

612.015.1

В31

К.Н.ВЕРЕМЕЕНКО
О.П.ГОЛОБОРОДЬКО
А.И.КИЗИМ

ПРОТЕОЛИЗ
В норме
и при
патологии

К. Н. ВЕРЕМЕЕНКО
О. П. ГОЛОБОРОДЬКО
А. И. КИЗИМ

ПРОТЕОЛИЗ в норме и при патологии

УДК 616.01:612.01
К 80-88

КИЕВ «ЗДОРОВ'Я» 1988

УДК 612.015.3+547.96

182848

Протеолиз в норме и при патологии
Веремеенко К. Н., Голобородько О. П., Кизим А. И. Государственный институт
К Здоровья, 1988.— 200 с
В монографии систематизированы современные представления о роли реакций ограниченного протеолиза в осуществлении важнейших функций организма — свертывания крови, фибринолиза, кининогенеза, иммуногенеза, регуляции артериального давления и др. Основное внимание уделено протеолитическим системам крови. Изложены данные о белковых ингибиторах крови и тканей, которые играют ключевую роль в регуляции протеолитических систем организма. Освещено значение протеолитических ферментов в патогенезе злокачественных новообразований, бронхолегочных заболеваний, а также важность их исследования в клинике для объективной характеристики течения этих заболеваний и прогноза. Представлены краткие сведения об использовании активаторов и ингибиторов протеолиза в терапии ряда заболеваний. Описаны методы определения в крови активности протеолитических ферментов и их ингибиторов.

Для биохимиков, физиологов, патофизиологов, иммунологов, врачей различных специальностей.

Ил 17 Табл 4 Библиогр.: с 188—196

Рецензенты акад. АН УССР В. А. Белицер, проф. В. В. Мосолов



В 4106000000-056 КУ 5-056-88
М209(04)-88 .

ISBN 5-311-00014-7

6601 «ЗДОРОВЬЕ» 1988

© Издательство «Здоровья», 1988

В настоящее время внимание биохимиков, врачей, патофизиологов, иммунологов привлечено к протеолитическим ферментам, которые играют важную роль в обмене веществ. В течение последнего десятилетия опубликовано большое количество работ по данной проблеме, состоялись симпозиумы, посвященные биологическим функциям этих ферментов, где были сформулированы новые представления о роли протеолиза в организме.

Сведения о протеолизе важны для выяснения многих вопросов теоретической и практической медицины и биологии. Эта проблема актуальна в связи с решениями XXVII съезда КПСС. В «Основных направлениях развития охраны здоровья населения и перестройки здравоохранения СССР в двенадцатой пятилетке и на период до 2000 года» поставлена задача сосредоточить усилия ученых на основных фундаментальных направлениях медико-биологических, клинических и биологических исследований, результаты которых должны привести к решению проблем практического здравоохранения и прежде всего к выявлению причин болезней с целью их профилактики, ранней диагностики и лечения.

Протеолитические ферменты катализируют расщепление пептидных связей в белках и пептидах. По современной классификации они относятся к классу гидролаз (3), подклассу пептид-гидролаз (3.4), который разделяется на два подподкласса — пептидазы (экзопептидазы) и протеиназы (эндопептидазы, пептидил-пептид-гидролазы). Пептидазы либо отщепляют от белков и пептидов N- и C-концевые аминокислоты, либо гидролизуют дипептиды. Протеиназы расщепляют внутренние пептидные связи в белках и пептидах. Они составляют наибольшую группу пептид-гидролаз и сравнительно полно изучены.

Протеолитические ферменты не только участвуют в неспецифическом распаде белковых молекул, но имеют и регуляторное значение, являясь одним из механизмов биологического контроля функций органов и тканей организма. Регуляторный механизм действия протеиназ включает два типа реакций. Первый связан с полным расщеплением белков до аминокислот, которые впоследствии вовлекаются в общий метаболический обмен. Второй обусловлен реакциями ограниченного протеолиза и заключается в

расщеплении одной или нескольких специфических пептидных связей в молекулах белков, что приводит к появлению активных форм белков или пептидов. Однако в отличие от общего протеолиза при этом не происходит полного расщепления белковых молекул. Ограниченный протеолиз играет решающую роль в образовании активных форм ферментов и гормонов из неактивных предшественников, синтезе и инактивации биоактивных пептидов (ангиотензинов, кининов, нейропептидов), имеющих значение в регуляции сосудистого тонуса, артериального давления, деятельности мозга, воспалительных и аллергических реакциях. Защитные функции организма — свертывание крови, фибринолиз, иммунный ответ осуществляются в каскадных реакциях при участии протеиназ с ограниченной специфичностью. Протеолитические ферменты играют важную роль в оплодотворении, морфогенезе, межклеточных взаимодействиях, онкогенной трансформации, патогенности вирусов.

Протеолитические ферменты, обладающие высокой биологической активностью, представляют потенциальную опасность для большинства белковых структур тканей. Однако в организме существуют механизмы, контролирующие это их свойство. Активность протеиназ регулируется несколькими путями — пространственной разобщенностью фермента и субстрата, синтезом большинства протеолитических ферментов в форме неактивных предшественников. К важнейшим физиологическим регуляторам протеолиза относятся также специфические белки — ингибиторы крови и тканей, которые связывают протеолитические ферменты, лишая их полностью или частично каталитической активности.

В норме существует динамическое равновесие между протеолитическими ферментами и их ингибиторами. При ряде патологических состояний происходит избыточная активация протеолиза, что является важным патогенетическим звеном в развитии деструктивных, воспалительных, аллергических реакций, нарушении процессов гемостаза, а также одним из факторов, способствующих инвазии клеток злокачественных опухолей.

Изучение протеолиза и механизмов его регуляции способствует решению задач практической медицины. Исследования протеиназ с широкой и в особенности узкой субстратной специфичностью, а также их ингибиторов с успехом проводятся в клинике для диагностики ряда заболеваний. Препараты очищенных протеиназ, их активаторов и ингибиторов используются в медицинской практике в качестве эффективных лечебных средств.

В литературе нет монографий, обобщающих данные о роли протеолиза, и в частности ограниченного, в защитных реакциях организма, участии протеолитических ферментов в воспалительных, аллергических реакциях и злокачественном перерождении клеток, а также механизмах их регуляции. Посвященные этим

вопросам обзорные статьи имеют в основном биохимическую направленность и не дают полного представления о значении протеолиза в физиологических и патологических процессах. В них не рассматривается значение исследований протеиназ и их ингибиторов в диагностике и терапии различных заболеваний.

В настоящей монографии обобщены и проанализированы данные литературы и собственных исследований авторов о биологических функциях протеолитических ферментов, механизмах их регуляции с помощью белковых ингибиторов крови и тканей, роли протеолиза в норме и при патологии, применении препаратов этих ферментов и их ингибиторов в клинике; описаны методы определения протеиназ и их ингибиторов в биологических жидкостях. Основное внимание уделено протеиназам и ингибиторам крови. Роль протеолитических ферментов во внутриклеточном обмене белков, определяющем их скорость распада и регуляцию кругооборота в организме, представляет самостоятельный интерес и здесь не освещается.

Задача монографии — привлечь внимание научных работников и врачей к исследованию роли протеолиза в норме и при патологии. Авторы будут глубоко признательны читателям за ценные советы и критические замечания

ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОГРАНИЧЕННОГО ПРОТЕОЛИЗА

ПРОТЕИНАЗЫ В ОБРАЗОВАНИИ АКТИВНЫХ ФОРМ ФЕРМЕНТОВ И ГОРМОНОВ

Протеолитические ферменты участвуют в различных физиологических процессах. Особое значение имеют реакции ограниченного протеолиза пептидных связей в неактивных белках-предшественниках, которые приводят к образованию активных форм ферментов, гормонов, пептидов. Эффективная концентрация физиологически активных соединений зависит от действия специфических протеиназ, участвующих не только в образовании, но и разрушении этих соединений.

Среди реакций ограниченного протеолиза наиболее хорошо изучены реакции образования активных форм ферментов из неактивных предшественников, или зимогенов. Этот процесс называется активацией зимогенов — термин, который вначале применяли для обозначения активации протеиназ поджелудочной железы. Позже было установлено, что аналогичный тип реакций широко распространен в организме и лежит в основе образования протеиназ систем гемокоагуляции, фибринолиза, комплемента, а также вазоактивных кининов, гормонов и других белковых соединений. Активация зимогенов при помощи ограниченного протеолиза представляет собой важнейший контрольный механизм, который может способствовать возникновению новых физиологических функций или регулировать уже существующие ранее.

Реакции ограниченного протеолиза в большинстве случаев осуществляются при помощи каскадного механизма, заключающегося в том, что на каждом этапе из соответствующего зимогена образуется протеолитический фермент, катализирующий следующую реакцию. Ограниченный протеолиз — заключительная реакция в образовании активных форм ферментов. Обычно пептидная связь расщепляется на поверхности молекулы предшественника, имеющей специфические образования в виде петель или хаотических отрезков полипептидной цепи, а не на внутренних участках со строением спирали или складчатых структур. Зимогены активируются путем протеолитического гидролиза пептидной связи на участке, являющемся аминоконцевым по отношению к активному центру фермента.

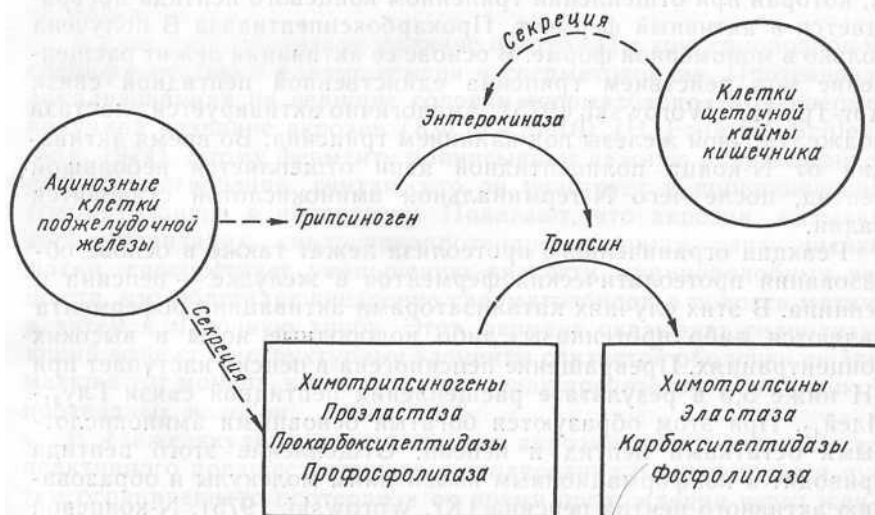
Рассмотрим реакции ограниченного протеолиза на примере активации проферментов поджелудочной железы. Особая роль в их превращении принадлежит трипсину, который активирует зимогены, не только секретируемые железой (собственные), но и

другие. Это объясняется способностью трипсина расщеплять пептидные связи, образованные карбоксильными группами основных аминокислот. В частности, трипсин активирует следующие зимогены: химотрипсиногены А, В, С, проэластазу, прокарбоксипептидазы А и В. Он активирует также проферменты панкреатической фосфолипазы, киназы фосфорилазы и др.

Активация зимогенов поджелудочной железы происходит в два этапа (рис. 1). На первом из них продуцируемый ацинозными клетками трипсиноген активируется специфической протеиназой слизистой оболочки тонкой кишки — энтерокиназой. Активация трипсиногена в физиологических условиях строго специфична, так как энтерокиназа не способна расщеплять другие белки. Во время активации гидролизуется единственная связь Лиз₆-Илей₇ из 228 пептидных связей в молекуле профермента и отщепляется гексапептид, при этом в молекуле белка происходят конформационные изменения и формируется активный центр. Установлено, что N-концевой фрагмент, отщепляющийся от трипсиногена во время активации, находится на поверхности молекулы и окружен молекулами растворителя, что делает его легко доступным для энтерокиназы. Ионы кальция способствуют увеличению скорости образования активного фермента и замедлению образования инертных белков.

Трипсин может также вызывать активацию трипсиногена путем аутокатализа. Однако скорость этой реакции в 1000 раз

Рис. 1. Схема активации зимогенов поджелудочной железы



меньше, чем скорость его активации энтерокиназой. Отщепленные пептиды в процессе активации зимогенов могут иметь физиологическое значение. Так, N-концевой гексапептид трипсиногена является антагонистом гастрина и подавляет секрецию желудочного сока. Образовавшийся трипсин далее активировывает превращение других панкреатических зимогенов — химотрипсиногенов, прокарбокиспептидаз, проэластазы, профосфолипазы. В процессе «быстрой активации» бычьего химотрипсиногена А трипсином вначале образуется л-химотрипсин. При этом в молекуле профермента гидролизуется пептидная связь Арг₁₅-Илей₁₆. Далее л-химотрипсин аутокаталитически превращается в σ-химотрипсин путем расщепления дополнительной пептидной связи Лей₁₃-Сер₁₄ и освобождается дипептид серил-аргинин. Из σ-химотрипсина в результате химотриптического гидролиза двух пептидных связей Тир₁₄₆-Тре₁₄₇ и Асп₁₄₈-Ала₁₄₉ образуется α-химотрипсин. Более подробные сведения о механизме активации трипсиногена и химотрипсиногенов приведены в монографии В. В. Мосолова (1971).

В основе активации прокарбокиспептидазы А также лежат процессы расщепления специфических пептидных связей. Этот профермент получен из поджелудочной железы в двух формах, одна из которых с молекулярной массой 87 000 дальтон состоит из трех субъединиц (I, II и III), другая с молекулярной массой 64 000 дальтон — из двух (I и II). Субъединица I представляет собой собственно предшественник карбокиспептидазы, а субъединица II является зимогеном эндопептидазы с субстратной специфичностью, подобной химотрипсину. В настоящее время выделена в чистом виде субъединица I прокарбокиспептидазы А, которая при отщеплении трипсином концевой пептида превращается в активный фермент. Прокарбокиспептидаза В получена только в мономерной форме. В основе ее активации лежит расщепление под действием трипсина единственной пептидной связи Арг-Тре (Кг. Worowski, 1975). Аналогично активируется эластаза поджелудочной железы под влиянием трипсина. Во время активации от N-конца полипептидной цепи отщепляется небольшой пептид, после чего N-терминальной аминокислотой становится валин.

Реакции ограниченного протеолиза лежат также в основе образования протеолитических ферментов в желудке — пепсина и реннина. В этих случаях катализаторами активации профермента являются либо протеиназы, либо водородные ионы в высоких концентрациях. Превращение пепсиногена в пепсин наступает при pH ниже 5,0 в результате расщепления пептидной связи Глу₄₁-Илей₄₂. При этом образуются богатый основными аминокислотными остатками пептид и пепсин. Отщепление этого пептида приводит к конформационным изменениям молекулы и образованию активного центра пепсина (Кг. Worowski, 1975), N-концевой

аминокислотой в последнем является изолейцин, в пепсиногене — лейцин.

Другой фермент желудочного сока реннин также синтезируется в форме зимогена. Активация прореннина происходит при pH ниже 5,0 и заключается в аутокаталитическом отщеплении фрагмента от N-концевого участка молекулы, что сопровождается снижением молекулярной массы с 36 000 до 33 000 дальтон. N-концевой аминокислотой в прореннине является аланин, а в реннине — глицин.

Реакции ограниченного протеолиза приводят к образованию активных форм протеолитических ферментов не только в пищеварительных соках, но и в других биологических жидкостях и секретах. Рассмотрим протеолитическую систему проакрозин — акрозин, которая играет важную роль в процессе оплодотворения. В последние годы получены данные о том, что протеиназы включаются в такие процессы, как миграция сперматозоидов, внедрение их через стенку яйцеклетки, индукция акросомной реакции, деконденсация хроматина после слияния сперматозоида с яйцеклеткой, имплантация бластоцитов в матке, инволюция тканей этого органа и роды (H. Fritz и соавт., 1979). Считают также, что трипсиноподобная протеиназа обеспечивает так называемый блок полиспермии у человека и других млекопитающих. Суть его заключается в том, что после проникновения одного сперматозоида в яйцеклетку выделяется этот фермент и вызывает такие изменения zona pellucida, которые делают ее непроницаемой для других сперматозоидов (В. А. Лукин, 1977). Особое внимание привлекают протенназы и их ингибиторы, находящиеся в семени различных животных и человека.

В ряде работ показано наличие протеиназ с трипсиноподобной специфичностью в плазме семени и сперматозоидах. Протеиназа, локализованная на вершине головки сперматозоида — акросоме, получила название акрозин (КФ. 3.4.21.10) (H. Fritz, W. Schleinig, 1974). Этому ферменту приписывают важную роль в процессах оплодотворения, считая, что он участвует в проникновении сперматозоидов в яйцеклетку. Полагают, что акрозин, вызывая деполимеризацию сиалогликопротеидов матрикса слизи шейки матки, способствует уменьшению вязкости муциноподобных веществ, что облегчает внедрение сперматозоидов в полость матки, а затем в маточную трубу. Этот фермент оказывает гидролизующий эффект на структурные элементы слизистой оболочки шейки матки в тот момент, когда сперматозоиду препятствует сеть гликопротеидных волокон.

В свежееякулированном семени акрозин находится в виде неактивного предшественника — проакрозина и активируется путем ограниченного протеолиза во время прохождения через женские половые органы (R. Parrish, K. Polakoski, 1979). Разра-

ботаны методы выделения акрозина из семени животных и человека. Из семени быка и человека фермент выделен путем экстракции хлористоводородной кислотой с последующей гель-фильтрацией на сефадексе G-50 и ионообменной хроматографией на п-аминобензидин-сефарозе (I. Elce, E. McIntyre, 1982). Выход составил примерно 1 мг препарата акрозина из 100 мл семени быка, удельная активность повышалась в 300 раз по сравнению с таковой фермента в плазме семени. Полагают, что акрозин высвобождается из сперматозоидов в плазму семени при замораживании. Наличие в жидкой части семени наряду с акрозином других ферментов с эстеразной активностью и его ингибиторов затрудняет процесс очистки фермента. С помощью гель-фильтрации на сефадексе G-50 при pH 2,2 акрозин из семени человека можно отделить от ингибиторов.

По данным К. Polakoski, R. Parrish (1977), профермент из семени хряка находится в двух формах — проакрозин I и проакрозин II с молекулярной массой соответственно 55 000 и 53 000 дальтон, которые в результате реакций ограниченного протеолиза последовательно превращаются в три формы акрозина — α , β и γ с молекулярной массой соответственно 49 000, 34 000 и 25 000 дальтон. Исследователи предполагают, что в инициации образования акрозина участвует проакрозин, обладающий некоторой каталитической активностью. Молекулярная масса акрозина человека, определяемая различными методами, колеблется от 25 000 до 75 000 дальтон. I. Elce, E. McIntyre (1982) отметили, что она равна 38 000 дальтон. Эта величина близка к молекулярной массе α - и β -акрозина хряка. Оптимум ферментативного действия акрозина человека находится в зоне pH около 8,0. Этот фермент стабилен в кислой среде, для проявления его максимальной активности необходимы ионы кальция. Акрозину человека свойственна широкая трипсиноподобная специфичность в отношении белковых и синтетических субстратов.

Активность акрозина в экстрактах из сперматозоидов, полученных непосредственно из придатков яичка, значительно выше таковой в экстрактах из сперматозоидов эякулята. Это связано с наличием в плазме семени ингибиторов протеолиза (L. Zaneveld и соавт., 1974). Последние инактивируются в женских половых органах, вследствие чего сперматозоиды, находящиеся в матке, обладают более выраженной протеолитической активностью, чем только что выделенные. Активация сперматозоидов (капацитация) осуществляется под влиянием веществ, секретлируемых слизистой оболочкой маточных труб и матки. Во время активации удаляются протеиназный ингибитор, декапацитирующие факторы и другие вещества, присутствующие в семени.

В последние годы внимание исследователей привлекли естественные ингибиторы акрозина, контролирующие активность фер-

мента в организме. Из них наиболее изучены ингибиторы, находящиеся в плазме семени и слизи шейки матки. В плазме семени содержатся антипротеиназы: α_1 -ингибитор протеиназ (α_1 -ИП), интер- α -ингибитор трипсина (И- α -ИТ) и α_1 -антихимотрипсин (α_1 -АХ). В норме уровень α_1 -ИП в плазме семени в 5 раз ниже, чем в сыворотке крови, тогда как концентрация α_1 -АХ и И- α -ИТ может достигать величин, характерных для сыворотки крови. Во время нормального овуляторного цикла в слизи шейки матки обнаруживается антитромбин III (АТ III), а при приеме гормональных противозачаточных средств появляется С1-инактиватор (С1И) ¹.

В опытах *in vitro* исследовалось влияние очищенных препаратов ингибиторов протеиназ на активность акрозина, выделенного из семени кроликов и человека (J. Stray, K. Polakoski, 1982). Полученные данные показали, что α_1 -ИП и И- α -ИТ угнетают акрозин человека, α_1 -АХ не оказывает на него инактивирующего действия, а С1И обладает слабым антиакрозинным эффектом.

Во время овуляторного цикла концентрация ингибиторов протеиназ значительно колеблется. В середине цикла она снижена, а в начале цикла и в процессе овуляции повышена. Предполагают, что уменьшение содержания α_1 -ИП обусловлено влиянием эстрогенов, а увеличение связано с действием прогестерона. Эти факты говорят о том, что слизь, продуцируемая железистыми клетками шейки матки, образует непроницаемый барьер для сперматозондов во время инфертильной фазы цикла благодаря высокой концентрации ингибиторов и, наоборот, снижение последней способствует ускорению проникновения сперматозоидов в яйцеклетку. Эндометриальный секрет обладает протеолитической активностью по отношению к фибрину, с которым связан плазминоген (B. Casslen, 1985). Эта активность увеличивается в ходе пролиферирующей фазы, становится максимальной в середине цикла, уменьшается в фазе образования желтого тела и возрастает перед менструацией. Такой характер изменения протеолитической активности обусловлен более высокой концентрацией α_2 -антиплазмина (α_2 -АП) в фазе образования желтого тела по сравнению с таковой в середине цикла.

Сперматозонды, подвергнутые действию ингибиторов акрозина и введенные перед овуляцией в полость матки крольчих, не оплодотворяли яйцеклетку. Разработан клинический тест для диагностики бесплодия, при котором каплю семени и каплю слизи шейки матки наносят на пленку и с помощью фазово-контрастного микроскопа определяют скорость внедрения сперматозондов. Прибавление ингибиторов к семени значительно уменьшает скорость проникновения сперматозондов через слизистую оболочку матки.

¹ Черточка над цифрой указывает на активную форму первого компонента комплемента

Предпринимались попытки использовать природные и синтетические ингибиторы протеиназ в качестве противозачаточных средств (L. Zaneveld и соавт., 1974). Синтетический ингибитор протеолиза N-тозил-лизин-хлорметилкетон, прибавленный к жизнеспособным сперматозоидам, тормозил процесс оплодотворения. Дальнейшая разработка методов применения ингибиторов акрозина открывает новые возможности противозачаточной терапии.

Ограниченный протеолиз играет важную роль в образовании активных гормонов. Большинство белковых и пептидных гормонов синтезируется в эндокринных железах в виде крупномолекулярных белковых предшественников, из которых активные формы белков образуются в процессе посттрансляционного процессинга. Один из основных видов процессинга — ограниченный протеолиз. Сначала он происходит в секреторных гранулах или цистернах эндоплазматического ретикулума, а затем активная форма гормона секретируется в кровь. Так образуется инсулин, вазопрессин, окситоцин, гастрин, соматостатин и некоторые другие гормоны (Н. А. Юдаев, 1984).

Наиболее интенсивно изучаются механизмы образования инсулина из его предшественника — проинсулина, синтезирующегося в клетках панкреатических островков. Проинсулин был открыт в 1967 г. D. Steiner и P. Oyer. В настоящее время расшифрована его первичная структура и осуществлен химический синтез. Молекула проинсулина состоит из одной полипептидной цепи.

Проинсулин синтезируется на рибосомах в виде преинсулина. Под влиянием сигнальной пептидазы удаляется гидрофобный пептид из 20—30 аминокислотных остатков на его N-терминальном конце, в результате чего образуется проинсулин. Образование инсулина из проинсулина начинается в аппарате Гольджи и продолжается внутри гранул β -клеток. При этом путем частичного протеолиза происходит отщепление связывающего пептида C с высвобождением двух пар основных аминокислот Арг-Арг и Лиз-Арг и инсулина. В процессе конверсии прогормона в гормон образуются эквимолекулярные количества пептида и инсулина (W. Kemmler и соавт., 1971).

В многочисленных исследованиях изучалась природа протеолитических ферментов, осуществляющих превращение проинсулина в инсулин (Л. С. Лобарева, В. М. Степанов, 1983). Считают, что вычленение блоков основных аминокислот из предшественника происходит с участием не менее двух ферментов с различной специфичностью действия. В опытах *in vitro* преобразования проинсулина в инсулин можно достичь применением смеси трипсина и панкреатической карбоксипептидазы В в определенных количественных соотношениях. Однако в физиологических условиях эти ферменты не оказывают прямого влияния на образование гормона, поскольку они синтезируются экзокринной частью железы.

Поэтому проводились исследования с целью обнаружить в островковом аппарате поджелудочной железы ферменты со специфичностью трипсина и карбоксипептидазы В. Отмечено, что превращение проинсулина в инсулин гомогенатами островкового аппарата блокируется динизопропилфторфосфатом (ДФФ), что позволяет предположить участие сериновой протеиназы в расщеплении пептидной цепи проинсулина. Наиболее вероятно, что таким ферментом может быть калликреин, который присутствует в β -клетках поджелудочной железы, а также кининазы — экзопептидазы со специфичностью панкреатической карбоксипептидазы В. Эти ферменты выделены из поджелудочной железы и использованы для расщепления проинсулина. При обработке проинсулина их смесью образуются инсулиноподобные продукты, которые по электрофоретической подвижности идентичны продуктам расщепления, возникающим при расщеплении прогормона трипсином и карбоксипептидазой В. Полифункциональный ингибитор протеиназ аprotинин тормозит расщепление проинсулина калликреином или его смесью с карбоксипептидазой В. Однако в настоящее время еще не установлено, является ли инсулином конечный продукт гидролиза проинсулина этими ферментами.

Еще один фермент способен вызывать превращение проинсулина в инсулин — активатор плазминогена, который синтезируется панкреатическими островками и представляет собой сериновую протеиназу (G. Jackson, Y. Nemerson, 1980). Прибавление глюкозы к ткани островкового аппарата увеличивает синтез инсулина и активатора плазминогена. Экспериментально установлено, что сам активатор плазминогена не способен непосредственно активировать проинсулин, но при добавлении плазминогена расщепляется проинсулин и образуется вещество, электрофоретическая подвижность которого такая же, как подвижность инсулина. Эти опыты свидетельствуют о возможном участии плазмينا в преобразовании проинсулина в инсулин. Но плазминоген — это белок с высокой молекулярной массой (90 000 дальтон) и пока не выяснено, может ли он попадать из крови в β -клетки, где образуется инсулин из его предшественников.

Расшифровка механизмов превращения проинсулина в инсулин и природы ферментов, участвующих в этом процессе, имеет не только теоретическое, но и большое практическое значение в плане поисков естественных активаторов проинсулина при недостаточном их образовании в организме.

Ограниченный протеолиз включается в биогенез других пептидных гормонов, в частности гормонов гипофиза. В результате действия на общий белковый предшественник — проопиомеланокортин (ПОМК) некоторых протеолитических ферментов с ограниченной специфичностью образуется ряд активных пептидов различного физиологического действия (И. П. Ашмарин и соавт.,

1978). Этот белок, имеющий молекулярную массу 30 000 дальтон и состоящий из 265 аминокислотных остатков, синтезируется не только в гипофизе, но и других отделах мозга. Из него в результате частичной протеолитической деградаци образуются ряд гормонов и нейропептидов — кортикотропин (АКТГ), эндорфины, меланотропины (В. Н. Орехович и соавт., 1984). Эти пептиды обозначаются термином «стрессорные гормоны», так как их образование и секреция усиливаются при стрессовых состояниях.

Под действием эндопептидазы гипофиза из ПОМК (рис. 2) в результате расщепления одной пептидной связи образуется β -липотропин (β -ЛПГ) и предшественник АКТГ, который затем превращается в активный гормон. β -ЛПГ под влиянием специфической протеиназы преобразуется в два активных фрагмента — γ -липотропный гормон, имеющий более высокую активность, чем исходный гормон, и β -эндорфин — пептид, обладающий свойствами анальгезирующего вещества. Из β -эндорфина при гидролизе появляются другие активные пептиды с анальгезирующими свойствами — α и γ -эндорфины и пентапептид мет-энкефалин. В свою очередь, из γ -липотропина при гидролизе пептидной связи образуются N-фрагмент и меланоцитостимулирующий гормон (β -МСГ). В различных отделах мозга ограниченный протеолиз исходной белковой молекулы ПОМК протекает неодинаково. В передней доле гипофиза образуются преимущественно АКТГ, β -ЛПГ и β -эндорфин, а в промежуточной доле — α -МСГ и опиоидные пептиды.

Кроме протеиназ, участвующих в образовании активных пептидов, в мозге есть ферменты, отщепляющие N-концевой тирозин от γ - и β -эндорфинов. При отщеплении теряются их опиатные свойства и в связи с этим усиливается психотропный эффект. В мозге выявлены также белки, контролирующие активность протеолитических ферментов, — ингибиторы протеолиза. Наибольшая их активность определяется в микросомах и фракциях микросомальных мембран (М. Ю. Еропкин, 1983).

Рассмотренные механизмы биогенеза и инактивации нейропептидов, вероятно, играют важную роль в реализации молекулярных механизмов таких функций мозга, как память, запоминание, регулирование сна и болевые ощущения. Реакции ограниченного протеолиза представляют собой наиболее быстрый, простой, не требующий энергетических затрат путь образования активных пептидов или белков с различными физиологическими функциями. Этот путь с участием специфических протеиназ позволяет полностью использовать всю информацию, закодированную в матричной РНК белкового предшественника, и достичь быстрого генерализованного ответа организма на внешние воздействия. Например, в ответ на болевой синдром из гипоталамуса в гипофиз поступает АКТГ-релизинг-фактор, способствующий высвобождению

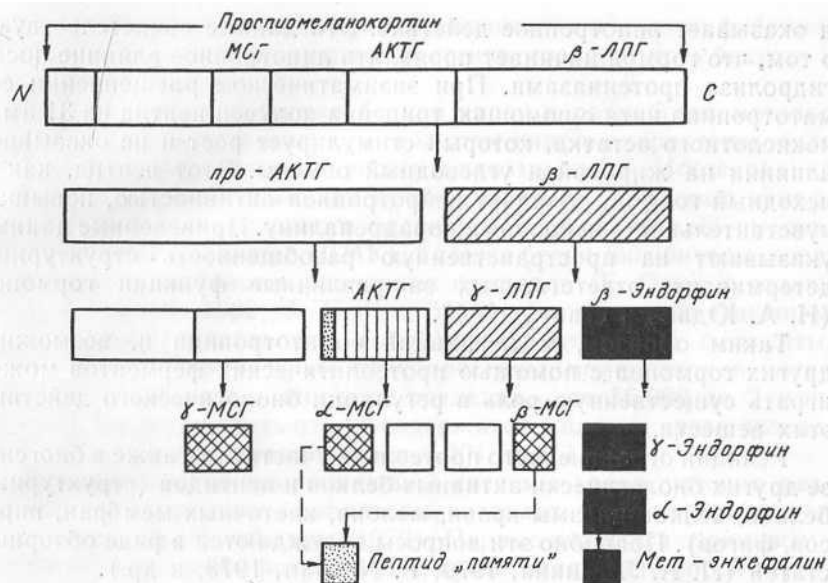


Рис. 2. Образование гормонов и нейропептидов из проопиомеланокортина под действием протеиназ (В. Н. Орехович и соавт., 1984)

дению из ПОМК β-ЛПГ, АКТГ и β-эндорфина, которые действуют на различные рецепторы тканей и приводят к эффективному снижению ощущения боли (Н. А. Юдаев и соавт., 1984).

Другие гормоны, синтезирующиеся в гипофизе, не претерпевают посттрансляционного процессинга перед их секрецией в кровь (соматотропин, пролактин). Однако они могут подвергаться на периферии предварительному протеолитическому расщеплению с образованием фрагментов, выполняющих различные функции исходного гормона (Н. А. Юдаев и соавт., 1984). В опытах *in vitro* показано, что при инкубации с пепсином соматотропина человека образуется низкомолекулярный пептид с более высокой липотропной активностью, чем у соматотропина, но не обладающий ростовой активностью (Ю. А. Панков, 1982). При действии на соматотропин плазмина и субтилизина из него вычлняются фрагменты, состоящие соответственно из 6 и 11 аминокислотных остатков, но при этом активность гормона не изменяется или даже повышается. Благодаря дисульфидным связям это расщепление не приводит к распаду белковой молекулы, но из одноцепочечной она превращается в двухцепочечную. Трасилол — поливалентный ингибитор протеиназ — подавляет липотропный эффект соматотропина, в то время как гормон, частично гидролизованный трипсином, в меньшей мере подвергается влиянию ингибиторов протеиназ

и оказывает липотропное действие. Эти данные свидетельствуют о том, что гормон начинает проявлять липотропное влияние после гидролиза протеиназами. При энзиматическом расщеплении соматотропина кита с помощью трипсина получен пептид из 31 аминокислотного остатка, который стимулирует рост и не оказывает влияния на жировой и углеводный обмены. Этот пептид, как и исходный гормон, обладает нейротропной активностью, повышая чувствительность нейронов к норадреналину. Приведенные данные указывают на пространственную разобщенность структурных детерминант, ответственных за различные функции гормонов (Н. А. Юдаев и соавт., 1984).

Таким образом, модификация соматотропина и, возможно, других гормонов с помощью протеолитических ферментов может играть существенную роль в регуляции биологического действия этих веществ.

Реакции ограниченного протеолиза участвуют также в биогенезе других биологически активных белков и пептидов (структурных белков, белков плазмы крови, молока, клеточных мембран, вирусов, фагов). Подробно эти вопросы обсуждаются в ряде обзорных статей (Л. А. Локшина, 1979; P. Noonan, 1978, и др.).

РОЛЬ ОГРАНИЧЕННОГО ПРОТЕОЛИЗА В ОБРАЗОВАНИИ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ СИСТЕМ КРОВИ

Плазма крови содержит несколько комплексных протеолитических систем, участвующих в защитных и регуляторных реакциях организма. Характерной чертой плазменных протеиназ, отличающих их от тканевых, является то, что они пространственно не разобщены, благодаря чему могут свободно взаимодействовать между собой. В образовании протеолитических ферментов крови решающую роль играет ограниченный протеолиз, большинство реакций которого осуществляется посредством каскадных механизмов. Это позволяет в случае необходимости существенно ускорять физиологические процессы в организме, а также тонко их регулировать на каждом этапе при помощи специфических белков.

К основным протеолитическим системам крови относятся системы свертывания, фибринолиза, комплемента, кининовая, ренин-ангиотензиновая.

ПРОТЕИНАЗЫ В ПРОЦЕССЕ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ

К настоящему времени достигнуты большие успехи в изучении механизма свертывания крови. Этот процесс представляет собой каскад реакций ограниченного протеолиза, в результате которого образуется основной фермент тромбин, катализирующий превра-

шение растворимого белка крови фибриногена в сгустки фибрина. В свертывании крови участвуют стенки сосудов, тромбоциты и плазменные факторы.

Успехи в области химии белков крови и разработка методов выделения позволили получить в чистом виде и охарактеризовать 13 факторов свертывающей системы плазмы крови. Исследования показали, что в свертывании крови участвуют некоторые компоненты кининовой системы, в частности, прекалликреин, высокомолекулярный кининоген (ВМК), а также белки-ингибиторы, контролирующие активность различных факторов (E. Davie и соавт., 1979; L. Kazal, 1982; J. Griffin, 1983). Большинство факторов свертывания представляют собой протеолитические ферменты. По химической природе это гликопротеины, молекулярная масса которых колеблется в широких пределах — от 56 000 до 2 млн. дальтон. Большая часть из них содержится в плазме крови человека в низких концентрациях — от 0,001 до 0,1 г/л.

Все компоненты свертывающей системы крови условно разделяют на ферменты, кофакторы, катализаторы, субстраты и ингибиторы (N. Heimburger, 1979). Первые являются сериновыми протеиназами, кроме фактора XIII, представляющего собой глутаминил-трансферазу (ϵ -лизил- γ -глутаминил-аминоацилтрансферазу). К протеиназам свертывания относятся тромбин, факторы VII, IX, X, XI, XII, к кофакторам — факторы III, V, VIII, ВМК, прекалликреин, к катализаторам — фосфолипиды, Ca^{2+} , к субстратам — фактор I (фибриноген). Под термином кофактор подразумевают регуляторные белки неферментативной природы, в присутствии которых усиливается активация определенных факторов. Все ферменты присутствуют в плазме крови в виде неактивных предшественников, которые активируются в реакциях ограниченного протеолиза. Предшественники протеиназ обозначаются римскими цифрами, а их активные формы — римской цифрой и буквой «а». Активация большинства факторов происходит на поверхности, в зависимости от природы которой выделяют внутренний и внешний пути свертывания. Если свертывание крови идет по внутреннему пути (Д. М. Зубаиров, 1978), то поверхностью служат фосфолипиды тромбоцитов (тромбоцитарный фактор — 3), во внешнем пути ее обеспечивает фактор, содержащийся вне сосудов — тканевой тромбопластин (фактор III).

Процесс свертывания крови можно представить в виде схемы, изображенной на рис. 3. Во внутреннем пути свертывания можно выделить группу ферментов контактной фазы (XIIa, XIa, калликреин) и протромбинового комплекса (IXa, Xa, IIa).

Контактную фазу свертывания запускает фактор XII (фактор Хагемана — FX), который активируется при взаимодействии с чужеродной поверхностью. Образовавшийся активный протеолитический фактор XIIa катализирует превращение профермента

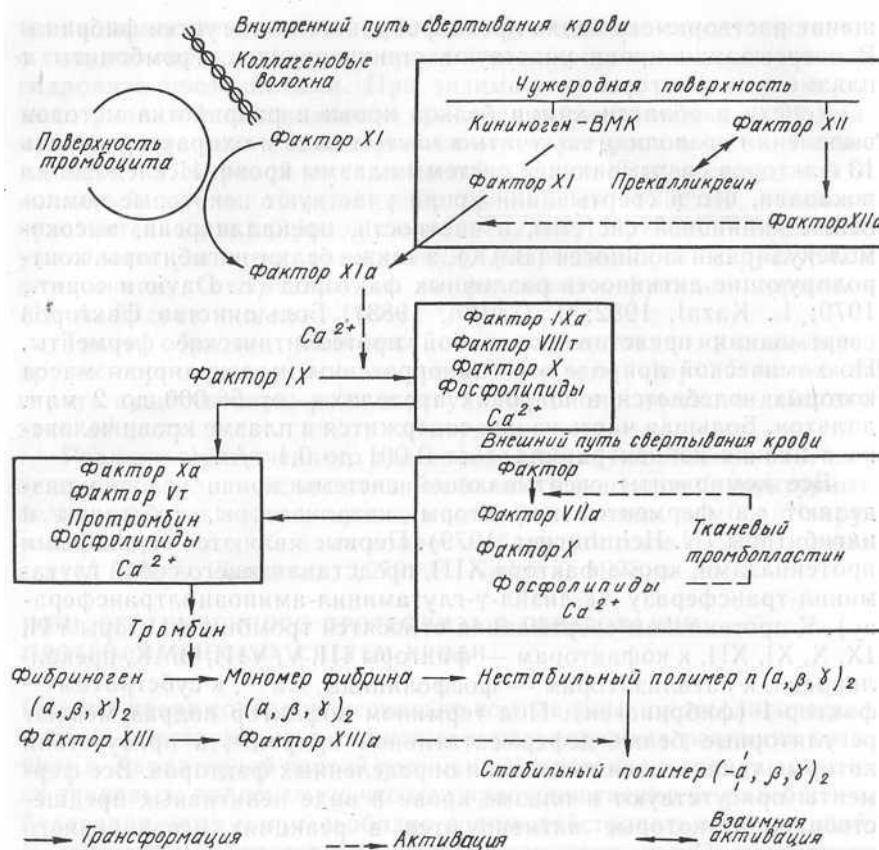


Рис. 3. Схематическое изображение процесса свертывания крови

фактора XI в фактор XIa. Обе реакции требуют присутствия кофакторов — прекалликреина и ВМК. Следующий этап каскадного механизма коагуляции заключается в активации фактора IX под действием фактора XIa, которая осуществляется в присутствии Ca^{2+} . В свою очередь фактор IXa в присутствии фосфолипидов (тромбоцитов), Ca^{2+} , а также фактора VIII, действие которого усиливается тромбином, катализирует образование фактора Xa из его неактивного предшественника (J. Griffin, 1981). После образования фактора Xa внутренний и внешний пути свертывания совпадают. Во внешнем пути фактор X активируется под действием фактора VIIa, тканевого тромбопластина и Ca^{2+} .

Впоследствии общий путь свертывания происходит следующим

образом. Образовавшийся фактор Ха катализирует преобразование протромбина в тромбин. Эта реакция протекает на поверхности фосфолипидов в присутствии фактора V (активированного тромбином — на схеме ФV₁) и Ca²⁺. Образовавшийся тромбин действует на свой субстрат фибриноген в жидкой фазе. Превращение фибриногена в фибрин представляет собой трехэтапный процесс. Первый этап — ферментативный: тромбин отщепляет 2 фибринопептида A от A α-цепей и 2 фибринопептида B от B β-цепей фибриногена, что приводит к образованию фибрин-мономера. На втором этапе мономеры, спонтанно соединяясь между собой, образуют сеть фибрина. Третий этап заключается в стабилизации фибрина фактором XIIIa (он образуется из неактивного предшественника под действием тромбина) (Ж. Фермилен, М. Ферстрате, 1984).

Остановимся подробнее на свойствах протеолитических ферментов, принимающих участие в свертывании крови, механизме их образования, структуре, содержании в норме и при патологии.

Фактор XII, или ФХ, является основным ферментом, запускающим реакции внутреннего пути свертывания крови. ФХ был открыт в 1955 г. и получил название по фамилии больного, в крови которого был выявлен его дефицит (O. Ratnoif, J. Colory, 1955). Это наследственное заболевание передается по аутосомально-доминантному типу. В настоящее время известно более 100 больных с дефицитом этого белка. При лабораторном исследовании крови таких больных обнаруживают удлинение времени свертывания крови до 30 мин и более, частичного тромбопластинового времени, которое не нормализуется при контактной активации плазмы каолином. Заболевание не сопровождается геморрагическими проявлениями, поэтому его называли «гемофилия без гемофилии». Таким больным можно проводить хирургические вмешательства без предварительного введения ФХ. У некоторых из них, несмотря на резкое замедление свертывания крови, наблюдаются тромбоэмболические осложнения. Так, первый из известных больных погиб от посттравматической легочной эмболии. При недостатке ФХ развиваются также инфаркты миокарда, тромбофлебиты (З. С. Баркаган, 1980).

В плазме здоровых людей содержание ФХ, установленное иммунохимическими методами, составляет 0,023—0,04 г/л, а у больных с дефицитом этого белка — 0,001—0,002 г/л (С. Cochrane, J. Griffin, 1982).

В условиях физиологической нормы ФХ, как и другие факторы свертывания, находится в плазме крови преимущественно в виде неактивного предшественника, активная форма составляет не более 8 % от общего содержания ФХ. Уровень ФХа повышается при физической нагрузке, повреждении тканей, переливании несовместимой крови, некоторых заболеваниях (А. М. Чернух, О. А. Гомазков, 1976; А. М. Чернух и соавт., 1981).

Таблица 1. Аминокислотный состав молекулы ФХ человека и быка, %

Аминокислота	Человеческий ФХ		Бычий ФХ	Аминокислота	Человеческий ФХ		Бычий ФХ
	S. Re- vak и соавт., 1974	J. Grif- fin, 1976	K. Fujika- wa и соавт., 1977		S. Re- vak и соавт., 1974	J. Grif- fin, 1976	K. Fujika- wa и соавт., 1977
Лизин	6,45	3,73	4,44	Аланин	7,1	9,33	8,3
Гистидин	3,57	4,73	4,61	Цистеин	3,56	3,07	4,47
Аргинин	5,52	6,91	5,76	Валин	5,11	5,97	5,25
Аспарагиновая кислота	8,22	6,56	7,67	Метионин	0,28	0,21	0,24
Треонин	5,58	5,98	5,55	Изолейцин	2,77	1,48	2,31
Серин	9,73	6,43	6,04	Лейцин	8,34	9,46	8,77
Глутаминовая кислота	12,02	12,31	11,41	Тирозин	2,71	2,43	2,31
Пролин	5,81	9,94	8,44	Фенилаланин	3,54	2,6	3,71
Глицин	9,71	9,02	8,27	Триптофан	—	—	2,44

ФХ выделен в очищенном виде из плазмы крови человека, быка, кроликов, гвинейской свинки (С. Cochrane, J. Griffin, 1982). Подробно изучено строение ФХ человека и быка. По химической природе ФХ является гликопротеином, молекула которого состоит из одной полипептидной цепи. Молекулярная масса ФХ человека и быка равна соответственно 76 000—80 000 дальтон и 74 000 дальтон (К. Fujikawa и соавт., 1977; К. Fujikawa и соавт., 1980). Коэффициент седиментации обоих белков составляет 4,5 S (К. Fujikawa, K. Walsch, 1977). Изоэлектрическая точка ФХ человека находится при pH 6,3 (J. Griffin, С. Cochrane, 1976). Белковая часть молекулы ФХ человека состоит из 17 аминокислот, а быка — из 18 аминокислот (табл. 1). Аминокислотная последовательность в N-конце молекулы ФХ плазмы человека следующая: Иле-Про-Про-Тре-Глу-Ала-Про-Лиз-Глу-Гис-Лиз-Тир, причем 7 остатков из 12 аналогичны таковым бычьего ФХ. В молекулу ФХ входит также 16,8% углеводов: 4,2% гексоз, 4,7% гексозамина и 7,9% ацетилнейраминовой кислоты (F. Kase и соавт., 1978; К. Fujikawa и соавт., 1980).

Предполагают, что активация ФХ осуществляется путем взаимодействия неактивного зимогена с чужеродной поверхностью, высокомолекулярным кининогеном и калликреином, либо плазмином и фактором XIa (Д. М. Зубанов, 1978). Образующийся при этой реакции активный фермент — α -ФХа — участвует в превращении фактора XI в фактор XIa. В опытах *in vitro* установлено, что α -ФХа может оказывать как прямое, так и опосредованное действие на активацию факторов внутреннего и внешнего пути свертывания, в частности фактора VII. Его эффект не прямой и проявляется через прекалликреин, который превращается в кал-

ликреин, активирующий фактор IX, а образовавшийся фактор IXa активирует фактор VII (L. Kazal, 1982).

Более подробно свойства фактора XIIa и его роль в активации прекалликреина описаны в разделе «Протеолитические ферменты кининовой системы крови».

Фактор XI свертывания крови, аналогично FX, участвует в контактной фазе свертывания крови.

В плазме крови здоровых людей содержится 0,002—0,006 г/л фактора XI (K. Kurachi, E. Davie, 1981). Описана врожденная недостаточность этого белка, причем наследование носит аутосомно-рецессивный характер. Заболевание называют гемофилией С. Болеют им лица обоего пола. Отмечена значительно большая частота этого заболевания среди евреев по сравнению с лицами других национальностей. Выделяют латентную, малую и выраженную формы гемофилии С (З. С. Баркаган, 1980). Содержание фактора XI при латентной форме заболевания составляет свыше 30 %. Спонтанные кровотечения отсутствуют, но могут обнаруживаться при тяжелых травмах и больших хирургических вмешательствах. Выявленная форма болезни характеризуется умеренной спонтанной кровоточивостью (носовые кровотечения), а также обильными постоперационными кровотечениями. Иногда наблюдаются гематомы (подкожные, межмышечные), гемартрозы. Диагностика болезни с дефицитом фактора XI затруднена, так как спонтанные геморрагии проявляются у 30—40 % больных, в остальных случаях они или отсутствуют, или наблюдаются при операциях, травмах. Лучшим лабораторным тестом для обнаружения недостаточности фактора XI признан аутокоагуляционный тест, а также каолин-кефалиновое время свертывания (З. С. Баркаган, 1980). Для предупреждения геморрагий, вызванных дефицитом фактора XI, больным вводятся 10—20 мл/кг массы свежемороженой или сухой плазмы с последующей поддерживающей терапией 5 мл плазмы/кг массы 1 раз в 2 дня. Период полужизни фактора XI, введенного в кровь, после первой трансфузии составляет 60 ч, а после повторных повышается до 120 ч.

Фактор XI получен в чистом виде из плазмы крови человека, быка и кролика. Для его выделения используют методы адсорбции $BaSO_4$, $Al(OH)_3$, $Ca_3(PO_4)_2$ с последующей ионообменной хроматографией и осаждением $(NH_4)_2SO_4$ или гель-хроматографией, а также колоночную хроматографию на гепарин-, бензамидин-агарозе, CM-сефадексе (K. Kurachi, E. Davie, 1981, L. Kazal, 1982).

Фактор XI человека — димерный гликопротеин с молекулярной массой 130 000—180 000 дальтон (молекулярная масса бычьего фактора XI — 124 000 дальтон). Изоэлектрическая точка белка находится при pH 9,1. Молекула фактора XI состоит из 2 идентичных или похожих полипептидных цепей (с молекулярной массой

65 000—90 000 дальтон каждая), соединенных между собой дисульфидными мостиками. Частично установлен аминокислотный и углеводный состав фактора XI. В состав фактора XI человека входит 5 % углеводов — гексозы, гексозамина, нейраминовой кислоты (К. Kugachi, E. Davie, 1981).

Фактор XI циркулирует в плазме крови в виде неактивного предшественника и активируется фактором XIIa при участии чужеродной поверхности, ВМК, прекалликреина, Ca^{2+} . Он может активироваться также трипсином (С. Cochrane, J. Griffin, 1982), тромбоцитами после их взаимодействия с коллагеном (Ж. Фермилен, М. Ферстрате, 1984). Активация фактором XIIa не сопровождается изменением суммарной молекулярной массы фактора XI, но в нем расщепляются пептидные связи Арг-Илей и белок из двухцепочечного превращается в четырехцепочечный. Молекула образовавшегося фактора XIa состоит из 2 тяжелых и 2 легких цепей, соединенных между собой дисульфидными связями. В каждой легкой цепи находится активный центр, что доказано способностью фактора XIa присоединять 2 молекулы АТ III. Фактор XIa угнетается такжеДФФ, СИ, панкреатическим, соевым ингибиторами трипсина и α_1 -ИП.

По ферментному действию фактор XIa является эндопептидазой, обладающей протеолитической, эстеразной и амидазной активностями. Его специфическая активность составляет 18 мкмоль тозил-L-аргинин метилового эфира, гидролизованного 1 мг фермента за 1 мин. Основное каталитическое действие фактора XIa направлено на протеолитическое расщепление фактора IX, в результате которого образуется активный фермент, участвующий в следующей реакции внутреннего пути свертывания крови. Фактор XIa может расщеплять также, хотя и в незначительной степени, FX и плазминоген (С. Cochrane, J. Griffin, 1982).

Фактор IX. Он, как и факторы X, VII, II, относится к группе факторов протромбинового комплекса. Все они синтезируются в печени. Характерная особенность их структуры — наличие в N-концевом участке молекул γ -карбоксиглутаминовой кислоты. Последняя образуется из глутаминовой кислоты путем карбоксилирования в гепатоцитах под влиянием филлохинона (витамина K).

Синтез всех перечисленных факторов зависит от филлохинона. При его дефиците или в присутствии антагонистов, а также алиментарном авитаминозе глутаминовая кислота не карбоксилируется, что приводит к синтезу неполноценных в функциональном отношении белков, получивших название PIVKA — протеины, индуцированные антагонистами филлохинона или при его отсутствии (Ж. Фермилен, М. Ферстрате, 1984; М. Espouf, 1977). Активность антагонистов филлохинона (кумарина, фенилина) может повышаться при применении многочисленных противотромбо-

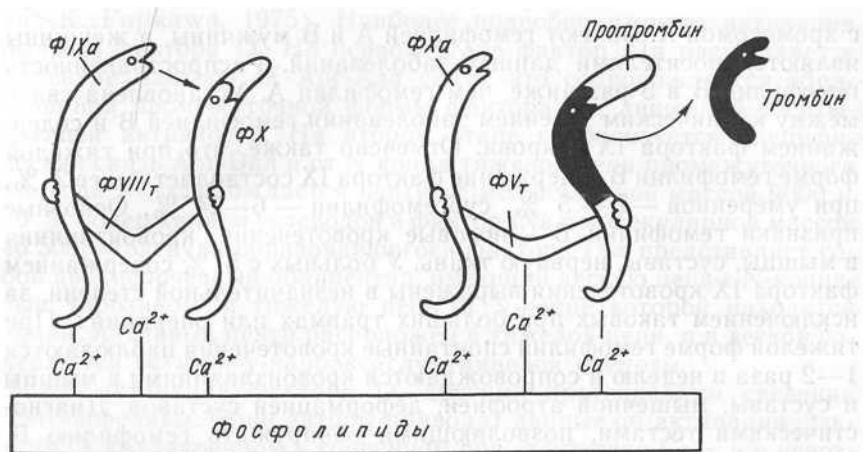


Рис. 4 Схема взаимодействия факторов протромбинового комплекса на поверхности фосфолипидов

тических средств — фенилбутазона, амидопирина, глюкагона и др. Дефицит филлохинона наблюдается при различных поражениях печени — обтурационной желтухе и желтухе, обусловленной гепатитом. В обоих случаях содержание факторов протромбинового комплекса снижается, о чем свидетельствует удлинение протромбинового времени. При обтурационной желтухе этот дефект может быть устранен с помощью парентерального введения филлохинона, а при желтухе, вызванной гепатитом, он не исправляется.

Активация факторов свертывания, зависящих от филлохинона, и их концентрирование происходят на поверхности фосфолипидов. Этот процесс можно представить схематически (рис. 4). Факторы IX, X, протромбин при помощи остатков γ -карбоксиглутаминовой кислоты в их молекулах через Ca^{2+} фиксируются на фосфолипидах. Здесь же на поверхности последних находятся факторы V и VIII, активированные тромбином (V_t и $VIII_t$), которые ускоряют реакции фермент — субстрат (фактор IXa — фактор X, фактор Xa — протромбин), способствуя их лучшей стерической ориентации.

PVKA неактивны, так как теряют способность адсорбироваться на фосфолипидах из-за отсутствия в их молекулах γ -карбоксиглутаминовой кислоты.

В плазме крови здоровых людей содержание фактора IX составляет 0,004—0,007 г/л (J. Milletich и соавт., 1981). При отсутствии фактора IX или его дефиците развивается заболевание, известное под названием болезнь Кристмаса, или гемофилия В. Как и классическая гемофилия А (обусловленная недостатком фактора VIII), гемофилия В наследуется по рецессивному типу, связанному

с хромосомой X. Болеют гемофилией А и В мужчины, а женщины являются носителями данных заболеваний. Распространенность гемофилии В в 5 раз ниже, чем гемофилии А. Установлена связь между клиническим течением заболевания гемофилией В и содержанием фактора IX в крови. Отмечено также, что при тяжелой форме гемофилии В содержание фактора IX составляет менее 2 %, при умеренной — 2 — 5 %, субгемофилии — 6—24 %. Основные признаки гемофилии В — носовые кровотечения, кровоизлияния в мышцы, суставы, нервную ткань. У больных с 5 % содержанием фактора IX кровотечения выражены в незначительной степени, за исключением таковых при больших травмах или операциях. При тяжелой форме гемофилии спонтанные кровотечения наблюдаются 1—2 раза в неделю и сопровождаются кровоизлияниями в мышцы и суставы, мышечной атрофией, деформацией суставов. Диагностическими тестами, позволяющими обнаружить гемофилию В, являются удлинение общего времени свертывания, частичного тромбопластинового времени, замедление потребления протромбина, снижение аутокоагуляционного теста, что особенно выражено при тяжелых формах заболевания. При гемофилии В дефект свертывания устраняется добавлением долго хранившейся сыворотки. Для лечения гемофилии В используют концентраты факторов IX либо вводят плазму крови в дозе 12—15 мл/кг массы (Д. М. Зубаиров, 1977; З. С. Баркаган, 1980). Время полужизни введенного препарата фактора IX колеблется от 18 до 30 ч. Поэтому трансфузию плазмы крови можно проводить 1 раз в сутки. Свойства фактора IX были изучены после получения высокоочищенных его препаратов из плазмы крови человека и быка при помощи методов ионообменной хроматографии, препаративного диск-электрофореза на ДЭАЭ-сефадексе и аффинной хроматографии на гепарин-сефарозе (В. Osterud, R. Flengsrud, 1975; H. Suotela, 1976). Бычий и человеческий фактор IX значительно отличаются. Молекулярная масса человеческого фактора IX составляет 63 000—72 000 дальтон, бычьего — 55 400 дальтон. Общее содержание углеводов (гексозы, галактозы) в молекуле фактора IX человека равно 20,3 %, быка — 25,8 % (L. Kazal, 1982). Изоэлектрическая точка фактора IX человека и быка находится соответственно при pH 4,3—4,4 и 3,7. В N-конце полипептидной цепи фактора IX быка содержится тирозин, человека — глицин или тирозин. В N-концевом участке молекулы фактора IX человека выявлено 8—10 остатков γ -карбоксихлутаминовой кислоты.

Протеолитическое превращение фактора IX в IXa под действием фактора XIa — двухступенчатый процесс, требующий Ca^{2+} , в результате которого образуется протениназа, обладающая БАЭЭ-эстеразной активностью. Молекулярная масса человеческого фактора IX после активации снижается до 42 000—45 000 дальтон (В. Osterud и соавт., 1975), бычьего — до 46 500 дальтон (E. Da-

vie, K. Fujikawa, 1975). Наиболее подробно изучена активация бычьего фактора IX. На первом этапе фактор XIa расщепляет в молекуле фактора IX Арг-Ала связь, что сопровождается образованием промежуточной формы фактора IX, лишенной свертывающей активности. На втором этапе гидролизуется специфическая связь Арг-Вал и от N-конца тяжелой цепи промежуточного фактора IX освобождается пептид с молекулярной массой 9000 и 50 % содержанием углеводов и фактор IXa с молекулярной массой 46 500. Молекула образовавшегося фактора IXa представляет собой двухцепочечный полипептид, имеющий легкую цепь с N-концевым тирозином и тяжелую цепь, в N-конце которой находится валин. Активный центр расположен в тяжелой цепи, а в легкой содержатся остатки γ -карбоксиглутаминовой кислоты.

Об активации фактора IX другими протеиназами сведения противоречивы. Одни авторы приводят данные об активации фактора IX калликреином и трипсином при отсутствии Ca^{2+} и о невозможности активирования тканевым тромбопластином и фактором VII (B. Osterud и соавт., 1975). Другие исследователи указывают на то, что фактор IX может активироваться фактором Xa, а также комплексом фактор VII-тканевой фактор (L. Kazal, 1982; P. Walsh и соавт., 1984). Высказывается мнение о способности фактора IX превращаться в фактор IXa активатором, содержащимся в гранулярной фракции сегментоядерных нейтрофильных гранулоцитов в присутствии Ca^{2+} (Д. М. Зубаиров, 1982).

Основная биологическая функция фактора IX заключается в активации следующего фактора протромбинового комплекса — фактора X.

Фактор X — важнейший протеолитический фермент, участвующий в свертывании крови, осуществляемом внутренним и внешним путем. В крови здоровых людей фактор X находится в неактивной форме, его содержание равно 0,02 г/л. Уровень фактора X резко снижается при недостатке филлохинона или введении его антагонистов — варфарина и др. Описано около 40 случаев заболевания наследственным дефицитом фактора X. Это заболевание было названо по фамилии первых двух больных, у которых оно обнаружилось (Стюарт, Прауэр). В зависимости от содержания фактора X различают несколько форм болезни Стюарта — Прауэра — очень тяжелую (1—2 % белка), средней тяжести (2—5 %), легкую (5—10 %), латентную (10 % белка и выше). Геморрагический синдром развивается в основном у гомозигот с содержанием фактора X до 10 % от нормы. У гетерозигот (количество белка 20—25 % от нормы) склонности к кровотечениям не отмечено. При очень тяжелой форме заболевания геморрагии (профузные желудочно-кишечные, повторяющиеся кровоизлияния в мозг) наблюдаются в раннем детском возрасте и приводят к гибели больных (З. С. Баркаган, 1980). Тяжелые формы болезни

сопровождаются петехиально-пятнистыми кровоизлияниями в кожу, подкожными гематомами, носовыми и десневыми кровотечениями. При хирургических вмешательствах (удалении зубов, полостных операциях) возникает угроза для жизни больных вследствие сильных геморрагий.

Для заболевания средней тяжести характерны кожные, десневые, носовые кровотечения, а также геморрагии при травмах и различных операциях. При легкой форме болезни кровотечения носят эпизодический характер, они возникают чаще после операций, травм. При латентном течении заболевания геморрагический синдром не наблюдается.

Лабораторные тесты, позволяющие диагностировать недостаток фактора X,— определение протромбинового и частичного тромбопластинного времени, которые удлиняются. Дефицит фактора X можно обнаружить также при добавлении к плазме больных несвежей сыворотки крови здоровых людей (З. С. Баркаган, 1980). Лечение заключается во введении больным свежей плазмы крови из расчета 10—15 мл/кг массы в сутки. Считают, что гемостаз нормализуется, когда концентрация фактора X достигает 10—20 % от нормы.

В настоящее время получены высокоочищенные препараты фактора X из плазмы крови человека и быка. Фактор X выделяют из плазмы крови путем его адсорбции на $BaSO_4$, $Ba(NO_3)_2$, $Al(OH)_3$ и последующей ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-, QAE-сефадексе, гель-хроматографии и электрофореза в полиакриламидном геле (М. Esnouf, 1977) с использованием ДФФ и соевого ингибитора трипсина. Наиболее изучен фактор X быка. Это гликопротеин с молекулярной массой 55 100, состоящий из тяжелой и легкой цепей, соединенных дисульфидными связями. В легкой цепи фактора X локализованы остатки γ -карбоксиглутаминовой кислоты, которые взаимодействуют с фосфолипидами. Содержание углеводов равно 10,3 % (2,9 % гексоз, 3,6 % гексозамина, 3,8 % нейраминовой кислоты). Молекулярная масса препаратов фактора X, полученных из плазмы крови людей, варьирует от 72 000 до 59 000 дальтон (К. Mertens, 1979; R. Marlar, 1979).

Известны 2 формы фактора X— X_1 и X_2 , которые обнаружены при колоночной ионообменной хроматографии. Они обладают высокой специфической активностью (К. Fujikawa и соавт., 1972). Фактор X быка во внутреннем пути свертывания активируется под действием фактора IXa в присутствии фактора VIII, фосфолипидов тромбоцитов и Ca^{2+} . Превращение фактора X в активную протенназу (фактор Xa) может осуществляться самим фактором IXa, но скорость такой реакции чрезвычайно мала. Фактор VIII, фосфолипиды и Ca^{2+} значительно ее повышают. Так, фактор VIII, не обладая ферментативной активностью, увеличивает скорость

активации фактора X в несколько сотен раз. Имеются данные о положительной обратной связи между двумя факторами: фактор Ха активирован фактором VIII, а последний эффективно действует как регуляторный белок в активации фактора X. Превращение фактора X в фактор Ха могут реализовать также трипсин, протеиназа из яда змей Russel, факторы VII, III (L. Kazal, 1982).

Активация фактора X осуществляется в несколько этапов. Вначале в N-конце тяжелой цепи молекулы фактора X под влиянием вышеупомянутых активаторов разрывается связь Арг₅₁-Илей₅₂, что сопровождается освобождением гликопептида с молекулярной массой 10 500 дальтон и активной формы сериновой протеиназы — фактора Ха-α с молекулярной массой 45 300 дальтон (M. Espouf, 1977; L. Kazal, 1982). При длительной инкубации в присутствии фосфолипидов и Ca²⁺ от C-конца тяжелой цепи отщепляется второй пептид (с молекулярной массой 2700 дальтон) и образуется фактор Ха-β (с молекулярной массой 42 000 дальтон), при этом разрывается связь Арг₂₉₀—Гли₂₉₁. Обе формы фактора X—Ха-α и Ха-β различаются молекулярной массой, содержанием углеводов (в факторе Ха-β они отсутствуют), но обладают примерно одинаковой свертывающей активностью. При активации фактора X трипсином вначале с C-конца цепи освобождается пептид и образуется фактор X-β, который затем превращается в фактор Ха-β (M. Espouf, 1977).

Молекулярная масса фактора Ха быка колеблется от 24 000 до 48 000 дальтон, что, по-видимому, связано с существованием низкомолекулярных и высокомолекулярных форм этого фактора. Молекулярная масса фактора Ха человека — 24 500—25 000 дальтон. Полагают, что человеческий фактор Ха по свойствам аналогичен бычьему, но по активности в 10 раз слабее последнего (B. Gladhaug и соавт., 1983).

Фактор Ха чувствителен к повышению температуры и подкислению среды: при 50 °С и рН 5,5 он теряет биологическую активность на 90 % (Б. А. Кудряшов, 1975).

Фактор Ха обладает также амидазной активностью в отношении хромогенных субстратов S-2222, S-2337, CBS 31.39, CBS 44 43 и др. (Т. Д. Большакова и соавт., 1985). Определение активности фактора Ха с помощью указанных субстратов имеет важное значение для диагностики наследственного или приобретенного дефицита этого фермента, а также для контроля за эффективностью лечения гепарином и непрямыми антикоагулянтами. Не меньшую клиническую ценность представляет изучение ингибитора фактора Ха — АТ III, уровень которого резко снижается при различных видах шока, травмах, внутрисосудистом свертывании.

Физиологическим субстратом протеолитического действия фактора Ха является протромбин — профермент одной из последних фаз свертывания крови.

Фактор VII — основной фермент внешнего пути свертывания крови. Он содержится в плазме крови здоровых людей в наименьшей концентрации (0,001—0,002 г/л) по сравнению с таковой других филлохинонзависимых факторов. Дефицит этого белка может быть приобретенным и врожденным. Приобретенная недостаточность фактора VII развивается при авитаминозе филохинона, назначении больным его антагонистов, некоторых заболеваниях печени. Наследственное заболевание, развивающееся по аутосомно-рецессивному типу, связанное с дефицитом фактора VII, встречается редко (0,2—1,5 % всех наследственных коагулопатий) и проявляется в основном у гомозигот (уровень белка ниже 10 % от нормы). Для тяжелой формы болезни (содержание фактора VII меньше 2 %) свойствен смешанный микроциркуляторно-гематомный тип геморрагий, причем гематомы, пупочные и желудочно-кишечные кровотечения обнаруживаются иногда при рождении. Позднее наблюдаются кровоизлияния в мозг, что может быть причиной гибели больных. Длительные и обильные геморрагии развиваются в результате травм и после оперативных вмешательств. При болезни средней тяжести (уровень фактора VII выше 5 %) преобладают петехии, носовые, десневые, маточные, желудочно-кишечные кровотечения, а также геморрагии после травм, различных операций. Легкая форма заболевания характеризуется микроциркуляторным типом кровоточивости, причем иногда неполноценность гемостаза проявляется только при травмах и операциях. Лабораторный тест, позволяющий обнаружить дефицит фактора VII, — определение протромбинового времени, которое значительно удлиняется. Этот дефект свертывания устраняется добавлением к плазме больных несвежей (24-часового хранения) сыворотки крови (З. С. Баркаган, 1980). Кровотечения лечат трансфузией плазмы — 10—15 мл/(кг · сут).

Согласно экспериментальным и клиническим данным, активность фактора VII повышена в крови больных ишемической болезнью сердца, сахарным диабетом и карциномой предстательной железы. В крови собак после инфузии эндотоксина наряду с 30 % увеличением уровня фактора VII наблюдается диссеминированное внутрисосудистое свертывание и тромбозы (В. Е. Пасторова, 1986).

Фактор VII получен в виде препаратов из плазмы крови человека и быка (W. Kisiel, E. Davie, 1975; G. Broze, 1981). При этом использовали комплекс методических приемов: адсорбцию на BaSO_4 , $\text{Al}(\text{OH})_3$, ионообменную и аффинную хроматографию на бензамидин-сефарозе (L. Kazal, 1982).

Фактор VII человека и быка представляет собой одноцепочечный гликопротеин с молекулярной массой 48 000 и 45 000 дальтон соответственно (M. Esnouf, 1977; G. Broze, P. Majerus, 1981). Содержание углеводов в препаратах фактора VII человека и быка

равно соответственно 9 и 15 %. N-концевая аминокислотная последовательность Ала-Асп-Гли-Фен-Лей гомологична таковой протромбина и легкой цепи фактора X (J. Jesty, Y. Nemerson, 1977). В отличие от других факторов протромбинового комплекса неактивная форма фактора VII обладает 0,8 % свертывающей активности от присущей фактору VIIa и чувствительностью к инактивирующему действию ДФФ (G. Broze, P. Majerus, 1981; Y. Nemerson, D. Repke, 1985).

Фактор VII в опытах *in vitro* может превращаться в свою более активную (в 60—125 раз и выше) форму факторами Xa, XIIa, XIa, тромбином, калликреином, плазмином, причем тремя последними без дополнительных кофакторов. Эти активаторы расщепляют в молекуле фактора VII связь Арг-Илей и белок из одноцепочечного превращается в двухцепочечный — фактор α -VIIa. Последний состоит из тяжелой полипептидной цепи (молекулярная масса 29 500 дальтон) и легкой (молекулярная масса 23 000 дальтон). При расщеплении фактором Xa связи Арг-Гли в тяжелой цепи α -VIIa образуется фактор — β -VIIa. Он гидролизует синтетический субстрат N- α -бензилоксикарбонил-L-аргинин-N-нитробензиловый эфир, но не обладает свертывающей активностью (M. Zug, Y. Nemerson, 1978).

Основной субстрат фактора VII — фактор X. Одни авторы полагают, что фактор VIIa непосредственно превращает фактор X в фактор Xa, по мнению других исследователей, этот процесс может происходить только под действием комплекса фактора VII с фактором III. Последний представляет собой липопротеид и содержится в тканях легких, мозга, плаценты и др. Считают, что его функция состоит в ускорении превращения фактора VII в фактор α -VIIa под действием фактора Xa (Y. Nemerson, D. Repke, 1985).

Протромбин, тромбин. Протромбин представляет собой зимоген ключевого фермента последней стадии свертывания крови — тромбина. По данным иммунохимических исследований, содержание протромбина в плазме крови здоровых людей составляет от 0,1 до 0,212 г/л, в среднем 0,15 г/л (К. Мапп и соавт., 1981). Известно несколько случаев врожденного дефицита протромбина, передача которого осуществлялась аутомным путем. У больных определялся геморрагический синдром — пупочные, носовые, подкожные кровотечения и гемартрозы. При лабораторном обследовании больных обнаружено удлинение протромбинового времени. Лечение больных с дефицитом протромбина — введение свежей плазмы (15—20 мл/кг массы).

Препараты протромбина получены из плазмы крови млекопитающих при помощи различных методов (хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе, гель-хроматография), которые включают первоначальную адсорбцию этого белка на $BaSO_4$, $Al(OH)_3$ с последу-

ющей элюцией натрия цитратом и удалением Ba^{2+} (L. Kazal, 1982). В настоящее время полностью расшифрована структура протромбина человека и быка (С. Б. Серебряный, 1982). Этот зимоген является гликопротеином с молекулярной массой 72 000—100 000 (у человека) и 68 500—72 000 дальтон (у быка) и содержит 7—8 % углеводов (маннозу, галактозу, глюкозамин, галактозамин, сиаловую кислоту). Углеводы находятся в виде 3 цепей, каждая из которых присоединяется к остатку аспарагина. Белковая часть молекулы состоит из одной полипептидной цепи, включающей 3 различных участка — фрагменты 1 (аминокислотные остатки от NH_2 -конца до 155) и 2 (остатки от 156 до 273) и претромбин 2 (остатки 274—582). В N-конце молекулы протромбина человека, быка, собаки, свиньи обнаружен аланин, в C-конце молекулы человека — остаток глутаминовой кислоты, собаки и лошади — глицин, быка — серин (К. Мапп и соавт., 1981).

Фрагмент 1 протромбина представляет собой филлохинон — зависимую часть молекулы. В него входят 10 остатков γ -карбоксиглутаминовой кислоты (в положении 6, 7, 14, 16, 19, 20, 25, 26, 29, 30), которые через Ca^{2+} присоединяются к фосфолипидам. Таким образом, фрагмент 1 закрепляется на фосфолипидной мицелле и играет важную роль в активации протромбина (L. Kazal, 1982).

Фрагмент 2 протромбина структурой напоминает фрагмент 1, но отличается от него отсутствием в молекуле остатков γ -карбоксиглутаминовой кислоты. В обоих фрагментах (1 и 2) бычьего и человеческого протромбина идентичны 24 % аминокислотных остатков, расположение цистеина и 3 дисульфидных мостика, а также последовательность 8 аминокислотных остатков (111—118 во фрагменте 1 и 216—233 во фрагменте 2). Предполагают, что функция фрагмента 2 состоит в способности связывать фактор V (кофактор реакции превращения протромбина в тромбин), который ответствен за ориентацию факторов II и X на фосфолипидной мицеллярной поверхности, способствуя их взаимодействию. Претромбин 2 — непосредственный предшественник тромбина.

Превращение протромбина в тромбин — быстрая реакция ограниченного протеолиза. Она отличается от образования протеиназ поджелудочной железы тем, что протекает не в растворе, а на поверхности фосфолипидов. Кроме того, образование тромбина сопровождается отщеплением от его предшественника почти половины молекулы, а при превращении трипсиногена (химотрипсиногена) в активную форму фермента высвобождаются лишь небольшие пептиды.

Активация протромбина происходит под действием двух ферментов — фактора Xa и тромбина (рис. 5). В первом случае реакция будет протекать с большой скоростью в присутствии фактора V, Ca^{2+} и поверхности фосфолипидов. Активированный

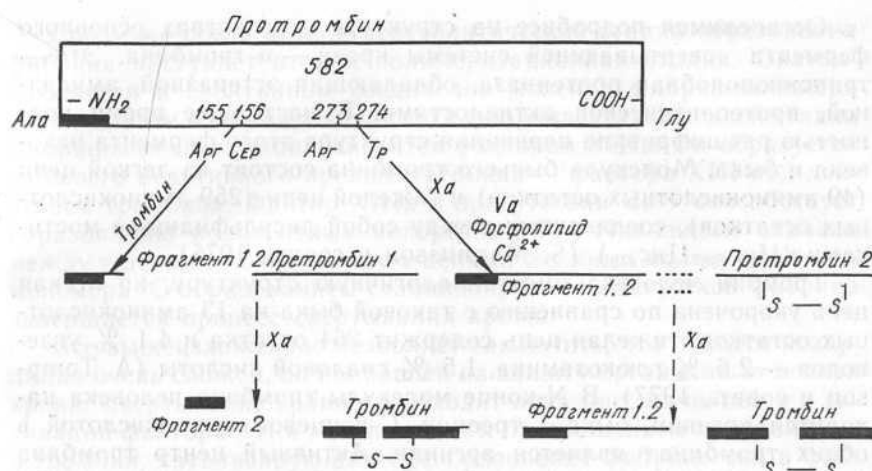


Рис. 5 Схема превращения протромбина в тромбин

тромбином фактор V (Va) в 300—500 раз ускоряет каталитическое воздействие фактора Ха на протромбин (М. Nesheim, К. Мапп, 1979). Вначале фактор Ха расщепляет связь Арг₂₇₃-Тре₂₇₄, при этом образуется претромбин 2 и фрагмент 1.2, соединенные нековалентными связями. Далее в результате гидролиза фактором Ха второй пептидной связи Арг₃₂₂-Илей₃₂₃ претромбин 2 превращается в α-тромбин и освобождается фрагмент 1.2. Это основной физиологический путь активации протромбина. Последний может активироваться и вновь образованным тромбином. В этом случае расщепляется связь Арг₁₅₅-Сер₁₅₆ и образуется претромбин 1 и фрагмент 1. Претромбин 1 утрачивает способность реагировать с Ca²⁺ и фосфолипидными мембранами, вследствие чего дальнейшее образование тромбина под действием фактора Ха будет протекать очень медленно.

При аутолизе или расщеплении трипсин-сефарозой α-тромбин превращается в β- и γ-формы. Они отличаются от истинного тромбина (α-форма) структурой и каталитическим действием.

α-Тромбин состоит из 2 полипептидных цепей, β-тромбин — из 3, γ-тромбин — из 4. β- и γ-формы тромбина лишены свертывающей активности, но обладают способностью расщеплять низкомолекулярные синтетические субстраты и проявляют одинаковое с α-формой фермента протеолитическое действие, направленное на гидролиз связи Арг₃₆-Гли₃₇ в молекуле фактора XIII (Ю. А. Умарова, С. М. Струкова, 1979; L. Logand, R. Credo, 1977). Кроме того, β- и γ-тромбины гидролизуют протромбин по связи Арг₁₅₆-Сер₁₅₇ с образованием претромбина 1 и фрагмента 1 протромбина (С. М. Струкова и соавт., 1980).

Остановимся подробнее на структуре и свойствах основного фермента свертывающей системы крови — α -тромбина. Это — трипсиноподобная протеиназа, обладающая эстеразной, амидазной, протеолитической активностями. В настоящее время полностью расшифрована первичная структура этого фермента человека и быка. Молекула бычьего тромбина состоит из легкой цепи (49 аминокислотных остатков) и тяжелой цепи (259 аминокислотных остатков), соединенных между собой дисульфидными мостиками (Cис₂₉₆-Cис₄₄₂) (S. Magnusson и соавт., 1975).

Тромбин человека имеет аналогичную структуру, но легкая цепь укорочена по сравнению с таковой быка на 13 аминокислотных остатков, тяжелая цепь содержит 264 остатка и 4,1 % углеводов — 2,6 % глюкозамина, 1,5 % сиаловой кислоты (A Tompson и соавт., 1977). В N-конце молекулы тромбина человека находится аргинин, быка — треонин. С-концевой аминокислотой в обоих тромбинах является аргинин. Активный центр тромбина и других сериновых протеиназ подобен, в его состав входит триада аминокислот Гис₃₆₅, Асп₄₁₉, Сер₅₂₇ — соответствующие участки в химотрипсине находятся в положении 57, 102, 195 (K. Maup и соавт., 1981).

В белках (фибриноген, протромбин, фактор XIII и др.) тромбин расщепляет пептидные связи, в образовании которых участвует СООН-группа аргинина. Так, в молекуле фибриногена фермент гидролизует связь Арг-Гли. Лучшими синтетическими субстратами для тромбина среди эфиров является N-арил-сульфанил-валил-аргинин, среди амидов — HD-фенил-аланил-пипеколил-L-аргинин-паранитроанилид (С. М. Струкова, 1982).

В организме тромбин может активировать предшественники факторов V, VIII, XIII, а также тромбоциты, способствуя их освобождению и агрегации (E. Workman и соавт., 1977). Тромбин вступает в контакт с мембранами тромбоцитов при помощи рецепторов высокого и низкого сродства к нему. В этом процессе участвует не каталитический, а дополнительный центр связывания тромбина. Через него тромбин, по-видимому, может взаимодействовать также с хеморецепторами сосудистой стенки, что возбуждает функцию противосвертывающей системы (С. М. Струкова, 1982).

Основная жизненно важная биологическая функция тромбина — реакция превращения фибриногена в фибрин. Исключительная избирательность действия фермента проявляется в том, что он разрывает в молекуле фибриногена лишь 4 Арг-Гли-связи, тогда как трипсин гидролизует 387. Вначале тромбин быстро расщепляет связь Арг₁₆-Гли₁₇ в 2 А- α -цепях фибриногена, при этом освобождаются 2 фибринопептида А. Затем фермент более медленно гидролизует связь Арг₁₄-Гли₁₅ в каждой из 2 В- β -цепей фибриногена, в результате чего образуются фибрин-мономер и 2 фибринопептида В.

Сразу же после первой протеолитической стадии образования фибрина наступает вторая полимеризационная стадия. Она заключается в спонтанном соединении молекул фибрин-мономера друг с другом и формировании сети фибрина. На последней стадии фибриновая сеть стабилизируется фактором XIIIa. Он образуется из своего неактивного предшественника — фактора XIII под действием тромбина. Фактор XIIIa в присутствии Ca^{2+} способствует образованию ковалентных поперечных Глу-Лиз-связей сначала между γ -цепями, затем между α -цепями смежных молекул фибрин-мономера. С образованием стабилизированных сгустков фибрина завершается процесс свертывания крови.

Все вышеизложенное позволяет заключить, что процесс коагуляции очень сложен, он направлен на защиту организма от потери крови. Свертывание крови происходит поэтапно: начинается с активации фактора XII и заканчивается превращением протромбина в тромбин, катализирующим преобразование фибриногена в фибрин. При нормальном гемостазе внутренний и внешний пути являются в равной мере необходимыми. Так, в условиях неповрежденности внешнего пути при дефиците факторов IX, VIII внутреннего пути у больных наблюдаются кровотечения. При нормальном функционировании внутреннего пути наследственная недостаточность фактора VII внешнего пути сопровождается геморрагическими осложнениями. Внешний путь свертывания крови быстрый (10—15 с), внутренний — более медленный (4—6 мин).

Реакции протеолиза, осуществляющие образование тромбина, контролируются сложной системой белковых ингибиторов протеиназ (подробнее см. главу II). Кроме того, существует положительная обратная связь между фактором XII и калликреином, факторами X и VII, тромбином и фактором V и отрицательная обратная связь между факторами X—VII и тромбином-протромбином.

Дальнейшее изучение протеолитических ферментов, участвующих в свертывании крови, будет способствовать пониманию этой важнейшей защитной системы организма в норме и при патологии, а также разработке новых методов диагностики и терапии заболеваний, связанных с нарушением гемостаза.

ПРОТЕИНАЗЫ И ФИБРИНОЛИТИЧЕСКАЯ СИСТЕМА

Фибринолитическая система крови — одна из основных протеолитических систем в организме человека. Под термином «фибринолиз» подразумевают ферментативный процесс лизиса сгустков фибрина, который играет роль в поддержании крови в жидком состоянии, препятствуя в противовес системе свертывания крови внутрисосудистому тромбообразованию. Кроме того, фибринолиз

обеспечивает растворение и удаление внеклеточных отложений фибрина, находящихся вне кровотока: почечных канальцах, матке, слезном канале, желчных путях, канальцах грудных желез и др. (Ж. Фермилен, М. Ферстрате, 1984). Протеиназы фибринолитической системы крови участвуют в инвазии опухолей, иммунологических, воспалительных, аллергических реакциях, овуляции, имплантации эмбрионов (У. Хеднер, 1982; Р. Чакрабартти, 1982).

О существовании в крови фактора, способного растворять сгустки фибрина, было известно давно. Еще более 200 лет назад было отмечено, что кровь внезапно погибших людей в течение длительного времени сохраняется в жидком состоянии. Ее смешивание со сгустками крови здоровых людей приводит к их растворению. Впервые лизис фибрина назвал фибринолизом А. Dastre в 1893 г. В 1907 г. вещество, вызывающее этот процесс, обнаружили в эуглобулиновой фракции крови. W. Tillet, R. Garner в 1933 г. в фильтратах культур некоторых штаммов β -гемолитического стрептококка выявили вещество, вызывающее быстрый лизис сгустков крови человека, получившее название фибринолизина. Однако в его присутствии сгустки, образованные при действии тромбина на очищенный фибриноген, не растворялись. Добавление же в эту систему эуглобулиновой фракции сыворотки крови человека способствовало лизису. Вещество, содержащееся в сыворотке крови, назвали лизирующим фактором. В 1941—1945 гг. А. Kaplan, L. Christensen независимо друг от друга доказали, что лизирующий фактор сыворотки крови является неактивным предшественником протеолитического фермента, который превращается в активную форму стрептококковым фактором. Предшественник протеиназы был обозначен плазминогеном, его активная форма — плазмином, а стрептококковый фактор — стрептокиназой (СК) (D. Colleen, 1980).

Интенсивные исследования процесса фибринолиза начаты в 50-х годах XX ст. В результате многочисленных исследований в настоящее время установлено, что фибринолитическая система крови состоит из многих компонентов: плазмина, плазминогена, активаторов, ингибиторов. В крови циркулирует не свободный плазмин, а его неактивный зимоген. Фибринолиз осуществляется путем активации последнего различными активаторами и образования плазмина. Кроме того, организм располагает механизмами купирования плазмина. Эту функцию выполняют ингибиторы протеиназ. Таким образом, благодаря наличию специфических белков фибринолиз может быстро включаться и выключаться.

Превращение плазминогена в плазмин — центральная реакция фибринолиза. Она реализуется несколькими путями (рис. 6): внутренним, внешним, экзогенным (D. Colleen, 1980). Во внутреннем пути превращения плазминогена в плазмин участвуют в основном активаторы плазмы крови. Важнейшим из них является ФХ. Его

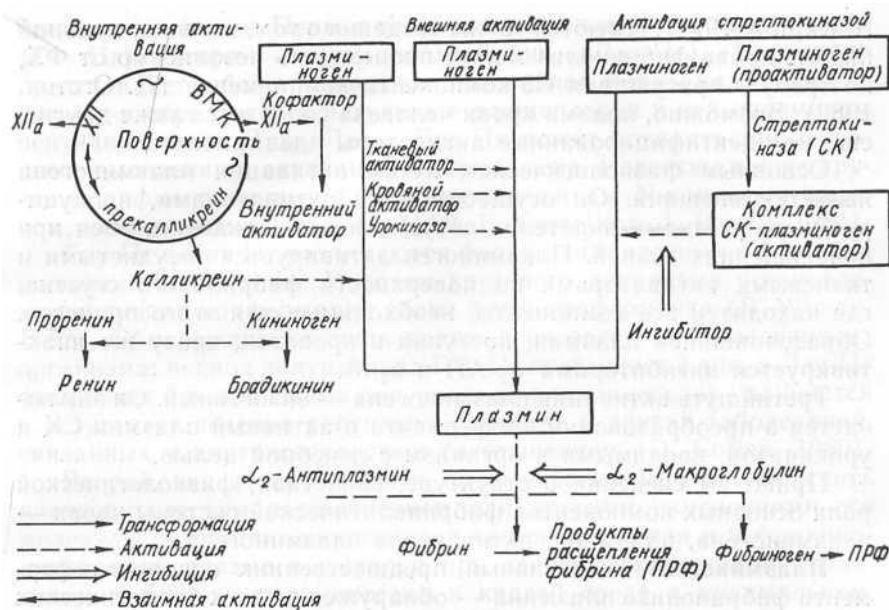


Рис. 6 Схема фибринолитической системы крови

активные фрагменты α -ФХа, β -ФХа образуются из неактивного предшественника ФХ под действием калликреина в присутствии чужеродной поверхности (коллагена эндотелия сосудов) и ВМК. Одни авторы предполагают, что эффект ФХ на активацию плазминогена не прямой: он осуществляется через калликреин, образующийся из прекалликреина под влиянием β -ФХа (В. Вошта, J. Griffin, 1978; R. Vick, 1982). Другие исследователи считают, что в роли активатора может выступать сам ФХ, а именно α -ФХА (G. Goldsmith, 1977; A. Kaplan, L. Yecies, 1980).

ФХ — неотъемлемый компонент контактного фибринолиза, в активации которого участвует чужеродная поверхность (коллаген, каолин и др.). Об этом свидетельствует тот факт, что при отсутствии ФХ в плазме крови некоторых птиц (например, кур) не определяется зависящая от него фибринолитическая активность (К. Н. Веремеенко и соавт., 1983). Однако опосредованная ФХ активация плазминогена не является единственной возможностью запуска фибринолитической системы крови в организме. В опытах *in vitro* установлено, что ФХ активирует около 10 % плазминогена, остальная же его часть превращается в плазмин под действием специфического активатора — СК (К. Н. Веремеенко и соавт., 1978).

Способностью активировать плазминоген обладает также фактор XI свертывания крови после его активации α -ФХа (R. Mandle,

А. Карлан, 1979). Имеются также сведения о том, что в нормальной плазме крови фибринолиз может происходить независимо от ФХ, но требует присутствия С3-компонента комплемента (Д. Огстон, 1982). Возможно, плазма крови человека содержит также другие, еще не идентифицированные активаторы плазминогена.

Основным физиологическим путем активации плазминогена является внешний. Он осуществляется активаторами, продуцируемыми клетками эндотелия сосудов и освобождающимися при повреждениях тканей. Плазминоген активируется сосудистыми и тканевыми активаторами на поверхности фибринового сгустка, где находятся все компоненты, необходимые для этого процесса. Образовавшийся плазмин, поступая в кровоток, сразу же инактивируется ингибиторами α_2 -АП и α_2 -М.

Третий путь активации плазминогена — экзогенный. Он заключается в преобразовании профермента в активный плазмин СК и урокиназой, вводимыми в организм с лечебной целью.

Приводим сведения о структуре, свойствах, физиологической роли основных компонентов фибринолитической системы крови — плазминогена, плазмينا, активаторов плазминогена.

Плазминоген — неактивный предшественник основного фермента фибринолиза плазмина — обнаружен во всех биологических жидкостях организма, некоторых тканях и компонентах крови. Его содержание в плазме крови здоровых людей, определяемое различными методами, колеблется от 0,12 до 0,40 г/л (Н. Landmann, 1978). Предполагают, что профермент синтезируется в печени, костном мозге, почках. Уровень плазминогена наиболее низкий у плода, новорожденных, больных циррозом печени и значительно повышен на последних месяцах беременности, при инфекционных заболеваниях, травмах, злокачественных опухолях (Ж. Фермилен, М. Ферстрате, 1984). Известны 3 случая наследственного дефицита плазминогена, проявляющегося в его неспособности превращаться в плазмин, что связано с содержанием в молекуле профермента в положении 600 треонина вместо аланина (Т. Miyata и соавт., 1984).

В настоящее время плазминоген выделяют из крови или третьей фракции белков по Кону методом аффинной хроматографии на L-лизин-сефарозе, конканавалин-А-сефарозе и др. (С. А. Кудинов и соавт., 1979; D. Deutsch, E. Mertz, 1970; E. Kottger и соавт., 1982). Высокоочищенные препараты плазминогена получены из крови не только человека, но и различных животных — быка, собаки, кошки, овцы, лошади, обезьяны (Н. Landmann, 1978). Они характеризуются гетерогенностью, обусловленной структурными различиями молекул профермента. Один из видов гетерогенности связан с ограниченным протеолизом проэнзима плазминогеном. В этом случае образуются 2 основные формы плазминогена, содержащие в N-конце молекул или глутаминовую аминокислоту.

кислоту, или лизин. Первая получила название «Глу-плазминоген» (Глу-Пг), вторая — «Лиз-плазминоген» (Лиз-Пг). Последняя представляет собой производное от нативной формы плазминогена Глу-Пг и образуется в результате расщепления в ней плазмином пептидной связи Лиз₇₆-Лиз₇₇. Лиз-Пг может появляться и в процессе выделения и активации плазминогена. Известны также другие модифицированные формы профермента с N-концевым валином, метионином (D. Collen, 1980; F. Castellino, J. Pavell, 1981).

Глу-Пг и Лиз-Пг различаются физико-химическими и функциональными свойствами. Методом кругового дихроизма установлена различная конформация обеих форм профермента (B. Wiman, 1982). Обнаружены отличия также в скорости их выведения из организма: период полураспада Глу-Пг превышает 2 дня, а Лиз-Пг составляет 0,8 дня. Время полураспада плазминогенов удлиняется в результате лечения рептилазой цирроза и других заболеваний, связанных с внутрисосудистым свертыванием (D. Collen, 1980).

Второй вид гетерогенности плазминогена нельзя объяснить протеолитическим расщеплением или другими изменениями его молекулы вследствие очистки, так как он свойствен и нефракционированной плазме и выявлен при электрофоретическом разделении нативного плазминогена в кислой среде в крахмальном, полиакриламидном геле, а также при помощи аффинной хроматографии на L-лизин-сефарозе (F. Castellino, P. Wallen, 1981). Получены 2 фракции Глу-Пг — Глу-плазминоген I (Глу-Пг I) и Глу-плазминоген II (Глу-Пг II). Они различаются молекулярной массой, углеводным составом, третичной структурой. Первая форма плазминогена в отличие от второй имеет более высокую молекулярную массу и содержит больше сиаловой кислоты, N-ацетил-глюкозамина, нейтральных сахаров. Кроме того, молекула Глу-Пг I имеет 2 углеводные цепи, одна из них присоединяется к Асн₂₈₈, другая к Тре₃₄₅, расположенных в кринглах₁₋₄. Глу-Пг II содержит лишь одну олигосахаридную цепь, причем местом ее присоединения к белковой части молекулы является Тре₃₄₅. Наряду с этим Глу-Пг I по сравнению с Глу-Пг II быстрее активируется урокиназой и СК в присутствии фибрина (Y. Takada и соавт., 1985). Низкие концентрации транексамовой кислоты и ε-АКК вызывают более значительные конформационные изменения в молекуле Глу-Пг I, чем Глу-Пг II.

Еще один вид гетерогенности препаратов плазминогена проявляется при их электрофоретическом анализе в крахмальном или полиакриламидном геле в щелочной среде, а также изоэлектрическом фокусировании (L. Summaga и соавт., 1972). Так, оба типа Глу-Пг при изоэлектрическом фокусировании разделяются на 6 фракций с изоэлектрическими точками (pI) — 6—7. Известны также изоформы Лиз-Пг с pI 6,7—8,1. Чем обусловлен этот вид гетерогенности, до настоящего времени не выяснено. Предпола-

гают, что он связан с различным содержанием сиаловых кислот. Однако против такой точки зрения свидетельствует факт сохранения активности зимогена при его полном деснализировании. Имеются сообщения о существовании нескольких форм плазминогена, которые не содержат углеводов (P. Wallen, 1980). Считают, что в физиологических условиях нативной формой плазминогена человека и животных является Глу-Пг.

По химической природе плазминоген представляет собой гликопротеин. Его молекула в отличие от молекулы трипсина и других сериновых протеиназ содержит в N-концевом участке несколько петлеобразных структур, в которых имеются лизинсвязывающие участки (ЛСУ), специфически реагирующие с лизиновыми участками (ЛУ) фибрина.

Механизм активации плазминогена, его превращение в активный фермент до настоящего времени полностью не выяснен. Согласно имеющимся данным, основной реакцией, приводящей к образованию плазмина, является расщепление единственной пептидной связи Арг₅₆₀-Вал₅₆₁ в молекуле профермента тканевыми, сосудистыми активаторами, а также урокиназой и комплексом плазминоген — СК. Эта связь расположена в дисульфидной петле, образованной мостиком Цис₅₅₇-Цис₅₆₅. Предполагают, что такая структура чрезвычайно важна для специфического взаимодействия с активаторами. Благодаря дисульфидным связям расщепление Арг₅₆₀-Вал₅₆₁ не приводит к распаду молекулы плазминогена, но из одноцепочечной она превращается в двухцепочечную. При активации Глу-Пг могут образовываться Глу-плазмин (Глу-П) и Лиз-плазмин (Лиз-П), а из Лиз-Пг — только Лиз-П. Пока неясно, какая форма профермента в организме преобразуется в плазмин. Имеются данные о том, что активация Глу-Пг урокиназой в очищенных системах протекает в 20 раз медленнее Лиз-Пг (D. Collep, 1980). Образование той или иной формы плазмина зависит от способа их получения. Если активацию плазминогена проводят в присутствии ингибиторов плазмина, то образуется Глу-П, при их отсутствии расщепляется пептидная связь Лиз₇₆ — Лиз₇₇ и образуется Лиз-П. Далее может разрываться связь Арг₆₇-Мет₆₈. Однако последние 2 реакции протекают под действием самого плазмина, а не активаторов плазминогена (P. Wallen, 1980; V. Wiman, 1982).

Плазмин (КФ.3.21.7) относится к эндопептидазам — сериновым протеиназам трипсиноподобного действия. Его молекулярная масса составляет около 80 000 дальтон. Фермент нестабилен при нейтральных значениях рН, при снижении рН до 4 и ниже устойчивость фермента повышается. При рН 2 плазмин осаждается 1 М раствором NaCl, при этом его активность почти не изменяется (H. Landmann, 1978).

Плазмин в опытах *in vitro* обладает широкой специфичностью, проявляющейся в способности расщеплять белковые субстраты (фибрин, фибриноген, γ -глобулин, факторы комплемента, казеин), эфиры аргинина, лизина, а также нитроанилиды и β -нафтиламиды этих же аминокислот. Предпочтительнее фермент гидролизует связи, образованные СООН-группой лизина.

Оптимум действия плазмина на белки находится при рН 7—8, на эфиры аргинина — при рН 8—9, на эфиры лизина — при рН 6,5. Плазмин обычно получают из плазминогена путем его активации СК, урокиназой. Активность фермента выражают в казеинолитических единицах (к. е.): 1 к. е. соответствует такому количеству плазмина, которое освобождает 450 мкг растворимого в трихлоруксусной кислоте тирозина из 4 % раствора казеина при рН 7,4 и температуре 35 °С в течение 1 ч. Высокоочищенные препараты обладают активностью, равной 15—30 к. е./мг белка.

В настоящее время полностью расшифрована первичная структура плазмина (плазминогена). По химической природе — это гликопротеин, молекула которого содержит 790 аминокислотных остатков и 24 дисульфидных мостика (D. Collep, 1980). Белок состоит из 2 полипептидных цепей — тяжелой (А), расположенной в N-конце молекулы, и легкой (В) — в С-концевом участке. N-концевой аминокислотой является глутаминовая, С-концевой — аспарагиновая. В состав молекулы входит 2—3 % углеводов, локализованных в тяжелой цепи. Олигосахариды присоединяются к Asp₂₈₈ и Thr₃₄₅ (А. Takada, Y. Takada, 1985). В легкой цепи (Val₅₆₁-Asn₇₉₀) находится активный центр, включающий аминокислоты: серин, гистидин, аспарагиновую. В ней же расположен участок взаимодействия со СК. В тяжелой цепи плазмина (Lys₇₇-Arg₅₆₀) имеется 5 близких по аминокислотной последовательности петлеобразных участков — доменов, или кринглов, в легкой цепи — 2. 5 гомологичных кринглов представляют собой компактные структуры глобулярного типа с хорошо выраженным гидрофобным ядром (В. В. Новохатний, 1985). Кринглы тяжелой цепи обозначены K₁, K₂, K₃, K₄, K₅. Установлено, что в доменах K₁₋₄ локализованы специфические участки, обладающие сильным сродством к лизину, ϵ -АКК, парааминобензойной кислоте и другим ω -карбоновым кислотам, обладающим антифибринолитическими свойствами (В. В. Новохатний, С. А. Кудинов, 1984; С. А. Кудинов, 1985). Эти ЛСУ играют важную роль во взаимодействиях между плазмином (плазминогеном) и фибрином, а также плазмином и его ингибитором — α_2 -АП. Непосредственно в акте катализа они не участвуют, но являются главным фактором избирательного связывания с фибрином, фибриногеном или α_2 -АП. Показано, что в функционировании ЛСУ плазмина, его способности связывать лизин и другие ω -карбоновые кислоты, а также фибрин (фибриноген) и α_2 -АП решающую роль в K₄ играет триптофан, в K₁ —

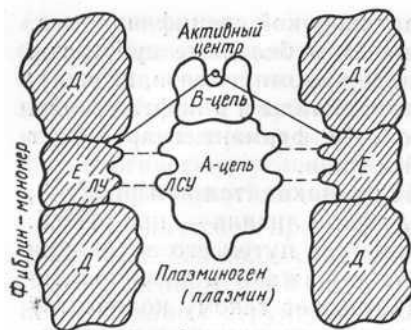


Рис. 7. Схема взаимодействия плазмина с фибрином

тирозин (S. Hochschwender, R. Loursen, 1981; L. Miguel и соавт., 1983).

Наряду с ЛСУ в молекуле плазмина (плазминогена) обнаружены участки, обладающие сродством к *p*-аминобензамидину, которые локализованы в K_5 тяжелой цепи и кринглах легкой цепи. Кроме бензамидинподоб-

ных веществ они могут присоединять аргинин. Возможно, эти участки, аналогично ЛСУ, вносят вклад в избирательность действия фермента (С. А. Кудинов, 1985).

Так как основная функция плазмина в организме заключается в лизисе фибрина, рассмотрим подробнее взаимодействие фермента с этим субстратом. Его можно представить схематически (рис. 7).

В молекуле фибрина, состоящей из доменов Д и Е, в домене Е (В. Wiman, P. Wallen, 1977) локализованы ЛУ, с которыми комплементарно реагируют ЛСУ плазмина (плазминогена). Фибрин по сравнению со своим предшественником фибриногеном имеет большее сродство к плазминогену, что свидетельствует, очевидно, о том, что в молекуле фибрина ЛУ в большей степени выставлены на поверхность. Очищенный фрагмент Е (выделенный из фибриногена) конкурирует с фибрином за ЛСУ плазминогена. Последние можно заблокировать ϵ -АКК и другими, сходными с лизином веществами, которые мешают сорбции плазминогена (плазмина) фибрином. Установлено, что плазминоген функционирует в качестве связывающего звена между частицами олигомеров фибрина, вызывая их осаждение (А. Garman, R. Smith, 1982). ϵ -АКК специфически мешает этой реакции. Малый плазминоген (мини-ПГ) — продукт протеолитического расщепления нативного плазминогена (состоит из легкой цепи и 1 крингла — K_5 тяжелой цепи) — не осаждает олигомеры фибрина. Очевидно, для реакции осаждения требуется присоединение осаждающего агента к 2 или более молекулам фибрина, что и обеспечивается ЛСУ интактного плазминогена. Свойство присоединяться ЛСУ к нескольким молекулам фибрина присуще также плазмину. Такая поливалентность имеет биологический смысл: она позволяет молекуле плазмина действовать на новые интактные молекулы фибрина, оставаясь связанной с субстратом и избегая перехода в раствор и инактивации ингибитором — α_2 -АП. Подтверждением этого служит определение продолжительности жизни плазмина, гидролизующего по-

лимерный фибрин в системе, содержащей α_2 -АП: время полужизни связанного с фибрином плазмина в 100 раз превышает таковое фермента, находящегося в свободном состоянии (D. Collen, 1980). Вместе с плазминогеном сгусток фибрина специфически связывает тканевый активатор плазминогена.

Итак, основной процесс лизиса фибринового сгустка плазмином сложен и заключается во взаимодействии всех компонентов системы. Образование фибрина из фибриногена и построение сети фибриновых волокон сопровождается сорбцией плазминогена и его активаторов на их поверхности, причем действие основного ингибитора плазмина — α_2 -АП — затруднено. Все это создает условия для локального интенсивного фибринолиза. В избирательном расщеплении тромбов решающим фактором служит полимерная структура волокон фибрина. Плазмин — фермент, способный *in vitro* расщеплять различные белки, оказывается строго специфичным для сгустка фибрина, и даже фибриноген, который для свободного плазмина является наилучшим субстратом, остается интактным. Только после лизиса сгустка, попадая в кровоток, плазмин быстро и необратимо инактивируется α_2 -АП.

Активаторы плазминогена естественного происхождения — это протеолитические ферменты, которые, расщепляя определенную связь в молекуле плазминогена, способствуют его превращению в плазмин. Они обнаружены в большинстве тканей организма, биологических жидкостях, крови и ее составных частях (Г. В. Андреев, 1985). Классифицировать активаторы плазминогена пока не представляется возможным, так как мы располагаем неполными сведениями об их химическом строении, свойствах. Физиологические активаторы плазминогена разделяют в зависимости от источника их получения. Известны плазменные, сосудистые, тканевые активаторы, урокиназа (из мочи), а также активаторы, продуцируемые культурами клеток как нормальных, так и раковых, и трансформированных онкогенными вирусами (Е. М. Макогоненко, 1983).

Активаторы плазминогена участвуют не только в фибринолизе, но и в регуляции многих физиологических и патологических процессов — регенерации тканей, овуляции и имплантации бластулы, активации коллагеназ, росте и метастазировании опухолей (К. Reddy, D. Kline, 1980).

В плазме крови человека и животных обнаружено несколько активаторов плазминогена. Некоторые из них связаны с внутренним путем активации фибринолиза посредством ФХ. К ним относятся калликреин, который, как полагают, играет существенную роль на начальных стадиях образования плазмина и превращении Глу-Пг в Лиз-Пг (Е. Gyzander и соавт., 1984; M. Jorg, B. Binder, 1985), а также фактор XIa и С3-компонент комплемента (Д. Огстон, 1982; R. Mandle, A. Kaplan, 1979). Имеются плазменные

активаторы, образование которых не зависит от ФХ (Г. В. Андренко, 1983). D. Ogston и соавторы (1976) получили в очищенном виде активатор плазминогена из крови людей после сдавливания вен рук. Полагают, что он может освобождаться либо из стенок вен, либо в результате активации ФХ. В плазме крови обнаружен также активатор плазминогена, напоминающий по свойствам урокиназу (С. Klufft и соавт., 1981). Из фибринолитически активной плазмы промывной крови внезапно умерших людей выделен стрептокиназоподобный активатор с удельной специфической активностью 203 АЕ/мг, что в 88 раз превышает таковую исходной плазмы. По химической природе — это β -глобулин с молекулярной массой 70 000 дальтон и изоэлектрической точкой при рН 6,2 (Т. К. Платонова, О. А. Петренко, 1979). Охарактеризован и другой активатор плазминогена, полученный из того же источника, что и предыдущий. Фермент обладал узким спектром действия, направленным лишь на превращение плазминогена в плазмин. Он термостабилен. Его активность устойчива при рН 5—8, оптимум действия находится при рН 7,4 и температуре 37 °С (О. А. Маркова, 1983).

Активаторы плазминогена обнаружены также в форменных элементах крови — эритроцитах, гранулоцитах (О. Г. Оглоблина и др., 1981), В-лимфоцитах (J. Maillard, C. Favreau, 1981), моноцитах (Д. Огстон, 1982). Активатор из моноцитов имеет молекулярную массу 52 000 дальтон, инактивируется низкими концентрациями солей и α_2 -М (R. Stephens, J. Golder, 1984). Активаторы содержатся в слюне, желчи, слезах, молоке и в других биологических жидкостях (Д. Огстон, 1982). Проникая из крови в просвет соответствующих желез, они препятствуют закупорке их выводных протоков.

Выделены и изучены некоторые свойства активаторов из стенки различных сосудов человека. Считают, что их источником является эндотелий, главным образом, малых вен, хотя они обнаружены и в малых артериях, больших венах (почечных и др.), а также в лимфатических сосудах (Ж. Фермилен, М. Ферстрате, 1984). Исследование и характеристика сосудистых активаторов плазминогена затруднены вследствие их лабильности. Молекулярная масса этих активаторов, по данным различных авторов, составляет 55 000—67 000 дальтон, изоэлектрическая точка — при рН 8,2, их активность угнетается ДФФ, лизином, ϵ -АКК. Активатор, аналогичный по свойствам сосудистому, выделен из плазмы крови людей, подвергшихся большой физической нагрузке. Считают, что его появление в плазме крови связано с высвобождением из стенки венозных сосудов (R. Radcliffe, T. Heinze, 1978; K. Reddy, D. Kline, 1980). Молекула сосудистого активатора плазминогена состоит из одной полипептидной цепи. Активатор подобен тканевому или идентичен с ним, но отличается от урокиназы кинетикой расщепле-

ния N-ацетил-L-лизин-метилового эфира, неспособностью угнетаться специфической антисывороткой к урокиназе и большим сродством к фибрину.

Физиологический механизм, посредством которого активатор освобождается из стенки сосудов в кровоток, пока неясен. Известно, что при введении многих вазоактивных веществ — адреналина, никотиновой кислоты, вазопрессина — кратковременно повышается фибринолитическая активность крови. Выделение активатора плазминогена усиливается под влиянием бигуанидов (например, фенформина) и некоторых анаболических стероидов, которые могут стимулировать как синтез активаторов сосудистой стенки, так и их освобождение. Высказано предположение, что превращение плазминогена в плазмин под действием сосудистых активаторов находится под нейрогуморальным контролем (Д. Огстон, 1982).

Активаторы плазминогена обнаружены в разных тканях организма человека и животных. Для их выделения применяют различные методические приемы, включающие фракционирование сульфатом аммония, аффинную хроматографию на лизин-сефарозе 4В или фибрин-аргинин-сефарозах, гель-хроматографию на сефадексе G-150 или сефакриле G-200 (Е. М. Макогоненко, 1983; R. Radcliffe, T. Heinze, 1978). В очищенном виде активаторы получены из сердца, матки, яичников, почек свиньи (Е. Cole, F. Bechtapp, 1977; S. Soeda, A. Nagamatsa, 1981; P. Wallen и соавт., 1982). Богаты этими веществами надпочечники, лимфатические узлы, предстательная и щитовидная железы (D. Collen, 1980). Содержание тканевого активатора в одном и том же органе, у одного и того же вида животных сильно различается и обусловлено функциональным состоянием организма.

Структура тканевого активатора зависит от способа его получения. Так, при выделении активатора из сердечной мышцы свиньи в присутствии ингибиторов протеиназ — апротинина и ϵ -АКК — его молекула состояла из одной полипептидной цепи (с молекулярной массой 64 000 дальтон). При отсутствии ингибиторов полученный активатор имел 2 полипептидные цепи (молекулярная масса 32 000 дальтон каждая), соединенных дисульфидными связями. Такая же форма тканевого активатора получена в результате ограниченного протеолиза его интактной молекулы плазминона или трипсинона. Частичное расщепление одноцепочечного активатора повышает его амидазную активность в 8 раз, а фибринолитическую — в 1,5 раза. Активаторы плазминогена, выделенные из ткани матки женщин и свиньи, были аналогичными. Их молекулярная масса равнялась 64 000 дальтон. Молекула состояла из 2 полипептидных цепей (молекулярная масса 31 000 и 38 000 дальтон), соединенных дисульфидными мостиками. Активный центр был локализован в легкой цепи белка (D. Rijken и соавт., 1979). Имеются данные о наличии активатора Пг в тон-

кой кишке. Он обладает эстеразной активностью, проявляющейся в способности гидролизовать N- α -ацетил-лизин-метиловый эфир, и амидазной в отношении хромогенных субстратов S-2238, S-2286, S-2251. По свойствам этот активатор близок к урокиназе. Предполагают, что он может участвовать в развитии ряда заболеваний пищеварительного канала (N. Wong, H. Lau, 1984). Из ткани миокарда внезапно погибших людей получен активатор плазминогена с молекулярной массой 70 000 дальтон. Его кинетическая характеристика расщепления различных хромогенных субстратов была идентична таковой активатора из сосудистой стенки вен (B. Binder и соавт., 1981).

Активаторы плазминогена обнаруживают также в культуре клеток почек, легких, мочеочника, эндотелия сосудов, скелетных мышц (Г. В. Андреев, 1983; B. Festoff и соавт., 1982; H. Ljungberg и соавт., 1984). Хорошим источником активатора в культуре тканей служат клетки злокачественных опухолей, в частности меланомы. Из них получен препарат активатора, очищенный в 263 раза (D. Rijken, D. Collen, 1981; M. Ranby и соавт., 1982). В последнее время для повышения чистоты и выхода активатора в качестве аффинного сорбента используют однопочечный белок из бобов *Erythrina latissima* (C. Heussen и соавт., 1984). При сравнении активаторов из клеток меланомы и матки отмечено, что они подобны, или идентичны, по аминокислотному составу, амидолитическим свойствам, способности связываться с фибрином, но отличаются от урокиназы (D. Rijken, D. Collen, 1981; M. Ranby и соавт., 1982).

Активаторы плазминогена — тканевые, сосудистые, из культуры тканей — представляют собой сериновые протеназы, которые, как полагают некоторые исследователи, находятся в виде неактивных предшественников. Последние спонтанно или под действием протеназ (плазмина и др.) превращаются в активную форму (E. Cole и соавт., 1978). В опытах *in vitro* тканевые активаторы обладают эстеразной, амидазной активностями, расщепляя связи, образованные карбоксильной группой аргинина и лизина. Субстратами для них являются тозил-L-аргинин-метиловый эфир (ТАМЭ), S-2322, S-2222, S-2238 и др. (E. Cole и соавт., 1978). Сосудистые активаторы из культуры клеток расщепляют ТАМЭ, ацил-гли-лиз-о-мет (W. Ming-Chi и соавт., 1977; B. Binder и соавт., 1979). В то же время все активаторы плазминогена инертны в отношении белковых субстратов — казеина, гемоглобина, фибрина, фибриногена. Их активность подавляется ДФФ, паранитрофениловым эфиром гуанидинбензойной кислоты (П-НФГБ) (W. Schleuning, A. Granelli-Piperino, 1979). Естественные же ингибиторы протеназ — трасилол, из бобов сои, картофеля, подчелюстной железы, АТ III и др. — не влияют на их активность. Ингибиторами активаторов являются белки, содержащиеся в пе-

чени, легких, плаценте человека. Одни из них угнетаются KSCN, другие — нечувствительны к его действию и характеризуются кислотостабильностью (Е. М. Макогоненко, 1983).

Главное отличие тканевых и сосудистых активаторов плазминогена от урокиназы состоит в их высоком сродстве к фибрину. В присутствии последнего скорость образования плазмина из плазминогена под действием тканевых активаторов возрастает в 1000 раз (P. Wallen, M. Ranby, 1981; M. Ranby, 1982).

Процесс активации плазминогена тканевыми и сосудистыми активаторами на поверхности фибрина до конца не выяснен. Согласно имеющимся данным, активатор плазминогена сначала связывается с фибрином, а затем этот комплекс фиксирует плазминоген (M. Noyлаerts и соавт., 1981). Предполагают, что взаимодействие плазминогена и его активатора происходит на поверхности А- α -цепи фибрина (D. Lloyd и соавт., 1981). Ускоряет активацию плазминогена не только цельная молекула фибрина, но и фрагмент, полученный из нее в результате воздействия бромцианом. Он имеет молекулярную массу 43 000 дальтон и состоит из участков А- α -цепи (остатки 148 — 208), В- β -цепи (остатки 191 — 224, 225 — 242, 243 — 305) и γ -цепи (95 — 265), которые соединены дисульфидными связями. На основании этих данных делается вывод о том, что стимуляция активации плазминогена не требует образования полимерной структуры (W. Niewenhuizen и соавт., 1983).

К естественным активаторам плазминогена относится урокиназа (КФ.3.4.99.26) — сериновая протеиназа, содержащаяся в моче человека и животных. Используя метод культуры почечных клеток эмбриона человека, К. Reddy (1980) установил, что местом синтеза урокиназы являются почки. В норме 1 мл мочи содержит 10 СТА ед. урокиназы. Она быстро выводится из кровотока и, попадая в печень, расщепляется. Эти данные следует учитывать при использовании препаратов урокиназы в лечебных целях (D. Collen и соавт., 1984). Время полужизни урокиназы у кроликов и обезьян составляет соответственно 3 и 8 мин.

Для выделения урокиназы из мочи используют различные методы: адсорбцию на желатин-, агматин-сефарозах, гель-хроматографию на сефадексе G-150 (K. Huber и соавт., 1981). Для очистки фермента предложен также метод колоночной хроматографии с древесными опилками кедра в качестве сорбента. Препарат, полученный таким способом, имел активность 60 000 ед/мг белка (O. Kobayashi и соавт., 1981). Высокоочищенные препараты высокомолекулярной формы урокиназы (молекулярная масса 54 000 дальтон) получают методом обратной иммуноадсорбции, т. е. аффинной хроматографии на сефарозе 4В, с которой ковалентно связан IgG. Последний связывает все белки, кроме урокиназы (K. Yokoigawa и соавт., 1984).

Известны 2 формы урокиназы из мочи человека — урокиназа I и урокиназа II с молекулярной массой соответственно 33 000 и 54 000 дальтон. Первая более устойчива к изменениям pH от 6,8 до 9,6, нагреванию до 60 °С. Кроме того, она активирует Глу-Пг в 2,5—5 раз медленнее второй, а протеолитическое действие обеих урокиназ на Лиз-Пг аналогично (Д. Лормо и соавт., 1982).

Две фракции урокиназы получены из культуры эмбриональных клеток почек, их молекулярная масса — 47 500 и 31 500 дальтон. Обе активируют плазминоген, но высокомолекулярная более активна (Р. Vaveux и соавт., 1981). Молекула ее состоит из 2 полипептидных цепей, связанных дисульфидными мостиками. Эта форма может превращаться в низкомолекулярную. Из тканей почек человека выделен новый тип урокиназы, состоящий из одной полипептидной цепи (молекулярная масса — 54 000 дальтон). Фермент характеризуется более высоким сродством к фибрину и выраженным тромболитическим действием (Н. Sumi и соавт., 1982). Урокиназоподобный активатор плазминогена обнаружен в плазме крови здоровых людей и больных с дефицитом факторов XI, XII (Y. Tissot и соавт., 1982). Урокиназу в последние годы получают методом генной инженерии. Для клонирования гена урокиназы из клеток почки плода выделяют мРНК, определяющую синтез фермента в бесклеточной системе. мРНК используют в качестве матрицы для получения кДНК, которую клонируют в клетках *E. coli* на плазмиде pBR 322. Синтезированный белок идентичен активатору плазминогена из мочи (Р. Hung, 1984).

Биологическая функция урокиназы заключается в активации плазминогена, находящегося в сгустках крови мочевых путей, что способствует растворению сгустков. В опытах *in vitro* показано, что процесс превращения плазминогена в плазмин с помощью урокиназы может протекать при pH 5,5—9 и сопровождается протеолитическим расщеплением пептидной связи Arg₅₆₀-Val₅₆₁. Кроме способности расщеплять плазминоген урокиназа проявляет эстеразную активность в отношении N- α -ацетил-глицил-L-лизин-метилового эфира; тозил-L-аргининметилового эфира и протеолитическую в отношении казеина (К. Reddy, D. Kline, 1980). Активация плазминогена и гидролиз синтетических субстратов, катализируемые урокиназой, угнетаются производными бензамидина и фенилгуанидина. Однако фермент нечувствителен к действию белковых ингибиторов протеназ мочи, а также соевому ингибитору трипсина.

По физико-химическим, иммунологическим и функциональным свойствам урокиназа отличается от других активаторов плазминогена. Так, если тканевой активатор высвобождается лизосомальными ферментами только из поврежденных или погибших клеток, то урокиназу продуцируют здоровые клетки почек. Кроме того, урокиназа активирует плазминоген при отсутствии фибрина,

хотя этот процесс и может ускоряться последним, если в системе присутствует Глу-Пг, а не Лиз-Пг (А. Takada и соавт., 1984).

К экзогенным активаторам плазминогена относится СК. Она представляет собой неферментный белок, продуцируемый β -гемолитическим стрептококком. СК имеет молекулярную массу около 47 000 дальтон, коэффициент седиментации 3,15S, изоэлектрическую точку — 4,7—6,5 (К. Reddy, D. Kline, 1980). В настоящее время полностью расшифрована первичная структура этого белка. Молекула СК состоит из 415 аминокислотных остатков, причем 245 из них в N-концевом участке гомологичны таковым сериновых протеиназ поджелудочной железы и из *Str. griseus*. N-концевой аминокислотой СК является изолейцин, С-концевой — лизин. В состав СК входит 0,2 % гексоз и 0,1 % гексозамина. Белок устойчив к действию высоких температур, денатурирующему влиянию мочевины и гуанидинхлорида. Он стабилен в зоне рН от 7 до 10 (В. Н. Никандров, 1982). В активном центре СК в положении 57 находится глицин, другие 2 аминокислоты — Asp₁₀₂ и Ser₁₉₅ такие же, как у сериновых протеиназ. Предполагают, что третичная структура СК и вышеуказанных ферментов также гомологичны. Молекула СК состоит из 2 доменов. Структурное сходство свидетельствует, по-видимому, об эволюции СК из сериновых протеиназ. В состав СК не входит цистеин и цистин, что необычно для белков с такой молекулярной массой. Около 60 % аспарагиновых и глутаминовых остатков амидированы (С. А. Кудинов, Т. В. Грищенко, 1982).

СК, не проявляя протеолитической и эстеразной активности, способна активировать плазминоген. Она обладает высокой видовой специфичностью: хорошо активирует плазминоген человека и некоторых видов животных, других видов животных — слабо или вообще не активирует. Добавление же к плазминогену последних видов животных смеси плазмы крови человека (или эуглобулиновой фракции) со СК приводит к полноценной активации профермента. Это послужило основанием для предположения о наличии в плазме человека проактиватора, который под влиянием СК превращается в активатор. Позднее было доказано, что таким проактиватором является плазминоген (плазмин). Плазминоген различных видов можно разделить на 3 группы в зависимости от характера его взаимодействия со СК: 1-я — плазминоген человека, обезьян, кошек, который активируется каталитическими количествами СК; 2-я — плазминоген собак, кроликов, требующий для активации больших концентраций СК; 3-я — плазминоген коров, овец, свиней, мышей, крыс, не активируемый СК. Последний хорошо активируется комплексом плазминоген человека — СК и урокиназой. Неодинаковая степень активации плазминогена, вероятно, объясняется различием в структуре плазминогена человека и разных видов животных (К. Reddy, 1980).

СК, обладая большим сродством к плазминогену человека, образует с ним комплекс (Пг-СК), который, как считают, является активатором профермента. Образовавшийся в ходе этой реакции плазмин в свою очередь может комплексоваться со СК (П-СК) и в таком виде выступать в роли активатора. Этот процесс будет зависеть от времени и концентрации реагентов, температуры. Образование комплексов плазминогена (плазмина) со СК доказано с помощью физико-химических и ферментативных методов. Так, смесь человеческого плазминогена со СК при электрофорезе в крахмальном геле при pH 6 (8) передвигалась с промежуточной скоростью по сравнению с таковой исходных белков. Кроме того, при аналитическом центрифугировании эквимольной смеси плазминогена и СК получали компонент с коэффициентом седиментации 5,2S (для исходных белков этот показатель равен соответственно 4,1S и 2,9S). На основании данных о том, что в присутствии мочевины или снижении pH комплекс Пг-СК диссоциирует, а при нитровании (модификации тирозилов) комплексы не образуются, считают, что связываются тирозин плазминогена и карбоксильные группы Глу- и Асп-молекулы СК. Остатки тирозина локализованы в легкой цепи Пг, с ними и реагирует СК. (L. Summaga, K. Robbins, 1976). Комплексы Пг-СК, П-СК обладают многими свойствами, присущими сериновым протеиназам: инактивируются специфическими веществами, блокирующими активный центр сериновых протеиназ, — ДФФ, п-НФГБ, угнетаются естественными ингибиторами, способны гидролизовать синтетические субстраты — ТАМЭ, ацетил-лизин-метидовый эфир, а также N- α -CB₂L-лизинпаранитрофениловый эфир (K. Reddy, 1980). В то же время в отличие от свободного плазмина комплексы не расщепляют белковые субстраты — фибрин, фибриноген, казеин и др.

После образования комплекса и формирования активного центра его компоненты подвергаются протеолизу. При связывании плазминогена с каталитическими количествами СК гидролизует пептидная связь Арг₅₆₀-Вал₅₆₁ и образуется двухцепочечный белок плазмин. Молекулярная масса одной цепи составляет 60 000 — тяжелая цепь и 20 000 дальтон — легкая цепь (K. Reddy, 1980). При взаимодействии плазминогена со стехиометрическими количествами СК расщепляется связь Арг-Вал, в результате чего из Глу-Пг образуется Глу-П. Последний превращается в Лиз-П и высвобождается N-концевой фрагмент. Плазмин в комплексе со СК не может отщепить этот фрагмент, а свободный фермент легко его освобождает (С. А. Кудинов, 1982).

СК после комплексообразования с плазминогеном подвергается ограниченному протеолизу. Количество образовавшихся из нее фрагментов, по данным одних авторов, равно 5 (молекулярная масса 40 000, 36 000, 31 000, 26 000, 10 000 дальтон) (L. Summaga

и соавт., 1974), по сообщению других, — 4 с молекулярной массой от 47 000 до 25 700 (G. Siefiring, F. Castellino, 1976).

Не только СК, но и ее высокомолекулярные фрагменты активируют плазминоген (С. А. Кудинов, 1982; K. Reddy, 1980). Эффективным активатором, даже более сильным, чем Пг-СК, является стехиометрический комплекс между легкой цепью плазмينا и СК (К. Кеннет, 1982).

Таким образом, в организме содержатся многочисленные активаторы плазминогена. Одни из них своими свойствами подобны или идентичны тканевым активаторам, другие — урокиназе. Основные сведения о компонентах фибринолиза получены в опытах *in vitro* при исследовании очищенных систем. Они позволяют лишь предположить характер процессов, лежащих в основе фибринолиза в организме человека. По-видимому, эти процессы осуществляются путем сложного взаимодействия между плазминогеном, его активаторами, плазмином, ингибиторами, фибриногеном (фибрином).

Изучению фибринолитической системы крови, ее роли при физиологическом состоянии и в условиях патологии посвящены многочисленные работы. Наиболее подробно эти вопросы освещены в монографии Г. В. Андреевко (1979), обзорных статьях I. Nilsson и соавторов (1980), R. Bick (1982) и др. Оценить состояние фибринолиза в крови здоровых людей трудно, поскольку активаторы и ферменты этой системы уравновешены плазменными ингибиторами. Поэтому в норме фибринолитическая активность в крови (плазме) практически не проявляется. В клинических лабораториях используют методы ее определения в разбавленной плазме крови или эуглобулиновой фракции, лишенной ингибиторов.

Биохимические и гистохимические методы применяли для исследования фибринолитической активности плазмы практически здоровых людей и изучения влияния на нее различных факторов. В норме фибринолитическая активность плазмы крови варьирует в зависимости от пола, возраста, расы, времени суток, сезона, диеты (I. Nilsson и соавт., 1980). В венозной крови она выше, чем в артериальной, что, вероятно, связано с большим содержанием активатора плазминогена в венах. При большой физической нагрузке, тяжелой гипоксии (давлении O_2 менее 35 мм рт. ст.), а также эмоциональном возбуждении, страхе, испуге наблюдается гиперфибринолиз. Активацию фибринолиза вызывает использование с лечебной целью анаболических стероидов, адреналина, никотиновой кислоты, вазопрессина. Они действуют как на синтез активаторов плазминогена в стенках сосудов, так и на их освобождение. Повышение фибринолитической активности в крови здоровых людей вследствие воздействия различных факторов или физического состояния организма представляет собой защитную

реакцию. Нарушение же регуляторного механизма фибринолитической активности может привести к развитию различных патологических состояний. Различают два вида усиления фибринолиза — первичный и вторичный (З. С. Баркаган, 1980; R. Bick, 1982).

Первичный фибринолиз общего и местного характера может развиваться в результате появления в крови свободного плазмина. Это связано с выделением в кровотоки активаторов плазминогена из поврежденных тканей. Образовавшийся плазмин расщепляет не только фибрин, но и фибриноген, V, VII факторы свертывания, что сопровождается поступлением в кровь продуктов расщепления фибрина (фибриногена), оказывающих противосвертывающее действие. Общий первичный фибринолиз наблюдается при тяжелых травмах, агонии, остром лейкозе, электрошоке, при воздействии токсинов (Г. В. Андреев, 1982), местный — при оперативных вмешательствах на органах, содержащих большие количества активаторов плазминогена (матке, предстательной железе и др.) и является причиной локальных кровотечений. Местный первичный фибринолиз развивается также при хронических заболеваниях печени, злокачественных новообразованиях грудной железы, желудка, кишок. Наиболее сильные кровотечения бывают у больных саркомой различных органов (R. Bick, 1982).

Вторичный фибринолиз развивается в ответ на диссеминированное внутрисосудистое свертывание (синдром ДВС, тромбгеморрагический синдром, коагулопатия потребления). Диссеминированное внутрисосудистое свертывание неспецифично и может возникать при различных патологических процессах (З. С. Баркаган, 1980). На первой стадии синдрома ДВС циркулирующая кровь (особенно в микрососудах) начинает быстро свертываться в результате поступления в нее тромбопластических веществ из поврежденных тканей, эндотелия сосудов, при этом нарушается микроциркуляция в органах. На второй стадии синдрома ДВС наступает истощение всех компонентов свертывания, что сопровождается активацией фибринолиза и неконтролируемым кровотечением. Синдром ДВС наблюдается при тяжелых родах (отторжении плаценты), всех видах сепсиса (в особенности менингококкового и стафилококкового), многих вирусных заболеваниях, злокачественных новообразованиях, главным образом паренхиматозных органов.

Для выбора способа лечения первичного и вторичного фибринолиза необходимо их дифференцировать. С этой целью применяют определение в плазме крови больных содержания продуктов расщепления фибрина (фибриногена), растворимых комплексов фибрина в реакциях паракоагуляции протаминсульфатом и этанолом, а также уровня АТ III. Концентрация продуктов расщепления фибрина (фибриногена) повышается при обоих видах

фибринолиза, однако протаминсульфатный и этаноловый тест положителен при вторичном и отрицателен при первичном фибринолизе. Кроме того, содержание АТ III значительно снижается при синдроме ДВС, а при первичном фибринолизе находится в пределах нормы.

В терапии первичного фибринолиза успешно используют синтетические (ϵ -АКК, АМСА, парааминобензойную кислоту) и естественные ингибиторы протеиназ (трасилол и его аналоги). Выбор лечения синдрома ДВС зависит от его стадии. На первой стадии, когда активируется система свертывания, целесообразно капельное внутривенное введение небольших доз гепарина (10 000 ЕД ежедневно, несколько раз в день) в сочетании с реополиглюкином (150—600 мл). Назначают также небольшие дозы активаторов плазминогена — СК или урокиназу (100 000—250 000 ЕД). В связи с истощением факторов свертывания внутривенно вводят 200—300 мл нативной или замороженной плазмы крови (или концентрата АТ III). На второй стадии синдрома ДВС, когда активируется фибринолитическая система, назначают естественные ингибиторы протеиназ (трасилол или его аналоги).

Часто встречаются заболевания, сопровождающиеся ослаблением фибринолиза. К ним относятся инфаркт миокарда, сахарный диабет (Г. В. Андреев, 1982; I. Nilsson и соавт., 1980). Снижение фибринолитической активности крови обусловлено уменьшением содержания активаторов плазминогена и увеличением уровня ингибиторов. Лечение этих заболеваний проводят различными тромболитическими средствами (протеиназами, активаторами). Подробные сведения о лечебном применении фибринолитических препаратов обобщены в третьем разделе главы III.

ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ КИНИНОВОЙ СИСТЕМЫ КРОВИ

Среди различных протеолитических ферментов крови с ограниченным специфическим действием важную роль в физиологических и патологических процессах играют ферменты, осуществляющие образование и распад кининов. Последние являются вазоактивными низкомолекулярными пептидами, участвующими в регуляции сосудистого тонуса, процессах микроциркуляции, воспалительных и аллергических реакциях (К. Н. Веремеенко, 1977). Концентрация отдельных компонентов кининовой системы в плазме крови незначительна — 0,03—0,2 г/л (Г. С. Пасхина, 1980).

Наибольшее значение в образовании кининов при физиологических условиях принадлежит протеолитическому ферменту калликреину (КФ 3.4.21.8). Он находится в плазме крови в виде

неактивного предшественника прекалликреина. Превращение последнего в активную протеиназу калликреин — сложный протеолитический процесс, осуществляющийся в каскадном механизме и требующий участия нескольких белков. Среди них центральное место занимает ФХ, который продуцируется печенью и выделяется в кровь в виде неактивного белка.

В физиологических условиях ФХ активируется двумя путями: контактным и ферментативным. Активация неактивного предшественника ФХ в организме может происходить на поверхности эндотелия сосудов и коллагена, а *in vitro* — в присутствии каолина, стекла и других чужеродных поверхностей. Поэтому она получила название «контактной активации» (D. Ogston, V. Bennet, 1978). Механизмы этого процесса мало изучены. Согласно одной гипотезе, для активации ФХ имеет значение отрицательный заряд активирующей поверхности: *in vitro* — это отрицательно заряженные поверхности частиц кремнезема, а *in vivo* — карбоксильные анионы поверхности коллагена (D. Ogston, V. Bennet, 1978; G. Mugaño, 1978). Предполагают, что активация ФХ обусловлена взаимодействием положительно заряженных белковых молекул неактивного белка с отрицательно заряженными частицами чужеродной поверхности (S. Revak, C. Cochrane, 1976). Однако это предположение недостаточно подтверждено экспериментальными данными. В лаборатории биохимии Киевского НИИ отоларингологии им. А. И. Колумийченко МЗ УССР установлены факты, не согласующиеся с этим представлением. При изучении контактной активации системы ФХ — прекалликреин отмечено, что гидрофильные органические кремнеземы — аэросилы с отрицательно (карбоксиаэросилы) и положительно (аминоэтоксиаэросилы) заряженными частицами в одинаковой степени способствуют активации ФХ в цельной плазме человека. Это свидетельствует о том, что заряд поверхности частиц кремнезема не имеет существенного значения в процессе контактной активации ФХ, предшествующей преобразованию прекалликреина в калликреин (К. Н. Веремеенко и соавт., 1983). Эти данные косвенно подтверждает тот факт, что молекула ФХ, изоэлектрическая точка которой находится при рН 6,3 (J. Griffin, C. Cochrane, 1976), при активации ФХ аэросилами в слабощелочной среде должна иметь отрицательный заряд. Мы полагаем, что в реакциях взаимодействия ФХ с поверхностью первостепенную роль играют не ионные, а водородные связи, образованные имидазольными группами гистидина с соответствующими поверхностными группами, т. е. в основе контактной активации лежит взаимодействие полярных гидрофильных групп. Гидрофобные аэросилы не оказывают активирующего действия (Н. Ф. Мегедь и соавт., 1976).

ФХ при контакте с чужеродной поверхностью (каолином, коллагеном) обладает минимальной способностью активировать пре-

калликреин. Она резко повышается в присутствии так называемых регуляторных белков, входящих в состав кининовой системы, — ВМК и прекалликреина (М. Gordon и соавт., 1980). ВМК — это белковый предшественник физиологически активных полипептидов кининов. Содержание его в плазме крови составляет 0,07—0,09 г/л (С. Cochrane, J. Griffin, 1982). Нативная молекула ВМК млекопитающих представляет собой одноцепочечный гликопротеин (Т. Nakagasu, S. Nagasawa, 1979). Брадикинин образуется в результате ограниченного протеолиза калликреином плазмы внутренних пептидных связей в ВМК. После вычленения брадикинина кининоген представляет собой скрепленную дисульфидной связью двухцепочечную белковую молекулу. Из N-концевой части ВМК образуется тяжелая цепь, а из С-концевой — легкая (S. Iwagaya и соавт., 1979). Под действием плазменного калликреина от ВМК почти одновременно с брадикинином отщепляется еще один фрагмент (фрагмент 1—2), который при дальнейшем гидролизе дает пептидные фрагменты 1 и 2. Фрагмент 1 — гликопептид с молекулярной массой 8000 дальтон. Фрагмент 2 (молекулярная масса 4600 дальтон), состоящий на 25 % из аминокислотных остатков гистидина, получил название «гистидин-богатого» пептида. В процессе контактной активации он обуславливает фиксацию ФХ на активирующей поверхности (Т. Sugo и соавт., 1980). При этом молекула ФХ становится в 500 раз более чувствительной к протеолитическому расщеплению калликреином. В нековалентном комплексе с ВМК находится и прекалликреин, из которого под действием активной формы ФХ образуется калликреин. Активность комплексно связанного фермента подавляется ингибиторами калликреина в значительно меньшей степени, чем свободного, т. е. ВМК предохраняет молекулу калликреина от воздействия С1И и α_2 -М (М. Schariga и соавт., 1982). В настоящее время доказано, что С1И и α_2 -М являются основными ингибиторами калликреина в плазме крови.

Основной путь активации ФХ протекает по типу ограниченного протеолиза с участием калликреина. Фрагментация ФХ под действием калликреина происходит в несколько стадий. При разрыве специфической внутренней пептидной связи Арг-Вал в цепи молекулы нативного ФХ (первичное расщепление) образуется его активная форма α -ФХа, которая представляет собой двухцепочечный энзим, состоящий из тяжелой (молекулярная масса 52 000 дальтон) и легкой (молекулярная масса 28 000—30 000 дальтон) цепей. В тяжелой цепи (N-терминальный участок молекулы ФХ) находится пептидный участок (молекулярная масса 12 000 дальтон), обеспечивающий связь с чужеродной поверхностью при поверхностнозависимой активации ФХ. Легкая цепь, образующаяся из С-концевой части молекулы фактора, содержит активный центр, включающий серин и аспарагиновую кислоту. Таким образом,

α -ФХа отличается от исходной молекулы ФХ только конформацией (З. Ф. Федорова и соавт., 1981). Дальнейшее расщепление пептидной связи вне дисульфидного мостика сопровождается образованием из С-концевого участка молекулы ФХ низкомолекулярного фрагмента (молекулярная масса 28 000 дальтон). Он представляет собой протеолитический фермент и обозначается как β -ФХа. Обе активные формы ФХ превращают прекалликреин в калликреин в реакции ограниченного протеолиза, однако основным активатором прекалликреина является β -ФХа (С. Cochrane, J. Griffin, 1982). Последний, диффундируя в жидкую среду, расщепляет около 80 % прекалликреина в кровяном русле и 20 % этого зимогена, связанного с поверхностью (S. Revak, С. Cochrane, 1976). α -ФХа, оставаясь связанным с поверхностью, осуществляет контактную фазу превращения плазменного прекалликреина в калликреин. Поэтому во время контактной активации процессы образования кининов, катализируемые калликреинами, могут происходить под действием α -ФХа и β -ФХа на поверхности и в сосудистом русле.

Имеются сообщения об аутоактивации ФХ, т. е. о его превращении в ФХа без участия калликреина и других протеолитических ферментов (G. Tansi и соавт., 1983). В процессе активирования ФХ его активной формой образуются иные фрагменты, чем при активации калликреином (J. Dupp, A. Kaplan, 1982). О механизме появления ФХ в форме ФХа при связывании с поверхностью высказано предположение, что сам ФХ является «активным зимогеном», способным расщеплять только те молекулы ФХ, которые связаны с поверхностью (С. Cochrane, 1982). Образующийся ФХа может затем активировать нативный ФХ в цельной плазме крови и выделенный из нее при связывании с иницирующей поверхностью (G. Tansi и соавт., 1983). Активные формы ФХа катализируют в реакциях ограниченного протеолиза преобразование прекалликреина в калликреин.

Калликреины крови получены в очищенном виде из плазмы или сыворотки крови различных животных. Прекалликреины у млекопитающих синтезируются в печени и являются гликопротеинами с молекулярной массой 80 000—100 000 дальтон. Аминокислотный состав молекулы прекалликреина человека и ряда животных (кролика, гвинейской свинки, крысы и др.) сходен. Содержание прекалликреина в плазме крови человека в среднем равняется 0,02 г/л (B. Alving и соавт., 1983). Активация прекалликреина осуществляется активной формой ФХ (в особенности β -ФХа) в реакции ограниченного протеолиза (B. Alving и соавт., 1983). Имеются данные о том, что характер и уровень активации профермента у различных животных и человека неодинаковы (Н. Ф. Мегедь и соавт., 1976). Кинетика хода активации профермента во времени у человека сходна с таковой лишь у крыс. Актив-

вазия прекалликреина не обнаружена в плазме цыплят, что объясняется отсутствием в крови птиц ФХ, а также низким содержанием в ней ВМК, который необходим для контактной активации плазменного прекалликреина. Полученные данные свидетельствуют о видовых отличиях прекалликреин-калликреиновой системы, сложившихся в процессе эволюционного развития.

М. Webster и соавторы (1979) сообщили о новом активаторе прекалликреина (молекулярная масса 70 000 дальтон), названном бразильским фактором. Подобно ФХ он адсорбируется целитом и наиболее быстро активирует прекалликреин в присутствии чужеродных частиц.

При активации одноцепочечный прекалликреин превращается в двухцепочечный калликреин благодаря расщеплению в предшественнике пептидной связи Арг-Илей. Образовавшийся фермент состоит из двух дисульфидносвязанных цепей — тяжелой (молекулярная масса 43 000 дальтон) и легкой (молекулярная масса 33 000—36 000 дальтон). Активный центр с сериновым остатком локализован в легкой цепи (Т. С. Пасхина, 1980). В функцию тяжелой цепи, по-видимому, входит связывание с ВМК (F. Vander Graaf и соавт., 1982). Изучена вторичная структура калликреина: в его молекуле практически не наблюдаются α -спиральные участки, на основании чего сделан вывод о том, что α -спирали не играют существенной роли в формировании пространственной структуры молекулы фермента (Г. Я. Яровая, 1981).

Как указывалось выше, главная функция калликреина заключается в вычленении кининов из ВМК. Плазменные калликреины играют также решающую роль в энзиматической активации ФХ, который является ведущим фактором системы свертывания крови. Имеются данные об участии калликреинов в активации проренина, превращении проинсулина в инсулин, связи их с клеточной пролиферацией и системой простагландинов (Т. С. Пасхина, 1980; Л. С. Лобарева, В. М. Степанов, 1983; W. Rumpf и соавт., 1980).

Основное физиологически активное вещество калликреин-кининовой системы плазмы крови — брадикинин — представляет собой девятичленный пептид. Концентрация его в крови ничтожно мала: около $2 \cdot 10^{-8}$ г/л. Биологическое действие брадикинина заключается в снижении артериального давления, повышении проницаемости сосудов, сокращении гладкой мускулатуры, болевом синдроме, изменении микроциркуляции. Указанные свойства дают основание считать брадикинин одним из медиаторов воспаления и предположить его участие в развитии многих патологических состояний (К. Н. Веремеенко, 1977). Брадикинин увеличивает синтез простагландинов, в наибольшей мере — $F_2\alpha$, изменяет поглощение клетками или секрецию ими K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , повышает биоэлектрическую активность волокон гладкой мускулатуры, регулирует подвижность мужских половых клеток, участвует

в метаболизме глюкозы, влияет на скорость синтеза различных полипептидов и белков, особенно коллагена (Т. С. Пасхина, 1980).

Инактивация брадикинина осуществляется в организме специфическими протеолитическими ферментами, гидролизующими в его молекуле определенные пептидные связи. Эти ферменты, называемые кининазами, обнаружены в жидкой части крови, ее форменных элементах, тканях. Скорость гидролиза брадикинина кининазами очень высока: период его полураспада в крови человека равен 30 с (G. Haberland, 1980).

В плазме крови присутствуют 2 кининазы — аргинин-карбоксипептидаза (кининаза I, КФ 3.4.12.7) и пептидилдипептидаза (этот фермент называют еще карбоксикапепсином, ангиотензин-I-превращающим ферментом, кининазой II, КФ 3.4.15.1). Кининаза I — специфический протеолитический фермент, отщепляющий от брадикинина С-концевой аргинин, что сопровождается потерей биологической активности пептида. Наряду с этим она инактивирует также анафилатоксины С3а и С5а. Кининаза I находится в плазме крови в активной форме, природные ее ингибиторы не обнаружены (Т. С. Пасхина, 1980). Кининаза II расщепляет в молекуле брадикинина связь между пролином и фенилаланином в положении 7—8, высвобождая дипептид Фен-Арг от С-концевой части полипептидной цепи. Как и кининаза I, она обнаруживается в тканях организма только в активной форме; относится к металлоферментам. Кининаза II связана с мембранами клеток, локализована преимущественно в эндотелии сосудов и слизистой оболочке легких. Брадикинин в легких разрушается только этим ферментом. Кининаза II играет также ключевую роль в превращении ангиотензина I в ангиотензин II (Т. С. Пасхина, 1980).

Таким образом, кининазы являются важнейшей группой протеолитических ферментов, которые наряду с ингибиторами калликреинов (СII и α_2 -M) осуществляют физиологический контроль уровня кининов в организме.

Функция калликреин-кининовой системы нарушается при ряде патологических состояний. Исследование содержания в плазме крови контактного прекалликреина в динамике экспериментального острого панкреатита показало, что в течение первых 3 дней заболевания наблюдается выраженное снижение этого показателя, вызванное, по-видимому, эндогенной активацией профермента, сопровождающейся нарастанием активности калликреина и повышенным образованием вазоактивных пептидов кининов (Н. В. Беляков и соавт., 1976; Н. С. Мищенко, Н. Ф. Погорелая, 1980).

При остром инфаркте миокарда обнаруживается резкая активация кининовой системы, сопровождающаяся повышением уровня кининов, увеличением активности калликреинов и снижением

концентрации кининогена (Л. Т. Малая и соавт., 1973). Особенно сильно выражены эти изменения при крупноочаговых инфарктах миокарда. Активирование кининовой системы наблюдается также при ожоговых травмах. Наименьшие уровни прекалликреина, кининогена и кининазы I отмечались в период шока. Изменения содержания компонентов кининовой системы и ингибиторов протеолиза, способствующие активации прекалликреинов и образованию кининов, выявлялись при нефротическом синдроме в крови, интерстициальной жидкости, абдоминальных и плевральных экссудатах (Т. С. Пасхина, 1980).

Большую ценность представляет изучение протеолитических ферментов и их ингибиторов, участвующих в функционировании кининовой системы, при заболеваниях печени у взрослых и детей (С. А. Крамарев, 1980; А. М. Голубенко, 1982). Установлено, что вирусный гепатит сопровождается снижением в крови уровня прекалликреина и ингибиторов калликреина, степень которого зависит от тяжести болезни. При затяжных и хронических формах вирусного гепатита отсутствие нормализации этих показателей указывает на продолжающийся процесс в печени. Содержание исследуемых компонентов кининовой системы не изменяется при холецистохолангитах и гемолитических анемиях, что можно использовать для дифференциации вирусного гепатита и этих заболеваний. Уровень прекалликреина и ингибитора калликреина более выражено уменьшается при циррозе печени, чем при механической желтухе и вирусном гепатите (Н. Ф. Погорелая, 1985). Диагностическое значение исследования компонентов калликреин-кининовой системы подробно освещено в ряде монографий и обзорных статей (А. А. Дзизинский, О. А. Гомазков, 1976; К. Н. Веременко, 1977; Т. С. Пасхина, 1982).

Описаны случаи наследственной недостаточности ряда компонентов калликреин-кининовой системы, сопровождающейся нарушением процессов кининогенеза. Известны генетически обусловленный дефицит протеолитического фермента кининазы I с более чем четырехкратным увеличением содержания кининов в плазме крови и случаи наследственной недостаточности ВМК (Т. С. Пасхина, 1980). Ведется поиск низкомолекулярных синтетических ингибиторов калликреина, которые могли бы использоваться в медицинских целях при патологических состояниях, характеризующихся активацией кининовой системы, а также в научных исследованиях (Т. С. Пасхина, 1980).

РОЛЬ ПРОТЕОЛИЗА В АКТИВАЦИИ КОМПЛЕМЕНТА

Реакции ограниченного протеолиза участвуют в активации системы комплемента. Термином «комплемент» обозначается многокомпонентная система белков, которые в определенных случаях

преобразуются в активный протеолитический комплекс с многообразными физиологическими свойствами, такими, как освобождение организма от микробов и чужеродных клеток, инактивация вирусов, активация фагоцитоза, образование биологически активных веществ (биогенных аминов, анафилатоксинов) и др. Как и другие протеолитические системы крови, система комплемента активируется в каскадном механизме, причем ее отдельные компоненты приобретают способность к активации после присоединения к определенной поверхности. Эта система включает 19 плазменных белков, которые образуют 9 компонентов, реагирующих друг с другом в определенной последовательности с формированием высокоспецифических протеиназ, входящих в состав многокомпонентного белкового комплекса. Отдельные компоненты циркулируют в крови в виде предшественников, не способных соединяться со свободными антигенами или антителами. Многие из этих компонентов в процессе активации расщепляются на субкомпоненты, которым присуща основная биологическая активность комплемента.

Компоненты системы комплемента являются высокомолекулярными белками, входящими в состав α -, β - и γ -глобулинов, и составляют около 5—10 % от всех белков плазмы крови (Н. А. Константинова и соавт., 1980; Н. И. Бахов, В. М. Земсков, 1982).

С 1969 г. комплемент обозначают прописной латинской буквой С, а его компоненты номером согласно порядка их активации: С1, С4, С2, С3... С9. Исключение составляет компонент С4, занимающий место перед компонентом С2, что связано с историей его открытия. Активный компонент комплемента, обладающий протеолитической активностью, обозначают штрихом над цифрой, например, С1'. Фрагменты, образующиеся после расщепления компонентов комплемента, обозначают строчной латинской буквой, идущей после цифры: С3а, С3б и т. д. (К. П. Кашкин, В. Г. Кубась, 1981).

Известны два пути запуска системы комплемента. Первый из них, названный классическим, начинается со взаимодействия комплемента с комплексом антиген — антитело. Второй путь — альтернативный (обходной) — представляет собой немедленное взаимодействие комплемента непосредственно с антигеном с исключением медленной стадии формирования антител. К настоящему времени выделены и охарактеризованы различные компоненты комплемента и установлены пути их активации (Э. П. Ченчикова, 1978; К. П. Кашкин, В. Г. Кубась, 1981; Н. И. Бахов, В. М. Земсков, 1982; С. Г. Осипов, В. Н. Титов, 1984).

Классический путь активации. Запуск каскада активации системы комплемента по классическому пути (рис. 8) происходит при взаимодействии первого компонента комплемента С1 (молекулярная масса около 900 000 дальтон, концентрация в плазме

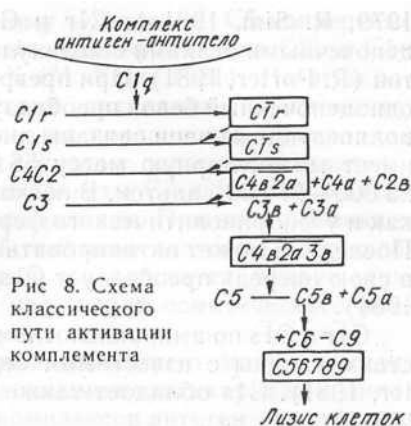
300—400 мг/л) с иммуноглобулинами, находящимися в иммунном комплексе антиген — антитело (Э. П. Ченчикова, 1978; A. Laurell, 1979). C1 впервые идентифицирован как единый функциональный комплекс системы комплемента A. Ferrata в 1907 г. (R. Sim, 1981). Позднее обнаружили, что он состоит из трех субкомпонентов — C1q, C1r и C1s, образующих комплекс в присутствии Ca^{2+} (R. Porter, 1981). В сыворотке крови этот комплекс составляют, находясь в неактивной форме,

1 молекула C1q и по 2 молекулы C1r и C1s (R. Sim, 1981). Вырабатывается C1 моноцитами-макрофагами (Д. Н. Маянский, 1982). Первый компонент комплемента выделен в очищенном виде. Большинство известных методов позволяют получить его активную форму; имеются также способы выделения C1 в неактивированном виде (R. Medicus, R. Chapius, 1980).

Началом активации C1 является связывание субкомпонента C1q (концентрация в сыворотке 150 мг/л) с двумя Fc-участками 1 молекулы IgM или 2 молекулами IgG. Субкомпонент первого компонента комплемента C1q представляет собой узнающий и связывающий коллагеноподобный белок, не обладающий ферментативной активностью (Н. И. Бахов, В. М. Земсков, 1982; R. Porter, 1981). Далее к C1q присоединяется второй субкомпонент C1r (концентрация в сыворотке 100 мг/л). Это нековалентное взаимодействие приводит к конформационному изменению C1r с высвобождением в нем активного центра еще до расщепления пептидной связи и превращению ее в C1r'; последний в свою очередь катализирует протеолитическое преобразование C1r или C1r' в C1r, активный протеолитический фермент (R. Porter, 1981; R. Sim, 1981).

Аминокислотный состав C1r идентичен аминокислотному составу C1r. Одни авторы полагают, что активация C1r сопровождается уменьшением его молекулярной массы, другие считают, что в процессе активации изменяется лишь электрофоретическая подвижность компонента (Э. П. Ченчикова, 1978).

C1r активизирует третий субкомпонент первого компонента комплемента C1s (концентрация в сыворотке крови 120 мг/л), превращая его в активную протеиназу C1s. В основе этого превращения лежит ограниченный протеолиз единственной пептидной связи Arg-Илей без высвобождения какого-либо фрагмента (A. Laurell,



1979; R. Sim, 1981a). C1 \bar{r} и C1s являются зимогенами — одноцепочечными белками с молекулярной массой 83 000—85 000 дальтон (R. Porter, 1981). При превращении их в активные протеиназы одноцепочечный белок преобразуется в двухцепочечный, в котором полипептидные цепи связаны дисульфидной связью. Тяжелая цепь имеет молекулярную массу 56 000—60 000 дальтон, а легкая — 25 000—27 000 дальтон. В легкой цепи находится активный центр, как и у фибринолитического фермента плазмина (R. Porter, 1981). Последний может активировать C1, превращая C1 \bar{r} в C1 \bar{r} , который в свою очередь преобразует C1s в C1s (С. Г. Осипов, В. И. Титов, 1984).

C1 \bar{r} и C1 \bar{s} по аминокислотному составу и ферментативным свойствам сходны с известными сериновыми протеиназами (R. Porter, 1981). C1 \bar{s} обладает также эстеразной активностью (R. Sim, 1981a).

Функция C1 \bar{s} заключается в действии на четвертый (C4) и второй (C2) компоненты комплемента, по отношению к которым он проявляет эстеролитическую и протеолитическую активность (R. Sim, 1981). В компоненте C4 C1 \bar{s} расщепляет единственную Арг-Ала пептидную связь в последовательности аминокислот Лей-Гли-Арг-Ала-Лей-Глу (R. Sim, 1981a). При этом образуются 2 фрагмента — главный C4b и малый — C4a (Н. И. Бахов, В. М. Земсков, 1982). Фрагмент C4a способствует высвобождению из мастоцитов и базофилов серотонина. C2 (20—40 мг/л сыворотки) расщепляется под действием C1 \bar{s} также на главный фрагмент C2a (молекулярная масса 74 000 дальтон) и малый фрагмент C2b, обладающий кининоподобной активностью (Н. А. Константинова, Э. П. Ченчикова, 1981; М. Кегг, 1981). Расщепление C2 под действием C1 \bar{s} осуществляется по связи Арг-Илей или Лиз-Илей (М. Кегг, 1981). Фрагмент C2a представляет собой сериновую протеназу. Он проявляет эстеразную активность по отношению к определенным эфирам аргинина или лизина, в основном к N-ацетил-глицил-лизин-метиловому эфиру (М. Кегг, 1981; R. Porter, 1981).

Фрагмент C2a сам по себе не вызывает последующую активацию белков комплемента. Он приобретает способность к этому при взаимодействии с фрагментом C4b и мембраной клетки. Образующийся комплекс (C4b2a), обладающий протеолитической активностью, получил название C3-конвертазы классического пути. Она является ферментом, расщепляющим C3 (при этом гидролизует одна пептидная связь Арг-Сер) на главный фрагмент C3b и малый C3a (анафилатоксин I), обладающий хемотаксическими и анафилатоксическими свойствами (Н. И. Бахов, В. М. Земсков, 1982; М. Кегг, 1981). Фрагмент C3b присоединяется к C3-конвертазе и превращает последнюю в протеолитический фермент C5-конвертазу (C4b2a3b). Кроме того, он формирует центры присоединения

к мембране клетки или к иммунному комплексу. С5-конвертаза взаимодействует с С5, расщепляя его на 2 фрагмента С5b и С5a (анафилатоксин II) по связи Арг-Х (М. Кегг, 1981). На этом завершаются протеолитические стадии активации комплемента. Главный фрагмент С5b фиксируется на поверхности чужеродной клетки и образует комплекс с С6, к которому далее последовательно присоединяются плазменные компоненты С7, С8 и С9. Компоненты С6—С9 соединяются без расщепления. При этом возникает цитолитический комплекс, который, вызывая очаговые повреждения структуры клеточных мембран, способствует разрушению бактериальных клеток вследствие нарушения осмотического равновесия.

Альтернативный путь активации. Комплемент может активироваться непосредственно бактериальными полисахаридами, липополисахаридами и при отсутствии комплексов антиген — антитело. При этом первые факторы классического механизма С1, С4 и С2 роли не играют (А. Laugell, 1979). Альтернативный путь совпадает с классическим на стадии превращения С3 под действием С3-конвертазы этого пути. В образовании С3-конвертазы участвуют два протеолитических фермента — факторы D и В.

Фактор D представляет собой сериновую протеиназу трипсинового типа с узкой специфичностью действия (Л. В. Козлов, Л. С. Соляков, 1982; М. Кегг, 1981). Некоторые исследователи считают, что он находится в сыворотке крови только в виде активного фермента (R. Porter, 1981). В последнее время получены данные о существовании зимогенной формы этого фактора. Фактор D является низкомолекулярным белком с молекулярной массой 24 000 дальтон и присутствует в сыворотке крови в небольших концентрациях (1—1,5 мг/л). Он устойчив к действию ингибиторов протеиназ, содержащихся в плазме. Из синтетических субстратов этот фермент гидролизует только N-бензонил-илей-глю-гли-арг-п-нитроанилид.

Фактор D активирует фактор В протеолитическим расщеплением его на два фрагмента: Вb (активный фермент) и Va. Он активирует фактор В только в присутствии С3b и Mg^{2+} (R. Porter, 1981). С3b служит для связывания с поверхностью. При активации в молекуле профермента расщепляется связь Арг-Илей или Лиз-Илей (М. Кегг, 1981). Содержание фактора В в сыворотке крови составляет 280 мг/л; он является гликопротеином с молекулярной массой 90 000 дальтон.

Имеются указания на сходство аминокислотного состава фактора В с таковым фактора С2 классического пути активации системы комплемента (М. Кегг, 1981). Ферментативно активный фрагмент Вb представляет собой сериновую протеиназу нового класса с молекулярной массой 60 000 дальтон (R. Sim, 1981; R. Porter, 1981). Из синтетических субстратов он гидролизует N-ацетил-глицил-лизин-метиловый эфир.

Фрагмент $B\bar{b}$, образующийся при расщеплении фактора В фактором D, комплексируется с C3b с образованием $C3bB\bar{b}$ — C3-конвертазы альтернативного пути, которая, как и отличающаяся от нее по составу C3-конвертаза классического пути, приступает к расщеплению третьего компонента комплемента C3. Фрагмент $B\bar{b}$ сам не активирует C3 и C5 (R. Porter, 1981). Механизм образования C3b, требующегося для запуска альтернативного пути, неясен (A. Laurell, 1979). В данном случае, как видно, фрагмент C3b, продукт действия конвертазы альтернативного пути, представляет собой в то же время неотъемлемый компонент самого фермента. Ферментативно активный фрагмент $B\bar{b}$ может образоваться также при действии трипсина на свободный фактор В.

Действие системы комплемента регулируется либо специфическими белками плазмы — ингибиторами протеиназ, которые связывают ферменты, либо протеолитическими ферментами, вызывающими расщепление отдельных компонентов до пептидов, не обладающих биологической активностью. Наиболее изучен C1И, который в иммунном комплексе подавляет активность C1г и C1s. Исследования показали, что этот ингибитор быстро реагирует с C1s и более медленно — с C1г (R. Sim, A. Reboul, 1981).

Из других ингибиторов заслуживает внимание C3а-инактиватор, или анафилатоксин-инактиватор, который блокирует действие фрагмента C3а. Фрагменты C3а и C5а, как известно, являются анафилатоксинами, способными усиливать сосудистую проницаемость, стимулировать высвобождение гистамина из тканевых базофилов, сокращать гладкую мускулатуру, вызывать хемотаксис нейтрофильных гранулоцитов (A. Laurell, 1979). C3а-инактиватор выделяется клетками эндотелия сосудов и является металлопротеиновым ферментом, пока недостаточно изученным (Н. И. Бахов, В. М. Земсков, 1982). Анафилатоксин C5а инактивируется специфической пептидазой, сходной с карбоксипептидазой В, которая отщепляет С-концевой аргинин, после чего биологическая активность пептида C5а теряется (К. П. Кашкин, В. Г. Кубась, 1981; A. Laurell, 1979).

C3b-инактиватор (концентрация в сыворотке 20 мг/л), являясь, как полагают, сериновой протеиназой, расщепляет одну пептидную связь в α' -цепи C3b в присутствии усиливающего его действие В1Н-глобулина. При этом в жидкой среде из C3b образуются 2 фрагмента — C3c и C3d. При гидролизе C3b, фиксированного на клетке, также выделяются эти фрагменты, только C3c остается связанным с мембраной, а C3d уходит в межклеточную жидкость. Физиологическое значение этих фрагментов не изучено. (Э. П. Ченчикова, 1982; R. Porter, 1981). C3b-инактиватор расщепляет также 2 пептидные связи в α' -цепи C4b при наличии связывающего его белка.

В сыворотке крови обнаружен C567-ингибитор, который предупреждает реактивный лизис эритроцитов под действием комплекса C567. Фенотипически реактивный лизис несенсибилизированных эритроцитов проявляется пароксизмальной ночной гемоглобинурией (Э. П. Ченчикова, 1978).

Таким образом, система комплемента — важнейший фактор естественного иммунитета. Она представляет каскад протеолитических реакций, в котором активация каждого компонента комплемента осуществляется с помощью реакций ограниченного протеолиза. Отличительная особенность протеиназ системы комплемента — их способность эффективно функционировать только в комплексе с другими белками, в котором они могут быть защищены от инактивирующего действия ингибиторов протеолитических ферментов.

Общая концентрация комплемента в крови обычно определяется по его гемолитической активности в отношении эритроцитов барана, сенсибилизированных кроличьим гемолизином. В последние годы широко применяются методы с использованием антисывороток к гомогенным компонентам комплемента.

В настоящее время известно, что ряд заболеваний является результатом генетических нарушений в системе комплемента. Описаны случаи генетически обусловленной недостаточности некоторых компонентов этой системы. Показано, что в основном дефицит компонентов комплемента передается по аутосомно-рецессивному типу (А. Уорд, Дж. Уичер, 1981). Дефицит компонентов, участвующих в ранних этапах активации классического пути — C1, C4 и C2, вызывает заболевания типа системной красной волчанки. Недостаточность компонентов C5—C9 сопровождается рецидивирующими инфекциями, названными нейссериями. Основная хемотаксическая активность в отношении нейтрофильных гранулоцитов в цельной сыворотке обеспечивается комплексом C567, главная роль в котором принадлежит фрагменту C5b. При дефиците его лейкоциты в очаг воспаления практически не поступают. Некоторые сведения о клинических признаках недостаточности основных компонентов комплемента представлены в обзорной статье К. П. Кашкина, В. Г. Кубаса (1981).

Наследственный дефицит C1И — наиболее часто встречающаяся недостаточность в этой системе и вследствие этого наиболее изученная (А. Laugell, 1979; М. Кегг, 1981). Этот генетический дефект проявляется заболеванием, получившим название ангионевротического отека, которое в отличие от большинства генетических нарушений системы комплемента передается по аутосомно-доминантному типу. Причиной возникновения отека считают повышенное образование кининоподобного фрагмента C2b в результате ослабления контроля данным ингибитором действия C1s на C2. Этот фрагмент в отличие от C3a и C5a увеличивает про-

ницаемость сосудов без предварительного высвобождения гистамина. Кроме того, отсутствие СТИ способствует повышению активности калликреина, катализирующего образование вазоактивных кининов. Исходя из вышесказанного, определение активности СТИ в сыворотке или плазме крови имеет значение для диагностики наследственного ангионевротического отека. Содержание ингибитора определяется по степени торможения сывороткой крови активности СІs-протеиназы. В качестве субстратов используют N-замещенные эфиры аргинина или лизина. Показано, что в сыворотке крови здоровых людей содержится в 10 раз больше СТИ, чем у больных. Для лечения ангионевротического отека используют ингибиторы протеолитических ферментов — ϵ -аминокапроновую и транэксамовую кислоты (К. П. Кашкин, В. Г. Кубась, 1981).

Описан также дефицит ингибитора С3b компонента комплемента, приводящий к увеличению количества свободного С3b и недостаточности С3. В основе последней лежит способность С3-конвертазы расщеплять этот компонент протеолитическим способом. При дефиците данного ингибитора отмечаются также уменьшение содержания фактора В и отсутствие фактора D, которые участвуют в неспецифической устойчивости к инфекциям, обусловленной альтернативным путем активации комплемента. У больных с наследственной недостаточностью С3b-ингибитора постоянно наблюдаются инфекции гнойной этиологии и кожный зуд, по-видимому, обусловленный высвобождением гистамина, выделяющегося под действием повышенных количеств С3а. В настоящее время не имеется лекарственных препаратов, содержащих этот ингибитор (К. П. Кашкин, В. Г. Кубась, 1981; А. Уорд, Дж. Уичер, 1981).

Недостаточность компонентов комплемента и их ингибиторов может быть также приобретенной (вторичной). Дефицит компонентов комплемента обнаруживается при аллергических состояниях, инфаркте миокарда, гломерулонефрите, коллагенозах и других заболеваниях (Н. И. Бахов, В. М. Земсков, 1982). При болезнях печени (циррозе, гепатите) снижается общее содержание комплемента в результате уменьшения синтеза компонентов С3, С6, С9. Значительно уменьшается общая комплементарная активность и активность индивидуальных компонентов комплемента при ожоговой болезни, особенно выражено — перед летальным исходом. Так, общая комплементарная активность за 1—3 дня до смерти составляла 6—12 % от нормы (Т. В. Голосова и соавт., 1985). Определение количественного содержания компонентов комплемента в динамике патологического процесса позволяет оценить иммунологическое состояние организма, может иметь прогностическое значение и служить объективным критерием эффективности терапии.

ПРОТЕИНАЗЫ РЕНИН-АНГИОТЕНЗИНОВОЙ СИСТЕМЫ

Ренин-ангиотензиновая система является наиболее важной гуморальной протеолитической системой, участвующей в регуляции артериального давления. Ее конечный биологически активный продукт — октапептид ангиотензин II представляет собой самое мощное из известных сосудосуживающих веществ. По силе вазоконстрикторного эффекта он значительно превосходит норадреналин. Ренин-ангиотензиновая система представлена двумя группами протеиназ — образующими и инактивирующими ангиотензин II.

Ферментом, запускающим процесс образования ангиотензина II, является ренин (КФ 3.4.99.19). Эта специфическая протеиназа, поступающая в кровь из почек, вычлениет из белка α_2 -глобулиновой фракции ангиотензиногена декапептид ангиотензин I (Н-Асп-Арг-Вал-Тир-Илей-Гис-Про-Фен-Гис-Лей-ОН), не обладающий биологической активностью. Превращение ангиотензина I в ангиотензин II осуществляется другим протеолитическим ферментом — пептидилдипептидазой. Ренин впервые был идентифицирован в экстрактах из тканей почек как вещество, обладающее вазопрессорными свойствами. Однако его энзиматическая природа была охарактеризована значительно позже, так как долгое время не было достаточно очищенных стабильных препаратов этого фермента и только развитие аффинной хроматографии позволило их получить. Ренин обнаружен также в тканях мозга и подчелюстных желез, амниотической жидкости и плазме крови (M. Ondetti, D. Cushman, 1982)

Ренин расщепляет в ангиотензиногене или его N-концевом фрагменте только одну пептидную связь Лей-Лей (Лей-Вал у человека) между 10-м и 11-м аминокислотными остатками. При этом высвобождается N-концевой декапептид ангиотензин I (E. Slater, 1981). Показано, что ангиотензиноген человека расщепляется только ренином человека или приматов. В то же время ренин человека может оказывать действие на ангиотензиноген большинства видов млекопитающих.

Выделенные препараты ренина гетерогенны: они содержат несколько молекулярных форм фермента с различной молекулярной массой и неодинаковой энзиматической активностью — от неактивного предшественника проренина до высокоактивной низкомолекулярной формы. Наиболее активен низкомолекулярный ренин с молекулярной массой 40 000 дальтон. Форма ренина с молекулярной массой 60 000 дальтон имеет ферментативную активность в 2,5 раза меньше, чем таковая низкомолекулярного ренина. Высокомолекулярную форму ренина можно превратить в более активную низкомолекулярную. При этом отщепляется неактивный белок, получивший название ренинсвязывающего белка.

Взаимодействие его с низкомолекулярной формой ренина сопровождается образованием высокомолекулярной формы фермента. Этот процесс ускоряется в присутствии веществ, блокирующих SH-группы, что объясняют угнетением данными веществами тиоловых протеиназ, участвующих в превращении высокомолекулярных форм ренина в низкомолекулярные (M. Ondetti, D. Cushman, 1982). В экстрактах из почек крыс низкомолекулярная форма ренина связывается с компонентом цитозоля в присутствии Cu^{2+} (Sh. Morimoto и соавт., 1984). При этом образуется высокомолекулярная форма фермента, но его активность не изменяется при увеличении молекулярной массы под действием Cu^{2+} .

Высокомолекулярный ренин обладает значительной активностью и поэтому не может считаться зимогенной формой фермента.

Неактивные формы ренина обнаружены в тканях мозга и почек, а также в плазме крови. Неактивный предшественник ренина, выделенный из экстрактов почечной ткани, имеет молекулярную массу 43 000—53 000 и составляет только 15 % от общего содержания ренина. В плазме крови в неактивной форме находится около 80 % от общего количества фермента (E. Slater, 1981). Неактивная (латентная) форма ренина (молекулярная масса 48 000 дальтон) обнаружена в популяции интерстициальных эндокриноцитов из яичек крыс (K. Pandey и соавт., 1984). *In vitro* она не активируется трипсином, а превращается в активную форму с помощью веществ, содержащих SH-группу (2-меркаптоэтанол, цистеин и др.). Такая активная форма ренина по сравнению с латентной имеет более низкую молекулярную массу (39 000 дальтон) и в 5—10 раз более высокую ферментативную активность.

Плазменный проренин (молекулярная масса 56 000 дальтон) в очищенных системах может превращаться в активную форму под действием протеолитических ферментов. По данным одних авторов, эти ферменты превращают проренин в ренин с изменением молекулярной массы предшественника, по наблюдениям других, молекулярная масса при образовании активной формы ренина не изменяется (M. Ondetti, D. Cushman, 1982).

Механизм активации неактивного предшественника ренина изучен неполно. В большинстве работ при исследовании этого процесса использовали цельную плазму — сложную белковую систему, содержащую различные протеиназы и их ингибиторы. Активация проренина плазмы наблюдается при низкой температуре ($-4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Наиболее полной активации можно достичь диализом плазмы в кислой среде (примерно при pH 3). Полагают, что при этом разрушаются ингибиторы протеолиза, что приводит к активации сериновых протеиназ, которые путем ограниченного протеолиза превращают проренин в активную форму. Не исключено также, что в кислой среде происходит лишь модификация

проренина, который становится более чувствительным к протеолитическому действию протеиназ. Наряду с этим имеются данные о том, что обработка кислотой способствует диссоциации неактивного ренина на активный ренин и его ингибитор. Последний затем может гидролизоваться либо связываться другими протеиназами. Получены свидетельства того, что в физиологических условиях проренин может активироваться калликреином — главным ферментом кининовой системы (M. Ondetti, D. Cushman, 1982).

Аминокислотный состав ренина почек людей, собак, крыс и подчелюстных слюнных желез мышей сходен. Его молекула содержит около 350 аминокислотных остатков, связанных в одну полипептидную цепь, и 4 остатка цистеина на 1 моль белка.

Оптimum действия ренина на естественный субстрат находится в зоне рН, близкой к нейтральной (6—7,5). Согласно классификации ферментов, ренин относят к протеиназам с неизвестным механизмом катализа. Однако по ряду свойств он близок к кислым протеиназам. Активность ренина угнетается ингибитором кислых протеиназ и не тормозится ингибиторами сериновых, тиоловых или металлопротеиназ (M. Ondetti, D. Cushman, 1982). В составе активного центра ренина содержится по одному остатку аспарагиновой кислоты и тирозина, которые присущи также активным центрам других кислых протеиназ. Отличительной особенностью ренина является наличие в его активном центре остатка аргинина, который отсутствует в активном центре карбоксильных протеиназ.

Первыми методами определения активности ренина были биологические. Они основаны на его способности образовывать ангиотензин I, который далее превращается в ангиотензин II, обладающий свойством повышать артериальное давление. При этом активность фермента выражается в единицах Голдблатта (1 единица равняется количеству ренина, вызывающему увеличение артериального давления у собак на 30 мм рт. ст.) (E. Slater, 1981). В настоящее время более широко используются радиоиммунологические и флюорометрические методы определения активности ренина (M. Ondetti, D. Cushman, 1982). Флюорометрические методы основаны на том, что сначала ренин гидролизует специфические для него связи в октапептиде Z-Про-Фен-Гис-Лей-Лей-Вал-Тир-Сер-β-нафтиламиде, или тетрапептиде Лей-Вал-Тир-Сер-β-нафтиламиде, а затем аминопептидаза М отщепляет от продуктов гидролиза β-нафтиламид, обладающий флюоресцентными свойствами. Подобным образом определение активности ренина проводят и с использованием в качестве субстрата синтетического октапептида Арг-Про-Фен-Гис-Лей-Лей-Вал-Тир-7-амино-4-метил-кумарина. Только в этом случае от продуктов гидролиза его ренином флюороген 7-амино-4-метил-кумарин отщепляется под действием лейцин-аминопептидазы.

В физиологических условиях ренин высвобождается в кровяное русло из почек в ответ на различные физиологические стимулы (E. Slater, 1981). Фермент участвует в поддержании нормального сердечно-сосудистого гомеостаза, компенсаторной реакции при сердечной недостаточности, в патогенезе реноваскулярной гипертензии у человека.

Активность ренина контролируется рядом ингибиторов, которые разделяются на 4 группы: субстратные аналоги, антитела к ренину, пептиды типа пепстатина и фосфолипиды (E. Haber, 1983). Из субстратных аналогов наибольшую ингибирующую активность в отношении ренина *in vitro* проявляет синтетический нанопептид Про-Гис-Про-Фен-Гис-Фен-Фен-Вал-Тир. Этот ингибитор обладает видовой специфичностью: наиболее сильно он взаимодействует с ренином человека. Однако при внутривенном введении ингибитор быстро удаляется из тока крови и вследствие этого *in vivo* эффект его кратковременен. Был синтезирован его аналог — декапептид (путем присоединения на С-конце остатка лизина), который исчезает из системы кровообращения в 10 раз медленнее, чем нанопептид. На экспериментальной модели гипертензии у обезьян, вызванной ренином, показана способность этого декапептида снижать артериальное давление (M. Ondetti, D. Cushman, 1982).

Выделенный из фильтратов культур определенных видов *Streptomyces* ацил-пентапептидный компонент, названный пепстатином, угнетал пепсин и ренин (E. Haber, 1983). При экспериментальной гипертензии внутривенное введение пепстатина вызывало снижение артериального давления. Применение пепстатина в клинике затруднено в связи с его низкой растворимостью и кратким периодом полураспада в организме. Синтезированы более растворимые производные пепстатина — N-ацетил-пепстатин и пепстатин, содержащий на С-конце метиловый эфир аргинина. Однако они также быстро выводятся из организма.

Получение высокоочищенных гомогенных препаратов ренина способствовало использованию специфических к ренину антител в качестве ингибиторов фермента. Такие антитела угнетают активность ренина *in vitro*. Введение их в организм вызывает снижение артериального давления при экспериментальной острой почечной гипертензии (M. Ondetti, D. Cushman, 1982).

Образующийся в результате действия ренина на ангиотензиноген ангиотензин I подвергается дальнейшему расщеплению пептидилдипептидазой. Она широко распространена в организме и в наибольшем количестве содержится в легких и почках. В нашей стране пептидилдипептидаза впервые выделена из почек быка в 1963 г. Ю. Е. Елисеевой, В. Н. Ореховичем. Т. Stewart и соавторы (1982) получили 13 мг гомогенного препарата пептидилдипептидазы из 15,8 кг легочной ткани и 29 мг — из 5,8 кг ткани почек.

В связанной с мембранами форме она находится также в клетках эндотелия сосудов; эпителиальных клетках почечных канальцев и кишок. Фермент выявлен в некоторых участках мозга; предстательной железе, печени. В растворимой форме пептидилдипептидаза обнаружена в амниотической жидкости — среднее содержание 136 нг/мл (Т. Yasui и соавт., 1984). Плазма (сыворотка) крови человека в норме имеет низкую активность этого фермента (Т. Stewart и соавт., 1982).

Пептидилдипептидаза — это гликопротеин, содержащий 8—32 % углеводов, представленных маннозой, галактозой, N-ацетилглюкозаминном и фукозой (М. Ondetti, D. Cushman, 1982). Молекулы этого фермента из легких и почек человека представляют собой единственную полипептидную цепь с молекулярной массой 155 000 дальтон. Фермент из сыворотки крови человека также имеет молекулярную массу 140 000—155 000 дальтон. Изоэлектрическая точка пептидилдипептидазы из легких и почек находится при pH 5,1—5,3, а из сыворотки крови — при pH 4,7 (Т. Stewart и соавт., 1982). Высокий коэффициент экстинкции растворов фермента при длине волны 280 нм отражает значительное содержание в его молекуле триптофана и тирозина. Каталитически важными в его активном центре являются остатки аргинина, тирозина, лизина и глутаминовой или аспарагиновой кислот. Имеются данные о том, что пептидилдипептидаза содержит 1 грамм-атом Zn в 1 моль (Р. Büning и соавт., 1979).

Пептидилдипептидаза является экзопептидазой. Она отщепляет в реакции ограниченного протеолиза от С-конца молекулы ангиотензина I дипептид Гис-Лей, при этом образуется ангиотензин II (Н-Асп-Арг-Вал-Тир-Илей-Гис-Про-Фен-ОН). Естественный субстрат пептидилдипептидазы — брадикинин, от С-конца молекулы которого она отщепляет пептиды Фен-Арг и Сер-Про (М. Khosla и соавт., 1979). Из природных соединений пептидилдипептидаза гидролизует также мет⁵-енкефалин и лей⁵-енкефалин. Для проявления активности фермента по отношению к большинству субстратов, за исключением брадикинина, необходимы Cl⁻ (Т. Stewart и соавт., 1982). Действие пептидилдипептидазы ограничивается остатком пролина: она не гидролизует связи, образованные иминогруппой этой аминокислоты (В. Н. Орехович и соавт., 1984). Активность пептидилдипептидазы сильно ингибируется в присутствии ЭДТА и о-фенантролина; Co²⁺ являются активаторами этого фермента (J. Friedland и соавт., 1981).

Пептидилдипептидаза обладает свойством не только образовывать сосудосуживающий ангиотензин II, но и инактивировать другой биологически активный пептид — брадикинин, действие которого направлено на расширение просвета кровеносных сосудов. Таким образом, функция этого фермента заключается в регуляции в организме концентрации пептидов; от которых зависит

уровень сосудистого тонуса и артериального давления. Увеличение активности пептидилдипептидазы, сопровождающееся возрастанием содержания ангиотензина II и усилением распада брадикинина, вызывает сужение сосудов и повышение артериального давления.

Протеолитические ферменты, инактивирующие ангиотензин II, получили название ангиотензиназ (В. Н. Орехович и соавт., 1984). Один из них — это тиоловая протеиназа (протеиназа I), которая путем ограниченного протеолиза расщепляет его на 2 тетрапептида. Второй фермент — аминокпептидаза А — отщепляет от N-конца молекулы ангиотензина II остаток аспарагиновой кислоты. Образующийся при этом ангиотензин III по сравнению с ангиотензином II имеет более слабую способность суживать сосуды. Его основная функция заключается в стимуляции синтеза альдостерона.

Разработка иммунологических методов определения основных компонентов ренин-ангиотензиновой системы способствовала использованию этих биохимических показателей в диагностике ряда патологических процессов. Особое внимание привлекли исследования диагностического значения данных тестов при сердечно-сосудистых заболеваниях. У больных инфарктом миокарда изменяется активность пептидилдипептидазы, причем интенсивность сдвигов определяется наличием гипертонического компонента (В. Н. Орехович и соавт., 1977). При развитии болезни на фоне коронарного атеросклероза без гипертонического синдрома активность фермента находится на нижнем уровне нормы, при осложнении инфаркта миокарда гипертонической болезнью — повышается. Осложнения инфаркта миокарда, сопровождающиеся легочной патологией, вызывают значительное снижение активности фермента. В связи с этим исследования активности пептидилдипептидазы могут послужить дополнительным диагностическим тестом при инфаркте миокарда, осложненном гипертонической болезнью и поражениями легких. Активность пептидилдипептидазы увеличивается в плазме крови и лимфатических узлах больных саркомой и лепрой (Т. Stewart и соавт., 1982). При циррозе печени в плазме крови активность ренина повышается в зависимости от тяжести заболевания: в стадии компенсации она увеличена в 3 раза, при декомпенсированном циррозе с наличием асцита — в 4 раза, а при циррозе печени с желтушностью кожи — в 9 раз (Ф. Г. Назыров и соавт., 1985).

Наряду с диагностическим значением пептидилдипептидазы в последнее время изучается возможность использования препаратов ее ингибиторов в качестве терапевтических средств при гипертонической болезни. Предпосылкой к этому послужили экспериментальные исследования по изысканию таких ингибиторов. В последнее десятилетие обнаружено, что пептидилдипептидаза *in vivo* и *in vitro* угнетается различными веществами (М. Khosla и со-

авт., 1979). Высокоспецифические ингибиторы этого фермента разделяют на два класса: олигопептиды из яда змей и непептидные ингибиторы. Сильными ингибиторами фермента являются пептиды, выделяемые из яда южноамериканских змей. Из многочисленных пептидных ингибиторов, обнаруженных в яде этих змей, наиболее полно изучены нанопептид SQ 20881 (Пир-Трп-Про-Арг-Про-Гли-Илей-Про-Про) и пентапептид ВРР5а (Пир-Лиз-Трп-Ала-Про). Ингибирующее действие этих веществ на пептидилдипептидазу связано с их конкуренцией с биологически важными субстратами фермента — брадикинином и ангиотензином I. Большинство из этих ингибиторов содержат N-концевую пироглутаминовую кислоту и последовательность аминокислот Про-Про на С-конце.

Выяснение механизма действия пептидилдипептидазы способствовало разработке методов лечения гипертонической болезни с помощью специфических ингибиторов. Пептидные ингибиторы вызывали снижение артериального давления у экспериментальных животных и людей, больных гипертонической болезнью (М. Khosla и соавт., 1979; E. Erdös, 1979). Этот эффект связывали с угнетением пептидными ингибиторами пептидилдипептидазы. Однако быстрая потеря активности этих ингибиторов при приеме *per os* ограничивала их использование в качестве гипотензивных средств. В связи с этим были синтезированы непептидные ингибиторы фермента, из которых очень сильным является 2-D-метен-3-меркаптопропанол-L-пролин, названный каптоприлом (М. Khosla и соавт., 1979). Этот ингибитор обладает многими свойствами нанопептида из яда змей. Каптоприл угнетает пептидилдипептидазу благодаря связыванию Zn-содержащего участка фермента с SH-группами ингибитора (D. Cushman и соавт., 1982). Меньшей ингибиторной активностью по сравнению с каптоприлом обладают бензилянтарная кислота и сукцинил-L-пролин (D. Cushman и соавт., 1982).

Ряд авторов изучали гипотензивное действие каптоприла у экспериментальных животных. При скормливании ингибитора здоровым животным у них снижается артериальное давление (A. Carretero и соавт., 1981; M. Fregly, 1980). Пероральное введение каптоприла предотвращает развитие экспериментальной почечной гипертензии (M. Fregly и соавт., 1981), а также достоверно снижает артериальное давление у животных с гипертензией, вызванной различными способами (A. Carretero и соавт., 1981; M. Fregly и соавт., 1981). У здоровых животных гипотензивное действие каптоприла является следствием угнетения превращения ангиотензина I в ангиотензин II, а у животных с хронической гипертензией — результатом увеличения концентрации кининов (A. Carretero и соавт., 1981).

В многочисленных исследованиях изучалась терапевтическая эффективность каптоприла при гипертензии различной этиологии

у человека (D. McKinstry и соавт., 1980; В. Kalberg и соавт., 1981; Т. Fujita и соавт., 1981, и др.). Данные литературы указывают на значительный гипотензивный эффект каптоприла, который связывают с благоприятным изменением соотношения двух биологически активных веществ, участвующих в регуляции артериального давления — ангиотензина II и брадикинина. Снижение артериального давления при введении каптоприла обычно сопровождается уменьшением в крови активности пептидилдипептидазы (Н. Вгруппе и соавт., 1980; D. Klaus и соавт., 1980). Максимальное уменьшение активности фермента при однократном введении каптоприла при гипертонической болезни достигается через 1 ч и составляет 45 % от исходного уровня; через 4 ч после приема каптоприла активность фермента возвращается к исходному уровню (В. Campbell и соавт., 1982). При проведении больным гипертонической болезнью курса лечения каптоприлом наблюдаются сдвиги других компонентов ренин-ангиотензиновой системы: в плазме крови возрастает активность ренина (D. Klaus и соавт., 1980; Н. Вгруппе и соавт., 1982; В. Campbell и соавт., 1982) и уменьшается уровень ангиотензина II (R. McСаа, 1979 К. Ohman и соавт., 1981). При приеме каптоприла в крови увеличивается содержание кининов (R. McСаа, 1979).

Однако каптоприл, имея свободную SH-группу и связываясь в организме с различными белками, при длительном приеме внутрь нарушает процессы всасывания в кишках и обратного всасывания в почечных канальцах (Edwards, Padfield, 1985). В связи с этим синтезированы производные дипептидов Ала-Про и Лиз-Про, которые являются неактивными предшественниками ингибиторов и активируются после всасывания в кровь (пероральные ингибиторы группы МК). Из них наиболее изучен эналаприл; он имеет ряд недостатков, но оказывает выраженное гипотензивное действие. Работы по выделению и синтезу ингибиторов пептидилдипептидазы, их экспериментальному и клиническому изучению продолжаются.

В крови, синовиальной жидкости, лейкоцитах содержатся природные ингибиторы пептидилдипептидазы (В. Н. Орехович и соавт., 1984). Ингибитор из сыворотки крови является низкомолекулярным пептидом, устойчивым к температурному воздействию и кислой среде. Ингибиторы пептидилдипептидазы обнаружены также в тканях легких и почек.

Расшифровка механизма действия системы ренин — ангиотензин II — брадикинин послужила основанием для использования в клинике новых эффективных препаратов в борьбе с различными формами гипертонической болезни. Определение основных компонентов этой биологической системы в плазме крови — важный показатель в диагностике ряда патологических состояний.

ВЗАИМОСВЯЗЬ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ СИСТЕМ КРОВИ

Плазма крови содержит сложный набор протеолитических ферментов, согласованное действие которых лежит в основе гемокоагуляции, фибринолиза, кининогенеза, иммунных реакций, регуляции артериального давления. Многие реакции этих биологических систем катализируются специфическими протеиназами, находящимися в плазме крови и, в отличие от тканевых, пространственно не разобщенными (W. Vogt, 1979). В плазме крови здорового человека обнаруживается незначительная протеолитическая активность. Это обусловлено тем, что основная часть ферментов содержится в виде неактивных зимогенов, и наличием белков, быстро связывающих активные формы протеиназ.

Расшифровка механизмов активации зимогенов протеолитических ферментов позволила в значительной степени вскрыть взаимосвязь между гемокоагуляцией, фибринолизом, кининогенезом, иммунологическими реакциями и во многом понять сущность этих физиологических процессов, которые осуществляются в каскадном механизме и требуют ряда специфических протеиназ. Указанные физиологические системы теснейшим образом связаны между собой, так как имеют общие механизмы активации и контроля (Л. А. Локшина, 1979; К. Н. Веремеенко, 1983). Ключевые протеолитические ферменты этих систем могут активироваться с помощью одних и тех же белковых факторов. Наиболее подробно изучена активация протеиназ крови с помощью ФХ. Этот фактор запускает свертывание крови, фибринолиз и кининогенез. ФХ находится в плазме крови человека и животных в виде белка, не обладающего протеолитической активностью. Под влиянием контакта с чужеродной поверхностью (волокна коллагена, хондроитинсерная кислота, бактериальные липополисахариды) происходит адсорбция и последующая активация ФХ в протеолитически активную форму — ФХа. В процессе контактной активации ФХ необходима не только поверхность, но и другие кофакторы белковой природы — ВМК и прекалликреин. Это подтверждается тем, что врожденные дефициты данных белков приводят к нарушению контактной фазы свертывания крови, замедляют коагуляцию, фибринолиз и кининогенез. ВМК выполняет функцию кофактора контактной активации и циркулирует в кровотоке в виде комплекса с прекалликреином. При помощи фрагмента, богатого гистидином, он связывается с чужеродной поверхностью. ФХ также адсорбируется на поверхности и взаимодействует там с комплексом ВМК-прекалликреин. Полагают, что при контактной активации ФХ на чужеродной поверхности образуется тройной комплекс: ФХ-ВМК-прекалликреин (S. Iwanaga и соавт., 1979). Механизм активации ФХ на поверхности окончательно еще не выяснен. При образовании комплекса появляются, по-видимому,

пластина (XI фактор свертывания крови). В реакции ограниченного протеолиза он преобразует профермент в активную протеиназу — фактор XIa. Эта прокоагулянтная активность локализована в легкой цепи FXa, содержащей богатый гистидином пептид, и осуществляется на поверхности. Для этой реакции необходим ВМК, который делает профермент более чувствительным к протеолитическому расщеплению под действием FXa. Возникающий в процессе активации протеолитический фермент XIa через цепь последовательных реакций образует тромбин, вызывающий превращение фибриногена в фибрин. β -FXa — главный активатор прекалликреина — оказывает незначительное активирующее действие на фактор XI. Эти данные свидетельствуют о том, что от степени фрагментации FX зависит дальнейшая направленность активации либо свертывающей, либо калликреин-кининовой системы крови.

Третий субстрат FXa — плазминоген, который под его влиянием непосредственно или через проактиватор превращается в плазмин — центральный фермент фибринолиза. Активация плазминогена может осуществляться также непосредственно кинин-образующим ферментом калликреином (G. Mignano, 1978). Путь образования плазмина с участием FX не является решающим: основную роль в активации плазминогена в плазмин в физиологических условиях играют тканевые активаторы. Из рис. 9 видно, что плазмин тесно связан с кининогенозом. Фермент, расщепляя FX, образует фрагмент β -FXa, который представляет собой сильный активатор прекалликреина.

Нами разработаны методы определения зависимых от FX плазменных калликреинов, плазмина и их ингибиторов (К. Н. Веремеенко и соавт., 1975, 1979, 1980). В настоящее время они используются в клинике в качестве новых диагностических критериев при заболеваниях печени, инфаркте миокарда, острых панкреатитах.

Система комплемента тесно связана с системами свертывания крови, фибринолиза, кининогеноза: ключевые ферменты указанных биологических систем участвуют в их взаимной активации (R. Porter, 1981). Так, плазмин, образующийся под действием FXa, без участия иммунных комплексов может инициировать классический путь активации комплемента, превращая C1 в C1-эстеразу, и расщеплять C3 с образованием анафилатоксина C3a, который является хемотаксическим фактором. Кроме того, калликреин также преобразует профермент C1 в протеолитически активную форму. Анафилатоксины C3a и C5a инактивируются киназой I, которая, как и в брадикинине, отщепляет C-концевой аргинин, после чего биологическая активность пептидов теряется.

Связь между указанными выше гуморальными системами организма заключается также в общих механизмах их регуляции ингибиторами протеиназ. Сывороточные ингибиторы основных

протеолитических ферментов крови — тромбина, плазмина, калликреина — не являются строго специфическими и тормозят активность всех ферментов, хотя и в неодинаковой степени (J. Travis, G. Salvesen, 1983). Так, α_2 -М — медленно действующий ингибитор тромбина, плазмина, калликреина. Его тормозящий эффект отчетливо проявляется при гидролизе комплексом фермент — α_2 -М высокомолекулярных субстратов и слабо выражен при расщеплении низкомолекулярных. Основной ингибитор двух протеиназ (С1г и С1s) первого компонента комплемента — С1И также представляет собой главный ингибитор калликреина. Наследственный дефицит этого ингибитора проявляется ангионевротическим отеком. При этой патологии не синтезируется адекватное количество ингибитора, которое могло бы нейтрализовать активность протеиназ первого компонента комплемента и калликреина. С1И образует комплексы также с плазмином, ФХ, его активными фрагментами и предшественником плазменного тромбопластина.

АТ III — основной ингибитор тромбина — реагирует также с плазмином и калликреином. Однако имеются различия в их чувствительности к ускоряющему влиянию гепарина на комплексообразование. Так, сильное ускорение взаимодействия АТ III с тромбином наблюдается при концентрациях гепарина в 400 раз ниже тех, которые необходимы для такого же ускорения комплексообразования АТ III с плазмином. Это свидетельствует о том, что АТ III имеет более высокое сродство к тромбину по сравнению с другими протеиназами.

С калликреин-кининовой системой тесно связана ренин-ангиотензиновая (M. Ondetti, D. Cushman, 1982). Схематически эту связь можно представить следующим образом (рис. 10). Калликреин — ключевой фермент кининовой системы, катализирующий высвобождение кининов из кининогена, способен также превращать проренин в ренин — высокоспецифическую протеиназу почек. Последняя расщепляет в молекуле ангиотензиногена единственную пептидную связь с образованием декапептида — ангиотензина I. Этот пептид обладает высокой потенциальной активностью, обусловленной его способностью превращаться в ангиотензин II — мощный сосудосуживающий агент.

Вторым ферментом, связывающим эти две системы, является пептидилдипептидаза — ангиотензинпревращающий фермент (В. Н. Орехович и соавт., 1984). Он катализирует образование ангиотензина II, наибольшие количества которого обнаружены в эндотелиальных клетках сосудов легких. Этот же фермент участвует в инактивации кининов, в частности брадикинина. Таким образом, в реакциях ограниченного протеолиза образуется два пептида-антагониста — ангиотензин II и брадикинин, определяющие в организме уровень артериального давления.

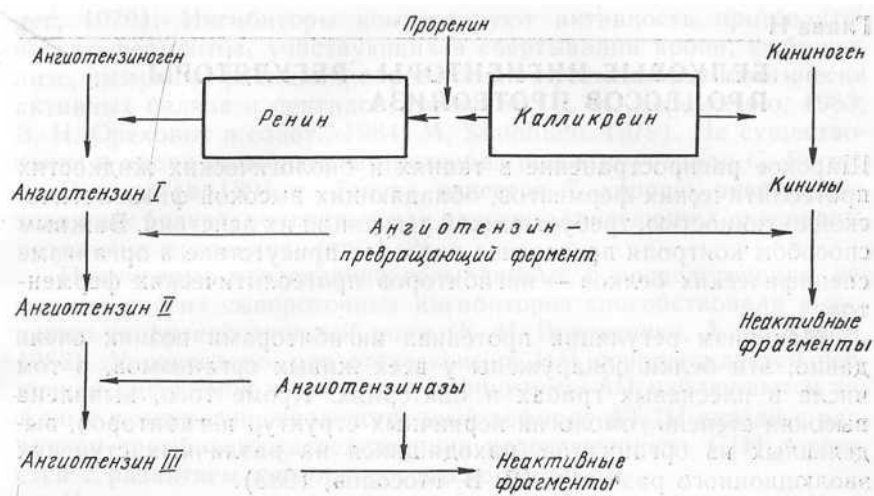


Рис. 10. Связь кининовой и ренин-ангиотензиновой систем

Между кининовой системой и простагландинами существует взаимосвязь (И. К. Шхвацабая, А. А. Некрасова, 1977; A. Nasjletti, K. Malik, 1979). Кинины участвуют в активации ферментных систем, катализирующих образование простагландинов. Брاديкинин стимулирует превращение профосфолипазы в активную форму, вызывающую высвобождение арахидоновой кислоты. Последняя через цепь превращений (образование циклических перекисей) преобразуется в простагландины. С другой стороны, простагландины активируют кининовую систему. Введение простагландина E_2 в почечную артерию собак сопровождается повышением экскреции кининообразующего фермента калликреина с мочой. Действие брадикинина на проницаемость сосудистой стенки усиливается под влиянием простагландина E_2 (И. К. Шхвацабая, А. А. Некрасова, 1977).

Таким образом, рассмотренные гуморальные системы организма теснейшим образом связаны между собой. Это — единая полисистема, ответственная за сохранение гомеостаза (А. М. Чернух, О. А. Гомазков, 1976).

БЕЛКОВЫЕ ИНГИБИТОРЫ—РЕГУЛЯТОРЫ ПРОЦЕССОВ ПРОТЕОЛИЗА

Широкое распространение в тканях и биологических жидкостях протеолитических ферментов, обладающих высокой физиологической активностью, требует тонкой регуляции их действия. Важным способом контроля протеолиза является присутствие в организме специфических белков — ингибиторов протеолитических ферментов.

Механизм регуляции протеиназ ингибиторами возник очень давно: эти белки обнаружены у всех живых организмов, в том числе в плесневых грибах и бактериях. Кроме того, выявлена высокая степень гомологии первичных структур ингибиторов, выделенных из организмов, находящихся на различных ступенях эволюционного развития (В. В. Мосолов, 1983).

В последние годы наиболее подробно изучены ингибиторы крови и тканей. Установлена первичная структура большинства из них, выяснены механизмы взаимодействия с протеиназами, биологические функции, разработаны методы определения активности. Это вызвало интерес к этой группе регуляторных белков врачей различного профиля, биохимиков, патофизиологов, иммунологов.

СЫВОРОТОЧНЫЕ ИНГИБИТОРЫ ПРОТЕИНАЗ И ИХ РОЛЬ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

Важную роль в регулировании протеолиза играют специфические белки — ингибиторы крови, обладающие свойством связывать протеолитические ферменты эндогенного и экзогенного происхождения. После альбуминов и иммуноглобулинов они представляют по количеству (примерно 10 % от общего уровня) третью группу функционально активных белков сыворотки (N. Heimburg

Т а б л и ц а 2. Характеристика ингибиторов протеиназ плазмы крови

Ингибитор	Молекулярная масса, дальтон	Содержание, %		Концентрация (средние данные)	
		пептидов	углеводов	г/л	мкмоль/л
α_1 -ИП	55 000	86	12,2	2	36
АТ III	65 000	85	13,4	0,3	4,5
α_2 -М	725 000	92	7,7	2	2,7
α_2 -АП	70 000	86	14	0,07	1
С1И	104 000	65	34,7	0,25	2,5
α_1 -АХ	69 000	73	24,6	0,4	7
И- α -ИТ	160 000	90	8,4	0,4	3

ger, 1979). Ингибиторы контролируют активность протеолитических ферментов, участвующих в свертывании крови, фибринолизе, иммунных реакциях, образовании и распаде физиологически активных белков и пептидов, гормонов (К. Н. Веремеенко, 1983; В. Н. Орехович и соавт., 1984; M. Steinbuch, 1979). На существование в крови ингибиторов протеиназ впервые указали С. Fermi, L. Pernossi в 1894 г. Теперь известно 7 хорошо охарактеризованных белков, полностью или частично угнетающих активность различных протеиназ (табл. 2).

Полученные в последние годы данные о наследственном дефиците многих сывороточных ингибиторов способствовали выяснению их физиологической роли (К. Н. Веремеенко, А. И. Кизим, 1982). Установлено, что отсутствие α_1 -ИП сопровождается первичной эмфиземой легких; при дефиците α_2 -АП наблюдаются тяжёлые геморрагии; наследственный дефицит АТ III связан с развитием тромбозов; наследственная недостаточность СИ сочетается с развитием ангионевротического отека.

Механизм регуляции протеолиза ингибиторами позволяет организму в нужное время быстро купировать протеолитические реакции и таким образом приостанавливать или замедлять развитие того или иного биологического процесса. Ингибиторы можно рассматривать как компоненты универсальной системы, предохраняющей организм от избыточного протеолиза в крови и тканях.

α_1 -ИНГИБИТОР ПРОТЕИНАЗ

Из различных ингибиторов, присутствующих в плазме крови человека, особый интерес представляет α_1 -ИП, локализованный в α_1 -глобулиновой фракции (К. Н. Веремеенко, 1985), который вначале называли α_1 -антитрипсином, так как на его долю приходится около 90 % общей антитрипсиновой активности нормальной плазмы. Позднее было показано, что этот белок связывает не только трипсин, но и другие протеолитические ферменты, поэтому он получил название α_1 -ИП, которое более точно отражает его функциональную активность (J. Travis, G. Salvesen, 1983).

α_1 -ИП составляет 75 % фракции α_1 -глобулинов сыворотки крови и содержит 12,5 % углеводов (галактозу, маннозу, N-ацетил-глюкозамин и сиаловую кислоту). Синтезируется он в клетках печени и благодаря сравнительно низкой молекулярной массе распределяется по сосудам и внесосудистым пространствам. Вначале ингибитор синтезируется в виде неактивного предшественника, затем превращается в активную форму протеолитическим отщеплением N-концевого 20-членного пептида (T. Geiger и соавт., 1982).

В организме существует две формы α_1 -ИП: печеночная и секреторная; последняя синтезируется в гепатоцитах на полирибосо-

мах, связанных с мембраной. В культуре ткани печени взрослых лиц и эмбрионов синтезируется соответственно 1,1 и 0,8 мг/г ткани α_1 -ИП. Добавление в питательную среду колхицина, циклогексамида и нейраминидазы снижает скорость его синтеза. С помощью иммуноэлектрофореза и последующей ауторадиографии показано, что этот ингибитор продуцируют также культуры моноцитов.

Препараты α_1 -ИП получены в гомогенном виде (R. Berninger, R. Talamo, 1979) что позволило изучить их структуру. В настоящее время для очистки ингибитора используют либо методы аффинной хроматографии на конканавалин-А-сефарозе, связывающей большинство гликопротеинов плазмы, либо методы дисульфидного обмена между единственным цистеиновым остатком в восстановленном ингибиторе и α -цепями иммуноглобулина, соединенными с матрицей с помощью дисульфидных связей (J. Travis, G. Salvesen, 1983). Для предотвращения попадания конканавалина в препараты α_1 -ИП его предварительно элюируют с сефарозы метил-L-D-глюкопиранозидом, а сам ингибитор — цистеином. Выход α_1 -ИП составляет примерно 50 %. Даже при выделении его из цельной плазмы не удается полностью избавиться от небольших примесей.

Разработаны методы получения очищенного препарата ингибитора из плазмы крови кроликов и собак, причем последний по иммунохимическим свойствам отличается от человеческого (W. Abrams и соавт., 1978; A. Koj и соавт., 1978).

α_1 -ИП человека представляет собой одноцепочечный белок, не содержащий внутренних дисульфидных связей. Его единственный цистеиновый остаток способен образовывать дисульфидную связь с цистеином или глутатионом другой молекулы ингибитора. Нативный белок состоит из 294 аминокислотных остатков с N-концевой глутаминовой кислотой и с C-концевым лизином. С помощью циркуляторного дихроизма установлено, что он содержит 36 % α -спиральных структур. В этом ингибиторе 30 % аминокислотной последовательности напоминает таковую в АТ III и овальбумине цыплят. В активном центре присутствует метионин, который необходим для функциональной активности этого гликопротеина: окисление метионина приводит к инактивации ингибитора (D. Johnson, J. Travis, 1978).

α_1 -ИП теряет активность при pH ниже 5 и выше 10,5, при этом изменяется его ультрафиолетовый спектр, что обусловлено ионизацией остатков тирозина, при 70 °C в течение 10 мин исчезает 90 % активности (M. Soap, G. Mitza, 1984). Ингибитор связывается с трипсином в соотношении 1:1, а избыток протеиназы быстро гидролизует образующийся комплекс. Период полужизни α_1 -ИП колеблется от 4 до 6 дней, а некоторых полиморфных вариантов короче (J. Sharp, 1976).

α_1 -ИП обладает широким спектром действия. Кроме трипсина

он тормозит активность эластазы, коллагеназы, тромбина, плазмина, ренина, калликреина, акрозина, факторов Ха и XIa свертывания крови и др. (M. Steinbuch, 1979). Имеются данные о том, что α_1 -ИП угнетает также микробные сериновые протеиназы. Однако сама по себе инактивация указанных ферментов в опытах *in vitro* не является достаточным критерием функциональной активности α_1 -ИП. Решающей служит скорость инактивации определенной протеиназы ингибитором. Анализ показал, что наиболее высокая константа ассоциации α_1 -ИП с нейтрофильной эластазой и первичная функция ингибитора в организме направлена на торможение именно этого фермента.

Взаимодействие α_1 -ИП с сериновыми протеиназами осуществляется путем протеолитической атаки фермента на ингибитор как на субстрат. Остаток серина активного центра протеиназ ковалентно связывается с определенным аминокислотным остатком ингибитора с образованием стехиометрического комплекса. Для комплексообразования имеют значение также ионные и гидрофобные взаимодействия. Еще недавно считалось, что основную роль в активном центре α_1 -ИП играет лизин, поскольку его модификация приводит к потере способности инактивировать трипсин, химотрипсин и эластазу. В настоящее время важная роль в связывании α_1 -ИП с эластазой отводится метионину (D. Johnson, J. Travis, 1978).

Детальные исследования показали, что ингибитор обладает большим полиморфизмом и представлен целой системой белков, обозначенной Pi, классификация которой основана на изоэлектрической подвижности изоформ ингибитора (J. Sharp, 1976). Человеческий α_1 -ИП существует по крайней мере в виде 24 форм (типов и подтипов). Различные аллельные формы ингибитора можно разделить электрофорезом в кислом крахмальном геле, перекрестным электрофорезом, изоэлектрическим фокусированием в полиакриламидном геле. С помощью последнего метода при pH 3,5—6 можно получить все аллельные варианты ингибитора. Идентифицируют аллели с помощью электрофореза на агарозе при pH 8,6 и иммунохимического количественного определения. Отдельные формы α_1 -ИП получены в очищенном виде методом аффинной хроматографии на конканавалин-A-сефарозе.

Среди населения наиболее часто встречается аллель PiM, частота распространения которого составляет 0,86—0,99. Другие разновидности аллелей встречаются реже. В зависимости от скорости передвижения в электрическом поле по сравнению с нормальным аллелем различают следующие варианты: PiF — быстрый, PiS — медленный, PiZ — очень медленный. Кроме того, обнаружены еще следующие аллели — B, C, D, E, E₂, G, F, I, L, M₂, M₃, N, P, V, W, W₂, X, Y, Y₂ и др., а также инертный, или нулевой, аллель. Аллели Pi наследуются согласно закону Менделя как

кодминантные и проявляют свой эффект как один аутосомный локус; его топография в хромосоме не установлена. Изоэлектрическая точка формы PiZ находится в более щелочной среде, чем PiM. В плазме крови с фенотипом PiZZ концентрация ингибитора 0,3 г/л.

Вначале предполагали, что фенотип PiZZ плазменного α_1 -ИП отличается от фенотипа PiMM более низким содержанием сиаловой кислоты. Впоследствии обнаружили, что углеводные компоненты в обеих формах ингибитора идентичны и обработка белков нейраминидазой в существенной мере не изменяет их активности. Исследование первичной структуры показало, что в молекуле ингибитора с фенотипом PiZZ в положении 342 глутаминовая кислота замещена лизином. В фенотипе PiSS по сравнению с фенотипом PiMM в положении 264 обнаружен валин вместо глутаминовой кислоты (J. Travis, G. Salvesen, 1983). Такая замена в аминокислотной последовательности изменяет конформацию белка, что приводит к нарушению секреции его из клеток печени в кровь.

В Европе аллель PiF наиболее часто встречается в Венгрии, а аллель PiZ — в Швеции. У взрослого населения Нью-Йорка частота фенотипов PiZZ и PiSZ составляет соответственно 1:2000 и 1:500, а при подозрении на легочное заболевание — 1:100 и 1:150. Большинство Pi-аллелей одинаково влияет на синтез α_1 -ИП. За пониженный синтез α_1 -ИП и вследствие этого уменьшение его количества в плазме ответственны следующие аллели: PiW и PiS (60 %), PiZ (15 %), PiP (15 %) и Pi — нулевой (0 %). У гетерозиготных организмов с фенотипами PiMZ и PiMS синтезируется соответственно 57,5 % и 80 % белка по отношению к его синтезу при нормальном фенотипе PiMM; при гомозиготных фенотипах PiZZ и PiSS синтезируется соответственно 15 % и 60 % ингибитора.

Содержание α_1 -ИП можно определять энзиматическим методом, основанным на торможении активности экзогенных протеиназ сывороткой крови, и иммунохимическими методами — радиальной иммунодиффузией, электроиммунодиффузией, лазерной нефелометрией. При использовании иммунодиффузного метода определения содержания α_1 -ИП получают более высокие результаты, поскольку при этом обнаруживается не только свободная, но и связанная с протеиназами форма ингибитора. В сыворотке крови здоровых людей средний уровень ингибитора составляет 2 г/л. Содержание α_1 -ИП в осенний период значительно выше, чем в весенний, особенно выражены сезонные колебания ингибитора у мальчиков (V. Wagner и соавт., 1976). Концентрация α_1 -ИП увеличивается в крови беременных женщин, при трехмесячной беременности она в 2 раза выше, чем у небеременных женщин. У новорожденных концентрация α_1 -ИП в сыворотке крови практически не отличается от таковой у взрослых людей.

При патологических состояниях в плазме (сыворотке) крови наблюдается как снижение, так и повышение уровня α_1 -ИП (К. Н. Веремеенко, А. И. Кизим, 1975). Сниженный уровень ингибитора, не связанный с генетическими нарушениями, определяется у больных с неонатальной дыхательной недостаточностью, острой желтой атрофией печени, при почечных заболеваниях, связанных с повышенной протеинурией. Нарастание концентрации α_1 -ИП при воспалении происходит вследствие усиленного поступления этого белка в кровь, из которой он достигает поврежденных тканей, где быстро взаимодействует с освобожденными из клеток протеиназами.

Повышенный интерес врачей к α_1 -ИП обусловлен его участием в развитии ряда наследственных и приобретенных заболеваний. В последние годы обнаружена зависимость между дефицитом α_1 -ИП и обтурационными изменениями в легких, а также некоторыми болезнями печени.

В 1963 г. появилось первое сообщение о зависимости недостаточности α_1 -ИП у членов одной семьи с обтурационными изменениями в легких. С. Laurell, S. Eriksson установили связь между генетическим дефицитом α_1 -ИП в крови и развитием эмфиземы легких и назвали это явление α_1 -антитрипсиновой недостаточностью. Эмфизема легких возникает при резком дефиците (гомозиготный фенотип PiZZ) и умеренной недостаточности (гетерозиготный фенотип PiSZ) α_1 -ИП (J. Morse, 1978). При фенотипе PiZZ эмфизема наблюдается в 60 % случаев. Авторы полагают, что недостаточность этого белкового ингибитора предрасполагает к повреждению соединительной ткани легких лизосомальными протеиназами, высвобождающимися в процессе фагоцитоза. Особую роль играет эластаза нейтрофильных гранулоцитов, которая разрушает эластические волокна легочной ткани, что приводит к истончению и разрыву альвеолярных перегородок. α_1 -ИП инактивирует эластазу в 10 раз быстрее, чем другие сериновые протеиназы. Ткань легких человека, в отличие от легочной ткани быка, не содержит специфических ингибиторов протеиназ. Именно поэтому при дефиците α_1 -ИП эмфиземой легких болеют с раннего возраста.

Поскольку у некоторых лиц с фенотипами PiZZ и PiSZ эмфизема легких не развивается, полагают, что в патогенезе заболевания кроме эластазы участвуют дополнительные факторы, усугубляющие повреждение легких у больных с наследственным дефицитом ингибитора. К таким факторам относятся курение, поступление в организм вредных веществ, некоторых ксенобиотиков.

Наибольший интерес вызывает влияние табачного дыма на развитие эмфиземы легких. Нефракционированный дым быстро снижает ингибирующее действие α_1 -ИП на эластазу поджелудочной железы и нейтрофильных гранулоцитов. Табачный дым содер-

жит пероксидные и супероксидные анионы, окисляющие молекулы α_1 -ИП, вследствие чего последний теряет способность подавлять активность эластазы. Перекись водорода, добавленная к табачному дыму, усиливает его окислительную активность, а антиоксиданты предотвращают данный эффект (А. Cohen, Н. James, 1982). Эластаза менее чувствительна к инактивации табачным дымом. Водные растворы табачного дыма тормозят взаимодействие α_1 -ИП и эластазы *in vitro*. Вдыхание дыма сопровождается снижением активности α_1 -ИП в легких, которое устраняется восстанавливающими агентами (А. Janoff и соавт., 1980).

α_1 -ИП бронхиальной промывной жидкости человека, обработанной табачным дымом, имеет сниженную эластазо-ингибирующую способность, обусловленную окислением в его молекуле 4 остатков метионина. После вдыхания курильщиком дыма в сыворотке крови обнаруживается 23 % α_1 -ИП в окисленном состоянии, тогда как у некурящих людей окисленный ингибитор не определяется. При окислении компонентами табачного дыма полностью подавляется способность α_1 -ИП инактивировать эластазу, но сохраняется его трипсинингибирующая активность. На этом свойстве основан метод определения окисленной формы α_1 -ИП в сыворотке крови — по разности между способностью ингибировать активность трипсина и эластазы (К. Beatty и соавт., 1982).

Таким образом, вдыхание табачного дыма изменяет в легочной ткани соотношение между протеиназами и ингибиторами в сторону преобладания первых. Это происходит за счет находящихся в дыме окислителей, непосредственно превращающих функционально активный α_1 -ИП в неактивную форму. Кроме того, α_1 -ИП может инактивироваться под действием окислителей, которые высвобождаются фагоцитирующими нейтрофильными гранулоцитами, инфильтрующими очаг воспаления и модифицирующими ингибитор так, что он теряет способность связывать эластазу. Наиболее подробно изучено ферментативное окисление, катализируемое системой миелопероксидазы, инактивирующей α_1 -ИП при различных воспалительных процессах. Во время фагоцитоза наряду с окислителями из нейтрофильных гранулоцитов выделяются активные протеиназы и накапливаются в пораженных тканях. Протеолитические ферменты, кроме расщепления тканевых структур, могут также усиливать образование окисляющих веществ, что приводит к резкой инактивации α_1 -ИП, т. е. исключению ингибиторного звена из механизма контроля за действием образующихся протеиназ.

Протеиназы, в особенности эластаза, продуцируемая *Pseudomonas aeruginosa*, разрушает α_1 -ИП, вследствие чего эти микроорганизмы, инактивируя ингибитор, дают возможность эндогенным сериновым протеиназам разрушать ткани (К. Morihaga и соавт., 1979).

В последние годы получены данные о диагностическом значении определения уровня сывороточного α_1 -ИП при различных патологических состояниях и прежде всего при бронхолегочных заболеваниях (N. Böhm, 1980). Т. Е. Гембицкая (1984) у 6 из 137 больных с диагнозом хронического обструктивного бронхита обнаружила первичную эмфизему легких, из них у 2 человек полностью отсутствовал α_1 -ИП, у 3 было выраженное уменьшение его уровня по гомозиготному типу, у 1 больного — снижение содержания было умеренным по гетерозиготному типу. Поскольку большинство людей с дефицитом α_1 -ИП заболевают эмфиземой легких, определение у них уровня этого белка важно в диагностическом и прогностическом плане. Данный показатель может служить скрининг-тестом при массовом обследовании больных с первичной эмфиземой легких и предпосылкой для профилактики заболеваний (профессиональная ориентация, отказ от курения). У 18 % больных эмфиземой легких и у 60 % больных силикозом наблюдалось снижение уровня α_1 -ИП. Повышение содержания ингибитора отмечено при обострении хронического бронхолегочного процесса (М. В. Гудь, 1978). По данным Ю. Н. Левашова и соавторов (1983), из 74 больных кистозной гипоплазией легких у 29 определяется дефицит α_1 -ИП, тогда как у больных с бронхоэктазами — из 47 лиц у 2. При инфильтративном туберкулезе легких уровень α_1 -ИП повышался в 1,5 раз по сравнению с донорами, что трактуется как защитная реакция, направленная на ограничение протеолитического расщепления легочной ткани (Г. О. Каминская и соавт., 1984).

W. Hall и соавторы (1976) произвели типирование сывороточного α_1 -ИП иммуноэлектрофоретическим и энзиматическим методами при заболеваниях легких. Содержание α_1 -ИП в сыворотке крови людей с фенотипом PiMZ было снижено до 1,25—1,78 г/л (норма 1,95—2,00 г/л). Это может быть важным патогенетическим фактором в развитии деструктивных изменений соединительной ткани легких, обусловленных ослаблением ингибиторного потенциала против эластазы и коллагеназы. При наследственном дефиците α_1 -ИП усугубляется роль факторов внешней среды, в частности курения, в возникновении повреждения легких, приводящего к эмфиземе и легочному сердцу.

Дети особенно чувствительны к дефициту α_1 -ИП. Гомозиготная недостаточность α_1 -ИП проявляется в раннем возрасте в форме дистрофии и длительной желтухи (D. Karitzky, 1980). Активность α_1 -ИП у 43,3 % детей, больных хроническим бронхитом и хронической пневмонией, наполовину уменьшена. По данным J. Rudnik и соавторов (1976), концентрация α_1 -ИП в сыворотке крови снижена у 17,3 % таких больных, что может служить объективным критерием течения заболевания органов дыхания, а также фактором повышенного риска при обследовании в медико-генетических

консультациях. У детей раннего возраста, больных спастическим бронхитом и бронхопневмонией, α_1 -ИП обнаруживается в бронхиальных секретах, что позволяет считать его не только белком острой фазы воспаления, но и одним из компонентов неспецифической защиты дыхательного аппарата от инфекции.

Описаны случаи семейной гиперхолестеринемии на фоне недостаточности α_1 -ингибитора протеиназ типа ZZ. Предложена гипотеза генетического сцепления между системой Pi и аутосомным доминантным детерминированием утраты клеточных рецепторов для липопротеидов низкой плотности — (R. Victorino, 1978). Другая важная область исследования α_1 -ИП — это заболевания печени, в частности холестатическая желтуха и ювенильный цирроз. Частота неонатального заболевания печени у людей с фенотипом PiZZ составляет 10—20 %.

Механизмы нарушения функции печени при Pi-фенотипических аномалиях остаются мало изученными. Предполагают, что у больных с указанной патологией в гепатоцитах накапливаются значительные количества α_1 -ИП. Изучение биоптатов печени больных с фенотипом PiZZ показало наличие в клетках паренхимы гранул, содержащих α_1 -ИП. Предложен простой иммунофлюоресцентный метод выявления в биоптатах печени α_1 -ИП, который может служить в качестве скрининг-теста обнаружения включений этого белка в тканях (P. Dergvon, 1984). Ингибитор соединяется с мембранами эндоплазматического ретикулула и откладывается в гепатоцитах в виде агрегатов, что приводит к нарушению его выделения через мембрану в плазму крови. В основе ухудшения транспорта α_1 -ИП лежит нарушение сialiрирования в гепатоцитах, в частности, отсутствие одного остатка сиаловой кислоты на аллеле PiZ (J. Morse, 1978) вследствие дефицита трансферазы сиаловой кислоты в печеночных клетках. У лиц с резкой недостаточностью α_1 -ИП (гомозиготы PiZZ) активность трансферазы сиаловой кислоты на 89 % снижается также в плазме крови.

Поскольку синтез α_1 -ИП осуществляется в печени, ряд авторов изучали его содержание у больных с различной патологией этого органа и проанализировали связь между недостаточностью α_1 -ИП и ее клиническими проявлениями у детей. Анализ данных показал, что недостаточность α_1 -ИП проявляется у гомозигот по патологическому гену в форме поражения печени и холестатической желтухи. Развитие печеночной недостаточности при дефиците ингибитора обусловлено неконтролируемой активностью протеиназ гепатоцитов. Подчеркивается, что для уточнения этиологии необходимо исследование концентрации α_1 -ИП у новорожденных с невыясненной гипербилирубинемией и продолжительной желтухой неизвестной природы. За больными с недостаточностью ингибитора необходимо длительное наблюдение, сочетающееся со специфической терапией (А. Калиева и соавт., 1984).

Важным представляется изучение диагностической ценности определения α_1 -ИП крови при ненаследственной патологии. Особого внимания заслуживает исследование сывороточного α_1 -ИП при злокачественных новообразованиях. Интерес к этому вопросу возник давно, но подробное исследование началось лишь в 60-е годы в связи с разработкой методов определения α_1 -ИП в сыворотке крови. Установлено, что сыворотка крови больных с онкологическими заболеваниями по сравнению с таковой здоровых лиц обладает более высокой способностью инактивировать трипсин. Эта закономерность выявлена у больных раком гортани (В. М. Лосяцкая, 1971), грудной железы, легких, толстой кишки, шейки матки и др. (С. А. Гешелин и соавт., 1984). Поскольку 90 % антитриптической активности связано с α_1 -ИП, можно считать, что нарастание уровня ингибиторов протеолиза у больных связано с увеличением концентрации именно α_1 -ИП.

Подробно изучены изменения сывороточных ингибиторов протеиназ у больных раком гортани на различных стадиях патологического процесса (К. Н. Веременко и соавт., 1983). У большинства больных раком гортани уровень α_1 -ИП повышен в 1,5—2 раза, причем наиболее выраженные изменения обнаруживаются при III—IV стадиях заболевания. Содержание α_1 -ИП исследовано также при раке гортани после хирургического вмешательства и лучевой терапии. Через 6—9 дней после удаления опухоли уровень α_1 -ИП возрастает по сравнению с дооперационным в 1,7 раза, а через 14—20 дней несколько снижается, не достигая, однако, дооперационного. После получения половинной дозы облучения (3000 рад) содержание α_1 -ИП повышается в 1,3 раза и остается таким же после окончания курса лучевой терапии. Исследования концентрации этого гликопротеина в отдаленный период после лечения показали, что возникновение рецидива опухоли сопровождается резким нарастанием его количества, при отсутствии рецидивов или метастазов в отдаленный период содержание ингибитора сохраняется относительно низким. Опасность быстрого рецидива опухоли больше у больных с высоким уровнем α_1 -ИП до операции. Поэтому исследования содержания α_1 -ИП при первичном обследовании больных, а также в динамике лечения может быть важным прогностическим тестом.

Механизм нарастания концентрации сывороточных ингибиторов протеиназ и, в частности, α_1 -ИП остается невыясненным. Полагают, что повышение содержания α_1 -ИП связано с поступлением его в кровь при деструкции опухоли. Однако это предположение о «вымывании» ингибитора из ткани злокачественной опухоли в кровь не находит экспериментального подтверждения. Согласно данным наших исследований, опухолевые ткани гортани содержат небольшие количества α_1 -ИП (в среднем 250 мкг/г ткани), а уровень его в сыворотке крови больных раком гортани повышается

примерно на 1 г/л (К. Н. Веремеенко, В. М. Лосицкая, 1968). Следовательно, для столь высокого повышения концентрации α_1 -ИП в сыворотке крови при деструкции новообразования масса опухоли должна составлять десятки килограммов. По-видимому, нарастание уровня α_1 -ИП представляет собой защитную реакцию в ответ на активацию протеиназ опухоли.

В раковых опухолях человека содержатся неактивные формы α_1 -ИП, что дает основание для применения этого ингибитора с лечебной целью при злокачественных новообразованиях (S. Sawaki и соавт., 1977).

В литературе имеются сообщения о диагностической ценности определения содержания α_1 -ИП также при других заболеваниях. Уровень α_1 -ИП нарастает при остром и хроническом панкреатите (К. Н. Веремеенко и соавт., 1975). Острый вирусный гепатит сопровождается увеличением концентрации α_1 -ИП в сыворотке крови, а хроническое течение этого заболевания — уменьшением (F. Tigano, 1976). У детей, больных диабетом, повышается содержание α_1 -ИП. У больных, перенесших острый инфаркт миокарда, концентрация α_1 -ИП быстро нарастает до максимальной на 5—7-е сутки (Rennic, 1976).

После пересадки почки уровень α_1 -ИП, определяемый методом радиальной иммунодиффузии, резко повышается и затем через 10 дней снижается. Острая реакция отторжения пересаженной почки сопровождается нарастанием концентрации α_1 -ИП, тогда как при благоприятных результатах даже через 2 года после операции количество ингибитора находится в пределах нормы (J. Zagognik, 1980). Авторы считают, что определение содержания α_1 -ИП в сыворотке крови является информативным прогностическим тестом для отторжения трансплантированной почки.

Антипротеолитическая активность сыворотки резко повышается у лиц после приема алкоголя, а также у больных хроническим алкоголизмом (Z. Kudrewicz-Hubicka, A. Gygonic, 1981). Прием алкоголя в дозе 2 г/кг сопровождается быстрым нарастанием содержания сывороточных ингибиторов протеиназ, причем максимальный их уровень определяется через 1 ч; через 4 ч показатель снижается до нормы. Фракционирование сыворотки крови после приема алкоголя с помощью электрофореза в полиакриламидном геле показало, что повышение концентрации ингибиторов протеиназ обусловлено увеличением именно количества α_1 -ИП. В связи с этим определение уровня α_1 -ИП может быть использовано для ранней диагностики алкогольной интоксикации.

Диагностическую ценность представляет также исследование α_1 -ИП в других биологических жидкостях: спинномозговой, амниотической, секретах слюнных желез. У больных с тяжелой черепно-мозговой травмой уровень α_1 -ИП в спинномозговой жидкости повышается в 8—10 раз, при улучшении состояния больных

концентрация ингибитора снижается (А. П. Ромоданов и соавт., 1972). В амниотической жидкости во время беременности концентрация α_1 -ИП нарастает, составляя на 24-й неделе 0,8 г/л, в конце беременности снижается до 0,3 г/л (D. Houvet и соавт., 1980). В секретах слюнных желез больных хроническим тонзиллитом уровень α_1 -ИП уменьшается по сравнению с нормой (К. Н. Веремеенко и соавт., 1975).

Дальнейшее изучение α_1 -ИП с помощью энзимологических и иммунохимических методов будет способствовать пониманию его функциональной роли в организме, а также расширению возможности использования данного белка-ингибитора в диагностике ряда патологических состояний.

АНТИТРОМБИН III

Вторым важным ингибитором протеиназ является АТ III, который вместе с гепарином составляет важнейшую часть противосвертывающей системы и играет ведущую роль в поддержании крови в жидком состоянии. АТ III блокирует не только тромбин, но и другие сериновые протеиназы, участвующие в каскадном механизме свертывания крови (Ю. Я. Лагутина, Г. А. Федуллова, 1982; E. Thaler, 1979).

Ранее было установлено, что сам гепарин не влияет на свертывание фибриногена тромбином, но проявляет свойства ингибитора в присутствии плазмы крови или определенного ее белка. Последний получил название кофактора гепарина, или антитромбина II (АТ II), в отличие от медленного ингибитора тромбина — антитромбина III, инактивирующего фермент в отсутствие гепарина. Последующие исследования показали, что свойство медленно инактивировать фермент без гепарина и быстро в его присутствии характерно для одного и того же ингибитора, а именно АТ III. Его неактивный комплекс с тромбином образуется при молярном соотношении компонентов 1:51. Свойства и строение комплекса тромбин — АТ III не зависят от того, получен ли он при наличии гепарина или без него. Очевидно, реакция взаимодействия между тромбином и АТ III обуславливается специфическим сродством определенных участков в молекулах этих белков. Гепарин лишь ускоряет связывание тромбина с АТ III, выступая в роли вспомогательного катализатора. Следовательно, основным ингибитором тромбина является АТ III, а гепарин — его кофактором. Однако и сейчас некоторые авторы ошибочно называют АТ III кофактором гепарина (О. А. Семенова и соавт., 1985; G. Migano и соавт., 1980), что не соответствует его биологической функции, которая является решающей в инактивации тромбина, аналогично тому, как в системе фермент — кофермент определяющую роль играет белок.

Гепарин представляет собой кислый полисахарид класса глюкозаминогликанов (С. М. Бычков, 1981), в дисахаридной структурной единице которого содержится 2—3 сульфатные группы. При физиологических условиях благодаря карбоксильным и сульфатным группам молекула гепарина имеет высокий отрицательный электрический заряд, что обеспечивает электростатическое взаимодействие с белками, имеющими основные группы. Молекулярная масса препаратов гепарина, полученных из легких быка, колеблется от 3000 до 17 000 дальтон. Антикоагулянтная активность гепарина нарастает по мере увеличения молекулярной массы препарата. В ответ на избыточное количество тромбина гепарин из депо мобилизуется и поступает в плазму крови. Природа этого явления раскрыта Б. А. Кудряшовым (1975), который установил, что в основе его лежит рефлекторный механизм.

По современным представлениям, АТ III присуще 75 % анти-тромбинового потенциала плазмы крови (J. Travis, G. Salvesen, 1983). Инактивация тромбина осуществляется системой АТ III — гепарин. Это имеет физиологическое значение, так как после выполнения своей функции фермент оказывается опасным и быстрое прекращение его действия необходимо для организма.

Недавно описан новый плазменный антитромбин, названный гепариновым кофактором II (ГК II) (D. Tollefsen, 1984). Он имеет молекулярную массу большую, чем АТ III, и образует неактивный комплекс с тромбином в соотношении 1:1. Активаторами ГК II служат гепарин и другие сульфатированные полисахариды, причем наиболее специфичен из них дерматансульфат. ГК II характеризуется более узкой по сравнению с АТ III субстратной специфичностью, проявляющейся в способности инактивировать тромбин, не влияя при этом на фактор Ха и плазмин. По функциональному действию — это выраженный антитромбин, который отличается по иммунологическим свойствам от АТ III, α_2 -М, α_1 -ИП. Физиологическая роль ГК II в настоящее время еще не выяснена, поэтому при последующем изложении материала речь будет идти только об АТ III.

АТ III синтезируется тканью печени, почек, сосудистой стенкой легких. Вероятно, последний факт играет роль в поддержании текучести крови в микроциркуляторном русле. Аналогично другим ингибиторам протеолиза АТ III представляет собой гликопротеин, содержащий примерно 13 % углеводов (гексозу, глюкозамин, нейраминовою кислоту). Кроме коротких углеводных цепей, молекула АТ III имеет гликолипидный компонент. Его молекулярная масса, по данным различных методов определения, равна около 65 000 дальтон, изоэлектрическая точка находится при pH 5,11. Почти полностью расшифрована первичная структура белка, показана гомология с таковой α_1 -ИП и овальбумина. АТ III содержит 4 гликолизированных участка, структура которых близка соответ-

ствующим цепям углеводов в α_1 -ИП. Содержание АТ III в плазме крови составляет в среднем 4,5 мкмоль/л (M. Steinbuch, 1979).

АТ III выделен из плазмы крови человека и животных в очищенном виде методом аффинной хроматографии на гепаринсефарозе. Ингибитор образует стехиометрический комплекс с тромбином, серин активного центра которого связывается с остатками аргинина молекулы АТ III (R. Rosenberg, 1977). Модификация ϵ -аминогруппы остатка лизина в АТ III мешает реакции с ним гепарина, но не препятствует проявлению прогрессивного анти-тромбинового эффекта. Связывание тромбина с АТ III зависит от рН среды, оно тормозится при смещении рН в кислую сторону. При ацидозе реакция комплексообразования с АТ III резко замедлена (L. Roka, H. Vley, 1977). Поэтому при таком патологическом состоянии прежде всего необходимо восстановить нормальный рН крови, а затем назначать соответствующую терапию.

Комплекс тромбин — АТ III диссоциирует при обработке сильными нуклеофилами, при этом образуется двухцепочечная форма АТ III, что свидетельствует о расщеплении пептидной связи во время реакции (J. Travis, G. Salvesen, 1983). Однако реакция не сопровождается освобождением свободного пептида. Наличие 6 дисульфидных связей указывает на образование ковалентной связи между тяжелыми и легкими цепями. Некоторые протеиназы, например, нейтрофильная эластаза, которая не угнетается АТ III, медленно инактивирует ингибитор путем протеолитического расщепления. Способностью гидролизовать АТ III обладает также протеолитический фермент из яда змей, который разрывает в его молекуле связь Арг₃₇₅-Сер₃₇₆.

АТ III вступает в комплексообразование не только с тромбином, но и многими активированными сериновыми протеиназами каскада свертывания крови — факторами Ха, XIa, XIIa (M. Jorgensen и соавт., 1984). АТ III является одним из основных ингибиторов фактора Ха, эффект которого усиливается гепарином, особенно его высокомолекулярной фракцией. Таким образом, АТ III обладает способностью не только купировать активность тромбина, но и прекращать его образование из протромбина. Этот ингибитор связывается также с плазмином, трипсином, химотрипсином, калликреином плазмы, урокиназой, тромбиноподобными ферментами из яда змей (M. Steinbuch, 1979), что, вероятно, не имеет существенного физиологического значения в организме. Инактивация указанных протеолитических ферментов АТ III происходит так же медленно, как и тромбина, и усиливается в присутствии гепарина, хотя и в меньшей степени. Для ускорения угнетающего действия на тромбин требуются гораздо меньшие концентрации гепарина (0,005 ед/мл), чем для оказания такого влияния на плазмин (2 ед/мл). При наличии в растворе двух протеиназ — тромбина и фактора Ха—АТ III избирательно реагирует с первой.

При изучении антикоагулянтного эффекта гепарина обнаружено, что его нестехиометрические количества способны катализировать реакцию взаимодействия тромбина с АТ III, т. е. гепарин действует как катализатор. После окончания инактивации тромбина АТ III гепарин остается в растворе и сохраняет свою биологическую активность: 1 моль гепарина может участвовать в быстрой инактивации нескольких молей тромбина.

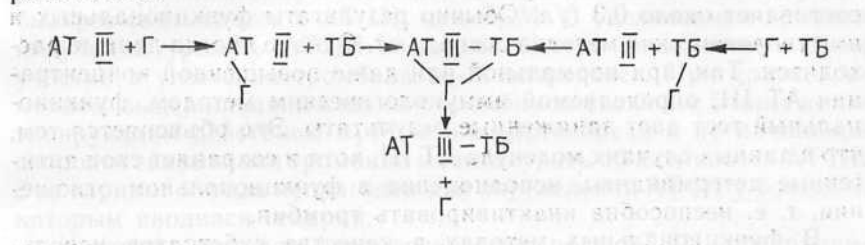
В настоящее время гепарин рассматривается как аллостерический фактор, который присоединяется к определенному участку АТ III, вызывая в нем конформационные изменения. Модифицированный белок приобретает способность угнетать тромбин и другие сериновые протеиназы. В результате перестройки в молекуле АТ III создаются связывающие центры, комплементарные центрам молекулы тромбина, благодаря этому оба белка скрепляются между собой нековалентными связями. АТ III присутствует в плазме крови в агрегированной форме: молекулярная масса связанного с тромбином АТ III колеблется от 160 000 до 250 000 дальтон, т. е. больше, чем сумма молекулярных масс двух компонентов, — 100 000 дальтон (E. Marlinick, G. Gora-Naslak, 1983).

В последние годы изучен механизм активации АТ III гепарином. Проведено спектроскопическое исследование АТ III в присутствии и отсутствии гепарина, химической модификации АТ III окислением или метилированием при помощи специфических реагентов на триптофан. Установлено, что гепарин взаимодействует с пептидным фрагментом ингибитора, который содержит остаток триптофана, расположенный на N-конце в положении 49. Химическая модификация АТ III полностью лишает его способности связываться с гепарином, но не препятствует взаимодействию с тромбином. При слабом восстановлении АТ III расщепляется 1 из 3 дисульфидных мостиков, что сопровождается снижением способности связывать гепарин и сохранением комплексообразования с тромбином. По-видимому, в молекуле АТ III содержатся специфические участки для соединения с гепарином и тромбином.

Имеются данные о том, что гепарин влияет на тромбин, поскольку он может с ним взаимодействовать. В результате этого молекула фермента подвергается конформационным изменениям, что делает ее более чувствительной к АТ III. Для процесса активации необходимы определенные структуры в молекуле гепарина: N-сульфатные группы являются главными для взаимодействия с АТ III, а свободные карбоксильные группы — для связывания с тромбином. Быстрая инактивация тромбина происходит в результате нескольких промежуточных реакций, в которых участвуют АТ III, гепарин и тромбин. Гепарин комплексируется как с ингибитором, так и с ферментом (M. Nesheim, 1983).

Кинетические исследования показали, что узловой является реакция в тройном комплексе тромбин — АТ III — гепарин. Путь

к ней лежит либо через комплекс АТ III — гепарин либо гепарин — тромбин; к которым присоединяются тромбин и АТ III соответственно. Оба пути могут реализоваться с одинаковой вероятностью. Тройной комплекс далее претерпевает конформационные изменения, в результате которых образуются АТ III — тромбин и гепарин. Схематически инактивацию тромбина (ТБ) можно изобразить так:



АТ III и тромбин имеют определенное сродство, однако без гепарина они реагируют медленно, в его присутствии скорость реакции увеличивается в 1800 раз и комплекс образуется за доли секунды (P. Jordan, 1979). Природа этого комплекса такая же, как и первичного нековалентного комплекса фермент — субстрат Михаэлиса.

Молекулярные механизмы взаимодействия между компонентами описываемой системы мало изучены. Можно полагать, что на поверхности молекул, вступающих в тройной комплекс, имеются определенные комплементарные участки, обеспечивающие образование промежуточных соединений. Взаимодействие между молекулами-партнерами осуществляется системой межмолекулярных нековалентных связей, в основном электростатических, в данном случае анионными зарядами молекулы гепарина. При образовании тройного комплекса или после него происходит ацилирование серина в активном центре тромбина при разрыве пептидной связи, образованной карбоксильной группой аргинина в молекуле АТ III. В результате этого каталитическая функция тромбина блокируется.

Введение экспериментальным животным комплекса тромбин — АТ III показало, что он быстро выводится из организма гепатоцитами, как и комплекс трипсин — α_1 -ИП. Предполагают, что эти 2 гомологичных ингибитора имеют общий рецепторный участок узнавания, который открывается, когда протениназы к ним присоединяются (H. Fuchs, S. Pizzo, 1983).

Определение АТ III в плазме крови рассматривается как один из важных лабораторных тестов, позволяющих судить о состоянии противосвертывающей системы крови. В связи с этим следует остановиться на принципах методов определения этого высоко-реактивного ингибитора ферментов гемостаза. В клиниках при-

меняют иммунологические и функциональные методы исследования. Первые основаны на количественном определении белка АТ III, прореагировавшего со специфическими для него антителами, вторые — на выявлении снижения активности тромбина, экзогенно добавленного к плазме крови, содержащей АТ III. Его уровень, установленный иммунологическими методами, выражают в весовых единицах на определенный объем плазмы: в норме он составляет около 0,3 г/л. Обычно результаты функциональных и иммунологических методов совпадают. Однако иногда данные расходятся. Так, при нормальной или даже повышенной концентрации АТ III, определяемой иммунологическим методом, функциональный тест дает заниженные результаты. Это объясняется тем, что в данных случаях молекула АТ III, хотя и сохраняет свои антигенные детерминанты, неполноценна в функциональном отношении, т. е. неспособна инактивировать тромбин.

В функциональных методах в качестве субстратов используются фибриноген и низкомолекулярные синтетические пептиды. Методы с применением синтетических субстратов основаны на расщеплении тромбином пептидов с хромогенными или флюорогенными свойствами. У хромогенных субстратов содержится хромофор — паранитроанилин, который и отщепляется ферментом. Его количество регистрируется спектрофотометрически. У флюорогенных субстратов в результате реакции, катализируемой тромбином, освобождается диметиловый эфир 5-аминоизофталевой кислоты, количество которого измеряют на флюориметре. В этих методах используются автоматические анализаторы, что обеспечивает быстроту, высокую чувствительность определения АТ III (Е. Holmes и соавт., 1981). Однако их широкое применение в отечественных лабораториях ограничено вследствие высокой стоимости и малой доступности хромогенных субстратов, выпускаемых зарубежными фирмами.

Реальным для клинических лабораторий является определение АТ III с использованием в качестве субстрата тромбина фибриногена. Имеются два варианта метода. В одном из них устанавливается концентрация АТ III в плазме крови в присутствии гепарина. Вносимый в избыток экзогенный тромбин полностью связывается с АТ III, содержащимся в плазме крови человека. Оставшийся несвязанным фермент определяется по свертыванию фибриногена. Количество связанного в реакции тромбина, измеряемое по разнице между внесенным в пробу и оставшимся после инкубации с плазмой, соответствует содержанию АТ III, поскольку фермент и ингибитор реагируют между собой стехиометрически в молярном соотношении 1:1. Концентрацию ингибитора выражают в процентах, принимая за 100 его содержание в нормальной стандартной плазме. Уровень АТ III у здоровых людей составляет 85—115 % от такового стандартной плазмы.

Во втором варианте устанавливается концентрация АТ III без добавления к плазме гепарина. В этом случае ее определение затрудняется тем, что в плазме крови присутствуют и другие ингибиторы тромбина, в частности, α_2 -М. При добавлении к плазме точного количества тромбина (без гепарина) АТ III инактивирует 75 % фермента, а α_2 -М — 25 %. Поскольку молярные концентрации двух ингибиторов близки, тромбин в начальном периоде быстрее связывается с АТ III, чем α_2 -М. С увеличением времени инкубации уровень АТ III в плазме быстро снижается, а доля участия в угнетении тромбина α_2 -М возрастает. При кратковременном выдерживании плазмы с тромбином (не более 5 мин) инактивирующим действием α_2 -М можно пренебречь и по начальной скорости связывания тромбина можно судить об активности АТ III. Это вариант метода непригоден для определения АТ III у больных, которым вводился гепарин.

Учитывая важную физиологическую роль АТ III, предпринимали исследования в клинике с диагностической целью. Интерес к изучению этого белка возник после обнаружения в 1965 г. его наследственного дефицита у членов одной норвежской семьи с предрасположенностью к тромбозу вен (E. Thaler, 1979). В последующие годы была описана недостаточность АТ III у больных с тромботическими осложнениями. Чаще всего клиническими признаками дефицита АТ III бывают тромбозы глубоких вен, легочная эмболия, синдром ДВС. Хирургическое вмешательство, инфекция, беременность являются факторами риска для лиц с недостаточностью АТ III. У 2/3 членов семей с наследственным дефицитом АТ III (содержание его 50 % от нормы) наблюдаются тромбозы (R. Kaufmann, 1978). В ряде случаев врожденный дефицит АТ III сопровождается недостаточностью других сывороточных антипротеиназ. Дефицит АТ III передается по наследству по аутосомно-доминантному пути.

Среди различных форм наследственной недостаточности АТ III, при которых имеется риск тромбообразования, не обнаружено форм с отсутствием этого ингибитора. Вероятно, полная потеря способности синтезировать этот белок сопровождалась бы летальным исходом.

Методом изоэлектрического фокусирования в полиакриламидном геле при pH 4—6,5 установлено, что АТ III, как и α_1 -ИП, присутствует в плазме крови человека в нескольких изоформах. Спектры изоингибиторов больных с наследственным дефицитом АТ III и здоровых людей значительно отличаются. Это позволяет с помощью данного метода обнаруживать врожденную недостаточность АТ III (G. Leone, 1983).

Описаны случаи наследственного дефицита АТ III, связанные с изменениями функциональной активности его молекулы (J. Mortensen, 1983). У 6 из 9 больных с глубокими венозными тромбозами

содержание АТ III, определенное иммунохимическим методом, было несколько выше нормы. Однако инактивация тромбина и фактора Ха в присутствии гепарина была замедленной. Считают, что плазма больных содержала 2 различные формы АТ III, одна из которых ингибировала тромбин и фактор Ха, а другая — дефектная — оказывала медленный инактивирующий эффект.

Известны случаи наследственных дефицитов АТ III, при которых резко снижена чувствительность ингибитора к гепарину (Т. Koide и соавт., 1983). У этих больных содержание АТ III, определяемое без гепарина, такое же, как у здоровых людей. Однако АТ III малоактивен в присутствии обычно используемых доз гепарина, а при резком их повышении до величин, не влияющих на эффективность нормального АТ III, аномальный ингибитор приобретает способность тормозить тромбин. Эти данные свидетельствуют о том, что сродство АТ III к гепарину в плазме больных резко снижено, что приводит к нарушению связывания АТ III с гепарином, в основе которого лежит образование нековалентных связей между компонентами комплекса. Можно полагать, что при таких формах наследственной патологии изменяется упорядоченная нативная структура молекулы АТ III, фиксированная топография функциональных групп, необходимых для образования связей между ингибитором и гепарином; сродство АТ III к гепарину уменьшается. Это изменение макроструктуры АТ III, вероятно, наступает в результате мутационного изменения его первичной структуры.

Недостаточность АТ III чаще является результатом не врожденного дефицита, а различных заболеваний (Г. В. Андреев и соавт., 1980; Н. Я. Лагутина, Г. А. Федулова, 1982). В патогенезе приобретенной недостаточности АТ III имеют значение многие факторы: нарушение синтеза этого белка при заболеваниях печени, его выход из кровеносного русла при болезнях почек, повышенное потребление ингибитора вследствие его взаимодействия с факторами свертывания крови, септициемии, усиления белкового катаболизма. При уменьшении уровня АТ III ниже 50 % нормы возникает реальная возможность развития тромбоэмболии. При тяжелом протекании гепатита, осложненного массивными тромбозами вен, концентрация АТ III снижается в такой же степени, как и факторов протромбинового комплекса II, VII, IX, X (Е. Thaler, 1979). Содержание АТ III уменьшается также в результате приема противозачаточных средств, содержащих эстрогены.

Уровень АТ III снижается в плазме крови больных тромбозами вен и эмболией легких (А. Воег и соавт., 1979). Уменьшение количества АТ III у больных, подвергшихся хирургическому вмешательству по поводу глубоких венозных тромбозов, коррелирует со степенью развития тромбоэмболий в послеоперационный период. В острой фазе ишемического инсульта активность АТ III

ниже, чем в норме, что, вероятно, связано с образованием неактивного комплекса антитромбин — тромбин в условиях повышенной свертываемости крови.

Уровень АТ III является важным биохимическим тестом для ранней диагностики внутрисосудистого свертывания крови. При этом состоянии организм наводняется активированными протеолитическими ферментами, на нейтрализацию которых расходуются ингибиторы, и в частности АТ III. Концентрация АТ III снижается при остром и хроническом течении процесса (R. Visk и соавт., 1980). В этих случаях исследование АТ III дает большую информацию, чем определение уровня фибриногена, тромбинового, частичного тромбопластинового и рептилазного времени. Исследование АТ III в динамике заболевания позволяет судить о потреблении ингибитора активированными факторами свертывания крови и эффективности терапии, в частности гепарином. Лечебный эффект последнего резко ослабляется вследствие уменьшения содержания АТ III. При этом целесообразно введение поливалентных антипротеиназ, которые ингибируют свертывание крови, фибринолиз, кининовую систему.

У больных с нефротическим синдромом различной этиологии значительно снижена активность АТ III, при лечении гепарином она постепенно нормализуется (Л. Р. Полянцева и соавт., 1979). Полагают, что причиной уменьшения количества ингибитора является процесс локальной и диссеминированной внутрисосудистой коагуляции, при которых АТ III связывается с ферментами, активирующимися при свертывании крови, а также с продуктами расщепления фибрина. Снижение концентрации АТ III в крови при нефротическом синдроме обусловлено его выведением с мочой (за 1 сутки выделяется примерно 5 г). Установлена взаимосвязь между концентрацией АТ III в сыворотке крови и фракцией альбуминов, имеющей приблизительно сходную с ингибитором молекулярную массу. Это позволяет высказать предположение о том, что уменьшение содержания АТ III обусловлено повышенной его фильтрацией через основную мембрану гломерул. Полагают, что недостаточность АТ III, вызванная его экскрецией с мочой, играет существенную роль в развитии венозных тромбозов у больных с нефротическим синдромом.

При сахарном диабете, особенно при сосудистых ретинопатиях, концентрация АТ III значительно падает, что объясняется усиленным его потреблением факторами свертывания крови (L. Moppieg и соавт., 1978). Одна из причин уменьшения АТ III в крови — его выход из внутрисосудистого русла вследствие повышения проницаемости эндотелия сосудов и повреждения токсинами гепатоцитов.

Снижение уровня АТ III не всегда связано с тромбоэмболическими осложнениями. Так, у больных циррозом печени содержа-

ние ингибитора резко уменьшается, хотя тромботические проявления отсутствуют. Для клинической картины этого состояния характерны кровотечения. Это свидетельствует о том, что в возникновении тромбозов кроме АТ III участвуют другие факторы, возможно, система прокоагулянтов.

Предпринимаются попытки применить препарат АТ III с лечебной целью при его наследственном дефиците. По данным Р. Lahaggague и соавторов (1980), введение человеческого АТ III больным (5 раз по 300 ед. в течение 2 сут) увеличивает количество белка в плазме крови в 2 раза. Лечение варфарином повышает как биологическую активность ингибитора, так и его содержание, определяемое по реакции с антигенами.

В настоящее время разработан метод промышленного производства концентрата АТ III из плазмы крови, включающий осаждение полиэтиленгликолем и хроматографию на гепарин-сефарозе (М. Wickerhauser и соавт., 1979). Препараты АТ III или его концентраты эффективны при синдроме ДВС в стадии гипо- и гиперкоагуляции (З. С. Баркаган, 1980). Они также показаны при обширных оперативных вмешательствах, при которых активируется система свертывания крови. Можно полагать, что препараты АТ III найдут широкое применение в хирургической клинике после обширных оперативных вмешательств.

α_2 -МАКРОГЛОБУЛИН

Одним из важнейших плазменных ингибиторов протеиназ является α_2 -М, образующий комплексы с протеиназами всех классов — сериновыми, тиоловыми, кислыми, металлозависимыми. Его можно отнести к одному из регуляторов активности протеолитических ферментов крови и тканей (F. Van Leuven, 1982).

О существовании особого ингибитора протеиназ в крови человека, способного видоизменять каталитические функции фермента, стало известно в 1962—1963 гг., когда независимо друг от друга В. А. Белицер, К. Н. Веремеенко и В. Naverback и соавторы обнаружили, что трипсин в присутствии избытка сывороточных ингибиторов сохраняет способность расщеплять протаминсульфат, низкомолекулярные синтетические субстраты, но не гидролизует высокомолекулярные белки. Дальнейшие исследования позволили объяснить это явление наличием в α_2 -глобулиновой фракции специфического белка, в комплексе с которым трипсин гидролизует протаминсульфат. Этот белок назвали ингибитором I в отличие от ингибитора II, который полностью инактивировал фермент (К. Н. Веремеенко, А. И. Кизим, 1964). Выделение ингибитора I из сыворотки крови человека, изучение его свойств дало возможность установить, что он тождествен белку, полученному В. Naverback (1962), и представляет собой α_2 -М.

Содержание α_2 -М в плазме взрослых практически здоровых людей составляет в среднем 2 г/л, варьируя в зависимости от пола и возраста. В плазме женщин уровень α_2 -М на 20 % выше, чем у мужчин. Концентрация этого белка значительно увеличена в плазме крови детей (1—3 лет) и равна 4,5 г/л. Считают, что местом синтеза α_2 -М является печень. α_2 -М присутствует не только в плазме крови, но и в таких внеклеточных жидкостях, как синовиальная, амниотическая, спинномозговая, лимфа, экссудаты, семя и др. (F. Van Leuven, 1982). α_2 -М, идентичный плазменному белку, обнаружен в субклеточных фракциях мембран и тромбоцитах. Данных о полном отсутствии этого белка нет. По-видимому, потеря способности его синтеза сопровождалась бы летальным исходом. Однако имеются сообщения о снижении уровня α_2 -М до 30—50 % в плазме крови 3 человек, у одного из них обнаружен синдром поражения соединительной ткани, два других практически здоровы (W. Borth, 1984).

У человека описаны 3 различные генетически полиморфные формы α_2 -М, обозначенные А, В, С. Они отличаются электрофоретической подвижностью и их наследование, вероятно, осуществляется по аутосомально-доминантному типу (P. Harpel, 1975).

Для выделения α_2 -М из плазмы крови человека или из ее фракции III по Кону предложены различные методы. В одних из них для фракционирования α_2 -М используют риванол, хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе (M. Steinbuch, 1972), в других — полиэтиленгликоль, риванол, гель-хроматографию на сефадексе G-200 (M. Song и соавт., 1975). Широкое применение находят методы ионообменной, аффинной, Zn^{2+} -хелатной хроматографии (R. Sutcliffe и соавт., 1980; T. Kurecki и соавт., 1979). Известен и способ выделения α_2 -М из плазмы крови человека при помощи сибакрон голубой сефарозы С6В и иммуноадсорбции (M. Bridges и соавт., 1982). В лаборатории биохимии Киевского НИИ отоларингологии им А. И. Коломийченко МЗ УССР в качестве адсорбента α_2 -М предложен кремнийорганический полимер — полиметил-силоксан, позволяющий получить препарат α_2 -М с биологической активностью 90—100 %.

При использовании различных методов препараты α_2 -М характеризуются гетерогенностью, что, вероятно, объясняется различием в составе углеводных групп в молекуле белка (J. Freney, P. Bourgillon, 1974). Молекула α_2 -М может существовать в двух формах, характеризующихся при электрофорезе в полиакриламидном геле неодинаковой подвижностью и другими свойствами. Электрофоретически медленная форма α_2 -М получила название S- α_2 -М, а быстрая — F- α_2 -М. По данным гель-хроматографии и изоэлектрического фокусирования, оба белка не отличаются изоэлектрическими точками и радиусами Стокса (A. Barrett, 1979). По структуре S- α_2 -М представляет собой планарный тетрамер, а

F- α_2 -M — псевдотетраэдральный, S-форма обладает свойством связывать протеиназы, а F-форма образуется из первой в результате воздействия на нее протеиназ, солей аммония, низкомолекулярных аминов (A. Barrett, 1981).

Активность α_2 -M зависит от температуры и pH среды. При температуре 40 °C трипсинсвязывающая активность частично очищенного α_2 -M полностью сохраняется. Инактивация наступает при 50 °C, а при 55—60 °C резко усиливается. При pH 4 α_2 -M примерно на 50 % теряет способность образовывать комплекс с трипсином, а при pH 2 необратимо денатурируется. Белок частично теряет активность в растворах $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (К. Н. Веремеенко, А. И. Кизим, 1970). Инактивирующее действие на α_2 -M оказывают алифатические амины, при этом он теряет способность связывать протеиназы. Обработка α_2 -M (pH 7,4) 0,25 M раствором метиламина уменьшает его плазминсвязывающую способность, а 0,25 M раствором гидразина — полностью лишает α_2 -M свойства образовывать комплекс с плазмином (P. Nagel, 1975). При быстром замораживании до -70 °C α_2 -M сохраняет активность в течение года, повторное же замораживание и оттаивание при более высокой температуре приводит к потере его биологической активности (P. Nagel, 1975).

Для определения α_2 -M в биологических жидкостях используют иммунологические и энзиматические методы. Первые основаны на применении специфических антисывороток (P. Nagel, 1975), вторые — на способности белка образовывать с протеиназой (например, трипсином) комплекс, нечувствительный к действию ингибитора из бобов сои (К. Н. Веремеенко, Л. И. Волохонская, 1969).

По химической природе α_2 -M представляет собой гликопротеин с молекулярной массой 716 000—725 000 дальтон, молекула которого состоит из тетрамера идентичных субъединиц, причем пары связаны между собой дисульфидными мостиками, а димеры — нековалентно. При относительно мягких условиях — pH 4 в присутствии 1 M раствора мочевины молекула α_2 -M диссоциирует на 2 половины с образованием фрагментов с молекулярной массой 360 000 дальтон. Эти полумолекулы можно раздробить путем обработки тиоловыми соединениями, в результате чего образуются компоненты с молекулярной массой 180 000 дальтон, которые и являются субъединицами белка.

В 1984 г. полностью расшифрована первичная структура α_2 -M. Его идентичные субъединицы содержат 1451 аминокислотный остаток, в N-концевом участке расположен серин, в C-концевом — аланин. Обнаружена локализация 11 дисульфидных мостиков — Цис₂₅-Цис₆₃, Цис₂₂₈-Цис₂₇₆, Цис₂₄₆-Цис₂₆₄, Цис₂₅₅-Цис₄₀₈, Цис₅₇₂-Цис₇₄₈, Цис₆₁₉-Цис₆₆₆, Цис₇₉₈-Цис₈₂₈, Цис₈₂₄-Цис₈₆₀.

Цис₈₉₈-Цис₁₂₉₈, Цис₁₀₅₆-Цис₁₁₀₄, Цис₁₃₂₉-Цис₁₄₄₄, Цис₄₄₇ одной субъединицы, возможно, образует мостик с Цис₄₄₇ другой субъединицы (L. Sottrup-Jensen и соавт., 1984). Аминокислотный состав α_2 -М определили ряд исследователей (P. Hall, R. Roberts, 1978; L. Sottrup-Jensen и соавт., 1984). В нём преобладающими в количественном отношении являются валин, лейцин, серин, глутаминовая кислота и треонин (137, 134, 122, 106 и 100 остатков соответственно на 1 субъединицу). Эти вещества составляют 41 % от всех остатков. В α_2 -М по сравнению с другими белками содержится относительно мало цистенна и триптофана (24 и 11 остатков соответственно на 1 субъединицу).

Аналогично другим гликопротеинам плазмы крови молекула α_2 -М содержит углеводы (8—10 %). Размер и заряд олигосахаридных цепей гетерогенен. В участке 1 субъединицы обнаружено 8 углеводных цепей, 5 из них — в N-концевом участке, 3 — в C-концевом. В состав углеводов входят манноза, N-ацетилглюкозамин, галактоза, N-ацетил-нейраминовая кислота и фукоза. Основные группы глюкозамина присоединяются к 8 остаткам аспарагина, расположенным в положениях 32, 47, 224, 373, 387, 846, 968 и 1401 (L. Sottrup-Jensen и соавт., 1984).

В молекуле α_2 -М обнаружены Ca^{2+} , Mg^{2+} (A. Dumitrescu и соавт., 1977). Этот белок является вторым после альбумина переносчиком Zn^{2+} в плазме (A. Parisi, B. Vallee, 1970). Имеются сообщения о том, что Zn^{2+} , Ca^{2+} могут служить функциональными активаторами конформационных изменений в молекуле α_2 -М (F. Van Leuven, 1982).

Изучение пространственной организации α_2 -М показало, что белок содержит 8,6 % α -спиралей и 35—60 % β -структур (L. Sottrup-Jensen и соавт., 1984). Моделью третичной структуры α_2 -М выбрана конформация β -бочонка преальбумина (G. Welinder и соавт., 1984).

В последние годы выполнены исследования, раскрывающие механизм взаимодействия α_2 -М с протеиназами. Образование комплекса между ферментом и ингибитором представляет собой сложную многоступенчатую реакцию. На первом этапе реакции активная протеиназа, обозначенная «П» реагирует с определенным участком молекулы α_2 -М. При этом образуется непрочный комплекс α_2 -М—П. На втором этапе фермент расщепляет специфическую пептидную связь, что приводит к конформационным изменениям молекулы белка (α_2 -М*). На третьем этапе протеиназа ковалентно присоединяется к особому участку в молекуле α_2 -М, что сопровождается образованием более компактной по сравнению с α_2 -М структурой. Наличие компактной структуры подтверждается результатами электронной микроскопии, рис. 11 (H. Schramm,

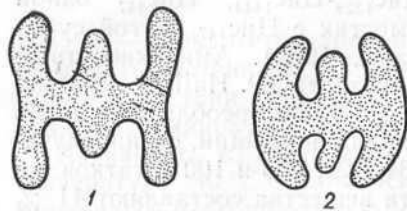
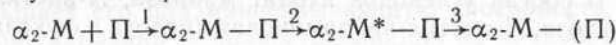


Рис. 11 Схематическое изображение макроструктуры α₂-М (1) и его комплекса с протеиназами (2)

W Schramm, 1982), увеличением скорости передвижения комплексов в полиакриламидном геле (P. Hargel, 1976), данными

дифференциальной сканирующей калориметрии (J. Chlembowski, K. Williams, 1983), повышением интенсивности флуоресценции (D. Straight, P. McKee, 1982). Захват протеиназы α₂-М приводит к блокированию ряда ее свойств, ограничению специфичности действия, что обозначено на схеме (П). Этапы реакции можно изобразить схематически (A Barrett, 1981, J Travis, G Salvesen, 1983) следующим образом:



В настоящее время в α₂-М расшифрована химическая природа участка, подвергающегося протеолитическому расщеплению, и участка ковалентного присоединения к протеиназам. Первый получил название зоны приманки, второй — внутреннего тиоэфира (по одной в каждой цепи). Установлено, что в молекуле α₂-М содержится 4 участка приманки, определена их аминокислотная последовательность и пептидные связи, гидролизующие различными протеиназами. Так, трипсин расщепляет связи Арг₆₈₁-Вал₆₈₂, Арг₆₉₆-Лей₆₉₇, плазмин, тромбин, субтилизин гидролизуют связь Арг₆₉₆-Лей₆₉₇, бычья эластаза — Вал₆₈₂-Гли₆₈₃, папаин — Гли₆₈₃-Фен₆₈₄, Гис₆₉₉-Вал₇₀₀, химотрипсин — Тир₆₈₅-Глу₆₈₆. Протеиназы различных классов расщепляют пептидные связи, локализованные вблизи середины полипептидной цепи субъединицы α₂-М. В результате этого образуются две половины цепи с молекулярной массой 85 000 дальтон.

Участок приманки действует как естественный субстрат для протеолитических ферментов. Для одних из них, например, трипсина, химотрипсина, эластазы нейтрофильных гранулоцитов, катепсина, он является лучшим субстратом, чем для других, — плазмина, тромбина. В случае плазмина это объясняется тем, что в зоне приманки отсутствует лизин, образованные им пептидные связи данный фермент расщепляет предпочтительнее связей аргинина.

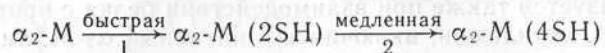
В результате протеолитического гидролиза специфических пептидных связей в зоне приманки молекула α₂-М подвергается структурным изменениям, приводящим к попаданию фермента в «ловушку» и раскрытию специальных связывающих его участков. Химическая природа последних установлена с помощью низкомолекулярных нуклеофильных агентов — первичных аминов, в

частности метиламина. При обработке метиламином α_2 -М из электрофоретически медленной формы превращается в быструю, которая образуется также при взаимодействии белка с протеиназой. Кроме того, метиламин, включаясь в нативный α_2 -М, лишает его способности присоединяться к протеиназам, т. е. конкурирует за специфические связывающие участки в молекуле α_2 -М. Последующие исследования показали, что метиламин присоединяется к глутаминовому остатку α_2 -М в молярном соотношении 4:1 с образованием γ -глутамил-метиламида, при этом высвобождаются 4 тиоловые группы цистеина (ни одна из них не содержится в молекуле исходного α_2 -М). Это позволило предположить, что нативный α_2 -М содержит внутренний тиоэфир, который относительно стабилен и стерически защищен от взаимодействия с большими нуклеофильными агентами, такими, как белки, но раскрывается как высокореактивная группа после протеолитического расщепления участка «ловушки» или путем нуклеофильного ацилирования тиоэфира.

Внутренний тиоловый эфир образуется между β -SH-группами Цис₉₄₉ и γ -карбонильной группой Глх₉₅₂, который реагирует с метиламином. В протеиназах химическими группами, ответственными за реакцию взаимодействия с α_2 -М, могут быть аминокислоты основных аминокислот. Как показали эксперименты, при взаимодействии фермента с ингибитором образуется изопептидная связь γ -Глу- ϵ -Лиз между лизином протеиназы и глутаминовой кислотой α_2 -М. Об этом свидетельствует тот факт, что трипсин, в котором блокированы остатки лизина, в меньшей степени реагирует с α_2 -М (F. Van Leuven, 1982).

Коэффициент связывания протеиназ зависит от скорости их вовлечения в «ловушку» α_2 -М и варьирует в зависимости от ряда факторов: величины молекул фермента, их субстратной специфичности, температуры, концентрации реагирующих веществ. Скорость взаимодействия между α_2 -М и относительно специфическими протеиназами с большой молекулярной массой (подобными тромбину и плазмину) значительно меньшая, чем между α_2 -М и ферментами, имеющими относительно широкую специфичность и небольшую молекулярную массу (трипсином, химотрипсином, эластазой, катепсином). Так, константа первичной скорости связывания α_2 -М с трипсином составляет $2 \cdot 10^7$ моль⁻¹/с⁻¹, для плазмина и α_2 -М она равна $5 \cdot 10^5$ моль⁻¹/с⁻¹. Ход присоединения протеиназ к участку тиолового эфира α_2 -М прослежен на примере трипсина. Так как белок-белковое взаимодействие происходит очень быстро (время исчисляется секундами), то его изучали в присутствии сильного конкурентного ингибитора фермента — бензамидина и оценивали по накоплению образовавшихся тиоловых групп, концентрации расщепленных субъединиц и изменению внутренней флюоресценции. Согласно полученным данным, реакция взаимо-

действия протеиназы с α_2 -М двухступенчатая, ее можно представить в виде такой схемы:



На первом (быстром) этапе в результате присоединения протеиназы к тиоловому эфиру образуется лишь половина SH-групп, на втором (медленном) — освобождается другая половина SH-групп. При взаимодействии α_2 -М с небольшими концентрациями трипсина образуется комплекс, в котором молярное соотношение компонентов составляет 1:1, и при этом освобождается одна пара SH-групп. В результате комплексообразования α_2 -М с высокими концентрациями фермента освобождается две пары SH-групп. Молярное соотношение реагирующих веществ равно 1:2. Хотя α_2 -М содержит 4 субъединицы с идентичной первичной структурой, он может максимально связывать лишь 2 моль трипсина. Независимо от концентрации фермента степень ковалентного связывания для трипсина составляет 60—70 % (U. Christensen, L. Sottrup-Jensen, 1984). Остальная часть трипсина удерживается в комплексе за счет нековалентных связей. Максимальный коэффициент связывания для плазмина, тромбина равен 1, химо-трипсина — 1,4. Полагают, что наблюдаемое для крупных молекул протеиназ (плазмина, тромбина) отклонение от коэффициента связывания 2:1 объясняется тем, что после гидролиза $\text{Arg}_{696}^{\text{H}_2\text{O}}$ Лей₆₉₇ в молекуле α_2 -М часть «ловушек» захлопывается раньше, чем молекулы фермента успевают в нее проникнуть (J. Vjork, Ingemar, 1984).

Таким образом, последовательность образования комплекса следующая: протеиназа реагирует с участком или участками α_2 -М приманки, расщепляет в нем определенные пептидные связи в реакции ограниченного протеолиза, что приводит к конформационным изменениям молекулы ингибитора, раскрытию внутреннего тиоэфира, с которым протеиназа ковалентно соединяется, что сопровождается высвобождением SH-групп. Считают, что образовавшиеся комплексы протеиназа — α_2 -М стабильны и не диссоциируют (A. Barrett, P. Starkey, 1973). Однако имеются сообщения о том, что модифицированные формы трипсина (метилтрипсин), тромбина (метилтромбин), а также нативные формы ферментов высвобождаются из комплексов с α_2 -М под действием избытка других блокированных по остаткам лизина или нативных протеиназ (D. Wang и соавт., 1983).

α_2 -М обладает также способностью присоединяться нековалентно к некоторым протеиназам, модифицируя их субстратную специфичность, и белкам неферментативной природы. К ним относятся основные белки — карбоксипептидаза А, аспаратами-нотрансфераза, миелин, гистон. Они, по-видимому, обратимо реа-

гируют с α_2 -М своими гидрофобными и ионными участками (G. Salvesen, J. Travis, 1983). Характер взаимодействия α_2 -М с протеиназами всех классов уникален в том отношении, что активный центр ферментов остается свободным: в связанном виде с α_2 -М они сохраняют способность гидролизовать некоторые синтетические субстраты, а также белки, молекулы которых не имеют высокоорганизованной вторичной или третичной структуры.

Наиболее подробно изучена расщепляемость различных субстратов комплексом трипсин — α_2 -М. Большинство белков (альбумин, миозин, фибриноген) либо устойчивы к его действию, либо расщепляются им слабо (казеин, гемоглобин, инсулин). Исключение составляет щелочной белок протаминсульфат, который, как и синтетические субстраты ТАМЭ и БАПНА, гидролизуется комплексносвязанным трипсином со скоростью, аналогичной таковой свободного фермента. В комплексе с α_2 -М трипсин приобретает устойчивость к аутолизу и действию других белковых ингибиторов (α_1 -ИП, ингибитору из бобов сои), что положено в основу его определения. α_2 -М характеризуется высоким сродством к трипсину. Константа скорости реакции фермента с α_2 -М в 6—7 раз превышает таковую с α_1 -ИП (Е. Л. Ходорова и соавт., 1969).

α_2 -М — один из ингибиторов фибринолиза. В комплексе с α_2 -М плазмин слабо расщепляет фибриноген, VIII фактор свертывания крови — на 0,1 и 0,5 % соответственно (P. Nagel, 1973, E. Vantera и соавт., 1980). Комплекс плазмин — α_2 -М на 50 % гидролизует хромогенный субстрат Н-Д-Вал-Лиз-п-нитроанилид (E. Gyzander, A. Teger-Nillson, 1980). Плазмин в связанном с α_2 -М состоянии со значительной скоростью гидролизует фибрин, но обладал незначительной фибринолитической активностью (К. Н. Веремеенко и соавт., 1984). Установленные факты существенны для понимания фибринолитического действия плазмينا в организме, где небольшие дозы фермента оказывают фибринолитический, а не фибриногенолитический эффект.

α_2 -М является одним из ингибиторов свертывания крови, обеспечивающим около 25 % антитромбинового потенциала плазмы крови (Д. М. Зубанов, 1978; U. Abildgaard, 1979). α_2 -М — медленный антитромбин: потеря свертывающей способности тромбина усиливается с удлинением времени его взаимодействия с ингибитором и составляет 95 % исходной (H. Rinderknecht, M. Geokas, 1973). Тромбин угнетается α_2 -М в плазме человека менее эффективно, чем антитромбином III (основным ингибитором этого фермента). Гепарин ускоряет взаимодействие АТ III с тромбином, но не влияет на скорость связывания тромбина с α_2 -М. Кроме того, тромбин в комплексе с α_2 -М не реагирует с гепарином, поскольку центр связывания последнего с ферментом может быть блокирован в результате его вовлечения в «ловушку» α_2 -М (F. Pochon и соавт., 1982). Другие серино-

вые протеиназы системы свертывания крови — факторы XIIa, IXa, XIa, VIIa не подавляются α_2 -M, что, по-видимому, объясняется неспособностью расщеплять пептидные связи в зоне прианки ингибитора.

α_2 -M служит главным ингибитором кининообразующих ферментов плазмы крови. Он полностью угнетает их биологическую активность (эффект на повышение сосудистой проницаемости, сокращение гладкой мускулатуры), но эстеразная активность при этом на 50 % сохраняется. Степень инактивации фермента α_2 -M зависит от концентрации последнего и времени взаимодействия компонентов. Ингибитор непосредственно на кинины не влияет. Секреторные калликреины α_2 -M не угнетаются. В связанном с α_2 -M состоянии калликреин становится малочувствительным к инактивирующему действию своего основного ингибитора СИ и соевого ингибитора (D. McConnell, 1972).

Большинство авторов полагают, что протеиназы имеют один и тот же участок связывания в молекуле α_2 -M (зона внутреннего тиолового эфира). В опытах *in vitro* установлено, что сразу же связавшись, протеолитический фермент не может быть вытеснен из комплекса с α_2 -M другой протеиназой. Так, трипсин и химотрипсин не могут вытеснить папаин и катепсин В из их комплекса с α_2 -M. Плазмин и тромбин способны в равной степени конкурировать за эквивалентное связывание с α_2 -M (J. Travis, G. Salvesen, 1983). Вероятно, подобная конкуренция между ферментами существует и *in vivo*.

Приведенные данные позволяют заключить, что α_2 -M не полностью подавляет каталитическое действие протеиназ, а лишь сужает их субстратную специфичность, поэтому более правильным было бы назвать его ограничителем (рестриктором) ферментативных функций протеолитических ферментов.

Вследствие широкой специфичности в отношении различных протеолитических ферментов α_2 -M может выполнять защитные функции. Наши знания по этому вопросу ограничены, но к настоящему времени начали пополняться конкретными сведениями. Анализ литературы показывает, что α_2 -M инактивирует большинство протеиназ, но особенно быстро неспецифические, обладающие широким спектром действия (эластазу, катепсин G, протеиназы из лейкоцитов). В условиях патологии эти ферменты накапливаются в организме и оказывают деструктивные воздействия на тканевые структуры бронхолегочного дерева, соединительной ткани, сосудов, а также способствуют освобождению вазоактивных соединений, участвующих в регуляции сосудистого тонуса, процессов микроциркуляции. Кроме того, α_2 -M может образовывать защитный барьер против патогенных микробов и паразитов, которые внедряются в организм с помощью выделяемых ими протеолитических ферментов. Этот бе-

лок способен инактивировать протеиназы из яда некоторых видов змей при их попадании в кровь.

Получены данные о роли α_2 -М в защите белков соединительной ткани от деструктивного воздействия таких специфических протеиназ, как коллагеназа и эластаза (W. Borth, 1984). α_2 -М обнаруживаются в синовиальной жидкости воспаленных суставов, он предохраняет белковые структуры соединительного матрикса от влияния указанных выше протеиназ. Так, нейтрофильная эластаза, которая расщепляет различные компоненты соединительной ткани (эластин, коллаген III типа, протеогликан, фибронектин) лишена протеолитической активности, когда связана с α_2 -М. Растворимые же низкомолекулярные пептиды эластина легко разрушаются комплексом.

Роль α_2 -М сильно выражена в регуляции процессов свертывания крови и фибринолиза, в частности при чрезмерной их активации, наблюдаемой при диссеминированном внутрисосудистом свертывании крови. При этом α_2 -М выполняет функцию нейтрализации активированных протеиназ крови, поскольку потенциальная способность других сывороточных ингибиторов протеиназ (АТ III, α_2 -АП) исчерпывается. α_2 -М при данных патологических состояниях берет на себя основную роль ингибирования протеолитических ферментов крови.

Одну из предполагаемых функций α_2 -М связывают с удалением активированных ферментов протеолиза из кровотока. Комплексы плазмин — α_2 -М, тромбин — α_2 -М исчезают из кровообращения быстрее (30 мин), чем свободный α_2 -М (часы). Из крови и внесосудистого пространства комплексы удаляются при помощи специальной структуры в молекуле α_2 -М (участок «узнавания»), которая распознается клеточными рецепторами ретикулоэндотелиальной системы и не относится к участку приманки и тиоэфиру (F. Van Leuven, 1982). Комплексы α_2 -М с ферментами, а не нативный α_2 -М, удаляются эндоцитозом фибробластами и макрофагами, имеющими на своей поверхности рецепторы. Полагают, что последние активно отвечают на присутствие комплексов протеиназа — α_2 -М ускорением синтеза коллагена или угнетением специфической коллагеназы в околкеклеточном матриксе (W. Borth, 1984)

С помощью ионообменной хроматографии в сочетании с гелехроматографией осуществлена стократная очистка мест связывания α_2 -М, выделенных из спонтанно трансформированных фибробластов линии NIH-3T3. Очищенные рецепторы представляют собой кислый белок с радиусом Стокса 4,5—5 нм (J. Napover и соавт., 1983). Узнавание рецепторами комплекса не зависит от природы включенной в него протеиназы, так как ими распознается, очевидно, измененная конформация молекулы ингибитора. Это подтверждается тем, что F- α_2 -М, обработанный метиламином,

удаляется эндоцитозом таким же образом, как и α_2 -М, связанный с протеиназой (J. Travis, G. Salvesen, 1983). Так как α_2 -М специфически связывается с внутренней поверхностью эндотелиальной выстилки кровеносных и лимфатических сосудов, возможно, он участвует в регуляции протекновения у поверхности эндотелия (А. Я. Фриденштейн, Е. А. Лурия, 1980). Получены данные о роли α_2 -М в иммунных реакциях организма (К. James, 1980; J. Travis, G. Salvesen, 1983). α_2 -М синтезируется в культуре клеток моноцитами и фиксированными легочными макрофагами (Т. Нови и соавт., 1977). α_2 -М, продуцируемый лимфоцитами, может изменять их реакции на специфические и неспецифические стимулы (К. James, 1980). Эти факты имеют большое значение, так как лимфоидные, моноцитарные и гранулоцитарные клетки секретируют также различные протеолитические ферменты в ответ на иммунологические и другие воздействия.

Нативный α_2 -М и его субъединицы оказывают ингибирующее действие на активность естественных клеток-киллеров и антителозависимую опосредованную клетками цитотоксичность (Р. Гвагна и соавт., 1982). α_2 -М способен связываться с мембранами клеток ретикулоэндотелиальной системы — лимфоцитами, сегментоядерными нейтрофильными гранулоцитами, макрофагами. Полагают, что при взаимодействии протеиназ с α_2 -М в последнем обнажается гидрофобный участок, который и присоединяется к рецептору на поверхности макрофага (С. Вежер, Р. Нарпел, 1976).

α_2 -М изменяет реакции лимфоцитов на хемотаксические, митогенные факторы, лимфокины, лектины и чужеродные антигены (К. James, 1980). Например, он подавляет хемотаксическую реакцию моноцитов в ответ на воздействие активатора плазминогена или калликреина, которые образуются при активации фибринолиза и кининогенеза посредством ФХ. α_2 -М тормозит также реакцию нейтрофильных гранулоцитов на С3а и С5а (К. James, 1980). В высоких дозах α_2 -М подавляет синтез и секрецию продуцируемого сенсibilизированными лимфоцитами фактора, угнетающего миграцию макрофагов (R. Davis и соавт., 1971). Белок влияет на способность макрофагов и нейтрофильных гранулоцитов мигрировать в участки воспаления, а также на синтез и освобождение некоторых растворимых медиаторов (К. James, 1980). По-видимому, это проявляется либо локально, либо системно путем регуляции активных протеиназ в микросреде клеточной поверхности в результате их связывания α_2 -М с последующим удалением образовавшегося комплекса ретикулоэндотелиальной системой.

Благодаря высокой реактивности α_2 -М обладает способностью связывать лимфокины — растворимые биологические соединения, образующиеся при взаимодействии сенсibilизированных лимфоцитов со специфическим антигеном. α_2 -М может воздействовать на опосредуемые лимфокинами фазы воспалительных и дру

гих иммунных реакций посредством различных механизмов: нейтрализацией цитопатогенных протеиназ, торможением синтеза и освобождения определенных растворимых медиаторов и др. (H. Remold, R. Rosenberg, 1975). Иммунологическое значение имеет также его взаимодействие с лектинами — конканавалином А и фитогемагглютинином (K. James, 1980).

Таким образом, α_2 -М ингибирует протеиназозависимые реакции, участвующие в иммунологических процессах, его можно рассматривать как важный компонент иммунной системы организма.

Учитывая важную роль α_2 -М в регуляции и модификации активности протеолитических систем крови и тканей, исследование уровней этого белка стали широко использовать в клинике. Приобрело значение изучение α_2 -М и других сывороточных антипротеиназ при острых панкреатитах, в патогенезе которых существенную роль играет активация протеолитических ферментов в пораженной ткани и крови, что вызывает нарушение динамического равновесия между протеолизом и его ингибиторами (К. Н. Веремеенко и соавт., 1976).

В сыворотке крови больных вирусным гепатитом уровень α_2 -М, исследуемый энзиматическим тестом, снижен и особенно значительно при тяжелых формах заболевания (К. Н. Веремеенко и соавт., 1975). Повышение содержания этого белка при остром вирусном гепатите, обнаруженное с помощью метода радиальной иммунодиффузии, вероятно, связано с определением различных форм α_2 -М как обладающих способностью образовывать активные комплексы с протеиназами, так и не вступающих во взаимодействие с ферментом. Частично деградированные формы α_2 -М, отличающиеся электрофоретической подвижностью, выявлены в сыворотке крови больных циррозом печени (С. Orley, 1980). У больных холецистохолангитами и гемолитическими анемиями, сопровождающимися желтухой, уровень α_2 -М не отличался от нормы (П. С. Мощич и соавт., 1980).

Концентрация α_2 -М падает на ранних стадиях ожоговой болезни (в стадии токсемии), а при ее благоприятном течении нормализуется (Т. С. Пасхина и соавт., 1972, 1976). Снижение уровня этого белка может быть связано с изменением сосудистой проницаемости и его выходом из ожоговой раны, а также обусловлено его главной физиологической функцией — связыванием с активизирующимися протеиназами и выведением их из сосудистого русла.

При инфекционном мононуклеозе установлен параллелизм между увеличением содержания сывороточного α_2 -М и нарушением клеточного иммунитета (J. Svejda, V. Kral, 1982). При введении контрацептивных препаратов уровень α_2 -М нарастает в сыворотке крови, что рассматривается как гиперкоагуляционное состояние, вызванное оральным применением этих веществ (D. Paternoster и соавт., 1982). Увеличение содержания α_2 -М

обнаружено в плазме крови наряду с параллельным резким уменьшением уровня АТ III при болезнях почек и раннем отторжении почечного трансплантата (V Wagner, M Wagnerova, 1977). Высокие концентрации α_2 -М определены при сахарном диабете, особенно при нарушении функции почек и диабетических микроангиопатиях (К. Н. Веремеенко и соавт., 1970).

Существенные различия в уровне сывороточного α_2 -М отмечены также при злокачественных новообразованиях (R. Adlin и соавт., 1975), бронхитах, эмфиземе легких (D. Burnett, A. Stockley, 1981). Установлена прямая корреляция между возрастанием содержания α_2 -М и метастазированием опухоли. При ряде заболеваний выявлены качественные изменения этого глобулина. Так, α_2 -М сыворотки крови больных с цистифиброзом свойственна не только сниженная способность связывать папаин, трипсин, тромбин, но и изменение углеводного компонента его молекулы (M. Parsons, J. Romeo, 1980). При иммуноэлектрофорезе сывороток крови больных кистозной болезнью получали 2 фракции протеолитической активности, сывороток крови здоровых людей — 3, что объясняется отсутствием комплекса протеиназа — α_2 -М при данной патологии (E. Shapiro и соавт., 1976). С помощью электрофокусирования сыворотки крови больных рассеянным склерозом обнаружена атипичная фракция белка, которая, как предполагают, не содержит сиаловой кислоты, необходимой для транспорта глобулина, и выделяется в повышенном количестве в результате демиелинизации (S. Rastogi, J. Clausen, 1980)

α_2 -М определяют с диагностической целью не только в сыворотке крови, но и в других биологических жидкостях. Его содержание значительно увеличено в синовиальной жидкости больных артритом (в норме не обнаруживают). В полости сустава больных ревматическим остеоартрозом определяется в основном α_2 -М, связанный с протеиназами (D. Lewis, 1977). Местом локализации данного ингибитора является цитоплазма макрофагов и фибробластов, свободных и фиксированных на тканях (W Borth, 1984)

При обструктивных заболеваниях дыхательных путей увеличивается уровень α_2 -М в бронхиальном секрете, что связывают с повышенной трансудацией белков из крови во время воспаления (D Burnett, A. Stockley, 1981) Исследование содержания α_2 -М в амниотической жидкости целесообразно для диагностики внутриутробного врожденного расщепления остистых отростков позвонков (F. Van Leuven, 1982).

В последнее время изучается возможность применения α_2 -М в качестве терапевтического средства. В ряде работ указывается на значительное облегчение течения лучевой болезни при введении животным этого белка (П. А. Михайлов и соавт., 1978; О. С. Семюта, 1982; J. Sontag и соавт., 1971). Отмечено, что α_2 -М обладает способностью восстанавливать кроветворение и увеличивать до

75 % выживаемость животных, облученных дозой 750 Р. Такое облучение резко подавляло биосинтез белка и нуклеиновых кислот в костном мозге, селезенке и лимфатических узлах животных. Внутривенное введение животным 10 мг α_2 -М на 100 г массы тела нормализовало синтез РНК и ДНК в лимфоидных органах и костном мозге, причем в последнем нормализация наступала раньше (Л. И. Симонова и соавт., 1979).

α_2 -М восстанавливает способность селезенки и печени крыс к синтезу глобулинов и гистонов после облучения (Е. М. Чаговец и соавт., 1976), оказывает благоприятное воздействие на лейко- и эритропоэз (J. Sontag и соавт., 1971). Исследования на летально облученных мышах показали, что введение гомологического или гетерологического α_2 -М стимулировало регенерацию лимфопоэтических и гранулоцитарных элементов и значительно снижало частоту летальности (P. Nettesheim и соавт., 1968). α_2 -М, по-видимому, влияет на дифференциацию, а не на пролиферацию лимфоцитов. Некоторые из этих эффектов связаны с тем, что белок как бы «убирает» клеточные остатки после облучения (K. James, 1980).

При морфологических и гистохимических исследованиях лимфоидных органов облученных крыс, леченных α_2 -М, отмечалось значительное морфологическое восстановление клеточных элементов вилочковой железы, селезенки, подмышечных лимфатических узлов; репаративная реакция со стороны иммунокомпетентных органов была выражена резче, чем у животных, не получавших α_2 -М (И. А. Михайлов и соавт., 1978).

Изучение влияния α_2 -М на состояние некоторых неспецифических защитных реакций у крыс в ранний период лучевой болезни показало, что введение животным этого белка задерживает снижение бактерицидности крови, обусловленное действием радиации, почти в 2 раза повышает процент фагоцитирующих лейкоцитов, вызывает дальнейший рост опсоинов в крови, способствующих перевариванию фагоцитами чужеродного материала (Л. И. Симонова и соавт., 1974). При введении препарата α_2 -М значительно возрастает уровень α_1 -глобулинов, что можно расценивать как активацию первой фазы защитного «гликопротеинового ответа» — неспецифической реакции организма на действие лучевого фактора (Л. И. Симонова и соавт., 1974). Эти данные свидетельствуют о возможности использования α_2 -М как биостимулятора для повышения интенсивности репарационных процессов при лучевой болезни и других патологических состояниях. Имеются сообщения о цитотоксическом действии α_2 -М на опухолевые клетки человека и мышей (А. Коо, 1983).

Изложенные сведения свидетельствуют о важной физиологической роли α_2 -М, его участии в регуляции важнейших протеолитических систем крови, ответственных за процессы гемостаза, фибринолиза, кининогенеза. В литературе приведены также данные,

указывающие на способность α_2 -М контролировать внеклеточные протеолитические системы тканей, участвовать в удалении активированных протеиназ эндогенного и экзогенного происхождения из кровотока, иммунном ответе организма, метаболизме соединительной ткани. Дальнейшее исследование этого высокореактивного белка расширит наши знания о его биологическом значении и возможности применения в клинике.

α_2 -АНТИПЛАЗМИН

В 1972 г. S. Müllertz высказал предположение о существовании особого ингибитора фибринолиза в плазме крови умерших людей, который в отличие от известных антипротеиназ — α_2 -М и α_1 -ИП быстро взаимодействовал с плазмином плазмы, обработанной урокиназой. Позднее этот ингибитор был выделен и охарактеризован независимо друг от друга тремя группами исследователей: D. Colleen — в Бельгии, M. Moroi, N. Aoki — в Японии, S. Müllertz, I. Clemmensen — в Дании (S. Müllertz, 1979). Он стал известен под разными названиями: первый плазминовый ингибитор, α_2 -ингибитор плазмينا, антиплазмин, первичный ингибитор фибринолиза и α_2 -АП. Международный комитет по тромбозам и гемостазу предложил термин « α_2 -антиплазмин», который в настоящее время является общепринятым.

Согласно современным представлениям, α_2 -АП — это основной быстродействующий ингибитор плазмина (N. Aoki и соавт., 1978). При электрофорезе он перемещается в зоне α_2 -глобулинов. По данным иммунохимического исследования, его содержание в плазме крови здоровых людей равно 50—70 мг/л. Ингибитор получен в гомогенном виде, что подтверждено диск- и иммуноэлектрофорезом. Методы очистки α_2 -АП различны, но в основном они включают аффинную хроматографию на сефарозе 4 В, канавалин-А-сефарозе или ДЭАЭ-целлюлозе. Недавно предложен простой одноэтапный метод выделения α_2 -АП из плазмы крови, из которой был удален плазминоген. Он заключается в аффинной хроматографии плазмы на фрагменте тяжелой цепи плазминогена, присоединенного к сефарозе (B. Wiman, 1980). Выход гомогенного белка составляет 50—60 %.

α_2 -АП представляет собой гликопротеин, молекула которого состоит из одной полипептидной цепи и содержит 11—14 % углеводов на 1 моль белка — 10 моль сиаловых кислот, 30 моль гексозы и 7 моль глюкозамина (B. Wiman, 1981). Одноцепочечный белок стабилизирован 3 дисульфидными связями, 2 из них легко восстанавливаются и S-карбоксиметилируются без потери активности. Молекулярная масса ингибитора, определенная методом электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия и седимен-

тационного равновесия, равна 65 000—70 000 дальтон. Коэффициент седиментации — 3,45S. Молекула асимметрична, в ней содержится 16 % α -спиралей, 19 % β -структур, 65 % — беспорядочной спиральной структуры.

Частично расшифрована аминокислотная последовательность α_2 -АП, которая мало похожа на таковую в АТ III и α_1 -ИП. N-концевой аминокислотой является аспарагин, C-концевой — лейцин. При хранении в растворе, а также повторном замораживании и оттаивании α_2 -АП быстро теряет активность, но сохраняет ее при лиофилизации. Для определения содержания α_2 -АП используют хромогенные (D-валил-лейцил-лизин-п-нитроанилид-S-2251), флюорогенные субстраты (диметиловый эфир D-валил-лейцил-лизин-аминоизофталевой кислоты) и фибрин (D. Lawson и соавт., 1979). Применяемые методы основаны на способности α_2 -АП торозить расщепление этих субстратов плазмином.

Характерной особенностью α_2 -АП является то, что он подавляет фибринолитическую и эстеразную активность плазмينا практически мгновенно даже при 0 °С в отличие от α_2 -М, инактивирующее действие которого усиливается с увеличением времени взаимодействия с ферментом. Большое сродство к плазмину определяет его важную роль в регуляции фибринолиза *in vivo*.

В опытах *in vitro* ингибитор реагирует также с трипсином, плазменным калликреином, химотрипсином, тромбином, фактором XIa свертывания крови (H. Saito и соавт., 1979). Отмечено ингибирование прекалликреинактивирующего действия фрагментов ФХ и кининогеназной активности калликреина α_2 -АП в концентрации 50 мкг/мл. Угнетение указанных ферментов, за исключением трипсина, очень медленное и поэтому мало вероятно, чтобы α_2 -АП контролировал активность этих протеиназ в организме. α_2 -АП взаимодействует с трипсином относительно быстро (K_{acc} равна $1,8 \cdot 10^6$ моль⁻¹/с⁻¹) с образованием эквимольного устойчивого комплекса, что свидетельствует, по-видимому, о его участии в регуляции каталитической функции этого фермента. α_2 -АП не угнетает факторы IXa и Xa, протеиназу C1s, а также папаин и эластазу нейтрофильных гранулоцитов, освобождающуюся при воспалительных процессах.

Связывание плазмينا с α_2 -АП зависит от используемых препаратов фермента (K_{acc} колеблется от $1,8 \cdot 10^7$ моль⁻¹/с⁻¹ до $3,8 \cdot 10^7$ моль⁻¹/с⁻¹ при 25 °С) и происходит в два этапа. На первом — быстром этапе — образуется обратимый комплекс фермент — ингибитор, который на втором — медленном — превращается в необратимый комплекс. L-лизин в концентрации 0,25—0,5 моль влияет только на первый этап. Необходимо подчеркнуть, что взаимодействие плазмينا с α_2 -АП преимущественно в начальной стадии представляет собой одну из самых быстрых белок-белковых реакций. Ее скорость на порядок выше таковой трипсина

с α_2 -АП. Быстрота связывания обусловлена наличием свободных ЛСУ в тяжелой цепи плазмина. Их блокирование 6-аминогексановой кислотой в 10 раз уменьшает K_{acc} . Важность ЛСУ для комплексообразования плазмина с α_2 -АП подтверждается также тем, что на реакцию этого ингибитора с трипсином, не содержащим таких участков, 6-аминогексановая кислота не влияет даже при высокой концентрации (0,1 моль). Однако при взаимодействии α_2 -АП с плазмином решающую роль играет активный центр последнего. Это доказывается тем, что изолированная легкая цепь фермента связывается с ингибитором необратимо и теряет при этом каталитическую активность. Мини-плазмин также реагирует с α_2 -АП в 2 стадии, но скорость первой стадии значительно ниже, чем с интактным плазмином, а второй стадии одинакова, что объясняется присутствием в мини-плазмине активного центра. При образовании комплекса плазмин расщепляет специфическую лейцил-метиониновую связь в С-концевом участке молекулы α_2 -АП, затем образуется ковалентная связь между активным серином фермента и карбоксильной группой лейцина в молекуле ингибитора. Комплексообразование сопровождается конформационными изменениями в α_2 -АП, что нарушает его антигенные детерминанты. Описана частичная локализация 4 типов антигенных детерминант. Так, детерминанты первого типа находятся в N-концевом участке молекулы α_2 -АП и не изменяются при взаимодействии с плазмином, детерминанты второго и третьего типа, расположенные в С-концевом участке, чувствительны к протеолизу плазмином и модифицируются при комплексообразовании.

α_2 -АП ингибирует процесс фибринолиза несколькими путями. В отличие от других антиплазминов и, в частности, от α_2 -М, этот ингибитор в физиологических концентрациях препятствует плазминогену адсорбироваться на фибрине, конкурируя за ЛСУ. В очищенной системе Глу-Пг имеет более слабое сродство к фибрину, чем Лиз-Пг. Присоединение α_2 -АП к плазминогену вызывает конформационные изменения в его молекуле, что приводит к частичному или полному блокированию связывающего участка. Уменьшая способность профермента соединяться с нитями фибрина, α_2 -АП снижает количество образующегося плазмина на поверхности сгустка и замедляет фибринолиз. В присутствии 6-аминогексановой кислоты образуется диссоциирующий комплекс α_2 -АП-плазмин, что объясняется, по-видимому, наличием общего специфического связывающего участка в молекуле плазминогена для α_2 -АП и синтетического ингибитора (N. Aoki и соавт., 1978).

α_2 -АП не только мешает адсорбции плазминогена на фибрине, но и соединяется поперечными связями с волокнами фибрина, делая сгустки менее чувствительными к лизису плазмином. Ингибитор ковалентно связывается главным образом с А- α -цепями фибрина, которые наиболее чувствительны к действию плазмина.

Для специфического взаимодействия α_2 -АП с плазмином необходимо присутствие фактора XIIIa, тромбина и Ca^{2+} . При дефиците в плазме фактора XIIIa способность ингибитора соединяться с волокнами фибрина исчезает.

Новым доказательством физиологической роли α_2 -АП как основного ингибитора фибринолиза явилось обнаружение врожденного дефицита этого белка. N. Aoki и соавторы (1980) описали случай наследственной недостаточности α_2 -АП у мужчины с выраженной склонностью к кровотечениям. Концентрация α_2 -М, АТ III, α_1 -ИП, СТИ, титры факторов свертывания, число тромбоцитов, протромбиновое и тромбопластиновое время в крови больного были такими же, как у здоровых людей. Содержание α_2 -АП, определенное иммунохимическим методом, составляло менее 1 мг/л (в норме — 61 мг/л). У членов семьи больного уровень ингибитора не превышал 50 % нормы. О нарушении у больного фибринолиза свидетельствовало резкое ускорение *in vitro* лизиса сгустка цельной крови. Добавление очищенного препарата α_2 -АП к крови больного корректировало фибринолиз, причем степень угнетения лизиса сгустка была прямо пропорциональна количеству прибавленного ингибитора. Внутривенное или оральное введение больному синтетического ингибитора фибринолиза — транс-аминометил-циклогексан-карбоновой кислоты — также нормализовало фибринолиз и ослабляло тенденцию к геморрагиям. Несмотря на повышенный фибринолиз *in vitro*, концентрация фибриногена была в пределах нормы. При длительном стоянии цитратной плазмы больного не обнаруживали прогрессивного расщепления фибриногена, хотя превращение Глу-Пг в Лиз-Пг было ускорено, вероятно, под действием спонтанно образующихся следовых количеств плазмина.

A. Yoshioka и соавторы (1982) приводят сообщение о врожденной недостаточности α_2 -АП у трех сестер (в возрасте 5 лет, 2 лет и 3 мес) в японской семье. У них наблюдали кровоточивость пуповины при рождении, а в последующем длительные кровотечения после небольших травм. В плазме крови выявлено значительное уменьшение активности α_2 -АП и ускорение лизиса сгустков эритроцитов.

Для изучения роли α_2 -АП в процессах фибринолиза у животных избирательно удаляли ингибитор из плазмы, используя специфические антитела против очищенного белка (T. Kumado, Y. Abiko, 1984). Отмечено, что истощение α_2 -АП в плазме животных и человека приводит к полной потере быстродействующей антиплазминовой активности. Лизис сгустка в плазме крыс ускоряется под действием урокиназы. При инкубации изолированных тромбов с сывороткой крови, из которой удален α_2 -АП, обнаружено сравнительно быстрое растворение тромба с одновременным снижением уровня плазминогена и накоплением продуктов распада.

да фибриногена. В опытах *in vivo* показано, что истощение α_2 -АП сопровождается кровотечением в участках венопункции.

За последние годы накопились данные, свидетельствующие о целесообразности исследования α_2 -АП в плазме крови с диагностической целью. Ферментативным методом с использованием хромогенного субстрата — S-2251 установлено повышение концентрации α_2 -АП в крови больных с острыми тромбозами и после оперативных вмешательств. Максимальное нарастание содержания ингибитора отмечалось в острый период заболевания, что позволяет рассматривать α_2 -АП как белок острой фазы воспаления (А. Teger-Nilsson и соавт., 1978). Уровень ингибитора снижался в крови больных циррозом печени, причем наблюдалась прямая зависимость между степенью уменьшения количества α_2 -АП и гипоальбуминемией, а также активностью холинэстеразы в сыворотке крови. Эти данные указывают на то, что α_2 -АП синтезируется в гепатоцитах. Повышенный фибринолиз у больных циррозом, вероятно, обусловлен уменьшением содержания основного ингибитора плазмينا. У больных с нефротическим синдромом концентрация α_2 -АП в плазме крови снижена (А. Richards, 1981). Полагают, что недостаточность ингибитора способствует удалению отложений фибрина в клубочках при гломерулонефрите.

Уровень α_2 -АП уменьшается при синдроме ДВС. У животных с синдромом ДВС, вызванным введением тканевого тромбопластина, уже через 10 мин в крови определяется комплекс α_2 -АП — плазмин, который через 6 ч исчезает из сосудистого русла (N. Aoki, 1979). В крови больных с подострым хроническим течением синдрома ДВС комплекс α_2 -АП — плазмин не обнаруживается, что, по-видимому, объясняется быстрым его выведением из организма клетками ретикулоэндотелиальной системы. При введении таким больным урокиназы комплекс выявляют, но он мгновенно исчезает из циркуляции.

Определение комплекса α_2 -АП — плазмин — важный тест для контроля за лечением больных фибринолитическими препаратами. Наличие его в плазме крови свидетельствует об активации фибринолитической системы. Введение активаторов плазминогена — СК, урокиназы — вызывает образование плазмина, который быстро связывается и инактивируется α_2 -АП. Неактивный комплекс содержит новые антигенные структуры, которые иммунологически отличаются от молекулы плазминогена. Разработан простой латексный тест агглютинации для определения комплекса в плазме. Внутривенное введение СК больным сопровождается значительным увеличением титра комплекса плазмин — α_2 -АП в течение первых 3 ч и некоторым его повышением после 24 ч (период полураспада комплекса составляет несколько часов). При инъекции СК уменьшается уровень свободного α_2 -АП и одновременно появляется комплекс фермента с ингибитором, который быстро

выводится из организма. При введении больным умеренных доз урокиназы в крови определяется лишь комплекс α_2 -АП — плазмин, больших доз — еще и комплекс плазмин — α_2 -М (N. Aoki, 1979). Последний комплекс часто выявляют в послеоперационный период у больных злокачественными новообразованиями.

Считают, что α_2 -АП является первым быстродействующим ингибитором плазмина, а α_2 -М становится основным ингибитором после того, как весь α_2 -АП прореагирует с ферментом. α_2 -М связывает некоторое количество плазмина и в том случае, когда он еще не полностью соединился с α_2 -АП (M. Gallimore и соавт., 1979).

Приведенные данные свидетельствуют о том, что первичная или вторичная активация фибринолитической системы *in vivo* сопровождается появлением циркулирующих комплексов плазмин — α_2 -АП, которые можно обнаружить в плазме благодаря их антигенным свойствам. Определение комплексов может служить объективным критерием продолжающейся активации фибринолиза.

С1-ИНАКТИВАТОР

С1И — основной ингибитор активированной формы первого компонента комплемента. Его обозначают также термином С1-ингибитор эстеразы, который нельзя признать удачным, так как ингибитор подавляет не только эстеразную, но и белокгидролизующую функцию ряда протенназ.

С1И представляет собой α_2 -нейроаминогликопротеин, состоящий из единственной полипептидной цепи с молекулярной массой 104 000 дальтон (M. Steinbuch, 1979). Ингибитор характеризуется большим содержанием углеводов (35 %) и высокой концентрацией сиаловой кислоты (14—15 %). Данных о его первичной структуре нет, известно только, что в N-концевом участке молекулы белка находится аспарагин. Содержание С1И в плазме крови здоровых людей составляет 0,17 г/л. Метод выделения ингибитора из плазмы крови включает его осаждение полиэтиленгликолем, хроматографию на ДЭАЭ-сефадексе и лизин-сефарозе. Выход активного белка — 70—75 % (R. Haggison, 1983). С1И подавляет активность двух протеолитических ферментов первого компонента комплемента — С1s и С1г (P. Harpel, N. Cooper, 1975). В С1-иммунном комплексе протеиназы угнетаются ингибитором в меньшей степени, чем в свободном виде. Эти данные свидетельствуют о возможности торможения активности С1s и С1г в физиологических условиях, когда они находятся в иммунных агрегатах. Только нативный С1И связывается с ферментами, угнетая их активность, денатурированный же кислотой теряет антипротеиназные свойства.

С $\bar{1}$ -инактиватор взаимодействует также с калликреином, плазмином, ФХ, его активными фрагментами и предшественником плазменного тромбoplastина. Для комплексообразования с плазмином не требуется цельной молекулы ингибитора, так как фермент в одинаковой мере инактивируется интактной и частично расщепленной молекулой.

С $\bar{1}$ И не подавляет активность эластазы из поджелудочной железы свиньи и бычьего химотрипсина. Эти ферменты путем протеолитического расщепления модифицируют молекулу ингибитора таким образом, что она теряет способность реагировать с С $\bar{1}$ s и плазменным калликреином. Папаин, фицин, бромелаин также вызывают образование протеолитически модифицированной формы ингибитора, однако она сохраняет способность угнетать калликреин и С $\bar{1}$ s.

При взаимодействии протеназ иммунного комплекса — С $\bar{1}$ Г и С $\bar{1}$ s с С $\bar{1}$ И образуется эквимольный комплекс, лишенный функциональной активности. С $\bar{1}$ Г реагирует с ингибитором более медленно, чем С $\bar{1}$ s. Предварительная обработка С $\bar{1}$ Г и С $\bar{1}$ s ДФФ мешает комплексообразованию, что указывает на участие активного центра фермента во взаимодействии с С $\bar{1}$ И. Скорость реакции связывания ингибитором С $\bar{1}$ s (и в меньшей степени С $\bar{1}$ Г), механизм которой мало изучен, повышается в присутствии гепарина.

С $\bar{1}$ И — основной ингибитор плазменного калликреина, полностью угнетающий кининогеназную и на 95 % ТАМЭ-эстеразную активность фермента (M. Gallimore и соавт., 1979). Комплекс калликреин—С $\bar{1}$ И стабилен ($K_{acc} = 6,9 \cdot 10^4$ моль $^{-1}$ /с $^{-1}$), в его образовании участвует активный центр фермента. Гепарин не влияет на скорость взаимодействия С $\bar{1}$ И с плазменным калликреином. Как и α_2 -М С $\bar{1}$ И играет роль ингибитора калликреина плазмы, но скорость инактивации последним ингибитором больше. Однако сниженное сродство α_2 -М к калликреину компенсируется более высоким его содержанием в нормальной плазме. Кроме того, *in vivo* скорость реакции плазменного калликреина с С $\bar{1}$ И может быть более медленной, чем в очищенной системе, поскольку в плазме крови фермент находится в связанном состоянии с циркулирующим высокомолекулярным кининогеном.

Считают, что активность калликреина плазмы крови контролируется примерно в равной степени С $\bar{1}$ И и α_2 -М (P. Nagel и соавт., 1985). При добавлении к плазме калликреина 57 % его взаимодействует с С $\bar{1}$ И, а 43 % — с α_2 -М. Это имеет важный биологический смысл, поскольку калликреин играет ключевую роль в протеолитических реакциях крови. С одной стороны, он катализирует освобождение брадикинина из ВМК, с другой — участвует в активации ФХ, который запускает внутреннюю систему свертывания крови. Определение С $\bar{1}$ И в сыворотке крови применяется в клинике с диагностической целью. В настоящее время разработан

простой метод определения СТИ в плазме крови с использованием хромогенного субстрата трипептид-N-нитроанилида (В. Wiman, T. Nilsson, 1983). У больных с наследственным дефицитом этого белка развивается ангионевротический отек, приводящий к развитию отека кожи, конечностей, слизистой оболочки верхних дыхательных путей. По данным М. Cheesbrough, P. Kinmont (1978), у больных с наследственным ангионевротическим отеком содержание СТИ в сыворотке крови составляет 13 % от нормы. В основе механизма этого синдрома, очевидно, лежит нарушение контроля активации системы первого компонента комплемента, что вызывает растормаживание протеиназ С1-иммунного комплекса. Р. Nagel и соавторы (1975) изучали функциональные особенности и структуру СТИ, выделенного из плазмы крови матери и дочери, больных различными формами ангионевротического отека. Они отметили, что по сравнению со здоровыми людьми у больных дефектная молекула ингибитора имеет более высокую молекулярную массу и меньшую подвижность при электрофорезе в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Для дефектных белков характерна неспособность образовывать комплекс с С1s и плазмином, что установлено методом гелевого электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия. При иммунохимических исследованиях СТИ больных и здоровых людей был идентичным.

В связи с важной физиологической ролью СТИ предпринимаются попытки применить препараты этого белка для заместительной терапии больных ангионевротическим отеком. Введение очищенного препарата СТИ купирует клинические проявления заболевания. Получены также положительные результаты лечения больных антифибринолитическими препаратами и половыми гормонами (С. Molina и соавт., 1977).

α_1 -АНТИХИМОТРИПСИН

α_1 -АХ — ингибитор протеолитических ферментов плазмы крови человека, который специфически инактивирует сериновые протеиназы с химотрипсиноподобной активностью (J. Travis, G. Salvesen, 1983). Его открыл Н. Schultze и назвал α_1 -Х-гликопротеином; впоследствии данное вещество было идентифицировано как ингибитор химотрипсина. Это — белок острой фазы воспаления, содержание которого резко нарастает непосредственно после различных видов оперативного вмешательства, ожогов и др. Через 8 ч после инсульта концентрация его в плазме крови удваивается. Эти данные свидетельствуют о первичной роли α_1 -АХ в регуляции специфических энзимов, освобождающихся во время воспалительных процессов из фагоцитирующих клеток (нейтрофильных гранулоцитов, базофилов, тканевых мастоцитов); в мокроте больных

хроническими бронхитами его концентрация выше, чем в сыворотке крови. Полагают, что α_1 -АХ играет важную роль в контроле активности протеиназ бронхиального секрета. Ингибитор обнаружен также в плевральной жидкости (А. Laine, А. Nayem, 1980). Определена первичная структура α_1 -АХ, он состоит из одной полипептидной цепи (J. Travis, М. Mогоi, 1981). Аминокислотная последовательность в N-концевом участке молекулы близка к таковой в α_1 -ИП. Это позволяет высказать предположение об общем эволюционном происхождении двух белков (М. Mогоi, J. Travis, 1983). N-терминальная аминокислота — аргинин, С-концевая — глицин; молекулярная масса ингибитора колеблется от 58 000 до 68 000 дальтон. Молекула белка содержит около 26 % углеводов (N-ацетил-гексозамин, гексозы, сиаловую кислоту). Содержание в плазме α_1 -АХ, по данным различных авторов, варьирует от 0,25 до 0,48 г/л.

Из плазмы крови человека ингибитор выделен в чистом виде методом, включающим осаждение аммония сульфатом, фракционирование на голубом сибакроне, иммобилизованном на сефарозе. Очищенный α_1 -АХ чувствителен к нагреванию и рН среды. Потеря ингибирующей активности наблюдается при температуре выше 50 °С, рН ниже 5 и выше 10,5. Замороженный раствор ингибитора при рН 8 сохраняет свою активность. Окисление не влияет на α_1 -АХ. Инкубация ингибитора с проназой, субтилизином, термолитином, эластазой из *Pseudomonas aeruginosa* и нейтральной протеиназой из *Bacillus polymyxa* сопровождается потерей антихимотриптической активности. Во время выдерживания с этими протеиназами α_1 -АХ (молекулярная масса 67 000 дальтон) превращается из нативного в неактивный (молекулярная масса 63 000 дальтон), при этом стабильные комплексы протеиназа — ингибитор не образуются. Полагают, что инактивация ингибитора перечисленными ферментами может иметь физиологическое значение, заключающееся в поддержании равновесия между содержанием ингибитора и химотрипсиноподобными протеиназами. Так как α_1 -АХ человека инактивирует не только химотрипсин, но и другие протеиназы, его название не совсем удачно. Активность эластазы нейтрофильных гранулоцитов и трипсина человека не подавляется данным ингибитором.

α_1 -АХ образует стехиометрический (1:1) комплекс с химотрипсином, стабильный при кипячении в 1 % растворе додецилсульфата натрия. Скорость комплексообразования α_1 -АХ с катепсином G и химотрипсином (человека, быка) высокая, но с первым ферментом в тысячу раз меньшая, чем со вторым ($K_{acc} 5,1 \times 10^7$ моль⁻¹/с⁻¹). Способность катепсина G гидролизовать протеогликан и фибронектин свидетельствует, по-видимому, об участии α_1 -АХ, инактивирующего данный фермент, в контроле катаболизма белков соединительной ткани и клеточных взаимодейст-

виях. Ингибитор, подавляя активность катепсина G и химазы тканевых базофилов бронхиального секрета — ферментов, катализирующих реакцию превращения ангиотензина I в ангиотензин II, регулирует сокращение гладкой мускулатуры и образование альдостерона, особенно при воспалении.

Цитотоксические клетки при взаимодействии с α_1 -АХ могут терять естественную и антителозависимую киллерную активность (Y. Kondo, N. Ohsawa, 1982). В связи с сообщениями об избирательном действии различных групп киллеров на раковые клетки исследовали α_1 -АХ в опухолевой ткани. Определенные линии опухолевых клеток продуцировали α_1 -АХ в виде неактивного предшественника, который, возможно, является защитным агентом против киллерных клеток. Эти исследования представляют интерес в целях изучения ингибиторов киллерных лимфоцитов.

ДРУГИЕ ИНГИБИТОРЫ ПРОТЕИНАЗ КРОВИ

В сыворотке крови обнаружены также другие ингибиторы протеолитических ферментов: интер- α -ингибитор трипсина (И- α -ИТ), β_1 -антиколлагеназа — β_1 -АК, α -ингибитор цистеиновых протеиназ — α -ИЦП, ингибитор протеиназ С — ИПС (J. Travis, G. Salvesen, 1983).

И- α -ИТ был открыт в 1961 г. Он является ингибитором не только трипсина, но и химотрипсина, образуя с ним стехиометрический комплекс. И- α -ИТ подавляет активность акрозина человека, пламина, причем реакция его взаимодействия с этими ферментами медленная. Панкреатическая нейтральная эластаза, катепсин G не инактивируются этим ингибитором. И- α -ИТ — это одноцепочечный гликопротеин, содержащий 8,4 % углеводов, 1 грамм-атом Zn^{2+} . Его молекулярная масса — 160 000 дальтон. В активном центре ингибитора содержится аргинин. По структуре И- α -ИТ относится к семейству ингибиторов Кунитца.

Физиологическая роль И- α -ИТ пока не выяснена, так как не выявлено заболеваний с его дефицитом. Полагают, что И- α -ИТ участвует в регуляции активности трипсиноподобной протеиназы, освобождающейся из пораженных тканей. Установлена его способность вступать во взаимодействие с IgG, причем образующиеся комплексы не осаждаются в отличие от комплексов антиген — антитело (J. Travis, G. Salvesen, 1983).

β_1 -АК получена в чистом виде с помощью аффинной хроматографии. Молекулярная масса белка составляет 30 000—33 000 дальтон, ингибитор содержит две свободные сульфгидрильные группы, участвующие во взаимодействии с ферментом. Этот ингибитор специфически инактивирует коллагеназу кожи, синовиальной жидкости, гранулоцитов. Активность трипсина, эластазы,

папаина ингибитором не подавляется. Предполагают, что при физиологических условиях функция β_1 -АК состоит в инактивации нейтральной коллагеназы синовиальной жидкости.

α -ИЦП — плазменный белок, инактивирующий цистеиновые протеиназы. Он выделен в гомогенном виде и, по-видимому, находится в плазме в виде двух форм с молекулярной массой 57 000 и 175 000 дальтон. Белок быстро связывается с катепсинами Н и G, папаином, фицином, бромелаином. Имеются указания на то, что α -ИЦП блокирует катепсина-В-подобные протеиназы асцитной жидкости опухолей, способствующие инвазии злокачественных клеток (J. Leppøy, 1983).

Определение активности α -ИЦП в сыворотке крови человека затруднено ввиду того, что α_2 -М также подавляет активность указанных цистеиновых протеиназ. В связи с этим предлагается вначале избирательно инактивировать α_2 -М обработкой сыворотки крови при температуре 55 °С метиламином (в этих условиях α -ИЦП стабилен, а α_2 -М полностью инактивируется). Уровень α -ИЦП возрастает при ревматоидном артрите и почечной недостаточности (V. Horsu-Narvi и соавт., 1982).

Физиологическая роль α -ИЦП мало выяснена. Можно допустить, что этот ингибитор, особенно его низкомолекулярная форма, диффундирует из крови в межтканевые пространства и, таким образом, его функция направлена против цистеиновых протеиназ, освобождающихся при тканевом повреждении.

Свойства указанных ингибиторов, их физиологическая роль нуждаются в дальнейшем изучении.

ТКАНЕВЫЕ ИНГИБИТОРЫ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

Важную роль в регуляции протеолитических систем в организме играют не только сывороточные, но и тканевые ингибиторы. Впервые тканевой ингибитор протеиназ, угнетающий активность калликрейна, обнаружен Н. Kгаут и соавторами в 1930 г. в лимфатических железах. В 1936 г. М. Kунитц, G. Northrop из поджелудочной железы быка выделили ингибитор трипсина, который был назван ингибитором Кунитца. Впоследствии вещество с подобными свойствами выявили в легких, печени, селезенке, слюнных, щитовидной железах, семенных пузырьках, яичниках, сердце быка и назвали ингибитором трипсина и калликрейна (E. Frey и соавт., 1983). Этот ингибитор локализуется в тканевых базофилах и, по-видимому, необходим для регуляции в них активности протеиназ. Обнаружена прямая зависимость между содержанием ингибитора и количеством тканевых базофилов в отдельных органах (H. Fritz и соавт., 1979).

Ингибитор обладает полифункциональным свойством, проявляющимся в торможении активности различных протеиназ сыворотки крови и тканей. Это послужило предпосылкой для изучения его биохимических и лечебных свойств в эксперименте и клинике (G. Haberland, R. McCopp, 1979). В настоящее время разработаны простые и эффективные методы получения ингибитора Кунитца в очищенном виде, позволяющие исследовать его первичную и третичную структуры. Среди них наиболее быстро выполнимыми и специфическими являются методы, основанные на кислотной экстракции ингибиторов из тканей с последующей аффинной хроматографией на водонерастворимых ферментных производных (трипсин-сефарозе или трипсин-целлюлозе).

По химической природе ингибитор Кунитца представляет собой полипептид с молекулярной массой 6512, он содержит 58 аминокислотных остатков, соединенных в одну полипептидную цепь. Последняя поперечно прошита 3 дисульфидными мостиками, один из которых легко расщепляется с помощью восстанавливающих агентов. Расшифрована первичная структура ингибитора: в N-концевом участке молекулы содержится аргинин, в C-концевом — лизин. Изоэлектрическая точка находится вблизи pH 10,5. Катионные свойства ингибитора Кунитца обусловлены преобладанием в его молекуле аминокислот основного характера, а также тем, что из 8 остатков кислых аминокислот 4 относятся к амидам.

Третичная структура ингибитора имеет грушевидную форму (H. Fritz и соавт., 1979). Полипептидная цепь свернута таким образом, что гидрофобные радикалы сконцентрированы внутри молекулы, а гидрофильные расположены снаружи и соприкасаются с водным окружением. Такая упаковка молекулы приводит к образованию компактной третичной структуры, которая устойчива к протеолитическому расщеплению, высокой температуре, действию кислот, оснований и органических растворителей. Ингибитор выдерживает кратковременное кипячение в разбавленной кислоте, но теряет активность в растворах с pH 1 и выше 12,6. В условиях комнатной температуры при физиологических pH он сохраняет свою активность 18 мес. Ингибитор стабилен в 70 % метаноле, 50 % этаноле и ацетоне. Из протеолитических ферментов только термолизин способен гидролизовать этот пептид, превращая его в неактивную форму (H. Fritz, G. Wunderer, 1983).

Ингибитор Кунитца имеет широкий спектр действия. Это — мощный ингибитор калликреина из тканей поджелудочной и подчелюстной желез, почек, мочи, плазмы крови человека и быка. Тканевые калликреины инактивируются им в большей степени, чем плазменные. Ингибитор Кунитца не влияет на активность химо-трипсина, но подавляет катионный и анионный трипсин человека, что имеет значение для применения его препаратов в терапии острых панкреатитов. Этот ингибитор характеризуется мощным дей-

ствием на плазмин и способностью реагировать с комплексом СК — плазмин.

Представляют интерес данные о том, что ингибитор Кунитца блокирует активность нейтральных протеиназ лейкоцитов — эластазы и катепсина G, причем к первому ферменту имеет более высокое сродство. Он вступает в комплексообразование с протеолитическим ферментом сперматозоидов — акрозином, но сродство его к нему низкое. Ингибитор Кунитца слабо подавляет активность урокиназы и не влияет на панкреатическую эластазу, тромбин, субтилизин, папаин, фицин, пепсин, ренин (H. Fritz и соавт., 1979).

С помощью рентгенокристаллографических и кинетических исследований, метода магнитного резонанса выяснены механизмы образования и структура комплексов протеиназ с ингибитором (H. Fritz, G. Wunderer, 1983). При комплексообразовании остатки лизина или аргинина молекулы ингибитора связываются с остатками серина активного центра фермента. Тетраэдральный промежуточный продукт образуется в результате действия нуклеофильного кислорода спиртовой группы серинового остатка фермента на карбонильную группу аргинина или лизина реактивной пептидной цепи ингибитора. Его макромолекула построена так, что из 58 аминокислотных остатков 14 находятся во внутреннем участке глобулы, следовательно, для многочисленных взаимодействий с помощью водородных, солевых связей, ван-дер-ваальсовых взаимодействий требуется значительное количество прироста свободной энергии — 80 кДж/моль (H. Fritz и соавт., 1979). В несвязанном ингибиторе имеется структура, которая точно подходит к контактному участку на поверхности протеиназы. Она включает Цис₁₄, Цис₃₈, Лиз₁₅, Ала₁₆, Арг₁₇ и Арг₃₉. Замена двух последних нейтральными аминокислотами лишает ингибитор способности связывать тканевые и плазменные калликреины. Плазмин же, наоборот, вступает в комплекс с ингибитором, у которого произошла замена указанных аминокислот. Эти данные свидетельствуют о том, что для калликреинов требуются специфические структурные особенности, поскольку им свойственна более узкая субстратная специфичность по сравнению с плазмином и трипсином.

В настоящее время получены препараты ингибитора Кунитца для медицинских целей: трасилол (ФРГ), контрикал (ГДР), цалол (Швейцария), гордокс (Венгрия), пантрипин (СССР) и др. Изучены свойства препаратов ингибиторов в эксперименте. Показано, что они обладают низкой токсичностью и антигенностью. LD₅₀ для мышей и крыс равна $2,5 \cdot 10^6$ КИВ/кг, а для кроликов — $0,5 \cdot 10^6$ КИВ/кг массы тела. Однако необходимо избегать быстрого парентерального введения больших доз ингибитора, так как его высокая основность может обусловить освобождение гистамина

и привести к анафилактической реакции. Антитела, специфические к ингибитору Кунитца, не обнаружены в сыворотке крови человека во время и после лечения. После внутривенной инъекции ингибитор быстро выводится из организма благодаря распределению его во внеклеточной жидкости и последующей аккумуляции в почках. Время полужизни ингибитора Кунитца колеблется от 10 до 70 мин и зависит от дозировки используемого препарата. Через 4 ч около 80 % ингибитора выявляется в почках крыс. Он захватывается клетками проксимальных канальцев и метаболизируется лизосомами почек. В моче ингибитор практически не определяется: через 1,5 ч после внутривенной инъекции 1 000 000 КЕ препарата обнаруживается лишь 1,5 % от этой дозы. Относительно высокая основность ингибитора позволяет ему реагировать с кислыми гликопротеинами или мукополисахаридами, в том числе с гепарином, фиксироваться на мембране щеточной каймы почки, а затем распадаться в этом органе.

В настоящее время препараты ингибитора Кунитца используют в научных целях, в частности при очистке биологически активных веществ (ферментов, гормонов), изучении макроструктуры белка, а также в качестве лечебных средств (В. В. Мосолов, 1983). В химии белков ингибиторы применяются для выделения протеолитических ферментов с помощью аффинной хроматографии с нерастворимыми производными трасилола (трасилол-сефарозой, трасилол-целлюлозой и др.). Последние использовались для очистки трипсина, химотрипсина, панкреатической эластазы, плазмина, калликреинов, катепсина G. Препараты ингибиторов применяются в биомедицинских исследованиях в качестве веществ, предотвращающих протеолитическое расщепление белков, ферментов, проферментов в биологических жидкостях. Так, они используются для подавления возможной активации проферментов при выделении кининогенов, кининосвобождающих ферментов, факторов свертывания крови, получения различных молекулярных форм плазмина, фибронектина, глюкагона. Путем специфического ингибирования калликреина можно выявлять ферменты в смеси протеиназ и эстераз. Ингибитор Кунитца широко используется как маркер молекулярной массы при гель-хроматографии, электрофорезе (H. Fritz, G. Wunderer, 1983).

Результаты экспериментального изучения свойств ингибиторов послужили обоснованием для их лечебного применения. В культуре клеток трасилол замедляет расщепление белковых гормонов (вещества P, инсулина). Это может иметь практическое значение при лечении инсулинрезистентного диабета. Ингибитор способствует сохранению целостности клеточных мембран почек, мозжечка, предотвращает выход токсических продуктов из распадающихся клеток. Трасилол влияет на протеолитические системы лейкоцитов, угнетая активность катепсина G, калликреиноподоб-

ного фермента базофилов, освобождающегося под действием стимуляции IgE, инактивирует нейтральные протеиназы, высвобождающиеся из клеток вторичных лизосом, в зависимости от дозировки повышает или снижает ответ периферических лимфоцитов на различные стимулы, подавляет рост трансформированных клеток злокачественных опухолей, что, по-видимому, связано с усилением иммунного ответа хозяина на опухоль (Ю. Б. Мишин, 1982); Полифункциональные ингибиторы в опытах на животных угнетают фибринолитическую активность крови, препятствуют агрегации тромбоцитов, которая повышается после обширных хирургических вмешательств. Они замедляют образование кининов, сохраняют уровень циркулирующего кининогена, что имеет значение для нормального поддержания кининогенеза.

Ингибитор Кунитца обладает широкой специфичностью, поэтому исследовалась его терапевтическая эффективность в различных областях медицины (А. С. Сыновец, А. П. Левицкий, 1985). Впервые в 1953 г. E. Frey и соавторы, исходя из существенной роли активации протеолитических ферментов в развитии панкреатита, применили трасилол для лечения острой фазы этого заболевания и отметили его эффективность. В последующие годы появилось много работ, подтверждающих положительное действие трасилола и его аналогов при остром панкреатите. На основании данных литературы можно сделать заключение, что тканевые ингибиторы наиболее эффективны в лечении ранних (отечных) форм заболевания, они уменьшают интоксикацию, болевой синдром, ограничивают воспалительный процесс, предупреждают в ряде случаев переход отечной формы в некротическую. В связи с этим лечение ингибиторами необходимо назначать даже при подозрении на острый панкреатит, причем следует вводить высокие дозы препарата (общая доза трасилола должна составлять 1 000 000 КЕ). Ингибитор быстро исчезает из организма и поэтому эффективной концентрации в крови и тканях можно достичь лишь его постоянным капельным внутривенным введением (К. Н. Веремеенко, 1971).

Важная область применения ингибиторов — шоки различного генеза, поскольку в их развитии играют роль протеолитические ферменты тканевого, микробного, лейкоцитарного происхождения, участвующие в образовании вазоактивных кининов, активации фибринолиза (G. Haberland, R. McConn, 1979). Раннее внутривенное введение трасилола и его аналогов способствует нормализации артериального давления, улучшению общего состояния, снижению смертности больных (H. Fritz, G. Wunderer, 1983).

Полифункциональные ингибиторы протеиназ применялись в комплексной терапии больных ишемической болезнью сердца (Л. Н. Суднева, Л. Г. Пименов, 1982). Внутривенное капельное вливание контрикала больным в течение 4—5 дней, начатое сразу же после поступления в клинику, способствовало более благопри-

ятному течению заболевания. Выявлен противоболевой эффект ингибитора, при его введении у некоторых больных исчезала за-грудинная боль. Отмечена быстрая положительная динамика электрокардиографических сдвигов под влиянием контрикала. Уже после первого капельного введения этого препарата уменьшались или полностью купировались абдоминальный и стенокардический синдромы, устранялась аритмия. Биохимические исследования показали положительное влияние антипротеиназных препаратов на динамику сывороточного миоглобина и активность аспартат-аминотрансферазы. Полагают, что ингибиторы протеиназ оказывают различное действие на протеолитические системы организма и в первую очередь блокируют ферменты, катализирующие образование кининов, ответственных за болевой синдром, нарушение процессов микроциркуляции, шоковые реакции. Антипротеиназные препараты целесообразно использовать для ограничения очага поражения миокарда в максимально ранние сроки, а также как профилактические средства, ослабляющие выраженность клинических проявлений и осложнений при ишемической болезни сердца.

Особая область применения тканевых ингибиторов протеиназ — нарушение процессов гемостаза и фибринолиза. Ингибиторы являются эффективными средствами в борьбе с кровотечениями, используются в акушерско-гинекологической, урологической практике, при операциях на открытом сердце и др. Достигнуты успехи в лечении ингибиторами фибринолитических кровотечений при преждевременной отслойке плаценты, внутриутробной гибели плода и др. Ингибиторы широко применяются в урологии как эффективные гемостатические препараты в терапии кровотечений, возникающих во время и после оперативных вмешательств на предстательной железе, спонтанных и эссенциальных гематуриях.

Ингибиторы протеолиза с успехом используются в общехирургической клинике в лечении кровотечений, наблюдаемых при больших оперативных вмешательствах, которые нередко осложняются тромбгеморрагическим синдромом. Капельное внутривенное введение ингибиторов в стадии гипокоагуляции способствует остановке кровотечений и снижению фибринолитической активности крови. Трасилол в больших дозах оказывает антикоагулянтное действие, проявляющееся в торможении начальных фаз системы свертывания крови и поэтому он показан при тромбгеморрагическом синдроме в стадии гиперкоагуляции. Трасилол рекомендуют использовать для профилактики нарушений фибринолиза во время операций на открытом сердце с применением гемодиализа. Ингибитор в дозе 300 000—400 000 КЕ/10 кг массы тормозит фибринолиз в послеоперационный период (M. Masiak, W. Bross, 1980).

Клинические наблюдения показали перспективность использования ингибиторов протеолиза при аллергических реакциях,

поскольку в их патохимической стадии в результате повреждающего действия на клетки комплекса антиген — антитело освобождаются протеиназы с кининогеназной активностью. Результаты клинко-биохимических исследований свидетельствуют о целесообразности применения контрикала в сочетании с лизоцимом в терапии аллергических ринитов и бронхиальной астмы (К. Н. Веремеенко и соавт., 1980).

Внутриартикулярное введение антипротеиназных препаратов при ревматическом артрите способствует угасанию воспалительных изменений в суставе, снижению протеолитической активности синовиальной жидкости, сокращению сроков стационарного лечения больных (К. Н. Веремеенко, Е. Т. Складенко, 1973). Разработаны показания и способы применения ингибиторов протеолиза для лечения хронических тонзиллитов. Их следует вводить локально ингаляциями и методом фонофореза. Данные клинических наблюдений и биохимических исследований секретов слюнных желез подтверждают положительное действие ингибиторов в ближайший и отдаленный период (К. Н. Веремеенко и соавт., 1981). Ингибиторы протеолиза — эффективные лекарственные препараты при пародонтозе, заболеваниях слизистой оболочки полости рта (К. Н. Веремеенко, 1977).

Таким образом, полифункциональные ингибиторы протеолиза оказывают положительное действие при заболеваниях, связанных с активацией протеолиза (фибринолиза, кининогенеза, системы комплемента). Вначале полагали, что это действие неспецифично. В настоящее время известно, что указанные системы протеолиза имеют общие механизмы активации, осуществляемые одними и теми же сериновыми протеиназами. Блокирование активности различных ферментов протеолиза лежит в основе терапевтического эффекта препаратов ингибиторов протеиназ с полифункциональными свойствами.

Глава III

ПРОТЕИНАЗЫ, ИХ АКТИВАТОРЫ И ИНГИБИТОРЫ В ПАТОГЕНЕЗЕ И ЛЕЧЕНИИ НЕКОТОРЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

ПРОТЕОЛИЗ И БРОНХОЛЕГОЧНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

В последние годы накоплены данные, свидетельствующие о роли протеолитических ферментов и факторов их регуляции в возникновении эмфиземы легких, обструктивного бронхита, острой пневмонии, острой дыхательной недостаточности (О. Г. Оглоблина, 1984; К. Н. Веремеенко, А. И. Кизим, 1985; Н. В. Тутов и соавт., 1985). Некоторые авторы полагают, что в основе патогенеза указанных

заболеваний лежит единый пусковой механизм, связанный с нарушением баланса между протеолизом и его белковыми ингибиторами, контролирующими эту гуморальную систему. Сформулирована протеазно-антипротеазная теория, согласно которой деструктивные заболевания легких у человека развиваются в результате либо избыточной активации протеиназ в очаге поражения, либо недостаточного содержания ингибиторов, вследствие чего система протеолиза становится декомпенсированной.

Рассмотрим источники и природу протеолитических ферментов, которые могут играть существенную роль в возникновении патологических изменений в легких. Основное значение в развитии тканевого повреждения имеют фагоцитирующие клетки — нейтрофильные гранулоциты и альвеолярные макрофаги. При воспалении они накапливаются в экссудатах и во время фагоцитоза высвобождают избыточные количества высокоактивных протеиназ. Основную роль в ферментативных процессах играют нейтрофильные гранулоциты, действие же макрофагов ограничивается выделением хемотаксических факторов для нейтрофильных гранулоцитов, а также стимулированием высвобождения ферментов из их азурофильных гранул.

Главными ферментами нейтрофильных гранулоцитов являются эластаза и коллагеназа, которые локализованы в лизосомальной фракции. Эти ферменты обладают высокой активностью по отношению к белковым структурам соединительнотканного матрикса бронхов и легких (A. Janoff, 1972). Коллагеназа избирательно расщепляет коллаген на отдельные фрагменты, а эластаза разрушает эластические волокна. Оба фермента действуют на базальную мембрану и вызывают некроз эндотелиальных клеток, что приводит к повреждению сосудов. Кроме этих протеиназ нейтрофильные гранулоциты содержат кислые катепсины G и D, которые воздействуют на сосуды не только прямым, но и косвенным образом — путем высвобождения кининообразующих ферментов, катализирующих образование вазоактивных кининов. Эти вещества способствуют расширению капилляров, артериол, повышению проницаемости сосудистой стенки и обуславливают эмиграцию гранулоцитов в очаг повреждения. Последние высвобождают большие количества кининов, что приводит к воспалительной реакции. Деструкция гранулоцитов сопровождается также освобождением активаторов плазминогена, участвующих в преобразовании плазминогена в плазмин, который не только деполимеризует фибрин, но и через FX может активировать кининовую систему.

Таким образом, основной вклад в общую протеолитическую активность бронхиального секрета вносят ферменты гранулоцитов, оказывающие в условиях патологии деструктивное действие на протеогликановые комплексы тканей. Основным ферментом, повреждающим эластические структуры бронхолегочного дерева,

является нейтрофильная эластаза. Это доказывается тем, что в эксперименте можно вызвать эмфизему легких интратрахеальным введением животным эластазы нейтрофильных гранулоцитов, выделенной из гнойной мокроты больных хроническим бронхитом. Аналогичное действие оказывает папаин (P. Martogana, N. Share, 1975). Из других групп протеолитических ферментов, участвующих в разрушении соединительнотканного каркаса бронхолегочного дерева, следует упомянуть также протеиназы, которые выделяются бактериальными клетками в процессе развития воспаления.

В организме здорового человека ежедневно синтезируется около 1 г эластазы, катепсина G и других протеиназ. При физиологических условиях активность этих ферментов подавляется специфическими белками — ингибиторами, которые быстро связывают ферменты. Образующиеся комплексы протеиназы — ингибиторы выводятся из организма ретикулоэндотелиальной системой.

К ингибиторам, которые противостоят действию протеиназ в дыхательных путях человека, относятся две группы белков. Первую составляют сывороточные ингибиторы поступающие в бронхиальный секрет из крови. Ко второй группе относятся специфические низкомолекулярные белки, синтезируемые в бронхах. Наиболее изучена роль сывороточных белковых ингибиторов в защите тканей от действия протеиназ. Основным белком, предохраняющим бронхолегочное дерево от избыточного протеолиза, является α_1 -ИП, который угнетает многие протеиназы животного, лейкоцитарного и бактериального происхождения. Он играет решающую роль в подавлении активности лейкоцитарной эластазы, коллагеназы, сериновых протеиназ микроорганизмов.

В защите тканей бронхолегочной системы от действия протеиназ кроме α_1 -ИП участвует α_2 -М, ингибирующий все известные протеиназы, в том числе эластазу, катепсин G и коллагеназу (К. Н. Веремеенко и соавт., 1983). В бронхиальном секрете здоровых людей концентрация α_2 -М невелика, но она может значительно повышаться при воспалении. В отличие от α_1 -ИП α_2 -М образует такие комплексы с протеиназами, в которых последние могут избирательно расщеплять определенные субстраты и разрушать некоторые компоненты тканей. Защитное действие от протеиназ может оказывать также α_1 -АХ, который специфически тормозит активность катепсина G гранулоцитов. Однако его роль в ингибировании протеиназ бронхолегочного дерева выяснена недостаточно.

Сывороточные ингибиторы (в особенности α_1 -ИП) чувствительны к кислой pH среды и температурному воздействию. При подкислении реакции среды в условиях воспаления содержание лабильных сывороточных ингибиторов резко уменьшается, что

дает возможность эндогенным протеиназам расщеплять тканевые структуры бронхов и легких. Кислотолабильным ингибиторам присуще всего 10—15 % антипротеолитической активности бронхиального секрета. Деструктивному действию протеиназ в дыхательных путях в основном противостоят низкомолекулярные местно синтезируемые белки-ингибиторы, а также кислотостабильные ингибиторы (КСИ) плазменного происхождения (О. Г. Оглоблина, 1982).

В бронхиальном секрете обнаружено 4 КСИ, как синтезирующихся в бронхах, так и поступающих из крови: КСИ I, КСИ II, КСИ III и КСИ IV. Они ответственны за 85—90 % общего антипротеолитического потенциала бронхиального секрета. Основным КСИ является КСИ I (молекулярная масса 10 500—15 000). Он продуцируется серозными клетками желез подслизистой оболочки бронхов и верхних дыхательных путей, подъязычной и подчелюстной железами. КСИ I по иммунологическим свойствам близок к КСИ плазменной части семени человека; его концентрация в бронхиальном секрете равна 15 мг/л. Ингибитор с большой скоростью подавляет активность эластазы и катепсина G лейкоцитов. КСИ I чувствителен к табачному дыму, но устойчив к действию протеиназ гранулоцитов. КСИ II угнетает лишь эластазу нейтрофильных гранулоцитов и не влияет на активность катепсина G. КСИ III инактивирует трипсин и неэффективен в отношении эластазы. КСИ IV представляет собой производное сывороточного И- α -ИТ, он отщепляется от последнего в результате реакции ограниченного протеолиза. КСИ IV присуще около 5 % антипротеолитической активности бронхиального секрета. Он инактивирует эластазу и активатор плазминогена.

КСИ бронхиального секрета, синтезируемые местно, являются главными защитными белками от протеиназ в бронхах крупного и среднего калибра, в нижних же отделах бронхиального дерева (на уровне альвеол) основную функцию нейтрализации этих ферментов выполняет α_1 -ИП.

В норме в дыхательных путях существует динамическое равновесие между активностью протеиназ и их ингибиторами, т. е. протеиназно-ингибиторная система является компенсированной. У больных деструктивными заболеваниями легких и бронхов в процессе воспаления резко нарастает потенциал протеолитических ферментов вследствие усиления инфильтрации тканей нейтрофильными гранулоцитами, а также повышенной их секреции под влиянием чужеродных веществ. Деструкция нейтрофильных гранулоцитов сопровождается высвобождением протеиназ, которые повреждают протеогликановые комплексы тканей.

Ряд вредных факторов может оказывать активирующее действие на синтез и выход протеиназ из клеток в межклеточную ткань. Одним из них является курение (J. Travis, G. Salvesen, 1983).

Отмечено, что у курильщиков активность нейтрофильной эластазы в бронхо-альвеолярном лаваже при пересчете на число клеток увеличена. Химические компоненты табачного дыма повышают проницаемость эпителия альвеол, увеличивая приток эластазы нейтрофильных гранулоцитов в легочную межтканевую ткань, где находится ее субстрат — эластин. Ко второму фактору, способствующему активации протеолиза, относятся бактерии и вирусы. При бактериальной инфекции активность эластазы нейтрофильных гранулоцитов возрастает в результате их активации микроорганизмами. Разрушение бактерий сопровождается освобождением протеолитических ферментов, в частности эластазы. При вирусных инфекциях нарушается целостность эпителия, это вызывает увеличение притока протеолитических ферментов из гранулоцитов.

При бронхолегочной патологии не только происходит активация ферментов протеолиза, но и снижается ингибиторный потенциал, что приводит к декомпенсации протеиназно-ингибиторной системы. Уменьшение ингибиторного потенциала связывают с генетически обусловленным дефицитом α_1 -ИП и влиянием факторов окружающей среды. Лица с наследственной недостаточностью этого ингибитора предрасположены к заболеванию тяжелой формой эмфиземы легких, которая может развиваться в относительно молодом возрасте (J. Morse, 1978). Функциональная активность α_1 -ИП, т. е. его способность связывать протеиназы, резко снижается при курении: например, в промывных водах из легких курильщиков обнаруживается неактивный ингибитор. В данном случае это происходит в результате окисления метиониновых остатков в активном центре α_1 -ИП. Поскольку риск заболевания эмфиземой легких при гетерозиготном дефиците α_1 -ИП возрастает при курении и работе на вредных производствах, его определение необходимо при диспансеризации лиц, поступающих на соответствующие производства. Дефицит этого защитного белка является противопоказанием при профотборе на вредные производства, а также предупреждением об опасности курения.

Учитывая важную роль системы протеиназы — ингибиторы в патогенезе бронхолегочных заболеваний, большое внимание уделяют исследованию ее компонентов в биологических жидкостях организма. Активность протеолитических ферментов увеличивается в сыворотке крови (Н. В. Сыромятникова и соавт., 1978; И. Б. Орлюк, Г. М. Тебенчук, 1982, и др.), бронхиальном секрете и мокроте легких больных хроническими заболеваниями легких. По данным А. Г. Хоменко и соавторов (1983), у больных хроническим бронхитом в период обострения в мокроте снижается содержание свободных и местно синтезируемых КСИ протеиназ и одновременно повышается уровень протеолиза и активность эластазы. Нарушение баланса в системе протеиназы — ингибиторы,

по мнению этих авторов, способствует усилению воспалительной реакции и приводит к морфологическим изменениям в бронхолегочном дереве. При туберкулезе легких в бронхиальном секрете нарастает активность эластазы и уменьшается содержание ингибиторов, в особенности тех, которые угнетают протеиназы лейкоцитов. Более выраженное увеличение активности эластазы наблюдается в смывах из бронхов при обширном распространении гнойно-воспалительного процесса в легких, что свидетельствует о лейкоцитарном происхождении ферментов. О. Г. Оглоблина и соавторы (1980) отмечают, что целесообразнее определять активность протеиназ и их ингибиторов не в мокроте, а в бронхиальном секрете. Так, в бронхиальном секрете больных различными бронхолегочными заболеваниями, в особенности при гнойном воспалении, резко нарастает трипсино- и эластазоподобная активность и одновременно снижается удельная активность КСИ. Обнаружена корреляция между уменьшением уровня КСИ и степенью воспалительного процесса, т. е. эти биохимические тесты информативны при оценке тяжести заболевания. Аналогичные изменения выявлены в смывах из бронхов больных туберкулезом легких, осложненным эндобронхитом (М. В. Шестерина и соавт., 1983; Б. М. Макеев, 1984). При бронхоэктазах и деформирующем бронхите у детей содержание КСИ в бронхиальных смывах снижается в 2—7 раз и параллельно в 4—5 раз повышается активность протеиназ гранулоцитов (Р. М. Хорькова и соавт., 1982). Полагают, что уменьшение уровня КСИ в бронхиальном секрете связано с ослаблением их синтеза слизистой оболочкой бронхов.

Важную информацию о течении заболевания дает определение в бронхиальном секрете свободных и связанных с протеиназами КСИ. При начальных стадиях воспалительного процесса преобладают свободные (не связанные с протеиназами) ингибиторы; по мере усиления его активности нарастает концентрация связанных ингибиторов.

Следовательно, для бронхолегочной патологии характерен дисбаланс между активностью протеиназ и их ингибиторов, синтезируемых местно и поступающих из крови; при этом эндогенных ингибиторов оказывается недостаточно для полной нейтрализации избытка протеолитических ферментов, накапливающихся в очаге воспаления.

Дефицит ингибиторов, обнаруженный при бронхолегочных заболеваниях, послужил основанием для включения в комплексную терапию препаратов, обладающих способностью подавлять активность протеиназ лейкоцитарного и бактериального происхождения. С этой целью используют ингибиторы калликрейна, трипсина и др., полученные из легких, поджелудочной и околоушной желез быка (трасилол и его аналоги). Положительный эффект этих ингибиторов отмечен при ингаляционном и внутривенном

введении больным бронхиальной астмой (Г. В. Сошенкова, 1981; М. Я. Ясницкая, К. Н. Веремеенко, 1981). Лечебное действие ингибиторов связано с торможением ими образования кининов протеиназами нейтрофильных гранулоцитов и микроорганизмов, уменьшением проницаемости клеточных мембран, а также инактивацией кининогеназ базофилов, освобождающихся под влиянием IgE и катализирующих образование лейкокининов (К. Н. Веремеенко, 1983).

В последние годы ведутся исследования по обоснованию возможности применения препаратов α_1 -ИП в лечении обструктивных заболеваний легких, так как разработаны методы очистки этого ингибитора для получения его медицинских препаратов в промышленных масштабах (С. Glaser, 1981). Предварительное внутритрахеальное введение α_1 -ИП препятствует возникновению эмфизематозных повреждений в легких хомячков, вызванных аэрозолями панкреатической эластазы или папаина. В то же время введение даже больших доз α_1 -ИП в кровь не оказывает защитного действия. Очевидно, для предотвращения изменений в легких имеет значение определенная концентрация α_1 -ИП внутри альвеол, а не в сыворотке крови. Основной мишенью для α_1 -ИП служат эластаза и коллагеназа лейкоцитов. Введение частично очищенного препарата ингибитора в дозе 4 г 1 раз в неделю в течение 1 мес больным с гомозиготной его недостаточностью повышает содержание α_1 -ИП в сыворотке крови до 35 % от нормы и более. Кроме того, в жидкости бронхо-альвеолярного лаважа обнаруживается антитриптическая активность, которая до лечения не наблюдалась (J. Gadek, R. Crystal, 1983).

Авторы полагают, что при наследственной недостаточности α_1 -ИП лечение этим ингибитором следует проводить еще до появления симптомов заболевания. Необходимо разрабатывать мероприятия по раннему выявлению лиц с наследственной гомозиготной недостаточностью α_1 -ИП.

В настоящее время исследуется возможность лечебного применения при эмфиземе легких низкомолекулярных синтетических ингибиторов эластазы из нейтрофильных гранулоцитов (Н. В. Путов и соавт., 1985). В частности, используются хлорметилкетоны — необратимые ингибиторы сериновых протеиназ, азапептиды (азанорлейцин) и гетероциклические ацилирующие агенты. В основе их инактивирующего действия лежит способность алкилировать активный центр протеолитических ферментов. При экспериментальной эмфиземе легких, вызванной с помощью эластазы, эти ингибиторы оказывают положительное влияние только в том случае, если их вводят сразу же после фермента. Для увеличения времени действия в организме предпринимаются попытки применения хлорметилкетона, связанного с сывороточным альбумином человека.

α_1 -ИП быстро инактивируется окисляющими агентами, высвобождающимися при фагоцитозе, поэтому с помощью метода генной инженерии синтезировали стабильный ингибитор, в котором метионин активного центра замещен валином (S. Rosenberg и соавт., 1984). Наличие более устойчивого к окислению ингибитора позволит снизить количество вводимого препарата и повысить его лечебную эффективность.

РОЛЬ ПРОТЕИНАЗ И ИХ ИНГИБИТОРОВ В ЗЛОКАЧЕСТВЕННОМ РОСТЕ

Интерес к изучению протеолитических ферментов при злокачественных новообразованиях объясняется их высокой биологической активностью, участием в защитных реакциях организма, обмене соединительной ткани, процессах роста и деления клеток и др. (Л. А. Локшина, 1979; К. Н. Веремеенко, 1983). Раковые опухоли продуцируют сложный набор протеолитических ферментов и факторов, регулирующих их активность, — ингибиторов протеиназ (R. Farbiszewski, K. Worowski, 1975).

Протеолитические ферменты тканей. Значительное количество исследований посвящено изучению протеолитических ферментов, особенно лизосомного происхождения, в тканях злокачественных новообразований. Большинство авторов отметили, что активность тканевых протеиназ в злокачественных опухолях человека и экспериментальных животных выше, чем в тканях, из которых эти новообразования происходят. Так, в ткани злокачественных опухолей грудной железы человека увеличена активность кислых и нейтральных протеиназ (Б. Ф. Близнюк, 1982), в злокачественных опухолях матки у женщин — катепсина D (H. Geyer и соавт., 1980), в злокачественных новообразованиях гортани — катепсиноподобных (О. П. Голобородько и соавт., 1979) и трипсиноподобных ферментов (В. М. Лосицкая, 1971). Аналогичные результаты получены в эксперименте: в раковых опухолях кожи у мышей, вызванных химическими канцерогенами, наблюдается значительная катептическая активность, тогда как в нормальной коже она не определяется (R. Shamberger, G. Rudolph, 1967). Ряд авторов обнаружили увеличение активности кислых и нейтральных протеиназ по мере роста опухоли (B. Sylvén и соавт., 1959; J. Kawiak, B. Miks, 1979).

Наиболее подробно изучены кислые протеиназы лизосом, особенно катепсин D, обладающий широкой специфичностью действия и способностью разрушать многие белки межклеточного пространства. Этот фермент в раковых опухолях проявляет высокую активность и по ряду функциональных и структурных свойств отличается от аналогичного фермента соответствующих нормаль-

ных тканей (В. Н. Орехович, 1977; О. В. Казакова, В. Н. Орехович, 1979).

Повышение активности кислых протеиназ наблюдалось при исследовании не только ткани новообразований, но и экссудатов из опухолей по сравнению с экссудатами невоспалительного или воспалительного происхождения, а также в интерстициальной жидкости опухолей (L. Libenson, M. Jena, 1957; J. Wagner, H. Duck, 1967). По данным М. Mayer и соавторов (1976), активность нейтральной протеиназы в мышцах крыс с перевиваемой карциномой Уокер 256 с увеличением массы опухоли возрастала более чем в 3 раза по сравнению с активностью этого фермента в мышцах здоровых крыс. У больного злокачественной опухолью почки отмечалось повышение общей катептической активности в ткани печени, причем степень его коррелировала с величиной опухоли в почке (T. Scherstén и соавт., 1969). Приведенные сведения свидетельствуют о том, что при опухолевом росте увеличивается активность протеиназ не только в месте возникновения опухоли, но и в других тканях и органах, отдаленных от пораженного участка. Механизм этого явления пока трудно объяснить, тем не менее подобные наблюдения указывают на общее действие опухоли на организм.

Активность протеолитических ферментов исследовали также в культурах опухолевых клеток и трансформированных клетках. Они также характеризовались повышенной активностью протеиназ. Так, клетки карциномы грудной железы человека в культуре ткани выделяли в культуральную жидкость в 11 раз больше протеолитического фермента типа катепсина В₁, чем клетки фибroadеномы и нормальной ткани (A. Poole и соавт., 1978). Позднее было показано, что свойства этого фермента отличаются от ряда известных свойств катепсина В₁ — он имеет более высокую молекулярную массу и менее подвержен инактивации при рН среды, превышающем нейтральный (J. Mort и соавт., 1980). Отмечая преимущественную секрецию злокачественными опухолями катепсина В или близких по специфичности ферментов, авторы высказывают предположение, что эти ферменты, обладающие еще значительной активностью при рН 7, могут расщеплять белки на поверхности клеток либо вблизи нее (K. Tiltman и соавт., 1980). Повышение катепсиноподобной активности обнаружено также в вирустрасформированных клетках (H. Bosmann, 1972; H. Bosmann и соавт., 1974; V. Hatcher и соавт., 1976).

При разрушении липопротеидной мембраны лизосом протеиназы новообразований способны к выходу из них и накоплению внутри клетки (R. Farbiszewski, K. Wogowski, 1975). Отсюда они могут попадать в кровяное русло и вызывать увеличение активности протеолиза в плазме крови и других биологических жидкостях организма-хозяина. Так, отмечено повышение в сыво-

ротке крови активности катептических ферментов (B. Sylvén и соавт., 1959; J. Wagner, H. Duck, 1967) и в сыворотке и моче — нейтральных протеиназ (И. Ф. Спицин и соавт., 1978). R. Pietras и соавторы (1978, 1979) установили, что в сыворотке крови женщин с инвазивным раком различной локализации активность катепсина В₁ увеличивается в 45 раз, причем другие лизосомальные ферменты при этом не определяются. Исследование этого фермента может иметь дифференциально-диагностическое и прогностическое значение: при раке шейки матки III и IV стадий и рецидивах заболевания его активность выше, чем при I и II стадиях опухолевого процесса, при ремиссиях после лечения она снижается до нормы и остается повышенной при опухолях, не поддающихся лечению.

Особого внимания заслуживает изучение при злокачественном росте коллагеназы, поскольку инвазия опухолей требует распада основного белка соединительной ткани коллагена. Коллагеназа является единственным ферментом, способным к внеклеточному расщеплению коллагена при физиологическом значении реакции среды. Поэтому опухоли, секретирующие коллагенолитические ферменты, могут обеспечить как миграцию клеток, так и проникновение их в окружающий коллагенозный внеклеточный матрикс (D. Tagin и соавт., 1982; B. Pauli и соавт., 1983). Высказывается предположение, что опухоли, синтезируя простагландин F₂, стимулируют распад окружающей ткани путем усиления активности тканевой коллагеназы (A. Matsumoto и соавт., 1979). Для эпидермальных и мезодермальных опухолей характерно увеличение активности этого фермента, которое наиболее выражено при высокозлокачественных опухолях (I. Yamanishi и соавт., 1972; E. Vaueg и соавт., 1979; G. Wirl, J. Frick, 1979; B. Pauli и соавт., 1983). Обнаружена корреляция активности коллагеназы с клиническим течением болезни (Ch. Huang и соавт., 1976).

Имеются данные о том, что вокруг опухолей кожи часто возникают деструктивные изменения, связанные с расщеплением нормальных участков коллагена кожи под действием специфической коллагеназы (K. Hashimoto и соавт., 1972). Раковые клетки в культуре ткани высвобождают значительные количества этого фермента в окружающую среду (M. Dabbous и соавт., 1977; Ch. Huang и соавт., 1979; M. Paranjpe и соавт., 1980; L. Liotta и соавт., 1981). Отмечено, что при выходе из опухолевых клеток в асцитную жидкость происходит активация неактивной формы коллагеназы (F. Steven и соавт., 1980). Опухолевый рост обуславливает усиленное выделение коллагеназы соединительной тканью стромы (Ch. Huang и соавт., 1976).

Таким образом, изучение многих систем *in vivo*, тканевых культур, трансформированных клеток показало, что злокачественный рост в основном сопровождается увеличением активности ли-

зосомальных протеиназ в тканях и жидких средах организма. Эти наблюдения послужили основанием для предположения, что активный протеолиз в опухоли может быть одной из причин метастазирования и инвазивного роста. Прямых доказательств участия протеиназ злокачественных опухолей в метастазировании пока не получено, однако имеются косвенные. Так, С. Blackwood и соавторы (1965), В. Sloane и соавторы (1981, 1982) отметили, что наиболее высокая активность катепсина В характерна для опухолей со значительной способностью к метастазированию.

Лизосомальные протеиназы, по-видимому, могут быть одним из факторов усиленной пролиферации опухолевых клеток, обуславливающей инвазивность злокачественных опухолей. Положительная корреляция между общей протеолитической активностью и инвазивностью опухолей обнаружена В. Sylvén, Н. Malmgren (1957). Позднее было показано, что активность кислых протеиназ в наружной части подкожно трансплантированных сарком Йенсена выше, чем во внутренней (R. Kampschmidt, D. Wells, 1968). Увеличенные количества лизосомальных ферментов (нейтральной протеиназы и катепсина В₁) в опухолевой клетке локализуются либо в плазматической мембране, либо у поверхности опухолевой клетки (В. Sylven и соавт., 1974; Т. Chu и соавт., 1979). Учитывая то, что катепсин В действует на протеогликаны, предполагают, что он может вызывать изменения в окружающем внеклеточном матриксе и способствовать инвазии опухолевыми клетками нормальных тканей (Н. Shnebli, 1974; В. Pauli и соавт., 1983).

Протеолитические ферменты, вероятно, могут играть роль в поддержании неконтролируемого размножения опухолевых клеток. Согласно гипотезе М. Burger (1973), трансформированные клетки не переходят после деления в фазу G₀ в связи с тем, что на их поверхности остаются активные протеиназы; на поверхности нормальных клеток эти ферменты активны только в период митоза. Протеолитические ферменты могут быть важным фактором регуляции скорости роста клеток. V. Hatcher и соавторы (1976) показали, что активность кислых и нейтральных протеиназ, находящихся на поверхности трансформированных клеток, коррелирует со временем удвоения культуры клеток. Для клеток со временем удвоения, превышающим 3 дня, характерна меньшая активность протеолитических ферментов по сравнению с клетками с более коротким временем удвоения.

Протеиназы фибринолиза и свертывания крови. К настоящему времени накопились данные о том, что протеолитические ферменты фибринолитической и свертывающей систем могут играть важную роль в осуществлении способности клеток злокачественных опухолей к инвазивности и метастазированию. Большое значение имеют фибринолитические ферменты, особенно активаторы плазминогена, которые с высокой специфичностью катализируют

превращение плазминогена в плазмин — основной фибринолитический фермент крови и тканей (Л. А. Локшина, 1979; Н. Landmann, 1978).

Первые сведения о наличии фибринолитических ферментов в опухолевых клетках получены давно. В 1925 г. А. Fischer обнаружил, что культуры фибробластов цыплят, трансформированных онкогенными вирусами, проявляют фибринолитическую активность, тогда как культуры нормальных клеток такой способностью не обладают. Впоследствии подобные данные были получены при изучении различных культур трансформированных клеток (J. Unkeless и соавт., 1973; L. Ossowski и соавт., 1973; 1973a; D. Goldberg и соавт., 1975; R. Pollack и соавт., 1975; E. Reich, 1975; V. Hatcher и соавт., 1976; J. Hamilton и соавт., 1978; B. Wolf, D. Goldberg, 1978; V. Mahdavi, R. Hynes, 1979, и др.). Эти исследования, установившие различия в фибринолизе нормальных и злокачественных клеток, позволили предположить, что лизис сгустков фибрина, находящихся вне клетки, может или зависеть от секреции раковыми клетками соответствующих ферментов, или осуществляться под действием ферментов фибринолиза, связанных с внешней поверхностью клеточных мембран.

Интенсивность фибринолиза при трансформации может значительно превышать таковую для нормальных клеток: почти в 20 раз в трансформированных фибробластах хомячка, более чем в 5 раз — в трансформированных фибробластах мыши, в 3—4 раза — в трансформированных фибробластах цыпленка, в 2—10 раз (в экспоненциальной фазе роста) и в 20—200 раз (в фазе G₀, когда рост клеток останавливается) — в трансформированных клетках 3Т3 (L. Ossowski и соавт., 1973; D. Loskutoff, D. Paul, 1978).

L. Ossowski и соавторы (1973) и J. Unkeless и соавторы (1973) отметили, что фибринолитическая активность трансформированных в малигнанные клеток является результатом взаимодействия двух компонентов. Один из них (клеточный фактор) продуцируется самими клетками, а другой (сывороточный фактор) представляет собой белок, который содержится в крови человека и всех позвоночных животных и вносится вместе с сывороткой — обычной составной частью культуральной среды. Каждое из этих веществ в отдельности фибринолитической активностью не обладает. Сывороточный фактор является проферментом плазминогена, клеточный — сериновой протеназой, активатором плазминогена, катализирующим преобразование плазминогена в плазмин. Последний, обладая трипсиноподобной специфичностью, ингибируется ϵ -АКК, ингибитором трипсина из бобов сои и полифункциональным ингибитором из поджелудочной железы быка (L. Ossowski и соавт., 1973; J. Unkeless и соавт., 1973; K. Dano, E. Reich, 1979). В то же время активатор плазминогена, выделенный из среды, в которой культивировались мышинные клетки, трансформи-

рованные вирусом саркомы мышей, не подвергается действию ингибиторов трипсина. Ионы металлов, красители, аналоги аминокислот и ряд других веществ в различной степени тормозят активность этого фермента (K. Danø, E. Reich, 1979).

E. Reich (1975) установил, что трансформированные фибробласты мыши выделяют в культуральную среду по крайней мере 4 сериновые протеиназы, причем 2 из них представляют собой активаторы плазминогена. Количественно преобладает активатор с молекулярной массой 50 000 дальтон, второй активатор имеет молекулярную массу 25 000 дальтон. J. Christman и соавторы (1975) активатор плазминогена с молекулярной массой 50 000 дальтон обнаружили в культуральной среде при выращивании трансформированных фибробластов хомячка. В очищенном виде этот белок, состоящий из 2 субъединиц с молекулярной массой 25 000 дальтон каждая, имел изоэлектрическую точку при pH 9,5. Этот активатор отличался по аминокислотному составу от урокиназы, α -химотрипсина и трипсина и в энзиматически активной форме локализовался на поверхности клеточных мембран. V. Mahdavi, R. Hynes (1979) выявили активатор плазминогена с молекулярной массой 62 000 дальтон в составе частиц клеточной мембраны трансформированных клеток, а с молекулярной массой 39 000 дальтон — в культуральной среде.

Последующие исследования показали, что нарастание фибринолитической активности в культуральной среде трансформированных клеток различных животных обусловлено повышенным выделением активаторов плазминогена (A. Goldberg и соавт., 1975; R. Pollack и соавт., 1975). Интенсивность образования активаторов плазминогена и степень потенциальной фибринолитической активности тесно коррелируют с морфологическими критериями злокачественной трансформации клеток (L. Ossowski и соавт., 1973a). Эта корреляция зависит также от присутствия в среде плазминогена (P. Whig и соавт., 1979). При отсутствии его уменьшается скорость образования колоний клеток, замедляется развитие морфологических изменений, характерных для опухолевой трансформации, нарушается способность клеток к миграции. По данным L. Ossowski и соавторов (1973), экзогенный плазминоген или активный плазмин прочнее связываются с трансформированными клетками, чем с нормальными. Введение ингибиторов активаторов плазминогена ограничивало рост трансформированных онкогенными вирусами клеток (A. Goldberg и соавт., 1975). В трансформированных вирусом саркомы Рауса куриных фибробластах активность активаторов плазминогена обнаруживалась в течение всего клеточного цикла. Максимальной она была в фазе G_2 или митозе, а в нормальных фибробластах выявлялась только в течение фазы S, в конце фазы G_2 или митозе (J. Soric, B. Brdar, 1982).

Таким образом, первичные культуры клеток, трансформированных онкогенными вирусами, выделяют в отличие от нормальных в культуральную среду значительные количества активаторов плазминогена, вследствие чего в этой жидкости при определенных условиях повышается фибринолитическая активность, причем связь фибринолиза и неоплазии не зависит от природы трансформирующего агента. На основании этих данных высказано предположение, что увеличенные уровни активатора плазминогена, по-видимому, связаны с поддержанием трансформированного состояния и одним из наиболее ранних признаков перерождения клеток может служить их способность продуцировать активаторы плазминогена (A. Goldberg, S. Lazarowits, 1974; E. Reich, 1974). Однако при многократных пассажах трансформированных клеток такая закономерность уже не проявляется: обнаружены культуры трансформированных клеток с низкой фибринолитической активностью и нетрансформированных — с высокой (D. Mott и соавт., 1974). Активаторы плазминогена, образуемые опухолевыми клетками, способны активировать латентные протеиназы соединительнотканых клеток, что может быть одним из возможных механизмов инвазии нормальной ткани опухолевыми клетками (J. Boyd и соавт., 1979).

Приведенные сведения характеризуют культуры трансформированных клеток животного происхождения. Подобные данные получены при изучении культур опухолевых клеток человека — остеосаркомы, меланомы, мезотелиомы (D. Rifkin и соавт., 1974; D. Colpen и соавт., 1977). Они позволяют заключить, что культуры опухолевых клеток человека продуцируют значительные количества активаторов плазминогена и в определенных условиях проявляют фибринолитическую активность, которая тормозится ингибиторами трипсина.

Из культуры клеток меланомы человека выделены активаторы плазминогена 2 видов — главный компонент имел молекулярную массу 50 000 дальтон, а другой — 60 000 дальтон; оба чувствительны к действиюДФФ, т. е. представляют собой сериновые протеиназы. Активатор плазминогена из культуральной среды клеток карциномы поджелудочной железы человека также имел молекулярную массу 55 000 дальтон (Wu Ming-chi и соавт., 1977; Wu Ming-chi, A. Yunis, 1979). Изоэлектрическая точка его находилась при рН 8,7, он был термостабильным (выдерживал нагревание при температуре 60 °С в течение 30 мин) и проявлял активность при рН 1,5—10. В самих опухолевых клетках активатор плазминогена обнаруживался в мембранной фракции и высвобождался из мембран при обработке их детергентами. Подвижность при электрофорезе в полиакриламидном геле клеточного активатора плазминогена была такой же, как и секретируемого. Активатор плазминогена из культивируемой карциномы поджелудочной железы по

ряду свойств (молекулярная масса, аминокислотный состав, зависимость от рН и температуры, активация плазминогена) не отличался от урокиназы из мочи человека. Активатор плазминогена из клеток Hela ингибировался синтетическим пептидом дансил-глутамил-глицил-хлорметилкетон (P. Coleman и соавт., 1979). Клетки вторичных метастазов гигантско-клеточной карциномы легких в культуре ткани и клеточная линия рака молочной железы продуцировали также значительные количества активаторов плазминогена (J. Davidson и соавт., 1969; W. Butler и соавт., 1979). Высокий уровень активаторов плазминогена обнаружили в культуральной жидкости и лизатах клеток культур злокачественных опухолей мозга, причем, как и в случае трансформированных клеток животных, он являлся сериновой протеиназой (W. Tucker и соавт., 1978). В таких же объектах нормальных клеток мозга активаторы плазминогена не определялись.

Фибринолиз, вызванный плазмином, был характерен для культур клеток раковых опухолей матки и грудной железы в отличие от клеток соответствующих нормальных тканей, но в процессе культивирования опухолевые клетки постепенно теряли фибринолитические свойства (B. Nagy и соавт., 1977). Это, по мнению авторов, объясняется тем, что в условиях длительного культивирования исчезает популяция клеток, продуцирующих активатор плазминогена.

Потерю способности культур клеток опухолей человека выделять активаторы плазминогена при длительном культивировании наблюдали также K. Rosenthal и соавторы (1977). Так, недолго растущие в культуре клетки (менее 30 пассажей) карцином ободочной и прямой кишок обладали способностью активировать плазминоген, а длительно существующие в культуре злокачественные клетки (рак ободочной кишки и гортани, плоскоклеточный рак полости рта, клетки Hela) его не активировали. E. Wilson, E. Dowdle (1978) не обнаружили полного отсутствия секреции активаторов плазминогена при длительном культивировании злокачественных клеток. Секреция активаторов плазминогена в течение первых 50—100 суток культивирования возрастала до максимальной, после чего их уровень уменьшался до длительного неустойчивого плато. Авторы считают, что, по-видимому, в условиях *in vitro* сначала возникает клеточная популяция со сравнительно высокой скоростью синтеза активаторов, а затем — стабильная популяция злокачественных клеток с низкой скоростью их синтеза.

Активаторы плазминогена в клетках фибросаркомы человека ассоциируются с мембраной пузырьков пластинчатого комплекса, с помощью которого в дальнейшем они могут выделяться в межклеточное пространство (W. Laug и соавт., 1983). Имеются сведения о выделении клетками культуры меланомы и карциномы

грудной железы человека активной формы фибринолитического фермента, которая отличается от активатора плазминогена и плазмина сыворотки крови человека (D. Shultz и соавт., 1975).

Ряд авторов отметили сдвиги в системе фибринолиза в тканях злокачественных новообразований человека и животных. Содержание активаторов плазминогена в тканях злокачественных опухолей мозга, вторичных метастатических образованиях при гигантско-клеточной карциноме легких, опухолях грудной железы, желудка, эндометрия, шейки матки, мочевого пузыря, толстой кишки, легкого, злокачественной меланоме было выше, чем в нормальной ткани (J. Davidson, 1969; G. Weiss, F. Beller, 1969; H. Hisazumi, 1975; J. Parilla и соавт., 1975; B. Nagy и соавт., 1977; N. Sakuragawa и соавт., 1977; W. Tucker и соавт., 1978; J. Corastani и соавт., 1980; G. Marcus и соавт., 1980, 1981). В тканях злокачественных новообразований иногда выявляются также другие компоненты фибринолитической системы: ингибиторы плазмина и активаторов плазминогена, свободный плазмин (J. Davidson, 1969; H. Hisazumi, 1975; H. Hisazumi и соавт., 1977; N. Sakuragawa и соавт., 1977). Результаты наших исследований показали, что в тканях злокачественных новообразований гортани обнаруживаются как активаторы, так и проактиваторы плазминогена. Кроме того, в 50 % случаев определяется плазминоген, в 25 % — свободный плазмин (О. П. Голобородько и соавт., 1982).

Первичные опухоли молочных желез у мышей и крыс продуцируют *in vivo* значительно большие количества активатора плазминогена, чем нормальные ткани железы (L. Ossowski и соавт., 1979). В бесклеточной асцитной жидкости опухоли Эрлиха у мышей активаторы плазминогена не обнаружены (P. LeBlanc, N. Back, 1975). Они определялись в субклеточных фракциях клеток этих опухолей — ядерной и митохондриально-лизосомальной. В асцитной жидкости не выявлялся также свободный плазмин и в процессе роста опухоли уменьшалось содержание плазминогена. Опухолевые промоторы значительно увеличивают продуцирование активаторов плазминогена и коллагеназы клетками бычьего эпителия капилляров — соответственно в 2—10 и 5—15 раз (J. Gross и соавт., 1982). Исследователи высказывают предположение, что активатор плазминогена участвует в активации латентной коллагеназы раковых клеток при инвазии (M. Rajanpre и соавт., 1980).

Повышенный уровень активаторов плазминогена в опухолях может быть использован при направленной терапии химиопрепаратами, связанными с пептидными носителями (M. Bruesch и соавт., 1983). Модифицированные таким образом лекарственные вещества гидролизуются в опухолях активаторами плазминогена с высвобождением активного компонента вблизи опухоли.

Исходя из того что расщепление фибриногена является одним

из условий, обеспечивающих распространение опухолей, N. Raymond и соавторы (1983) предлагают рассматривать активаторы плазминогена как маркеры метастатического потенциала раковых клеток. Основанием для этого послужили результаты экспериментальных исследований, показавшие, что у мышей опухоли образуются только при внутривенном введении культур опухолевых клеток с высоким содержанием активаторов плазминогена.

Фибринолитическая активность повышается в плазме крови больных онкологическими заболеваниями (Ф. А. Бергут, Г. В. Андреевко, 1974; Н. Mali и соавт., 1976; Т. Kosugi и соавт., 1982). Нарастание фибринолиза у больных этими заболеваниями и животных с опухолями сопровождается увеличением в крови продуктов распада фибрина/фибриногена (J. Anstey, J. Blythe, 1978; S. Garlsson, 1973; E. Wilmes, K. Hochstrasser, 1978; M. Bruesch и соавт., 1983). Последние выявляются в повышенных количествах в среде культивирования клеток злокачественных опухолей по сравнению со средой культивирования доброкачественных опухолей или нормальных органов (L. Svanberg, B. Astedt, 1976). Наличие продуктов распада фибрина/фибриногена в крови считается одним из признаков злокачественного роста, причем некоторые из них обладают иммунодепрессивными свойствами (А. С. Белыхостов, Б. О. Войтенков, 1983).

Значение обнаруженных изменений активности компонентов фибринолитической системы в возникновении и развитии неоплазии еще не совсем ясно. Однако имеются данные о том, что активаторы плазминогена и плазмин существенно изменяют свойства поверхности мембран клеток и мембранных ферментных систем, нарушают скорость синтеза ДНК и контактное торможение и вследствие этого могут быть частью механизмов контроля над характером роста опухолевых клеток (J. Christman и соавт., 1975; R. Pollack и соавт., 1975; M. Kapiszewska, 1980). Увеличение продукции активаторов плазминогена клетками злокачественных опухолей и высокая спонтанная фибринолитическая активность в карциноматозных тканях в ряде случаев коррелируют со степенью инвазивности и частотой возникновения метастазов (H. Peterson и соавт., 1973; B. Brdar и соавт., 1976; J. Corastani и соавт., 1980). Имеются также указания на то, что искусственная интенсификация фибринолитических процессов у животных с опухолями увеличивает частоту спонтанных метастазов (M. Sigimura и соавт., 1975). Но в литературе приведены и другие данные. Так, L. Svanberg и соавторы (1975) в тканях злокачественных опухолей яичников обнаружили корреляцию фибринолитической активности не с малигнизацией, а с количеством кровеносных сосудов в исследуемом участке опухоли, а D. Tagin и соавторы (1982) не выявили корреляционной зависимости между продукцией активаторов плазминогена и метастатическим потенциалом опухолевых клеток.

Несмотря на некоторую противоречивость полученных данных, многие из них свидетельствуют о том, что повышенное выделение опухолевыми клетками активаторов плазминогена, обладающих свойствами нарушать межклеточные контакты и регуляторные механизмы роста, может быть одним из характерных признаков злокачественного перерождения клеток.

При онкологических заболеваниях наряду с усилением фибринолиза наблюдается активация системы свертывания крови, приводящая к тромбоэмболическим осложнениям (Т. Edington, 1980). Раковые клетки продуцируют факторы, способствующие свертыванию крови. Так, ткани опухолей разных органов у человека имеют более высокое содержание тромбопластина, чем те органы, из которых они происходят (М. А. Уколова, Е. Б. Квакина, 1962; В. П. Сипетров, 1978; N. Sakigagawa и соавт., 1977). Активность тромбопластического фактора обнаружена также в культуральной среде ряда культур новообразований и асцитной жидкости опухолей животных, причем она ассоциировалась с плазматическими мембранными везикулами, сбрасываемыми с опухолевых клеток *in vivo* и *in vitro* (Н. Dvorak и соавт., 1981). Наличие этих везикул с активным тромбопластическим фактором может объяснить накопление фибрина, часто сопутствующее различным новообразованиям животных и человека (S. Gordon, 1981). Из опухолевых клеток животных выделена тиловая протеиназа, способная ускорять коагуляцию посредством активации фактора X (S. Gordon, 1981). В тканях злокачественных новообразований человека, особенно во вторичных опухолях, обнаружен белок со свойствами, близкими к протромбину; в нормальных тканях это вещество не выявлено (Б. И. Кузник и соавт., 1976). По данным Б. А. Кудряшова и соавторов (1977), экзогенные противосвертывающие вещества у животных угнетают рост метастазов первичной опухоли.

Повышение свертывания крови у больных онкологическими заболеваниями может быть обусловлено рядом факторов, в частности выделением в кровь тромбопластических и прокоагулянтных веществ раковыми клетками (Д. П. Павловский, 1981; W. Brajerski, 1976; J. Kaniak, 1977). Особенно сильно увеличивается уровень тромбопластических веществ в крови при злокачественных новообразованиях с тромбоэмболическими осложнениями (J. Kaniak, 1977). Выделение этих веществ бластными клетками через клеточные мембраны в окружающую среду и повышение тромбопластической активности крови считается наиболее характерной особенностью новообразований (Д. П. Павловский, 1981).

У больных злокачественными новообразованиями различной локализации в плазме крови увеличивается также содержание фибриногена (Д. П. Павловский, 1981; К. Н. Веремеенко и соавт., 1983; W. Brajerski, 1976; J. Kaniak и соавт., 1977; P. Opat и соавт., 1981; T. Kosugi, 1982). Имеются данные о значении фибриногена

крови для прикрепления опухолевых клеток: удаление из крови фибриногена во время инъекции опухолевых клеток животным приводило к образованию первичных опухолей с меньшей массой и уменьшению количества метастазов по сравнению с животными с нормальным содержанием фибриногена (J. Chmielewska и соавт., 1980). Предполагают также, что именно полимеризация фибриногена в фибрин может быть связана с имплантацией опухолевых клеток и ростом метастазов (G. Weiss, F. Beller, 1969). Наряду с этим существует мнение, что отложение фибрина в периферической зоне опухолей может быть одной из защитных реакций организма против роста опухоли (H. Peterson и соавт., 1973).

Таким образом, в тканях злокачественных новообразований содержатся белки и ферментные системы, участвующие в свертывании крови. Однако значение этих веществ в жизнедеятельности опухолевых клеток еще полностью не выяснено. Этот вопрос требует дальнейшего изучения.

Ферменты калликреин-кининовой системы. В последние годы привлекают внимание исследования при злокачественных новообразованиях вазоактивных пептидов кининов. Эти вещества участвуют в регуляции тока крови и проницаемости клеточных мембран, в связи с чем могут косвенно способствовать метастазированию и инвазии опухолей (К. Н. Веремеенко, 1983).

Система протеиназ, способная образовывать кинины, обнаружена в злокачественных клетках и тканях (О. П. Голобородько и соавт., 1980; J. Oates и соавт., 1964; L. Greenbaum и соавт., 1969). В асцитной жидкости опухоли Эрлиха у мышей содержание прекалликреина увеличивалось по мере роста новообразования, а активность кининазы, относительно высокая в начале заболевания, равномерно уменьшалась в течение опухолевого роста и затем резко увеличивалась в его конечной фазе (P. LeBlanck, N. Back, 1975). В патологическом накоплении асцитной жидкости участвуют лейкокинины, образующиеся из лейкокининогенов под действием катепсина D. Применение ингибитора кислых протеиназ пепстатина тормозит образование асцитной жидкости при экспериментальных опухолях у мышей (L. Greenbaum и соавт., 1973).

В сыворотке крови больных хроническим и острым лимфолейкозом и раком гортани обнаружена активация прекалликреин-калликреиновой системы (С. Г. Галкина, 1981; Г. Т. Блеян и соавт., 1982; К. Н. Веремеенко и соавт., 1983; H. Lukjan, M. Bielawiec, 1981). Степень увеличения активности калликреинов и кининаз при хроническом миелоидном лейкозе зависит от стадии заболевания и тяжести состояния больного (Н. Ф. Бужерак, 1980). У больных различными злокачественными заболеваниями крови, особенно острым лейкозом и множественной миеломой, снижена активность пептидилдипептидазы, катализирующей также расщепление брадикинина (F. Rømer, K. Emmersten, 1980). При

нелимфогранулематозной лимфоме плохой прогноз ассоциируется с низкой активностью этого фермента.

Изучение протеолитических ферментов при злокачественном росте началось давно. Их роль при неоплазии еще полностью невыяснена, но можно отметить, что при опухолевом росте часто возрастания уровней активатора плазминогена, коллагеназы, лизосомальных катепсинов. Прямых доказательств участия протеолитических ферментов в стимулировании опухолевого роста пока не получено, однако имеется множество косвенных свидетельств о связи процессов протеолиза и канцерогенеза. К ним относятся: увеличенная протеолитическая активность в трансформированных клетках и при любой локализации злокачественных новообразований у животных и человека (наиболее активные ферменты обнаруживаются по периферии опухолей — в зоне интенсивной инвазии), способность трансформированных клеток *in vivo* разрушать межклеточные контакты, наличие корреляции между протеолитической активностью раковых клеток и их инвазивностью, локализация протеиназ на или близко к поверхности трансформированных клеток, способность протеолитических ферментов стимулировать клеточную пролиферацию, подавление ингибиторами протеиназ опухолевого роста у животных и др.

Современные представления о роли протеолитических ферментов в генезе и инвазивности опухолей можно обобщить следующим образом (Ю. Б. Мишин, 1982; А. С. Белохвостов, Б. О. Войтенков, 1983; D. Wallach, 1976; Z. Zbytniewski, A. Kanclerz, 1977; N. Raymond, J. Kellen, 1983).

1. Протеиназы из опухолевых клеток *in vivo* могут разрушать нормальную архитектуру ткани, облегчая инфильтрацию опухолевых клеток в ткани хозяина.

2. Протеолитические ферменты, как эндогенные, так и экзогенные, способны удалять с поверхности клеток определенные белки, что приводит к ликвидации контактного торможения роста и изменению адгезивных свойств клеток.

3. Протеиназы, выделяемые клетками новообразований либо находящиеся в цитоплазматической мембране, расщепляют высокомолекулярные соединения тканей хозяина и обеспечивают раковые клетки питательными веществами, необходимыми для опухолевого роста.

4. Кислые протеиназы, секретируемые из опухолевой ткани в интерстициальную жидкость, могут разрушать первичные мембраны капилляров, способствуя проникновению раковых клеток через стенки сосудов к тканям хозяина и образованию метастазов.

5. Протеолитические ферменты способны ослаблять антигенные свойства раковых клеток, расщепляя определенные участки, ответственные за иммуноспецифичность, а также модифициро-

вать иммуноглобулины таким образом, что они теряют свою защитную функцию против раковых антигенов.

Протеиназы опухолей могут воздействовать как на сами опухолевые клетки, так и на их взаимоотношения с организмом-опухоленосителем различными путями. Эти механизмы взаимно не исключают друг друга и каждый из них в свое время может играть определенную роль в зависимости от типа опухоли. Дальнейшее изучение роли этих ферментов в злокачественном перерождении имеет теоретическое и практическое значение.

Ингибиторы протеолиза. Ингибиторы протеолиза или антипротеиназы содержатся в тканях и крови и являются одним из механизмов защиты организма от протеолитических ферментов эндогенного и экзогенного происхождения. Нарушение равновесия протеиназы — ингибиторы протеиназ приводит к возникновению различных патологических состояний (Z. Zbytniewski, A. Kanclerz, 1977). В клинической и экспериментальной онкологии параллельно исследованиям протеолитических ферментов ведется интенсивное изучение регуляторов их действия — ингибиторов протеиназ.

В тканях злокачественных опухолей содержание антипротеиназ снижается. С. Blackwood и соавторы (1965) обнаружили уменьшение уровня ингибиторов протеиназ в опухолях женских половых органов, особенно низким было их содержание в метастазах. Аналогичные результаты получены при исследовании злокачественных опухолей другой локализации. Так, в тканях новообразований молочной железы и гортани уровень ингибиторов протеиназ был значительно меньшим, чем в соответствующих нормальных тканях (В. М. Лосицкая, 1971; С. А. Гешелин и соавт., 1981). В клетках опухолей человека была обнаружена главным образом функционально неактивная форма одного из основных ингибиторов протеолитических ферментов — α_1 -ИП (S. Sawaki, 1977).

В сыворотке (плазме) крови при опухолях различной локализации повышается концентрация антипротеиназ. Увеличение антипротеолитической активности отмечено при раке поджелудочной и молочной желез, печени, шейки матки, легких, гортани, внутричерепных опухолях, причем в основном за счет нарастания α_1 -ИП (Е. И. Степанова и соавт., 1977; И. Ф. Спицин и соавт., 1979; К. Н. Веремеенко и соавт., 1983; A. Latner и соавт., 1976; J. Bata и соавт., 1977; M. Micksche, O. Kokron, 1977; A. Tress, J. Munoz, 1977; S. Galves и соавт., 1978; L. Chio, C. Oon, 1979; I. Biesiekierska-Chańko, 1981). При малигнанных опухолях уровень ингибиторов протеолиза возрастает также в моче и ликворе (S. Galves и соавт., 1979; E. Wilmes и соавт., 1979; C. Hermann, U. Vieth, 1980). Количественное определение сывороточных ингибиторов можно использовать в качестве прогностического теста, а также для оценки эффективности лечения больных злокачественными

новообразованиями (Б. Е. Кардаш, И. Я. Гейтман, 1978; С. Hermann, U. Vieth, 1980; I. Biesiekierska-Chańko, 1981).

Повышение содержания антипротеиназ и прежде всего α_1 -ИП в крови больных с новообразованиями, вероятно, обусловлено естественной реакцией организма на высокую активность протеиназ в тканях опухолей и является защитным механизмом от инвазии опухолей (Z. Zbytniewski, A. Kanclerz, 1977).

При онкологических заболеваниях наряду с количественными изменениями ингибиторов трипсина выявляются их качественные отличия. У больных раком гортани сывороточные ингибиторы трипсина, локализованные в α_1 - и α_2 -глобулиновой фракциях, менее чувствительны к температурному воздействию и кислой реакции среды, чем у доноров (В. М. Лосицкая, 1971). При раке легких, предстательной железы и пищеварительного канала обнаружены изменения содержания углеводов в молекуле α_1 -ИП (I. Rostenberg и соавт., 1978). При остром миелоидном лейкозе в крови больного выявлен новый вариант α_1 -ИП с высокой электрофоретической подвижностью, который образуется вследствие двух мутаций (A. Yoshida и соавт., 1979).

В некоторых работах изучалось содержание α_2 -М, СТИ и АТ III при онкологических заболеваниях. Повышение уровня α_2 -М наблюдали при ранних стадиях рака гортани (В. М. Лосицкая, 1971). У больных раком шейки матки концентрация этого ингибитора значительно не отличалась от нормы и повышалась только при рецидивах заболевания (T. Pulay, S. Csömör, 1980). Не отмечено значительных изменений содержания α_2 -М при раке легкого и мочеполовых путей (J. Vata и соавт., 1977; U. Dunzendorfer и соавт., 1980). В сыворотке крови больных с гепатомой обнаружено резкое снижение концентрации α_2 -М (A. Tress, J. Mupoz, 1977). При злокачественных новообразованиях уменьшается активность АТ III, причем наиболее низкое содержание этого ингибитора наблюдается при метастазах в печени (W. Brajerski, 1976; H. Noregger и соавт., 1981). При первичных карциномах печени снижение в плазме крови уровня АТ III связано с увеличением его катаболизма (V. Chap и соавт., 1981). В сыворотке крови больных со злокачественными новообразованиями увеличена концентрация СТИ, контролирующего активность первого компонента комплемента (J. Astrup и соавт., 1977). Наиболее выраженное повышение содержания этого ингибитора отмечалось при наличии метастазов.

Уровень ингибиторов протеиназ в опухолях зависит от физиологического состояния организма. Так, опухоли молочной железы содержат низкомолекулярный ингибитор протеолиза, количество которого резко возрастает в новообразованиях при беременности и лактации (B. Waxler, F. Wezeman, 1983). Так как эстрогены повышают протеолитическую активность в раковых опухолях мо-

лочной железы *in vitro*, можно предположить, что нарастание концентрации ингибиторов является ответом на увеличение инвазивного потенциала опухолей в условиях усиленного выделения в организме стероидных гормонов.

Учитывая активацию протеолитических процессов, особенно фибринолиза и коллагенолиза, у больных злокачественными опухолями, исследователи предпринимают попытки использовать естественные и синтетические ингибиторы протеолиза для торможения злокачественного роста и лечения экспериментальных опухолей (Z. Zbytniewski, A. Kanclerz, 1977). Ингибиторы протеиназ, выделенные в чистом виде из различных тканей, широко применяются в клинике при патологических процессах, связанных с активацией протеиназ (К. Н. Веремеенко, 1971).

В эксперименте показано, что природный ингибитор протеолиза широкого спектра действия (полифункциональный ингибитор Кунитца) тормозит рост опухолей и распространение опухолевых клеток (A. Latner и соавт., 1974; T. Gibaldi, C. Nisi, 1977). Этот эффект проявляется в основном при солидных карциномах, которые в определенной степени способны к инвазии и метастазированию (A. Lage и соавт., 1978).

В опытах *in vivo* обнаружено, что ингибитор из тканей легких контрикал угнетает рост и прививаемость солидной карциномы Эрлиха у мышей, причем его влияние опосредуется организмом опухоленосителя (Ю. Б. Мишин, 1982). Об этом свидетельствует то, что в условиях подавления иммунной системы общим облучением до прививки опухоли полностью снимается противоопухолевый эффект ингибитора. С помощью ингибиторов протеолиза можно подавить также индуцируемую рентгеновскими лучами злокачественную трансформацию клеток (A. Kennedy, J. Little, 1981). Поэтому разработка методов повышения синтеза и высвобождения ингибиторов из тканей в биологические жидкости организма является перспективным направлением в иммунотерапии злокачественных опухолей (А. С. Белохвостов, Б. О. Войтенков, 1983).

U. Thorgerirsson и соавторы (1982) показали, что природные ингибиторы протеиназ, а также экстракты хряща быка, содержащие ингибиторы сериновых и металлозависимых протеиназ (коллагеназ), подавляют инвазивные свойства клеток ретикулярной саркомы, характеризующихся *in vivo* высокой инвазивностью и выраженной коллагенолитической активностью. Хрящ и аорта — ткани, содержащие высокие концентрации ингибитора трипсина, по многим параметрам сходного с ингибитором Кунитца, высокоустойчивы к опухолевой инвазии (D. Rifkin, R. Crowe, 1977).

Р. Коо (1983) изучал противоопухолевую активность ингибитора протеиназ широкого спектра действия α_2 -М и отметил, что в опытах *in vitro* он является цитотоксическим фактором по отно-

шению к опухолевым клеткам, так как задерживает рост культивируемых клеток злокачественных опухолей.

Одно из объяснений противоопухолевого действия полифункциональных ингибиторов протеиназ заключается в том, что благодаря щелочным свойствам эти вещества способны соединяться с кислыми гликозаминогликанами мембран первичных капиллярных сосудов, способствуя их целостности. Присоединение ингибиторов нейтрализует также активные протеолитические ферменты, локализованные в мембранах раковых клеток, что мешает им проникать через стенки сосудов и образовывать метастазы. Длительное пребывание раковой клетки в просвете капилляров увеличивает вероятность ее цитолиза с помощью механизмов естественной защиты организма (Z. Zbytniewski, A. Kanclerz, 1977).

Синтетические ингибиторы протеолитических ферментов — тозил-лизин-хлорметилкетон, тозил-фенилаланин-хлорметилкетон — тормозили опухолевый процесс на коже у мышей, вызванный химическими канцерогенами (W. Troll и соавт., 1970). Ингибиторы фибринолиза *p*-аминобензимид и ϵ -АКК увеличивали продолжительность жизни и процент долгоживущих мышей — носителей карциномы Эрлиха (R. Verloes и соавт. 1978). Пероральное введение транэксамовой кислоты животным-опухоленосителям вызывало уменьшение размеров или подавление роста опухолей, увеличение времени выживания животных, снижение скорости накопления асцитической жидкости (B. Astedt, C. Trope, 1980). Полагают, что ее действие на рост опухолей может быть обусловлено торможением превращения плазминогена в плазмин. Ингибитор кислых протеиназ пепстатин также вызывает уменьшение объема асцитической жидкости при различных формах рака у мышей (L. Greenbaum, 1979). Как считает автор, это происходит благодаря угнетению активности катепсина D, который катализирует образование лейкокининов, способствующих в значительной степени накоплению асцитической жидкости (К. Н. Веремеенко, 1977).

О значительной противоопухолевой активности ингибиторов протеиназ свидетельствуют торможение опухолевого роста, снижение прививаемости опухолей, увеличение выживаемости животных при введении им этих ингибиторов (Ю. Б. Мишин, 1982; R. Verloes и соавт., 1978; T. Giralди и соавт., 1980). Отмечено непосредственное (подавление пролиферации трансформированных клеточных линий) и косвенное (через иммунную систему организма-опухоленосителя) действие ингибиторов на опухолевый рост.

Дальнейшее изучение противоопухолевого действия ингибиторов протеолиза, их способности задерживать метастазирование и инвазию опухолей — важная задача экспериментальной и клинической онкологии.

Исследование протеолитических ферментов с широкой и узкой субстратной специфичностью, а также их естественных ингибиторов актуально в целях расшифровки механизмов злокачественного роста и поиска новых лечебных препаратов для нормализации системы протеолиза у больных онкологическими заболеваниями.

ПРОТЕИНАЗЫ И ИХ АКТИВАТОРЫ КАК ТРОМБОЛИТИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА

Протеолитические ферменты и их активаторы применяются в клинической практике для лизиса тромбов (Е. И. Чазов и соавт., 1966; Е. И. Чазов, К. М. Лакин и др., 1977; Г. В. Андреевко, 1979). Этому способствовала расшифровка механизмов естественного фибринолиза, который является защитной реакцией организма и обеспечивает удаление из него фибриновых сгустков (D. Collen, 1980).

Успехи в изучении отдельных компонентов фибринолитической системы способствовали разработке методов тромболитической терапии (Ф. И. Комаров, И. Н. Бокарев, 1980). В решении вопроса об искусственном повышении фибринолитического потенциала крови наметились два подхода — использование активаторов плазминогена и активных протеолитических ферментов. Наиболее целесообразным представлялось экзогенное введение протеиназ, которые бы непосредственно лизировали тромбы. В начале 50-х годов в качестве тромболитического препарата пытались применить трипсин, поскольку в опытах *in vitro* он эффективно расщеплял фибрин. Однако внутривенная инъекция этого фермента с целью лизиса отложений фибрина внутри сосудов вызывала выраженные побочные реакции, а тромболитический эффект был недостаточным. Это объяснялось тем, что вводимый трипсин гидролизует не только фибрин, но и другие плазменные белки, что обуславливало образование вазоактивных пептидов, нарушающих функцию свертывания крови. Кроме того, трипсин вызывал активацию протромбина и стимулировал свертывание крови. В связи с этим в настоящее время трипсин как тромболитическое средство не применяется.

Впоследствии для лизиса фибриновых сгустков использовали протеолитические ферменты, выделенные из грибов *Asp. oryzae*, *Asp. ochracea*, *Asp. nidulans*, *Asp. terricola* и др. (Г. В. Андреевко, 1979). Из *Asp. oryzae* получены очищенные препараты протеиназ — бриназа и бринолаза, которые при внутривенном введении животным в дозах, превышающих ингибиторный потенциал плазмы, проявляют фибринолитическое действие. Однако применение указанных ферментов в качестве фибринолитических средств затруднено, так как они не обладают специфичностью по отношению к фибрину и могут расщеплять также другие белки крови. По

данным Н. Klösing и соавторов (1981), тромболитический эффект оказывает окраза (фермент из *Asp. ochracea*), введенная внутривенно животным в дозах, значительно меньших, чем ингибиторная емкость плазмы крови. Полагают, что в присутствии фибрина активный фермент освобождается из неактивного комплекса с ингибиторами крови и атакует фибриновую основу тромба. Недавно разработан полупроизводственный метод получения тромболитического препарата триазы из культуры патогенного гриба *Tg. roseum* и показано его фибринолитическое действие (О. К. Гаврилов и соавт., 1985).

Анализ литературы позволяет сделать заключение, что протеиназы из грибов можно использовать в качестве фибринолитических средств путем их непосредственного введения в участок тромба или закрытые полости.

Для профилактики тромбозов применяются препараты тромбиноподобных ферментов, выделенных из яда некоторых видов змей — арвин и батроксобин (К. Stocker, 1978). Механизм действия этих препаратов заключается в удалении фибриногена из циркулирующей крови; при этом улучшаются ее реологические свойства и уменьшается вязкость, которая в существенной мере определяется фибриногеном. Основное отличие дефибринирующих энзимов от тромбина заключается в том, что они отщепляют от молекулы фибриногена только фибринопептид А, а тромбин — фибринопептиды А и В. В результате неполного расщепления фибриногена образуются ранние рыхлые формы фибрина, которые легко лизируются и выводятся из организма. Имеются данные о применении ферментов из ядов змей для лечения тромбозов. Введение арвина за несколько дней до тромбозэктомии предотвращает послеоперационные ретромбозы, а также позволяет выполнить обширные операции на венах в условиях полной дефибринации (Р. Olsson и соавт., 1976).

В тромболитической терапии нашли применение препараты плазмина: тромболизин, фибринолизин (отечественного производства), актаза, фибролан и др. (Г. В. Андреев, 1979). Они получены путем активации плазминогена СК и трипсином, в частности фибринолизин — посредством активации трипсином плазминогена, выделенного из фракции III белков по Кону плацентарной крови. На основании теоретических разработок Б. А. Кудряшова (1975) и предложенной им новой концепции регуляции жидкого состояния крови фибринолизин необходимо назначать в сочетании с гепарином. Внутривенное введение такой смеси эффективно в лечении тромбозов периферических артерий, магистральных вен нижних конечностей и таза, инфаркта миокарда, кровоизлияний в глаз и др. Методика применения, показания и результаты лечения подробно изложены в монографиях Е. И. Чазова (1966), Е. И. Чазова, К. М. Лакина (1977), Г. В. Андреев (1979) и др.

Лучший эффект достигается при введении фибринолизина непосредственно в тромб или вблизи него, что позволяет уменьшить концентрацию фермента и избежать побочных реакций. Однако методические трудности, связанные со сложностью зондового селективного введения препарата непосредственно в очаг поражения, затрудняют его применение при оказании экстренной медицинской помощи в условиях стационара. Введение же фибринолизина в общую циркуляцию не всегда дает эффект, так как фермент быстро инактивируется плазменными ингибиторами, особенно α_2 -АП. Кроме того, использование больших доз плазмина, превышающих антипротеолитический потенциал плазмы, приводит к неспецифическому протеолизу, в результате которого образуются продукты распада белков, обладающие высокой фармакологической активностью. К ним относятся пептиды, потенцирующие действие вазоактивных соединений кининов и др., что сопровождается побочными реакциями. Это ограничивает применение фермента. Однако наблюдаемый положительный эффект вводимого экзогенно фибринолизина свидетельствует о возможности его прямого литического действия на тромб. По-видимому, лизис тромбов в данном случае объясняется образованием комплекса плазмина с α_2 -М, который является переносчиком фермента и защищает его от инактивации циркулирующими антиплазминами. Благодаря естественному средству к фибрину плазмин может освобождаться из комплекса и оказывать лизирующее действие на тромб.

Основной причиной, препятствующей широкому применению в терапии тромбозов экзогенного плазмина, является его низкая специфичность к фибрину, т. е. невозможность разделить фибринолитическую и фибриногенолитическую функцию. В связи с этим ведутся исследования, направленные на получение модифицированных протеиназ, в частности плазмина, которые бы избирательно расщепляли сгустки фибрина, но не влияли на его предшественник — фибриноген, преобладающий в плазме, и были бы менее подвержены инактивации сывороточными ингибиторами протеиназ.

Мы попытались разработать такую модификацию плазмина, которая бы делала его избирательным в отношении к фибрину. Для модификации плазмина в качестве своеобразного носителя использовали α_2 -М — белок, содержащийся в плазме крови человека и обладающий уникальной способностью реагировать практически со всеми известными эндопептидазами, ограничивая их каталитические функции (К. Н. Веремеенко и соавт., 1984). Этот тип связывания протеиназ можно назвать биологической иммобилизацией, которая не требует предварительной активации носителя. Ранее мы обнаружили, что α_2 -М образует активные комплексы с протеиназами поджелудочной железы, в которых ферменты обладают

более узкой субстратной специфичностью и малой чувствительностью к ингибиторам плазмы крови (К. Н. Веремеенко, 1971).

В наших исследованиях иммобилизация плазима на α_2 -М включала получение очищенных препаратов фермента и α_2 -М из плазмы крови человека. Очищенный плазминоген выделяли из III фракции белков плазмы крови по Кону путем аффинной хроматографии на L-лизин-сефарозе (С. А. Кудинов и соавт., 1979). Для получения плазима его активировали СК (варидазой фирмы Ледерле). α_2 -М выделяли из цитратной плазмы крови методом, предложенным М. Song и соавторами (1975). Для получения комплекса плазмин и α_2 -М инкубировали в течение 30 мин при температуре +20 °С (+37 °С). В пробах был 1,5—2-кратный молярный избыток α_2 -М по сравнению с концентрацией фермента. Доказательством комплексообразования служили данные ультрацентрифугирования, а также малая чувствительность фермента, связанного с α_2 -М, к действию соевого ингибитора трипсина (К. Н. Веремеенко и соавт., 1984).

Нами проведено сравнительное изучение гидролиза естественных субстратов — фибрина и фибриногена комплексом плазмин — α_2 -М (рис. 12). Характер гидролиза обоих субстратов, определя-

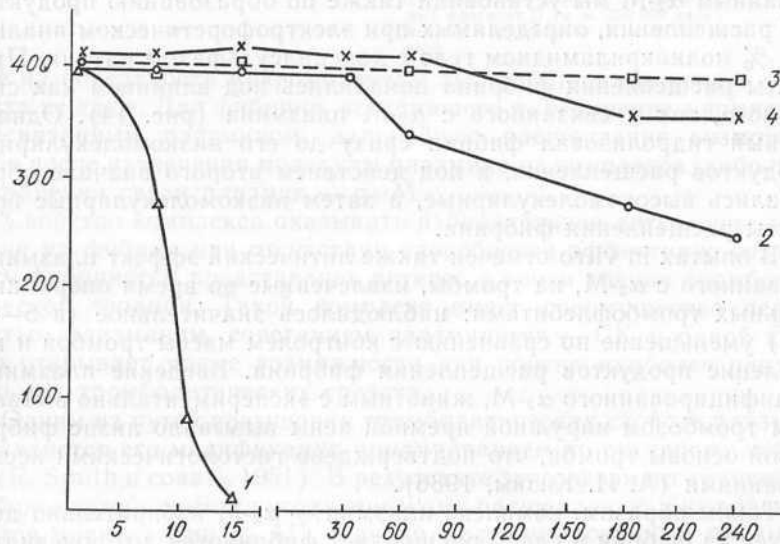


Рис. 12. Расщепление фибрина и фибриногена плазмином и трипсином, связанными с α_2 -М.

По оси абсцисс — время инкубации комплексов плазмин — α_2 -М (трипсин — α_2 -М) с фибрином (фибриногеном), мин; по оси ординат — содержание нерасщепленного фибриногена (фибрина), мкг. 1 — лизис фибрина комплексом плазмин — α_2 -М; 2 — гидролиз фибриногена комплексом плазмин — α_2 -М; 3 — расщепление фибрина трипсином, связанным с α_2 -М; 4 — гидролиз фибриногена комплексом трипсин — α_2 -М

емый по нерасщепившемуся их количеству после воздействия комплекса плазмин — α_2 -М, был неодинаков. Так, весь фибрин (400 мкг) лизировался связанным с α_2 -М плазмином в среднем за 15 мин (кривая 1), а фибриноген оставался интактным в течение 30 мин и только через 60—240 мин уровень его уменьшался (кривая 2). Для оценки специфичности действия плазмина, соединенного с α_2 -М, на фибрин и выяснения вопроса о том, присуще ли такое действие родственным ему сериновым протеиназам, изучали гидролиз фибрина и фибриногена комплексом трипсин — α_2 -М (см. рис. 12, кривые 3, 4). В отличие от плазмина трипсин после связывания с α_2 -М полностью терял способность лизировать сгустки фибрина и расщеплять фибриноген. Эти данные свидетельствуют о специфичности действия на фибрин комплекса плазмин — α_2 -М (К. Н. Веремеенко, А. И. Кизим, 1984).

Способность плазмина, связанного с α_2 -М, эффективно гидролизовать фибрин была подтверждена в опытах, в которых фибринолитическую активность определяли методом фибриновых пластинок. Согласно полученным данным (рис. 13), комплекс плазмин — α_2 -М лизирует фибрин со скоростью аналогичной таковой свободного фермента. Гидролиз фибрина нативным и модифицированным α_2 -М мы установили также по образованию продуктов его расщепления, определяемых при электрофоретическом анализе в 4 % полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия. Продукты расщепления фибрина появлялись под влиянием как свободного, так и связанного с α_2 -М плазмина (рис. 14). Однако первый гидролизовал фибрин сразу до его низкомолекулярных продуктов расщепления, а под действием второго вначале образовались высокомолекулярные, а затем низкомолекулярные продукты расщепления фибрина.

В опытах *in vitro* отмечен также литический эффект плазмина, связанного с α_2 -М, на тромбы, извлеченные во время операции у больных тромбозом вен: наблюдалось значительное (в 5—10 раз) уменьшение по сравнению с контролем массы тромбов и накопление продуктов расщепления фибрина. Введение плазмина, модифицированного α_2 -М, животным с экспериментально вызванным тромбозом наружной яремной вены вызывало лизис фибриновой основы тромба, что подтверждено гистологическими исследованиями (А. И. Кизим, 1986).

Таким образом, комплекс плазмин — α_2 -М избирательно действует на фибрин и слабо расщепляет фибриноген, что, очевидно, объясняется особенностями структуры фермента и субстрата. Характерный признак плазмина — наличие в молекуле ЛСУ. Фибрин же содержит активные, выставленные на поверхность молекулы ЛУ, которые комплементарны ЛСУ фермента. Поэтому можно предположить, что для ЛУ фибрина возможен контакт с ЛСУ плазмина, даже соединенного с α_2 -М. В меньшей мере экспонирован-

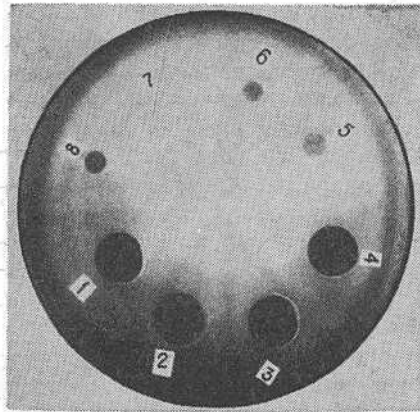


Рис. 13. Фибринолитическая активность свободного плазмина (1, 2) и его комплекса с α_2 -М (3, 4)

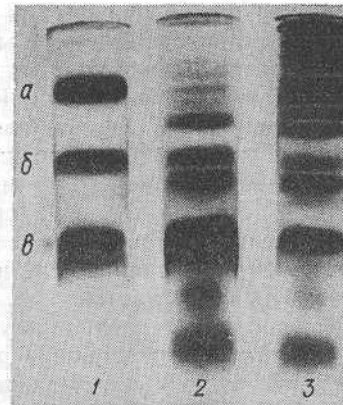


Рис. 14. Электрофореграммы продуктов расщепления фибрина свободным плазмином (2) и связанным с α_2 -М (3). Свидетели (1):

a — фибриноген, молекулярная масса (м. м.) 340 000 дальтон; *б* — димерный фрагмент D (м. м. 200 000 дальтон); *в* — фрагмент D (м. м. 85 000 дальтон)

ные на поверхность макромолекулы ЛУ фибриногена такого контакта не дают. Для фибрина, вступившего в соединение с комплексосвязанным плазмином, дальнейшее расщепление возможно либо после извлечения молекулы плазмينا из комплекса, либо при сохранении связи плазмин — α_2 -М.

Свойство комплекса оказывать избирательное литическое действие на фибрин при отсутствии способности эффективно атаковать фибриноген представляет интерес с точки зрения тромболитической терапии. Такой комплекс имеет преимущества перед чистым плазмином, сочетанием плазминоген — СК и одной СК. Это открывает новые возможности для поиска наиболее рациональных тромболитических средств.

Одним из путей повышения тромболитических свойств плазмينا является его модификация ацилированием по активному центру (R. Smith и соавт., 1981). В результате этого фермент становится более устойчивым к аутолитическому расщеплению и не подвергается инактивации α_2 -АП. Однако модифицированный плазмин сохраняет свойство соединяться с фибрином, поскольку его активный центр пространственно отделен от лизиновых участков субстрата. В дальнейшем фермент, связанный с фибрином, деацилируется, при этом освобождается его активный центр и происходит лизис фибрина. После выполнения своей функции плазмин поступает в кровоток, где мгновенно и необратимо инактиви-

руется α_2 -АП. Эксперименты на животных показали, что после введения ацилплазмина повышается фибринолитическая активность, максимальный уровень которой достигается через 30 мин и нормализуется через 60 мин (Р. Б. Айсина и соавт., 1985). Данный путь является перспективным для тромболитической терапии и заслуживает всестороннего изучения.

Рассмотрим вопрос о применении активаторов плазминогена в качестве тромболитических средств. В норме в циркулирующей крови активность свободного плазмина практически не определяется, хотя и происходит фибринолиз, связанный с удалением фибрина. Это объясняется тем, что основной фибринолитический фермент образуется не в циркулирующей крови, а непосредственно на его субстрате фибрине. При появлении сгустков фибрина, составляющих основу тромба, в определенном участке сосудистого русла плазминоген, содержащий в своей молекуле специфические ЛСУ, взаимодействует с ЛУ фибрина. Здесь же на сгустке сорбируются активаторы плазминогена, продуцируемые клетками эндотелия сосудов и других тканей, которые превращают плазминоген в плазмин (В. Wiman, P. Wallen, 1977). Плазмин образуется внутри самого волокна фибрина и действует там локально, не подвергаясь инактивации антиплазминами, которыми богата плазма крови. При этом фермент лизирует только фибрин, а не фибриноген, количество которого преобладает в плазме. Такая литическая система функционирует значительно надежнее и безопаснее, чем плазмин, вводимый непосредственно в кровь.

Учитывая современные представления о механизме физиологического фибринолиза, многие авторы считают, что с терапевтической целью лучше вводить не активный фермент, а естественные активаторы плазминогена. Были предприняты многочисленные попытки получить препараты активаторов плазминогена, пригодные для использования в клинике.

Плазма трупной крови содержит большие количества активаторов плазминогена. Ее введение больным с тромбоэмболическими осложнениями приводит к избирательному лизису сгустков фибрина и эффективно при тромбоэмболических осложнениях (Э. Д. Думпе и соавт., 1973). В настоящее время разработаны методы выделения активатора плазминогена из крови внезапно погибших людей и ведутся экспериментальные исследования по обоснованию их применения в клинике (Г. К. Платонова, С. А. Петренко, 1979; В. Б. Хватов, Т. К. Платонова, 1983).

В эксперименте на животных изучен терапевтический эффект активаторов плазминогена, выделенных из различных клеток и тканей человека и животных — сердца, почек, матки, мочеочника (Б. Ф. Кавешникова, 1985; F. Vachman и соавт., 1964; H. Ljungner и соавт., 1984). Суперселективное введение собакам с экспериментально вызванным тромбозом бедренной артерии активатора

плазминогена в дозе 1,5 мг/кг массы способствовало лизису тромбов (Н. Н. Малиновский и соавт., 1985).

Активаторы плазминогена получены в высокоочищенном состоянии также из клеток меланомы (D. Collep и соавт., 1982; C. Kogninger и соавт., 1982). Их тромболитическое действие не уступает таковому естественных активаторов, полученных из нормальных тканей человека (F. Van der Werf, S. Bergmann и соавт., 1983). Избирательность связывания этих активаторов с фибрином значительно превосходит таковую СК, урокиназы и не сопровождается активацией фибринолиза в общей кровотоке.

Так как выход активаторов плазминогена из тканей невелик, предпринимались попытки получить их методом генной инженерии посредством ДНК-рекомбинантной технологии (Б. Ф. Кавешникова, 1985; S. Bergmann и соавт., 1983). По этому методу созданы препараты тканевого активатора на бактериальных пластидах, изучается эффективность их действия в эксперименте (L. Aledort и соавт., 1983). Описано литическое действие на вызванные экспериментально тромбы у собак рекомбинантного активатора из клеток меланомы (D. Reppica и соавт., 1983). Применение аналогичного активатора оказывало положительное действие при лечении инфаркта миокарда, вызванного у обезьян. Отмечен значительный лизис тромбов и восстановление кровотока, регистрируемого методом артериографии (W. Flameng и соавт., 1985). Эти данные являются предпосылкой к широкому использованию активаторов плазминогена, полученных ДНК-рекомбинантным способом, в лечении больных острым инфарктом миокарда.

В настоящее время в качестве тромболитических средств в клинике применяются два активатора плазминогена: один — бактериального происхождения — СК, другой — естественный — урокиназа. Наиболее хорошо изучен терапевтический эффект СК, которая синтезируется β-гемолитическими стрептококками, приспособившимися в процессе эволюции к обитанию в организме человека. В отличие от других активаторов СК не действует как фермент, она не проявляет протеолитической и эстеразной активности. При введении в организм СК образует с плазминогеном стехиометрический комплекс (соотношение моль/моль), который приобретает свойство превращать профермент в плазмин.

Экспериментальные исследования и клинические наблюдения показали, что внутривенное введение СК эффективно в лечении тромбозов периферических сосудов, инфаркта миокарда, эмболий легких (Е. И. Чазов и соавт., 1980, 1981). Лучшие результаты получены при лечении свежих венозных тромбозов. Это объясняется тем, что венозные тромбы состоят преимущественно из фибрина и эритроцитов. Свежие сгустки фибрина, не стабилизированные ковалентными связями, легче подвергаются гидролизу, чем стабилизированные. Этот факт может иметь важное значение в

создании ингибиторов фактора XIII, исключающих стабилизацию фибрина.

В клиниках используют препараты СК: авелизин (ГДР), стрептазу (ФРГ), варидазу (Бельгия), стрептолиазу (СССР) и др. В Белорусском НИИ эпидемиологии и микробиологии разработан тромболитический препарат под названием целиаза.

Препараты СК назначают капельно внутривенно. Так как в крови содержатся антитела против СК, лечение начинают с введения антителонейтрализующей дозы (250 000 ЕД), растворенной в 50 мл изотонического раствора натрия хлорида, со скоростью 30 капель/мин. При отсутствии побочных реакций терапию продолжают поддерживающими дозами (750 000 ЕД). Предложен также прерывистый метод введения СК: в течение первых 3 дней по 600 000 ЕД, в последующие дни — по 250 000 ЕД раз в день (V. Kakkar, M. Scully, 1978). Полагают, что при таком способе лечения в крови образуются небольшие количества активаторного комплекса, которые адсорбируются на тромбе и действуют более продолжительный период (время циркуляции СК—3—4 ч). Для профилактики тромбообразования СК вводят с гепарином.

Новым в тромболитической терапии является введение СК в сочетании с Лиз-Пг, который легче адсорбируется и активируется на сгустке (при введении одной СК на фибрине ее адсорбируется 6—8 %, а комплекса СК-Лиз-Пг — 80 %). У больных, которых лечили Лиз-Пг со СК, уменьшалась частота кровотечений. Дозы компонентов для лечения следующие: 90 мг плазминогена (его вводят первым) и 600 000 ЕД СК. Содержание антиплазминов при таком способе лечения снижается, а концентрация плазминогена в крови остается достаточно высокой. Инъекции СК можно сочетать также с плазмином. В настоящее время предпочтение отдают введению СК непосредственно в очаг поражения. Так, при лечении инфаркта миокарда препарат вливают катетером через бедренную артерию и подводят к блокированной венечной артерии тромбированного участка. Этим достигается высокая местная концентрация препарата, что способствует быстрому лизису тромба. Метод эффективен, если его применяют при сердечном приступе в первые часы.

Наиболее частые осложнения тромболитической терапии СК — кровотечения, возникающие вследствие активации плазминогена и быстрого образования в сосудистом русле плазмينا, который расщепляет фибриноген, факторы V и VII. Образовавшиеся продукты распада фибриногена препятствуют полимеризации фибрина и нарушают функцию тромбоцитов. Эти кровотечения можно предотвратить или остановить путем тщательного подбора поддерживающей дозы СК. Если доза СК недостаточна, то образуются малые концентрации активаторного комплекса и относительно большое количество плазминогена, который превращается в

плазмин. В результате этого развивается гиперплазминемия и появляется возможность сильного кровотечения. Если поддерживаемая доза СК высокая, то накапливается много активатора и истощается плазминоген, что может привести к снижению тромболитического потенциала и развитию повторного тромбоза. Другие осложнения связаны с антигенной природой СК (Е. И. Чазов, К. М. Лакин, 1977).

В связи с указанными недостатками нативной СК исследуется возможность использования СК, иммобилизованной на биосовместимых носителях. В нашей стране получены препараты иммобилизованной на декстрани СК (стрептодеказа), которые имеют значительные преимущества: обладают пониженной антигенностью, меньшей токсичностью, более высокой стабильностью, выраженной продолжительностью лечебного действия (Е. И. Чазов и соавт., 1982). Стрептодеказу вводят в организм струйно (вначале 300 000 ЕД, а через 1 ч 2 700 000 ЕД). После введения препарата фибринолитическая активность остается на высоком уровне 48—72 ч. Обнаружен положительный эффект иммобилизованной СК при лечении эмболий легочной артерии, тромбозов коронарных сосудов, внутриглазных кровоизлияний (Е. И. Чазов и соавт., 1980, 1981, 1982).

Заслуживает внимания попытка введения иммобилизованной СК имплантацией ее вдали от места поражения (L. Мерсег и соавт., 1978). СК, иммобилизованную на нейлоне, вшивали кроликам под кожу. При этом в течение 150 сут свертывание крови было замедлено в 3,5 раза. После удаления СК из организма ее активность практически полностью сохранялась. Следовательно, СК не вступала непосредственно в контакт с системой кровообращения, а плазминоген свободно диффундировал в межтканевую ткань, где взаимодействовал со СК, которая катализировала образование плазмина. В крови не обнаруживали антител против СК, а также фиброзных образований вокруг нейлона, тогда как у контрольных животных участок имплантации одного нейлона был пропитан фиброзной тканью. Авторы полагают, что иммобилизацию СК можно использовать для профилактики и лечения тромбоэмболических заболеваний.

Другим мощным активатором плазминогена, который нашел применение в клинике, является урокиназа. Фермент получен в высокоочищенном состоянии, не вызывает побочных реакций и не стимулирует антителообразование. Преимущество урокиназы заключается в том, что она имеет большее сродство к плазминогену, связанному с фибрином, чем к циркулирующему в крови проферменту (V. Kakkar, M. Scully, 1978). Поэтому введение урокиназы вызывает меньшую системную гиперплазминемия и, следовательно, меньшую опасность геморрагий. Урокиназа, проникая в тромб, активирует плазминоген, образуется плазмин, который обуслов-

ливают лизис тромба внутри и на поверхности. Положительное тромболитическое действие оказывает не только внутривенное, но и оральное введение урокиназы. Экспериментальные исследования показали, что ее высокомолекулярные формы при оральном применении из кишечника легко проникают в кровь, где активируют пламиноген. Активация осуществляется, по-видимому, либо путем стимуляции биосинтеза, либо высвобождением низкомолекулярной формы урокиназы, катализирующей превращение Глу-Пг в Лиз-Пг. Последний обладает большим сродством к фибрину и легче превращается активаторами в плазмин. Оральное применение высокомолекулярной урокиназы в дозе 120 000 МЕ ежедневно в течение 7 дней эффективно в лечении больных церебральными тромбозами (N. Toki и соавт., 1985).

Широкому применению урокиназы препятствует трудность ее выделения и высокая стоимость очищенных препаратов. С целью уменьшения доз фермента и увеличения продолжительности действия ведутся исследования, направленные на получение иммобилизованной урокиназы и обоснование ее применения в клинике (А. В. Максименко, В. П. Торчилин, 1985). Следует подчеркнуть, что отсутствие должного биохимического контроля противотромботической терапии считается противопоказанием к ее проведению (В. А. Люсов, Ю. Б. Белоусов, 1981). При лечении тромболитическими препаратами необходимо определение следующих показателей: тромбинового времени, содержания фибриногена, пламиногена, фибринолитической активности, продуктов распада фибриногена/фибрина, растворимых комплексов фибрина, ингибиторов фибринолиза и свертывания крови, комплексов плазмин — α_2 -АП. Одни из этих методов простые, быстро выполнимые, другие требуют длительного времени, специальных реактивов. К наиболее простым методам относится определение тромбинового времени. При лечении СК оно не должно увеличиваться более чем в 4 раза по сравнению с контролем. Большее увеличение тромбинового времени будет косвенно указывать на чрезмерное образование плазмينا и повышение опасности кровотечений. Определение концентрации фибриногена — один из важнейших тестов контроля за терапией тромболитическими препаратами. В. А. Белицер и соавторы (1983) предложили новый метод определения фибриногена. Он надежен, легко воспроизводим и может широко внедряться в лабораторную практику. В динамике тромболитической терапии следует следить, чтобы уровень фибриногена не падал ниже 2 г/л.

К быстро выполнимым и информативным методам относится определение фибринолитической активности по времени лизиса сгустка фибрина зуглобулиновой фракции плазмы, которое не должно быть меньше 30 мин (норма 3—5 ч). Важную информацию об эффективности лечения дает определение содержания плазми-

ногена: снижение этого показателя будет свидетельствовать об истощении фибринолитического потенциала крови и возникновении вследствие этого тромботических осложнений (в норме концентрация плазминогена составляет 0,2 г/л). Во время тромболитической терапии сильно возрастает уровень продуктов распада фибриногена/фибрина, что служит признаком возможного появления геморрагий. При тромболитической терапии целесообразно определение ингибиторов плазмина — α_2 -АП и основного ингибитора тромбина — АТ III и их комплексов с ферментом. Особое значение имеет исследование комплекса плазмин — α_2 -АП, повышение уровня которого свидетельствует об активации фибринолиза *in vivo*. Для его определения предложен простой тест латексной агглютинации с использованием специфических антисывороток, позволяющих отличить комплекс от предшественников. В настоящее время для определения ингибиторов плазмина применяют специфические хромогенные субстраты.

Таким образом, протеолитические ферменты и их активаторы являются важными средствами консервативной терапии тромбозных заболеваний. Дальнейшая разработка способов получения очищенных препаратов прямого и опосредованного фибринолитического действия, а также методов лабораторного контроля тромболитической терапии послужит основой для быстрого внедрения этих высокоактивных лекарственных средств в клинику.

Глава IV

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ И ИХ ИНГИБИТОРОВ В ПЛАЗМЕ (СЫВОРОТКЕ) КРОВИ

Методы определения активности протеолитических ферментов и их ингибиторов могут быть использованы в клинике с диагностической целью, а также для характеристики течения заболевания и прогноза. Большинство из приведенных ниже методов исследования либо разработаны, либо модифицированы и апробированы в лаборатории биохимии Киевского НИИ отоларингологии им. проф. А. И. Коломийченко МЗ УССР.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ

Определение суммарной протеолитической активности в плазме (сыворотке) крови по гидролизу протамина (К. Н. Веремеенко, 1971). С помощью этого метода исследуется эндогенная протеоли-

тическая активность плазмы, проявляемая протенназами с трипсиноподобной активностью (плазмином, калликреином) и ферментами пептидазного действия. Метод основан на определении аргининсодержащих пептидов, которые отщепляются от щелочного белка протамина протеолитическими ферментами плазмы крови.

Материал и реактивы. 1. Плазма крови человека (получают в день опыта). Кровь из локтевой вены берут в полиэтиленовые пробирки, содержащие 1 объем цитрата натрия в расчете на 9 объемов крови. Плазму отделяют центрифугированием в течение 15 мин при 1200 g и используют на протяжении 2—3 ч.

2. 3,8 % раствор трехзамещенного цитрата натрия.

3. 0,05 М медиаловый буфер с pH 7,6. Для его приготовления смешивают 61,5 мл 0,1 М раствора медиала и 38,5 мл 0,1 н. раствора хлористоводородной кислоты, а затем прибавляют 100 мл дистиллированной воды.

4. 1 % раствор протаминсульфата (фирма «Мегск») в медиаловом буфере (навеску препарата тщательно растирают в буфере в течение 15 мин). Для исследований пригодны препараты протаминсульфата с минимальным количеством аргининсодержащих пептидов. Оптическая плотность окрашенных продуктов распада протаминсульфата, растворимых в трихлоруксусной кислоте, в контрольной пробе не должна превышать 0,25.

5. 20 % раствор трихлоруксусной кислоты.

6. 0,02 % раствор оксихинолина (20 мг перекристаллизованного оксихинолина растворяют в 10 мл 96 % этилового спирта и хранят при температуре +3...+5 °С; перед опытом разбавляют в 10 раз дистиллированной водой).

7. 10 % раствор гидроксида натрия.

8. 1 % раствор гипобромита натрия (1 г жидкого брома растворяют в 100 мл 5 % раствора гидроксида натрия).

9. 40 % раствор мочевины.

Ход определения. В 2 пробирки (опытную и контрольную) отмеривают по 0,2 мл цельной плазмы и по 0,4 мл 0,05 М медиалового буфера с pH 7,6 (максимум протеолитической активности наблюдается в зоне pH 7,6—8,4). Затем в опытную пробу прибавляют 0,2 мл 1 % раствора протаминсульфата. Обе пробы инкубируют в течение 15 мин при температуре +35 °С (зависимость скорости реакции от времени инкубации в пределах 15—60 мин была прямо пропорциональной). Затем в обе пробирки прибавляют по 0,8 мл 20 % трихлоруксусной кислоты. После этого в контрольную пробу вносят 0,2 мл раствора протаминсульфата, выдержанного при температуре +35 °С в течение 15 мин. После тщательного перемешивания содержимого пробирок их помещают в холодильник при температуре +3...+5 °С на 20 мин, а затем центрифугируют при 3000 g в течение 45 мин. Прозрачный центрифугат сливают и окрашивают с помощью реакции Сакагуши (К. Н. Веремеенко, 1971). Через 10 мин фотометрируют опытные пробы по сравнению с контрольными в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 508 нм в спектрофотометре СФ-26 или любом другом.

Количество отщепленного аргинина рассчитывают, пользуясь калибровочным графиком, составленным в соответствии с условиями опыта (объем пробы 6,2 мл) и представляющим собой кривую зависимости оптической плотности от количества аргинина (К. Н. Веремеенко, 1971). В качестве стандарта используют хлорид аргинина (60,5 мг препарата растворяют в 50 мл воды). В 1 мл этого раствора содержится 1000 мкг аргинина. Его разбавляют водой до концентрации аргинина 50 мкг/мл и измеряют оптические плотности окрашенных растворов, содержащих от 5 до 40 мкг этого вещества. В таких пределах наблюдается линейная зависимость между оптической плотностью и количеством аргинина. Суммарную протеолитическую активность выражают в миллимолях отщепленного аргинина за 1 ч в 1 л плазмы крови.

Пример расчета. Количество аргинина, образовавшегося в условиях опыта, равно, например, 9 мкг (разница между содержанием аргинина, находящегося в

опытной и контрольной пробах, по данным фотометрирования при длине волны 508 нм). Общий объем реакционной смеси — 1,6 мл; длительность инкубации — 15 мин; в пробе находилось 0,2 мл плазмы; молекулярная масса аргинина — 174,2. Протеолитическая активность данного образца плазмы равна:

$$\frac{9 \times 1,6 \times 60 \times 1000}{0,2 \times 15 \times 174,2 \times 1000} = 1,6 \text{ ммоль/ (ч} \cdot \text{л)}.$$

Суммарная протеолитическая активность в плазме крови взрослых доноров в среднем равна 1,9 ммоль/(ч · л); колебания составляют 1,3—2,4 ммоль/(ч · л). У детей в возрасте 6—14 лет она несколько выше — 2,6 ммоль/(ч · л).

Определение суммарной эстеразной активности сыворотки крови по расщеплению БАЭЭ (Т. С. Пасхина, Г. А. Яровая, 1970). Протеолитические ферменты сыворотки крови способны гидролизовать N-бензоил-L-аргинин этиловый эфир (БАЭЭ) с образованием N-бензоил-L-аргинина (БА). Метод основан на том, что высвобождающийся во время ферментативной реакции БА при длине волны 253 нм имеет более высокие величины молярной экстинкции, чем БАЭЭ.

Материал и реактивы. 1. Сыворотка крови.

2. 0,05 М трис-НСI-буфер с рН 8; для его приготовления смешивают 25 мл 0,2 М раствора трис с 13,4 мл 0,2 М раствора хлористоводородной кислоты и доводят дистиллированной водой до объема 100 мл.

3. $1,5 \times 10^{-3}$ М раствор гидрохлорида БАЭЭ (молекулярная масса 342,8); готовят непосредственно перед опытом: 51,4 мг препарата гидрохлорида БАЭЭ растворяют в 100 мл вышеупомянутого буфера.

4. $1,5 \times 10^{-3}$ М раствор БА (молекулярная масса 278,3); 41,7 мг препарата растворяют в 100 мл того же буфера.

Ход определения. Реакцию проводят в термостатированной кювете при температуре +25 °С в спектрофотометре. К 0,03 мл цельной сыворотки прибавляют 1,97 мл трис-НСI-буфера. К этой смеси добавляют 1 мл раствора БАЭЭ и измеряют ее оптическую плотность по сравнению с таковой контроля, состоящего из 2 мл буфера и 1 мл раствора БАЭЭ, при длине волны 253 нм. Затем такие же измерения проводят через каждые 10 мин в течение 30 мин.

Количество образовавшегося БА, эквивалентное количеству гидролизованного БАЭЭ, вычисляют, исходя из величины прироста оптической плотности по калибровочному графику (Т. С. Пасхина и соавт., 1968). Для его построения готовят растворы БА и БАЭЭ с различной концентрацией этих веществ в 1 мл (0,05, 0,1, 0,2, 0,3 мкмоль). Измеряют оптическую плотность этих растворов при длине волны 253 нм против трис-НСI-буфера и затем вычисляют разницу между таковой растворов БА и БАЭЭ одинаковой концентрации (ΔE_{253} БА—БАЭЭ). Вычерчивают калибровочный график, откладывая на оси ординат ΔE_{253} БА — БАЭЭ и на оси абсцисс — соответствующее ей количество БА в микромолях на миллилитр.

Эстеразную активность сыворотки крови выражают в миллиэстеразных единицах (мЭЕ) в 1 мл сыворотки крови. Одна единица соответствует гидролизу 1 мкмоль БАЭЭ за 1 мин. Суммарная БАЭЭ-эстеразная активность цельной сыворотки человека составляет в среднем (340 ± 20) мЭЕ/мл.

Определение суммарной эстеразной активности плазмы крови по гидролизу ТАМЭ (R. Colman и соавт., 1969). Протеиназы плазмы крови гидролизуют N-тозил-L-аргинин метиловый эфир (ТАМЭ) с образованием N-тозил-L-аргинина и метилового спирта. Метод основан на спектрофотометрическом определении количества образовавшегося метанола.

- Материал и реактивы.*
1. Плазма крови.
 2. 0,15 М раствор натрия хлорида.
 3. 0,1 М Na-фосфатный буфер с рН 7,6 на 0,15 М растворе натрия хлорида.
 4. 0,055 М раствор ТАМЭ (молекулярная масса 378,88) — 41,7 мг в 2 мл буфера.
 5. 15 % раствор трихлоруксусной кислоты.
 6. 2 % раствор перманганата калия.
 7. 10 % раствор сульфита натрия.
 8. 0,2 % раствор хромотропной кислоты в 65 % растворе серной кислоты.
 9. 10^{-3} М раствор метанола (молекулярная масса 32,04) в 5 % трихлоруксусной кислоте.

Ход определения. Полиэтиленовую пробирку, содержащую 2 мл раствора ТАМЭ, помещают в ледяную баню. Затем прибавляют по 0,1 мл плазмы крови и буфера. После этого смесь переносят в термостат с температурой +37 °С. Через 1 мин из реакционной смеси берут 1 мл жидкости и прибавляют к нему 0,5 мл 15 % трихлоруксусной кислоты (контрольная проба). Через 30 мин снова отмеряют 1 мл реакционной смеси и останавливают реакцию 0,5 мл трихлоруксусной кислоты (опытная проба). Пробы центрифугируют при 2000 g в течение 5 мин. Затем по 0,5 мл надосадочной жидкости из обеих проб помещают в отдельные пробирки, содержащие 0,1 мл 2 % раствора перманганата калия и перемешивают в течение 1 мин. Затем вносят 0,1 мл 10 % раствора сульфита натрия, встряхивают до полного обесцвечивания и сразу прибавляют 4 мл хромотропной кислоты при энергичном перемешивании. После этого пробы выдерживают в водяной кипящей бане в течение 15 мин, охлаждают до температуры +25 °С и определяют оптическую плотность опытной пробы против контрольной при длине волны 580 нм.

Суммарную эстеразную активность плазмы крови выражают в микромолях гидролизованного ТАМЭ за 1 ч в 1 мл плазмы.

Количество образовавшегося метилового спирта, эквивалентное количеству гидролизованного ТАМЭ, определяют по калибровочному графику. Для его построения на оси абсцисс откладывают количество метанола в микромолях (0,1; 0,2; 0,3; 0,5), а на оси ординат — оптическую плотность соответствующих его растворов в 5 % трихлоруксусной кислоте, измеренную при длине волны 580 нм по сравнению с таковой 5 % раствора трихлоруксусной кислоты. ТАМЭ-эстеразная активность в плазме крови доноров составляет 6—11 мкмоль ТАМЭ/(ч • мл).

Пример расчета:

$$\frac{A \times 1,5 \times 2,2 \times 2}{0,5 \times 0,1} = B,$$

где А — количество образовавшегося метанола, вычисленное по кривой, мкмоль; 1,5 — общий объем пробы после центрифугирования, мл; 2,2 — общий объем реакционной смеси; 2 — коэффициент пересчета на 1 ч; 0,5 — взято на окрашивание из пробы после ее центрифугирования, мл; 0,1 — количество плазмы в реакционной смеси, мл.

В — количество расщепленного ТАМЭ, эквивалентное количеству образовавшегося метанола, мкмоль/(ч • мл).

Определение Хагеман-зависимой фибринолитической активности (ХЗФА) в плазме крови человека (К. Н. Веремеенко и соавт., 1978). В основу метода положена способность активированного каолином ФХ в разбавленной плазме превращать плазминоген в плазмин (D. Ogston и соавт., 1969). Фибринолитическую активность определяют по скорости лизиса фибрина плазмином, образующимся при активации плазминогена ФХ в разбавленной плазме при рН 4,8.

Материал и реактивы. 1. Плазма крови человека (получают в день опыта). Кровь из локтевой вены берут в полиэтиленовые пробирки, содержащие 1 объем 1,34 % раствора оксалата натрия в расчете на 9 объемов крови. Плазму отделяют центрифугированием в течение 10 мин при 1200 g и используют в течение 2—3 ч.

2. 1,34 % раствор оксалата натрия.

3. 0,01 М ацетатный буфер с рН 4,8. Его готовят смешиванием 40 мл 0,01 М раствора уксусной кислоты и 60 мл 0,01 М раствора ацетата натрия.

4. 1 % суспензия каолина (готовят в день постановки опыта на ацетатном буфере).

5. 0,05 М медиановый буфер с рН 7,6 (см. с. 164).

6. 1 % раствор бычьего фибриногена, производящегося в Литовской ССР.

7. 0,5 % раствор тромбина того же производства.

Получение зуглобулинового осадка. В полиэтиленовые пробирки (диаметр около 20 мм), содержащие 0,5 мл плазмы, прибавляют 9,25 мл ацетатного буфера и сразу же вносят 0,25 мл суспензии каолина, хорошо перемешивают и помещают в водяную баню при температуре 37 °С. Контактную активацию фактора XII с образованием фактора XIIa, необходимого для превращения плазминогена в плазмин, проводят в течение 45 мин при периодическом помешивании содержимого деревянной палочкой. За это время происходит превращение плазминогена в плазмин с помощью фактора XIIa и кофакторов «контактной» активации. Затем пробы центрифугируют в течение 5 мин при 1200 g. Надосадочную жидкость сливают, пробирки опрокидывают на фильтровальную бумагу для полного удаления центрифугата. Зуглобулиновый осадок суспендируют в 0,5 мл медианового буфера.

Ход определения. В прозрачные полиэтиленовые пробирки диаметром 10 мм вносят 0,2 мл суспензии зуглобулинов, 0,3 мл медианового буфера, добавляют 0,1 мл раствора фибриногена и сразу же — 0,1 мл раствора тромбина. Пробу помещают в водяную баню при температуре +37 °С. С момента добавления тромбина отмечают время лизиса фибриновых сгустков, которое служит мерой активности плазмина. В норме оно составляет 10—30 мин, в среднем — 15 мин. При вирусном гепатите и циррозе печени время лизиса сгустков фибрина под действием контактно активируемого плазминогена увеличивается до 90—250 мин.

Определение ХЗФА в зуглобулиновом осадке по расщеплению протаминсульфата (К. Н. Веремеенко и соавт., 1978). Метод основан на определении аргинина, высвобождающегося из протаминсульфата при расщеплении его плазмином, образующимся в результате действия активированного каолином ФХ на плазминоген в разбавленной плазме. Активацию профермента проводят вышеописанным способом (см. с. 167). Приготовление реактивов, необходимых для определения аргинина, описано на с. 164.

Ход определения. К 0,1 мл суспензии эуглобулинового осадка (получение см. с. 167) прибавляют 0,5 мл медиалового буфера и 0,2 мл раствора протаминсульфата, выдерживают в течение 30 мин при температуре +37 °С и останавливают реакцию добавлением 0,8 мл 20 % трихлоруксусной кислоты. Аналогично проводят контрольные пробы, но протаминсульфат вносят после трихлоруксусной кислоты. Контрольные и опытные пробы центрифугируют 45 мин при 3000 g и в 1 мл прозрачного центрифугата окрашивают аргинин в реакции Сакагуши (К. Н. Веремеенко, 1971). Определяют разницу оптической плотности при длине волны 508 нм между контрольной и опытной пробамии ($E_{оп} - E_{к} = E$). Количество освободившегося аргинина устанавливают по калибровочной кривой (см. с. 164).

ХЗФА выражают в миллимолях отделившегося аргинина за 1 ч в 1 л плазмы. Расчет проводят по формуле:

$$\mu = \frac{C \times V \times 1000}{T \times V_1 \times 174,2 \times 1000}$$

где С — количество аргинина, определяемое в 1 мл трихлоруксусного центрифугата, в мкг; V — объем реакционной смеси (1,6 мл); 1000 — коэффициент пересчета на 1 л крови; V_1 — объем суспензии эуглобулинового осадка (0,1 мл), взятого для определения активности фермента; T — время инкубации эуглобулинового осадка с протаминсульфатом, ч; 1000 — коэффициент пересчета, ммоль; 174,2 — молекулярная масса аргинина.

В плазме практически здоровых людей ХЗФА составляет 3,2—5,6 ммоль аргинина/(ч · л), в среднем — 4 ммоль аргинина/(ч · л).

Определение прекалликреина и ингибиторов калликреина в плазме крови человека (К. Н. Веремеенко и соавт., 1975). В основу метода положено определение калликреина, образовавшегося из прекалликреина при контактной активации каолином плазменного ФХ (R. Colman и соавт., 1969). Активный фермент определяют по расщеплению протаминсульфата. Принцип метода — измерение количества аргинина, которое отщепляется от протаминсульфата под действием образовавшегося калликреина плазмы. Метод дает возможность одновременно с прекалликреином определять исходную протеолитическую активность плазмы, а также ингибиторы калликреина. Ингибитор, который взаимодействует с калликреином в течение 4 мин и вызывает резкое снижение активности фермента, обозначают как быстро реагирующий. Дальнейшее уменьшение активности калликреина между 5-й и 30-й минутами обусловлено действием медленно реагирующего ингибитора.

Материал и реактивы: 1. Плазма крови. Кровь берут из локтевой вены сухим шприцем натошак в полиэтиленовую пробирку, содержащую один объем антикоагулянта (3,8 % раствор цитрата натрия) на 9 объемов крови. Плазму получают центрифугированием крови при 1200 g в течение 15 мин и используют на протяжении 3—4 ч. Если исследования проводят не в день забора крови, то полученную плазму сразу же замораживают, используя смесь, состоящую из 5 весовых частей льда и 2 весовых частей хлорида натрия. Плазма пригодна для определения компонентов калликреин-кининовой системы при хранении ее в замороженном состоянии 1 нед. При хранении незамороженной плазмы при температуре +3...+5 °С активность значительно снижается уже через 24 ч. Гемолизированную и липоидную плазму использовать нельзя.

2. 3,8 % раствор цитрата натрия.

3. 0,05 M медиаловый буфер с рН 7,6 (приготовление см. с. 164).

4. 1 % суспензия каолина в медиаловом буфере.
5. 1 % раствор протаминсульфата отечественного производства или фирмы «Мегск» (приготовление см. с. 164).
6. 20 % раствор трихлоруксусной кислоты.
7. 0,02 % раствор оксихинолина (приготовление см. с. 164).
8. 10 % раствор гидроксида натрия.
9. 1 % раствор гипобромита натрия (приготовление см. с. 164).
10. 40 % раствор мочевины.

Ход определения. В полиэтиленовую пробирку, помещенную в водяную баню при температуре +25 °С, вносят 0,8 мл плазмы и 0,8 мл суспензии каолина, смесь встряхивают в течение 30 мин. Через 1; 5; 30 мин контакта плазмы с каолином отбирают по 0,2 мл смеси и быстро вносят в пробирки, содержащие 0,4 мл медиалового буфера и 0,2 мл раствора протаминсульфата (опытные пробы). Реакционную смесь инкубируют в термостате при температуре +35 °С в течение 15 мин, после чего реакцию останавливают, добавляя 0,8 мл раствора трихлоруксусной кислоты. Контрольные пробы проводят аналогично, но 0,2 мл раствора протаминсульфата, предварительно выдержанного 15 мин при температуре +35 °С, вносят после трихлоруксусной кислоты. Параллельно определяют исходную (не активированную каолином) протаминрасщепляющую активность плазмы в пробе, содержащей 0,1 мл плазмы, 0,5 мл медиалового буфера и 0,2 мл раствора протаминсульфата. После прибавления трихлоруксусной кислоты пробы помещают в холодильник при температуре +3...+5 °С на 20 мин, а затем центрифугируют в течение 45 мин при 3000 г.

В центрифуге определяют содержание аргинина по реакции Сакагуши (К. Н. Веремеенко, 1971).

Пример расчета. Исходная протаминрасщепляющая активность плазмы, в которой определялась активность неактивированной каолином плазмы, равна 0,17; по калибровочной кривой это соответствует 7 мкг аргинина. Общий объем пробы — 1,6 мл, время инкубации — 15 мин, на определение взято 0,1 мл плазмы, молекулярная масса аргинина — 174,2. Следовательно, исходная протаминрасщепляющая активность в 1 л данного образца плазмы равна:

$$\frac{7 \times 1,6 \times 1000}{15 \times 0,1 \times 174,2} = 43 \text{ мкмоль аргинина / (мин} \cdot \text{л)}.$$

Концентрация прекалликреина. Оптическая плотность пробы, в которой определялась протаминрасщепляющая активность после контакта с каолином в течение 1 мин, равна 0,72, что соответствует 31,4 мкг аргинина. Оптическая плотность пробы для определения исходной протаминрасщепляющей активности составляет 0,17 и по калибровочной кривой эта величина соответствует 7 мкг аргинина. Для вычисления содержания прекалликреина определяют разницу между этими показателями: 31,4 мкг — 7,0 мкг = 24,4 мкг. Активность прекалликреина в 1 л данного образца плазмы будет равна:

$$\frac{24,4 \times 1,6 \times 1000}{15 \times 0,1 \times 174,2} = 149 \text{ мкмоль аргинина / (мин} \cdot \text{л)}.$$

Содержание быстро реагирующего ингибитора калликреина. Оптическая плотность пробы, в которой определялась протаминрасщепляющая активность плазмы после активации каолином в течение 5 мин, равна 0,45, что соответствует 19,6 мкг аргинина. Рассчитывают разницу между количеством аргинина, отщипнувшегося на 1-й и 5-й минутах активации плазмы каолином: 31,4 мкг — 19,6 мкг = 11,8 мкг. Содержание быстро реагирующего ингибитора в 1 л данного образца плазмы равно:

$$\frac{11,8 \times 1,6 \times 1000}{15 \times 0,1 \times 174,2} = 72 \text{ мкмоль}.$$

Для вычисления активности ингибитора за 1 мин контакта плазмы с каолином показатель 72 делим на 4, что соответствует 18 мкмоль/(мин·л).

Количество медленно реагирующего ингибитора калликреина. Оптическая плотность пробы для измерения активности плазмы после активации каолином в течение 30 мин равна 0,315, что соответствует по калибровочной кривой 13,1 мкг аргинина. Разница между количеством аргинина, отщепившегося в пробах на 5-й и 30-й минутах активации, равна: 19,6 мкг — 13,1 мкг = 6,5 мкг. Содержание медленно реагирующего ингибитора в 1 л данного образца плазмы составляет:

$$\frac{6,5 \times 1,6 \times 1000}{15 \times 0,1 \times 174,2} = 40 \text{ мкмоль.}$$

Для вычисления активности данного ингибитора за 1 мин контакта плазмы с каолином полученный показатель делят на 25, т. е. $40:25 = 1,6$ мкмоль/(мин·л).

В плазме крови здоровых людей исходная протаминрасщепляющая активность составляет 25—65 мкмоль аргинина/(мин·л), в среднем — 42 мкмоль аргинина/(мин·л), содержание прекалликреина — 90—210 мкмоль аргинина/(мин·л), в среднем — 148 мкмоль аргинина/(мин·л), быстро реагирующего ингибитора калликреина — 10—24 мкмоль аргинина/(мин·л), в среднем 17,7 мкмоль аргинина/(мин·л), медленно реагирующего ингибитора калликреина — 1,2—3 мкмоль аргинина/(мин·л), в среднем — 1,6 мкмоль аргинина/(мин·л).

При патологических состояниях уменьшается уровень прекалликреинов либо в результате их потребления для образования калликреинов, либо за счет снижения функционального состояния печени. Например, при вирусном гепатите содержание прекалликреина и быстро реагирующих ингибиторов калликреина уменьшается, составляя в среднем соответственно 66 мкмоль аргинина/(мин·л) и 7 мкмоль аргинина/(мин·л). При острых панкреатитах уровень этих показателей также снижен соответственно до 115 мкмоль аргинина/(мин·л) и 11 мкмоль аргинина/(мин·л).

Предложены методы определения прекалликреина и ингибиторов калликреина в условиях активации каолином с использованием синтетических субстратов — ТАМЭ и БАЭЭ (О. А. Гомазков и соавт., 1972; R. Colman и соавт., 1969).

Определение содержания калликреиногена (прекалликреина) в сыворотке (плазме) крови человека (Т. С. Пасхина, А. В. Кринская, 1974). Метод основан на том, что образующийся в результате гидролиза БАЭЭ калликреином БА имеет более высокий коэффициент молярной экстинкции.

Метод включает два этапа: I — отделение прекалликреина от остальных компонентов кининовой системы и других трипсиноподобных ферментов сыворотки крови с помощью ДЭАЭ-сефадекса А-50 при рН 7; II — измерение активности калликреина, образующегося после активации трипсином прекалликреина, по расщеплению БАЭЭ.

Материал и реактивы. 1. Плазма крови. Забор крови осуществляется в полиэтиленовые пробирки с помощью силиконированного шприца с силиконированной иглой. Для получения плазмы смешивают 9 объемов крови и 1 объем 4 % цитрата натрия.

2. 0,02 М фосфатный буфер с рН 7.
3. Густая суспензия ДЭАЭ-сефадекса А-50, уравновешенного 0,02 М фосфатным буфером с рН 7.
4. 0,02 М калий-натрий-фосфатный буфер с рН 7, содержащий хлорид натрия в концентрации 0,05 моль.
5. 0,1 М фосфатный буфер с рН 8.
6. БАЭЭ — $1,5 \cdot 10^{-3}$ М раствор в 0,1 М фосфатном буфере с рН 8.
7. 0,1 % раствор трипсина в 0,02 М растворе хлористоводородной кислоты.
8. Овомукоид — 2 % раствор в 0,1 М фосфатном буфере с рН 8.

Получение неадсорбированной фракции белков сыворотки крови, содержащей прекалликреин. К 0,25 мл сыворотки (плазмы) крови прибавляют 0,5 мл 0,02 М фосфатного буфера с рН 7, а затем 2,5 мл суспензии ДЭАЭ-сефадекса А-50. Смесь осторожно перемешивают в течение 10 мин тонкой стеклянной палочкой и прибавляют 3 мл 0,02 М калий-натрий-фосфатного буфера с рН 7, содержащего хлорид натрия в концентрации 0,05 моль, и еще перемешивают в течение 2 мин. Суспензию переносят на стеклянный фильтр № 1 (ДГ-29) и фильтруют при небольшом отрицательном давлении. Фильтрат количественно переносят в мерные пробирки объемом 5 мл. Объем фильтрата доводят до метки 0,02 М фосфатным буфером с рН 7.

Определение содержания прекалликреина. К 1 мл неадсорбированной фракции добавляют 0,8 мл 0,1 М фосфатного буфера с рН 8 и 0,1 мл раствора трипсина. Пробу выдерживают в течение 2 мин при температуре +25 °С, после чего добавляют 0,1 мл раствора овомукоида для инактивации трипсина. Через 15 мин к пробе добавляют 1 мл раствора БАЭЭ. Эстеролитическую активность опытной пробы измеряют при температуре +25 °С по приросту оптической плотности при длине волны 253 нм в течение 10—15 мин, делая отсчеты через 3—5 мин. Контрольную пробу составляют из 2 мл 0,1 М фосфатного буфера с рН 8 и 1 мл раствора БАЭЭ.

Содержание прекалликреина выражают в миллиединицах калликреина в 1 мл сыворотки крови и вычисляют по формуле:

$$\frac{\Delta D_{253}^{15} \times 3 \times 5 \times 1000}{1,1 \times 15 \times 0,25}$$

где ΔD_{253}^{15} — прирост оптической плотности в пробе за 15 мин (при линейном ходе реакции); 1,1 — ΔD_{253} , соответствующая образованию 1 мкмоль БА из БАЭЭ в 1 мл пробы (вычисляется по разности молярных коэффициентов экстинкции БА и БАЭЭ при длине волны 253 нм); 3 — объем пробы в кювете, в мл; 5 — объем неадсорбированной фракции, в мл; 0,25 — количество сыворотки крови, взятое для анализа, в мл; 15 — длительность инкубации, мин.

Содержание прекалликреина, определяемое этим методом, в норме в сыворотке крови составляет (369 ± 59) мед/мл, а при циррозах и гепатитах — соответственно (239 ± 75) мед/мл и (223 ± 29) мед/мл. Значительно уменьшается количество прекалликреина при ожоговой болезни — (206 ± 63) мед/мл, увеличивается при заболеваниях почек, в частности при нефротическом синдроме до (464 ± 84) мед/мл.

С помощью этого метода в сыворотке крови можно определять активность свободного калликреина. В норме активный калликреин в сыворотке крови практически отсутствует. Измеримые величины калликреина получают только при ряде патологических состояний.

Определение активности кининазы I (карбоксипептидазы N) в сыворотке крови по гидролизу гиппурил-L-лизина (J. Folk и соавт., 1960).

Метод основан на том, что кининаза I расщепляет гиппурил-L-лизин (ГЛ) с высвобождением гиппуровой кислоты (ГК). Последняя по сравнению с ГЛ имеет более высокий показатель молярного коэффициента экстинкции при длине волны 254 нм. Количество освобожденной ГК служит мерой активности фермента.

Реактивы. 1. 0,1 М трис-HCl-буфер с pH 7,4, содержащий 10^{-4} моль хлорида кобальта. Для его приготовления смешивают 500 мл 0,2 М раствора трис (24,2 г гидроксиметиламинометана в 1 л раствора) и 414 мл 0,2 М раствора хлористоводородной кислоты, объем доводят дистиллированной водой до 1 л, затем вносят 13 мг хлорида кобальта.

2. 0,001 М раствор ГЛ (молекулярная масса 307,37). В 12,5 мл трис-HCl-буфера растворяют 3,85 мг ГЛ.

3. 0,001 М раствор ГК (молекулярная масса 179,18). В 100 мл трис-HCl-буфера растворяют 17,9 мг ГК.

Ход определения. Реакцию проводят в термостатированной кювете с толщиной оптического слоя 1 см при температуре $+37^{\circ}\text{C}$. Опытную пробу, состоящую из 1,47 мл трис-HCl-буфера и 0,03 мл сыворотки крови, предварительно выдерживают в течение 10 мин при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ для активации кининазы Co^{2+} и затем прибавляют 1,5 мл раствора ГЛ. Сразу же измеряют ее оптическую плотность при длине волны 254 нм, фотометрируя по сравнению с контрольной пробой, содержащей 1,5 мл трис-HCl-буфера и 1,5 мл раствора ГЛ (нулевая точка). Последующие измерения оптической плотности пробы проводят через каждые 5 мин в течение 20—30 мин в зависимости от активности фермента. Используют данные, полученные в зоне прямой пропорциональности между активностью кининазы и длительностью реакции. По величине оптической плотности определяют количество освобожденной ГК, используя калибровочный график.

Построение калибровочного графика. При длине волны 254 нм измеряют оптическую плотность следующих растворов ГЛ и ГК: 0,083; 0,166; 0,25; 0,5 мкмоль/мл. Вычерчивают калибровочный график, откладывая на оси ординат разность оптических плотностей растворов ГК и ГЛ соответствующих концентраций (E_{254} ГК-ГЛ), а на оси абсцисс — соответствующие им количества ГК в микромолях на миллилитр.

Активность фермента выражают в микромолях ГК, освобожденной за 1 мин в 1 л сыворотки.

Пример расчета. Для определения взято 0,03 мл сыворотки крови. Прирост оптической плотности в пробе (E_{254} ГК-ГЛ) за 30 мин составляет 0,065, что соответствует 0,08 мкмоль ГК, объем пробы равен 3 мл, время инкубации 30 мин. Следовательно, активность кининазы в 1 л этого образца сыворотки равна:

$$\frac{0,08 \times 3 \times 1000}{0,03 \times 30} = 267 \text{ мкмоль ГК / (мин} \cdot \text{л)}.$$

Активность кининазы в сыворотке крови здоровых людей колеблется от 200 до 290 мкмоль ГК/(мин · л).

Описанный метод пригоден также для определения активности кининазы в слюне. В этом случае в реакционную смесь помещают 0,25 мл исследуемого материала.

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СЫВОРОТОЧНЫХ ИНГИБИТОРОВ ПРОТЕОЛИЗА

Определение общей антитриптической активности сыворотки. Метод основан на определении разницы между активностью пробы, содержащей определенное количество трипсина, и активностью пробы, в которой часть фермента связывается ингибиторами сыворотки.

Материал и реактивы. 1. Сыворотка крови, разбавленная в 100 раз 0,05 М медианаловым буфером, содержащим $4 \cdot 10^{-3}$ моль Ca^{2+} .

2. Казеин по Гаммарстену. Для определения ингибиторов трипсина используется его 2 % раствор в медианаловом буфере. 2 г казеина суспендируют в 100 мл 0,05 М медианалового буфера (см. с. 164), нагревают в кипящей водяной бане в течение 15 мин, а затем охлажденный раствор доводят до pH 7,6 10 % раствором гидроксида натрия.

3. Кристаллический трипсин (фирма „Srofa“). 5 мг фермента растворяют в 5 мл 0,0025 н. раствора хлористоводородной кислоты (исходный раствор). Непосредственно перед опытом готовят рабочий раствор, разбавляя исходный 0,05 М медианаловым буфером с pH 7,6, содержащим $4 \cdot 10^{-3}$ моль Ca^{2+} , до концентрации трипсина 62,5 мкг/мл. Ca^{2+} предохраняют фермент от аутолитической инактивации в слабощелочной среде.

4. 5 % раствор трихлоруксусной кислоты.

Ход определения. К 0,2 мл разбавленной в 100 раз сыворотки крови (количество ее может варьировать в зависимости от содержания ингибиторов от 0,2 до 0,6 мл) прибавляют 0,2 мл фермента (12,5 мкг). Для образования комплекса фермент — ингибитор реакцию смесь выдерживают при температуре $+20^\circ\text{C}$ в течение 15 мин; затем доводят объем пробы до 1 мл медианаловым буфером. К смеси добавляют 1 мл раствора казеина, инкубируют 20 мин при температуре $+35^\circ\text{C}$. Реакцию останавливают прибавлением 3 мл 5 % раствора трихлоруксусной кислоты. Контрольные пробы отличаются от опытных тем, что кислоту вносят перед прибавлением казеина. В прозрачном фильтрате, полученном при центрифугировании в течение 30 мин при 3000 g, определяют оптическую плотность продуктов распада казеина, фотометрируя в спектрофотометре опытную пробу по сравнению с контрольной при длине волны 280 нм. Количество оставшегося после связывания с ингибиторами фермента рассчитывают по калибровочной кривой, составленной по кристаллическому трипсину. По разнице между количеством добавленного и оставшегося после инкубации с сывороткой крови фермента определяют количество трипсина, связанного с ингибиторами. Прямая зависимость между количеством сыворотки и степенью инактивации фермента наблюдается до 70 % угнетения.

Для построения калибровочного графика помещают в пробы известные количества трипсина (от 1 до 12,5 мкг) и вышеописанным способом определяют оптические плотности проб после расщепления трипсином казеина. На оси абсцисс откладывают количество трипсина в пробе, а на оси ординат — соответствующие оптические плотности проб при длине волны 280 нм.

Антитриптическую активность выражают в граммах инактивированного трипсина в 1 л цельной сыворотки.

Пример расчета. В пробе находилось 12,5 мкг фермента. Количество оставшегося трипсина после выдерживания с 0,2 мл сыворотки крови, разбавленной в 100 раз, рассчитанное по калибровочной кривой, составляет 10 мкг. Следовательно, количество связанного фермента в пробе равно 2,5 мкг (12,5—10). 1 л цельной сыворотки угнетает фермента:

$$\frac{2,5 \times 100 \times 1000}{1\ 000\ 000 \times 0,2} = 1,25 \text{ г.}$$

где 2,5 — количество связанного фермента, мкг; 100 — разведение плазмы; 1000 — коэффициент для пересчета на 1 л; 0,2 — количество сыворотки в пробе, мл; 1 000 000 — коэффициент для перевода в граммы.

В норме средняя величина общей антитриптической активности у практически здоровых людей составляет в среднем 1,5 г инактивированного трипсина на 1 л сыворотки; у больных раком гортани — 2,3 г/л (К. Н. Веремеенко и соавт., 1983).

Экспресс-метод определения ингибиторов трипсина в сыворотке крови человека (К. Н. Веремеенко и соавт., 1986). В основу метода положена способность ингибиторов протеиназ сыворотки крови тормозить лизис экзогенным трипсином желатиновой поверхности рентгенпленки (К. James и соавт., 1966).

Материал и реактивы. 1. Сыворотка крови, разбавленная в 4 раза 0,05 М трис-буферным раствором с рН 8,0. При содержании ингибиторов ниже 0,75 г/л она разбавляется в 2 раза. Для получения сыворотки кровь центрифугируют в течение 15 мин при 1200 g, ее используют в день забора или сохраняют в замороженном состоянии при температуре -10°C . Гемолизированные или липоидные сыворотки не пригодны, так как при их использовании результаты исследования получаются заниженными.

2. Трис-буферный раствор 0,05 М с рН 8,0, содержащий хлорид кальция в концентрации $4 \cdot 10^{-3}$ моль. Для его приготовления смешивают 50 мл 0,2 М раствора трис (12,1 г трис в 500 мл раствора) и 32 мл 0,2 н. раствора хлористоводородной кислоты. Доводят объем дистиллированной водой до 200 мл и прибавляют 0,88 мл 10 % раствора хлорида кальция.

3. 0,2 н. раствор хлористоводородной кислоты.

4. 10 % раствор хлорида кальция.

5. Трипсин кристаллический фирмы „Spofa“. Раствор фермента готовят в день проведения исследования из расчета, чтобы в 1 мл трис-буфера содержалось соответственно 0,125; 0,25; 0,375; 0,5; 0,625; 0,75; 0,875; 1 мг трипсина.

6. Рентгенпленка (засвеченная, проявленная, закрепленная). Кусочек пленки размером 7×4 см (при условии исследования 4 образцов сыворотки) равномерно расчерчивают карандашом по горизонтали на 4 ряда, а по вертикали на 8, затем обильно смачивают дистиллированной водой и помещают в чашку Петри. В образующиеся 32 маленьких квадрата наносят по капле смеси трипсина и сыворотки.

Ход определения. В 8 пробирок Видаля вносят по 0,1 мл раствора трипсина различной концентрации (0,125; 0,25; 0,375; 0,5; 0,625; 0,75; 0,875; 1 мг в 1 мл) и по 0,1 мл разбавленной в 4 раза буфером сыворотки крови. Содержимое пробирок тщательно перемешивают легким встряхиванием и оставляют на 15 мин при температуре $+20...+22^\circ\text{C}$ для образования комплекса трипсина с сывороточными ингибиторами. Затем микропипеткой объемом 0,1 мл отбирают по 0,02 мл каждой смеси, помещают в 8 горизонтально расположенных квадратов на рентгенпленке и выдерживают в чашке Петри при температуре $+20...+22^\circ\text{C}$ в течение 20 мин. За это время не связанный с ингибитором трипсин действует на желатиновую поверхность рентгенпленки. Затем пленку промывают дистиллированной водой и учитывают образовавшиеся на ней зоны лизиса. Чем выше содержание ингибиторов в сыворотке крови, тем большее количество трипсина инактивируется. Поэтому зоны лизиса пленки отмечают в пробах с высоким содержанием трипсина. При низких уровнях ингибиторов зоны лизиса наблюдаются при более слабых концентрациях фермента.

Содержание ингибиторов трипсина в 1 л сыворотки крови выражают среднеарифметическим значением концентрации раствора трипсина отрицательного результата (отсутствие зоны лизиса желатиновой поверхности рентгенпленки) и первого положительного результата (наличие зоны просветления пленки), умноженным на разбавление сыворотки и коэффициент (1000) для пересчета на 1 л.

Пример расчета. Лизис желатиновой поверхности пленки обнаружен в квадрате, содержащем пробу с концентрацией трипсина 0,5 мг/мл, просветления пленки не наблюдалось при уровне фермента 0,375 мг/мл. В данном случае концентрация ингибиторов трипсина, рассчитанная по формуле:

$$\frac{(0,5 + 0,375)}{2} \times 4 \times 1000 = 1750 \text{ мг/л,}$$

т. е. 1 л данного образца цельной сыворотки способен инактивировать 1750 мг или 1,75 г трипсина.

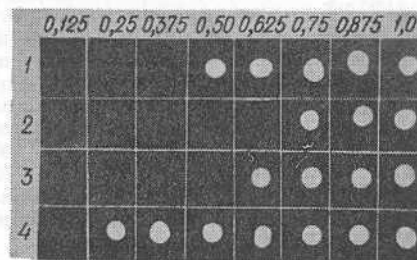


Рис. 15. Определение содержания ингибиторов трипсина в различных образцах сыворотки крови.

По горизонтали — концентрация трипсина, мг/мл; по вертикали — образцы сыворотки: 1 — донор; 2 — беременность; 3 — рак гортани; 4 — эмфизема легких

На рис. 15 представлен пример определения содержания ингибиторов трипсина в 4 образцах сыворотки крови: практически здоровых людей, беременных, больных раком гортани и эмфиземой легких. С помощью описанного метода и спектрофотометрического исследования антитриптической активности с применением в качестве субстрата казеина (см. с. 173) как в норме, так и при физиологических и патологических состояниях с повышенным и пониженным содержанием ингибиторов трипсина были получены практически одинаковые результаты (табл. 3).

Простота и быстрота выполнения экспресс-метода определения ингибиторов трипсина в сыворотке крови, соответствие его данных результатам спектрофотометрического исследования позволяют рекомендовать этот метод для широкого внедрения в клинико-

Таблица 3. Сравнительные данные содержания сывороточных ингибиторов трипсина, полученные предложенным методом (1) и спектрофотометрическим (2)

Обследуемые	Число наблюдений	Содержание ингибиторов, г/л ($\bar{X} \pm m$)	
		1	2
Здоровые люди	11	1,52 ± 0,07	1,42 ± 0,03
Беременные	15	2,70 ± 0,13	2,54 ± 0,11
Больные злокачественными новообразованиями гортани	13	1,98 ± 0,09	2,12 ± 0,07
Больные бронхолегочными заболеваниями	7	0,81 ± 0,04	0,94 ± 0,04

лабораторную практику. Он характеризует содержание одного из основных ингибиторов системы протеолиза — α_1 -ИП, составляющего приблизительно 90 % общей антитриптической активности сыворотки крови, и может быть использован в качестве экспресс-теста для массового обследования больных с целью выявления лиц с наследственной недостаточностью этого ингибитора.

Метод определения КСИ протеиназ в плазме крови. Он основан на способности КСИ подавлять активность трипсина. Инактивацию кислоточувствительных ингибиторов проводят прогреванием подкисленной плазмы (Р. И. Якубовская и соавт., 1981).

- Реактивы.** 1. 0,9 % раствор хлорида натрия;
2. 0,01 н. раствор хлористоводородной кислоты;
3. 0,5 н. раствор гидроксида калия.

Ход определения. К 0,1 мл исходной плазмы прибавляют 1,9 мл 0,9 % раствора хлорида натрия, 0,1 мл 0,01 н. раствора хлористоводородной кислоты (при этом рН разбавленной плазмы должен равняться 3,2—3,4). Затем смесь прогревают в течение 30 мин при +60 °С и после охлаждения доводят ее рН до 6—6,5 прибавлением 0,14 мл 0,5 н. раствора гидроксида калия (Р. И. Якубовская и соавт., 1981). Из общего объема отбирают 0,4—0,6 мл в зависимости от содержания КСИ, прибавляют 0,2 мл раствора трипсина (12,5 мкг) и после выдерживания фермента с ингибитором в течение 15 мин при температуре +20 °С доводят объем пробы до 1 мл миналовым буфером с рН 7,6. Протеолитическую активность несвязанного трипсина определяют по гидролизу 2 % казеина, как описано на с. 173.

Пример расчета. Оптическая плотность (E_{280}) пробы, содержащей смесь трипсина и плазмы крови, равна 0,225. Это соответствует 8,4 мкг оставшегося фермента. К плазме было добавлено 12,5 мкг трипсина. Количество фермента, связанного с ингибиторами, в данном случае равно $12,5 - 8,4 = 4,1$ мкг. Количество КСИ в граммах инактивированного трипсина в 1 л данного образца плазмы рассчитывают по формуле:

$$\frac{4,1 \times 2,24 \times 1000}{0,6 \times 0,1 \times 1000 \ 000} = 0,15,$$

где 4,1 — количество инактивированного трипсина, мкг; 2,24 — общий объем пробы, мл; 1000 — коэффициент для пересчета на 1 л плазмы; 0,6 — взято на определение активности ингибитора из общего объема пробы, мл; 0,1 — количество плазмы, помещенное в пробу, мл; 1 000 000 — коэффициент для пересчета в г.

Определение α_1 -ИП в плазме (сыворотке) крови человека. Метод основан на способности α_1 -ИП плазмы крови подавлять гидролиз трипсином N-бензоил-DL-аргинин-п-нитроанилида (БАПНА). В то же время трипсин в комплексе с α_2 -М способен расщеплять БАПНА. При постановке теста к плазме крови добавляют фермент в количестве, избыточном по отношению ко всем трипсинсвязывающим белкам. Содержание α_1 -ИП определяют по разнице между известным количеством трипсина и фермента, оставшегося после его взаимодействия с ингибиторами плазмы.

- Материал и реактивы.** 1. Плазма крови, разбавленная в 100 раз фосфатным буфером.
2. 0,05 М фосфатный буфер с рН 7,6.

3. 0,001 М раствор БАПНА. 43,5 мг препарата суспендируют в 1 мл ацетона, прибавляют 80 мл 0,05 М фосфатного буфера с рН 7,6; смесь нагревают в водяной бане при температуре +75...+80 °С до полного растворения препарата, охлаждают и объем доводят до 100 мл. Раствор можно использовать на протяжении 2—3 нед при хранении его в темном месте.

4. Трипсин кристаллический. 5 мг препарата растворяют в 5 мл 0,0025 н. раствора хлористоводородной кислоты (исходный раствор). Он стабилен при хранении в холодильнике (+3...+5 °С) в течение 1 нед. Непосредственно перед опытом готовят рабочий раствор разбавлением исходного фосфатным буфером в 20 раз (50 мкг/мл).

5. 5 % раствор фосфорновольфрамовой кислоты в 1 М ацетатном буфере с рН 4,5.

Ход определения. К 0,2 мл разбавленной плазмы (в зависимости от содержания ингибиторов ее количество может варьировать от 0,2 до 0,4 мл) прибавляют 0,2 мл раствора трипсина (10 мкг). Для образования комплекса фермент — ингибитор реакцию смесь выдерживают в течение 15 мин при +20 °С. Объем доводят до 1 мл фосфатным буфером. Затем добавляют 3,2 мл раствора БАПНА и выдерживают при температуре +35 °С в течение 20 мин. Реакцию останавливают прибавлением 1,4 мл раствора фосфорновольфрамовой кислоты. Контрольные пробы отличаются от опытных тем, что трипсин прибавляют после фосфорновольфрамовой кислоты. Осадок отделяют центрифугированием проб в течение 30 мин при 3000 г. В прозрачной надосадочной жидкости определяют оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 383 нм в кювете с толщиной слоя 1 см, сравнивая опытную пробу с контрольной.

Для вычисления содержания α_1 -ИП строят калибровочный график, на котором по оси абсцисс откладывают количество трипсина (1—10 мкг), а по оси ординат — оптическую плотность проб, в которых осуществляется гидролиз БАПНА соответствующей концентрацией трипсина, измеренную при длине волны 383 нм. Содержание α_1 -ИП выражают в микромолях на 1 л плазмы.

Пример расчета. Оптическая плотность пробы, в которой трипсин реагировал с плазменными ингибиторами, равна 0,375, что соответствует 6,5 мкг трипсина. Количество добавленного фермента равно 9 мкг. Концентрация трипсина, связанного с α_1 -ИП, в данном случае будет равняться: $9 - 6,5 = 2,5$ мкг.

Исходя из того что 1 моль трипсина взаимодействует с 1 моль ингибитора, содержание α_1 -ИП можно рассчитать по формуле:

$$\frac{2,5 \times 100 \times 1000}{0,2 \times 24\,000} = 52 \text{ мкмоль/л,}$$

где 2,5 — количество связанного с α_1 -ИП трипсина, мкг; 100 — разведение плазмы; 1000 — коэффициент пересчета на 1 л плазмы; 0,2 — количество плазмы в пробе, мл, 24 000 — молекулярная масса трипсина.

Содержание α_1 -ИП в плазме крови практически здоровых людей составляет в среднем 57 мкмоль/л, а больных раком гортани — 91 мкмоль/л.

Определение α_2 -М в сыворотке крови. В основу метода положен принцип, заключающийся в том, что α_2 -М количественно образует с трипсином активный (способный расщеплять БАПНА) комплекс, который нечувствителен к ингибитору из бобов сои (К. Н. Веремеенко, Л. И. Волохонская, 1969). При определении к сыворотке крови добавляют трипсин в избытке по отношению ко всем трипсинсвязывающим белкам; этим обеспечивается полное насыщение α_2 -М ферментом. Избыток трипсина инактивируют соевым ингибитором, который полностью нейтрализует свободный трипсин и

не действует на фермент, связанный с α_2 -М. При расщеплении БАПНА трипсином образуется окрашенный в желтый цвет п-нитроанилин, количество которого определяют спектрофотометрически при длине волны 383 нм (В. Erlanger и соавт., 1961).

Материал и реактивы. 1. Сыворотка крови, разведенная в 20 раз фосфатным буфером.

2. 0,05 М фосфатный буфер с рН 7,6.

3. 0,001 М раствор БАПНА (приготовление см. с. 177).

4. Трипсин кристаллический (фирма "Spofa"); приготовление исходного раствора описано на с. 177. Рабочий раствор готовят непосредственно перед опытом разведением его 0,05 М фосфатным буфером с рН 7,6 до концентрации 200 мкг в 1 мл.

5. Соевый ингибитор фирмы "Reanal". Препарат растворяют в фосфатном буфере из расчета 0,5 мг в 1 мл.

6. 5 % раствор фосфорновольфрамовой кислоты в 1 М ацетатном буфере рН 4,5.

Ход определения. К 0,3 мл разбавленной в 20 раз сыворотки крови (в зависимости от содержания α_2 -М количество сыворотки может варьировать от 0,2 до 0,5 мл) прибавляют 0,3 мл рабочего раствора трипсина. Для образования комплекса трипсин — α_2 -М смесь выдерживают в течение 15 мин при комнатной температуре, добавляют 0,2 мл раствора соевого ингибитора для нейтрализации свободного трипсина (ингибитор протеиназ трасилол частично подавляет активность трипсина, связанного с α_2 -М, и поэтому не может быть использован вместо ингибитора из бобов сои). Через 15 мин объем смеси доводят до 1 мл фосфатным буфером, затем пробы помещают в водяной термостат (при температуре +30 °С) на 2 мин, прибавляют 3,2 мл БАПНА и инкубируют 30 мин. Комплекс трипсин — α_2 -М расщепляет БАПНА, вследствие чего образуется п-нитроанилин, количество которого служит мерой активности фермента. Реакцию останавливают прибавлением 1,4 мл 5 % фосфорновольфрамовой кислоты. Контрольную пробу проводят аналогично опытной, но трипсин прибавляют после фосфорновольфрамовой кислоты. В опытной и контрольной пробах осадок отделяют центрифугированием при 3000 g в течение 30 мин. В прозрачной надосадочной жидкости определяют разницу оптической плотности опытной и контрольной проб в спектрофотометре при длине волны 383 нм в кювете с толщиной оптического слоя 1 см.

Содержание α_2 -М может быть выражено в весовых единицах специфически связанного с ним трипсина, а также в абсолютных единицах.

Количество фермента, связанного с α_2 -М, определяют по калибровочной кривой, составленной по расщеплению БАПНА кристаллическим трипсином. Зависимость скорости гидролиза БАПНА от концентрации трипсина 1—10 мкг в пробе имеет линейный характер.

Пример расчета. Оптическая плотность (Е) пробы, в которой содержалось 0,3 мл разбавленной в 20 раз сыворотки, равна 0,105. По данным калибровочного графика это соответствует 1,8 мкг трипсина.

В 1 л сыворотки свяжется с α_2 -М трипсина:

$$\frac{1,8 \times 20 \times 1000}{0,3 \times 1000 \times 000} = 0,12 \text{ г.}$$

Поскольку известна молекулярная масса α_2 -М, а в условиях насыщения 1 моль α_2 -М соединяется с 2 моль трипсина (молекулярные массы трипсина и α_2 -М соответственно равны 24 000 и 725 000), легко рассчитать содержание α_2 -М в абсолютных единицах, например, в граммах. Для этого необходимо количество связанного трипсина умножить на коэффициент $15 \left(\frac{725 \ 000}{48 \ 000} \right)$. Таким образом, в 1 л данного

образца сыворотки содержится α_2 -М:

$$0,12 \times 15 = 1,8 \text{ г.}$$

Концентрация α_2 -М в сыворотке крови доноров, определяемая этим методом, составляет в среднем 1,8 г/л, или 2,5 мкмоль/л.

Определение АТ III в плазме крови (В. А. Белицер и соавт., 1987). Метод основан на определении разницы между уровнем тромбина, добавленного в избытке к плазме крови, и его количеством, оставшимся после инактивации части фермента АТ III. Реакцию проводят в присутствии гепарина, который является активатором АТ III. Для последующей нейтрализации гепарина, мешающего образованию сгустка фибрина, используется протаминасульфат.

Материал и реактивы. 1. Дефибринированная плазма крови. Для ее получения 0,5—1 мл исследуемой цитратной или оксалатной плазмы крови последовательно выдерживают по 5 мин при температуре +37 °С и +53 °С, а затем переносят в ледяную баню и выдерживают также в течение 5 мин. После этого ее центрифугируют при 1200 г в течение 10 мин. Параллельно указанным образом проводят дефибринирование стандартной усредненной плазмы крови (смесь равных объемов плазмы 10—15 доноров).

2. 0,05 М трис-НС1-буфер с рН 7,4, содержащий хлорид натрия в концентрации 0,15 моль. Для приготовления 200 мл этого буфера требуется 1,211 г трис, 8,3 мл 1 н. раствора хлористоводородной кислоты и 1,753 г хлорида натрия.

3. Гепарин (отечественный медицинский препарат). Исходный раствор разводят трис-буфером до концентрации 40 ЕД/мл.

4. Тромбин (препарат Каунасского предприятия бакпрепаратов). В пробу помещают такое количество препарата, которое в контроле дает время свертывания фибриногена, равное в среднем (35 ± 5) с. В зависимости от используемой партии тромбина количество препарата колеблется от 10 до 60 ЕД/мл трис-буфера. Необходимое количество тромбина растворяют в пластмассовых пробирках, центрифугируют в течение 5—10 мин при 1200 г и помещают в ледяную баню, где он находится до окончания исследований.

5. Протаминасульфат (препарат Хабаровского химико-фармакологического завода). Препарат растворяют из расчета 0,56 мг/мл трис-буфера при температуре +37 °С в течение 10—15 мин.

6. 0,3 % раствор фибриногена (препарат Каунасского предприятия бакпрепаратов). 29,6 мг препарата растворяют в 2 мл подогретой до +37 °С дистиллированной воды. Спектрофотометрическим методом определяют точную концентрацию белка в этом растворе ($E_{280} - E_{320}$) учетом коэффициента экстинкции $E_{1\%}^{1\text{см}}$ для нейтральной среды при 280 нм, равного 15,06. Полученный раствор разводят до 0,3 % трис-буфером. Он стабилен в течение 4 ч.

Плазму крови и растворы тромбина, фибриногена, гепарина и протаминасульфата хранят на протяжении 1 мес в замороженном состоянии в испарителе холодильника. Необходимые их количества для одной серии проб размораживают в течение 5—10 мин при +37 °С (растворы фибриногена следует размораживать при +37 °С на протяжении 30 мин). Повторное замораживание растворов недопустимо. После размораживания все растворы помещают в ледяную баню.

Ход определения. Перед определением активности АТ III в плазме крови ставят две контрольные пробы: K_1 — для определения контрольного времени свертывания фибриногена и K_2 — контроль на реактивы.

К о н т р о л ь K_1 . В пластмассовых пробирках смешивают 0,8 мл трис-буфера с 0,1 мл раствора тромбина и выдерживают в течение 3 мин в водяной бане при температуре +37 °С. Затем 0,1 мл этой смеси помещают в видалевскую пробирку, прибавляют 0,2 мл 0,3 % раствора фибриногена и по секундомеру при +37 °С определяют время образования сгустка фибрина.

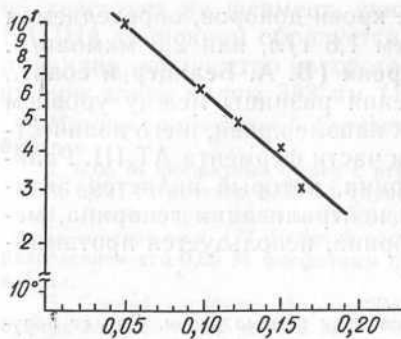


Рис. 16. Калибровочный график для определения АТ III.

По оси абсцисс — количество тромбина, ЕД., по оси ординат — lg времени свертывания фибриногена

Контроль K_2 . К 0,6 мл буфера с интервалом 0,5—1 мин прибавляют 0,1 мл раствора тромбина оптимальной концентрации, 0,1 мл гепарина и 0,1 мл раствора протаминсульфата. Затем отбирают 0,1 мл смеси, прибавляют 0,2 мл раствора фибриногена и фиксируют время образования сгустка. Время свертывания в контрольных пробах K_1 и K_2

должно быть одинаковым и составлять 30—40 с. Для определения АТ III в пластмассовые пробирки отмеривают 0,5 мл дефибринированной исследуемой плазмы крови, разбавленной в 30—50 раз, прогревают 2 мин, затем последовательно с интервалом 1 мин прибавляют 0,1 мл трис-буфера, 0,1 мл раствора гепарина и 0,1 мл раствора тромбина (после введения каждого компонента смесь тщательно перемешивают). Через 3 мин добавляют 0,1 мл раствора протаминсульфата, через 1 мин отбирают 0,1 мл смеси, прибавляют 0,2 мл раствора фибриногена и отмечают время образования сгустка, которое должно находиться в пределах 55—120 с. Полученное в этих опытах время свертывания фибриногена служит показателем количества тромбина, оставшегося после связывания его части с АТ III исследуемой плазмы крови. Его находят по стандартной тромбиновой кривой, для построения которой в ряд пробирок вносят рабочий раствор тромбина с известной активностью в количестве 0,02—0,1 мл, доводят общий объем до 0,7 мл трис-буфером и прибавляют по 0,1 мл растворов гепарина и протаминсульфата. Из каждой пробы отбирают по 0,1 мл смеси, прибавляют 0,2 мл раствора фибриногена и фиксируют время образования сгустка. Строят калибровочную кривую, откладывая на оси абсцисс количество ЕД тромбина, а на оси ординат — lg времени образования сгустка фибрина (рис. 16). Линейная зависимость наблюдается в пределах времени свертывания фибриногена 50—120 с. Калибровочную кривую строят заново при использовании новой навески тромбина (1 раз в месяц).

Содержание АТ III рассчитывают по формуле:

$$(A - B) \times C \times 18,$$

где А — исходное количество добавленного тромбина, В — обнаруженное количество оставшегося несвязанным тромбина, С — разведение плазмы крови, 18 — коэффициент, учитывающий разведение плазмы крови в пробе в тесте свертывания фибриногена.

Полученная величина выражает антитромбиновую активность плазмы крови в условных антитромбиновых единицах.

При определении содержания АТ III в плазме крови больного параллельно всегда исследуют АТ III в стандартной усредненной плазме крови вышеописанным способом.

Активность АТ III в плазме крови больного выражают в процентах по отношению к соответствующей величине, полученной для стандартной плазмы крови, которую принимают за 100 %.

Определение ингибиторов плазмина в плазме крови человека (К. Н. Веремеенко и соавт., 1980). Метод основан на торможении активности плазмина его ингибиторами плазмы крови.

Метод включает два этапа: I — получение из плазмы крови практически здоровых людей эуглобулиновой фракции, содержащей плазмин (см. с. 167), II — определение антиплазминов.

Материал и реактивы. 1. Плазма крови, разбавленная в 40 раз 0,05 М медиаловым буфером с рН 7,6 (приготовление буфера см. с. 164).

2. 1 % раствор фибриногена.

3. 0,5 % раствор тромбина.

Ход определения. В 2 прозрачные полиэтиленовые пробирки в зависимости от активности фермента вносят 0,2 или 0,3 мл эуглобулиновой фракции, полученной из плазмы крови доноров. В одну из пробирок вносят 0,2 мл разбавленной в 40 раз 0,05 М медиаловым буфером исследуемой плазмы и 0,1 мл медиалового буфера. Во вторую пробирку (контроль) помещают 0,3 мл буфера. Смеси выдерживают в течение 15 мин при температуре +20 °С...+22 °С для образования в опытной пробе комплекса плазмин — антиплазмин. Затем в опытную и контрольную пробы, помещенные в водяную баню с температурой +37 °С, последовательно вносят по 0,1 мл 1 % раствора фибриногена и 0,5 % раствора тромбина. После добавления тромбина отмечают время полного лизиса сгустка фибрина. Увеличение времени расщепления фибрина плазмином в опытной пробе по сравнению с контрольной служит мерой активности ингибиторов плазмина. Время лизиса фибринового сгустка под действием плазмина эуглобулиновой суспензии в контроле должно составлять 15—25 мин.

Содержание ингибиторов в 1 мл плазмы рассчитывают в условных единицах (усл. ед.) по формуле:

$$\frac{(t-t_0) \times Y}{t_0 \times X},$$

где t — время лизиса сгустка фибрина в опытной пробе, мин; t_0 — время лизиса фибринового сгустка в контрольной пробе, мин; X — количество плазмы, взятое в опыт; Y — разбавление плазмы.

Пример расчета. Время лизиса фибринового сгустка в опытной пробе равно 26 мин, в контрольной — 15 мин. Для определения активности ингибиторов брали 0,2 мл плазмы, разбавленной в 40 раз. Следовательно, 1 мл цельной плазмы данного образца содержит:

$$\frac{(26-15) \times 40}{15 \times 0,2} = 147 \text{ усл. ед. ингибитора.}$$

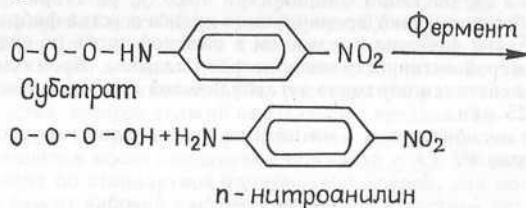
Концентрация антиплазминов в норме составляет 120—300 усл. ед., в среднем 220 усл. ед. При злокачественных новообразованиях ЛОР органов и циррозах печени содержание ингибиторов плазмина повышается и варьирует в пределах 380—500 усл. ед.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ХРОМОГЕННЫХ СУБСТРАТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СЫВОРОТОЧНЫХ ПРОТЕИНАЗ И ИХ ИНГИБИТОРОВ

Эти методы основаны на расщеплении протеолитическими ферментами синтетических пептидов с хромогенными свойствами, имеющих такую последовательность аминокислотных остатков, которая определяет специфичность действия фермента на естественный

субстрат. Синтез низкомолекулярных пептидов, обладающих сред-ством к определенным протеиназам, значительно повысил чувстви-тельность и специфичность данных методов, что обусловило их преимущество перед обычными методами исследования (И. Н. Бо-карев и соавт., 1981).

Принцип методов с использованием хромогенных субстратов заключается в том, что при гидролизе ферментом специфического субстрата расщепляется п-нитроанилидная связь. Отщепившийся при этом хромофор п-нитроанилин переходит в раствор и окраши-вает его в желтый цвет, благодаря чему его количество может быть изме-рено спектрофотометрическим методом (максимальная опти-ческая плотность таких растворов находится при длине волны 405 нм). Об активности фермента судят по количеству отщепив-шегося п-нитроанилина.



Основные хромогенные субстраты для определения сериновых протеиназ, их проферментов и ингибиторов представлены в табл. 4. В настоящее время хромогенные субстраты производятся в основ-ном за рубежом фирмами "Pentapharm" (Швейцария), "Kabi Diagnostica" (Швеция), "Boehringer Mannheim" (ФРГ).

Более 60 синтетических хромогенных субстратов используют для определения активности сериновых протеиназ фибринолиза, свертывания крови, калликреин-кининовой системы.

Для исследования активности протеолитических ферментов и их ингибиторов применяются также флюорогенные субстраты. Они представляют собой пептиды, к которым присоединены облада-ющие флюоресцентными свойствами диметилвый эфир аминоизо-фталевой кислоты, β-нафтиламид или амид метилкумарина. При действии протеиназ эти вещества высвобождаются и их количество можно измерить с помощью соответствующих флюорометрических методов (J. Fareed и соавт., 1983).

Определение прекалликреина в плазме крови при помощи хро-могенного пептидного субстрата. Принцип определения прекал-ликреина с помощью хромогенного субстрата, называемого «хро-мозим РК» (N-α-бензоил-L-пролил-L-фенилаланил-L-аргинин-п-нитроанилид гидрохлорид), заключается в том, что предвари-тельно активируют прекалликреин в калликреин, который в этом субстрате расщепляет нитроанилидную связь. При этом свободный

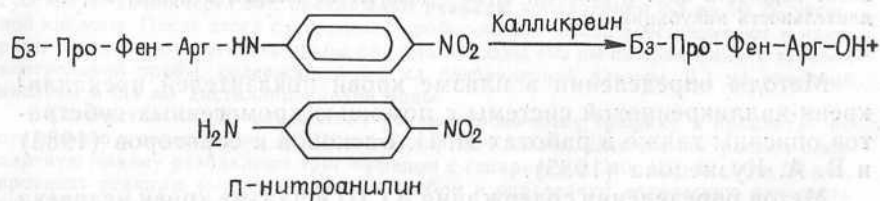
Т а б л и ц а 4. Основные синтетические хромогенные пептидные субстраты для сериновых протеиназ (J. Fareed и соавт., 1983)

Субстрат	Химическая структура	Определяемый фермент (ингибитор)
Хромозим ТН	Тоз или СБз-Гли-Про-Арг-п-НА	Тромбин, протромбин, АТ III
S-2238	H-D-Фен-Пип*-Арг-п-НА	
S-2160	N-Бз-Фен-Вал-Арг-п-НА	
S-2222	N-Бз-Илей-Глу(O—R**)-Гли-Арг-п-НА	АТ III, факторы VIII, IX, X, Ха, ингибиторы фактора Ха
S-2237	N-Бз-Илей-Глу(O-Пип)-Глу-Арг-п-НА	
S-2251	H-D-Вал-Лей-Лиз-п-НА	Плазмин, плазминоген, активатор плазминогена, α ₂ -АП
Хромозим Р	СБз-Гли-Про-Арг-п-НА	
Хромозим РL	Тоз-Гли-Про-Лиз-п-НА	
S-2288	H-D-Илей-Про-Арг-п-НА	Активатор плазминогена
S-2302	H-D-Про-Фен-Арг-п-НА	Калликреин, прекалликреин, фактор XII, ингибиторы калликреина
Хромозим РК	N-Бз-Про-Фен-Арг-п-НА	Урокиназа, ингибитор СI-эстеразы
Хромозим УК	N-Бз-Вал-Гли-Арг-п-НА	
S-2244	Пироглу-Гли-Арг-п-НА	
Хромозим Тгу	H-D-Вал-Гли-Арг-п-НА Сво-Вал-Гли-Арг-п-НА Z-Вал-Гли-Арг-п-НА	α ₁ -ИП, α ₂ -М

Пип* — пипекодил (пипекол)
R** — CH₃ или H

p-нитроанилин, переходящий в раствор, окрашивает его в желтый цвет. По интенсивности окраски судят об активности фермента.

Схематически реакция расщепления «хромозима РК» выглядит следующим образом:



- Материал и реактивы.* 1. Плазма крови (получение см. с. 168).
2. 0,4 % раствор хромозима РК в 0,15 М трис-имидазоловом буфере с рН 7,9.
3. 1 % суспензия каолина в этом же буфере.
4. 5 % раствор фосфорновольфрамовой кислоты в 1 М ацетатном буфере с рН 4,5.
5. 0,15 М трис-имидазоловый буфер с рН 7,9; для его приготовления готовят следующие растворы:

- а) 3 г трис, 1,7 г имидазола и 500 мл 0,1 н. раствора хлористоводородной кислоты разбавляют до 1 л дистиллированной водой (рН 2);
 б) 4,04 г трис, 2,27 г имидазола и 1,96 г хлорида натрия растворяют и доводят до 1 л дистиллированной водой (рН 9);
 в) 11,69 г хлорида натрия растворяют и доводят до 1 л дистиллированной водой.

Смешивают примерно 32,5 мл раствора «а» и 25 мл раствора «б» (рН смеси 7,9) и для получения окончательного буферного раствора 0,15 М с рН 7,9 прибавляют равный объем раствора «в».

Ход определения. В полиэтиленовую пробирку помещают 2 мл буфера, прибавляют 0,25 мл раствора субстрата и 0,25 мл каолин-плазменной смеси после активации плазмы каолином в течение 1 мин (для получения каолин-плазменной смеси смешивают 0,5 мл плазмы и 0,5 мл суспензии каолина). Пробу инкубируют 15 мин при температуре +35 °С. Реакцию прекращают прибавлением 1,4 мл фосфорновольфрамовой кислоты. Параллельно опытным пробам в тех же условиях ставят контрольные пробы, в которые субстрат вносят после добавления фосфорновольфрамовой кислоты. Опытные и контрольные пробы оставляют в холодильнике (+3...+5 °С) на 20 мин для лучшего осаждения денатурированного белка и центрифугируют в течение 30 мин при 3000 г. Затем определяют оптическую плотность опытных проб фотометрированием в спектрофотометре по сравнению с таковой контрольных проб при длине волны 405 нм.

Количество отщепившегося п-нитроанилина в пробе рассчитывают по калибровочному графику, для построения которого по оси абсцисс откладывают концентрацию растворов п-нитроанилина (0,01—0,08 мкмоль), а по оси ординат — оптическую плотность соответствующих растворов, измеренную при длине волны 405 нм.

Хромозимрасщепляющую активность плазменного прекалликреина выражают в микромолях отщепившегося п-нитроанилина (или расщепленного хромозима РК, так как реакция имеет эквимолекулярный характер) за 1 мин в 1 л плазмы.

Пример расчета. Оптическая плотность пробы равна 0,135. По калибровочному графику это соответствует 0,01 мкмоль п-нитроанилина. Расчет проводим по формуле:

$$\frac{0,01 \times 1000}{0,125 \times 15} = 5,3 \text{ мкмоль / (мин} \cdot \text{л)},$$

где 0,01 — количество отщепившегося п-нитроанилина, мкмоль; 1000 — коэффициент пересчета на 1 л плазмы; 0,125 — количество плазмы в пробе, мл; 15 — длительность инкубации, мин.

Методы определения в плазме крови показателей прекалликреин-калликреиновой системы с помощью хромогенных субстратов описаны также в работах И. П. Басковой и соавторов (1983) и В. А. Кузнецова (1985).

Метод определения содержания АТ III в плазме крови человека с помощью хромогенных субстратов (U. Abildgaard и соавт., 1977). Принцип метода заключается в исследовании оставшейся активности экзогенного тромбина после его взаимодействия с АТ III плазмы крови человека по расщеплению п-нитроанилидной связи в хромогенных субстратах. Для ускорения реакции между тромбином и АТ III добавляют гепарин. В результате гидролиза тромбином хромогенного субстрата образуется п-нитроанилин,

количество которого определяют спектрофотометрическим методом при длине волны 405 нм. Для проведения исследований известные количества тромбина инкубируют с образцом плазмы, разбавленной буфером, содержащим гепарин. Оставшуюся активность тромбина затем измеряют и сравнивают с таковой стандартной плазмы человека. В присутствии гепарина степень угнетения амидолитической активности тромбина пропорциональна активности АТ III.

Материал и реактивы. 1. Исследуемая (опытная) плазма крови. Для ее получения смешивают 9 объемов крови с 1 объемом 0,1 М раствора цитрата натрия и центрифугируют в течение 20 мин при 2000 g. Плазму отбирают и, если не исследуют сразу, то хранят в замороженном состоянии при температуре -20°C .

2. Стандартная плазма крови. Равные количества цитратной плазмы крови от 10 здоровых лиц смешивают и хранят отдельными порциями при температуре -20°C .

3. Трис-буфер с гепарином, рН 8,4, $\mu=0,2$. Для его приготовления смешивают 250 мл 0,2 М раствора трис, 20 мл 1 М раствора хлористоводородной кислоты, 30 мл 0,25 М раствора двузамещенного кислого калия этилендиаминтетраацетата, 0,6 мл раствора гепарина (5000 ед/мл) и общий объем доводят до 1 л 0,26 М раствором хлорида натрия. Конечная концентрация гепарина 3 ед/мл. Раствор хранят при температуре $+3...+5^{\circ}\text{C}$.

4. Тромбин. Исходный раствор содержит 50 или 100 NIHU тромбина в 1 мл 0,15 М раствора хлорида натрия. Его хранят в замороженном состоянии при температуре -20°C в течение 3 мес. Рабочие растворы (10—15 NIHU) хранят на льду и используют на протяжении 1 ч. Концентрацию тромбина подбирают таким образом, чтобы оптическая плотность проб после расщепления субстратов тромбином при отсутствии плазмы в условиях опыта составляла 0,85.

5. Хромогенные субстраты. Н-D-Фен-Пип-Арг-п-нитроанилид (S-2238; "Kabi Diagnostica") или тозил-Гли-Про-Арг-п-нитроанилид (хромозим ТН; Pentapharm). Их растворяют в дистиллированной воде до концентрации 1,5 ммоль/л и хранят в темноте при $+3...+5^{\circ}\text{C}$. Они стабильны в течение 6 мес.

6. 50 % уксусная кислота.

Ход исследований. Исследуемую (опытную) плазму разбавляют трис-буфером с гепарином в 60 раз (0,1 мл плазмы + 5,9 мл буфера). Отбирают в пробирку 0,4 мл этого раствора и предварительно прогревают его при температуре $+37^{\circ}\text{C}$. Затем прибавляют 0,1 мл рабочего раствора тромбина и через 30 с — 0,3 мл раствора субстрата. Точно через 30 с прекращают реакцию добавлением 0,3 мл 50 % уксусной кислоты. После этого содержимое пробирок тщательно перемешивают и измеряют оптическую плотность пробы при длине волны 405 нм по сравнению с таковой контрольной пробы, содержащей 0,4 мл разбавленной плазмы, 0,3 мл уксусной кислоты и 0,4 мл дистиллированной воды.

Количество АТ III определяют по калибровочному графику в процентах по отношению к содержанию АТ III в стандартной плазме. Для его построения стандартную плазму разбавляют трис-буфером с гепарином в 240, 120, 80, 60 и 50 раз, проводят реакцию вышеописанным способом и определяют оптическую плотность полученных проб. Оптическая плотность пробы, в которой проводилось исследование плазмы крови, разбавленной в 60 раз, условно принимается за содержание АТ III, равное 100 %. Тогда содержание АТ III при разведении плазмы в 240, 120, 80 и 50 раз составит соответственно 25, 50, 75 и 125 %. Для обычных исследований этого диапазона значений достаточно.

При построении графика по оси абсцисс откладывают значения содержания АТ III в процентах, а по оси ординат — соответствующие им величины оптической плотности проб (рис. 17). Калибровочный график строят каждый раз в день исследования опытной плазмы.

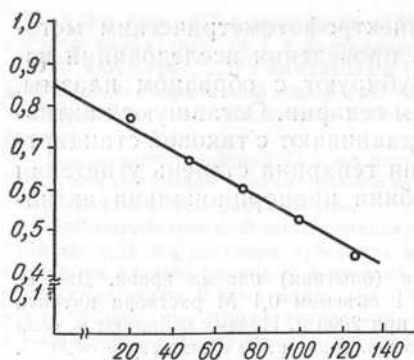


Рис. 17. Калибровочный график для определения АТ III с помощью хромогенных субстратов.

По оси абсцисс — содержание АТ III, %, по оси ординат — оптическая плотность проб, E₄₀₅.

Пример расчета. Например, оптическая плотность исследуемой пробы составляет 0,7. Согласно калибровочному графику, содержание АТ III в ней равняется 34 %.

Метод определения суммарной антиплазминовой активности плазмы крови по гидролизу хромогенного субстрата (М. Gallimore и соавт., 1979). Он основан на расщеплении экзогенным плазмином, оставшимся после взаимодействия с антиплазминами плазмы крови, синтетического хромогенного субстрата Тоз-Гли-Про-Лиз-п-нитроанилида. Об активности фермента судят по увеличению оптической плотности проб при длине волны 405 нм в результате высвобождения хромогенного продукта реакции — п-нитроанилина. При избытке плазмينا скорость расщепления субстрата уменьшается линейно с увеличением в плазме концентрации антиплазминов.

Материал и реактивы. 1. Плазма. Получают смешиванием 9 объемов крови и одного объема 0,11 М раствора трехзамещенного цитрата натрия. Центрифугируют в течение 15 мин при 2000 g. Плазму можно хранить в замороженном состоянии при температуре — 20 °С в течение 1 мес.

2. 0,05 М трис-буфер с рН 7,4, содержащий хлорид натрия в концентрации 0,1 моль. Его готовят следующим образом: 6,1 г трис и 5,85 г хлорида натрия растворяют в 800 мл дистиллированной воды. Доводят рН до 7,4 прибавлением около 44 мл 1 М раствора хлористоводородной кислоты и доливают дистиллированной водой до объема 1 л.

3. Плазмин ("Kabi Diagnostica"). Готовят раствор, содержащий 0,25 КЕ/мл. Растворитель состоит из равных объемов стерильного глицерина и 2 ммоль/л раствора хлористоводородной кислоты. Раствор плазмينا необходимо выдерживать перед использованием при +25 °С не менее 1 ч.

4. Хромогенный субстрат (Тоз-Гли-Про-Лиз-п-нитроанилид гидрохлорид (хромозим PL, "Pentapharm"). Растворяют в дистиллированной воде до концентрации 0,8 ммоль/л.

5. 50 % раствор уксусной кислоты.

Ход определения. В пластмассовую пробирку прибавляют 0,3 мл разбавленной в 30 раз буфером плазмы (10 мкл цельной плазмы), 0,2 мл буфера и 0,1 мл раствора плазмينا. Смесь выдерживают в течение 5 мин при температуре +37 °С. После этого добавляют 0,2 мл раствора хромозима PL и инкубируют при температуре +37 °С точно 60 с, реакцию прекращают добавлением 0,2 мл 50 % раствора уксусной кислоты. Реакционные смеси тщательно перемешивают и переливают в микрокювету (объем 1 мл) спектрофотометра. Опытные пробы фотометрируют по сравнению с контрольными, содержащими вместо раствора плазмينا буфер в

том же объеме, в спектрофотометре при длине волны 405 нм. При использовании кюветы объемом 3 мл соответственно увеличивают в 3 раза объем всех компонентов смеси.

Активность фермента выражают в единицах оптической плотности (E_{405}), количество ингибиторов — в процентах, сравнивая плотность пробы, в которую добавляли плазму, с оптической плотностью пробы, в которой плазму заменяли таким же объемом буфера. Оптическую плотность последней принимали за 100 %.

Этим методом определяют суммарное содержание ингибиторов плазмина (α_2 -АП, α_2 -М, α_1 -ИП, СТИ, АТ III). Его можно использовать также для определения основного наиболее быстрого ингибитора плазмина α_2 -АП, если исключить выдерживание смеси в течение 5 мин при температуре $+37^\circ\text{C}$ и немедленно прибавить субстрат к смеси, содержащей плазму и экзогенный плазмин.

Активность антиплазминов можно определять с использованием другого хромогенного субстрата — S-2251 (Н-D-Вал-Лей-Лиз-*p*-нитроанилид $\cdot 2\text{HCl}$), эта методика описана в работе Г. В. Андреевко (1981).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Активность карбоксикапепсина (образующего ангиотензин II) у больных инфарктом миокарда/Орехович В. Н., Малая Л. Т., Павлихина Л. В. и др.// Инфаркт миокарда.— Харьков: Б. и., 1977.— С. 27—34.*
- Активация прекалькреину плазмы крови высокодисперсными кремнеземами/Мегель Н. Ф., Веремеенко К. М., Павлов В. В., Тьортих В. А.//Укр. біохім. журн.— 1976.— Т. 48, № 3.— С. 370—374.*
- Андрееенко Г. В. Фибринолиз.— М.: Изд-во Моск. ун-та, 1979.— С. 261—298.*
- Андрееенко Г. В. Активаторы плазминогена и их физиологическая роль//Укр. біохім. журн.— 1983.— Т. 55, № 3.— С. 329—343.*
- Андрееенко Г. В. Тканевые активаторы плазминогена //Стрептокиназа в регуляции свертывающей и противосвертывающей систем крови. Минск.: Белорус. ордена Трудового Красного Знамени н.-и. ин-т эпидемиологии и микробиологии.— 1985.— С. 132—139.*
- Андрееенко Г. В., Полянцева Л. Р., Подорольская Л. В. Антитромбин III и его роль в клинической патологии//Терапевт. арх.— 1980.— № 2.— С. 141—145.*
- Баркаган З. С. Геморрагические заболевания и синдромы.— М.: Медицина, 1980.— 336 с.*
- Белицер В. А. Рецензия/Д. М. Зубаиров. Биохимия свертывания крови//Укр. біохім. журн.— 1979.— Т. 51, № 5.— С. 576—578.*
- Белохвостов А. С., Войтенков Б. О. Роль иммунодепрессивных факторов опухолей в трех стадиях иммунного взаимодействия опухоли и организма//Успехи соврем. биологии.— 1983.— Т. 95, вып. 2.— С. 255—272.*
- Биологически активные фрагменты белковых гормонов/Юдаев Н. А., Панков Ю. А., Бабицев В. Н. и др.//Вопр. мед. химии.— 1984.— Т. 30, № 3.— С. 8—15.*
- Бокарев И. Н., Бугоров В. Н., Логинов Л. Е. Применение хромогенных субстратов для диагностики нарушений свертывания крови и фибринолиза//Терапевт. арх.— 1981.— № 2.— С. 118—124.*
- Бычков С. М. Новые данные о гепарине//Вопр. мед. химии.— 1981.— Т. 27, № 6.— С. 726—738.*
- Веремеенко К. Н. Ферменты протеолиза и их ингибиторы в медицинской практике.— К.: Здоров'я, 1971.— 215 с.*
- Веремеенко К. Н. Кининовая система.— К.: Здоров'я, 1977.— 182 с.*
- Веремеенко К. Н. Роль протеолитических ферментов в регуляции обмена веществ//Биохимия животных и человека.— 1983.— Вып. 7.— С. 37—46.*
- Веремеенко К. Н. α_2 -Ингибитор протеиназ и его исследование в клинике//Клин. медицина.— 1985.— № 12.— С. 21—27.*
- Веремеенко К. Н., Волохонская Л. И. Определение α_2 -макроглобулина в сыворотке крови человека и его клиническое значение// Лаб. дело.— 1969.— № 7.— С. 394—397.*
- Веремеенко К. Н., Кизим А. И. Ингибиторы протеолитических ферментов крови и их исследование в клинике//Вопр. мед. химии.— 1975.— Т. 21, № 1.— С. 5—13.*
- Веремеенко К. Н., Кизим А. И. Сывороточные ингибиторы фибринолиза и свертывания крови//Биохимия животных и человека.— 1982.— Вып. 6.— С. 94—102.*

- Веремеенко К. Н., Кизим А. И. Молекулярные механизмы фибринолиза и перспективы тромболитической терапии//Вопр. мед. химии.—1984.—Т. 30, № 5.—С. 13—22.
- Веремеенко К. Н., Кизим А. И. Протеолитические ферменты и их ингибиторы при бронхолегочных заболеваниях//Врач. дело.—1985.—№ 7.—С. 34—38.
- Веремеенко К. Н., Кизим А. И., Грома С. П. Исследование ферментативных систем протеолиза в слюне у больных хроническим тонзиллитом//Вестн. оториноларингологии.—1975.—№ 6.—С. 13—18.
- Веремеенко К. Н., Верева В. С., Мегедь Н. Ф. Исследование прекалликреин-калликреиновой системы плазмы крови при остром панкреатите//Клин. хирургия.—1976.—№ 9.—С. 5—9.
- Веремеенко К. Н., Волохонская Л. И., Кизим А. И. Определение каолинактивируемого плазмينا в плазме крови человека//Лаб. дело.—1978.—№ 7.—С. 392—394.
- Веремеенко К. Н., Волохонская Л. И., Грома С. П. Обоснование и эффективность применения ингибиторов протениназ в комплексной терапии больных хроническим тонзиллитом//Журн. ушных, носовых и горловых болезней.—1981.—№ 3.—С. 8—13.
- Веремеенко К. Н., Кизим А. И., Колесник Л. А. α_2 -Макроглобулин и механизм его взаимодействия с протеиназами//Вестн. АМН СССР.—1984.—№ 8.—С. 60—64.
- Гембицкая Т. Е. Опыт анализа роли дефицита α_1 -антитрипсина в этиологии хронических неспецифических заболеваний легких//Терапевт. арх.—1984.—№ 3.—С. 70—73.
- Голобородько О. П., Опанащенко Г. А., Лосицкая В. М. Активность протеолитических ферментов в ткани злокачественных новообразований гортани//Вопр. онкологии.—1979.—Т. 25, № 11.—С. 73—74.
- Голобородько О. П., Опанащенко Г. А., Костюченко Е. С. Исследование ферментов кининовой системы и фибринолиза в плазме крови у больных раком гортани//Журн. ушных, носовых и горловых болезней.—1980.—№ 1.—С. 23—26.
- Голобородько О. П., Опанащенко Г. А., Ус И. А. Компоненты фибринолитической системы в тканях злокачественных новообразований гортани//Журн. ушных, носовых и горловых болезней.—1982.—№ 1.—С. 10—13.
- Гудь М. В. Содержание альфа-1-антитрипсина в сыворотке крови у больных с хроническими заболеваниями легких//Клин. медицина.—1978.—№ 2.—С. 102—105.
- Дзизинский А. А., Гомазков О. А. Кинины в физиологии и патологии сердечно-сосудистой системы.—Новосибирск: Наука, 1976.—208 с.
- Еропкин М. Ю. Роль протеолиза в процессинге и инактивации нейропептидов, его возможная связь с некоторыми функциями мозга//Успехи соврем. биологии.—1983.—Т. 95, № 1.—С. 65—83.
- Зубаиров Д. М. Биохимия свертывания крови.—М.: Медицина, 1978.—171 с.
- Зубаиров Д. М. Механизмы образования тромбина//Биохимия животных и человека.—1982.—Вып. 6.—С. 3—14.
- Исследование ингибиторов плазмينا в крови человека/Веремеенко К. Н., Волохонская Л. И., Голобородько О. П., Кизим А. И.//Лаб. дело.—1980.—№ 4.—С. 202—204.
- Исследование плазмينا в плазме крови человека/Веремеенко К. Н., Волохонская Л. И., Кизим А. И., и др.//Укр. биохим. журн.—1978.—Т. 50, № 4.—С. 475—479.
- Кардаш Б. Е., Гейтман И. Я. α_1 -Антитрипсин в сыворотке крови онкологических больных//Вопр. онкологии.—1978.—Т. 24, № 10.—С. 80—82.
- Кашкин К. П., Кубась В. Г. Система комплемента и ее активность//Иммунология.—1981.—№ 1.—С. 27—36.
- Кизим А. И. Тромболитическая активность комплекса плазмин — α_2 -макроглобулин//Тез. Всесоюз. симпозиума по медицинской энзимологии.—Махачкала: Государственный комитет СССР по науке и технике, 1986.—С. 116.

- Клинико-биохимическое* изучение нового тромболитического препарата — «стрептодеказы»/Чазов Е. И., Мазаев А. В., Суворова Л. А. и др.//Имобилизованные ферменты в медицине и медицинской промышленности.—Л.: Всесоюз. н.-и. технологический ин-т антибиотиков и ферментов медицинского назначения.—1982.—С. 21—37.
- Козлов Л. В., Соляков Л. С.* Возможность участия зимогенных форм факторов В и D в активации альтернативного пути системы комплемента человека//Биоорг. химия.—1982.—Т. 8, № 3.—С. 342—348.
- Комаров Ф. И., Бокарев И. Н.* Современное состояние и проблемы противотромботической терапии//Клин. медицина.—1980.—№ 7.—С. 18—25.
- Контактная активация прекалликреина и плазминогена в плазме крови*/Веремеенко К. Н., Волохонская Л. И., Кизим А. И., Погорелая Н. Ф.//Укр. биохим. журн.—1983.—Т. 55, № 3.—С. 295—301.
- Кудийов С. А.* Лизин- и аргининсвязывающие участки доменов плазминогена//Укр. биохим. журн.—1985.—Т. 57, № 5.—С. 23—35.
- Кудинов С. А., Гриненко Т. В.* Активация плазминогена стрептокиназой//Энзимология тромболитика и стрептокиназа.—Минск: Белорус. ордена Трудового Красного Знамени н.-и. ин-т эпидемиологии и микробиологии.—1982.—С. 34—40.
- Кудряшов Б. А.* Биологические проблемы регуляции жидкого состояния крови и ее свертывания.—М.: Медицина, 1975.—488 с.
- Кузнецов В. А.* Микрометод определения прекалликреина в плазме крови при использовании хромогенного субстрата//Лаб. дело.—1985.—№ 7.—С. 400—402.
- Лагутина Н. Я., Федулова Г. А.* Антитромбин III//Пробл. гематологии.—1982.—№ 3.—С. 42—50.
- Лобарева Л. С., Степанов В. М.* Образование инсулина из предшественника//Успехи соврем. биологии.—1983.—Т. 95, вып. 2.—С. 209—224.
- Локшина Л. А.* Регуляторная роль протеолитических ферментов//Молекулярная биология.—1979.—Т. 3, № 6.—С. 1205—1229.
- Лосицкая В. М.* Исследование сывороточных и тканевых ингибиторов протеолитических ферментов у больных раком гортани//Отоларингология.—1971.—Вып. 2.—С. 71—78.
- Макогоненко Е. М.* Методы получения и физико-химические свойства активаторов плазминогена//Укр. биохим. журн.—1983.—Т. 55, № 3.—С. 344—354.
- α_2 -Макроглобулин: структура, свойства и физиологическая роль*/Веремеенко К. Н., Семенюта О. С., Кизим А. И., Лобунец К. А.//Укр. биохим. журн.—1983.—Т. 55, № 2.—С. 218—233.
- Малая Л. Т., Лазарева С. А., Беркелиева С. Ч.* Активность кининоген-кининовой системы при остром крупноочаговом инфаркте и его осложнениях//Клин. медицина.—1973.—№ 4.—С. 29—36.
- Метод определения контактного прекалликреина и ингибиторов калликреина в плазме крови человека*/Веремеенко К. Н., Волохонская Л. И., Кизим А. И., Мегедь Н. Ф.//Лаб. дело.—1975.—№ 1.—С. 9—12.
- Методы исследования фибринолитической системы крови*/Под ред. Г. В. Андреевко.—М.: Изд-во Моск. ун-та, 1981.—С. 92—95.
- Мишин Ю. Б.* Влияние ингибитора протеаз контрикала на прививаемость и рост солидной карциномы Эрлиха у мышей//Вопр. онкологии.—1982.—Т. 28, № 1.—С. 73—75.
- Мишин Ю. Б.* Протеолитические ферменты раковых клеток и их участие в иммунологических взаимодействиях опухоли и организма//Актуальные вопросы этиологии и патогенеза опухолей.—М.: Медицина, 1982.—С. 68—74.
- Мосолов В. В.* Протеолитические ферменты.—М.: Наука, 1971.—414 с.
- Мосолов В. В.* Белковые ингибиторы как регуляторы процессов протеолиза.—М.: Наука, 1983.—39 с.

- Некоторые биохимические показатели плазмы крови у больных раком гортани до операции и в ближайшем послеоперационном периоде*/Веремеенко К. Н., Голобородько О. П., Кизим А. И. и др.//Журн. ушных, носовых и горловых болезней.— 1983.— № 6.— С. 44—48.
- Никандров В. Н.* Дискуссионные вопросы структурных и каталитических свойств стрептокиназы//Энзимология тромболитика и стрептокиназа.— Минск: Белорус. ордена Трудового Красного Знамени н.-и. ин-т эпидемиологии и микробиологии.— 1982.— С. 23—33.
- Оглоблина О. Г.* Кислотостабильные белки-ингибиторы протенназ млекопитающих. Свойства, структура, биологическая роль//Биохимия.— 1982.— Т. 47, № 10.— С. 1587—1600.
- Оглоблина О. Г.* Роль протенназ гранулоцитов и их ингибиторов в патогенезе неспецифических эндобронхитов//Вопр. мед. химии.— 1984.— Т. 30, вып. 1.— С. 3—13.
- Олигопептиды мозга — анальгетики, стимуляторы памяти и сна*/Ашмарин И. П., Ерошкин М. Ю., Ковалева Т. А., Рожанец В. В.//Молекулярная биология.— 1978.— Т. 12, № 5.— С. 965—979.
- Определение активности антитромбина III в плазме крови человека*/Белицер В. А., Мусялковская А. А., Платонова Т. Н., Ена Я. М.//Лаб. дело.— 1987.— № 4.— С. 255—259.
- Определение содержания фибриногена в плазме крови*/Белицер В. А., Варецкая Т. В., Бутылин Ю. П., и др.//Лаб. дело.— 1983.— № 4.— С. 38—42.
- Осипов С. Г., Титов В. Н.* Биологические функции системы комплемента//Иммунология.— 1984.— № 6.— С. 35—38.
- Оценка с помощью хромогенных субстратов показателей калликреин-кининовой и свертывающей систем в плазме крови больных с нефротическим синдромом*//Баскова И. П., Пасхина Т. С., Полянцева Л. Р. и др.//Вопр. мед. химии.— 1983.— Т. 29, № 5.— С. 96—99.
- Панков Ю. А.* Роль протеолитических ферментов в некоторых этапах биологического действия соматотропного гормона//Вестн. АМН СССР.— 1982.— № 9.— С. 38—45.
- Пасхина Т. С.* Кининовая система. Функции в плазме крови. Возможные пути направленного воздействия и регуляции//Целенаправленный поиск новых сердечно-сосудистых препаратов.— Рига: Зинатне, 1980.— С. 50—70.
- Пасхина Т. С.* Компенсаторные и патогенетические функции калликреин-кининовой системы в норме и при некоторых заболеваниях//Вестн. АМН СССР.— 1982.— № 9.— С. 50—56.
- Пасхина Т. С., Яровая Г. А.* Калликреин сыворотки крови человека. Активность фермента и хроматографический метод определения//Биохимия.— 1970.— Т. 35, вып. 5.— С. 1055—1058.
- Пасхина Т. С., Кринская А. В.* Упрощенный метод определения калликреиногена и калликреина в сыворотке (плазме) крови человека в норме и при некоторых патологических состояниях //Вопр. мед. химии.— 1974.— Т. 20, вып. 6.— С. 660—663.
- Пептиды — ингибиторы карбоксикапепсина (пептидил-дипептидазы А) и их значение для клинической медицины*/Орехович В. Н., Елисеева Ю. Е., Павличина Л. В. и др.//Вопр. мед. химии.— 1984.— Т. 30.— Вып. 3.— С. 51—56.
- Пилявская А. С., Кудинов С. А.* Современные представления о структуре и функции α_2 -антиплазмина//Укр. биохим. журн.— 1985.— Т. 57, № 2.— С. 93—103.
- Полянцева Л. Р., Андреев Г. В., Подорольская Л. В.* Антитромбин III плазмы крови у больных нефротическим синдромом//Клин. медицина.— 1979.— Т. 57, № 8.— С. 38—43.
- Протеолитические ферменты и их ингибиторы в клинической и экспериментальной онкологии*/Гешелин С. А., Вовчук С. В., Близнюк Б. Ф., Варбенец В. Ф.//Вопр. онкологии.— 1984.— № 10.— С. 9—18.

- Протеолитический и антипротеолитический потенциал мокроты у больных хроническим бронхитом в период обострения*//Хоменко Л. Г., Каминская Г. О., Пыллусте Я. А., и др.//Терапевт. арх.—1983.— № 3.— С. 60—63.
- Путов Н. В., Походзей И. В., Колодкина Л. А.* О роли некоторых механизмов в патогенезе эмфиземы и ряда других заболеваний легких//Терапевт. арх.—1985.— № 3.— С. 144—148.
- Разработка и получение фибринолитического препарата триазы*/Гаврилов О. А., Мурашова Н. С., Козлова М. А. и др.//Пробл. гематологии.—1985.— № 8.— С. 52—56.
- Роль протеолитических ферментов в регуляции физиологических процессов*/Орехович В. Н., Локшина Л. А., Елисеева Ю. Е., Павлихина Л. В.//Вестн. АМН СССР.—1984.— № 8.— С. 3—11.
- Ромданов А. П., Веремеенко К. Н., Мельниченко В. А.* Исследование протеолитических ферментов и их ингибиторов в крови и ликворе у больных с черепно-мозговой травмой//Вопр. нейрохирургии.—1972.— № 6.— С. 18—21.
- Семенова О. А.* Инактивация α -тромбина антитромбином III и роль гепарина в этом процессе//Усп. соврем. биологии.—1985.— Т. 100, вып. 1 (4).—С. 128—141.
- Серебряный С. Б.* Тромбин: его строение и особенности катализа//Биохимия животных и человека.—1982.— Вып. 6.— С. 14—25.
- Система комплемента у больных с ожоговой травмой*/Голосова Т. В., Вавилова Л. М., Панченков Н. Р. и др.//Клин. медицина.—1985.— Т. 63, № 2.— С. 118—122.
- Состояние микроциркуляции и системы ренин — ангиотензин — альдостерон при циррозе печени*/Назыров Ф. Г., Халмуратова Р. А., Хамидов П. М., Саатов Р. Р.//Клин. хирургия.—1985.— № 9.— С. 31—33.
- Структура С. М.* Структурно-функциональные особенности тромбина//Биохимия животных и человека.—1982.— Вып. 6.— С. 26—38.
- Суднева Л. Н., Пименов Л. Г.* Опыт применения и оценка клинической эффективности калликреин-протеазного ингибитора контрикала в комплексной терапии ишемической болезни сердца//Терапевт. арх.—1982.— № 12.— С. 72—77.
- Сыновец А. С., Левицкий А. П.* Ингибиторы протеолитических ферментов в медицине.—К.: Здоров'я.—1985.—72 с.
- Ферменты в оториноларингологии*/Под ред. К. Н. Веремеенко.—К.: Здоров'я, 1980.—184 с.
- Фибринолиз и тромболитис после введения тканевого активатора плазминогена собакам*/Малиновский Н. Н., Андреев Г. В., Максимович И. В., и др.//Вестн. АМН СССР, 1985, № 7.— С. 52—58.
- Чазов Е. И.* Тромбозы и эмболии в клинике внутренних болезней.—Москва, Варшава: Медицина, гос. мед. изд-во (ПНР), 1966.—262 с.
- Чазов Е. И., Лакин К. М.* Антикоагулянты и фибринолитические средства.—М.: Медицина, 1977.—312 с.
- Чернух А. М., Гомазков О. А.* О регуляторной и патогенетической роли калликреин-кининовой системы в организме//Патол. физиология и эксперим. терапия.—1976.— Вып. 1.— С. 5—16.
- Шхвацабая И. К., Некрасова А. А.* Биологически активные субстанции — простагландины и кинины, их роль в регуляции артериального давления и развитии артериальной гипертензии//Кардиология.—1977.— № 2.— С. 136—145.
- A new cysteine proteinase inhibitor in human serum* / Hopsu-Havu V. K. Ioronen I. A., Järvinen M., Rihne — Riv. Eur. Sci., Med e. Farmacol., 1982, v. 4, № 4 p. 389—394.
- Abildgaard U., Lie M., Odegard O. R.* Antithrombin (Heparin cofactor) assay with «new» chromogenic substrates (S-2238 and chromozym TH).—Thromb. Res., 1977, v. 11, № 4, p. 549—553.
- Activation of human breast carcinoma collagenase through plasminogen activator*/Paranjpe M., Engel L., Young N., Liotta L. A.—Life Sci., 1980, v. 26, № 15, p. 1223—1231.

- An enzymatic function associated with transformation of fibroblasts by oncogenic viruses/Ossowski L., Unkeless J. C., Tobia A. et al.—*J. Exp. Med.*, 1973a, v. 137, № 1, p. 112—126.
- Anstey J. T., Blythe J. G. Fibrin degradation products and diagnosis of ovarian carcinoma.—*Obstet and Gynecol.*, 1978, v. 52, № 5, p. 605—608.
- Aoki N. Natural inhibitors of fibrinolysis.—*Prog. Cardiovasc. Dis.*, 1979, v. 21, № 4, p. 267—286.
- Aoki N., Moroi M., Kazuko T. Effects of α_2 -plasmin inhibitor on fibrin clot lysis. Its comparison with α_2 -macroglobulin.—*Thromb. a. Haemost.*, 1978, v. 39, № 1, p. 22—31.
- Barrett A. J. α_2 -Macroglobulin.—*Meth. Enzymol.*, 1981, v. 80, 737—754.
- Bick R. L. The clinical significance of fibrin degradation products.—*Seminars in Thromboses and Haemostases*, 1982, v. 8, № 4, p. 302—330.
- Borth W. α_2 -Macroglobulin in connective tissue matrix metabolism.—*Collagen Rel. Res.*, 1984, v. 4, № 1, p. 83—95.
- Campbell B. C., Shepherd A. N., Reid J. L. Effects of the angiotensin converting enzyme inhibitor, captopril, in essential hypertension.—*Brit. J. Clin. Pharmacol.*, 1982, v. 13, № 2, p. 213—217.
- Carboxypeptidase B/Folk J. E., Pilz K. A., Garrol W. R., Grander J. A.—*J. Biol. Chem.*, 1960, v. 8, № 235, p. 2272—2280.
- Chan V., Lai C.-L., Chan T. K. Metabolism of antithrombin III in cirrhosis and carcinoma of the liver.—*Clin. Sci.*, 1981, v. 60, № 6, p. 681—688.
- Christensen U., Sottrup-Jensen L. Mechanism of α_2 -macroglobulin — proteinase interactions. Studies with trypsin and plasmin.—*Biochemistry*, 1984, v. 23, № 26, p. 6619—6626.
- Cochrane C. G., Griffin J. H. The biochemistry and pathophysiology of the contact system of plasma.—*Advanc. in Immunol.*, 1982, v. 33, p. 241—306.
- Cohen A. B., James H. L. Reduction of the elastase inhibitory capacity of alpha₁-antitrypsin by peroxides in cigarette smoke.—*Amer. Rev. Respirat. Dis.*, 1982, v. 126, № 1, p. 25—40.
- Collen D. On the regulation and control of fibrinolyses. E. Kowalski Memorial lecture.—*Thromb. Haemost.*, 1980, v. 43, № 2, p. 77—89.
- Collen D., De Cock F., Lijnen H. R. Biological and thrombolytic properties of proenzyme and active forms of human urokinase.—*Thromb. and Haemost.*, 1984, v. 52, № 1, p. 24—26.
- Congenital deficiency of α_2 -plasmin inhibitor/Yoshika K., Kamitsuji H., Takase T. et al.—*Haemostasis*, 1982, v. 11, № 3, p. 176—184.
- Contact activation of human plasma prorenin in vitro/Blumberg A. L., Sealey J. E., Atlas S. A. et al.—*J. Lab. and Clin. Med.*, 1981, v. 97, № 6, p. 771—778.
- Davie E. W., Fujikawa K., Kurachi K. Blood coagulation.—*Coll. Ges. Biol. Chem.*, 1979, v. 30, p. 233—237.
- Demonstration of renin activity in purified rat Leydig cells: evidence for the existence of an endogenous inactive (latent) form of enzyme/Pandey K. N., Melner M. H., Parmentier M., Inagami T.—*Endocrinology*, 1984, v. 115, № 5, p. 1753—1759.
- Deutsch D. G., Mertz E. T. Plasminogen: purification from human plasma by affinity chromatography.—*Science*, 1970, v. 170, № 3962, p. 1095—1096.
- Diagnostic and therapeutic problems associated with hereditary deficiency of the C₁-esterase inhibitor/Molina C., Brun J., Coulet M. et al.—*Clin. Allergy*, 1977, v. 7, № 2, p. 127—135.
- Diagnostic efficacy of newer synthetic-substrates methods for assessing coagulation variables: a critical over view/Fareed J., Messmore H. L., Walenga J. M., Bernus E. W.—*Clin. Chem.*, 1983, v. 29, № 2, p. 225—236.
- Edgington Th. S. Activation of the coagulation system in association with neoplasia.—*J. Lab. Clin. Med.*, 1980, v. 96 № 1, p. 1—4.

- Effect of natural protease inhibitors and a chemoattractant on tumor cell invasion in vitro*/Thorgeirsson U. P., Liotta L. A., Kalebic T. et al.— J. Nat. Cancer Inst., 1982, v. 69, № 5, p. 1049—1054.
- Elce I. S., Mc Intyre E. J.* Purification of bovine and human acrosin — Can. J. Biochem., 1982, v. 60, № 1, p. 8—14.
- Elevated serum cathepsin B₁-like activity in women with neoplastic disease*/Pietras R. J., Szego C. M., Mangan Ch. E. et al.— Gynecol. Oncol., 1979, v. 7, № 1, p. 1—17.
- Esnouf M. P.* Biochemistry of blood coagulation.— Brit. Med. Bull. Haemost., 1977, v. 33, № 3, p. 213—218.
- Evidence for a role of plasma kallikrein in the activation of prorenin*/Rumpf W., Becker K., Kreuzsch U. et al.— Nature, 1980, v. 283, № 5746, p. 482—483.
- Farbiszewski R., Worowski K.* Enzymy proteolityczne tkanek nowotworowych.— Post. Biochem., 1975, t. 21, № 4, s. 407—423.
- Фермилен Ж., Ферстрате М.* Гемостаз.— М.: Медицина, 1984.—187 с.
- Fibrinolysis*/Ed. Kline D. L., Reddy K. N. N.— CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, 1980.—243 p.
- Fibrinolysis associated with oncogenic transformation*/Ossowski L., Quigley J. P., Kellerman G. M., Reich E.— J. Exp. Med., 1973, v. 138, № 5, p. 1056—1064.
- Fibrinolysis-coagulation system in patients with cancer of the head and neck*/Kosugi T., Takagi J., Ariga Y. et al.— Arch. Otorhinolaryngol., 1982, v. 235, № 3, p. 211—215.
- Фибринолиз. Современные фундаментальные и клинические концепции*/Под ред. Гаффи П. Дж., Балкув-Улютина С.— М.: Медицина, 1982.—240 с.
- Fibrinolytic system in a patient with congenital deficiency of α_2 -plasmin inhibitor*/Aoki N., Sakata G., Natsuda M., Tateno K.— Blood, 1980, v. 55, № 3, p. 483—488.
- Foltefsen D. M.* Activation of heparin cofactor II heparin and dermatan sulphate — Nouv. Rev. Franc. Hematol., 1984, v. 26, № 4, p. 233—237.
- Fritz H., Wunderer G.* Biochemistry and applications of aprotinin, the kallikrein inhibitor from bovine organs.— Arzneim.— Forsch/Drug Res., 1983, v. 33, № 4, s. 479—494.
- Fritz H., Müller W., Henschen A.* Proteolysis and fertilization.— Coll. Ges. Biol. Chem., 1979, v. 30, p. 272—276.
- Garman A. J., Smith R. A.* The binding of plasminogen to fibrin: evidence for plasminogen bridging.— Thromb. Res., 1982, v. 27, № 3, p. 311—320.
- Goldberg A. R., Wolf B. A., Lefebvre P. A.* Plasminogen activators of transformed and normal cells.— In: Proteases and Biol. Contr. Cold. Spring. Harbor, 1975, p. 857—868.
- Greenbaum L. M.* Pepstatin, an inhibitor of acid kininogenase and ascites retardant in neoplastic disease.— Fed. Proc., 1979, v. 38, № 3, p. 2788—2791.
- Haber E.* Inhibitors of renin: present and future.— Clin — a. Exp. Hypertens., 1983, A 5, № 7—8, p. 1193—1205.
- Haberland G., McConn R.* A rationale for the therapeutic action of aprotinin.— Fed. Proc., 1979, v. 38, № 3, p. 2760—2767.
- Harpel P., Hugli T. E., Cooper N. R.* Structural features of abnormal C1-inactivator from a kindred with hereditary angioneurotic edema.— J. Clin. Invest., 1975, v. 55, № 3, p. 605—611.
- Heimbürger N.* The mechanism of blood coagulation and its control by proteinase — inhibitors.— In: Protease and Hormones. Els-North-Holland, Biomedical Press, 1979, p. 47—65.
- Human ureter, a source of tissue plasminogen activator*/Ljungner H., Astedt B., Bergqvist D., Pandolfi M.— Thromb. Res., 1984, v. 34, № 3, p. 217—224.
- Jackson K. W., Tang J.* Complete amino acid sequence of streptokinase and its homology with serine proteases.— Biochemistry, 1982, v. 21, № 26, p. 6620—6625.

- James K.* α_2 -Macroglobulin and its possible importance in immune systems.— Trends. Biochem. Sci., 1980, v. 5, № 2, p. 43—47.
- Kakkar V. V., Scully M. F.* Thrombolytic therapy.— Brit. Med. Bull., 1978, v. 34, № 2, p. 191—199.
- Kazal L. A.* Coagulation chemistry.— Clin. Biochem., 1982, № 2, p. 74—135.
- Koo P. H.* Human α_2 -macroglobulin: a major serum factor cytotoxic for tumor cells.— Cancer Lett., 1983, v. 18, № 2, p. 169—177.
- Kudrewicz-Hubicka Z., Gyganik A.* High level of serum antitrypsin as an early symptom of alcohol intoxication.— J. Clin. Chem. a. Clin. Biochem., 1981, v. 19, № 8, p. 740.
- Kurachi K., Davie E. W.* Human factor XI (Plasma thromboplastin antecedent).— Meth. Enzymol., 1981, v. 80, p. 211—220.
- Lage A., Diaz J. W., Gonzalez J.* Effect of proteinase inhibitor in experimental tumors.— Neoplasma, 1978, v. 25, № 2 p. 257—259.
- Landmann H.* Biochemistry of the factors of the fibrinolytic system.— Handbuch der experimentellen Pharmakologie. Springer-verlag: Berlin, Heidelberg, New York, 1978, v. 46, p. 3—48.
- Laurell A.-B.* The complement system.— Coll. Ges. Biol. Chem., 1979, v. 30, p. 223—232.
- McCaa R. E.* Studies in vivo with angiotensin I-converting enzyme (kininase II) inhibitors.— Fed. Proc., 1979, v. 38, № 13, p. 2783—2787.
- Moroi M., Travis J.* Amino acid sequence of the reactive site of human α_1 -antichymotrypsin.— J. Biol. Chem., 1983, v. 258, № 21, p. 12749—12752.
- Morse J. O.* Alpha₁-antitrypsin deficiency.— N. Engl. J. Med., 1978, v. 299, № 20, p. 1099—1105.
- Müllertz S.* The fibrinolytic system.— Scand. J. Haematol., 1979, v. 22, Suppl. 3, p. 15—23.
- Müllertz S.* The primary plasmin—inhibitor, α_2 -plasmin inhibitor or α_2 -antiplasmin.— In: The physiological inhibitors of coagulation and fibrinolysis (Ed. D. Collen et al.). Els.—/North-Holland, Biomedical Press, 1979, p. 87—101.
- Nakayasu T., Nagasawa S.* Studies on human kininogens.— J. Biochem., 1979, v. 85, № 1, p. 249—258.
- Nagy B., Ban J., Brdar B.* Fibrinolys associated with human neoplasia: production of plasminogen activator by human tumours.— Int. J. Cancer, 1977, v. 19, № 5, p. 614—620.
- Nasjletti A., Malik K. U.* Relationships between the kallikrein-kinin and prostaglandin system.— Life Sci., 1979, v. 25, № 2, p. 99—110.
- Neutral proteinase inhibitors and antimetastatic effects in mice/Giraldi T., Sava G., Kopitaz M. et al.*— Eur. J. Cancer, 1980, v. 16, № 4, p. 449—454.
- Ogston D., Bennett B.* Surface-mediated reactions in the formation thrombin, plasmin and kallikrein.— Brit. Med. Bull., 1978, v. 34, № 4, p. 107—112.
- Ondetti M. A., Cushman D. W.* Enzyme of the renin-angiotensin system and their inhibitors.— Ann. Rev. Biochem., 1982, v. 51, p. 283—308.
- Polakoski K. L., Parrish R. F.* Boar proacrosin.— J. Biol. Chem., 1977, v. 252, № 6, p. 1888—1894.
- Porter R. R.* The proteolytic enzymes of complement system.— Meth. Enzymol., 1981, v. 80, p. 3—5.
- Primary structure of human α_2 -macroglobulin. The complete structure/Sottrup-Jensen L., Stepanic T. M., Kristensen T. et al.*— J. Biol. Chem., 1984, v. 259, № 13, p. 8318—8327.
- Prothrombin/Mann K. G., Elion J., Butkowski K. J. et al.*— Meth. Enzymol., 1981, v. 80, p. 286—302.
- Raymond Ng., Kellen J. A.* The role plasminogen activators in metastasis.— Medical Hypotheses, 1983, v. 10, p. 291—293.
- Revak S. D., Cochrane C. G.* Hageman factor: its structure and modes of activation.— Thromb. a. Haemost., 1976, v. 35, № 3, p. 570—575.

- Sharp J. L.* The current of α_1 -antitrypsin, a protease inhibitor, in gastrointestinal disease.— *Gastroenterol.*, 1976, v. 70, № 4, p. 611—621.
- Sim R. B.* The first component of human complement — C₁.— *Meth. Enzymol.*, 1981, v. 80, p. 6—16.
- Sim R. B.* The human complement system serine proteases C1r and C1s and their proenzymes.— *Meth. Enzymol.*, 1981a, v. 80, p. 26—42.
- Slater E. E.* Renin.— *Meth. Enzymol.*, 1981, v. 80, p. 427—442.
- Sloane B. F., Dunn J. R., Houn K. V.* Lysosomal cathepsin A: correlation with metastatic potential.— *Science*, 1981, v. 212, № 4499, p. 1151—1153.
- Steinbuch M.* Regulation of proteinase activity.— *Coll. Ges. Biol. Chem.*, 1979, v. 30, p. 207—222.
- Stewart T. A., Weare J. A., Erdös E. G.* Human peptidyl dipeptidase (converting enzyme, kininase II).— *Meth. Enzymol.*, 1981, v. 80, p. 450—460.
- Studies* on a complex mechanism for the activation of plasminogen by kaolin and by chloroform; the participation of Hageman factor and additional cofactors/Ogston D., Ogston C. M., Ratnoff O. D., Forbes C. D.— *J. Clin. Invest.*, 1969, v. 48, № 10, p. 1786—1801.
- Studies* on plasma antiplasmin activity using a new plasmin specific chromogenic tripeptide substrate/Gallimore M. J., Amundsen E., Aasen A. O. et al.— *Thromb. Res.*, 1979, v. 14, № 1, p. 51—60.
- Studies* on plasma inhibitors of plasma kallikrein using chromogenic peptide substrate assays/Gallimore M. J., Amundsen T., Larsbraaten M. et al.— *Thromb. Res.*, 1979, v. 16 № 5/6, p. 695—703.
- Synthesis* in yeast of a functional oxidation-resistant mutant of human α_1 -antitrypsin/Rosenberg S., Barr J. B., Najarian R. C., Hallelwell R. A.— *Nature*, 1984, v. 312, № 5989, p. 77—80.
- Tarin D., Hayt B. J., Evans D. J.* Correlation of collagenase secretion with metastatic-colonization potential in naturally occurring murine mammary tumours.— *Brit. J. Cancer*, 1982, v. 46, p. 266—278.
- Thaler E.* Antithrombin III. Physiologic und Klinische Bedeutung.— *Gelben H.*, 1979, t. 19, Hf. 4, s. 145—154.
- The kallikrein-kinin system: a functional role of plasma kallikrein and kininogen in blood coagulation/Iwanaga S., Kato H., Sugo T. et al.*— *Coll. Ges. Biol. Chem.*, 1979, v. 30, p. 243—259.
- Travis J., Moroi M.* Human α_1 -antichymotrypsin.— *Meth. Enzymol.*, 1981, v. 80, p. 765—771.
- Travis J., Salvesen G. S.* Human plasma proteinase inhibitors.— *Ann. Rev. Biochem.*, 1983, v. 52, p. 655—709.
- Van Leuven F. V.* Human α_2 -macroglobulin: structure and function.— *Trends Biochem. Sci.*, 1982, v. 52, p. 185—187.
- Vogt W.* Substrate modulation as a control mechanism of plasma multienzyme systems.— *Coll. Ges. Biol. Chem.*, 1979, v. 30, p. 233—237.
- Wallach D. F. H.* Some biochemical anomalies that can contribute to the malignant behavior of cancer cells.— *J. Mol. Med.*, 1976, v. 1, № 2, p. 97—107.
- Wiman B.* Human α_2 -antiplasmin.— *Meth. Enzymol.* 1981, v. 80, p. 395—408.
- Wiman B., Nilsson T.* A new simple method for determination of C1-esterase inhibitor activity in plasma.— *Clin. Chim. Acta*, 1983, v. 128, № 213, p. 359—366.
- Worowski Kr.* Biologiczne znaczenie ograniczonej proteolizy.— *Post. Hig. Med. Dósw.*, 1975, t. 29, № 5, s. 619—664.
- Zbytniewski Z., Kanclerz A.* Inhibitory proteaz w medycynie.— *Post. Hig. Med. Dósw.*, 1977, t. 31, № 3, s. 393—407.

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АКТГ — кортикотропин
 β_1 -АК — β_1 -антиколлагеназа
 α_2 -АП — α_2 -антиплазмин
 α_1 -АХ — α_1 -антихимотрипсин
 α_1 -ИП — α_1 -ингибитор протеиназ
 α -ИЦП — α -ингибитор цистеиновых протеиназ
 α_2 -М — α_2 -макроглобулин
 α -МСГ — меланоцитостимулирующий гормон
АТ III — антитромбин III
БА — N-бензоил-L-аргинин
БАЭЭ — N-бензоил-L-аргинин этиловый эфир
БАПНА — N-бензоил-DL-аргинин-p-нитроанилид
 β -ЛПГ — β -липотропин
ВМК — высокомолекулярный кининоген
ГЛ — гиппурил-L-лизин
Глу-П — Глу-плазмин
Глу-Пг — Глу-плазминоген
ГК — гиппуровая кислота
ГК II — гепариновый кофактор II
ДВС — диссеминированное внутрисосудистое свертывание
ДФФ — диизопропилфторфосфат
И- α -ИТ — интер- α -ингибитор трипсина
ИПС — ингибитор протеиназ С
КСИ — кислотостабильные ингибиторы
Лиз-П — Лиз-плазмин
Лиз-Пг — Лиз-плазминоген
ЛСУ — лизинсвязывающие участки
ЛУ — лизиновые участки
п-НФГБ — паранитрофениловый эфир гуанидинбензойной кислоты
ПОМК — проопиомеланокортин
СК — стрептокиназа
ТАМЭ — N-тозил-L-аргинин метиловый эфир
ФХ — неактивная форма фактора Хагемана (XII фактор свертывания крови)
ФХа — активная форма ФХ (XIIa)
 β -ФХа — XII i
ХЗФА — Хагеман-зависимая фибринолитическая активность
СИ — СИ-инактиватор
 ϵ -АКК — ϵ -аминокапроновая кислота
ЭДТА — этилендиаминтетраацетат

СОДЕРЖАНИЕ

ОТ АВТОРОВ	3
ГЛАВА I ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОГРАНИЧЕННОГО ПРОТЕОЛИЗА	6
протеиназы в образовании активных форм ферментов и гормонов	6
роль ограниченного протеолиза в образовании протеолитических систем крови	16
Протеиназы в процессе свертывания крови	16
Протеиназы и фибринолитическая система	33
Протеолитические ферменты кининовой системы крови	51
Роль протеолиза в активации комплемента	57
Протеиназы ренин-ангиотензиновой системы	65
Взаимосвязь протеолитических систем крови	73
ГЛАВА II БЕЛКОВЫЕ ИНГИБИТОРЫ — РЕГУЛЯТОРЫ ПРО- ЦЕССОВ ПРОТЕОЛИЗА	78
сывороточные ингибиторы протеиназ и их роль в норме и при патологии	78
α_1 -Ингибитор протеиназ	79
Антитромбин III	89
α_2 -Макроглобулин	98
α_2 -Антиплазмин	112
C1-инактиватор	117
α_1 -Антихимотрипсин	119
Другие ингибиторы протеиназ крови	121
тканевые ингибиторы протеолитических ферментов	122

ГЛАВА III	
ПРОТЕИНАЗЫ, ИХ АКТИВАТОРЫ И ИНГИБИТОРЫ	
В ПАТОГЕНЕЗЕ И ЛЕЧЕНИИ НЕКОТОРЫХ ЗАБОЛЕ-	
ВАНИЙ	128
ПРОТЕОЛИЗ И БРОНХОЛЕГОЧНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ	128
РОЛЬ ПРОТЕИНАЗ И ИХ ИНГИБИТОРОВ В ЗЛОКАЧЕ-	
СТВЕННОМ РОСТЕ	135
ПРОТЕИНАЗЫ И ИХ АКТИВАТОРЫ КАК ТРОМБОЛИТИ-	
ЧЕСКИЕ СРЕДСТВА	152
ГЛАВА IV	
МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ПРОТЕОЛИ-	
ТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ И ИХ ИНГИБИТОРОВ В	
ПЛАЗМЕ (сыворотке) КРОВИ	163
МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕР-	
МЕНТОВ В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ	163
МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СЫВОРОТОЧНЫХ ИНГИБИТО-	
РОВ ПРОТЕОЛИЗА	173
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ХРОМОГЕННЫХ СУБСТРАТОВ ДЛЯ	
ОПРЕДЕЛЕНИЯ СЫВОРОТОЧНЫХ ПРОТЕИНАЗ И ИХ	
ИНГИБИТОРОВ	181
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	188
СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ	197

Монография

ВЕРЕМЕЕНКО КУЗЬМА НИКИТОВИЧ
ГОЛОБОРОДЬКО ОЛЬГА ПЕТРОВНА
КИЗИМ АЛЕКСАНДРА ИОСИФОВНА

**ПРОТЕОЛИЗ
в норме
и при патологии**

Зав. редакцией *Л. И. Евсева*
Редактор *Л. И. Богова*
Художник обложки *В. А. Лях*
Художественный редактор *Г. М. Кондрагова*
Технический редактор *Ж. Н. Головки*
Корректоры *В. И. Коваль,*
Г. Я. Малацай

ИБ № 3616

Сдано в набор 08.07.87. Подп. к печ. 01.02.88. БФ 05043.
Формат 60×84_{1/16}. Бумага тип. № 1. Гарн. лит. Печ. высо-
кая. Усл. печ. л. 11,63. Усл. кр.-отт. 11,63. Уч.-изд. л. 13,58.
Тир. 2300 экз. Зак. 7-2101. Цена 3 р.

Издательство «Здоровья», 252601, ГСП, Киев-1, ул. Ча-
лова, 65.

Главное предприятие республиканского производствен-
ного объединения «Полиграфкнига», 252057, г. Киев-57,
ул. Довженко, 3.

