

# ОГЛЯДИ

УДК 577.152.344; 575.151.042

## ТРОМБИН И АНТИКОАГУЛЯНТНАЯ ТЕРАПИЯ

М. В. КОЛОДЗЕЙСКАЯ, Л. И. СОКОЛОВСКАЯ, В. А. ЧЕРНЫШЕНКО,  
Э. В. ЛУГОВСКОЙ

Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев;  
e-mail: sokludmila@yandex.ru

*В обзоре представлены новые данные, раскрывающие рациональные подходы для фармакологического контроля за процессом свертывания крови и подтверждающие ключевую роль тромбина в процессах гемостаза по сравнению с другими протеиназами. Модуляция присущих тромбину свойств, описанная в обзоре, представляет новую возможность для создания антитромбиновых препаратов.*

*Аллостерия тромбина может служить основой развития новой терапии. Создание каталитически инертного тромбина в slow-форме с эффективной антикоагулянтной активностью in vivo позволит использовать его в медицине в качестве уникального антитромбинового агента.*

*Ключевые слова: тромбин, противосвертывающая система, синтетические ингибиторы, взаимодействие катион-π, энергия связывания, электростатическая потенциальная поверхность, фармакологический контроль.*

**Т**ромбин является сериновой протеиназой, способной существовать в двух конформациях: медленной (slow) и быстрой (fast), переход которых из одной в другую зависит от связывания с ионами  $\text{Na}^+$  [1–4]. Переход от slow-формы к fast-форме энзима является основной стадией молекулярного узнавания субстратов. Fast-форма тромбина связывает фибриноген с более высоким сродством и гидролизует его с большей скоростью, чем slow-форма. В то же время slow-форма тромбина более специфично активирует антикоагулянт протеин С, который инактивирует факторы Va и VIIIa и регулирует генерацию тромбина [2–14]. В условиях физиологических концентраций ионов  $\text{Na}^+$ , pH и температуры slow- и fast-формы находятся в равновесии, т. е. существует баланс между прокоагулянтной и антикоагулянтной активностью тромбина [14,15].

Антикоагулянтная роль тромбина основывается на активации протеина С (PC) с участием тромбомодулина — кофактора, расположенного на мембране эндотелиальных клеток. Активированный протеин С (APC) быстро инактивирует факторы Va и VIIIa, которые включены в процесс генерации тромбина [7–9].

В настоящее время в антикоагулянтной терапии преобладают гепариноиды, которые

принимают участие в антитромбиновом ингибировании тромбина и фактора Ха. Также используют варфарин — антикоагулянт непрямого действия [2]. Нефракционированный гепарин и варфарин не являются идеальными антикоагулянтами, т.к. в случае их передозировки возможны кровотечения. Недостатком нефракционированного гепарина, в отличие от низкомолекулярного, также является то, что он часто вызывает тромбоцитопению [2]. По сравнению с гепарином и варфарином преимущественно обладают ингибиторы тромбина прямого действия, оптимальную химическую структуру которых давно подбирали многие исследователи с целью использования их для широкого терапевтического применения. Так, вслед за аргатробаном, мощным ингибитором активного энзима, был синтезирован бивалирудин, который по действию подобен гирудину — природному ингибитору тромбина. Гирудин и бивалирудин являются более селективными ингибиторами тромбина по сравнению с аргатробаном, который связывается только в активном центре энзима, в то время как два первых взаимодействуют с гораздо большей поверхностью субстратсвязывающего участка, расположенного в направлении от активного центра к экзосайту I. Однако природные прямые ингибиторы не имеют значительной терапевтической эффективности по сравнению с

низкомолекулярными синтетическими соединениями или даже с нефракционными гепаринами [2,3]. Следует отметить, что аргатробан и бивалирудин были созданы прежде, чем была подробно исследована первичная структура тромбина [4]. После бивалирудина, который путем связывания его посредством мостика с экзосайтом I и активным центром тромбина вызывает ингибирование энзима, был синтезирован имадин [5], связывающийся с экзосайтом II и активным центром энзима.

Поскольку тромбин играет ключевую роль в процессах локального тромбообразования, он может служить главной мишенью для создания антитромботических средств и антикоагулянтов.

Точки приложения антитромботической терапии весьма различны [16–17]. Фармацевтический контроль может быть направлен на подавление активности тромбина, на торможение его биосинтеза, генерации и т. д. Наличие в молекуле тромбина, наряду с классическим активным центром, еще дополнительных центров связывания пептидных лигандов, позволяет создавать два класса его ингибиторов: низкомолекулярные соединения, взаимодействующие с активным центром тромбина и его ближайшим окружением, а также «двуглавые» олигопептиды, осуществляющие бивалентное взаимодействие с энзимом. Последние соединения для связывания с тромбином используют кроме зоны активного центра еще и экзосайт-I (АСУ-1). Они отличаются высокой специфичностью к тромбину, не обнаруживают выраженной токсичности и иммунной реактивности [16–18]. Представлена структура и свойства двух типов низкомолекулярных ингибиторов: соединений, молекулы которых имеют электрофильные группы, способные взаимодействовать с Ser 195 тромбина (пептидил-хлорметил-кетоны, альдегиды, кетометиленовые соединения, производные борной и фосфорной кислот), а также ингибиторы, которые не имеют указанных активных химических групп и являются обратимыми конкурентными ингибиторами тромбина. Обсуждаются перспективы использования этих соединений для профилактики и лечения различных тромбозомболических заболеваний [16, 17].

Ранее рядом авторов были сформулированы критерии идеального антитромботического препарата [18–23]. Он должен ингибировать тромбообразование и не подавлять гемостаз, иметь относительно большой период полужизни и легко всасываться при пероральном введении, быть весьма специфичным и не вызывать

серьезных побочных эффектов. Применяемые в настоящее время лекарственные препараты не удовлетворяют этим критериям. Поэтому исследования по созданию новых ингибиторов тромбообразования в последнее время значительно расширяются.

Из-за аллостерической природы тромбина любой эффектор, препятствующий связыванию  $\text{Na}^+$  с тромбином, стабилизирует его slow-форму, пролонгируя время свертывания фибриногена, активацию тромбоцитов и вызывая расщепление их рецепторов PAR-1 и PAR-4. Ионы  $\text{Na}^+$  являются эффективным контролем прокоагулянтной и антикоагулянтной функций тромбина. Изменение концентрации  $\text{Na}^+$  в плазме приводит к гипернатриемии [ $\text{Na}^+$ ] > 145 или гипонатриемии [ $\text{Na}^+$ ] < 135 мМ. Гипернатриемия часто связана с тромбозом вен, особенно церебральных, или тромбозом при вторичном диабете и других заболеваниях. Введение физиологического раствора здоровым волонтерам приводит к увеличению уровня фибринопептида А — продукта расщепления фибриногена тромбином [6–11].

В настоящее время перспективным направлением, на наш взгляд, является создание аллостерических ингибиторов тромбина, которые бы действовали на  $\text{Na}^+$ -связывающий участок энзима. Этот вопрос тесно связан с более детальным исследованием антикоагулянтной slow-формы тромбина [3, 12–15, 24–32]. В последние годы созданы различные мутанты тромбина с селективной специфичностью к РС, которые проявляют антикоагулянтные и антитромботические эффекты *in vivo* [13–15].

Появляется все большее количество новых данных, определяющих рациональные подходы к фармакологическому контролю за процессом свертывания крови и подтверждающих ключевую роль тромбина в процессах гемостаза [33–36].

Известны исследования по синтезу N-концевого фрагмента 1–47 гирудина, содержащего аминокислотные замены и проявляющего более мощную антитромбиновую активность по сравнению с активностью интактного гирудина [37–42]. Было исследовано влияние систематической замены Туг 3 в ингибиторе неcodированными аминокислотами или внедрением различных соединений, например фтора, йода, нитро-группы и др. в пара-положение. Удивительно, что при замене в положении 3 Туг→Ala исчезает различие в средстве аллостерических форм тромбина, тогда как более громоздкая боковая цепь  $\beta$ -нафтилаланина улучшает связывание с fast-формой тромбина. В ряде ис-

следований [33, 37, 38, 43] изучали степень сродства аналогов фрагмента гирудина 1–47 с fast-формой тромбина, которая зависит от степени гидрофобности боковой цепи аминокислоты в положении 3. Структурные анализы комплексов пептид–тромбин обнаружили, что атом йода пара-Phe и заряженный азот пара-аминометил-Phe эффективно взаимодействуют с ароматическим ядром Thr 215 участка S3 активного центра тромбина. На основании экспериментальных данных было сделано заключение, что “нетрадиционные” водородные связи типа X–H...π и катион-π при взаимодействии могут играть ключевую роль в формировании структуры протеина, его стабильности, а также в узнавании лигандов. Поэтому на основании теоретических расчетов показано, что среди многих комбинаций связи катионов и ароматических ядер взаимодействия  $\text{NH}_4^+$ ,  $(\text{K}^+)$  с индолом обеспечивают наиболее энергетически выгодное взаимодействие [40–42]. Эти предсказания подтверждены данными, полученными при изучении водородного связывания X–H...π, проведенного на 529 структурах белка и указывающих, что ядро индола Thr является наиболее частым π-акцептором водорода и наиболее широко распространенной парой донор–акцептор является пара Lys–Thr [41–48].

Следует отметить, что индол по своим свойствам является ароматическим соединением. Свободная пара электронов у атома азота сопряжена с π-электронами бензольного и пиррольного ядер, вследствие чего индол не обладает основными свойствами. Поэтому индольное ядро триптофана чрезвычайно склонно к реакциям электрофильного замещения, при этом заместитель направляется в положение 3.

Приведенные результаты показывают, что относительные изменения в сродстве аналогов гирудина 1–47 с fast-формой тромбина могут определяться эффектами десольватации, а с другой стороны они также подчеркивают значение «спрятанных» взаимодействий в узнавании комплекса гирудин–тромбин [41–43, 49, 50]. Показано также, что взаимодействие гирудин–тромбин дестабилизируется в присутствии отрицательных зарядов в пара-положении фенольного кольца подобно пара- $\text{NO}_2$ -Phe, где атомы кислорода имеют сильную электронную плотность. Во всех случаях при взаимодействии ингибитор–тромбин обнаружены специфические электростатические взаимодействия с электронной π-системой Thr 215, которые оказались благоприятными для пара-аминометил-Phe или отталкивающими для  $\text{NO}_2$ -Phe.

Обнаружено, что позиция 3 в молекуле гирудина, кроме ключевого значения для взаимодействия гирудин–тромбин, ответственна также за предпочтительное связывание этого ингибитора с прокоагулянтной формой энзима. Наличие в позиции 3 аминокислоты с боковой группой небольшого размера, подобно Ala, снижает сродство гирудина к fast-форме тромбина в 65 раз, но незначительно влияет на связывание со slow-формой. Напротив, замена Thr 3 массивным β-нафтилаланином усиливает сродство к fast-форме тромбина. Данные результаты определяют направление исследований по созданию новых ингибиторов тромбина, обеспечивающих усиление антикоагуляционных свойств энзима.

В настоящее время синтезированы новые аллостерические ингибиторы тромбина – сульфатированные дегидрополимеры (DHPs) 4-гидроксикоричной кислоты, которые проявляют необычные антикоагулянтные свойства [51]. Чтобы лучше выяснить механизм их действия, было исследовано прямое ингибирование тромбина, фактора Ха, фактора IXa и фактора VIIa тремя аналогами сульфатированных DHPs, а именно сульфатированным дегидрополимером кофейной ( $\text{CDSO}_3$ ), феруловой ( $\text{FDSO}_3$ ) и горчичной ( $\text{SDSO}_3$ ) кислот.

Главной целью создания этих соединений было значительное уменьшение полианионной природы гепарина, которая вызывает ряд неблагоприятных эффектов и уменьшает антикоагулянтное действие [52]. Следует отметить, что за последние 30 лет неизвестно появление нового мимика гепарина, который являлся бы полисахаридом. Действительно, предложенные новые структуры, фондапаринукс или идрапаринукс, являются производными низкомолекулярного гепарина (НМГ) [53].

Известно, что гепарин в своей структуре содержит гидрофильный полисахарид, в то время как структура сульфатированной DHPs основана на гидрофобном «лигнине». Природные лигнины содержат мономеры фенолпропанола, что дает возможность вводить ограниченный ряд сульфатированных групп [54, 55]. Предварительные исследования показали, что сульфатированные DHP3 являются гидрофобными молекулами, содержащими в среднем 0,8–0,9 анионных (сульфатных и карбоксильных) групп на мономер [51], тогда как в гепарине их содержится ~ 1,78. Молекулы этих ингибиторов полностью отличаются от антикоагулянтов, используемых в настоящее время в клиниках, включая гирудин, бивалирудин, аргатробан и ксимелагатран [56–60].

Обнаружено, что сульфатированные DHPs удлиняют время свертывания плазмы со скоростью, в пределах таковой низкомолекулярного гепарина [51], причем самым эффективным оказался CDSO<sub>3</sub>. При дальнейшем исследовании выявлены как сходство, так и различия между ними. Три сульфатированных DHPs ингибируют тромбин и фактор Ха в отсутствие антитромбина. Это является основным отклонением от предполагаемого механизма действия, так как сульфатированные DHPs должны бы имитировать функцию гепарина. Наномолярные величины IC<sub>50</sub> прямого ингибирования свидетельствуют о том, что эти соединения особенно мощные и являются, по-видимому, первыми молекулами пептидов или пептидометиков, которые вызывают прямое ингибирование тромбина и фактора Ха [61–65]. Исследования конкурентного связывания тромбина с хромогенным субстратом в присутствии гирудина, бычьего гепарина, эноксапарина и октасахариды гепарина предполагают, что CDSO<sub>3</sub> предпочтительно связывается с анионсвязывающим сайтом II тромбина.

Можно также предположить, что хотя FDSO<sub>3</sub> и SDSO<sub>3</sub> несколько отличаются по своей структуре, однако, учитывая их значительное сходство, эти олигомеры могут также связывать экзосайт II тромбина. Подобным способом эти сульфатированные DHPs могут взаимодействовать с анионсвязывающим экзосайтом II фактора Ха, который, как известно, узнает лиганды гликозаминогликана (GAG) со средством, подобным тромбину [65–69].

Приведенные выше результаты исследований позволяют предполагать, что это первые синтетические молекулы, которые радикально отличаются по своей структуре от всех используемых в клинике антикоагулянтов в данное время и, таким образом, представляют новый класс мощных ингибиторов тромбина и фактора Ха.

Известно, что механизм переваривания насосанной крови, регулируемый эндо- и экзопептидазами у большинства кровососущих, направлен на медленную деградацию белков крови и требует продолжительного пребывания ее в кишечном канале таких насекомых. Этот процесс регулируется ингибиторами протеолитических энзимов, которые поступают в кровь в составе секрета слюнных желез и/или секреторируются стенками кишечного канала. Так, были выделены эффективные ингибиторы тромбина из экстракта слюнной железы тропического клеща *Amblyomma variegatum*. Подробно исследован вериджин – один из са-

мых низкомолекулярных ингибиторов тромбина, обнаруженных в природе.

Показано, что часть сайта молекулы вериджина, который связывается с активным центром тромбина, состоит из аминокислотных остатков 8–14, в то время как вторая часть пептида (15–32 остатков) связывается с экзосайтом I тромбина [70]. Несмотря на небольшой размер и гибкую структуру молекулы, вериджин связывается с тромбином с высоким средством ( $K_i \sim 10,4$  pM) и высокой специфичностью. Обнаружено, что на кинетику связывания с энзимом влияет семь аминокислотных остатков N-концевого участка молекулы пептида. При дальнейшем исследовании показано, что вериджин по структуре и функциям подобен ингибитору тромбина гирулогу, но является более мощным, и его ингибиторная активность в значительной степени сохраняется после расщепления тромбином [70].

Отсутствие цистеинов, обуславливающих гибкость структуры молекулы, отличает вериджин от типичных ингибиторов тромбина, таких как гирудин (компактный N-концевой участок, кислый и удлиненный C-концевой сегмент [71,72]), родниин (двойной домен ингибитора Казалья [73]), орнитодорин (двойной домен ингибитора Кунитца [73]) и теромин (кислый N-концевой участок, компактный C-концевой сегмент [74]), даже если они все связаны с одинаковыми сайтами тромбина (активный центр и экзосайт-1). Хотя остатки вериджина 19-28 почти идентичны C-концевым участкам гирудина, их N-концевые сегменты полностью различны. В отличие от гирудина, вериджин не содержит сульфатированного остатка Туг и имеет три дополнительных остатка в C-концевой части молекулы. Десульфатирование гирудина или его C-концевого пептида сохраняет его антитромбиновую активность, несмотря на 10-кратное снижение в средстве и активности [75].

Вериджин отличается от других ингибиторов тромбина, таких как гемадин [76–78], триабин [79] и босроджерецин [80, 81] по ряду физико-химических свойств. По-видимому, вериджин лучше всего сравним с гирулогами – синтетическими бивалентными ингибиторами тромбина, представляющими собой эффективные медикаменты. Преимущества вериджина по сравнению с гирулогами очевидны: во-первых, вериджины (s-вериджин и EP 25) содержат натуральные L-аминокислоты (гирулоги, в основном, имеют D-Phe), во-вторых, s-вериджин и EP 25 являются более сильными ингибиторами тромбина, чем гиру-

лог-1 (например EP 25, сравнимый по длине молекулы с гирулогом-1, ингибирует тромбин с более сильным сродством,  $K_i$  величины EP 25 и гирулога 1 составляют  $\sim 149,8$  и  $\sim 2500$  pM [70] соответственно). Наконец, хотя гирулоги и s-вериджин расщепляются тромбином, s-вериджин и EP 25 теряют ингибиторную активность с более медленной скоростью, чем гирулоги. Например, при соотношении ингибитор : тромбин = 3 : 1 гирулог-1 теряет ингибиторную активность, рассчитанную по гидролизу амидолитического субстрата тромбином, после  $\sim 15$  мин инкубации, тогда как s-вериджин и EP 25 теряют более 90% ингибиторной активности только через 24 часа. Так как C-концевой сегмент вериджина и гирулогов DFEA(E) IPPEYL весьма подобны, можно предположить, что улучшенное сродство и большая стабильность вериджина связаны, главным образом, с аминокислотной последовательностью N-концевого участка. Было показано, что активный сайт вериджина, связывающий тромбин, имеет последовательность EPKMНКТ. Поэтому идентификация этого уникального участка связывания активного сайта имеет важное значение как для понимания субстратного предпочтения тромбина, так и открытия нового пути создания прямых ингибиторов энзима [70, 83, 84].

Для более подробной характеристики вериджина были синтезированы три пептида — s-вериджин и его варианты. Синтетический вериджин (s-вериджин) по аминокислотной последовательности подобен исходному ингибитору, тогда как два других аналога — EP 25 и AP 18 — имеют укороченную соответственно на 7 и 14 остатков структуру в N-концевом участке [70, 85, 86].

При исследовании ингибирования амидолитической активности тромбина указанными выше пептидами показано их значительное сходство. Пептид s-вериджин также быстро и прочно связывается с тромбином, как и исходный вериджин, хотя из-за отсутствия гликозилирования треонина в его молекуле проявляется его более слабая активность. Амидолитическую активность тромбина также ингибирует EP 25, но стационарное равновесие ингибирования достигается относительно медленно (после 20-мин инкубации). По-видимому, делеция семи N-концевых остатков (SDQGDYA) изменяет способ связывания пептида с энзимом от fast к slow. Однако на эффективность ингибирования EP 25 эта делеция не влияет. При достижении равновесия EP 25 ингибирует тромбин в той же самой степени как s-вериджин:  $IC_{50}$  — величина для EP 25 и

s-вериджина составляет соответственно 5,63 и 5,40 нМ. Не ингибирует амидолитическую активность тромбина AP 18, поэтому предполагают, что этот пептид не связывается с активным центром тромбина. К тому же AP 18 слегка увеличивает амидолитическую активность энзима пропорционально концентрации ингибитора. Эти результаты показывают, что на способ связывания пептидов с тромбином влияет его сайт от 8 до 14 (EPKMНКТ) [76, 85].

Удлиняют время свертывания фибриногена S-вериджин, EP 25 и AP 18. Так как фибриноген связывает как активный центр, так и экзосайт-1 тромбина [64, 89], можно заключить, что C-концевой участок вериджина подобно гирудину связывается с экзосайтом-1 тромбина [75, 76]. Обнаружено, что s-вериджин является конкурентным ингибитором тромбина и величина  $K_i$  линейно возрастает с увеличением концентрации синтетического субстрата N-D-Phe-pipicolyl-Arg-p-nitroanilide (S2238) и составляет  $146,4 \pm 13,6$  pM, что в 14 раз больше, чем для n-вериджина ( $10,4 \pm 1,4$  pM). Наоборот, EP 25 медленно связывает тромбин. Величина константы скорости реакции первого порядка (K) для установления равновесия между исходным комплексом (EI) и конечным стабильным комплексом (EI\*) увеличивается гиперболически в зависимости от концентрации EP 25. Константа диссоциации EI составляет  $529,7 \pm 76,7$  pM, тогда как ингибиторная константа  $K_i$   $149,8 \pm 30,4$ . Таким образом,  $K_i$  EP 25 оказалась такой же, как для s-вериджина ( $146,4 \pm 13,6$  pM). Эти результаты подтверждают, что делеция семи N-концевых остатков не влияет на мощность ингибитора, но обуславливает переключение связывания ингибитора из fast- в slow-форму энзима без потери сродства связывания. Предполагают, что ряд электростатических взаимодействий между C-концом EP 25 и экзосайтом-I тромбина обуславливает быстрое образование исходного комплекса (EI) [70]. Это приводит к последовательному связыванию EPKMНКТ к активному сайту тромбина в slow-форме, что приводит к образованию стабилизированного комплекса энзим-ингибитор (EI\*). Наоборот, в интактном вериджине N-концевой участок вероятно двумя отрицательно заряженными остатками в аминокислотной последовательности SDQGDYA обеспечивает дополнительное электростатическое взаимодействие N-концевого сегмента, которое способствует приближению к активному сайту. Таким образом, вериджин представляет собой новый класс ингибиторов тромбина [86, 87].

В последнее время для лечения тромбозов вен предложены новые антикоагулянты — фондапаринукс, идрапаринукс и ксимелаготран, которые успешно прошли клинические испытания. Два первых препарата ингибируют фактор Ха, блокируя таким способом генерацию тромбина, последний препарат ингибирует непосредственно тромбин [87–90].

Фондапаринукс — синтетический аналог связывающего антитромбин пентасахарида, обнаруженного в гепарине или НМГ. Связываясь с высоким сродством с антитромбином, фондапаринукс вызывает конформационные изменения в активном центре антитромбина, что обуславливает усиление его взаимодействия с фактором Ха [91–94]. После образования комплекса фактор Ха–антитромбин фондапаринукс диссоциирует от антитромбина с сохранением ингибиторной активности. По своей структуре фондапаринукс является синтетическим аналогом пентасахарида, обнаруженного в высокомолекулярном и низкомолекулярном гепаринах. При создании такого антикоагулянта, как идрапаринукс, в состав фондапаринукса были введены дополнительные О-метилованные и О-сульфатированные группы, которые обусловили более высокое сродство этого ингибитора к антитромбину по сравнению с исходным фондапаринуксом [95, 96]. Из-за более прочного связывания с антитромбином период полужизни его удлинен и составляет ~80 часов (вместо 17 для фондапаринукса и 4 для низкомолекулярного гепарина). Было проведено сравнительное исследование указанных выше трех антикоагулянтов. Обнаружено, что ни фондапаринукс, ни идрапаринукс, в отличие от НМГ, не связываются эндотелиальными клетками или иными протеинами плазмы и не вызывают тромбоцитопении *in vivo*.

Синтетический ингибитор тромбина ксимелагатран является пролекарством мелагатрана, который по размерам молекулы (молекулярная масса 429 Да) соответствует размеру щели активного центра тромбина и, связываясь с энзимом, образует при этом обратимый комплекс 1 : 1, что блокирует его функцию. Мелагатран оказался мало пригодным при пероральном приеме. Для преодоления этой проблемы была создана неактивная форма этого соединения с молекулярной массой 474 Да, в N-концевую часть молекулы которого к карбоксильной и амидной группам была присоединена эфирная группа, а в C-концевую введена гидроксильная группа. Хотя ксимелагатран не проявляет существен-

ной антикоагулянтной активности, он через 2 интермедиата под влиянием эстеразы быстро превращается в активную форму мелагатран. Показано, что мелагатран циркулирует в плазме крови с периодом полужизни 3 часа у здоровых волонтеров и 4–5 часов у пациентов. Отмечен широкий спектр терапевтического действия синтетического пептида и эффективность его антикоагулянтной реакции [97–99].

В заключение следует отметить, что в настоящее время необходимо стремиться создавать аллостерические ингибиторы тромбина, которые бы действовали на  $\text{Na}^+$ -связывающий участок энзима. Для этого большую помощь могут оказать биотехнологические методы получения рекомбинантных ингибиторов при использовании сведений о сравнительной антитвертывающей активности фрагментов различных природных ингибиторов тромбина, имеющих анионную природу и, по-видимому, взаимодействующих с анионсвязывающим сайтом энзима. Основным приемом, используемым при синтезе ингибиторов прямого действия, является модификация аминокислотной последовательности физиологических субстратов тромбина в месте расщепляемой энзимом пептидной связи за счет введения групп, обуславливающих невозможность гидролиза этих соединений под действием тромбина.

Поскольку тромбин проявляет трипсиноподобную специфичность, то важным элементом структуры его ингибиторов является наличие положительно заряженной боковой группы. В белках и пептидах таким является остаток аргинина, гуанидиновая группа которого сохраняет положительный заряд в широком диапазоне рН. В синтетических соединениях используют гуанидиновую, амидиновую, тиониевую, аминогруппу, которые способны взаимодействовать с остатком Asp-189 на дне «кармана» первичного связывания S1 молекулы тромбина. Синтетические ингибиторы прямого действия являются более простыми соединениями, которые теоретически обладают рядом преимуществ в применении и использовании по сравнению с природными антикоагулянтами [100–103].

В современной терапии тромбозов практическое применение нашли такие антикоагулянты, как высокомолекулярный и низкомолекулярный гепарины, фондапаринукс, идрапаринукс, ксиломегатран, кумарин (варфарин) и другие. Указанные соединения функционируют сложным способом: например первые четыре ингибитора за счет активации эндогенных белковых ингибиторов, главным

образом антитромбина III и кофактора II гепарина, которые затем и осуществляют ингибирование тромбина; ксиломегатран вызывает прямое ингибирование энзима.

Для достижения максимального терапевтического эффекта с минимальными побочными явлениями необходимо применять указанные препараты в строго дозированном количестве. В противном случае могут развиваться побочные эффекты, которые включают тромбоцитопению и аутоиммунные реакции на реагенты или некроз кожи при их применении. Но наибольшую опасность представляют геморрагические осложнения, которые иногда могут быть летальными.

Следует также отметить, что аллостерическая регуляция активности в основном характерна для энзимов, имеющих сложную субъединичную структуру. Поэтому, чтобы предположить существование подобного эффекта для сравнительно небольшого протеина, следует допустить как наличие в нем удаленных от активного центра эффекторных участков, так и большую конформационную подвижность отдельных сегментов полипептидной цепи энзима, что значительно облегчает создание эффективных антитромботических средств, которые направлены на предотвращение тромботических осложнений, вызываемых сердечно-сосудистыми заболеваниями.

## ТРОМБІН І АНТИКОАГУЛЯНТНА ТЕРАПІЯ

М. В. Колодзейська, Л. І. Соколовська,  
В. О. Чернишенко, Е. В. Луговської

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна  
НАН України, Київ;  
e-mail: sokludmila@yandex.ru

В огляді наведено нові дані щодо раціональних підходів для здійснення фармакологічного контролю за процесом зсідання крові, що підтверджують ключову роль тромбіну у процесах гемостазу в порівнянні з іншими протеїназами. Описано модуляцію притаманних тромбіну властивостей, що є новим підходом для створення антитромбінових препаратів.

Алостерія тромбіну може бути основою для розвитку нової терапії. Створення каталітично інертного тромбіну у slow-формі з ефективною антикоагулянтною активністю *in vivo* уможливорює використання його в медицині як унікального антитромбінового агента.

Ключові слова: тромбін, протизсідна система, синтетичні інгібітори, взаємодія

катіон- $\pi$ , енергія зв'язування, електростатична потенційна поверхня, фармакологічний контроль.

## THROMBIN AND ANTICOAGULANT THERAPY

M. V. Kolodzeyskaya, L. I. Sokolovskaya,  
V. A. Chernyshenko, E. V. Lugovskoy

Palladin Institute of Biochemistry, National  
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;  
e-mail: sokludmila@yandex.ru

### Summary

New data which reveal rational approaches for pharmacologic control of blood coagulation process and confirm the key role of thrombin in haemostasis processes compared with other proteinases are presented in the review. Modulation of thrombin properties described in the review gives a new possibility for creating anti-thrombin preparations.

Thrombin allostera can serve a basis for development of new therapy. Creation of catalytically inert thrombin in slow-form within efficient anti-coagulant activity *in vivo* will allow using it in medicine as a unique anti-thrombin agent.

Key words: thrombin, anticoagulation system, synthetic inhibitors, interaction of cation- $\pi$ , finding energy, electrostatic potential surface, pharmacologic control.

1. Fersht A. R. // Enzyme Structure and Mechanism. 1985. Freeman. New-York.
2. Dang Q. D., Vindigni A., Di Cera E. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1995. — **92**, N 13. — P. 5977–5981.
3. Di Cera E., Guinto E. R., Vindigni A. et al. // J. Biol. Chem. — 1995. — **270**, N 38. — P. 22089–22092.
4. Ayala Y., Di Cera E. // J. Mol. Biol. — 1994. — **235**, N 2. — P. 733–746.
5. Wells Ch. M., Di Cera E. // Biochemistry. — 1992. — **31**, N 47. — P. 11721–11730.
6. Stone S. R., Betz A., Hofsteenge J. // Ibid. — 1991. — **30**, N 40. — P. 9841–9848.
7. Esmon C. T. // Biochim. Biophys. Acta. — 2000. — **1477**. — P. 349–360.
8. Esmon C. T. // Trends Immunol. — 2004. — **25**. — P. 536–542.
9. Esmon C. T. // Chest. — 2003. — **124**, N 3. — P. 26S–32S.
10. Krem M. M., Di Cera E. // Proteins. — 1998. — **30**, N 1. — P. 34–42.
11. Di Cera E. // Chest. — 2003. — **124**, N 3. — P. 11S–17S.

12. Колодзейская М. В., Волков Г. Л. // Укр. біохім. журн. – 2007. – **79**, № 1. – С. 5–21.
13. Bode W., Turk D., Karshikov A. // Protein Sci. – 1992. – **1**. – P. 426–471.
14. Sanschagrín P. C., Kuhn L. A. // Ibid. – 1998. – **7**, N 10. – P. 2054–2064.
15. Liu L. W., Vu T. K., Esmon C. T., Coughlin S. R. // J. Biol. Chem. – 1991. – **266**, N 26. – P. 16977–16980.
16. Кибирев В. К., Гершкович А. А. // Укр. біохім. журн. – 1999. – **71**, № 1. – С. 5–15.
17. Кибирев В. К., Гершкович А. А. // Там само. – С. 16–26.
18. Das J., Kimball S. D. // Bioorgan. and Med. Chem. – 1995. – **3**, N 8. – P. 999–1007.
19. Sixma J. J., de Groot P. G. // Thromb. Res. – 1992. – **68**, N 6. – P. 507–512.
20. Sturzenbecher J., Meier J. // J. Enzyme Inhibition. – 1995. – **5**. – P. 1–2.
21. Haseptmann J., Markwardt E. // Seminars in Thromb. and Haemost. – 1992. – **18**, N 2. – P. 200–217.
22. *The Design of Synthetic Inhibitors of Thrombin* / Ed. By G. Claeson, M. F. Scully, V. V. Kakkar, J. Deadman. – NY. – London: Plenum Press, 1993. – 300 p.
23. Hijikata-Okunomiya A., Okamoto S. // Seminars in Thromb. and Haemost. – 1992. – **18**, N 1. – P. 135–149.
24. Colwell N. S., Blinder M. A., Tsiang M. et al. // Biochemistry. – 1998. – **37**, N 43. – P. 15057–15065.
25. Verhamme I. M., Olson S. T., Tollefsen D. M., Bock P. E. // J. Biol. Chem. – 2002. – **277**, N 9. – P. 6788–6798.
26. Esmon C. T. // Chest. – 2003. – **124**, N 3. – Suppl. – P. 26S–32S.
27. Hirsh J., Weitz J. I. // Lancet. – 1999. – **353**, N 9162. – P. 1431–1436.
28. Weitz J. I. // N. Engl. J. Med. – 1997. – **337**, N 10. – P. 688–698.
29. Pineda A. O., Savvides S. N., Waksman G., Di Cera E. // J. Biol. Chem. – 2002. – **277**, N 43. – P. 40177–40180.
30. Schreiber G., Fersht A. R. // J. Mol. Biol. – 1995. – **248**, N 2. – P. 478–486.
31. Sun W. Y., Smirnow D., Jenkins M. L., Degen S. J. // Thromb. Haemost. – 2001. – **85**, N 4. – P. 651–654.
32. Hedstrom L., Perona J. J., Rutter W. J. // Biochemistry. – 1994. – **33**, N 29. – P. 8757–8763.
33. Richardson J. L., Kroger B., Hoffken W. et al. // EMBO J. – 2000. – **19**, N 21. – P. 5650–5660.
34. Cohen J. // Nature. – 2002. – **420**, N 6917. – P. 885–891.
35. Libby P. // Ibid. – P. 868–874.
36. Adrogue H. J., Madias N. E. // N. Engl. J. Med. – 2000. – **342**, N 21. – P. 1581–1589.
37. Adrogue H. J., Madias N. E. // Ibid. – N 20. – P. 1493–1499.
38. Rubin D., Christian C. // Pediatr. Emerg. Care. – 2001. – **17**, N 4. – P. 313–314.
39. Rezaie A. R., He X. // Biochemistry. – 2000. – **39**, N 7. – P. 1817–1825.
40. Retrovan R. J., Ruf W. // Ibid. – N 47. – P. 14457–14463.
41. He X., Rezaie A. R. // J. Biol. Chem. – 1999. – **274**, N 7. – P. 4970–4976.
42. De Filippis V., Colombo G., Russo J. et al. // Biochemistry. – 2002. – **41**. – P. 13556–13569.
43. Dennis M. S., Eigenbrot C., Skelton N. J. et al. // Nature. – 2000. – **404**. – P. 465–470.
44. De Cristofaro R., Corotti A., Akhavan S. et al. // FEBS J. – 2006. – **273**. – P. 159–169.
45. Di Cera E., De Cristofaro R., Albright D. J., Fenton J. W. // Biochemistry. – 1991. – **30**. – P. 7913–7924.
46. Mecozzi S., West A. P., Doungherty D. A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, – 1996. – **20**. – P. 10566–10571.
47. Daugherty D. A. // Science. – 1996. – **271**. – P. 163–186.
48. Doolittle R. F., Feng D. F., Tsang S. et al. // Ibid. – **271**. – P. 470–477.
49. De Filippis V., Quarzago D., Vindigni A. et al. // Biochemistry. – 1998. – **37**. – P. 13507–13515.
50. De Filippis V., Russo J., Vindigni A. et al. // Protein Sci. – 1999. – **8**. – P. 2213–2217.
51. Monien B. H., Henry B. L., Raghuraman A. et al. // Bioorg. Med. Chem. – 2006. – **14**. – P. 7988–7998.
52. Henry B. L., Monien B. H., Bock P. E., Desai U. R. // J. Biol. Chem. – 2007. – **282**, N 44. – P. 31891–31899.
53. Desai U. R. // Med. Res. Rev. – 2004. – **24**. – P. 151–181.
54. Davin I. B., Lewis N. G. // Curr. Opin. Biotechnol. – 2005. – **16**. – P. 407–415.
55. Reale S., Di Tullio A., Spreti N., De Angelis F. // Mass. Spectrom. Rev. – 2004. – **23**. – P. 87–126.
56. Weitz J. I., Buller H. R. // Circulation. – 2002. – **105**. – P. 1004–1011.
57. Nutescu E. A., Shapiro N. I., Chevalier A. // Clin. Geriatr. Med. – 2006. – **22**. – P. 33–56.
58. Kikelj D. // Pathophysiol. Haemost. Thromb. – 2003. – **33**. – P. 487–491.
59. Gerotziapas G. T., Samama M. M. // Curr. Pharm. Des. – 2005. – **11**. – P. 3855–3876.

60. *Rezaie A. R.* // J. Biol. Chem. – 2000. – **275**. – P. 3320–3327.
61. *Bianchini E. P., Pike R. N., Le Bonnie B. F.* // Ibid. – 2004. – **279**. – P. 3671–3679.
62. *Olson S. T., Swanson R., Raub-Segall E. et al.* // Thromb. Haemost. – 2004. – **92**. – P. 929–939.
63. *Bedsted T., Swanson R., Chuang Y. J. et al.* // Biochemistry. – 2003. – **42**. – P. 8143–8152.
64. *Huntington J. A.* // J. Thromb. Haemost. – 2005. – **3**. – P. 1861–1872.
65. *Davie E. W., Kulman J. D.* // Semin. Thromb. Haemost. – 2006. – **32**. – P. 3–15.
66. *Lane D. A., Philippou H., Huntington J. A.* // Blood. – 2005. – **106**. – P. 2605–2612.
67. *Olson S. T., Halvorson H. R., Bjurk J.* // J. Biol. Chem. – 1991. – **266**. – P. 6342–6352.
68. *Carter W. J., Cama E. and Huntington J. A.* // Ibid. – 2005. – **280**. – P. 2745–2749.
69. *Richardson J. I., Fuentes-Prior P., Sadler J. E. et al.* // Biochemistry. – 2002. – **41**. – P. 2535–2542.
70. *Koh Ch. Ye., Kazimirova M., Trimnell A. et al.* // J. Biol. Chem. – 2007. – **282**, N 40. – P. 29101–29113.
71. *Schwienhorst A.* // Cell. Mol. Life Sci. – 2006. – **63**. – P. 2773–2791.
72. *Rydel T. J., Tulinsky A., Bode W., Huber R.* // J. Mol. Biol. – 1991. – **221**. – P. 583–601.
73. *Van de Locht A., Lamba D., Bauer M. et al.* // EMBO J. – 1996. – **15**. – P. 6011–6017.
74. *Salzet M., Chopin V., Baert J. et al.* // J. Biol. Chem. – 2000. – **275**. – P. 30774–30780.
75. *Maraganore J. M., Chao B., Joseph M. L. et al.* // Ibid. – 1989. – **264**. – P. 8692–8698.
76. *Naski M. C., Fenton J. W., Maraganore J. M. et al.* // Ibid. – 1990. – **265**. – P. 13484–13489.
77. *Strube K. H., Kroger B., Bialojan S. et al.* // Ibid. – 1993. – **268**. – P. 8590–8595.
78. *Richardson J. I., Kroger B., Hoffken W. et al.* // EMBO J. – 2000. – **19**. – P. 5650–5660.
79. *Fuentes-Prior P., Noeske Junblut C., Donner P. et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1997. – **94**. – P. 11845–11850.
80. *Arocas V., Lemaire C., Bouton M. C. et al.* // Thromb. Haemost. – 1998. – **79**. – P. 1157–1161.
81. *Monteiro R. Q., Raposo J. G., Wisner A. et al.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1999. – **262**. – P. 819–822.
82. *Anderson P. J., Nasset A., Dharmawardana K. R. et al.* // J. Biol. Chem. – 2000. – **275**, N 22. – P. 16428–16442.
83. *Monteiro R. Q., Bock P. E., Bianconi M. L. et al.* // Protein Science. – 2001. – **10**. – P. 1897–1904.
84. *Gurm H. S., Bhatt D. I.* // Am. Heart. – 2005. – **149**. – P. S43–S53.
85. *Page M. J., Macgillivray R. T., Di Cera E.* // J. Thromb. Haemost. – 2005. – **3**. – P. 2401–2408.
86. *Kim K. S., Tarakeshuwar P., Lee J. G.* // Chem. Rev. – 2000. – **100**. – P. 4145–4185.
87. *Eriksson H., Wahlander K., Gustafsson D. et al.* // J. Thromb. Haemost. – 2003. – **1**. – P. 41–47.
88. *Schulman M. D., Wahlander K., Torbjurn M. D. et al.* // The New Engl. J. Med. – 2003. – **349**. – P. 1713–1721.
89. *Weitz J. I.* // Circulation. – 2004. – **110**. – (Suppl. 1) – P. 1–26.
90. *Bauer K. A.* // Chest. – 2003. – **124**. – P. 364S–370S.
91. *Samama M. M., Gerotziafas G. T.* // Thromb. Res. – 2003. – **109**. – P. 1–11.
92. *Herbert J. M., Herault J. P., Bernat A. et al.* // Blood. – 1998. – **91**. – P. 4197–4205.
93. *Gustafsson D., Eng M.* // Thromb. Res. – 2003. – **109**. (Suppl. 1). – P. S9–S15.
94. *Johansson L. C., Andersson M., Fager G. et al.* // Clin. Pharmacokinet. – 2003. – **42**. – P. 475–484.
95. *Sarich T. C., Teng R., Peters G. R. et al.* // Ibid. – P. 485–492.
96. *Wahlander K., Eriksson-Lepkowska M., Frison L. et al.* // Ibid. – P. 755–764.
97. *Johansson L. C., Frison L., Logren U. et al.* // Ibid. – P. 381–392.
98. *Paolucci F., Clavies M. C., Donat F. et al.* // Ibid. – 2002. – **41**. (Suppl. 2). – P. 11–18.
99. *Buller H. R., Cohen A. T., Davidson B. et al.* // N. Engl. J. Med. – 2007. – **357**. – P. 1094–1104.
100. *De Filippis V., De Dea E., Lucatello F., Franson R.* // Biochem. J. – 2005. – **390**. – P. 485–492.
101. *Krem M. M., Di Cera E.* // EMBO J. – 2001. – **20**. – P. 3036–3045.
102. *Krem M. M., Di Cera E.* // Trends Biochem. Sci. – 2002. – **27**, N 2. – P. 67–74.
103. *Pineda A. O., Savvides S. N., Waksman G., Di Cera E.* // J. Biol. Chem. – 2002. – **277**, N 43. – P. 40177–40180.
104. *Prasad S., Wright K. J., Banerjee Roy D. et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2003. – **100**, N 24. – P. 13785–13790.
105. *Abrahams J. P., Thomassen E. A.* // Structure. – 2003. – **11**. – P. 363–354.
106. *Гершкович А. А.* // Биохимия. – 1996. – **61**, вып. 7. – С. 1139–1151.
107. *Bode W., Mayr I., Baumann U. et al.* // EMBO J. – 1989. – **8**. – P. 3467–3475.
108. *Gruber A., Cantwell A. M., Di Cera E., Hanson S. R.* // J. Biol. Chem. – 2002. – **277**, N 29. – P. 27581–27584.
109. *Pineda A. O., Carrell Ch. J., Bush L. A. et al.* // Ibid. – 2004. – **279**, N 30. – P. 31842–31853.

Получено 18.11.2008