

# Контактная активация протеолитических систем плазмы крови. Новые концепции о механизмах активации и биорегулирующих функциях.

Яровая Г.А., Блохина Т.Б., Нешкова Е.А.

Российская медицинская академия последипломного образования, Москва

*В обзоре литературы представлены сведения, накопленные за последние три десятилетия при изучении контактной системы, инициирующей активацию протеолитических систем плазмы крови (гемокоагуляция, фибринолиз, кининогенез, а также комплемент и ангиотензиногенез). Приведены данные о структурно-функциональных свойствах белков – участников контактной системы (фактор XII и XI свертывания крови, прекалликреин и высокомолекулярный кининоген), механизмах их активации на полианионной поверхности. Обсуждается новая концепция активации этой системы на поверхности эндотелиальных клеток, основанная на выделении комплекса белков, в состав которых, кроме перечисленных выше компонентов, входят склерокератин 1 и рецепторы проурокиназы и q –компонента комплемента. Развита представления о роли этой системы в биологии сосудов*

В последние годы значительно расширились, и в некоторых аспектах изменились существовавшие почти пять десятилетий представления о механизмах и роли реакций, обеспечивающих гемостаз. Наиболее существенные открытия произошли в расшифровке контактной системы активации и роли рецепторов клеточных мембран и их лигандов – факторов гемостаза – в регуляции не только свертывания и фибринолиза, но и функций эндотелия и клеток крови. Результаты этих исследований наглядно продемонстрировали определяющее значение факторов свертывания в эмбриональном развитии сосудистой системы и поддержании целостности сосудов в процессе эмбриогенеза.

Гемостаз, инициируемый при повреждении сосудистой стенки, является едва ли не главной системой защиты организма. Развивающиеся при повреждении стенки сосуда инициирование, ускорение и регуляция гемостаза определяются структурно не связанными между собой рецепторами клеточных мембран и их лигандами. Система свертывания крови представляет собой каскад протеолитических реакций, в ходе которых неактивные зимогены расщепляются с образованием активных бел-

ков. Ведущая роль в этом процессе принадлежит сериновым протеиназам свертывающей системы крови, таким как факторы VIIa, IXa, Xa, XIa и тромбин. Связываясь со специфическими рецепторами клеточных мембран тромбоцитов, лейкоцитов и эндотелия, эти белки инициируют и регулируют процессы гемостаза. Рецепторы этой системы включают тканевой фактор (TF), рецептор тромбина (PAR-1) и тромбомодулин. При повреждении сосудистой стенки TF экспонируется в циркуляцию и внеклеточная часть TF служит рецептором для фактора VII. При связывании TF происходит активация зимогена VII в активную сериновую протеиназу (VIIa). Комплекс TF/VIIa осуществляет образование активных факторов Xa и IXa. В присутствии своего кофактора – фактора Va, Xa превращает протромбин в тромбин. Последний, активируя тромбоциты и катализируя превращение фибриногена в фибрин – основной структурный компонент кровяного сгустка, – обеспечивает образование тромба. Образование следовых количеств тромбина резко ускоряет этот процесс, поскольку тромбин активирует факторы V, VIII и XI.

Известно, что кроме этого основного пути свертывания, имеется триггерный механизм, называемый

«контактной фазой» внутреннего пути каскада реакций системы свертывания крови. Свертывание крови начинается сразу же после повреждения эндотелия сосудов и обнажения субэндотелиальных структур. Триггерный механизм контактной фазы активации гемостаза детально изучен на отрицательно заряженных искусственных и природных поверхностях, таких как каолин, сульфатиды, декстрансульфаты, фосфолипиды и др. Взаимная ориентация молекул при активации проферментов осуществляется благодаря формированию на активирующей поверхности ансамбля, состоящего из четырех белков: факторов XII и XI гемостаза, высокомолекулярного кининогена (ВМК) и прекалликреина (ПК). Это ведет к активации фактора XII и превращению его в фактор XIIa.

Постулированный более тридцати лет назад механизм контактной активации фактора XII предусматривал ее участие в запуске каскада реакций внутреннего пути гемостаза. Было показано участие компонентов калликреин-кининовой системы (ККС) в активации фактора XII на полианионной поверхности и установлен реципрокный механизм активации фактора XII и ПК. В дальнейшем стало ясно, что активация контактной системы плазмы крови играет существенную роль в фибринолизе, поскольку приводит к активации плазминогена и проурокиназы. Влияние протеиназ, образовавшихся после инициации контактной системы, распространяется также на комплемент. Так, под действием пламина, фактора  $\beta$ XIIa и калликреина активируются г- и s-субъединицы первого компонента комплемента, представляющие собой предшественники сериновых протеиназ классического пути активации, и фактор В, который является проформой сериновой протеиназы альтернативного пути активации комплемента. Кроме того, калликреин является одним из активаторов проренина. Таким образом уже установлено, что контактная фаза инициирует активацию не только свертывающей системы, но и всех других протеолитических систем плазмы крови - ККС, фибринолитической, комплемента и ренин-ангиотензиновой системы.

В последние годы представления о механизме активации контактной системы существенно изменились в связи с тем, что был обнаружен альтернативный механизм активации контактной системы на эндотелиальных клетках.

### Структурно-функциональные свойства факторов контактной системы

Высокомолекулярный кининоген. В плазме крови человека присутствуют два кининогена: высокомолеку-

лярный (ВМК) и низкомолекулярный (НМК), синтез которых кодируется единым геном, локализованным в хромосоме 3. Кининогены являются полифункциональными гликопротеинами, синтезируются в основном гепатоцитами и перед секретированием в кровоток подвергаются посттрансляционному гликозилированию. ВМК и НМК имеют молекулярную массу ~120 кДа и ~90 кДа соответственно. Концентрация ВМК в плазме крови человека составляет 65–130 мкг /мл.

Молекула ВМК состоит из шести доменов (D). Домены D1, D2 и D3 имеют аминокислотные последовательности, гомологичные цистатаминам – ингибиторам цистеиновых протеиназ, таких как папаин, катепсины В и Н и кальпаин. Домен D1 несет центр, связывающий  $Ca^{2+}$ , функция домена известна не полностью.

ВМК может обратимо связываться с тромбоцитами, нейтрофилами и эндотелиальными клетками, участками, расположенными в D3 и D5 доменах. Для связывания ВМК с клетками необходим  $Zn^{2+}$ , при этом ВМК влияет на функции клеток. Так, взаимодействие ВМК (D3) с тромбоцитами, скорее всего через тромбоспондин, снижает активность тромбоцитарного кальпаина, связывание тромбоцитами тромбина и подавляет тем самым агрегацию тромбоцитов, стимулированную тромбином. ВМК при связывании с полиморфно-ядерными лейкоцитами (ПЯЛ) действует как антиадгезивная молекула. Это влияние ВМК можно объяснить тем, что он вытесняет фибриноген, связанный с интегринами  $\alpha$ - и  $\beta$ 2- и Mac-1. Кроме того, ВМК необходим при стимуляции активности ПЯЛ калликреином. При этом ВМК способствует увеличению продукции свободных радикалов кислорода, дегрануляции ПЯЛ и высвобождению гранулоцитарной эластазы и лактоферрина.

Предполагают, что связывание ВМК с эндотелиоцитами происходит через гликопротеины, идентичные рецепторам, связывающим глобулярные участки C1q-компонента комплемента. ВМК взаимодействует на поверхности эндотелиальных клеток с проурокиназным рецептором. При связывании ВМК с эндотелиоцитами увеличивается скорость генерирования брадикинина, который в свою очередь стимулирует освобождение тканевого активатора плазминогена и образование оксида азота (NO) и простациклина, оказывающих антитромботическое влияние и вазодилатацию. Последовательность брадикинина заключена в D4 кининогенов. Расположенные в С-концевой области ВМК D5 и D6, взаимодействуя с гидрофильной и анионной поверхностями, проявляют прокоагулянтную активность. Связывание с поверхностью осуществляется расположенным в D5 участком, обогащенным

остатками His, Lys и Gly, при этом ВМК принимает участие в формировании контактного ансамбля белков активации плазменных протеолитических систем как неэнзиматический кофактор. Терминальный домен ВМК (D6) имеет центры для связывания прекалликреина и фактора XI гемокоагуляции.

Особенности доменной структуры ВМК определяют его роль в регуляции функций ряда белков плазмы крови и разных клеток. ВМК участвует в активации контактной фазы плазменного протеолиза, контролирует адгезию и активность тромбоцитов, ПЯЛ, эндотелиоцитов, подавляет активность цистеиновых протеиназ, препятствуя деградации плазменных белков при повреждении различных тканей, участвует в регуляции артериального давления, модулирует воспалительные и антитромботические реакции, создает важную регуляторную систему во взаимодействии плазменных белков с клетками крови и клетками сосудистой стенки.

Прекалликреин и калликреин плазмы крови. Прекалликреин (ПК) – предшественник калликреина плазмы крови – синтезируется в гепатоцитах, является гликопротеином, с молекулярной массой ~90 кДа. Концентрация ПК в плазме крови составляет 295–580 нМ (35–50 мкг/мл). Ген, кодирующий ПК, локализован в дистальной части хромосомы 4.

ПК активируется путем расщепления связи Arg371–Phe372 активными формами фактора XII свертывания крови ( $\alpha$ XIIa и  $\beta$ XIIa) с образованием легкой и тяжелой цепей калликреина, связанных одной дисульфидной связью. Легкая цепь содержит каталитический домен, типичный для сериновых протеиназ с классической триадой остатков Ser, His и Asp в активном центре фермента. Тяжелая цепь состоит из четырех повторяющихся доменов, гомологичных доменам фактора XI гемокоагуляции. Тяжелая цепь участвует в связывании ВМК, фактора XII и нейтрофилов.

Калликреин, образующийся в результате активации ПК, обладает широким спектром биорегулирующих функций. Гидролизуя две пептидные связи в ВМК, калликреин освобождает брадикинин, который в свою очередь контролирует множество физиологических и патогенетических процессов, включая регуляцию артериального давления и функций эндотелиальных клеток.

Фактор XII свертывания крови синтезируется в печени как гликопротеин, содержащий 7% углеводов. Фактор XII состоит из нескольких доменов: домена II типа фибронектина, домена ростового фактора, домена I типа фибронектина, второго ростового домена, домена-крингла и каталитического домена, типичного для

сериновых протеиназ. Активации фактора XII осуществляется под действием калликреина, при этом последовательно образуются две активные формы фактора –  $\alpha$ XIIa и  $\beta$ XIIa. Расщепление связи Arg353–Val354 в молекуле предшественника приводит к образованию  $\alpha$ XIIa – формы фермента, состоящей из тяжелой и легкой цепей, соединенных дисульфидной связью. Тяжелая цепь ответственна за связывание белка с анионной поверхностью при контактной активации. Легкая цепь содержит каталитический домен, имеющий высокую степень гомологии в последовательности аминокислот и размещении дисульфидных связей с каталитическими доменами плазмина, тканевого активатора плазминогена и урокиназы. Активный центр образует классическую триаду из остатков His, Asp и Ser. Форма  $\beta$ XIIa образуется после гидролиза еще двух пептидных связей, приводящего к образованию 30 кДа – фермента представляющего собой легкую цепь фермента. Форма  $\beta$ XIIa является более эффективным активатором ПК, а  $\alpha$ XIIa – фактора XI.

Фактор XI гемокоагуляции синтезируется в печени как гликопротеин с молекулярной массой 143 кДа, содержащий 5% углеводов. Секретируется в плазму крови в виде зимогена, в концентрации ~30 нМ, циркулирует в комплексе с ВМК. Ген фактора XI локализован в хромосоме 4. Фактор XI является необычным зимогеном в семействе сериновых протеиназ, поскольку его молекула состоит из двух идентичных пептидных цепей, связанных дисульфидными связями, и содержит два активных центра на моль фермента. Молекула фактора XI представляет собой зеркальный димер очень сходных по структуре с прекалликреином субъединиц. Активация фактора XI происходит на анионной поверхности под действием фактора XIIa в присутствии ВМК в результате гидролиза связи Arg 369–Phe 370 в каждой из двух полипептидных цепей.

Заканчивая описание свойств компонентов контактной системы, следует обратить внимание на принципиальное положение: белки этой системы не являются фундаментальными элементами гемокоагулирующего пути, а выполняют лишь второстепенную, вспомогательную роль в генерировании тромбина. Так, дефицит фактора XII, ПК и ВМК не вызывает выраженной гемофилии.

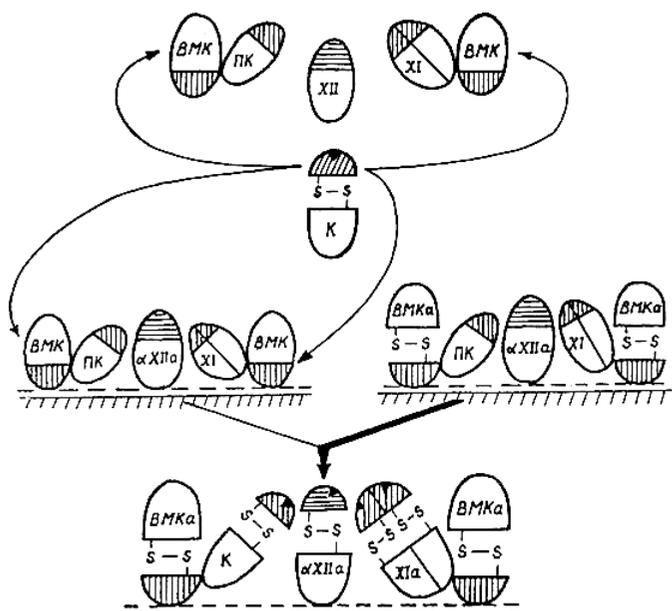
### **Активация контактной системы на полианионной поверхности**

Механизм взаимодействия ПК, ВМК, факторов XII и XI гемокоагуляции и ВМК были детально изучены *in*

*in vitro* на так называемой активирующей поверхности, содержащей высокую плотность отрицательных зарядов.

Схематическая модель контактной системы активации протеиназ представлена на рисунке 1. На поверхности сорбируются циркулирующие в кровотоке биомолекулярные комплексы ВМК-ПК, ВМК – фактора XI и фактора XII гемокоагуляции. Сорбция ПК и фактора XI осуществляется через ВМК, который связывается с анионной поверхностью катионным участком, расположенным в D5 и является своеобразным якорем для комплексированных с ним зимогенов; XII фактор свертывания имеет центры связывания в N-концевой области молекулы. В результате на активирующей поверхности формируется ансамбль из 4-х белков с взаимной ориентацией молекул и их локальной концентрацией, обеспечивающих высокую скорость процесса активации проферментов.

Многочисленные исследования контактной фазы активации ПК, XII и XI факторов гемокоагуляции



**Рисунок 1.** Контактная система активации прекалликреина, факторов XII и XI свертывания крови. Заштрихованные части представленных в схеме белков соответствуют легким цепям молекул; в активной форме белков эти цепи связаны – S–S-связями с тяжелыми цепями. Темные треугольники отмечают положение активных центров ферментов. ВМКa – декиннированная молекула ВМК, обладающая высокой прокоагулянтной активностью. ВМКи – инактивированная под действием XIa молекула ВМК, теряющая способность связываться с поверхностью

позволили расшифровать последовательность событий в этом процессе и постулировать его биологическое значение. Есть основания полагать, что фактор XII (зимоген) при адсорбции на поверхности в присутствии ВМК подвергается активации, связанной с конформационными изменениями, приводящими к экспонированию активного центра в зимогене и формированию активной формы фактора XIIa.

Небольшое количество фактора XIIa активирует плазменный ПК в калликреин и фактор XI в фактор XIa. Калликреин путем расщепления ВМК освобождает брадикинин и образует активный кофактор ВМК(a), при этом возрастает скорость активации зимогенов контактной системы. Калликреин, являясь наиболее эффективным активатором фактора XII, осуществляет протеолитическую активацию последнего в две активные формы: αXIIa и βXIIa. Известно также, что связанные с поверхностью калликреин и факторы XIa и αXIIa менее доступны действию ингибиторов, поэтому реципрокный активирующий механизм является решающим в системе контактной активации. Взаимоактивация ПК и фактора XII приводит к ускорению и распространению процесса их активации. Фактор XIa может прерывать каскад контактной системы активации зимогенов путем гидролиза молекулы ВМК в зоне домена D5, связывающегося с поверхностью, при этом ВМК лишается своей кофакторной функции.

Наиболее трудно объяснимым в системе контактной активации является тот факт, что фактор XIIa, фермент первого этапа каскада активации зимогенов, ответственен за активацию собственного активатора. Существует несколько версий для объяснения этого парадокса, которые сводятся главным образом к стремлению понять, каким образом инициируется процесс взаимоактивации факторов XII и ПК. Можно предположить автоактивацию фактора XII в присутствии анионной поверхности следовыми количествами фактора XIIa, всегда присутствующими в крови. Можно также полагать, опираясь на теоретические соображения, что конформационные изменения при связывании с поверхностью нативной молекулы фактора XII приводят к проявлению слабой каталитической активности зимогена, как это известно для трипсиногена. Не исключена возможность активации фактора XII под действием небольших количеств калликреина или других содержащихся в плазме и клетках крови неизвестных протеиназ, активирующих фактор XII или ПК.

Таким образом, увеличение относительной доступности субстратов, связанных с поверхностью в оптимально сориентированном микроокружении, а также оптимальная локальная концентрация всех участников контактной системы обеспечивают высокую скорость активации зимогенов и изменяют баланс между активацией протеиназ и их ингибированием в пользу активации.

Одной из важнейших функций контактной системы является образование калликреина, полифункциональной протеиназы, контролирующей множество различных биологических процессов. В частности молекулярные превращения в контактной системе оказывают влияние на ряд важнейших биохимических систем в плазме, клетках крови и эндотелии и могут играть решающую роль в воспалении.

В настоящее время существенно пересматривается роль контактной системы в регуляции гемостаза. Если ранее эта система рассматривалась в основном как начальный этап внутреннего пути гемокоагулирующего каскада, то сейчас уже стало ясно, что эта система активирует фибринолиз. Калликреин (и в меньшей степени факторы XIIa и XIa) непосредственно активирует пламиноген, хотя и менее эффективно, чем урокиназа. Тем не менее, плазменный калликреин уже охарактеризован как кинетически эффективный активатор проурокиназы *in vitro*. Недавние исследования показали, что активация проурокиназы под действием калликреина может осуществляться на поверхности тромбоцитов и эндотелиальных клеток. Наиболее эффективно проурокиназа активируется при связывании калликреина через ВМК с рецептором проурокиназы. Кроме того, высокая степень гомологии в структуре фактора XII, пламиногена и тканевых активаторов пламиногена свидетельствует, что контактная система является в основном системой фибринолиза. Обширные экспериментальные и клинические исследования показали, что контактная активация каскадных систем плазмы крови необходима для инициирования, усиления и распространения защитных реакций, которые обеспечиваются протеолитическими системами плазмы крови другими системами, с ними взаимодействующими. Калликреин, генерированный из прекалликреина контактной системы, активирует пламиноген, первый компонент (C1) и фактор В комплемента, фактор VII гемокоагуляции и проренин, а также стимулирует активацию нейтрофилов и влияют на функцию эндотелиоцитов либо непосредственно, либо через освобождение брадикинина. Известно, что брадикинин играет

главную роль в развитии воспаления. Особенно важно свойство брадикинина освобождать цитокины, такие как интерлейкин-1, фактор некроза опухоли и другие вторично генерируемые медиаторы: NO, простагландины и лейкотриены.

Гипотеза контактной активации фактора XII и ПК при связывании с отрицательно заряженной поверхностью легла в основу широко распространенных коагуляционных тестов, таких, как активированное частичное тромбопластиновое время, а также представлений о возможности активации ККС *in vivo* на искусственных поверхностях при медицинской интервенции и инфузии организма.

Физиологические отрицательно заряженные поверхности, способные инициировать активацию контактных систем, теоретически могут присутствовать и появляться при различных повреждениях организма, однако убедительных доказательств этому нет. Поэтому вопрос о роли контактной системы *in vivo* остается открытым. Сульфатиды, фосфолипиды, сульфаты холестерина и хондроитина, гепарины и другие глюкозамингликаны, коллаген, ураты и другие полианионные соединения теоретически можно рассматривать как физиологические отрицательно заряженные активирующие поверхности.

Тщательный анализ свойств всех компонентов внутреннего и внешнего путей активации гемокоагулирующего каскада, в том числе их участия в биологических реакциях этого пути и в развитии патологических процессов, связанных с манифестацией гемофилии, подтвердил, что дефицит факторов XII, ПК и ВМК, хотя и проявляется заметным пролонгированием времени свертывания крови *in vitro*, однако не вызывает кровоточивости у больных. На функции контактной системы вне гемокоагуляции указывает также обнаруженная в начале 90-х годов возможность активации фактора XI под действием тромбина, без участия других факторов контактной системы.

Следует заметить, что, несмотря на существенное расширение знаний о роли контактной системы в активации протеолитических систем плазмы и функций клеток крови, традиционно до сих пор эту систему связывают только с активацией внутреннего пути свертывания крови. Эта точка зрения была принята как парадигма и существовала на протяжении 35-летней истории изучения контактной фазы. Однако последние литературные данные позволяют констатировать широкое участие контактной системы (в том числе калликреин-кининовой) в биологии сосудов. В частности,

это касается ее роли в поддержании целостности сосудов и кровяного давления, воздействия на многие функции эндотелиальных клеток, в контроле процессов фибринолиза, в поддержании конститутивной антикоагулянтной природы внутрисосудистого пространства.

#### **Активация контактной системы на поверхности эндотелиальных клеток**

С середины 90-х годов гипотеза контактной активации на отрицательно заряженной поверхности стала тщательно проверяться и в результате была пересмотрена. Выдвинута новая концепция взаимодействия и активации компонентов контактной системы на клеточных мембранах, позволяющая объяснить роль белков этой системы *in vivo*. Предложенная Колман и Шмайер с сотр. гипотеза является альтернативной автоактивационному механизму образования фактора XIIa с последующей активацией белков калликреин-кининовой системы. В ее основу положены представления о том, что *in vivo* сборка мультикомплексов компонентов контактной системы происходит на клеточных рецепторах.

В соответствии с выдвинутой концепцией активация контактной системы происходит на поверхности эндотелиальных клеток. В результате изучения связывания комплекса ВМК-ПК с белками мембраны клеток было показано, что, несмотря на взаимодействие фактора XII с этим комплексом, активация ПК на эндотелиоцитах не зависит от присутствия фактора XII или его активных форм.

При изучении условий связывания ВМК с мембраной эндотелиоцитов было установлено, что связывание контролируется протеинкиназой С и рецептором брадикинина V1, экспрессированным на поверхности клетки. Ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента усиливают это действие брадикинина, а ВМК эффективнее связывается с мембраной. Поскольку домен D6 ВМК комплексирован с ПК или XI, эти компоненты оказываются связанными с эндотелиоцитами через ВМК. Активация ПК и образование калликреина инициируют генерацию брадикинина, усиливающего в свою очередь связывание ВМК с клетками.

Из лизатов эндотелиальных клеток был выделен главный белок, связывающийся с ВМК и идентифицированный как цитокератин 1 (СК1) – один из белков цитоскелета клетки. ВМК специфически взаимодействует с нативным или рекомбинантным СК1 только в присутствии  $Zn^{2+}$ . СК1 был найден также на тромбо-

цитах и гранулоцитах. Кроме СК1 в формировании комплекса, связывающего ВМК эндотелиальными клетками и гранулоцитами, участвует рецептор урокиназы (uPAR) и рецептор q-субъединицы первого компонента комплемента (gC1qR).

Изучение ингибиторного спектра и субстратной специфичности связанной с поверхностью эндотелия протеиназы, присутствие которой необходимо для активации ПК, позволило заключить, что она является  $Zn^{2+}$ -зависимой цистеиновой протеиназой. По данным Шмайера эта уникальная протеиназа, активирующая ПК, не ассоциирована с ансамблем белков, связывающим ВМК и ПК с клетками. Авторы полагают, что подобный механизм активации ПК может быть фундаментальным процессом на многих клетках, когда комплекс ПК и ВМК связывается с их мембранами. Изучение кинетики активации ПК и фактора XII на эндотелиальных клетках убедительно продемонстрировало, что активация ПК является первым этапом физиологической активации ККС на эндотелиоцитах. Активация фактора XII происходит после активации ПК под действием калликреина.

Благоприятные условия активации ККС создаются при образовании полибелкового ансамбля на поверхности эндотелиальной клетки, в состав которого кроме ВМК и ПК входят рецептор активатора плазминогена урокиназного типа (uPAR), рецептор q-субъединицы первого компонента комплемента (gC1qR), фактор XII и цитокератин 1. В этом комплексе ПК активируется под действием связанной с мембраной цистеиновой протеиназы (MP) с образованием калликреина, который в свою очередь активирует фактор XII. Калликреин расщепляет ВМК, при этом генерируется брадикинин и комплекс декиннированного ВМК с калликреином снимается с поверхности эндотелиоцитов. Новая гипотеза активации калликреин-кининовой системы позволяет предположить, что система выполняет важную роль в регуляции биологических функций сосудистой стенки.

Поскольку фактор XI структурно очень схож с ПК, механизм его активации практически идентичен таковому для ПК и требует взаимодействия с ВМК на эндотелиальных клетках в присутствии  $Zn^{2+}$  и цистеиновой протеиназы. Этот механизм активации фактора XI с участием описанного выше ансамбля белков на эндотелиальных клетках протекает независимо от фактора XIIa и  $\alpha$ -тромбина. Каким образом этот механизм активации факторов XI и XII участвует в гемостазе, в настоящее время еще неясно.

Однако эти исследования весьма убедительно свидетельствуют о важной роли ПК и калликреин-кининовой системы в целом в биологии клеточных мембран. Прежде всего это относится к брадикинину. Тот факт, что брадикинин является физиологическим, наиболее сильным стимулятором освобождения tPA *in vivo*, убедительно свидетельствует о его важном вкладе в фибринолиз. Есть основания полагать, что генерирование брадикинина является критическим событием в регуляции артериального давления и модулировании многих других процессов, определяющих функции сосудов. Показано, что калликреин является кинетически благоприятным активатором проурокиназы и активация фибринолиза может протекать без участия фактора XII и tPA. Здесь уместно напомнить, что одной из функций ВМК является подавление активации тромбоцитов, инициируемой тромбином. Прежде всего это связано с тем, что кининоген угнетает агрегацию тромбоцитов, вызванную кальпаином, экспрессированным на мембране и инициирующим формирование комплекса интегринов  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , необходимых для связывания фибриногена и агрегации тромбоцитов. Кроме того, кининогены угнетают связывание  $\alpha$ -тромбина с тромбоцитами и эндотелиальными клетками.

Калликреин плазмы крови, кроме кининогеназной функции и участия в регуляции активности других протеолитических систем, стимулирует активацию ПЯЛ, при этом из азурофильных гранул высвобождается эластаза и активируется латентная коллагеназа. Все эти свойства плазменного калликреина, а также биорегулирующие функции брадикинина и ВМК обеспечивают участие ККС в важнейших процессах, которые при определенных условиях могут вызвать развитие многих патологических состояний. Так, многочисленные экспериментальные и клинические исследования свидетельствуют об участии ККС в патогенезе острого и хронического воспаления, шока различной этиологии, диабета, аллергии, тромбгеморрагических нарушений, в том числе дессиминированного внутрисосудистого свертывания крови, онкологических заболеваний и других патологических состояний организма.

Патогенетические функции калликреина плазмы крови наиболее ярко проявляются при недостаточности его ингибиторов. В плазме крови активность калликреина контролируют главным образом инактиватор первого компонента комплемента (ИС1),  $\alpha_2$ -макроглобулин и в меньшей степени – антитромбин III и ингибитор протеина С.

### **Взаимодействие белков контактной системы плазмы крови с некоторыми протеиназами полиморфноядерных лейкоцитов при воспалении**

Просматриваются сложные неоднозначные взаимодействия компонентов контактной фазы с протеиназами клеток крови при развитии воспаления. В частности, было показано, что в зависимости от стадии активации ПЯЛ эти клетки могут активировать или инактивировать белки контактной системы. При изучении действия ПЯЛ на высокоочищенные препараты факторов XII, XIIa, прекалликреина, калликреина, выделенных из плазмы крови, нам удалось установить, что на начальной стадии активирования (примирования) ПЯЛ могут освобождать ранее неизвестную сериновую протеиназу, которая после активации калликреином оказывает дозозависимое активирующее действие на фактор XII. Однако при секреторной дегрануляции этих клеток, сопровождающейся освобождением из азурофильных гранул лизосомных протеиназ, компоненты контактной системы инактивируются. Показано, что очищенные препараты эластазы и катепсина G, выделенные из лейкоцитарной массы плазмы крови доноров, инактивируют препараты калликреина, фактора XIIa и их зимогенов, а также ВМК. Инактивирующим эффектом на зимогены обладает также химаза из тучных клеток.

Выдвинутая нами гипотеза о характере взаимодействия ПЯЛ и компонентов контактной системы подтверждается многочисленными клиническими наблюдениями, свидетельствующими об увеличении активации ПК в зависимости от тяжести воспалительного процесса, а затем о резком снижении активности калликреина и уровня его предшественника при неуклонном возрастании активности эластазы в терминальной стадии патологического процесса, особенно в тяжелых случаях с неблагоприятным исходом.

В качестве примера, свидетельствующего в пользу этого предположения, можно привести результаты одного из экспериментов, в котором очищенный препарат эластазы из лейкоцитов добавляли в плазму крови доноров в количествах, соизмеримых с количеством эластазы, освобождаемой в крови при дегрануляции ПЯЛ в процессе воспаления, и затем определяли фактор XIIa, калликреин и их предшественники. Полученные данные сопоставляли с результатами определения указанных компонентов контактной системы и активности эластазы в плазме крови больных перитонитом, находящихся в критическом состоянии.

Результаты изучения действия эластазы на компоненты контактной системы у доноров и в плазме крови

больных с перитонитом показали, что характер изменения активности исследуемых компонентов контактной системы в эксперименте и у больных с перитонитом сходны. Эти данные позволяют полагать, что в стадии активного воспалительного процесса компоненты системы могут быть повреждены эластазой, что в свою очередь может привести к истощению и нарушению их защитных функций.

Действие лейкоцитарной эластазы на ВМК было изучено нами совместно с Отделом фармакологии Университета г. Осло. Инкубация очищенных препаратов ВМК с лейкоцитарной эластазой приводила к расщеплению молекул ВМК. Инкубация ВМК с комплексом ЛЭ- $\alpha$ 1-ПИ показала, что, несмотря на полное подавление амидазной активности лейкоцитарной эластазы ингибитором, в эквимолярной, а также в 2, 4 и 5 раз ее превышающей концентрации, фермент сохранял свою способность расщеплять ВМК. Иммуноэлектрофоретическое определение кининогена в цитратной плазме после добавления эластазы подтвердило, что деградация кининогена происходит, несмотря на присутствие  $\alpha$ 1-ПИ. Причины этого неожиданного явления – гидролитического действия лейкоцитарной эластазы на высокомолекулярный кининоген плазмы крови человека, несмотря на присутствие  $\alpha$ 1-ПИ, в настоящее время исследуются.

Наши и литературные данные позволяют утверждать, что не только факторы контактной системы, но и другие белки плазмы крови расщепляются под действием эластазы *in vivo*. Это положение может внести вклад в понимание патогенетической роли лейкоцитарной эластазы в развитии тромбо-геморрагических осложнений при таких тяжелых воспалительных процессах, как множественная травма, перитонит и септицемии. Наибольшее неконтролируемое протеолитическое действие эластазы на белки контактной системы плазмы крови происходит в условиях наследственного или приобретенного дефицита  $\alpha$ 1-ПИ и других ингибиторов протеиназ этой системы, что часто

наблюдается при критических состояниях организма с неблагоприятным исходом.

В процессе исследования «контактной системы» был установлен состав ансамбля белков этой системы, детально изучены их структурно-функциональные свойства и белок-белковые взаимодействия. Ранее предполагалось, что активация контактной системы происходит на полианионной поверхности и наиболее вероятным пусковым механизмом является автоактивация фактора XII. В настоящее время удалось показать, что формирование ансамбля ВМК на полибелковом рецепторе происходит на эндотелиальных клетках и приводит к активации ПК. Фактор XII активируется вторично образовавшимся калликреином и далее процесс амплифицируется за счет реципрокной активации ПК и фактора XII. Фактор XI, также связанный в ансамбль белков на эндотелиальных клетках, может активироваться по тому же механизму, каким активируется ПК. Одновременно под действием калликреина расщепляется ВМК с образованием брадикинина, который стимулирует освобождение тканевого активатора плазминогена. Кроме того, компоненты калликреин-кининовой системы, включаются в процессинг урокиназы. И, наконец, ВМК и продукты его гидролиза обладают анитромбиновым и антикоагулянтным прямым и опосредованным действием.

Структура и функции белков контактной системы могут быть нарушены под действием протеиназ, освобождаемых клетками крови при патологических состояниях. Основанием для этого заключения служит выявленное деструктурирующее действие эластазы и катепсина G на ВМК, факторы XII, XIIa, ПК, и калликреин подтвержденное клиническими исследованиями. Калликреин плазмы крови является ключевой регуляторной протеиназой контактной системы внутреннего механизма активации защитных и адаптационных процессов, поскольку кроме кининогенеза, фибринолиза и гемостаза калликреин активирует ренин-ангиотензиновую систему и комплемент\*.

\* Список литературы находится в редакции