

Молекулярно-биологические проблемы создания лекарственных средств и изучение механизма их действия

© А. В. Максименко, 2003

А. В. Максименко

ПЕРЕХОД ОТ ФЕРМЕНТ-СУБСТРАТНЫХ К РЕЦЕПТОР-ЛИГАНДНЫМ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯМ В ИЗУЧЕНИИ УРОКИНАЗНОГО АКТИВАТОРА ПЛАЗМИНОГЕНА

Институт экспериментальной кардиологии, Российский Кардиологический Научно-Производственный Комплекс МЗ РФ, Москва

Среди протеаз плазмы крови активаторы плазминогена выделяются огромным числом их производных, полученных методами химического и биологического синтеза [1 – 4]. Упомянутые в приведенных обзорах междисциплинарные изучения проводились с целью повышения эффективности тромболитической терапии. Активаторы плазминогена, в каталитически активном виде представляющие собой сериновые протеиназы, стали значимыми препаратами для лечения острых сердечно-сосудистых поражений [1, 3, 5]. Активация/превращение белка крови плазминогена — субстрата активаторов плазминогена — под их ферментативным действием в трипсиноподобную протеазу плазмин ведет к повышению общей протеолитической активности и расширению ее специфичности, проявляющихся, в частности, в деградации фибрина. Разрушение фибрина, составляющего сетевую основу тромба, способствует ликвидации сосудистой закупорки и восстановлению кровотока. Следует отметить, что указанное фармакологическое (экзогенное) воздействие обусловлено весьма высокой концентрацией активаторов плазминогена в кровотоке при тромболитическом вмешательстве $\sim 0,01 - 1,00$ мкМ. Поиск “идеального” фибринолитического агента характеризовался высокой интенсивностью междисциплинарных разработок и переходом от приемов химической модификации биокатализаторов к технологии рекомбинантных ДНК или сочетанию этих методов [6, 7]. В настоящее время генно-инженерные мутантные формы тканевого активатора плазминогена (t-PA) входят в клиническую практику как болюсные средства тромболитика (ретеплаза, тенектеплаза, ланотеплаза, E6010) [2, 3, 5, 8]. Однако разработка новых активаторов плазминогена третьего поколения, потребовавшая значительных затрат организационно-финансовых и научно-производственных ресурсов, не привела к значимому прорыву в результатах лечения пациентов [8 – 10]. Осложнениями фармакологического тромболитика оставались гемorragии и реоклюзии [10, 11]. Наряду с развитием тромболитических подходов совершенствовались приемы хирургической реваскуляризации и разрабатывались методы и средства малоинвазивного эндоваскулярного восстановления кровотока (транслюминальная баллонная ангиопла-

стика, стентирование, атерэктомия и пр.). Какой из вышеперечисленных видов лечения имеет наибольшую клиническую эффективность не определено до сих пор, хотя, вероятно, им присущ, в целом, взаимодополняющий характер. Вместе с тем оказалось, что рестеноз является основным осложнением после чрезкожной транслюминальной коронарной ангиопластики [12]. Изучения на животных и данные гистологических наблюдений у человека показали, что рестеноз характеризуется неоинтимальной гиперплазией, обусловленной пролиферацией гладкомышечных клеток (ГМК) и синтезом экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ) [12]. Начальный (иницирующий) момент этих событий связан с процедурой катетерного баллонирования сосудистой стенки, что может вызывать поражение ее эндотелия. При механическом или электрическом повреждении артериального эндотелия у мышей с инактивированными генами активаторов плазминогена тканевого и/или урокиназного типов (u-PA) было обнаружено, что миграция ГМК в зону поражения наблюдается лишь у животных с дефицитом t-PA, но не для случаев дефицита u-PA или обоих активаторов плазминогена [13, 14]. Согласно этим данным образование неоинтимы зависело от u-PA, но не от t-PA. Это заключение напоминало классическую точку зрения, что t-PA ответственен за деградацию фибрина, а u-PA вовлечен в процессы тканевого ремоделирования и клеточной миграции [15]. Наряду с этим, инактивация гена u-PA у мышей приводила к достоверным спонтанным отложениям фибрина в тканях, в то время как никаких гистологических отклонений такого рода не наблюдалось у мышей с генетически обусловленным дефицитом t-PA [16]. На мышках с дефицитом активаторов плазминогена (PA), урокиназного рецептора (u-PAR), плазминогена (Pmg) было показано, что u-PA (на примере мышей с дефицитом t-PA) поддерживает достаточный фибринолитический потенциал, чтобы освободиться от фибриновых отложений с помощью u-PAR в тканях печени, так и без uPAR в других тканях [17]. Полученные данные позволили сформулировать концепцию, что u-PA обеспечивает эффективный опосредованный клетками фибринолиз, который регулируется локальной секрецией (рецепторно-независимый фибринолиз) или свя-

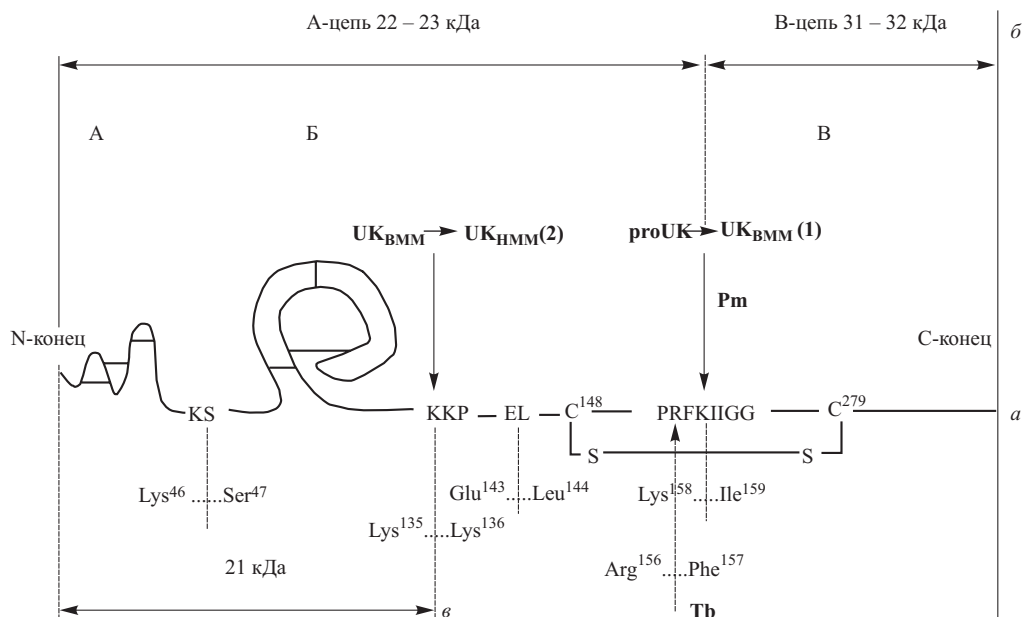


Рис. 1. Схематическое представление структурной организации u-PA. А — ростовой домен, Б — крингл-домен, В — протеазный домен (условно показанный прямым отрезком). *a* — полноразмерный одноцепочечный u-PA. Пояснения даны в тексте.

званием с клеточной поверхностью (рецепторно-зависимый фибринолиз), тогда как t-PA ответствен за клеточно-независимый фибринолиз благодаря его сродству к фибрину [17]. В соответствии с этими и другими [15, 18] представлениями, t-PA и u-PA являются комплементарными факторами фибринолиза, причем t-PA особо эффективен в лизисе эмболизированных фибриновых сгустков, а u-PA наиболее значим для растворения богатого фибрином покрытия раневого поля. Вместе с тем отсутствие первазивных, мультиорганных фибриновых отложений у мышей с генетически контролируемым дефицитом u-PA и t-PA, по сравнению с мышами с дефицитом u-PA и t-PA, обусловило предположение авторов, что, возможно, имеется другой рецептор u-PA [17], который еще не обнаружен исследователями. Накопление подобных обоснованных предположений стимулировало исследовательский поиск компонентов взаимодействия PA с клетками и ЭЦМ на лиганд-рецепторном уровне. С биомедицинских и фармакологических позиций особый интерес представляют последние данные научно-клинических исследований, полученные в Российском Кардиологическом Научно-Производственном Комплексе. Их аналитическому рассмотрению посвящено дальнейшее изложение.

Известные формы ограниченного протеолиза u-PA

Особенности структурной организации PA были установлены в результате многочисленных исследовательских усилий [1 – 6]. Так, u-PA состоит из трех доменов (рис. 1, *a*): домена, гомологичного эпидермальному фактору роста (ростовой домен, А), кренделеобразного домена (крингл 1, Б) и протеазного домена (В), содержащего сериновый и другие остатки каталитической триады, предназначенных для формирования активного центра. Молекулярная масса полноразмерного гликозилированного u-PA, называемого порой

проурокиназой (proUK, рис. 1, *a*), составляет приблизительно 54 кДа, а рекомбинантного негликозилированного u-PA, экспрессированного в *E.coli*, ориентировочно — 45 – 50 кДа. Разрыв пептидной связи Lys158 – Ile159 под действием плазмينا (Pm или калликреина) ведет к образованию двухцепочечного PA урокиназного типа, называемого обычно урокиназой (UK) или UK высокой молекулярной массы (UK_{ВММ}, рис. 1, *a*, (1)). При этом легкая (22 – 23 кДа) А-цепь и тяжелая (31 – 32 кДа) В-цепь (рис. 1, *b*), содержащая активный центр биокатализатора, удерживаются вместе дисульфидной связью Cys148 – Cys279 (рис. 1, *a*). Каталитическая эффективность UK существенно выше, чем у proUK. При отщеплении от N-концевой части u-PA (разрыв связи Lys135 – Lys136) фрагмента с молекулярной массой 21 кДа (рис. 1, *b*, аминоконцевой фрагмент) образуется UK низкой молекулярной массы (UK_{НММ}, рис. 1, *a*, (2)), составляющей ориентировочно 33 кДа. Такое превращение обычно происходит в результате самопереваривания UK в процессе ее выделения и очистки. Тромбин (Tb) расщепляет пептидную связь в u-PA между Arg156 – Phe157 (рис. 1, *a*), что ведет к инактивации u-PA. Таким образом, взаимодействие proUK с Pm повышает каталитическую активность UK, а взаимодействие с Tb ведет к образованию каталитически неактивных производных u-PA.

Новые продукты ограниченного протеолиза u-PA и их биологические функции

Изменение протеолитической активности u-PA представляется весьма важным, поскольку влияние u-PA на клеточную миграцию опосредуется помимо взаимодействия с заякоренным через гликозилфосфатидилинозитол-u-PA, обозначаемым CD87, также благодаря протеолитическому превращению Pmg в Pm. Pm вызывает деградацию многих компонентов

ЭЦМ и базальной мембраны, высвобождает и активирует факторы роста. Они влияют на миграцию клеток. Было обнаружено, что в условиях *in vitro* как в растворе, так и на клеточной поверхности может происходить под действием Pm ограниченный протеолиз u-PA, приводящий к образованию производного, лишённого ростового домена [19]. Место разрыва полипептидной цепи было идентифицировано по связи Lys46 – Ser47 (рис. 1, *a*). Протеолиз плазмином идет по этой связи быстрее, чем по участку Lys135 – Lys136. Образующаяся форма u-PA без ростового домена эффективнее, чем полноразмерный u-PA, интернализуется и деградируется клетками линии U 937. При этом u-PAR замедляет протеолиз u-PA дикого типа и его последующую интернализацию. Это подтверждалось как ингибированием протеолиза u-PA в присутствии растворимого u-PAR, так и благодаря взаимодействию с клетками трансфицированными геном u-PAR (при сравнении эффектов двух типов клеток линии HEK293: дикого типа без u-PAR и трансфицированного типа) [19]. Ингибирование интернализации исследуемых форм u-PA с помощью рецептор-ассоциированного белка (RAP) — универсального ингибитора рецепторов семейства рецепторов липопротеинов низкой плотности (ЛНП) — указало на участие в процессе урокиназного связывания белков семейства ЛНП-рецептора [19]. Методом аффинной хроматографии и лигандного блоттинга было показано, что таким участком связывания на поверхности клеток линии U 937 и ГМК трахеи человека является белок с молекулярной массой 210 кДа. Он состоит, как минимум, из двух субъединиц, связанных дисульфидной связью, локализуется в плазматических мембранах клеток и взаимодействует с антителами к иммуноглобулинам и протеазным доменом u-PA. Данные блоттинга продемонстрировали блокирование связывания u-PA без ростового домена с указанным выше белком препаратом моноклональных антител к протеазному домену u-PA в отличие от действия моноклональных антител против крингл-домена u-PA. Авторы предполагают, что образование в результате протеолиза формы u-PA без ростового домена служит механизмом инактивации биокатализатора при его избыточном скоплении на клеточной поверхности. Иммунохимически было показано, что локализация u-PA осуществляется по участкам фокальных контактов — местах соприкосновения клетки с ЭЦМ. Фокальные контакты образуются в результате взаимодействия белков ЭЦМ с интегринами клеток [20]. Во время миграции клеток u-PAR находится на лидирующем конце клетки. Можно отметить, что локализация u-PAR (а вместе с ним и u-PA) на клеточной поверхности очень динамична и зависит от функционального состояния клетки. В отличие от u-PA и u-PAR распределение Pmg и ингибитора активаторов плазминогена 1 типа (PAI-1) — основного ингибитора PA в кровотоке — довольно постоянно. PAI-1 прочно связывается с витронектином и равномерно распределяется по его поверхности [21]. Pmg локализуется на вентральной поверхности

клетки [22]. Таким образом, распределение PAI-1, действительно, не совпадает с локализацией фокальных контактов. Поэтому предлагаемый путь удаления u-PA с клеточной поверхности [19] может дополнить существующую схему регуляции активности u-PA благодаря взаимодействию с PAI-1. Вместе с тем это дополнение не представляется полным, поскольку не была изучена тромбиновая инактивация u-PA. С одной стороны, T_b — регулятор процессов воспаления и репарации тканей [23], обладающий известной полифункциональностью [24]. С другой стороны, тромбиновый протеолиз u-PA, осуществляющийся по связи, отдаленной всего на две аминокислоты от центра плазминового протеолиза (рис. 1, *a*), ведет к существенным конформационным изменениям протеазного домена u-PA, в результате чего теряется ферментативная активность. Вопрос — как конформер инактивированного тромбином u-PA взаимодействует с 210 кДа белком — остается открытым для последующих этапов изучения такого рода.

По данным исследований лаборатории профессора Н. R. Lijnen с тяжелой цепью u-PA может взаимодействовать и стромелизин-1, металлопротеиназа-3 матрикса (MMP-3) [25]. Благодаря этому происходит ограниченный протеолиз u-PA, ведущий к отщеплению N-концевого фрагмента молекулярной массы 17 кДа после разрыва связи Glu143 – Leu144 (рис. 1, *a*). При этом не наблюдается существенного изменения ферментативной активности образующихся производных u-PA.

Обнаруженное расщепление Glu143 – Leu144 связи в результате ограниченного протеолиза u-PA может играть роль в регуляции опосредованной клетками активности этого биокатализатора и может представлять механизм, которым контролируются зависимые и независимые от u-PAR функции u-PA [25].

Роль крингл-домена в хемотактическом действии u-PA

Ростовой домен u-PA опосредует специфическое связывание с u-PAR/CD87 участком аминокислотной последовательности между 12 и 32 позициями [26]. Роль же крингл-домена u-PA была до недавних пор не определена. Оказалось, что на поверхности ГМК трахеи человека, эмбриональных клеток почек человека (СНО) имеются сходные участки (крингл-связывающая мишень, КСМ) связывания ($K_d \sim 12 - 20$ нМ) с крингл-доменом u-PA, который оказывает влияние на миграцию клеток [27]. В исследовании использовался набор генно-инженерных конструкций производных u-PA (рис. 2). Было обнаружено, что ни каталитическая активность u-PA, ни связывание его с u-PAR через ростовой домен не являются критическими для стимулирования миграции ГМК трахеи человека [28]. Ростовой домен u-PA влияет на миграцию клеток, но его отсутствие не приводит к потере хемотактических свойств производных u-PA. Крингл-домен (рис. 2, r-KD) стимулировал миграцию ГМК в интервале концентраций 1 – 30 нМ (с максимальным эффектом при

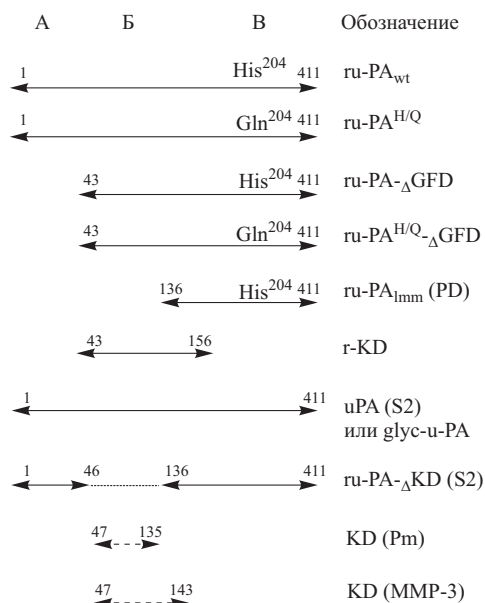


Рис. 2. Набор используемых (сплошная прямая) и предлагаемых для изучения (пунктирная прямая) условно представленных рекомбинантных форм и фрагментов u-PA. А, Б и В — обозначены как в подписи к рис. 1. По краям производных u-PA указаны порядковые номера аминокислот в полипептидной последовательности биокатализатора дикого типа. Пояснения даны в тексте.

20 нМ и эффективной концентрацией $1/EC_{50}/6$ нМ), а протеазный домен (рис. 2, ru-PA_{imm}, PD) не влиял на миграцию клеток. Сравнение эффектов u-PA, экспрессированного в клетках дрозофилы (рис. 2, S2), в полноразмерном виде (рис. 2, u-PA (S2)) и в форме, лишенной кринглового домена (рис. 2, ru-PA-_Δ KD (S2)), продемонстрировало неспособность ru-PA-_Δ KD (S2) стимулировать миграцию клеток, тогда, как и ru-PA_{wt}, вызывал хемотаксис [29]. Эти данные впервые указали на необходимость крингл-домена u-PA для стимулирования миграции клеток.

Ингибирование миграции ГМК, стимулированную рекомбинантными формами u-PA с крингл-доменом (рис. 2, ru-PA_{wt}, ru-PA^{H/Q}-_ΔGFD, r-KD), моноклональными антителами против крингл-домена u-PA подчеркнуло специфичность этого взаимодействия. Для его осуществления необходима интактная структура крингл-домена. Восстановление дисульфидных связей r-KD с последующим их алкилированием привело к образованию денатурированного крингл-домена (r-KD(d)). Было показано, что r-KD(d) не взаимодействовал с моноклональными антителами против r-KD и не стимулировал миграцию клеток. Подавление миграции ГМК, вызванной ru-PA_{wt} (рис. 2), антителами к u-PAR и отсутствие такого влияния на хемотактическое действие r-KD убеждает в заметной роли крингл-домена u-PA в стимуляции миграции ГМК.

Это заключение поддерживалось экспериментально установленным отличием белковой мишени (действующей по которой u-PA стимулирует миграцию клеток) от других ранее известных белков, связывающих u-PA на клетках: u-PAR/CD87 и представителей семейства

ЛНП-рецептора (LRP/ α_2 – MR, gp330/megalin, VLDLR) [27]. Специфичность взаимодействия обнаруженной КСМ с u-PA подтверждалась отсутствием такого взаимодействия между клетками и другими агентами, имеющими в своем составе крингл-домены, — t-PA и Pmg. Заметим, что t-PA содержит два, а Pmg — пять крингл-доменов. Авторы заключают, что КСМ может быть новым рецептором u-PA или адаптерным белком, сопрягающим урокиназный рецептор с эффекторными системами клетки, влияющими на их миграцию.

Представленные данные [19, 27 – 29] не только указали на лимитирующую роль крингл-домена в хемотактическом действии u-PA, но и обоснованно поставили новые исследовательские задачи. Так, устранение ферментативной активности u-PA достигалось интрастерически (по триаде активного центра) сайт-направленным мутагенезом (замена H204Q). Подобные формы u-PA (рис. 2, ru-PA^{H/Q}, ru-PA^{H/Q}-_ΔGFD) имеют генно-инженерное происхождение, тогда как в биосистемах u-PA инактивируется аллостерически после разрыва Tb связи Arg156 – Phe157 (рис. 1, a). Реальный интерес представляет изучение влияния инактивированных Tb производных u-PA на миграцию клеток. Значимость этого подхода связана и с ответом на вопрос, не меняется ли конформационный тип крингл-домена в зависимости от вида его конечных (терминальных) аминокислот (рис. 2, KD(Pm), KD(MMP-3)). Изменение границ (номерных позиций терминальных аминокислот) крингл-домена u-PA возможно благодаря приемам генной инженерии. Действительно, r-KD(d), в отличие от r-KD, не стимулировал миграцию ГМК. Однако в этом случае денатурирующее воздействие (разрыв дисульфидных связей r-KD дитиотреитолом с последующей обработкой йодацетамидом) было весьма жестким (заведомо проходя через стадию статистического клубка) и априори обеспечивающим функциональную предпочтительность интактной структуры r-KD перед денатурированной. Конформационные различия u-PA, обработанного Pm или Tb, могут оказаться менее выраженными, но не менее функционально значимыми.

Прямой эффект крингл-домена u-PA на миграцию клеток был показан с r-KD, полученным в границах 43 – 156 (рис. 2, r-KD). Его C-концевая позиция соответствует тромбиновому расщеплению u-PA (рис. 1, a). Целесообразно сопоставление эффектов такого r-KD с инактивированной Tb формой u-PA. Это важно как для оценки миграции клеток [27], так и для выяснения взаимодействия с 210 кДа белком [19]. Деления крингл-домена в форме ru-PA-_Δ KD (S2) (рис. 2, ru-PA-_Δ KD (S2)) ограничена участком 47 – 135. Здесь C-концевая граница соответствует превращению UK_{ВММ} в UK_{НММ} (рис. 1, a и (2)). Это наиболее медленно протекающая протеолитическая трансформация u-PA. Воздействие же Pm на u-PA в первую очередь идет по позиции Lys158 — Ile159 (рис. 1, a и (1)), что еще раз подчеркивает важность сравнения поведения в клеточных взаимодействиях форм u-PA, обработан-

ных Pm и T_b. Можно полагать, что это станет предметом дальнейших исследований.

u-PA во взаимодействии с клетками сосудистой стенки

Миграция и пролиферация клеток ярко проявляется при развитии рестенозов [12]. Исследование взаимодействий PA с клетками *in vivo* представляет особый интерес, поскольку позволяет достоверно выявить интегральные эффекты, влияющие на жизнеспособность организма и определяющие средства и приемы для профилактики и лечения развивающихся патологий. После экспериментального баллонирования сонной артерии крыс было обнаружено, что u-PA и u-PAR экспрессируются в стенке сосуда на ранних сроках (через 4 – 96 ч после вмешательства) и динамика этой экспрессии соответствует изменению миграции и пролиферации ГМК [30]. Эти данные согласуются с результатами других работ, подтверждая точку зрения, что экспрессия u-PA и u-PAR составляют одну из стадий алгоритма *in vivo*, связанного с началом пролиферации и миграции ГМК в стенке сосуда в ответ на его повреждение. Для оценки роли PA и их регуляторов в процессах формирования неинтимы проводили сразу после баллонирования периадвентициальное нанесение на сосуд в 40 % плуроническом геле различных препаратов: gu-PA_{wt} (20 нмоль/кг), gu-PA^{H/Q} (20 нмоль/кг), u-PA с измененным ростовым доменом (u-PA/GFD), в котором 24 первые аминокислоты заменены 13 другими аминокислотами (20 нмоль/кг), альфа₂-антиплазмина (20 нмоль/кг) — ингибитора Pm (α_2 -AP), моноклональные антитела к u-PA, блокирующие его ферментативную активность (mab-u-PA, 70 нмоль/кг) и рекомбинантный t-PA (rt-PA, 20 нмоль/кг) [31, 32]. Условия эксперимента наглядно показывают различие ситуаций, связанных с оценкой PA как тромболитика и как лиганда сосудистого рецептора. Оно определяется используемым концентрационным интервалом для PA (в случае тромболитика он, по крайней мере, на три порядка выше), способом введения PA (системно болюсно или инфузионно для тромболитика и локально пристеночно в геле через катетер для ангиопластики), видом мишени для взаимодействия с PA (плазменный сгусток и клеточная поверхность сосуда). В целом, это характеризует переход от изучения фермент-субстратных взаимодействий при фармакологическом тромболитике к исследованию рецептор-лигандных отношений при взаимодействии PA с клетками сосудистой стенки. В сравнении с контролем (нанесение только геля) gu-PA_{wt} достоверно увеличивал на четвертые сутки после баллонирования площадь неинтимы, меди и адвентиции и более выражено сужал просвет сосуда. Производное u-PA/GFD, не связывающееся с u-PAR и не стимулирующее *in vitro* миграцию ГМК, вызывало похожую картину. Неактивный gu-PA^{H/Q} не способствовал образованию неинтимы и неадвентиции (они были сходны с контролем), а также не увеличивал площадь меди и не уменьшал, в отличие от контроля, просвет сосуда.

Интересно, что mab-u-PA уменьшали площадь неинтимы, существенно не влияя на площадь меди и адвентиции и не сужая просвет сосуда. Число клеток неинтимы при нанесении mab-u-PA было более чем на 50 % меньше, чем в контроле. Не менялось в сравнении с контролем число клеток в неинтиме, меди и адвентиции при нанесении gu-PA^{H/Q}. Это свидетельствовало о подавлении действия эндогенного u-PA препаратами mab-u-PA и gu-PA^{H/Q}. К достоверно увеличенному числу клеток в неинтиме, меди и адвентиции приводило нанесение как gu-PA_{wt}, так и u-PA/GFD [33]. Различие их свойств *in vitro* нивелировалось в системе *in vivo*, подчеркивая вероятность связывания u-PA по разным центрам присоединения на клеточной поверхности.

Нанесение на поверхность сосуда α_2 -AP достоверно уменьшало в сравнении с контролем число клеток в неинтиме (на 70 %). Число клеток в меди и адвентиции существенно не менялось. Достоверных изменений индекса пролиферации в неинтиме при введении α_2 -AP отмечено не было, а площадь просвета сосуда на четвертый день после баллонирования была достоверно выше, чем в контроле. Отмеченное подавление аккумуляции ГМК в неинтиме и уменьшение ее площади после нанесения α_2 -AP указывали на торможение миграции ГМК из меди в интиму при ингибировании Pm. Это подразумевает участие эндогенного Pm в регуляции миграции клеток на ранних сроках после внутрисосудистого повреждения и подчеркивает значимость *in vivo* протеолитической активности u-PA в этих процессах.

Один из подходов к предупреждению миграции ГМК после сосудистого поражения развивается в Гаубиусской лаборатории Лейдена в Нидерландах. Он связан с экспрессией гибридного белка — мутеина, состоящего из аминоконцевого фрагмента u-PA и протеазного ингибитора (ингибитор бычьего панкреатического трипсина) посредством аденовируса [34]. Первая часть мутеина обеспечивает связывание с u-PAR, а вторая нацелена на ингибирование Pm на клеточной поверхности. В модельных системах *in vitro* и *in vivo* было обнаружено, что подобная система, действительно, значимо и достоверно ингибирует образование неинтимы и рестеноза [34].

Весьма интересные данные были получены после локального введения rt-PA [35]. Оказалось, что периадвентициальное нанесение rt-PA не только не увеличивало, но даже уменьшало площадь неинтимы, не влияя на площадь меди и адвентиции. Аккумуляция клеток в неинтиме уменьшалась, а в меди и адвентиции увеличивалась. При этом rt-PA предотвращал уменьшение просвета сосуда не только за счет ингибирования роста неинтимы, но и за счет позитивного ремоделирования артерии. Такая разнонаправленность эффектов u-PA и t-PA свидетельствовала, что стимуляция образования неинтимы *in vivo* может оказаться специфической особенностью u-PA.

Возможно она реализуется, в частности, в развитии реакций адвентиции. Показано, что ГМК являются

основным компонентом неоинтимы как после стентирования, так и ангиопластики [36]. При этом адвентициальные реакции после ангиопластики связаны также с активацией фибробластов и происходят хронологически независимо от образования неоинтимы. На культуре фибробластов было показано, что u-PA увеличивает долю клеток сократительного фенотипа [32], а также продемонстрировано участие u-PA в активации фибробластов, их трансформации в миофибробласты и усилении пролиферации клеток. Таким образом, u-PA способствует накоплению клеток сократительного фенотипа в адвентиции после повреждения.

Приведенные выше результаты указывают на эндогенный u-PA как новую функциональную мишень, воздействие на которую может быть направлено на предупреждение и уменьшение развития рестеноза после ангиопластики. Это заключение поддерживается и данными клинических наблюдений. Пациенты, у которых в течение года после успешной коронарной ангиопластики наблюдался возврат стенокардии, характеризовались повышением активности PAI-1, содержания С-реактивного белка и u-PA, по сравнению с больными без рецидива стенокардии как до, так и после ангиопластики [37]. По данным многофакторного анализа при разделении больных на группы с рецидивом стенокардии после ангиопластики и без такового было определено, что наибольший вклад в разделяющую (дискриминантную) функцию вносили показатель антигена u-PA крови и уровень С-реактивного белка. Следовательно, эти параметры выступали независимыми предикторами возобновления стенокардии в обследованной группе больных в течение года наблюдения после успешной коронарной ангиопластики. Определение указанных предикторов показано перед проведением коронарной ангиопластики для оценки нарушений в системе фибринолиза и коагуляции [38] и выявления больных с высоким риском развития острых интраоперационных осложнений и рецидива стенокардии после успешной процедуры эндоваскулярного вмешательства. Следует заметить, что данные и других клинических испытаний подчеркивают растущую прогностическую ценность увеличенного уровня С-реактивного белка как достоверного фактора риска при чрезкожном коронарном вмешательстве [39]. Вообще, результаты изучения С-реактивного белка представляют его надежным маркером протекания процессов воспаления в организме [40].

Новые подходы и задачи биомедицинского изучения u-PA

Убедительное обоснование роли u-PA в развитии неоинтимы и рестеноза естественно определяет ряд задач научно-клинического исследования. Рестеноз представляет собой комплексный ответ на сосудистое поражение. При определенных условиях репаративный процесс становится избыточным. Это приводит к значительному сужению сосуда и возврату симптомов преходящей ишемии. Понимая значимость процесса репарации сосудистой стенки, представляется естественным, что основная проблема связана с определени-

ем закономерностей регуляции сосудистого ранозаживления. Для этого исследуются патогенез рестеноза, возникновение воспалительной реакции, роль эндотелия в управлении сосудистой функцией [41]. Представление рестеноза как одной из форм “ускоренного” атеросклероза обоснованно ставит вопросы изучения оксидативного поражения и возможностей участия микроорганизмов в патогенезе атеросклеротических сосудистых заболеваний. u-PA выступает в этих ситуациях как провоцирующий и лечебный фактор. Стремление к определению роли u-PA в этих ситуациях обуславливает его изучение на клеточно-биологическом и структурно-функциональном уровне.

По результатам поиска блокаторов рестеноза выделяются ингибиторы Pm, неактивные формы u-PA, mab-u-PA, t-PA. Обоснование выбора наиболее эффективного агента требует широких медико-биологических исследований. Они касаются как ингибирования внутриклеточных путей передачи сигнала от митогенных рецепторов [42], так и выяснения функций отдельных структурных областей PA. Изменение их конформации в зависимости от вида реализуемого ограниченного протеолиза может кардинально менять направление действия этих агентов. Для выяснения таких вопросов огромные возможности дают методы генной инженерии, позволяющие получать заданные продукты белковой природы. Их тестирование в модельных биосистемах и *in vivo* ведет к получению уникальных результатов, позволяющих установить фундаментальные механизмы биопревращений и обосновать способы их регуляции.

Результативность такого подхода, показанная при исследовании фермент-субстратных взаимодействий PA в процессах тромбозиса, позволяет надеяться на достижение прорыва в получении знаний о процессах рецептор-лигандных воздействий с участием PA. Эти данные устанавливают закономерности инвазии, развития и метастазирования новообразований, важность понимания которых для онкологии и кардиологии нельзя переоценить.

Автор искренне признателен Ю. В. Щечилиной за помощь при оформлении рукописи для ее представления к опубликованию.

Работа была частично поддержана из средств проектов “Разработка средств и методов диагностики и лечения больных ишемической болезнью сердца” (грант 04/03-ИБС) и “Биокаталитические технологии для химического синтеза, аналитических систем и медицины” (грант 3 – 10/02), выполняемых в рамках Федеральной целевой научно-технической программы “Исследования и разработки по приоритетным направлениям науки и техники”, грантов РФФИ № 02-04-48641 и № 02-04-06122, а также Министерством Здравоохранения Российской Федерации.

ЛИТЕРАТУРА

1. D. Collen, and H. R. Lijnen, *Fibrinol. Proteol.*, **14**, 66 – 72 (2000).

2. F. J. Van de Werf, *Eur. Heart J.*, **20**, 1452 – 1458 (1999).
3. K. A. A. Fox, *Cardiovasc. Drugs Ther.*, **13**, 211 – 216 (1999).
4. A. B. Максименко, *Биоорг. химия*, **25**, 563 – 571 (1999).
5. F. Van de Werf F., *Am. Heart J.*, **138**, S115 – S120 (1999).
6. A. B. Максименко, *Мол. биология*, **29**, 38 – 60 (1995).
7. D. Collen, P. Sinnaeve, E. Demarsin, et al., *Circulation*, **102**, 1766 – 1772 (2000).
8. A. B. Максименко, *Вопр. биол. мед. фарм. химии*, **1**, 3 – 20 (2001).
9. D. Massel, *Can. J. Cardiol.*, **15**, 999 – 1005 (1999).
10. S. R. Mehta, J. W. Eikelboom, and S. Yusuf, *Lancet*, **356**, 1850 (2000).
11. F. W. A. Verheught, A. Meijer, W. K. Lagrand, and M. J. van Eenige, *J. Am. Coll. Cardiol.*, **27**, 766 – 773 (1996).
12. M. Hamon, C. Bauters, E. P. McFadden, et al., *Eur. Heart J.*, **16**(Supple. I), 33 – 48 (1995).
13. P. Carmeliet, L. Moons, J.-M. Herbert, et al., *Circ. Res.*, **81**, 829 – 839 (1997).
14. H. R. Lijnen, B. Van Hoef, F. Lupu, et al., *Arterioscler. Throm. Vasc. Biol.*, **18**, 1035 – 1045 (1998).
15. D. C. Rijken, and D. V. Sakharov, *Fibrinol. Proteol.*, **14**, 98 – 113 (2000).
16. P. Carmeliet, L. Schoonjans, L. Kieckens, et al., *Nature*, **368**, 419 – 424 (1994).
17. T. H. Bugge, M. J. Flick, M. J. S. Danton, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 5899 – 5904 (1996).
18. A. V. Maksimenko, and E. G. Tischenko, *J. Thromb. Thrombol.*, **7**, 307 – 312 (1999).
19. A. Poliakov, V. Tkachuk, N. Ovchinnikova, et al., *Biochem. J.*, **355**, 639 – 645 (2001).
20. P. A. Andreasen, L. Kjoller, L. Christensen, and M. J. Duffy, *Int. J. Cancer.*, **72**, 1 – 22 (1997).
21. J. Pollanen, O. Saksela, E. M. Salonen, et al., *J. Cell. Biol.*, **104**, 1085 – 1096 (1997).
22. J. Pollanen, R. W. Stephens, and A. Vahery, *Adv. Cancer Res.*, **57**, 273 – 328 (1991).
23. С. М. Струкова, *Биохимия*, **66**, 14 – 27 (2001).
24. A. B. Максименко, *Биохимия*, **58**, 1373 – 1383 (1993).
25. F. Ugwu, B. Van Hoef, A. Bini, et al., *Biochemistry*, **37**, 7231 – 7236 (1998).
26. A. Appela, E. A. Robinson, S. J. Ullrich, et al., *J. Biol. Chem.*, **262**, 4437 – 4440 (1987).
27. S. Mukhina, V. Stepanova, D. Traktouev, et al., *J. Biol. Chem.*, **275**, 15458 – 16450 (2000).
28. V. Stepanova, S. Mukhina, E. Kohler, et al., *Mol. Cell. Biochem.*, **195**, 199 – 206 (1999).
29. A. A. Poliakov, S. A. Mukhina, D. O. Traktouev, et al., *J. Recept. Signal. Transduct. Res.*, **19**, 939 – 951 (1999).
30. О. С. Плеханова, Н. И. Калинина, Е. А. Волынская, Е. В. Парфенова, *Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова*, **86**, 18 – 27 (2000).
31. Е. В. Парфенова, О. С. Плеханова, Н. И. Калинина и др., *Кардиология*, **9**, 69 – 77 (2000).
32. О. С. Плеханова, Н. И. Калинина, Е. А. Волынская, Е. В. Парфенова, *Бюл. экспер. биол. мед.*, **86**, 18 – 27 (2000).
33. O. Plekhanova, Ye. Parfyonova, R. Bibilashvilly, et al., *J. Hyperten.*, **18**, 1065 – 1069 (2000).
34. P. H. A. Quax, L. M. Lamfers, J. W. H. P. Lardenoye, et al., *Circulation*, **103**, 562 – 569 (2001).
35. О. С. Плеханова, М. А. Соломатина, С. П. Домогатский и др., *Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова*, **87**, 584 – 593 (2001).
36. T. Christen, V. Verin, M.-L. Bochaton-Piallat, Y. Popowski, et al., *Circulation*, **103**, 882 – 888 (2001).
37. А. П. Савченко, Ю. Г. Матчин, М. А. Смирнов и др., *Вест. радиол. рентгенол.*, № 2, 4 – 8 (2000).
38. T. L. Krasnikova, Ye. V. Parfyonova, I. A. Arefieva, et al., *Clin. Exp. Pharm. Physiol.*, **26**, 345 – 357 (1999).
39. D. L. Bhatt, M. A. Robbins, M. S. Penn, et al., *Circulation*, **104**, 992 – 997 (2001).
40. E. T. H. Yeh, H. V. Anderson, V. Pasceri, and J. T. Willerson, *Circulation*, **104**, 974 – 975 (2001).
41. R. J. Lefkowitz, and J. T. Willerson, *J. Am. Med. Assoc.*, **285**, 581 – 587 (2001).
42. G. Iaccarino, L. A. Smithwick, R. J. Lefkowitz, and W. J. Koch, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 3945 – 3950 (1999).

Поступила 25.04.02