

ВПЛИВ ПРОДУКТІВ РОЗЩЕПЛЕННЯ ПРОТРОМБІНУ НА АКТИВАЦІЮ ТА АГРЕГАЦІЮ ТРОМБОЦИТІВ

Д. С. КОРОЛЬОВА, В. О. ЧЕРНИШЕНКО, О. В. ГОРНИЦЬКА, Т. М. ПЛАТОНОВА

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: platonovt@gmail.com

Мезотромбін ефективно активує механічно стимульовані тромбоцити плазми крові і підвищує колаген-, ADP- та адреналініндуковану агрегацію збагаченої тромбоцитами плазми крові. Отже, в зоні активації системи зсідання крові мезотромбін може посилювати процес залучення тромбоцитів до тромбоутворення. Претромбін 1 пригнічує колаген-, ADP- та адреналініндуковану агрегацію тромбоцитів плазми крові, регулюючи таким чином не лише плазменний, але й тромбоцитарний гемостаз за принципом зворотного негативного зв'язку.

Ключові слова: мезотромбін, претромбін 1, тромбін, тромбоцити.

Протромбін є проензимом тромбіну – центрального регуляторного ензиму системи гемостазу. В разі ушкодження судини на мембрані активованих ендотеліоцитів та екстравакулярних клітин запускається каскад реакцій системи зсідання крові, внаслідок чого активується протромбін. Тромбін, що утворився, активує тромбоцити, а процес розщеплення протромбіну продовжується вже на їхній мембрані. У процесі фізіологічного розщеплення молекули протромбіну утворюється низка похідних, зокрема проміжний продукт його активації мезотромбін та функціонально неактивна форма протромбіну – претромбін 1 (рис. 1) [1].

Домінантним в утворенні тромбіну за фізіологічних умов і участі протромбінази є шлях, що передбачає утворення проміжного продукту метаболізму – мезотромбіну [2]. Деякі автори припускають існування двох протромбіназ [3]: перша розщеплює протромбін з утворенням мезотромбіну, а друга – гідролізує мезотромбін з утворенням α -тромбіну. Якщо такий механізм існує, то регуляція активності різних форм протромбінази забезпечує, ймовірно, накопичення мезотромбіну на мембранах ендотеліальних клітин та тромбоцитів [4]. Крім того, активність протромбінази і, отже, швидкість утворення мезотромбіну регулюється системою протеїну С та комплексом антитромбін III – гепарин [1].

Молекула мезотромбіну містить активний центр, який формується внаслідок розщеплення пептидного зв'язку в каталітичному домені протромбіну. Водночас, у мезотромбіні зберігається мембранозв'язувальний Gla-домен протромбіну. Таким чином, мезотромбін збері-

гає доменну структуру протромбіну і набуває тромбіноподібної ензиматичної активності [5]. Це підтверджується тим, що він ефективно активує протеїн С та фактор V зсідання крові, оскільки має здатність зв'язуватись із мембранами [4]. Згідно з даними аналізу розщеплення низькомолекулярних субстратів, активний центр мезотромбіну аналогічний активному центру тромбіну [5]. Однак інші субстратупізнавальні ділянки, зокрема екзосайти I та II в молекулі мезотромбіну, мають, імовірно, іншу, ніж тромбін, конформацію. Відтак спорідненість мезотромбіну і тромбіну до протеїнових субстратів неоднакова, з чим і пов'язані відмінності в їхній взаємодії з компонентами системи гемостазу [6].

Слід зазначити, що поява у кровотоці мезотромбіну відбувається внаслідок активації системи гемостазу, яка включає також активацію судинно-тромбоцитарної ланки. Через це в зоні активації системи зсідання крові, тобто безпосередньо в місці ушкодження судини, вже на перших етапах активації протромбіну мезотромбін бере участь в активації тромбоцитарної ланки гемостазу.

Претромбін 1 також з'являється у кровотоці за умов активації системи зсідання крові і розщеплення протромбіну тромбіном (рис. 1). Оскільки претромбін 1 ензиматично неактивний і не активується протромбіназою, його утворення вважають одним із механізмів негативної зворотної регуляції системи гемостазу, що перериває каскад реакцій зсідання крові. У процесі формування молекули претромбіну 1 каталітичний домен залишається інтактним, через що не формується активний центр. Водночас відсутність N-кінцевої ділянки про-

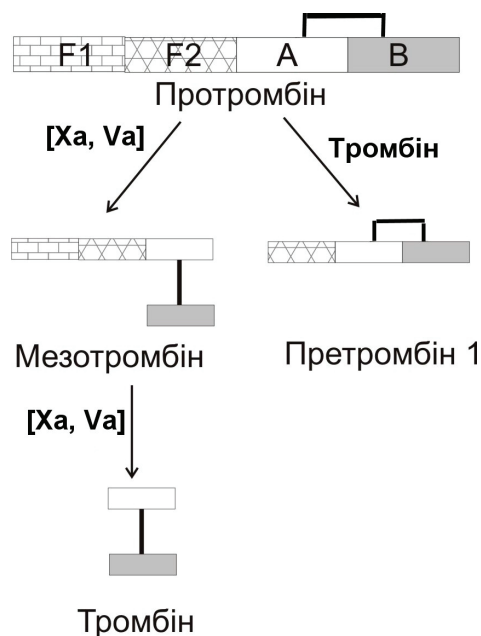


Рис. 1. Схема розщеплення протромбіну: F 1, F 2 – фрагменти 1 і 2 протромбіну відповідно; A, B – фрагменти каталітичного домену; Xa, Va – фактори зсідання крові

тромбіну в молекулі претромбіну 1 сприяє формуванню в ній екзосайту I, який забезпечує взаємодію з лігандами тромбіну, зокрема тромбоцитарними рецепторами [7].

Отже, після розщеплення протромбіну утворюються продукти, які мають функціональне значення, зокрема деяким із них притаманна ензиматична активність. Тому на сьогодні все більшу увагу привертає вивчення ролі похідних протромбіну в системі гемостазу, формування імунної відповіді та дослідження інших фізіологічних процесів.

Метою роботи було з'ясувати вплив мезотромбіну і претромбіну 1 на активацію та агрегацію тромбоцитів.

Матеріали і методи

Плазму крові одержували з венозної крові 10 донорів [8]. Протромбін отримували із плазми крові людини шляхом сорбування вітаміну К-залежних протеїнів на сірчанокислоту бар'ї з наступною елюцією його 0,05 М трис-НCl-буфером (pH 7,4), що містив 0,2 М NaCl, 0,01 М бензамідин і 0,02 М EDTA. Для отримання та очищення протромбіну використовували Q-сефарозу. Додаткове очищення протромбіну здійснювали на сефакрилі S-200. Гомогенність одержаного протеїну перевіряли методом диск-електрофорезу в поліакриламідному гелі [9].

Мезотромбін отримували шляхом розщеплення протромбіну, імобілізованим на BrCN-сефарозі екамуліном (активатором протромбіну з отрути ефі багатолускової – *Echis multisquamatis*) в 0,05 М трис-НCl-буфері (pH 7,4) із 0,13 М NaCl, 1 мМ CaCl₂ та 5 мМ бензамідином при кімнатній температурі впродовж 15 хв. Препарат мезотромбіну очищали від бензамідину (ex tempore) гель-фільтрацією на PD-10 (Amersham biosciences) у 0,05 М трис-НCl-буфері (pH 7,4) з 0,13 М NaCl при температурі 4 °С. Чистоту препаратів перевіряли електрофоретично. Мезотромбін зберігали у присутності 5 мМ бензамідину при температурі -20 °С. Відсутність домішок тромбіну у препараті мезотромбіну контролювали за здатністю його розщеплювати фібриноген.

Претромбін 1 одержували шляхом гідролізу протромбіну людини тромбіном з подальшим очищенням його іонно-обмінною хроматографією на Q-сефарозі методом, описаним у статті [9]. Чистоту препарату перевіряли електрофоретично. В експериментах використовували тромбін (Merck, Німеччина) з питомою активністю 50 NIH/мг.

Збагачену тромбоцитами плазму крові (ЗТПК) людини одержували центрифугуванням (160 g, 20 °С, 20 хв) цільної крові, до якої додавали розчин 3,8%-го лимоннокислого натрію у співвідношенні 9 : 1 [10].

Відмиті тромбоцити людини отримували гель-фільтрацією ЗТПК на сефарозі 2В методом, наведеним у статті [11]. Популяцію тромбоцитів, серед яких були і активовані, одержували механічною стимуляцією їх триразовим ресуспендуванням і осадженням центрифугуванням (340 g, 15 хв).

Агрегацію тромбоцитів вивчали в ЗТПК людини (200–300 тис. тромбоцитів/мкл). У разі виявлення гіпоагрегації ЗТПК не використовували. Агрегатометричні показники визначали в перші 3 год після забору крові, застосовуючи фотооптичний агрегометр SOLAR AP2110 методом G. V. Born [12]. До його кювети вносили 430 мкл ЗТПК і 20 мкл 0,025 М CaCl₂. Інкубацію проводили ex tempore протягом 5 хв при температурі 37 °С. Агрегацію тромбоцитів ініціювали внесенням до середовища одного з індукторів: ADP (концентрація 12,5 та 10 мкМ), колагену (2 мкг/мл) або адреналіну (0,8 та 0,6 мкг/мл). Процес реєстрували упродовж 10 хв у режимі роботи за початковим рівнем світлопропускання без нормування результатів вимірів. В експерименті оцінювали ступінь агрегації (максимальний рівень світлопропускання ЗТПК після внесення індуктора), швидкість агрегації (за зміною світлопро-

пускання ЗТПК у перші 30 с після внесення індуктора), час агрегації (час досягнення максимального її ступеня). У випадку колагеніндукованої агрегації вимірювали тривалість лаг-фази. Процес активації тромбоцитів індукторами вивчали на відмитих тромбоцитах людини методом цитометрії, застосовуючи протоковий цитофлуориметр COULTER® EPICS™ XL™ Flow Cytometer, – систему, яку використовують для якісної та кількісної характеристики біологічних і фізичних властивостей клітин. Під час експерименту використовували два типи світлорозсіювання: пряме, яке характеризує розмір клітин, та бічне, що відображає щільність цитоплазми клітин, тобто гранулярність тромбоцитів [13]. Кількість тромбоцитів обчислювали в автоматичному режимі.

Результати та обговорення

Однією з основних прокоагулянтних функцій тромбіну є активація тромбоцитів та індукція їхньої агрегації, опосередкованих рецепторами сімейства ПАР та глікопротеїном Ib (GPIb) [10, 14]. Натомість мезотромбін, незважаючи на наявність сформованого активного центру і здатність зв'язування із фосфоліпідними мембранами, не активує тромбоцити. Припускають, що мезотромбін взаємодіє із тромбіновим рецептором тромбоцитів з меншою афінністю, ніж тромбін [4, 13].

Застосовуючи метод протокової цитометрії, ми проаналізували вплив мезотромбіну

на відмиті тромбоцити людини. Відомо, що під час активації тромбоцитів відбувається поступова зміна їхньої форми (з дископодібної на сферичну) з утворенням псевдоподій і вивільненням компонентів цитоплазматичних гранул. Отже, такі параметри, як розмір та гранулярність тромбоцитів характеризують функціональний стан цих елементів крові.

Одержані нами дані свідчать, що мезотромбін не впливає на розміри та гранулярність відмитих тромбоцитів людини (рис. 2), у той час як тромбін, навіть у меншій кількості, швидко активує відмиті тромбоцити, зумовлюючи зміни їхнього розміру та гранулярності.

Водночас слід відзначити, що за наявності в популяції відмитих тромбоцитів значної кількості попередньо активованих (30–50%), нативні тромбоцити такої популяції набувають чутливості до мезотромбіну. Нами показано, що у зазначеній модельній системі відмиті тромбоцити людини у присутності мезотромбіну змінюють як розмір, так і гранулярність (рис. 3), однак чутливість їх до дії тромбіну все ще залишається вищою. При цьому частково активовані тромбоцити виявлено в місці активації системи зсідання крові [15], зокрема в місці ушкодження судини, де вони взаємодіють з активованим ендотелієм. Крім того, сенсibilізуються і «молоді» тромбоцити [16].

Підвищення чутливості тромбоцитів до мезотромбіну в наведеній модельній системі, ймовірно, пов'язане зі змінами як стану, так і фосфоліпідного складу їхніх мембран. Ос-

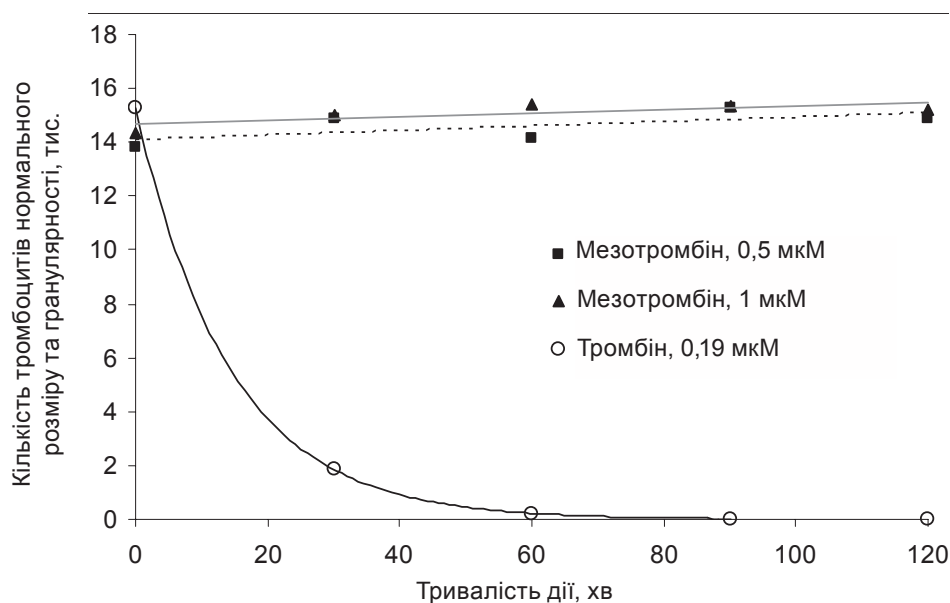


Рис. 2. Дія тромбіну і мезотромбіну на зміну кількості відмитих тромбоцитів нормального розміру та гранулярності

кільки встановлено, що мезотромбін здатен активувати клітини гліобластоми, розщеплюючи ПАР-1 [17], то, ймовірно, ефективність його взаємодії з останнім залежить не лише від конформаційних особливостей молекули мезотромбіну, але й від ліпідного та протеїнового оточення рецептора, функціонального стану клітин тощо.

Крім того, в іншій модельній системі — ЗТПК людини у присутності всіх компонентів плазми крові — було виявлено, що мезотромбін концентраційнозалежно індукуює агрегацію тромбоцитів (рис. 4).

Тромбін належить до найпотужніших фізіологічних індукторів агрегації тромбоцитів, зумовлюючи швидку їхню дегрануляцію і призводячи до необоротності агрегації (рис. 5). Але мезотромбін, навіть у високій концентрації (0,29 мкМ), спричинює оборотну агрегацію тромбоцитів (першу хвилю її), внаслідок чого з їхніх гранул вивільнюються індуктори агрегації, що, у свою чергу, зумовлює подальшу необоротну агрегацію — хвилю II (рис. 5).

У молекулі претромбіну 1, як зазначено вище, активний центр відсутній, через що його вважають функціонально неактивною формою протромбіну. У досліджуваних модельних системах нами встановлено, що претромбін 1 не

активує відмиті тромбоцити людини і не стимулює їх до агрегації (дані не наведено).

Після активації тромбоцитів *in vivo* агрегація їх відбувається. Згідно із традиційною моделлю цього процесу до суспензії тромбоцитів вводять агоніст, який активує інтегрин GPIIb/IIIa , внаслідок чого останній набуває високої спорідненості до фібриногену. Фібриноген зв'язується із тромбоцитами, що призводить до стабілізації агрегату [15].

Колагеніндукована агрегація тромбоцитів у дослідженнях *in vitro*, насамперед, дає змогу оцінити процес вивільнення вмісту тромбоцитарних гранул. Для такої агрегації характерна лаг-фаза, тривалість якої визначається швидкістю активації фосфоліпази C у відповідь на рецепторну активацію тромбоцитів [18]. Унаслідок активації тромбоцитів колагеном із тромбоцитарних гранул вивільнюються індуктори, які викликають незворотну агрегацію тромбоцитів. Тому агрегація за дії колагену є вторинною і віддзеркалює другу фазу — фазу секреції.

Дані досліджень ADP-індукованої та адреналініндукованої агрегації тромбоцитів дає змогу оцінити первинну та вторинну фази процесу. Дію ADP спрямовано на підвищення концентрації іонів Ca^{2+} в цитоплазмі тромбоцитів, що приводить до їхньої дегрануляції і

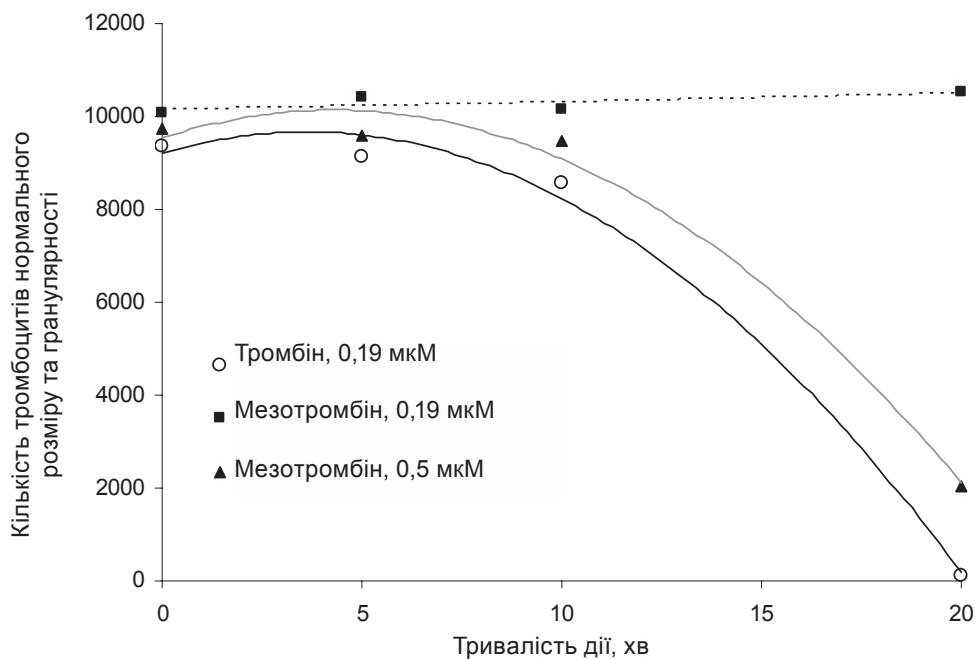


Рис. 3. Зміна кількості відмитих тромбоцитів нормального розміру та гранулярності за дії тромбіну та мезотромбіну в популяції, в якій у значній кількості (30–50%) містяться попередньо активовані тромбоцити

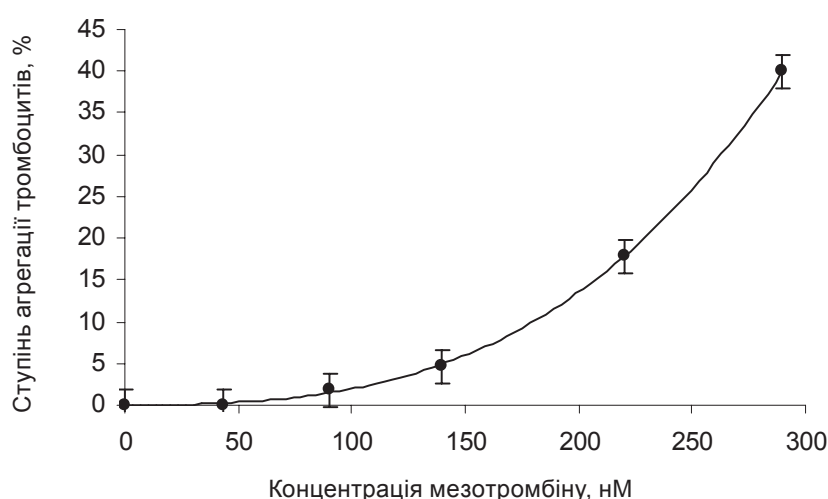


Рис. 4. Зміна ступеня агрегації тромбоцитів у ЗТПК залежно від концентрації мезотромбіну

зміни форми, а також до активації тромбоцитарних рецепторів. Стимуляція тромбоцитів людини адреналіном опосередковується α -адренорецептором субтипу $\alpha 2A$, однак точний механізм активації тромбоцитів за дії цього індуктора не встановлено. Адреналін належить до слабких індукторів агрегації, оскільки не здатен викликати повну агрегацію тромбоцитів людини, хоча істотно посилює відповідь їх на стимуляцію іншими агоністами [19].

Для дослідження впливу мезотромбіну на індуквану агрегацію тромбоцитів, ми використовували його у такій концентрації, яка не зумовлює агрегації тромбоцитів — 90 нМ (рис. 4). Одержані нами дані свідчать, що мезотромбін підвищує індуквану агрегацію тромбоцитів таким чином (рис. 6):

- скорочує лаг-фазу колагеніндукованої агрегації у 3,4 раза, не впливаючи на її ступінь;

- посилює ступінь першої хвилі ADP-індукованої агрегації у 1,5 раза, не змінюючи її швидкості, тобто швидкості утворення тромбоцитарних агрегатів;

- посилює в 1,8 раза першу хвилю адреналініндукованої агрегації та у 2,1 раза швидкість її, сприяючи чіткому відособленню першої хвилі агрегації і не впливаючи на ступінь другої хвилі.

Таким чином, мезотромбін підвищує первинний вплив адреналіну, модулюючи адреналініндуковану агрегацію тромбоцитів подібно до тромбіну, який синергічно посилює ефект адреналіну як у разі активації тромбоцитів, так і за інших процесів судинного гемостазу [19].

Одержані нами дані свідчать, що мезотромбін порівняно із тромбіном є малоефек-

тивним активатором тромбоцитів. Однак за активації системи зсідання крові в місці ушкодження судини він здатен ефективно залучати нові тромбоцити до утворення тромба, активуючи їх та сприяючи вторинній агрегації. З огляду на те, що мезотромбін не інгібується основним фізіологічним інгібітором тромбіну — антитромбіном III в комплексі з гепарином [5], — можна припустити, що в разі потужного пригнічення активності тромбіну (наприклад під час гепаринотерапії) роль ме-

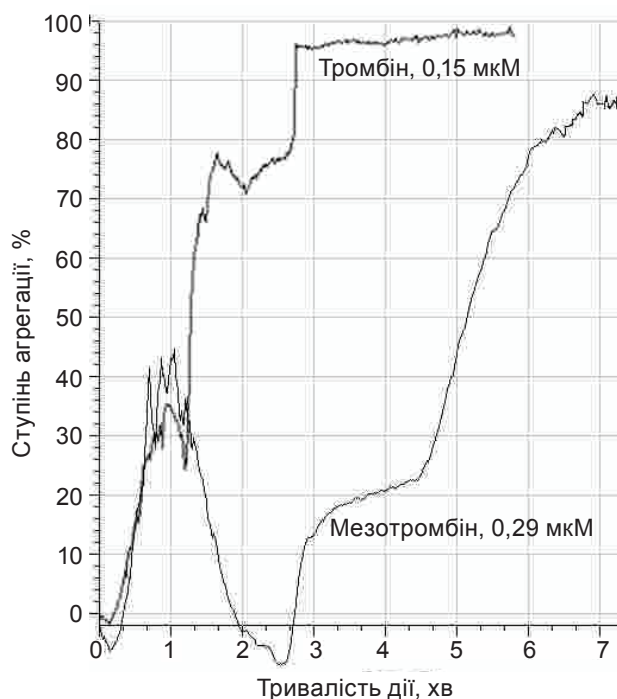


Рис. 5. Зміна ступеня агрегації тромбоцитів за дії на них мезотромбіну та тромбіну

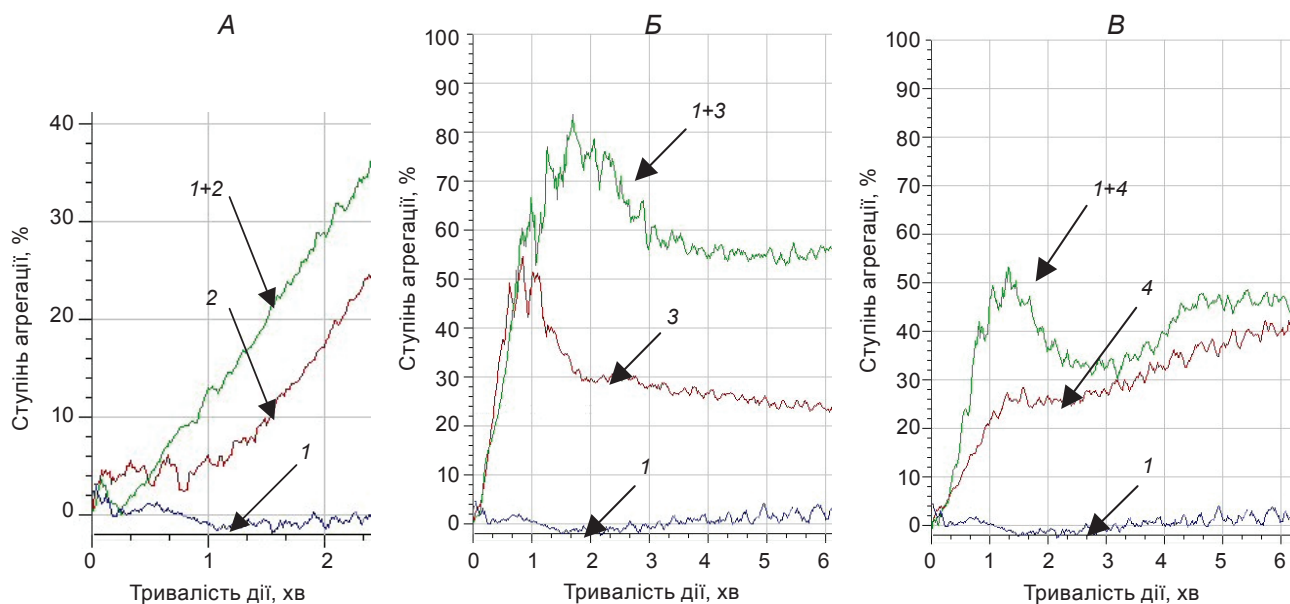


Рис. 6. Вплив мезотромбіну на колаген-, ADP- та адреналініндуковану агрегацію тромбоцитів людини в ЗТПК (А, Б та В відповідно): 1 – мезотромбін (0,09 мкМ), 2 – колаген (0,2 мкг/мл), 3 – ADP (1 мкМ), 4 – адреналін (60 нМ)

зотромбіну в активації тромбоцитарної ланки системи гемостазу набуває істотного значення.

На відміну від мезотромбіну, претромбін 1 дозозалежно пригнічує індуковану агрегацію тромбоцитів в ЗТПК (рис. 7), а саме:

– знижує швидкість ADP-індукованої агрегації і сприяє виокремленню першої її хвилі;

– ефективно пригнічує адреналініндуковану агрегацію, зменшуючи обидві хвилі або повністю нівелюючи адреналіновий сигнал;

– подовжує лаг-фазу колагеніндукованої агрегації, не впливаючи на її ступінь, тобто не перешкоджає секреції тромбоцитарних гранул та вторинній агрегації тромбоцитів.

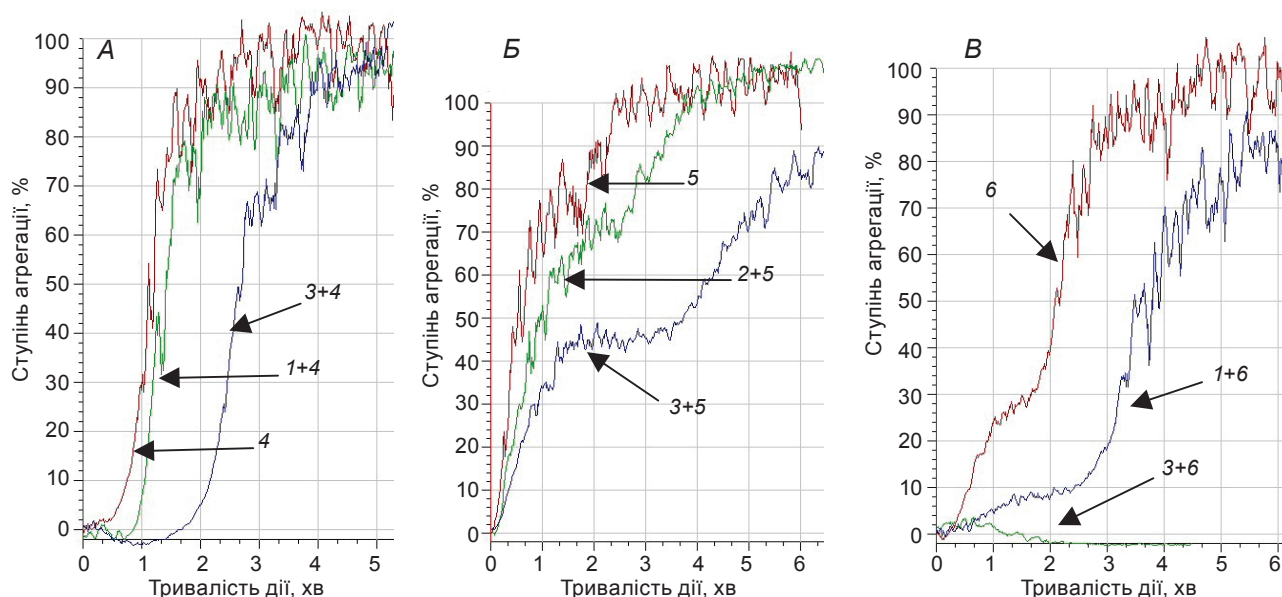


Рис. 7. Вплив претромбіну 1 на колаген-, ADP- та адреналініндуковану агрегацію тромбоцитів людини в ЗТПК (А, Б, В відповідно): 1 – претромбін (0,28 мкМ), 2 – претромбін (0,56 мкМ), 3 – претромбін (0,84 мкМ), 4 – колаген (0,2 мкг/мл), 5 – ADP (1,25 мкМ), 6 – адреналін (80 нМ)

Початкове зв'язування колагену із тромбоцитами за колагеніндукованої агрегації опосередковується глікопротеїним комплексом GPIb-V-IX, що взаємодіє з колагеном в комплексі з фактором фон Віллебранда. GPIb-опосередкований механізм активації тромбоцитів тромбіном передбачає можливість зв'язування з рецептором ензиматично неактивного тромбіну через екзосайт I [20]. Оскільки в молекулі претромбіну 1 формується екзосайт I, претромбін 1, зв'язуючись із GPIb на поверхні тромбоцитів, хоча і не активує їх, однак конкурує за зв'язування з комплексом колаген — фактор фон Віллебранда, пригнічуючи таким чином колагеніндуковану агрегацію тромбоцитів.

З огляду на наведені вище дані щодо впливу претромбіну 1 на агрегацію тромбоцитів, можна дійти висновку про участь його в негативно зворотній регуляції як у плазменному, так і в тромбоцитарному гемостазі.

Таким чином, мезотромбін належить до слабких індукторів агрегації тромбоцитів і у фізіологічній кількості не агрегує їх, а претромбін 1 взагалі не здатен активувати тромбоцити. Однак нами доведено, що зазначені похідні протромбіну впливають на колаген-, ADP- та адреналініндуковану агрегацію тромбоцитів у ЗТПК. Мезотромбін і претромбін 1 діють на тромбоцитарну ланку гемостазу різноспрямовано: мезотромбін сприяє залученню «нових» тромбоцитів до тромбоутворення, а претромбін 1 пригнічує хвилю зсідання крові, інгібуючи вторинну агрегацію тромбоцитів.

ВЛИЯНИЕ ПРОДУКТОВ РАСЩЕПЛЕНИЯ ПРОТРОМБИНА НА АКТИВАЦИЮ И АГРЕГАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ

*Д. С. Королева, В. А. Чернышенко,
О. В. Горницкая, Т. Н. Платонова*

Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев;
e-mail: platonovatn@gmail.com

Мезотромбін ефективно активує механічески стимульовані тромбоцити і посилює колаген-, ADP- і адреналініндуковану агрегацію обогашеної тромбоцитами плазми крові. Таким образом, в зоне активации системы свертывания крови мезотромбин способен усиливать процесс вовлечения тромбоцитов в тромбообразование. Претромбин 1 угнетает колаген-, ADP- и адреналининдуцированную агрегацию обогашенной тромбоцитами плазмы крови, регу-

люючи, таким образом, не только плазменный, но и тромбоцитарный гемостаз по принципу обратной негативной связи.

Ключевые слова: мезотромбин, претромбин 1, тромбин, тромбоциты.

INFLUENCE OF PROTHROMBIN CLEAVAGE PRODUCTS ON PLATELETS ACTIVATION AND AGGREGATION

*D. S. Korolova, V. O. Chernyshenko,
O. V. Gornitskaya, T. M. Platonova*

Palladin Institute of Biochemistry, National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: platonovatn@gmail.com

Summary

Meizothrombin efficiently activates mechanically triggered platelets and enhance collagen-, ADP- and adrenalin-induced aggregation of platelet-rich blood plasma. Thus, in clotting system activation zone meizothrombin is able to enhance process of involving platelets in clotformation. Prethrombin 1 inhibits collagen-, ADP- and adrenalin-induced aggregation of platelet-rich blood plasma and so regulates not only plasm but platelet hemostasis by reverse negative relation.

Key words: meizothrombin, prethrombin 1, thrombin, platelets.

1. Mann K. G., Butenas S., Brummel K. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2003. — **23**. — P. 17–25.
2. Bukys M. A., Kim P. Y., Nesheim M. E., Kalafatis M. // *J. Biol. Chem.* — 2006. — **281**, N 51. — P. 39194–39204.
3. Brufatto N., Nesheim M. E. // *Ibid.* — 2003. — **278**, N 9. — P. 6755–6764.
4. Côté H. C. F., Stevens W. K., Bajzar L. et al. // *Ibid.* — 1994. — **269**, N 15. — P. 11374–11380.
5. Côté H. C. F., Bajzar L., Stevens W. K. et al. // *Ibid.* — 1997. — **272**, N 10. — P. 6194–6200.
6. Han J. H., Côté H. C. F., Tollefsen D. M. // *Ibid.* — N 45. — P. 28660–28665.
7. Anderson P. J., Bock P. E. // *J. Biol. Chem.* — 2003. — **278**, N 45. — P. 44489–44495.
8. Баркаган З. С., Момот А. П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. — Изд. 2-е дополненное. — М.: Ньюдиамед, 2001. — 280 с.
9. Downing M. R., Butkowski R. J., Clark M. M., Mann K. G. // *J. Biol. Chem.* — 1975. — **250**, N 23. — P. 8897–8906.
10. Adam F., Guilin M.-C., Jandrot-Perrus M. // *Eur. J. Biochem.* — 2003. — **270**. — P. 2959–2970.

11. Белицер Н. В., Анищук М. Г., Познякова Т. М., Горкун О. В. // Цитол. и генетика. — 1989. — **24**, № 3. — С. 3–7.
12. Born G. V. // Nature. — 1962. — **194**. — P. 927–929.
13. Pelagalli A., Scalia G., Pero M. E. et al. // Rev. de Médec. Vétérinaire. — 2008. — **10**, N 159. — P. 481–484.
14. Covic L., Gresser A. L., Kuliopulos A. // Biochemistry. — 2000. — **39**, N 18. — P. 5458–5467.
15. Волков Г. Л., Платонова Т. Н., Савчук О. Н. и др. Современные представления о системе гемостаза. — К.: Наук. думка, 2005. — 295 с.
16. О कोरोков А. Н. Диагностика болезней внутренних органов. — М.: Мед. лит., 2001. — 512 с.
17. Kaufmann R., Zieger M., Tausch S. et al. // J. Neurosci. Res. — 2000. — **59**, N 5. — P. 643–648.
18. Jung S. M., Moroi M. // Adv. Exp. Med. Biol. — 2008. — **640**. — P. 53–63.
19. Spalding A., Vaitkevicius H., Dill S. et al. // Hypertension. — 1998. — **31**. — P. 603–607.
20. Soslau G., Class R., Morgan D. A. et al. // J. Biol. Chem. — 2001. — **276**, N 24. — P. 21173–21183.

Отримано 25.06.2009