

УДК 612.115;612.112.5

## ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ ЦИСТЕИНОВЫХ ПРОТЕИНАЗ НА ТРОМБОЦИТАРНОЕ И ПЛАЗМЕННОЕ ЗВЕНЬЯ СИСТЕМЫ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ

© 2009 г. Я. Н. Котова<sup>1\*</sup>, Е. А. Костанова<sup>2</sup>, М. А. Розенфельд<sup>2</sup>, Е. И. Синауридзе<sup>1,3</sup>,  
М. А. Пантелеев<sup>1,3</sup>, Ф. И. Атауллаханов<sup>1,3,4</sup>

<sup>1</sup>Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН,  
117977 Москва ГСП-1, ул. Косыгина, д. 4, @\*электронная почта: janakoo@yandex.ru

<sup>2</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эммануэля РАН, 119334, Москва, ул. Косыгина, д. 4

<sup>3</sup>Гематологический научный центр РАМН, 125167 Москва, Новозыковский проезд, д. 4а,

<sup>4</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва

Поступила в редакцию 06.05.2009 г.

Фактор XIIIa играет важную роль в стабилизации сгустка в реакциях свертывания крови. Недавно обнаружено, что он влияет на формирование “укутанных” тромбоцитов, которые являются сильно прокоагулянтными и характеризуются образованием после активации на внешней мембране клеток фосфатидилсерина и плотного слоя из альфа-гранулярных белков. Недавно открыты новые ингибиторы цистеиновых протеиназ (ИЦП) растительного происхождения, способные воздействовать на тиоловую группу активного центра фактора XIIIa. Изучено влияние ИЦП на образование “укутанных” тромбоцитов и на работу плазменного звена свертывания крови. Показано, что при активации тромбоцитов ИЦП дозозависимо снижают долю “укутанных” тромбоцитов в общей популяции, а также приблизительно на 40% снижают эндогенный тромбиновый потенциал (ЭТП) в тесте генерации тромбина как в богатой, так и в обедненной тромбоцитами плазме. Такое снижение ЭТП невозможно объяснить действием ИЦП на фактор XIIIa. Изучение влияния этих ингибиторов на активность фактора Ха и тромбина в чистой системе показало, что ИЦП дозозависимо ингибируют действие фактора Ха и тромбина, что и может служить причиной снижения ЭТП. Таким образом, установлено, что ИЦП влияют как на тромбоцитарное, так и на плазменное звено свертывания.

**Ключевые слова:** тромбоциты, плазменное звено свертывания, ингибиторы.

Свертывание крови представляет собой сложную систему биохимических реакций, основной функцией которой является предотвращение кровопотери путем формирования фибринового сгустка в месте повреждения сосуда.

В гемостатической реакции человека принимают участие ткань, окружающая сосуд, стенка сосуда, плазменные факторы свертывания и клетки крови, в первую очередь тромбоциты. При активации тромбоцитов нарушается асимметричность мембранного бислоя клеток, на их поверхности появляется фосфатидилсерин, фосфолипид, который в норме на внешнем слое мембраны не встречается. Поверхность становится прокоагулянтной: на ней начинают собираться прокоагулянтные комплексы свертывания [1].

Было обнаружено, что активация приводит к возникновению различных по способности усиливать свертывание субпопуляций тромбоцитов. Активация тромбином с коллагеном либо тромбином с конвульксином (агонист коллагенового

рецептора гликопротеина VI) приводит к образованию субпопуляции клеток, называемых “укутанными” тромбоцитами, которые характеризуются тем, что сохраняют на своей поверхности высокие уровни альфа-гранулярных белков, а также экспрессируют поверхностный фосфатидилсерин и поддерживают протромбиназную активность [2, 3].

В реакциях свертывания участвует также плазменный фактор XIII (фибрин-стабилизирующий фактор), трансглутаминаза, которая катализирует образование  $\epsilon$ -( $\gamma$ -глутамил)-лизиновых сшивок между фибриновыми нитями. Активированный фактор XIII (фактор XIIIa) играет важную роль в стабилизации сгустка и препятствует его физическому и фибринолитическому разрушению [4].

Было показано, что приблизительно половина циркулирующего в крови фактора XIIIa содержится в цитоплазме тромбоцитов [5] и выделяется, по-видимому, в ходе активации клеток. Тром-

боцитарный фактор XIIIa увеличивает степень фибриновой сшивки и резистентность фибрина к деградации плазмином [6]. Г.Л. Дейл и соавт. [3] показали, что фактор XIIIa влияет на формирование “укутаных” тромбозов. Это может предполагать роль данной трансглутаминазы в увеличении прокоагулянтных поверхностей в месте повреждения, а, следовательно, в ускорении процесса свертывания.

В ходе работы системы свертывания иногда возникают патологические ситуации, которые требуют для своей коррекции участия ингибиторов свертывания крови. Недавно из клубней картофеля выделили новые ингибиторы цистеиновых протеиназ (ИЦП), способные подавлять ферментативную активность плазменного фактора XIIIa. Эти ингибиторы обладают способностью как модифицировать молекулы мономера фибрина в результате влияния на полимеризационные центры, так и воздействовать на активный центр фактора XIIIa, что приводит к снижению или отсутствию сшивок между нитями фибрина [7].

Следует отметить, что специфических ингибиторов фактора XIIIa очень мало [8]. Не совсем ясна роль тромбоцитарного фактора XIIIa в ходе активации тромбоцитов. Нет сильных специфических ингибиторов плазменного фактора XIIIa, который играет роль в стабилизации сгустка. Все это делает очень интересной и разработку новых ингибиторов плазменного и тромбоцитарного фактора XIIIa, и исследование их влияния на все звенья системы свертывания.

Целью нашей работы было исследование влияния недавно открытых ИЦП из клубней картофеля на появление гетерогенности в популяции тромбоцитов при активации и на плазменное звено свертывания крови.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Материалы.** В работе были использованы: тромбин (“Haematologic Technologies”, США; “Roche”, Франция); конвульксин (“Pentapharm”, Швейцария); простагландин E1 (“MP Biochemicals”, США); R-фиикоэритрин(PE)- и флуоресцеин(FITC)-конъюгированный аннексин V (“Molecular Probes”, США); папаин (“Merck”, Германия); тромбопластин (“РЕНАМ”, Россия); S<sub>2765</sub> (фирмы “Chromogenix”, Италия). Тромбин-специфичный флуорогенный субстрат (BOS-Ile-Gly-Arg-AMC) синтезирован в Институте медицинской и биологической химии РАН. Остальные реагенты были фирмы “Sigma” (США).

**Получение фактора XIIIa.** Фактор XIII был выделен из бычьей крови по методу Лоранда и соавт. [9]. Фактор XIII переводили в активную форму (фактор XIIIa), добавляя к проферменту тромбин с активностью 15 НИН/мл до конечной кон-

центрации в реакционной смеси 7.5 НИН/мл. Смесь инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Остатки тромбина убирали добавлением антитромбин III-гепариновой смеси.

**Выделение ингибиторов цистеиновых протеиназ (ИЦП).** ИЦП получены из клубней картофеля сорта “Истринский” урожая 2007 года по методике, описанной в работе Е.А. Костановой и соавт. [7]. Активность ИЦП определяли по отношению к цистеин-содержащей протеиназе папаину. При этом смеси, содержащие постоянное количество папаина и различные количества ИЦП (общий объем 1 мл), инкубировали в течение 10 мин при 37°C в 50 мМ М трис-НСI-буфере (рН 8.0) в присутствии L-цистеина и EDTA в конечной концентрации 5 и 2 мМ соответственно. Затем в пробы вносили по 1 мл субстрата (1% казеин по-Гаммерстену) и определяли остаточную протеолитическую активность папаина по отношению к исходной активности папаина в контроле с помощью модифицированного метода Кунитца [10].

**Измерение активности ИЦП.** Активность выделенных ИЦП измеряли по влиянию данных препаратов на степень ковалентного сшивания казеина в присутствии фактора XIIIa в стандартной концентрации. Казеин получали из обезжиренного коровьего молока по методу Д.Т. Давиева и соавт. [11]. Реакцию сшивания проводили в течение 20 мин при 37°C в 50 мМ трис-НСI-буфере, содержащем 150 мМ NaCl и 50 мМ CaCl<sub>2</sub> (рН 7.4). При этом к 50 мкл 1% раствора казеина добавляли по 10 мкл исходного активированного фактора XIIIa (1.6 ед./мл), либо того же фактора, предварительно инактивированного путем инкубации при 37°C в течение 30 мин с ИЦП различной концентрации (в весовых соотношениях фактор XIIIa : ИЦП 1 : 0.3; 1 : 0.7; 1 : 1; 1 : 1.5). Реакцию останавливали добавляя к пробе смеси 2% додецилсульфата натрия (ДСН) и 5% β-меркаптоэтанол. Степень перекрестного сшивания полипептидных цепей казеина определяли в восстановленных образцах методом ДСН-электрофореза в 12.5% полиакриламидном геле [12].

Казеин не является специфическим субстратом для фактора XIIIa. Однако установлено [13–16], что β-казеин и некоторые его производные являются хорошими субстратами для фактора XIIIa.

На рис. 1 приведены результаты электрофоретического анализа способности ИЦП, которые представляют собой смесь белков, выделенных из клубней картофеля с помощью аффинной хроматографии, подавлять действие фактора XIIIa. Видно, что под влиянием фактора XIIIa, ингибированного в разной степени ИЦП, замедляется процесс ковалентного сшивания полипептидных цепей казеина (рис. 1, дорожка 3 – контроль, 4–7 –

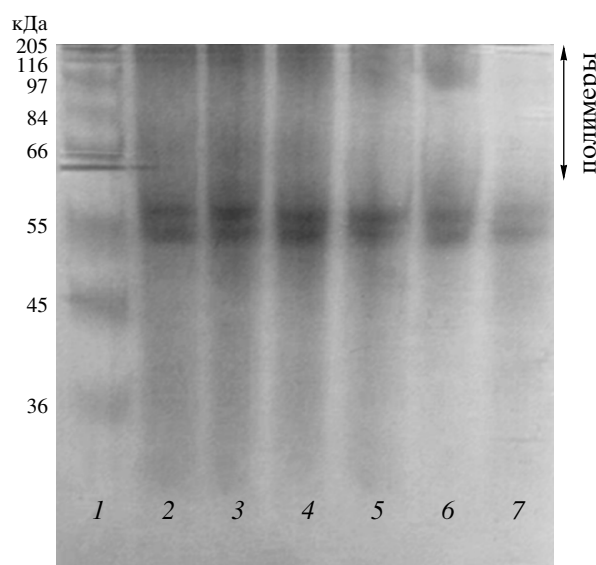
добавление ИЦП). При этом образование полимеров уменьшается или полностью отсутствует при повышении весовых концентраций ИЦП (рис. 1, дорожки 4–7). Это указывает на специфическое взаимодействие ингибиторов с активным центром фактора XIIIa, которое приводит к снижению активности фермента по отношению к неспецифическому субстрату казеину.

**Получение бедной и обогащенной тромбоцитами плазмы.** Плазму получали из крови здоровых доноров, заготовленной на 3.8% растворе цитрата натрия (111 мМ цитрат натрия, pH 5.5). Соотношение кровь : цитрат составляло 9 : 1. Для получения обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП) кровь центрифугировали при 100 g и комнатной температуре в течение 8 мин. Бедную тромбоцитами плазму (БТП) получали центрифугированием исходной крови при 1300 g и комнатной температуре в течение 15 мин.

**Выделение тромбоцитов.** Тромбоциты выделяли из обогащенной тромбоцитами плазмы. При этом для предотвращения активации тромбоцитов в исходную кровь добавляли простагландин E1 (1 мкМ) и апиразу (0.1 ед/мл). После центрифугирования крови отбирали слой плазмы (ОТП) и, чтобы предотвратить агрегацию клеток, добавляли в нее 3.8% раствор цитрата натрия (111 мМ цитрат натрия, pH 5.5) (в соотношении плазма : цитрат = 3 : 1). Тромбоциты концентрировали центрифугированием при 400 g в течение 5 мин при комнатной температуре, ресуспендировали в 300 мкл буфера А (20 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.4 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 мМ глюкозы, 0.5% бычий сывороточный альбумин, pH 7.4) и очищали от белков плазмы с помощью гель-хроматографии на колонке (ширина × высота = 1 × 6 см) с сефарозой CL-2B, заполненной буфером А.

**Определение влияния ингибиторов цистеиновых протеиназ на формирование гетерогенности тромбоцитов при активации.** Гель-фильтрованные тромбоциты в концентрации 20 тыс/мкл активировали в течение 15 мин при комнатной температуре в отсутствие (контроль) или в присутствии разных концентраций ИЦП (0.05; 0.1; 0.2; 0.4 мг/мл). Клетки активировали в буфере А в присутствии 2.5 мМ CaCl<sub>2</sub> и 0.2% флуоресцентно меченного аннексина V, добавляя: 1) 10 нМ тромбина с 10 нг/мл конвульксина; 2) 100 нМ тромбина или 3) 100 нг/мл конвульксина. Степень активации (по количеству связанного флуоресцентно меченного аннексина V) анализировали на проточном флуориметре Becton Dickinson (США), используя программу WinMDI 2.8 (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, США).

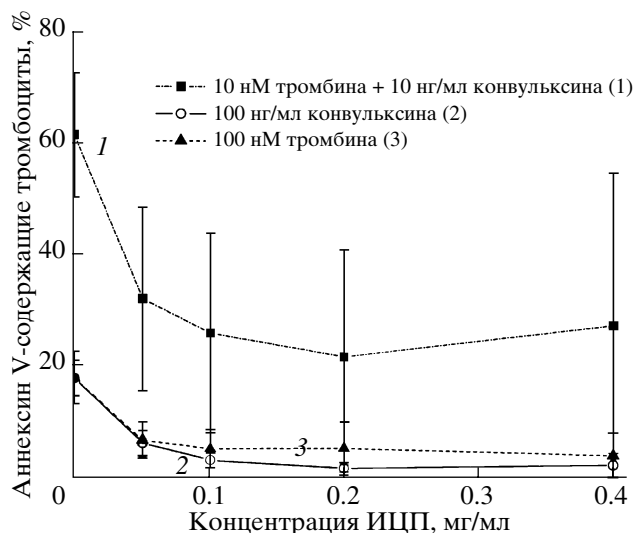
**Тест генерации тромбина.** Влияние ИЦП на плазменное звено свертывания изучали с помощью теста генерации тромбина, который измеря-



**Рис. 1.** Электрофореграмма восстановленных образцов продуктов реакции сшивания казеина под действием фактора XIIIa в присутствии различных концентраций ИЦП: 1 – белковые маркеры; 2 – исходный казеин; 3 – казеин с добавленным фактором XIIIa; 4, 5, 6, 7 – казеин с добавленным фактором XIIIa (исходная концентрация 1.6 стандартных ед/мл) в присутствии различных концентраций препарата ИЦП (весовые соотношения фермент : ингибитор – 1 : 0.3; 1 : 0.7; 1 : 1 и 1 : 1.5).

ет суммарное количество тромбина, образовавшегося в образце в ответ на стандартную рекальцификацию и активацию. Кинетику генерации тромбина в плазме измеряли, непрерывно регистрируя расщепление медленного флуорогенного субстрата (BOC-Ile-Gly-Arg-AMC) тромбином, образующимся в ходе свертывания. В основу методики положены работы [17, 18].

Измерения проводили следующим образом. В лунки 96-луночного планшета помещали по 90 мкл нормальной донорской плазмы (БТП), 10 мкл раствора ИЦП в буфере, содержащем 20 мМ HEPES и 140 мМ NaCl (pH 7.5), и по 10 мкл раствора флуорогенного субстрата (исходная концентрация 5 мМ). Образцы в планшете прогревали в течение 5 мин при 37°C, после чего во все лунки одновременно (многоканальной пипеткой) вносили по 25 мкл раствора активатора свертывания. Активатором служил раствор тромбопластина, приготовленный из его стандартного реагента для измерения протромбинового времени (ПВ), разбавленный в 250 раз тем же буфером, содержащим дополнительно 90 мМ CaCl<sub>2</sub>. Момент внесения активатора служил началом отсчета. Кинетику накопления флуоресцирующего продукта реакции аминотилкусарина (AMC) записывали на протяжении 120 мин с помощью флуориметрического ридера Fluoroscan II (“Lab-System”, Финляндия) ( $\lambda_{\text{возб}} = 380 \text{ нм}$ ;  $\lambda_{\text{исп}} = 440 \text{ нм}$ ).



**Рис. 2.** Влияние ИЦП на образование “укутанных” тромбоцитов. Активацию тромбоцитов проводили: 1 – тромбином (10 нМ) в присутствии конвульксина (10 нг/мл); 2 – конвульксином (100 нг/мл); 3 – тромбином (100 нМ). Представлены средние величины  $\pm$  стандартные отклонения ( $n = 4$ ). Данные статистически значимы при  $P < 0.05$ .

Полученные результаты усредняли по двум параллельным пробам. Ошибка параллельных измерений не превышала 2–5%. Скорость накопления продукта в каждый момент времени пропорциональна концентрации тромбина в плазме в данный момент. Таким образом, продифференцировав кривую накопления АМС, можно получить зависимость концентрации тромбина в системе от времени и затем определить параметры, характеризующие эту кривую. Условные единицы флуоресценции для каждого образца были переведены в абсолютные концентрации АМС с помощью калибровки сигнала по величинам сигналов известных концентраций АМС в данных образцах плазмы. Линейность метода в широком диапазоне концентраций АМС была проверена предварительно. Суммарное количество тромбина, образовавшегося в пробе за 120 мин (эндогенный тромбиновый потенциал, ЭТП), рассчитывали, определяя площадь под кривой зависимости концентрации тромбина в пробе от времени. Кроме того, были определены следующие параметры кривой генерации тромбина: максимальная концентрация тромбина, достигаемая в пробе ( $A_{\max}$ ), время достижения этой максимальной концентрации ( $t_{\max}$ ) и лаг-период до начала взрывного образования тромбина, за которое условно принимали время, необходимое для достижения тромбином концентрации 5 нМ ( $t_{\text{лаг}}$ ).

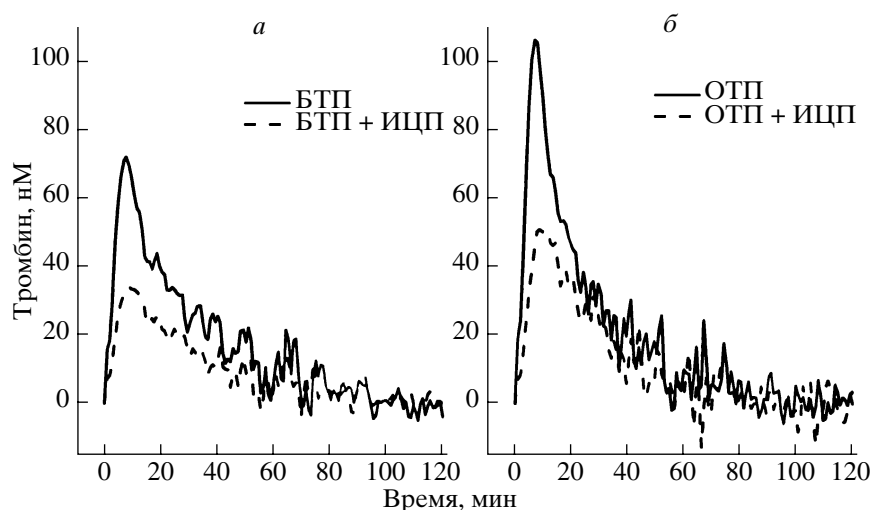
**Исследование влияния ИЦП на активность тромбина и фактора Ха.** Тромбин (10 нМ) или фактор Ха (5 нМ) инкубировали в буфере А в

присутствии разных концентраций ИЦП (0; 0.05; 0.1; 0.2; и 0.4 мг/мл) в течение 10 мин при 37°C. Затем в пробы добавляли специфичный хромогенный субстрат для тромбина (Chromozym TH) или для фактора Ха ( $S_{2765}$ ) и измеряли начальную скорость реакции гидролиза субстрата по увеличению оптической плотности раствора при длине волны 405 нм. Измерения проводили при 37°C в течение 30 мин с помощью планшетного фотометрического ридера Thermomax (“Molecular Devices”, США). Степень ингибирования каждого из ферментов оценивали как снижение скорости гидролиза (в %) по отношению к скорости гидролиза соответствующего субстрата в отсутствие ИЦП, которая была принята за 100%.

Статистический анализ проводили в программе OriginPro 7.5, критерий Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Влияние ИЦП на образование “укутанных” тромбоцитов.** Вопрос о том, как фактор XIIIa влияет на долю “укутанных” клеток при активации тромбоцитов, в настоящее время до конца не решен. Так показано [3], что присутствие фактора XIIIa увеличивает эту долю, тогда как в работе [19] обнаружено, что он не играет никакой роли в образовании гетерогенности тромбоцитов. Мы предположили, что если фактор XIIIa действительно увеличивает долю “укутанных” тромбоцитов, то можно ожидать, что его ингибиторы должны влиять на возникающую при активации гетерогенность популяции тромбоцитов, снижая долю “укутанных” тромбоцитов. В своей работе мы использовали ИЦП, выделенные из клубней картофеля, которые, как показано ранее [7], а также в нашей работе (рис. 1), снижают ферментативную активность фактора XIIIa. Необходимо отметить, что использованный препарат ингибиторов еще недостаточно очищен и, возможно, представляет собой смесь нескольких белков, содержащихся в исходном материале. “Укутанные” тромбоциты определяли как популяцию клеток с высоким содержанием прокаогулянтного фосфатидилсерина на поверхности. Эти клетки эффективно связывают флуоресцентно меченный аннексин V, что позволяет количественно оценить долю “укутанных” клеток в популяции с помощью проточной цитометрии. Показано, что в присутствии различных концентраций препарата ИЦП при активации отмытых клеток разными агонистами доля “укутанных” тромбоцитов снижается дозозависимо (рис. 2). При максимальной использованной в опытах концентрации ингибитора, которая составляла 0.4 мг препарата ИЦП/мл, количество “укутанных” тромбоцитов уменьшалось в присутствии различных активаторов в 2–10 раз по сравнению с контролем. При этом при совместной активации клеток тромби-



**Рис. 3.** Влияние ИЦП (0.15 мг/мл) на величины эндогенного тромбинового потенциала в богатой и обедненной тромбоцитами плазме. Приведены характерные кривые, полученные в одном из экспериментов.

ном с конвульксином полумаксимальный эффект наблюдали при концентрации ИЦП, равной 0.1 мг/мл, тогда как при отдельной активации тромбоцитов тромбином или конвульксином полумаксимальный эффект достигался при концентрации ИЦП 0.05 мг/мл. Таким образом, можно говорить о том, что ингибирующий эффект ИЦП приводит к снижению доли “укутанных” тромбоцитов, а следовательно, и доли прокоагулянтных поверхностей в ходе свертывания крови. Поскольку мы использовали отмытые тромбоциты, т.е. в системе отсутствовали белки плазменного звена свертывания, эффект ИЦП в данном случае можно объяснить только влиянием выделенных ингибиторов на тромбоцитарный фактор XIIIa.

**Влияние ИЦП на плазменное звено свертывания.** Фактор XIII играет важную роль в плазменном свертывании, стабилизируя образующийся сгусток с помощью сшивок между волокнами полимеризованного фибрина. Присутствие специфических ингибиторов фактора XIIIa не должно сказываться на процессах образования тромбина при активации свертывания в системе. Таким образом, чтобы характеризовать возможную чистоту и специфичность использованных в работе

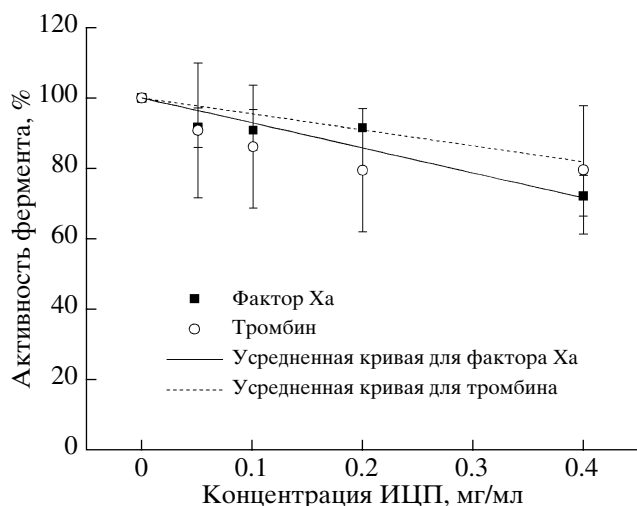
ИЦП, было интересно изучить, как влияют данные ингибиторы на свертывание в плазме.

Для описания интегрального состояния системы свертывания мы использовали тест генерации тромбина (ЭТП). Этот тест позволяет характеризовать кинетику генерации тромбина и измерить суммарное количество этого ключевого фермента свертывания, образующегося в образце плазмы в ответ на стандартную активацию. Генерация тромбина была измерена в отсутствие и в присутствии ИЦП как в бедной (БТП), так и в обогащенной тромбоцитами плазме (ОТП). Полученные результаты представлены на рис. 3 и в таблице. Оказалось, что присутствие ИЦП в концентрации примерно 0.15 мг/мл снижает производство тромбина (ЭТП) примерно на 40% как в БТП, так и в OTP. Параллельно снижались максимальные концентрации тромбина, достигаемые в пробах в ходе измерения ( $A_{max}$ ), и удлинялось время до достижения этих максимальных концентраций ( $t_{max}$ ) и до начала взрывного образования тромбина ( $t_{нар}$ ) (см. таблицу). Таким образом, все измеряемые параметры теста генерации тромбина свидетельствовали об ослаблении свертывания в присутствии ИЦП. Поскольку влияние пре-

Влияние ингибиторов цистеиновых протеиназ (ИЦП) на генерацию тромбина

Образец	ЭТП, нМ мин	$t_{max}$ , мин	$A_{max}$ , нМ	$t_{5нМ}$ , мин	Снижение ЭТП, %
БТП	2027.6	7.93	71.88	0.39	–
БТП + ИЦП (0.154 мг/мл)	1165.7	8.88	34.33	0.78	42.5
ОТП	2355.3	6.97	106.05	0.33	–
ОТП + ИЦП (0.150 мг/мл)	1437.2	10.75	51.07	0.78	39.0

Примечание. БТП – бедная тромбоцитами плазма, OTP – обогащенная тромбоцитами плазма, ЭТП – эндогенный тромбиновый потенциал.



**Рис. 4.** Снижение активностей тромбина и фактора Ха в присутствии различных концентраций препарата ИЦП. Реакции проводили в буферных системах в присутствии специфичных хромогенных субстратов. Представлены усредненные величины ( $\pm$  среднеквадратичные отклонения), полученные в трех независимых экспериментах. #  $P < 0.05$  для данных фактора Ха.

парата ингибиторов на тромбиновый потенциал оказалось примерно одинаковым в плазме, содержащей различные количества тромбоцитов, можно было предположить, что подавление свертывания связано в данном случае не с действием исследуемых ингибиторов на тромбоциты, а с их непосредственным влиянием на ферменты плазменного звена коагуляции.

Для обнаружения точек возможного влияния ИЦП в плазменном звене свертывания мы отдельно проверили, как ИЦП влияет на активность тромбина и фактора Ха в чистой буферной системе в присутствии специфичных хромогенных субстратов. Полученные результаты представлены на рис. 4. В обоих случаях ИЦП дозозависимо ингибировал активность этих ферментов. Ингибирование тромбина составило 10% при максимальных использованных концентрациях ИЦП (0.4 мг/мл) и не было достоверно значимым, тогда как ингибирование фактора Ха при той же концентрации ИЦП составляло примерно 30% и было достоверно значимым (рис. 4). Поскольку активированный фактор X входит в состав протромбиназного комплекса, подавление его активности, а также ингибирование самого тромбина, пускай и слабое, может быть причиной снижения генерации тромбина (ЭТП) в присутствии ИЦП.

Достаточно сильное влияние ИЦП на генерацию тромбина позволяет предполагать, что этот ингибитор может действовать не только на фактор Ха и тромбин, но и на другие прокоагулянтные факторы плазменного звена свертывания, например, на внешнюю теназу (комплекс факто-

ра VIIa и тканевого фактора). Все это требует дальнейшего изучения.

Таким образом, мы показали, что препараты ИЦП, выделенные из клубней картофеля, с одной стороны, снижают активность тромбоцитарного фактора XIIIa, а с другой — уменьшают долю высоко активных в свертывании “укутанных” тромбоцитов в общей популяции активированных тромбоцитов. Полученные данные могут иметь большое практическое значение, так как известных на сегодняшний день специфичных ингибиторов фактора XIIIa очень мало, а ингибиторов, пригодных для клинического применения, практически нет. В то же время при целом ряде патологий активность фактора XIIIa часто оказывается повышенной. Это наблюдается у больных с тромбоэмболическими осложнениями, атеросклерозом, сахарным диабетом, а также после оперативных вмешательств, у рожениц, после введения адреналина, глюкокортикоидов и т.д. [20, 21]. Повышенную активность фактора XIIIa можно рассматривать как еще один фактор риска возникновения в организме тромботических состояний. В этих случаях снизить активность данного фактора можно с помощью соответствующих ингибиторов. Однако, поскольку исследованные ингибиторы пока еще не полностью очищены, для выяснения вопроса об их специфичности и токсичности необходимо получить чистые препараты и изучить их влияние на различные компоненты системы свертывания.

*Работа была частично поддержана грантами Российского фонда фундаментальных исследований (07-04-00146, 08-04-12060, 09-04-92427, 09-04-00357), грантом Президента РФ для молодых ученых (МК-340.2008.04), а также Программами фундаментальных исследований Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология” и “Фундаментальная наука – медицине”.*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zwaal R.F.A., Schroit A.J. Pathophysiologic implications of membrane phospholipids asymmetry in blood cells // *Blood*. 1997. V. 89(4). P. 1121–1132
2. Alberio L., Safa O., Clemetson K.J., Esmon C.T., Dale G.L. Surface expression and functional characterization of  $\alpha$ -granule factor V in human platelets: effect of ionophore A23187, thrombin, collagen, and convulxin // *Blood*. 2000. V. 95. P. 1694–1702.
3. Dale G.L., Friese P., Batar P., Hamilton S.F., Reed G.L., Jackson K.W., Clemetson K.J., Alberio L. Stimulated platelets use serotonin to enhance their retention of procoagulant proteins on the cell surface // *Nature*. 2002. V. 415. P. 175–179.
4. Sane D.C., Kontos J.L., Greenberg C.S. Roles of transglutaminases in cardiac and vascular diseases // *Bio-science*. 2007. V. 12. P. 2530–2545.

5. *Serrano K., Devine D.V.* Intracellular factor XIII crosslinks platelet cyto skeletal elements upon platelet activation // *Thromb. Haemost.* 2002. V. 88. P. 315–320.
6. *Greenberg C.S., Birckbichler P.J., Rice R.H.* Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues // *FASEB J.* 1991. V. 5. P. 3071–3077.
7. *Костанова Е.А., Розенфельд М.А., Ревина Т.А., Валуева Т.А.* Белковые ингибиторы фибринстабилизирующего фактора (XIII) // *Известия академии наук.* Т. 3. С. 347–353.
8. *Sugimura Y., Hosono M., Wada F., Yoshimura T., Maki M., Hitomi K.* Screening for the preferred substrate sequence of transglutaminase using a phage-displayed peptide library. Identification of peptide substrates for TGase2 and factor XIIIa // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281(26). P. 17699–17706.
9. *Lewis S.D., Janus T.J., Lorand L., Shafer J.A.* Regulation of formation of factor XIIIa by its fibrin substrates // *Biochemistry.* 1985. V. 24. P. 6772–6777.
10. *Arnon R., Shapira E.* Antibodies to papain. A selective fractionation according to inhibitory capacity // *Biochemistry.* 1967. V. 6(12). P. 3942–3950.
11. *Davies D.T., Law A.J.* An improved method for the quantitative fraction of casein mixtures using ion-exchange chromatography // *J. Dairy Res.* 1977. V. 44. P. 213–221.
12. *Laemmli U.K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* 1970. V. 227(5259). P. 680–685.
13. *Cooke R.D., Holbrook J.J.* Calcium and the assay of human plasma clotting factor XIII // *Biochem. J.* 1974. V. 141: P. 71–78.
14. *Israels E.D., Paraskevas F., Israels L.G.* Immunological studies of coagulation factor XIII // *J. Clin. Invest.* 1973. V. 52(10). P. 2398–2403.
15. *Lorand L., Parameswaran K.N., Velasco P.T., Hsu L.K., Siefring G.E.Jr.* New colored and fluorescent amine substrates for activated fibrin stabilizing factor (Factor XIIa) and for transglutaminase // *Anal. Biochem.* 1983. V. 131(2). P. 419–425.
16. *Gorman J.J., Folk J.E.* Structural features of glutamine substrates for human plasma factor XIIIa (activated blood coagulation factor XIII) // *J. Biol. Chem.* 1980. V. 255(2). P. 419–427.
17. *Hemker H.C., Giesen P.L.A., Ramjee M., Wagenvoort R., Beguin S.* The thrombogram: Monitoring thrombin generation in platelet rich plasma // *Thromb. Haemost.* 2000. V. 83(4). P. 589–591.
18. *Hemker H.C., Giesen P.L.A., AlDieri R., Regnault V., de Smed E., Wagenvoort R., Lecompte T., Beguin S.* The Calibrated Automated Thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability // *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* 2002. V. 32(5–6). P. 249–253.
19. *Jobe S.M., Leo L., Eastvold J.S., Dickeneite G., Ratliff T.L., Lentz S.R., Paola J.D.* Role of FcRg and factor XIIIa in coated platelet formation // *Blood.* 2005. V. 106. P. 4146–4151.
20. *Kohler H.-P.* Role of blood coagulation factor XIII in vascular disease // *Swiss Med. Wkly.* 2001. V. 131. P. 31–34.
21. *Аметов А.С., Кондратьева Л.В.* Метформин – основа терапии пациентов с метаболическим синдромом // *Эндокринология.* 2006. Т. 14. № 26. С. 1905–1911.

## Influence of Protein Proteinase Inhibitors on Platelet and Plasma Components of Blood Coagulation

© 2009 г. Ya. N. Kotova<sup>1</sup>, E. A. Kostanova<sup>2</sup>, M. A. Rozenfel'd<sup>2</sup>, E. I. Sinauridze<sup>1,3</sup>,  
M. A. Panteleev<sup>1,3</sup>, F. I. Ataullakhanov<sup>1,3,4</sup>

<sup>1</sup>Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, Moscow, Russia; E-mail: janakoo@yandex.ru

<sup>2</sup>Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

<sup>3</sup>National Research Center for Hematology, Moscow, Russia

<sup>4</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Factor XIIIa plays an important role in stabilization of formed fibrin clot during blood coagulation. Recent reports indicate that factor XIIIa influences the formation of coated platelets, which have high procoagulant activity, retain high levels of alpha-granular proteins on their surface, and express surface phosphatidylserine after platelet activation. It was also discovered that new cysteine proteinase inhibitors (CPIs) from potato could take part in the regulation of factor XIIIa transglutaminase activity. The aim of the present study was to determine the effects of CPIs on coated platelets formation during platelet activation and on enzyme activities of plasma part of blood coagulation. We found that CPIs decreased the portion of coated platelets subpopulation in a dose-dependent manner. They reduced thrombin generation by nearly 40% both in platelet-rich plasma and in platelet-poor plasma as compared with control, and dose-dependently decreased activity of factor Xa and thrombin. In conclusion, the obtained data show that cysteine proteinase inhibitors influence platelet and plasma components of blood coagulation and suggest that further purification and characterization of these inhibitors have practical significance and interest.