладает высокой степенью активации проCPU, что обуславливает снижение фибринолиза и служит потенциальным механизмом развития тромбоза у таких людей [37]. Учитывая, что фактор XIa способствует образованию тромбина, кровотечения у пациентов с дефицитом фактора XI можно объяснить также снижением активации проCPU. Об этом свидетельствует тот факт, что у таких пациентов кровотечения возникают в основном в ткани с локально повышенной фибринолитической активностью. На экспериментальных животных было подтверждено XI-фактор-зависимое торможение фибринолиза, осуществляемое нарабатываемой тромбином CPU.

Тромбофилические состояния – это не только нарушения, обусловленные компонентами коагуляционного каскада, но и нарушения, связанные с компонентами фибринолиза. Сниженный фибринолитический потенциал плазмы (гипофибринолиз) является фактором риска как венозного, так и артериального тромбозов [39, 40]. Эпидемиологические исследования показали, что повышенные уровни CPU в плазме коррелируют с повышенным риском венозного тромбоза [41, 42]. Неоднозначны данные исследований относительно взаимосвязи уровней CPU и артериальных тромбозов, что может быть связано с использованием различных методов исследования.

Принимая во внимание “пороговый механизм” активации проCPU, а также тот факт, что концентрация проCPU в плазме меньше K_M , общую концентрацию проCPU, степень активации проCPU и стабильность фактических изоформ CPU следует рассматривать как факторы риска тромботических состояний.

Поскольку основные карбоксипептидазы крови не ингибируют, а замедляют фибринолиз, они могут служить интересной фармакологической мишенью [43]. Так, ингибиторы CPU имеют профибринолитический потенциал. Тяжёлые кровотечения, возникающие при использовании современных тромболитиков могут быть снижены за счёт сочетанного использования с ингибиторами CPU, которые могут потенцировать тромболитическую эффективность новых препаратов и способствовать снижению их эффективных доз, тем самым снижая риск кровотечений. На моделях артериального и венозного тромбозов у кроликов удалось существенно улучшить время перфузии при введении до тромболизиса специфического ингибитора для CPU из клубней картофеля (PTCI), а необходимая доза тАП для эффективного тромболизиса снижена в три раза [44, 45]. Кроме химических ингибиторов в последние годы разрабатываются вещества-блокаторы активации проCPU. Так, уже разработаны антитела с такими профибринолитическими свойствами. Рекombинантные однодоменные мини-антитела, ингибирующие

активацию проCPU комплексом Т-Тм, увеличивали степень и скорость тАП-опосредованного лизиса сгустка *in vitro*, а на модели венозной тромбоэмболии у мышей значительно снижали отложение фибрина в лёгких даже без введения тАП [46]. В другой работе внутривенное введение ингибиторов карбоксипептидаз типа В (низкомолекулярного синтетического или РТСИ) без добавления тАП вызывало эффективный лизис уже сформированных микротромбов в почках крысы, что сопровождалось повышением уровня D-димера в плазме [47]. На мышинной модели тромбоэмболии, вызванной внутривенным введением тромбопластина (2,5 мкг/кг), вводимые за 5 мин моноклональные антитела к человеческой рекомбинантной стабильной CPU, ингибирующие активацию зимогена CPU, снижали отложение фибрина в лёгких, а *in vitro* ингибировали активацию проCPU плазмином [24].

3. ИЗУЧЕНИЕ CPN И ЕЁ ВКЛАДА В РЕГУЛЯЦИЮ ФИБРИНОЛИЗА

По классификации базы данных пептидаз MEROPS, CPN (лизиновая карбоксипептидаза, кининаза I, инактиватор анафилатоксинов) – член подсемейства В семейства М14 цинксодержащих металлокарбоксипептидаз. Эта “регуляторная” внеклеточная экзопептидаза, синтезируется печенью и быстро секретируется ею в кровь. В отличие от CPU, в плазме CPN находится в стабильной активной форме в виде гетеротетрамерного гликопротеина молекулярной массой 280 кДа, состоящего из двух 48-55 кДа каталитических субъединиц (CPN1) (рис. 1) и двух 83 кДа гликозилированных регуляторных субъединиц (CPN2). Концентрация циркулирующей в плазме CPN составляет 100 нМ (30 мкг/мл). CPN содержит в своём активном центре ион цинка в качестве кофактора. CPN рассматривается как регулятор, защищающий от системного распространения медиаторов воспаления и вазоактивных пептидов (брадикинин, каллидин), а также контролирующей активность некоторых цитокинов и факторов роста, отщепляя от них С-концевые лизин и аргинин [48-50]. Лизин является предпочтительным С-концевым остатком. Сериновые протеиназы трипсин и плазмин протеолитически воздействуют на обе субъединицы CPN, повышая пептидазную активность этого фермента. Помимо пептидазной активности с оптимумом pH=7,5, CPN также обладает эстеразной активностью, выраженной при pH=8,7 [13]. Ферментативная активность CPN чувствительная к действию регуляторов. Добавление или, вероятно, замена иона цинка на ион кобальта в ферменте *in vitro* приводит к повышению активности CPN в 2-6 раз в зависимости от субстрата. Присутствие Co^{2+} в реакционной среде существенно повышает активность фермента при pH=7. Глутатион, цистеин и орнитин незначительно ингибируют фермент. Также ингибируют CPN лизин и аргинин. Природными субстратами для CPN могут выступать: продукты активации комплемента (анафилатоксины), гексапептидные энкефалины, фибринопептиды и

продукты деградации фибрина, α -цепь гемоглобина, хемерин [49-50].

В гене, кодирующем регуляторную субъединицу CPN, – CPN2 (3q29) – не описано существенных полиморфизмов или мутаций. В 80-х годах прошлого столетия была обследована семья человека, имеющего “недостаточность CPN”, клинически проявлявшуюся частыми ангионевротическими отёками на протяжении 11 лет, приступами продолжительностью до 24-х часов с преимущественным вовлечением лица и языка. Генетическая причина была идентифицирована ретроспективно в 2003 году путём секвенирования гена, кодирующего каталитическую субъединицу CPN (карбоксипептидазный протомер CPN) – CPN1 (10q24.2). В геномной ДНК пробанда обнаружили три варианта CPN1: 1) мутация сдвига рамки считывания в первом экзоне из-за инсерции G в позицию 385-го нуклеотида; 2) миссенс-мутация 746G>A в третьем экзоне; 3) IVS1 +6C>T SNP в первом интроне. На основании популяционных данных было предположено, что CPN-недостаточность у данного пациента была обусловлена редкими молекулярными событиями: описанными выше точечными мутациями. По данным ряда исследований, активность CPN повышается при раке лёгкого, саркоидозе, хронических бронхитах, бронхиальной астме, болезни Крона, псориазе и ревматоидном артрите [50-52].

В отличие от CPU, роль которой в фибринолизе достаточно хорошо экспериментально обоснована, участие CPN в этом процессе остаётся неясным. График зависимости торможения фибринолиза от концентрации CPU характеризуется кривой с насыщением (рис. 2). Добавление очищенной CPU к сгусткам из цельной крови, погружённым в плазму, существенно замедляет лизис этих сгустков, а введение в систему ингибитора CPU – РТСИ – отменяет эффект торможения фибринолиза. Кроме того, в плазме, лишённой CPU, фибринолиз происходит быстрее, чем в плазме, содержащей фермент CPU. В тоже время, добавление очищенной CPN к сгусткам из цельной крови, помещённым в плазму, незначительно замедляет лизис на начальных этапах, а после 1,5 ч инкубации степень лизиса в системах с добавлением экзогенной CPN и без CPN была одинаковой [53]. Добавление специфического ингибитора CPN к сгусткам, сформированным из обеднённой по проCPU плазмы, не потенцирует фибринолиз [54, 55].

Объяснением описанным выше лабораторным феноменам может быть степень отщепления лизинов от фибринового сгустка CPU в сравнении с CPN. Частично гидролизованные плазмином продукты фибрина тромбов из цельной крови экспонируют огромное количество сайтов специфического связывания плазминогена. Когда такие продукты протеолиза фибрина инкубируются с очищенной CPU (в концентрации равной активации всей проCPU, присутствующей в циркуляции) количество специфических сайтов для плазминогена уменьшается более чем на 90%. Однако если такие продукты

деградации фибрина инкубируются с очищенной CPN в плазменной концентрации, за тот же период времени количество сайтов связывания плазминогена уменьшается не более чем на 50% [53]. Возможно, участие CPN в замедлении активации плазминогена связано не с фибрин-зависимым механизмом, а с активацией плазминогена на клеточных поверхностях. Мембранные белки некоторых типов клеток имеют карбоксиконцевые лизины, выступающие в роли рецепторов для связывания плазминогена. На поверхности свежевыделенных лейкоцитов обнаруживается примерно в 100-раз меньше таких С-лизин, в сравнении с лейкоцитами из клеточной культуры. Такое различие, как полагают, связано с постоянной активностью CPN, присутствующей в крови и вносящей существенный вклад в отщепление от клеточных рецепторов С-концевых остатков лизина. Кроме того, при инкубации клеток в плазме наблюдается уменьшение сайтов связывания плазминогена, и это уменьшение блокируется добавлением 2-гуанидиноэтилмеркаптоянтарной кислоты (ГЭМЯК) – специфического ингибитора CPN. Аналогично, клетки проинкубированные с очищенной CPN демонстрируют снижение количества сайтов для плазминогена, и этот эффект отменяется добавлением ГЭМЯК [53]. Такой механизм видимо, важен главным образом в торможении деградации внеклеточного матрикса и во влиянии на миграцию клеток [53, 56].

В 2005 году было показано изменение четвертичной структуры белка плазменной CPN человека, а также изменение её активности по отношению к низкомолекулярному синтетическому субстрату под действием плазмина. При инкубации интактной тетрамерной молекулы CPN с плазмином происходил быстрый протеолиз связи Arg⁴⁵⁷–Ser⁴⁵⁸ в области С-конца регуляторных субъединиц с образованием фрагментов 72 и 13 кДа и высвобождением активного 142 кДа-гетеродимера. Кроме того, каталитические субъединицы также подвергались гидролизу с образованием фрагментов с молекулярной массой 48 кДа [56]. Длительная инкубация с плазмином приводила к гидролизу связи Arg²¹⁸–Arg²¹⁹ каталитических субъединиц и образованию фрагментов 21 и 27 кДа, которые удерживались вместе при помощи нековалентных взаимодействий и обладали большей активностью по сравнению с нативным ферментом. В 2007-2008 годах также обнаружено увеличение каталитической активности CPN при расщеплении плазмином и предложена “концепция долговременного антифибринолиза” [55]. Учёные из Канады показали, что CPN пролонгирует фибринолиз: 150 нМ увеличивает время лизиса на 50%, а 200 нМ – удваивает время лизиса. Однако, при добавлении к сгусткам CPN, расщеплённой плазмином (CPN-рп), происходило существенное замедление фибринолиза. Так, максимальная антифибринолитическая активность достигалась при предварительной 40-минутной инкубации CPN с плазмином. Антифибринолитическая активность гетеродимерной CPN-рп на 700% выше, чем у интактной CPN. CPN и CPN-рп пролонгируют

лизис дозозависимым и тАП-зависимым способом (рис. 2). Стабильная активность CPN, по-видимому, подчиняется такому же механизму порогового уровня, как и CPU. ГЭМЯК аннулирует антифибринолитический эффект CPN-рп. Такое участие плазмина в генерации “активированной” CPN-рп во время фибринолиза *in vivo* не доказано, поскольку в описанной работе CPN расщеплялась плазмином предварительно *in vitro*, а “активированная” CPN *in situ*, разумеется, не оказывает такого антифибринолитического эффекта. Возможно, плазмин и не способен активировать CPN, чтобы она вызвала локальное торможение фибринолиза. Однако в плазме крови есть другие протеиназы, которые вероятно могут активировать CPN, но это пока ещё не изучено. Недавно с помощью поверхностного плазмонного резонанса показано, что CPN может связываться с фибриногеном и фибрином. Кроме того, CPN была выделена из свёрнутой плазмы как один из белков, связанных с фибриновым сгустком [57].

4. НОВОЕ В ПОНИМАНИИ МЕХАНИЗМОВ ВЛИЯНИЯ КАРБОКСИПЕПТИДАЗ ПРИ СВЁРТЫВАНИИ

В самых последних экспериментальных исследованиях выявлено, что фибриноген в присутствии CPB организуется в более плотную фибриновую сеть с тонкими волокнами [58]. тАП-индуцированный лизис фибрина модифицированного CPB снижается, а генерация плазмина тормозится в присутствии CPB [58]. Для растворения фибринового сгустка фибрина свёрнутого в присутствии CPB требуется в два раза меньше плазмина, добавленного на поверхность сгустка. Однако при гомогенном распределении плазмина в объёме всего сгустка стимулирующий эффект CPB отменяется. В целом CPB тормозит растворение сгустков из плазмы тАП-зависимым лизисом. Если тАП был равномерно диспергирован в плазме до свёртывания, то 0,1 Ед/мл CPB пролонгирует время лизиса сгустка более чем в два раза, в то время как похожий эффект в системе чистых компонентов наблюдается при более высокой концентрации CPB. Также выявлены некоторые изменения в структуре фибрина в присутствии микромолярных концентраций аргинина, схожие с CPB-обработкой и в чем-то отличающиеся.

В работе [58] обнаружены два эффекта воздействия карбоксипептидазной активности на фибрин, не описываемых в концепции CPB-зависимой блокады положительной обратной петли фибринолиза основанной на экспонировании С-лизин: 1) повышение активности плазмина, когда фермент из жидкой фазы воздействует на поверхность предварительно сформированных сгустков, как считают авторы, вероятно, вследствие повышенной диффузии; 2) ускорение активации плазминогена, связанное со структурой фибрина. Все эти данные говорят о взаимосвязи карбоксипептидазной активности плазмы, локальной концентрации аргинина при свёртывании и структуры фибрина. Это указывает на сложность механизма влияния основных карбоксипептидаз на фибринолиз, способных

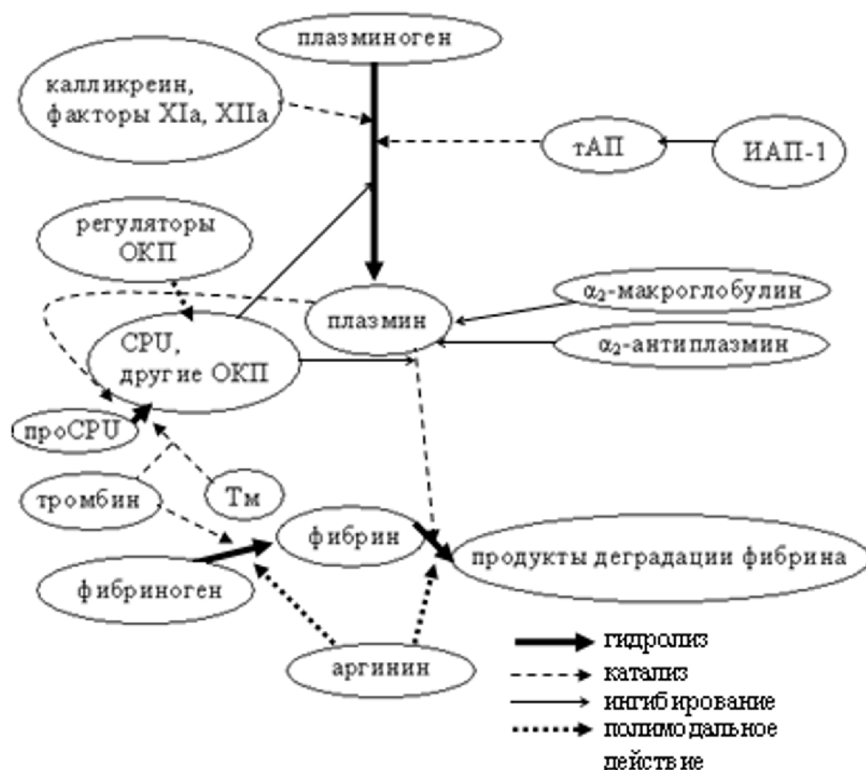


Рисунок 3. Фибринолитическая система и её регуляция: тАП - тканевый активатор плазминогена, ИАП-1 - ингибитор активаторов плазминогена-1, ОКП - основные карбоксипептидазы, Тм-тромбомодулин.

вносить изменения в ультраструктуру сгустка при его формировании и тем самым увеличивать скорости активации плазминогена и диффузии плазмينا в фибриновый сгусток (рис. 3). Высвобождаемый основными карбоксипептидазами аргинин может служить дополнительным модулирующим фактором биологической активности карбоксипептидаз [58].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итоги всему сказанному выше, следует отметить, что активность основных карбоксипептидаз, присутствующих в крови является одним из более сложных и важных механизмов, модулирующих кинетику фибринолиза, чем это принято считать. Необходимо понимать все тонкие эффекты и значение их баланса в рассмотрении карбоксипептидазной активности. И безусловно, следует внедрять комплексную оценку основных карбоксипептидаз крови в широкую лабораторную практику и использовать как обязательный показатель в клинике коагулологических нарушений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Neurath H., Walsh K.A. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **73**, 3825-3832.
2. Barrett A.J., Rawlings N.D., Woessner J.F. (2004) Handbook of Proteolytic Enzymes, 2nd edition, Elsevier, Amsterdam, Vol.1, 984 p.
3. Vassalli J.D., Sappino A.P., Belin D. (1991) J. Clin. Invest., **88**, 1067-1072.
4. Plow E.F., Freaney D.E., Plescia J., Miles L.A. (1986) J. Cell Biol., **103**(6 Pt1), 2411-2420.
5. Miles L.A., Dahlberg C.M., Plescia J., Felez J., Kato K., Plow E.F. (1991) Biochemistry, **30**, 1682-1691.
6. Camacho M., Fondaneche M.-C., Burtin P. (1989) FEBS Lett., **245**, 21-24.
7. Gonzalez-Gronow M., Stack S., Pizzo S.V. (1991) Arch. Biochem. Biophys., **286**, 625-628.
8. Fleury V., Anglés-Cano E. (1991) Biochemistry, **30**, 7630-7638.
9. Folk J.E., Gladner J.A. (1958) J. Biol. Chem., **231**, 379-391.
10. Yamamoto K.K., Pousette A., Chow P., Wilson H., el Shami S., French C.K. (1992) J. Biol. Chem., **267**, 2575-2581.
11. Walker J.B., Bajzar L. (2007) J. Thromb. Haemost., **5**, 1257-1264.
12. Hendriks D., Scharpe S., Van Sande M., Lommaert M.P. (1989) J. Clin. Chem. Clin. Biochem., **27**, 277-285.
13. Yang H.Y.T., Erdös E.G. (1967) Nature, **215**(5108), 1402-1403.
14. Campbell W., Okada H. (1989) Biochem. Biophys. Res. Commun., **162**, 933-939.
15. Eaton D.L., Malloy B.E., Tsai S.P., Henzel W., Drayna D. (1991) J. Biol. Chem., **266**, 21833-21838.
16. Bajzar L., Manuel R., Nesheim M.E. (1995) J. Biol. Chem., **270**, 14477-14484.
17. Côté H.C.F., Stevens W.K., Bajzar L., Banfield D.K., Nesheim M.E., MacGillivray R.T. (1994) J. Biol. Chem., **269**, 11374-11380.
18. Bajzar L., Nesheim M. (1993) J. Biol. Chem., **268**, 8608-8616.
19. Bajzar L., Nesheim M.E., Tracy P.B. (1996) Blood, **88**, 2093-2100.
20. Willemse J.L., Hendriks D.F. (2006) Clin. Chem., **52**, 30-36.
21. Bajzar L., Morser J., Nesheim M. (1996) J. Biol. Chem., **271**, 16603-16608.
22. Mao S.S., Cooper C.M., Wood T., Shafer J.A., Gardell S.J. (1999) J. Biol. Chem., **274**, 35046-35052.

23. Binette T.M., Taylor F.B., Peer G., Bajzar L. (2007) *Blood*, **110**, 3168-3175.
24. Vercauteren E., Emmerechts J., Peeters M., Hoylaerts M.F., Declerck P.J., Gils A. (2011) *Blood*, **117**, 4615-4622.
25. Boffa M.B., Wang W., Bajzar L., Nesheim M.E. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 2127-2135.
26. Marx P.F., Brondijk T.H.C., Plug T., Romijn R.A., Hemrika W., Meijers J.C., Huizinga E.G. (2008) *Blood*, **112**, 2803-2809.
27. Valnickova Z., Thøgersen I. B., Potempa J., Enghild J.J. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 3066-3076.
28. Tsai S.P., Drayna D. (1992) *Genomics*, **14**, 549-550.
29. Mosnier L.O., Buijtenhuijs P., Marx P.F., Meijers J.C., Bouma B.N. (2003) *Blood*, **101**, 4844-4846.
30. Carrieri C., Galasso R., Semeraro F., Ammolio C.T., Semeraro N., Colucci M. (2011) *J. Thromb. Haemost.*, **9**, 154-162.
31. Walker J.B., Bajzar L. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 27896-27904.
32. Leurs J., Nerme V., Sim Y., Hendriks D. (2004) *J. Thromb. Haemost.*, **2**, 416-423.
33. Broze G.J.Jr., Higuchi D.A. (1996) *Blood*, **88**, 3815-3823.
34. Mosnier L.O., Lisman T., Van den Berg H.M., Nieuwenhuis H.K., Meijers J.C., Bouma B.N. (2001) *Thromb. Haemost.*, **86**, 1035-1039.
35. Foley J.H., Nesheim M.E. (2009) *J. Thromb. Haemost.*, **7**, 453-459.
36. Foley J.H., Nesheim M.E., Rivard G.E. (2012) *Haemophilia*, **18**, 316-322.
37. Colucci M., Binetti B.M., Tripodi A., Chantarangkul V., Semeraro N. (2004) *Blood*, **103**, 2157-2161.
38. Minnema M.C., Friederich P.W., Levi M., von dem Borne P.A., Mosnier L.O., Meijers J.C., Biemond B.J., Hack C.E., Bouma B.N., ten Cate H. (1998) *J. Clin. Invest.*, **101**, 10-14.
39. Meltzer M.E., Bol L., Rosendaal F.R., Lisman T., Cannegieter S.C. (2010) *J. Thromb. Haemost.*, **8**, 605-607.
40. Guimarães A.H.C., de Bruijne E.L.E., Lisman T., Dippel D.W., Deckers J.W., Poldermans D., Rijken D.C., Leebeek F.W. (2009) *Br. J. Haematol.*, **145**, 115-120.
41. Van Tilburg N.H., Rosendaal F.R., Bertina R.M. (2000) *Blood*, **95**, 2855-2859.
42. Libourel E.J., Bank I., Meinardi J.R., Baljé-Volkers C.P., Hamulyak K., Middeldorp S., Koopman M.M., van Pampus E.C., Prins M.H., Büller H.R., van der Meer J. (2002) *Haematologica*, **87**, 1068-1073.
43. Willemse J.L., Heylen E., Nesheim M.E., Hendriks D.F. (2009) *J. Thromb. Haemost.*, **7**, 1962-1971.
44. Klement P., Liao P., Bajzar L. (1999) *Blood*, **94**, 2735-2743.
45. Nagashima M., Werner M., Wang M., Zhao L., Light D.R., Pagila R., Morser J., Verhallen P. (2000) *Thromb. Res.*, **98**, 333-342.
46. Hendrickx M.L.V., Zatloukalova M., Hassanzadeh-Ghassabeh G., Muyldermans S., Gils A., Declerck P.J. (2014) *Thromb. Haemost.*, **111**, 824-832.
47. Muto Y., Suzuki K., Sato E., Ishii H. (2003) *Eur. J. Pharmacol.*, **461**, 181-189.
48. Michel B., Igic R., Leray V., Deddish P.A., Erdős E.G. (1996) *Circ. Res.*, **78**, 635-642.
49. Du X.Y., Zabel B.A., Myles T., Allen S.J., Handel T.M., Lee P.P., Butcher E.C., Leung L.L. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 751-758.
50. Skidgel R.A., Erdős E.G. (2007) *Int. Immunopharmacol.*, **7**, 1888-1899.
51. Mathews K.P., Pan P.M., Gardner N.J., Hugli T.E. (1980) *Ann. Intern. Med.*, **93**, 443-445.
52. Cao H., Hegele R.A. (2003) *J. Hum. Genet.*, **48**, 20-22.
53. Redlitz A., Tan A.K., Eaton D.L., Plow E.F. (1995) *J. Clin. Invest.*, **96**, 2534-2538.
54. Walker J.B., Hughes B., James I., Haddock P., Kluff C., Bajzar L. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**(11), 8913-8921.
55. Walker J.B., Binette T.M., Mackova M., Lambkin G.R., Mitchell L., Bajzar L. (2008) *J. Thromb. Haemost.*, **6**, 848-855.
56. Quagrainie M.O., Tan F., Tamei H., Erdős E.G., Skidgel R.A. (2005) *Biochem. J.*, **388**(Pt 1), 81-91.
57. Talens S., Lebbink J.H.G., Malfliet J.J.M.C., Demmers J.A., Uitte de Willige S., Leebeek F.W., Rijken D.C. (2012) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **427**, 421-425.
58. Kovács A., Szabó L., Longstaff C., Tenekedjiev K., Machovich R., Kolev K. (2014) *Thromb. Res.*, **133**, 80-87.
59. Denis C., Deiteren K., Mortier A., Tounsi A., Franssen E., Proost P., Renault J.C., Lambeir A. M. (2012) *PLoS One.*, **7**, e34199.
60. Fernández D., Pallarès I., Covalada G., Avilés F.X., Vendrell J. (2013) *Curr. Med. Chem.*, **20**, 1595-1608.

Поступила: 15. 02. 2015.
Принята к печати: 18. 03. 2015.

BASIC CARBOXYPEPTIDASES OF BLOOD: SIGNIFICANCE FOR COAGULOGY

A.V. Timofeev

Russian Research Institute of Haematology and Transfusiology,
16 Vtoraya Sovetskaya str., Saint Petersburg, 191024 Russia; fax: +7(812) 717-25-50;
e-mail: antonvtimhaef@gmail.com

This review considers the basic metallo-carboxypeptidases of human blood and their role in coagulologic disorders. It includes information on the history of the discovery and biological characteristics of potential enzymes-regulators of the fibrinolytic process: carboxypeptidase U and carboxypeptidase N. Certain attention is paid to the biochemical mechanisms and the main modern concepts of the antifibrinolytic effects of these enzymes.

Key words: basic carboxypeptidases, fibrin, fibrinolysis, plasmin, clot