

ПРОТЕЇН С: МЕХАНІЗМИ ФУНКЦІОНУВАННЯ ТА МЕТОДИ ОДЕРЖАННЯ

Д. Д. ЖЕРНОСЕКОВ¹, Т. В. КУРКІНА^{1,2}

¹ Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ

² Київський національний університет імені Тараса Шевченка

E-mail: chemikdd@mail.ru, kurkina_tanya@ukr.net

Система протеїну С становить важливу ланку регуляції численних фізіологічних і патофізіологічних процесів організму. Розглянуто особливості структури протеїну С та механізми його активації. Особливу увагу приділено функціонуванню активованого протеїну С, його антикоагулянтним, протизапальним і профібринолітичним властивостям. З'ясовується можливе терапевтичне застосування препарату протеїну С для лікування багатьох патологій, що характеризуються дефіцитом цього білка. Описано існуючі джерела та підходи до одержання препарату протеїну С.

Ключові слова: протеїн С, гемостаз, антикоагулянт, запалення.

За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, серцево-судинні захворювання є найпоширенішими серед неінфекційних хвороб. Велику роль у розвитку ускладнень і високій смертності від серцево-судинних захворювань відіграють їхній тісний взаємозв'язок з багатьма хронічними недугами, посилення ризику при гострих хворобах, а також відсутність досконалих методів діагностики, прогнозування та лікування різноманітних патологій. Пошук засобів вдосконалення існуючих методик і впровадження передових підходів для лікування подібних відхилень є вкрай актуальним завданням. Сучасні методики лікування мають враховувати ключові фізіологічні й біохімічні процеси, яким часто притаманний надсистемний характер. Останнім часом дедалі більшу увагу дослідників привертають молекулярні механізми, що лежать в основі взаємодії різних фізіологічних та біохімічних систем. Так, система гемостазу крові перебуває у тісному зв'язку з ланкою імунної системи, що відповідає за ініціацію та розвиток запальних процесів. Регуляція запальних і гемостатичних процесів — це складні й багатокомпонентні каскади реакцій, що перебігають на різних рівнях, підсилюючи чи інгібуючи один одного. Од-

ним із білків плазми крові, що регулює як запальні, так і гемостатичні реакції, є протеїн С [1]. Завдяки значній функціональній значущості протеїн С видається одним з потенційних засобів лікування серцево-судинних захворювань і тромботичних ускладнень, що зумовлені запальними агентами або, навпаки, спричинюють їх появу.

Гемостаз забезпечує циркуляцію крові у рідкому стані кровоносними судинами організму і зупинку кровотеч у разі ушкодження судин. Ці функції виконують три ланки гемостазу: система зсідання крові, фібринолітична та антикоагулянтна системи. Протеїн С є гуморальним компонентом системи гемостазу, проте функціонування цього білка тісно пов'язано з її тканинними і тромбоцитарними компонентами. Дія протеїну С полягає у виконанні антикоагулянтних функцій, модуляції фібринолізу і запалення, індукції сигнальних шляхів.

Ще в 1960 р. Seegers W. відкрив активований протеїн С (названий тоді автопротромбіном IIa) і показав його здатність пригнічувати зсідання крові [2,3]. Неактивний протеїн С уперше було виділено Stenflo J. у 1979 р. з бичачої плазми в комплексі з вітаміном К-залежними білками, що розділялися іонообмінною хроматографією на

ДЕАЕ-сефарозі. Згодом цей білок назвали протеїном С; він виявився проферментом відкритого раніше активованого протеїну С [4].

Структура протеїну С. У крові може циркулювати як одно-, так і дволанцюгова форма протеїну С з переважанням останньої. Концентрація протеїну С у плазмі є досить низькою (2–5 мкг/мл або 40–80 нМ). Легкий ланцюг дволанцюгового протеїну С містить GlA-домен, до складу якого входять 9 залишків γ -карбоксихлутамінової кислоти. Саме тому протеїн С відносять до групи вітамін К-залежних білків. γ -Карбоксихлутамінами є залишки глутамату в положеннях 6, 7, 14, 16, 19, 20, 25, 26 і 29 [5]. Asp71 піддається β -гідроксилюванню [6]. До складу протеїну С також входять два домени, подібні до епідермального фактора росту (Epidermal Growth Factor domain — EGF). Основну частину важкого ланцюга становить типовий для серинових протеїназ каталітичний домен. Також важкий ланцюг містить NH₂-кінцевий активаційний пептид, що містить 12 амінокислотних залишків (рис. 1). Молекулярна маса протеїну — 62 кДа (21 кДа і 41 кДа для легкого і важкого ланцюгів відповідно). Вуглеводна частина молекули становить 23% від маси. Глікозилюваними у протеїну С є амінокислотні залишки Asn 97, Asn248, Asn313 і Asn329. Глікозилювання цих сайтів впливає на секрецію, подальший процесинг, інгібіторні властивості Ca²⁺ відносно активації протеїну С тромбіном без тромбомодуліну та на Е-селектинопоередковану клітинну адгезію [7, 8]. Ізоелектрична точка протеїну С лежить у межах рН 4,4–4,8. Коефіцієнт екстинкції E²⁸⁰_{1%} = 14,5. Час півжиття у плазмі — 8–12 годин. Ген протеїну С людини містить 8 екзонів та локалізується на хромосомі 2q13–q14. Унаслідок трансляції утворюється поліпептидний ланцюг, у якому 42 амінокислотні залишки складає літерна послідовність, 155 — легкий ланцюг, 262 — важкий ланцюг [9].

Активация протеїну С відбувається на мембрані ендотеліальних клітин і тромбоцитів (рис. 2). В основі активації лежить реакція відщеплення активаційного пептиду тромбіном. Однак для здійснення цієї реакції тромбіну необхідно перемкнутися зі шляху зсідання на шлях протизсідання. Білком, що забезпечує таке перемикання, є тромбомодулін. Внаслідок зв'язування з ним тромбін перестає виконувати прокоагулянтні функції, тобто перетворювати фібриноген на фібрин та активувати тромбоцити, фактори V і XIII. При цьому в 1 000 разів зростає здатність тромбіну зв'язувати й активувати

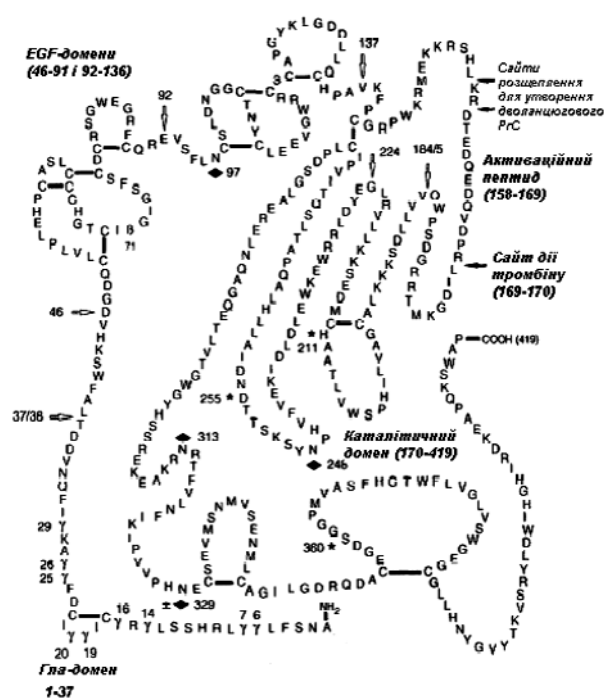


Рис 1. Схема первинної структури протеїну С:
* — амінокислотні залишки активного центру;
♦ — глікозилювані амінокислотні залишки;
γ-залишки γ -карбоксихлутамінової кислоти [10]

протеїн С [11]. У процесі активації протеїну С суттєва роль належить іонам кальцію і мембранним фосфоліпідам [12]. Також в активації бере участь ендотеліальний рецептор протеїну С (Endothelial cell Protein C Receptor — EPCR), що посилює цю реакцію у 20 разів. EPCR міститься на мембранах клітин артерій. На поверхні тромбоцитів активація протеїну С стимулюється тромбоцитарним фактором 4 (Platelet Factor 4 — PF4). Окрім тромбіну, протеїн С може бути активований фактором Ха. Ця реакція посилюється фактором Va. Також як специфічні активатори протеїну С можуть використовуватися активатори з отрут щитомордника. Неспецифічно протеїн С може бути активований трипсином і активатором фактора X з отрути гадюки Рассела. Фізіологічними інгібіторами активованого протеїну С у плазмі є α_1 -інгібітор протеїназ [13], α_2 -макроглобулін [14], α_2 -антиплазмін і гепарин-стимульований інгібітор протеїну С (protein C inhibitor — PCI) [15]. На поверхні тромбоцитів нексин I [16,17], а також вітронектин у комплексі з інгібітором активатора плазміногену контролюють дію активованого протеїну С [18].

Як же протеїн С здійснює антикоагулянтні функції? Відомо, що перетворення протромбіну на тромбін опосередковано

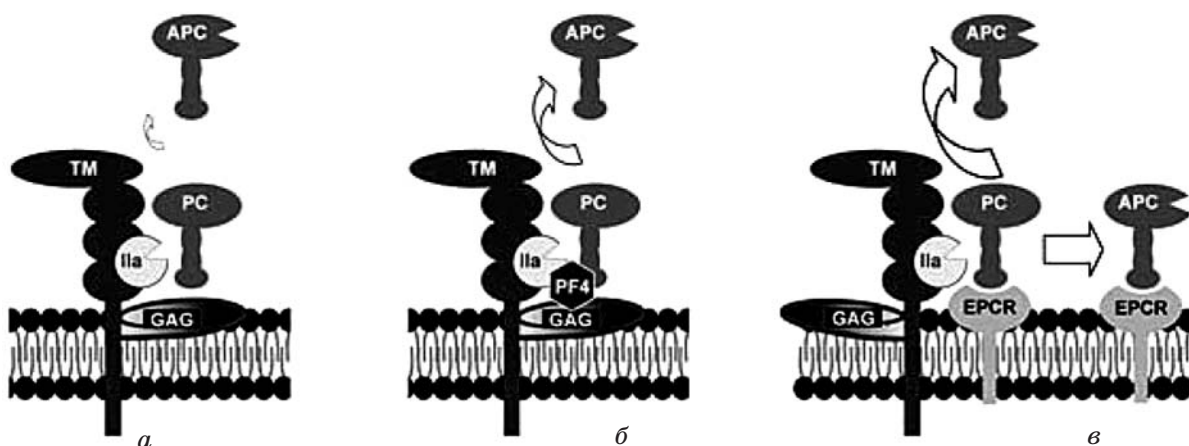


Рис. 2. Активація протеїну С (розміщено в порядку зростання швидкості активації):

- a* — механізм активації комплексом тромбін–тромбомодулін — сульфатований глікозаміноглікан;
б — із залученням тромбоцитарного фактора 4 на поверхні тромбоцитів;
в — із залученням епідермального рецептора протеїну С на поверхні епітеліальних клітин великих артерій.
 APC — активований протеїн С; IIa — тромбін;
 PC — протеїн С; GAG — глікозаміноглікан;
 PF4 — тромбоцитарний фактор 4; TM — тромбомодулін;
 EPCR — рецептор протеїну С ендотеліальних клітин [19]

формуванням білкових комплексів (теназного — фактори VIII, IX і протромбіназного — фактори X, V) на мембрані активованих клітин судин. Фактори VIIIa і Va є кофакторами активації протеїназ з'єднання. У процесі генерації тромбіну він сам посилює свою подальшу активацію шляхом активування факторів VIII і V. Дія активного протеїну С спрямована на розщеплення цих факторів і таким чином на інгібування генерації тромбіну [20].

Збалансований рівень білків гемостазу в плазмі забезпечує активацію протеїну С генерованим тромбіном. Активований протеїн С запобігає підсиленню продукування тромбіну через інактивацію кофакторів цього процесу. Паралельно в нормальному режимі працює фібриноліз, що забезпечує розчинення недоцільно утворених полімерів фібрину. Інактивація факторів VIIIa і Va активованим протеїном С пришвидшується за наявності Ca^{2+} і фосфоліпідів. Спорідненість активного протеїну С до фосфоліпідів підвищує протеїн S, що також є вітамін К-залежним білком і синтезується печінкою, ендотеліальними клітинами і тромбоцитами. Наявність іонів Ca^{2+} є важливим регульовальним фактором у функціонуванні протеїну С, оскільки вони не лише стимулюють активацію зимогену тромбіном у присутності тромбомодуліну, а й інгібують активацію за його відсутності. Розміщена поряд з Ca^{2+} -зв'язувальним сайтом протеазного домену автолітична петля протеїну С (залиш-

ки 301–316) на 5 амінокислотних залишків довша від цієї самої структури в інших серинових протеаз. Вважають, що ця петля, просторово взаємодіючи з активаційним пептидом, відіграє вирішальну роль у підтримці конформації зимогену, що не піддається розщепленню тромбіном за відсутності тромбомодуліну [21].

Важливу роль відіграє протеїн С також як профібринолітик. У численних експериментах *in vivo* й *in vitro* показано здатність активованого протеїну С стимулювати фібриноліз, однак механізм цієї реакції ще повною мірою не з'ясовано. Видається вірогідною ідея про посилення фібринолізу через інгібування генерації тромбіну, що призводить до зменшення активації інгібітора фібринолізу, який активується тромбіном (TAFI) [22], а також пригнічення низки процесів, зумовлених тромбіном, у тому числі й секреції інгібіторів активаторів плазміногену. TAFI інгібує фібриноліз, відщеплюючи С-кінцеві лізини фібрину, що є місцем зв'язування плазміногену — проформи ключового ферменту фібринолізу. Подібно до протеїну С, активація TAFI забезпечується комплексом тромбін–тромбомодулін. Таким чином, на рівні цього комплексу відбувається балансування процесів з'єднання крові та фібринолізу. За умов запалення вірогіднішою є активація TAFI, оскільки окисні реакції, характерні для вогнища запалення, не зачіпають важливі для цього процесу сайти в молекулі тромбомодуліну,

тимчасом як здатність активувати протеїн С значно зменшується. Досліджуючи хворих на діабет, виявили кореляцію рівня циркулюючого ТАФІ і комплексу АРС-РСІ, що свідчить про сприяння АРС фібринолізу через модуляцію дії ТАФІ. Проте значне зменшення відношення концентрації D-димерів до комплексів тромбіну з антитромбіном III (DD/ТАТ) у цих пацієнтів порівняно з контролем дозволяє припустити, що рівень АРС недостатній для протидії пригніченню фібринолізу [23].

Деякі вчені запропонували механізм регуляції фібринолізу через комплексоутворення з інгібітором активатора плазміногену (РАІ-1) і вивільнення активаторів плазміногену [25]. Так, антикоагулянтний ефект протеїну С значно послаблений на активованих тромбоцитах. Активовані тромбоцити виділяють велику кількість РАІ-1 і вітронектину. Вітронектин у 300 разів посилює інгібування активованого протеїну С інгібітором активатора плазміногену-1 (константа швидкості другого порядку $1,8 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ порівняно з $5,7 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ у разі системи без вітронектину). Отже, РАІ-1 може бути основним фізіологічним інгібітором активованого протеїну С за умов гострої фази, коли посилюються прокоагулянтні процеси [18]. Тому нейтралізації протитромболітичного і прокоагулянтного ефекту РАІ-1 можна досягти шляхом уведення екзогенного АПС пацієнтам, яких лікують тромболітиками. Так, позитивний ефект спостерігався під час уведення АПС пацієнтам з гострим інфарктом міокарда, яких лікували рекомбінантним тканинним активатором плазміногену. Крім того, активований протеїн С інгібує продукування TNF-b, що стимулює експресію РАІ-1 ендотеліальними клітинами [26].

Участь протеїну С у регуляції запальних процесів є яскравим прикладом функціональної залежності процесів запалення і коагуляції (рис. 3). Ініціатором зсідання є контакт тканинного фактора з кров'ю. У нормі тканинний фактор представлений клітинами у місцях, ізольованих від крові. Порушення цілісності тканин призводить до припинення цієї ізоляції. При цьому утворюється комплекс тканинного фактора з фактором VII, що зумовлює активацію фактора X і утворення тромбіну. При запаленнях, спричинених патологіями, і потрапленні в кров'яне русло ендотоксину, що супроводжується запаленням, моноцити і ендотеліальні клітини можуть бути стимульовані до експресії тканинного фактора. Це може спричинити активацію зовнішнього механізму зсідання крові і генерації тромбіну. Тромбін є підси-

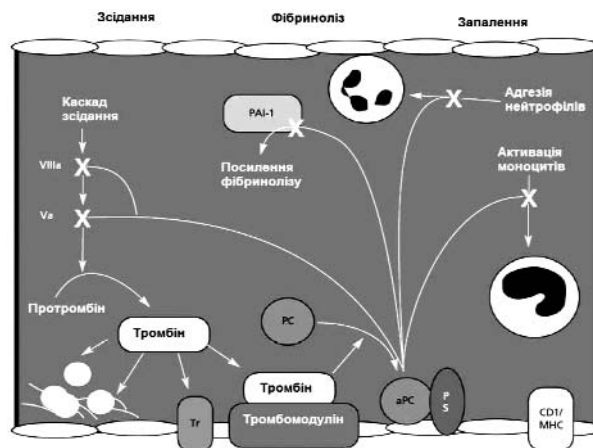


Рис. 3. Роль активованого протеїну С в регуляції запалення, зсідання крові та фібринолізу: РС — протеїн С; аРС — активований протеїн С; PS — протеїн S; РАІ-1 — інгібітор активатора плазміногену першого типу; Tr — рецептор тромбіну; CD1/МНС — головний комплекс гістосумісності; Va — активований фактор V; VIIIa — активований фактор VIII [24]

лювачем запальних реакцій. Як активатор тромбоцитів, він індукує секрецію білків адгезії, стимуляторів хемотаксису моноцитів, тромбоцитарного фактора росту. Також тромбін є мітогеном для більшості клітин, що реалізують запалення. Активація тромбіном тканинних фібробластів індукує секрецію фактора росту судинного ендотелію і простагландину E₂.

Наслідком запалення є пригнічення фібринолізу і зниження антикоагулянтного потенціалу плазми, у тому числі й у зв'язку з інгібуванням шляху протеїну С. Причинами зниження протеїн С-обумовленого антикоагулянтного потенціалу плазми при запаленнях є блокування медіаторами запалення IL-1 і TNF-α, а також ендотоксинами транскрипції генів тромбомодуліну і ендотеліального рецептора протеїну С, збільшення кількості вищеплюваних із мембрани молекул тромбомодуліну та ендотеліального рецептора протеїну С, пов'язане зі збільшенням кількості окисників у вогнищі запалення, окиснення метіоніну в молекулі тромбомодуліну, що зумовлює зменшення його кофакторної активності в реакції активації протеїну С, а також підвищення рівня С4b-зв'язувального білка, який утворює комплекси з протеїном S, позбавляючи його можливості виступати кофактором активного протеїну С [1].

Велика кількість експериментальних даних підтвердила важливу роль активованого протеїну С як протизапального агента.

Його протизапальна дія виявляється у впливі на моноцити (він зменшує продукування ІІ-1, TNF- α), інгібуванні ролінгу нейтрофілів, захисті епітеліальних клітин від загибелі. Індукцію сигнальних шляхів спричинює протеолітична активація PAR-1 рецепторів активованим протеїном С у комплексі з EPCR. Показано антиоксидантну, цитопротекторну і антиапоптотичну дію активованого протеїну С та розглядається можливість застосування його на противагу згубним для нервової системи ефектам рекомбінантного тканинного активатора плазміногену [27, 28]. У свою чергу, зменшення запалення сприяє зниженню прокоагулянтних і протифібринолітичних властивостей плазми загальною, що, знову ж таки, має сприяти зменшенню запалення. Тому патології в системі протеїну С спричинюють серйозні порушення діяльності всього організму.

Існує низка хвороб, безпосередньо пов'язаних із дисфункцією протеїну С. Так, відома спадкова недостатність протеїну С двох типів: тип І, зумовлений зниженням синтезу протеїну С печінкою, і тип ІІ, пов'язаний з дефектами структури молекули. Рівень протеїну С перебуває в межах норми, але він втрачає здатність до взаємодії з тромбіном. Спадкова недостатність протеїну С може бути як гетерозиготною (частота — 1 випадок серед 200–300 дорослих), так і гомозиготною (1 випадок на 160 000–360 000 новонароджених). Серйозні клінічні симптоми з'являються, коли концентрація протеїну С перебуває на рівні 20–25% від норми. У такому разі судини шкіри, очей, нирок і мозку найбільшою мірою схильні до некрозів і тромбозів [29, 30].

Дефіцит протеїну С, як й інших антикоагулянтів, — досить рідкісне явище, на відміну від резистентності до активованого протеїну С. Ця хвороба характеризується мутацією гена фактора V, за якої фактор Va втрачає здатність до інактивації протеїну С. Ще частішими є випадки набутої недостатності протеїну С, що може бути спричинено хворобами печінки, ДВС-синдромом, лікуванням антагоністами вітаміну К, злоякісними новоутвореннями й іншими патологіями [31].

Ключова роль протеїну С у захисних системах організму зумовила потребу в одержанні очищеного препарату цього білка. Для отримання концентрату протеїну С використовують плазму крові, культуру клітин та молоко трансгенних тварин. Кожне із цих вихідних джерел має певні недоліки та переваги. Так, одержання протеїну С з куль-

тури *E. coli* є відносно недорогим та ефективним засобом, однак синтезований таким чином протеїн С може бути неактивним через неправильний фолдинг або посттрансляційне глікозилювання. Препарат протеїну С, отриманий з молока трансгенних тварин, є досить дорогим, але його фолдинг та посттрансляційні модифікації є більш відповідними до природного білка. Вже одержано препарат з молока трансгенних свиней з концентрацією протеїну С 1 г/л (для порівняння: концентрація протеїну С у плазмі людини — 4 мг/л) [32]. Однак технологія подальшого очищення протеїну С з молока трансгенних тварин виявилась украй неефективною. Кінцевий вихід цільового білка становив лише 24%, головним чином через значні втрати протеїну С на стадії відділення від казеїнів молока [33].

У подальшому було запропоновано використання методу очищення протеїну С з молока трансгенних тварин на основі металоафінної хроматографії на залізовмісному сорбенті. Таким чином вдалося досягти відділення протеїну С від α -лактальбуміну, β -лактоглобуліну та казеїнів, однак, як свідчили результати перевірки амідолітичної активності очищеного препарату, кінцевий вихід протеїну С був невисоким. Автори роботи вважають, що значна кількість протеїну С залишилася зв'язаною з колонкою [34]. Отже, хоча використання трансгенних тварин для одержання протеїну С має свої переваги, цей метод є досить високовартісним. Окрім того, отримані з молока трансгенних тварин білки можуть викликати у пацієнтів алергійні реакції. Відомо, що домішка денатурованих похідних у нативних білках сприяє ініціації аутоімунних процесів відносно нативної ізоформи, що зумовлює виникнення тяжких патологічних ускладнень [35]. Тому для отримання протеїну С актуальним залишається використання донорської плазми та її фракцій. Найефективнішим методом для очищення протеїну С вважають імуноафінну хроматографію. Ще в 1995 р. Ortner та співавтори запропонували метод імуноафінного очищення, поєднаний з вірусною інактивацією препарату Pr С [36]. Для вірусної інактивації було розроблено сольвентдетергентний прийом, завдяки якому здійснювалась інактивація вірусу СНІДу. Протеїн С було очищено в 13 600 разів порівняно з препаратом плазми, кінцевий продукт мав специфічну активність 231 одиниця/мг [36]. Незважаючи на високу ефективність цього методу, деякі автори [37, 38] відзначають його

недоліки, пов'язані із забрудненням кінцевого продукту антитілами мишей. До того ж технологія використання моноклональних антитіл дуже високовартісна.

Оскільки перед хроматографічним очищенням препарату протеїну С донорська плазма потребує додаткових етапів очищення (адсорбція вітамін К-залежних білків на сульфаті барію, фракціонування сульфатом амонію), деякі автори вважають за доцільне використання фракції IV-1 за Коном. З літературних джерел відомо, що ця фракція містить близько 100 мкг протеїну С на 1 г пасти [39]. Але крім Pr C, фракція IV-1 за Коном містить й інші білки: альбумін, α -1-антитрипсин, антитромбін III, церулоплазмін, протромбін тощо. Деякі з цих білків є інгібіторами активованого протеїну С, тому присутність їх в очищеному препараті є небажаною [40]. Фракції IV та IV-1 за Коном є зручним джерелом для одержання Pr C, тому що це побічний продукт у процесі фракціонування плазми крові з метою отримання сироваткового альбуміну. У вітчизняній фармакологічній промисловості ці фракції використовують для одержання препарату полібіоліну [41]. Доведено, що полібіолін має протизапальну дію. Цілком імовірно, що певною мірою це зумовлено присутністю в цьому препараті Pr C та церулоплазміну, для яких теж визначено проти-запальний ефект. У разі очищення фракції IV за Коном доцільним є послідовне використання іонообмінної хроматографії на ДЕАЕ-FF-сефарозі та хроматографії на металоафінному сорбенті [42]. За даними цих авторів, завдяки сумісному використанню зазначених носіїв, можна досягти очищення фракції IV-1 за Коном у 128 разів.

Підсумовуючи дані щодо очищення протеїну С з різних джерел, можна зробити висновки, що найбільш доцільним для розроблення препарату протеїну С може бути очищення IV-1 фракції за Коном та послідовне очищення препарату на іонообміннику та металоафінному сорбентах. Слід також зазначити, що внаслідок складної багатомодульної будови протеїну С належить до лабільних білків, що схильні до аутоінактивації та потребують розроблення спеціальних методів збереження нативної структури [35].

Застосуванню протеїну С з терапевтичною метою присвячено чимало робіт. Велику роль у цих дослідженнях відіграла програма PROWESS (Recombinant Human Activated Protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis), що завершилась уведенням

до клінічної практики рекомбінантного активованого протеїну С Xigris [*Drotrecogin alpha* (Eli Lilly, США/Німеччина)] для лікування тяжкого сепсису з високим ризиком летального кінця. Використання активованого протеїну С у клініці продемонструвало зниження смертності від сепсису на 19,4%. При цьому ризик масивних кровотеч дорівнював 3,5% у досліджуваній групі (проти 2% у контрольній). Водночас у рамках дослідження RESOLVE (REsearching severe Sepsis and Organ dysfunction in children: a gLobal perspective) підтвердити ефективність активованого рекомбінантного протеїну С у дітей з тяжкою формою сепсису не вдалося [43].

Окрім рекомбінантного, зареєстровано отримані з плазми крові людини препарати протеїну С Ceprotin (Baxter International, Австрія) і Protexel (LFB, Франція) [44], а також його активної форми AnactC (Kaketsuken, Японія) [45]. Вони призначені для запобігання і лікування венозних тромбозів і геморагічної висипки за значної вродженої недостатності протеїну С. Донедавна ці препарати були зареєстровані лише на внутрішніх (європейському чи японському) ринках. Але в березні 2007 р. американська Агенція з контролю якості їжі і лікарських препаратів (Food and Drug Administration, FDA) схвалила використання Ceprotin для лікування вродженої недостатності цього білка. В Європі цей препарат було затверджено ЕМЕА ще в 2001 р. Відзначається ефективність препаратів протеїну С при терапії набутієї недостатності цього білка [29].

Виходячи з наведених даних про властивості протеїну С, видається доцільним подальше розроблення методів його одержання, вивчення функціональної ролі, а також дослідження застосування цього білка чи його активної форми для запобігання повторному тромбоутворенню і патологічним наслідкам експресії значної кількості PAI-1, для корекції запальних процесів, як нейрорепротектора при інсульті та для лікування дефіциту протеїну С. Враховуючи вагомість системи протеїну С у регуляції як запальних, так і гемостатичних процесів, модуляція вмісту її компонентів може стати основою прогресивних і якісно нових стратегій лікування серцево-судинних та багатьох інших захворювань [46, 47, 48].

ЛІТЕРАТУРА

1. *Esmon C.* The anticoagulant and anti-inflammatory roles of the protein C anticoagulant pathway // *J. Autoimmun.* — 2000. — V. 15, N2. — P. 113–116.
2. *Mammen E., Thomas W., Seegers W.* Activation of purified prothrombin to autoprothrombin I or autoprothrombin II (platelet cofactor II) or autoprothrombin II-A // *Thromb Diath Haemorrh.* — 1960. — V. 5. — P. 218–249.
3. *Seegers W., Novoa E., Henry R., Hassouna H.* Relationship of «new» vitamin K-dependent Protein C and «old» autoprothrombin II-a // *Thromb Res.* — 1976. — V. 8, N5. — P. 543–552.
4. *Stenflo J.* A new vitamin K-dependent protein. Purification from bovine plasma and preliminary characterization // *J. Biol. Chem.* — 1976. — V. 251, N2. — P. 355–363.
5. *Beckmann R., Schmidt R., Santerre R. et al.* The structure and evolution of a 461 amino acid human protein C precursor and its messenger RNA, based upon the DNA sequence of cloned human liver cDNAs // *Nucleic Acids Research.* — 1985. — V. 13, N14. — P. 5233–5247.
6. *Drakenberg T., Femlund P., Roepstorff P. et al.* β -Hydroxyaspartic acid in vitamin K-dependent protein C // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1983. — V. 80, N7. — P. 1802–1806.
7. *Grinnell S., Walls J., Gerlitz B.* Glycosylation of human protein C affects its secretion, processing, functional activities, and activation by thrombin // *J. Biol. Chem.* — 1991. — V. 266, N15. — P. 9778–9785.
8. *Grinnell S., Hermann R., Yan S.* Human protein C inhibits selectin-mediated cell adhesion: role of unique fucosylated oligosaccharide // *Glycobiology.* — 1994. — V. 4, N2. — P. 221–225.
9. *Patracchini P., Aiello V., Palazzi P. et al.* Sublocalization of the human protein C gene on chromosome 2q13-q14 // *Hum. Genet.* — 1989. — V. 81, N2. — P. 191–192.
10. *Castellini F.* Human protein C and activated protein C // *Trends Cardiovasc. Med.* — 1996. — V. 5, N2. — P. 55–62.
11. *Esmon N., Owen W., Esmon C.* Isolation of a membrane-bound cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C // *J. Biol. Chem.* — 1982. — V. 257, N2. — P. 859–864.
12. *Kisiel W., Canfield W., Ericsson L. et al.* Anticoagulant properties of bovine plasma protein C following activation by thrombin // *Biochemistry.* — 1977. — V. 16, N26. — P. 5824–31.
13. *Van der Meer F., van Tilburg N., van Wijngaarden A.* A second plasma inhibitor of activated protein C: α 1-antitrypsin // *Thromb Haemost.* — 1989. — V. 62, N2. — P. 756–762.
14. *Hoogendoorn H., Toh C., Nesheim M. et al.* Alpha 2-macroglobulin binds and inhibits activated protein C // *Blood.* — 1991. — V. 78, N9. — P. 2283–2290.
15. *Laurel M., Stenflo J., Carlson T.* Turnover of *I-protein C inhibitor and *I-antitrypsin and their complexes with activated protein C // *Ibid.* — 1990. — V. 76, N11. — P. 2990–2995.
16. *Hermans J., Stone S.* Interaction of activated protein C with serpins // *Biochem. J.* — 1993. — V. 295, N1. — P. 239–245.
17. *Suzuki K., Nishioka J., Hashimoto S.* Protein C inhibitor: purification from human plasma and characterization // *J. Biol. Chem.* — 1983. — V. 258, N1. — P. 163–168.
18. *Rezaie A.* Vitronectin Functions as a Cofactor for Rapid Inhibition of Activated Protein C by Plasminogen Activator Inhibitor-1 // *Ibid.* — 2001. — V. 276, N19. — P. 15567–15570.
19. *Laurent O., Mosnier J., Griffin H.* Protein C anticoagulant activity in relation to anti-inflammatory and anti-apoptotic activities // *Frontiers in Bioscience.* — 2006. — V. 11. — P. 2381–2399.
20. *Davie E., Fujikawa K., Kisiel W.* The coagulation cascade: Initiation, maintenance and regulation // *Biochemistry.* — 1991. — V. 30, N43. — P. 10363–10370.
21. *Yang L., Manithody C., Rezaie A.* The functional significance of the autolysis loop in protein C and activated protein C // *Thromb Haemost.* — 2005. — V. 94, N1. — P. 60–68.
22. *Gresele P., Momi S., Berrettini M. et al.* Activated Human Protein C Prevents Thrombin-induced Thromboembolism in Mice. Evidence that Activated Protein C Reduces Intravascular Fibrin Accumulation through the Inhibition of Additional Thrombin Generation // *J. Clin. Invest.* — 1998. — V. 101, N3. — P. 667–676.
23. *Yano Y., Gabazza E., Hori Y. et al.* Association Between Plasma Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor Levels and Activated Protein C in Normotensive Type 2 Diabetic Patients // *Diabetes Care.* — 2002. — V. 25, N7. — P. 1245–1246.
24. *Dettenmeier P., Swindell B., Stroud M. et al.* Role of Activated Protein C in the Pathophysiology of Severe Sepsis // *Am. J. Crit. Care.* — 2003. — V. 12, N.6. — P. 518–526.
25. *Sakata Y., Loskutoff D., Gladson C. et al.* Mechanism of protein C-dependent clot lysis: role of plasminogen activator inhibitor // *Blood.* — 1986. — V. 68, N6. — P. 1218–1223.
26. *Sakamoto T., Ogawa H., Takazoe K. et al.* Effect of activated protein C on plasma plasminogen activator inhibitor activity in patients with acute myocardial infarction treated with alteplase. Comparison with

- unfractionated heparin // *J. Am. Coll. Cardiol.* — 2003. — V. 42, N8. — P. 1389–94.
27. *Cheng T., Liu D., Griffin J. et al.* Activated protein C blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective // *Nat. Med.* — 2003. — V. 9. — P. 338–342.
 28. *Cheng T., Petraglia A., Li Z.* Activated protein C inhibits tissue plasminogen activator-induced brain hemorrhage // *Ibid.* — 2006. — V. 12, N11. — P. 1278–1285.
 29. *Kleijin E. de, Groot R. de, Hack E. et al.* Activation of protein C following infusion of protein C concentrate in children with severe meningococcal sepsis and pupura fulminans: a randomized, double-blinded, placebo-controlled, dose-finding study // *Crit. Care Med.* — 2003. — V. 31, N6. — P. 1839–184.
 30. *Emmerich J., Vossen C., Callas P. et al.* Chronic venous abnormalities in symptomatic and asymptomatic protein C deficiency // *J. Thromb. Haemost.* — 2005. — V. 3, N7. — P. 1428–1431.
 31. *Bucciarelli P., Rosendaal F., Tripodi A. et al.* Risk of venous thromboembolism and clinical manifestations in carriers of antithrombin, protein C, protein S deficiency, or activated protein C resistance: a multicenter collaborative family study // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 1999. — V. 19, N4. — P. 1026–33.
 32. *Velander W., Johnson I., Page R. et al.* High-Level Expression of a Heterologous Protein in the Milk of Transgenic Swine Using the cDNA Encoding Human Protein C // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1992. — V. 89, N24. — P. 12003–12007.
 33. *Drohan W., Wilkins D., Latimer E. et al.* A scalable method for the purification of recombinant human protein C from the milk of transgenic swine in *Advances in bioprocess engineering.* — Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994. — P. 501–507.
 34. *Wu H., Bruley D.* Chelator, metal ion and buffer studies for protein C separation // *Comparative Biochemistry and Physiology — Part A: Molecular & Integrative Physiology.* — 2002. — V. 132, N1. — P. 213–220.
 35. *Шевель М. В., Вережка С. В.* Автоповреждения белковых препаратов: молекулярные механизмы и пути их предотвращения // *Совр. пробл. токсикол.* — 2006. — №3. — С. 41–45.
 36. *Ortner C., Ralston A., Gee D. et al.* Large-scale production and properties of immunoaffinity-purified human activated protein C concentrate // *Vox Sang.* — 1995. — V. 69, N4. — P. 309–318.
 37. *Bruley D., Droxan W.* Protein C and related anticoagulants advances in applied biotechnology series: Culf Publishing Company: Houston, TX. — 1990. — V. 11. — P. 11–27.
 38. *Wu H., Bruley D. F.* Homologous human blood protein separation using immobilized metal affinity chromatography: Protein C separation from prothrombin with application to the separation of factor IX and prothrombin // *Biothechnol. Prog.* — 1999. — V. 15, N5. — P. 928–931.
 39. *Bertina R.M.* Protein C and related proteins, biochemical and clinical aspects. — Churchill Livingstone: New York, 1998. — P. 1–54.
 40. *Волков Г. Л., Платонова Т. Н., Савчук А. Н. и др.* Современные представления о системе гемостаза. — К.: Наук. думка, 2005. — 296 с.
 41. *Качаровский Б. В., Криворучко Р. А., Миндюк М. В.* Типовой регламент производства полибиоллина. — К.: Мин-во здравоохранения УССР, 1975.
 42. *Wu H., Bruley D.* Process scale-up studies for protein C separation using IMAC // *Adv. Exp. Med. Biol.* — 2005. — V. 599. — P. 61–66.
 43. *Nadel S. et al.* Drotrecogin alfa (activated) in children with severe sepsis: a multicentre phase III randomised controlled trial // *Lancet.* — 2007. — V. 369, N10. — P. 836–43.
 44. *Dreyfus M., Ladouzi A., Chambost H. et al.* Treatment of inherited protein C deficiency by replacement therapy with the French purified plasma-derived protein C concentrate (PROTEXEL®) // *Vox Sanguinis.* — 2007. — V. 93, N3. — P. 233–240.
 45. *Hajime T.* Human activated protein C. *Anact C.* // *Clinics & Drug Therapy.* — 2001. — V. 20, N4. — P. 426–427.
 46. *Genc K.* The rationale for activated protein C treatment in perinatal white matter injury // *Medical Hypotheses.* — 2007. — V. 68, N6. — P. 1418–1419
 47. *Genc K.* Activated protein C: Possible therapeutic implications for multiple sclerosis // *Ibid.* — 2007. — V. 68, N3. — P. 710.
 48. *Genc K.* Activated protein C: Therapeutic implications for Alzheimer's disease // *Ibid.* — 2007. — V. 69, N3. — P. 701–702.

**ПРОТЕИН С:
МЕХАНИЗМЫ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ
И МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ**

Д. Д. Жерносеков¹, Т. В. Куркина^{1,2}

¹Институт биохимии им. А.В. Палладина
НАН Украины, Киев

²Киевский национальный университет имени
Тараса Шевченко

*E-mail: chemikdd@mail.ru,
kurkina_tanya@ukr.net*

Система протеина С составляет важное звено многих физиологических и патофизиологических процессов организма. Рассмотрены особенности структуры протеина С и механизмы его активации. Особое внимание уделено функционированию активного протеина С, его антикоагулянтным, противовоспалительным и профибринолитическим свойствам. Рассматривается возможное терапевтическое применение препарата протеина С для лечения многочисленных патологий, характеризующихся дефицитом этого белка. Описаны существующие источники и подходы для получения препарата протеина С.

Ключевые слова: протеин С, гемостаз, антикоагулянт, воспаление.

**PROTEIN C:
MECHANISMS OF FUNCTIONING
AND PRODUCTION METHODS**

D. D. Zhernosekov¹, T. V. Kurkina^{1,2}

¹Palladin Institute of Biochemistry
of National Academy of Sciences of Ukraine,
Kyiv

²Taras Shevchenko Kyiv National University

*E-mail: chemikdd@mail.ru,
kurkina_tanya@ukr.net*

Protein C pathway is an important link in numerous physiological and pathophysiological processes of organism. The particular features of protein C structure and mechanisms of its activation are considered. Special attention is given to functioning of activated protein C, to its anticoagulant, anti-inflammatory and profibrinolytical properties. Possible therapeutic application of protein C for the treatment of large number of pathologies characterized by protein C deficiency is observed. Current sources and approaches for protein C preparation are described.

Key words: protein C, hemostasis, anticoagulant, inflammation.