

АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ім. О.В. ПАЛЛАДІНА

На правах рукопису

Дружина
Надія Миколаївна

Дослідження активації Glu-плазміногену тканинним
активатором плазміногену на різних моделях фібринового згустка

03.00.04 - біохімія

Автореферат

дисертації на здобуття ученого ступеня
кандидата біологічних наук

КИЇВ 1993



00802602 (1)

AB 28.591

Робота виконана в Інституті Біохімії ім. О.В. Палладіна АН України

Науковий керівник: кандидат біологічних наук
Макогоненко Є.М.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук
Кібірєв В.К.

кандидат біологічних наук
Позднякова Т.М.

Провідна установа: Київський державний університет
ім. Т.Г. Шевченка

Захист відбудеться "31" серпня 1994р. о __ год.
на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 016.07.01 в
Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна АН України за адресою:
252030, Київ-30, вул. Леонтовича, 9

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці вказаного інституту

Автореферат було розіслано "30" листопада 1993р.

Вчений секретар спеціалізованої ради *Кірсенко* КІРСЕНКО О.В.

ТВ-28, 007

Загальна характеристика роботи

Актуальність проблеми. Головною функцією фібринолітичної системи в організмі є ферментативний лізис фібринового згустка. Фібринолітична система наявна у крові всіх ссавців та виконує роль протилежну системі зсідання крові. В основі системи регуляції гемостатичного балансу лежить механізм формування та руйнування фібрину, що включає систему зсідання, яка призводить до утворення фібрину, та фібринолітичну систему, яка обумовлює розчинення фібрину, з усіма проферментами, ферментами, активаторами та інгібіторами.

На сьогодні досягнуті значні успіхи у вивченні молекулярних та кінетичних аспектів функціонування фібринолітичної системи. На основі численних експериментальних даних була сформульована регуляторна модель фібринолізу (Wiman, Collen, 1977), яка зараз уточнюється та деталізується. У загальному вигляді вона передбачає сорбцію плазміногену та його фізіологічного активатора на фібрині, де і відбуваються процеси активації та фібринолізу. Плазмін, який утворюється, будучи зв'язаним з фібрином, розщеплює його на розчинні фрагменти, а згодом, вивільнюючись у кровоток, плазмін швидко і необоротно інактивується α_2 -антиплазміном.

Активация плазміногену тканинним активатором плазміногену (t-PA) відбувається не в розчині, а на поверхні фібрину. Спочатку фібрин виступає як ефектор (стимулятор) активації, а згодом - як субстрат для плазміну. Протягом полімеризації фібрину та наступного гідролізу фібринового згустка плазміном, що утворюється, ефекторні та субстратні функції фібрину змінюються.

Остаточню не з'ясовано, як у ході полімеризації фібрину відщеплення фібринопептидів В і перетворення дезААфібрину в дезААВВ форму впливає на стимулюючі властивості фібрину в процесі активації нативного Glu-плазміногену t-PA. Серед літературних даних існують суттєві протиріччя щодо зміни ефекторних властивостей фібрину в процесі активації після ковалентної прошивки його фактором XIIIa. Не виключено, що залучення до фібринового згустка деяких інших білків плазми крові, зокрема фібронектину, може, до деякої міри, впливати на здатність фібрину прискорювати активацію.

Ефекторні властивості фібрину в процесі активації пояснюють виникненням потрібного циклічного комплексу тканинний активатор плазміногену-плазміноген-фібрин (Houlaerts, et.al., 1982). Ділянки зв'язування на молекулі фібрину, які комплементарні афінним структурам плазміногену і t-PA та важливі для активації, остаточно не локалізовано. Вважають, що ними можуть бути олігомери α C-доменів, Д-Е-Д тріади полімерного фібрину (Suenson, Petersen, 1990), міждомenna суперспіралізована ділянка, яка прилягає до Д-домену та містить Lys 157 α -ланцюга фібрину (Voskuilen, et.al., 1987), а також ділянка γ -ланцюга, що локалізована у Д-домени (Yonekawa, et.al., 1990). Встановлено існування двох фаз активації плазміногену t-PA: на нативному фібрині та на частково зруйнованому (Norman, et.al., 1985). Вважають, що стимулююча дія частково деградованого фібрину зумовлюється збільшенням кількості Glu-плазміногену та t-PA, які з ним зв'язуються, за рахунок появи нових ділянок зв'язування та зміною конформації Glu-плазміногену.

Дослідження процесу активації Glu-плазміногену t-PA за наявності різних моделей фібринового згустка, що відповідають тим чи іншим структурам полімерного фібрину, дало нагоду розширити уявлення про роль деяких структур фібрину у процесі активації.

Метою роботи стало вивчення ефекторних функцій фібрину щодо активації Glu-плазміногену t-PA у процесі формування фібринового згустка та дослідження стимулюючих властивостей окремих структур полімерного фібрину на процес активації. В роботі були поставлені наступні задачі.

1. Дослідження активації Glu-плазміногену t-PA на фібринових згустках з різним ступенем прошивки фактором XIIIa.

2. Вивчення впливу фіброектину, залученого до фібринового згустка, на ефекторні властивості фібрину в процесі активації.

3. Встановлення кінетичних параметрів активації Glu-плазміногену t-PA на фібринових згустках, утворених з дезAA- та дезAABV фібрину.

4. Дослідження ефекторних властивостей комплексу фібриноген-NDCB фібрину у процесі активації.

5. Вивчення активації Glu-плазміногену t-PA за наявності комплексів NDCB фібрину з фрагментами фібрин(о)гену, які містять Д домен.

Наукова новизна роботи. Було встановлено, що ковалентна модифікація полімерного фібрину фактором XIIIa знижує стимулюючу

здатність фібрину в процесі активації Glu-плазміногену t-PA. Було виявлено, що фібронектин, який залучено до ковалентно прошитого за допомогою фактора XIIIa фібринового згустка, на відміну від залученого до непрошитого FXIIIa згустка, погіршує ефективність активації Glu-плазміногену t-PA. Вперше було показано, що комплексам фібриноген-NDСВ фібрину та Д-Д-NDСВ фібрину притаманна стимулююча здатність щодо процесу активації. Було виявлено, що у фібринових згустках, утворених з мономерів дезАА- та дезААВВ-фібрину, кінетичні параметри активації Glu-плазміногену t-PA залишаються без змін.

Визначення кінетичних параметрів активації Glu-плазміногену t-PA за наявності різних моделей фібринового згустка дозволило конкретизувати уявлення про структури активаторного комплексу тканинний активатор плазміногену-фібрин-плазміноген і запропонувати схему просторового взаємного розташування компонентів комплексу на різних етапах процесу активації плазміногену t-PA та гідролізу полімерного фібрину плазміном, що утворюється.

Теоретичне та практичне значення роботи. Одержані результати поглиблюють наші уявлення про процес активації нативного Glu-плазміногену тканинним активатором плазміногену, роль полімерного фібрину та окремих його структур, як прискорювача реакції активації на різних стадіях утворення та руйнування фібринового згустка; дають можливість висловити припущення про локалізацію та взаємне розташування складових активаторного комплексу, які необхідні для забезпечення активаційного процесу, що, відповідно, дає можливість більш ефективного запобігання та лікуванню серцево-судинних захворювань.

Апробація роботи. Основні результати та окремі положення дисертаційної роботи були викладені та обговорені на Всесоюзній конференції "Методи одержання, аналізу та використання ферментів" (Юрмала, 1990р.), на X міжнародному конгресі по фібринолізу (Індіанаполіс, 1990р.), на VI Українському біохімічному з'їзді (Київ, 1992р.) та на спільному семінарі відділів структури та функції білків, хімії та біохімії ферментів і молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна АН України (Київ, 1993р.).

Публікації. За матеріалами дисертації було опубліковано 5 робіт.

Структура та об'єм дисертації. Дисертація викладена на 121 сторінках друкарського тексту та складається з вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, результатів та їх обговорення, що викладені у 2 главах, заключної частини, висновків, списку основної літератури, що використовувалась (197 джерел). Робота проілюстрована 28 рисунками та 3 таблицями.

Матеріали та методи дослідження

Glu-плазміноген людини виділяли з плазми донорської крові шляхом афінної хроматографії на лізин-сефарозі 4В (Deutch, Merts, 1970) з наступною гель-фільтрацією на сефадексі G-150.

Плазміні одержували активацією Glu-плазміногену стрептокіназою ("Стрептаза" Швейцарія), або урокіназою ("Абокіназа" США), яка була іммобілізована на сефарозі 4В.

Тканинний активатор плазміногену t-PA виділяли з ацетонового порошку, який одержували з сердець свиней (Кудінов, Макогоненко та інш. Авт.св., 1987).

Протеолітичну активність плазміногену (потенційну) і плазміну оцінювали за їх здатністю гідролізувати казеїн (по Гаммерстену) (Robbins, Summaga, 1979).

Активаторну активність тканинного активатора плазміногену визначали методом фібринових плівок (Haverkate, Brakman, 1975)

Фібриноген виділяли з цитратної донорської крові шляхом фракційного висолювання сульфатом натрію (Варецька, 1960). Препарат фібриногену очищали від домішок плазміногену на колонці з лізин-сефарозою, а від домішок фактора XIII - на колонці з п-ХМБ-сефарозою.

Фібрин-мономер дезААВВ одержували, обробляючи фібриноген α -тромбіном фірми "Calbiochem" (США) за наявності контрикалу та п-хлормеркурійбензоату натрію; утворений згусток розчиняли в 20мМ оцтової кислоті (Pozdnjakowa et.al., 1979).

Фібрин-мономер дезАА одержували, обробляючи розчин фібриногену в 0,03М трис-ацетатному буфері, рН 5,3, що містив 0,3М NaCl, тромбіном (0,05 Ніп од. на 1 мг фібриногену) протягом 35хв при 35°C (Луговской и др., 1978). Згодом висолювали сульфатом амонію і двічі переосаджували 0,06М

фосфатним буфером, рН 7,0, та іонною силою 0,22. Препарат дезАА фібрино-мономеру розчиняли в 20мМ оцтовій кислоті.

125I-мічений фібриноген одержували з фібриногену, який мітили Na^{125}I за допомогою хлораміну Т (McConachey, Dixon, 1980)

НДСВ фібрину (N-кінцевий дисульфідний вузол) одержували шляхом розщеплення фібрин-мономеру BrCN в 70% мурашиній кислоті з наступною гель-фільтрацією на сефадексі G-100 (Timpl, Fietzek, 1977). НДСВ очищали методом іонообмінної рідинної хроматографії високої роздільної здатності (Чудновец и др., 1991).

X2 фрагмент фібриногену одержували з 45 хвилинного плазмінового гідролізату фібриногену (молярне співвідношення плазміну до фібриногену 1:500, концентрація фібриногену 10мг/мл) шляхом гель-фільтрації через біогель P-300 з наступною рехроматографією на сефадексі G-200 (Lucas et al., 1983)

D-D фрагмент одержували шляхом плазмінолізу прошитого фактором XIIIa фібрину; гідролізат розподіляли гель-фільтрацією через сефакрил S-300 за високої іонної сили ($\mu=1$), фрагмент D-D доочищали іонообмінною хроматографією на KM-сефадексі.

Фактор XIII вилучали з плазми крові великої рогатої худоби у декілька етапів, які включали фракціонування сульфатом амонію, теплову денатурацію фібриногену, іонообмінну хроматографію на DEAE-Toyopearl (Lorand et al., 1970):

Фібронектин вилучали з плазми донорської крові шляхом афінної хроматографії у неденатуруючих умовах (Vuento, Vaheri, 1979).

Електрофорез у поліакриламідному гелі (ПААГ) провадили у трис-ацетатній системі за наявності 0,1% ДС-натрію (Weber, Osborn, 1969).

Термін напівлізису згустка визначали спектрофотометрично, вимірюючи зміну оптичної густини середовища при 350nm (Bouvier et al., 1975, Макогоненко та інш., 1987).

Активацию GII-плазміногену t-PA вивчали на 125I-мічених фібринових згустках за вивільненням продуктів деградації фібрину. У вічках планшета для імуноферментного аналізу утворювали фібринові згустки з різним ступенем прошивки, оброблюючи фібриноген тромбіном та екзогенним фактором XIIIa і додаючи $1 \cdot 10^6$ імп./хв. ^{125}I -фібриногену (об'єм згустка становив 0,4 мл). Для отримання згустків з фібронектином останній

додавали до інкубаційного середовища у концентрації 100 мкг/мл. Як робочий буфер використовували 0,02М вероналовий буфер, рН 7,4, що містив 0,13N NaCl та 0,001M CaCl₂. Гідроліз згустків провадили, нашаровуючи на поверхню фібринової плівки 0,2 мл реакційної суміші, яка містила Glu-плазміноген у концентраціях від 0 (контроль) до 24 мкг/мл та t-PA (1,5 IU/мл). Реакція відбувалася при 37°C. Через певні проміжки часу відбирали аліквоту (10мкл) надосадової рідини та реестрували у ній радіоактивність за допомогою лічильника "Gamma 550" ("Beckman" США). На прикладі гідролізу непрошитого фактором XIIIa ¹²⁵I-міченого фібринового згустка Glu-плазміногеном, що активується тканинним активатором плазміногену наведено загальну схему визначення кінетичних параметрів процесу активації. На рис. 1 подано одержані криві залежності вивільнення ¹²⁵I-мічених продуктів деградації фібрину з гелю в розчинну фазу середовища при гідролізі непрошитого фібрину Glu-плазміногеном, що активується t-PA. Використовуючи графічне диференціювання на ділянці кривої від 20хв до 30хв, за калібрувальною кривою вираховували швидкість утворення плазміну для певної концентрації плазміногену. Для побудови калібрувальних кривих фібринові згустки, утворені за тих самих умов, гідролізували плазміном у концентраціях від 0 (контроль) до 3,2мкг/мл. На рис. 2 наведено графіки збільшення радіоактивності розчинної фази системи непрошитого фібрину в ході його гідролізу плазміном. У вибраних концентраціях плазміну залежність вивільнення ¹²⁵I-мічених продуктів деградації фібрину від терміну гідролізу (у межах до близько 20хв) має лінійний характер. На підставі одержаних графіків будували калібрувальні криві у координатах tgα / [плазмін], де α - кут нахилу кривої збільшення радіоактивності для кожної концентрації плазміну до осі абсцис. На рис. 3 наведено калібрувальну криву, що отримана за гідролізом непрошитого фактором XIIIa фібрину плазміном.

Криві залежності швидкості утворення плазміну в процесі активації Glu-плазміногену t-PA від концентрації Glu-плазміногену за постійної концентрації t-PA мали вигляд типових кривих Міхаеліса-Ментен для кожного типу згустків. Ці криві лінеаризували у координатах [S]/V-[S] (рис.4.), за якими розраховували кінетичні параметри активації Glu-плазміногену тканинним активатором плазміногену у вибраних системах.

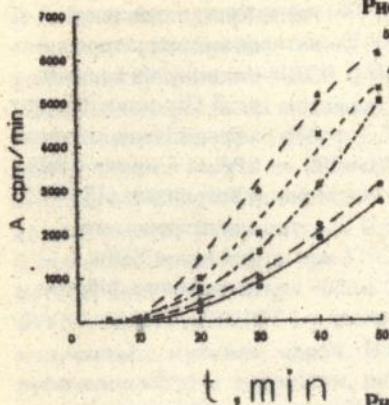


Рис. 1. Залежність вивільнення ^{125}I -мічених продуктів деградації фібрину з гелю в розчинну фазу середовища протягом гідролізу непрощитого фактором XIII фібрину Gln-плазміногеном (у концентраціях 1. -0,5; 2. -1; 3. -4; 4. -8; 5. -24 мкг/мл), що активується t-PA.

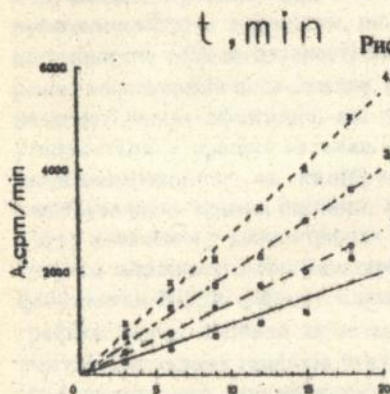


Рис. 2. Зміна радіоактивності розчинних ^{125}I -мічених продуктів деградації фібрину в реакційному середовищі, яке нашароване на непрощитий фібриновий гель, у процесі його гідролізу плазміном у концентраціях: 1. -0,4; 2. -0,8; 3. -1,6; 4. -3,2 мкг/мл

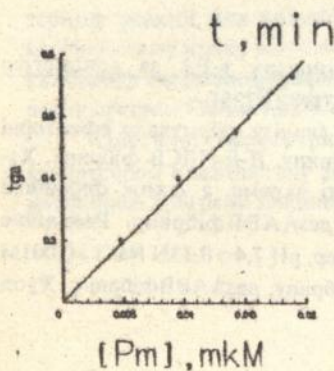


Рис. 3. Калібрувальна крива залежності t/g від концентрації плазміну для непрощитого фактором XIIIa фібрину

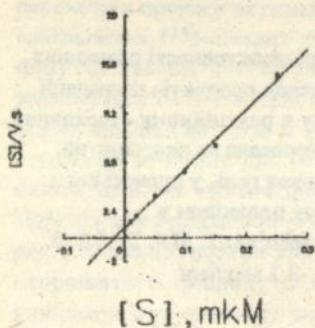
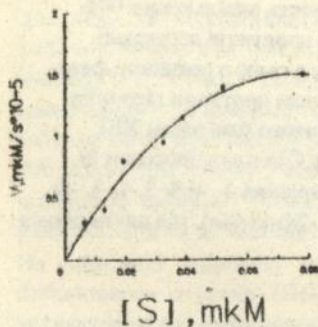


Рис.4. Крива залежності швидкості утворення плазіну від концентрації Glu-плазіногену, в процесі його активації t-PA та її лінеаризація у координатах $[S]/V-[S]$ для непроститого фактором XIIIa полімерного фібрину.

Дослідження активації Glu-плазіногену t-PA за допомогою хромогенного специфічного для плазіну субстрату S2251.

У вічках планшета для імуноферментного аналізу формували ефекторні системи: комплекси фібриноген-НДСВ фібрину, Д-Д-НДСВ фібрину, X₂-НДСВ фібрину, фрагменти Д-Д і X₂ взяті окремо, а також фібринові згустки, утворені з мономерів дезАА- та дезААВВ фібрину. Реакційне середовище містило 0,02M вероналовий буфер, рН 7,4 з 0,13N NaCl і 0,001M CaCl₂. Концентрація фібриногену, дезАА фібрину, дезААВВ фібрину, X₂ та

Д-Д фрагментів становила 100мкг/мл, НДСВ фібрину - 30мкг/мл. Для визначення швидкості активації на дезААфібрині, дезААВВфібрині та на комплексі фібриноген-НДСВ фібрину концентрацію Glu-плазміногену у реакційному середовищі змінювали від 1 до 30мкг/мл, у випадках активації на комплексах X₂-НДСВ фібрину, Д-Д-НДСВ фібрину, X₂ і Д-Д фрагментах взятих окремо - від 1 до 200мкг/мл. Концентрація t-PA у всіх випадках становила 5 IU/мл. Специфічний хромогенний субстрат S2251 містився у кожній системі у концентрації 0,3 мМ. Об'єм реакційної суміші становив 0,2мл. Реакцію провадили при 37°C. Через певні проміжки часу вимірювали оптичну густину проб при 405нм (E₄₀₅) на мікрорідері для ELISA-аналізу (DYNATECH PRODUCT) у двопробеному режимі, в якому автоматично вилучається мутність проби. На рис. 5 наведено графіки швидкості руйнування S2251 плазміном, що утворюється у процесі активації Glu-плазміногену t-PA за наявності комплексу фібриноген-НДСВ фібрину за різних концентрацій плазміногену. Аналогічні серії кривих було одержано за наявності інших ефекторів, які досліджувалися. Кількість плазміну, що утворюється у процесі активації, визначали, використовуючи графічне диференціювання, за калібрувальними кривими. Для побудови калібрувальних кривих системи, які вивчали, гідролізували за наявності S2251 плазміном у концентраціях від 0,5 до 5,0мкг/мл. На рис. 6 наведено графіки залежності зміни E₄₀₅ середовища від терміну гідролізу комплексу фібриноген-НДСВ фібрину плазміном. За даних концентрацій плазміну графіки мають лінійний характер в інтервалі часу до близько 30хв. На підставі одержаних графіків будували калібрувальні криві у координатах tg α -[плазмін], де α - кут нахилу кривої збільшення оптичної густини E₄₀₅ від терміну реакції для кожної концентрації плазміну. На рис. 7 наведено калібрувальну криву для системи фібриноген-НДСВ, Усі графічні побудови та обробку одержаних графіків провадили на EOM IBM PC використовуючи пакет програм CoPlot 1.02. CoHort Software.

Кінетичні параметри активації Glu-плазміногену тканинним активатором плазміногену за наявності різних ефекторів підраховували за допомогою програми Enzfitter R.J. Leatherbarrow для IBM PC

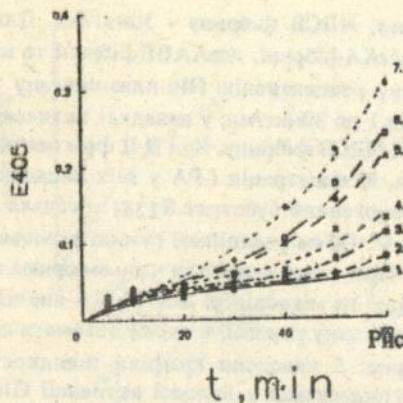


Рис.5. Швидкість руйнування S2251 плазміном, що утворюється в процесі активації Glu-плазміногену (в концентраціях: 1.-1; 2.-1,5; 3.-3; 4.-5; 5.-10; 6.-15; 7.-30 мкг/мл) t-Pa за наявності комплексу фібриноген-НДСВ фібрину.

Рис.6. Залежність зміни E405 середовища від терміну гідролізу S2251 плазміном (у концентраціях: 1.-0,5; 2.-1; 3.-1,5; 4.-2; 5.-3; 6.-5 мкг/мл) за наявності комплексу фібриноген-НДСВ фібрину.

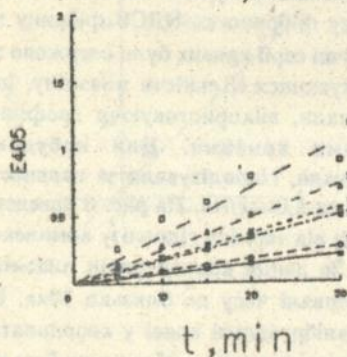
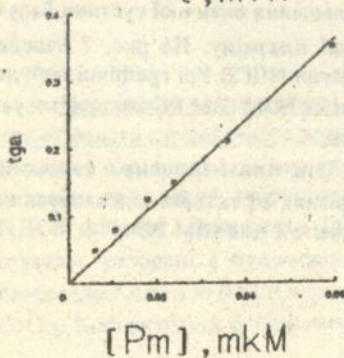


Рис.7. Калібрувальна крива залежність t_{90} від концентрації плазміну для комплексу фібриноген-НДСВ фібрину



Результати та їх обговорення

1. Дослідження активації Glu-плазміногену тканинним активатором плазміногену на моделях фібринових згустків з різним ступенем прошивки фактором XIIIa за наявності та без фібронектину

Суттєві суперечності серед літературних даних не дають однозначної відповіді на питання про вплив ковалентної модифікації фібрину фактором XIIIa на його ефektorні функції в процесі активації. Працюючи з високоочищеними білковими препаратами, ми створювали моделі фібринових згустків, що прошиті фактором XIIIa лише по γ -ланцюгам, по γ -та α -ланцюгам, та непрошиті зовсім. Чистоту препаратів та ступінь прошивки згустків контролювали електрофоретично (Рис. 8). Активацію нативного Glu-плазміногену t-PA досліджували за швидкістю вивільнення ^{125}I -мічених продуктів деградації фібрину в розчинну фазу реакційного середовища та реєструючи швидкість утворення в ході активації плазміну за розщепленням специфічного хромогенного субстрату S2251 і вивільненням p-нітроаніліну. Кінетичні константи реакції активації Glu-плазміногену t-PA, що обраховані за результатами, одержаними першим методом, склали для непрошитого згустка $K_m=0,019\text{мкМ}$, $k_{\text{cat}}=0,1\text{с}^{-1}$, прошитого по γ -ланцюгам $K_m=0,065\text{мкМ}$, $k_{\text{cat}}=0,09\text{с}^{-1}$, прошитого по γ -та α -ланцюгам $K_m=0,08\text{мкМ}$, $k_{\text{cat}}=0,08\text{с}^{-1}$. Метод з використанням S2251 дозволив розмежити дві фази реакції активації та визначити кінетичні параметри реакції активації Glu-плазміногену t-PA на непрошитому та повністю прошитому полімерному фібрині для першої та другої стадій активації. Результати подано у табл. 1.

Одержані результати свідчать про те, що прошивка фібрину по γ - і α -ланцюгам (у відсутність α_2 -антиплазміну) помітно гальмує швидкість активації Glu-плазміногену t-PA та погіршує ефektorні властивості фібрину. Варто зазначити, що прошивка згустка тільки по γ -ланцюгам призводить до деякого зменшення спорідненості t-PA до плазміногену. Певно, що прошивка фібрину фактором XIIIa модулює взаємодію тканинного активатора з плазміногеном; прошивка α -ланцюгів фібрину блокує або робить менш

рухомими, а тому менш доступними ділянки зв'язування на α C-доменах для t-PA та плазміногену.

Таблиця 1. Кінетичні параметри активації Glu-плазміногену t-PA на непрошитому та повністю прошитому фактором XIIIa полімерному фібрині

	Km (мкМ)		k _{cat} (с-1)		k _{cat} /Km (мкМ ⁻¹ с ⁻¹)	
	I фаза	II фаза	I фаза	II фаза	I фаза	II фаза
Непрошитий	0,075	0,018	0,016	0,01	0,21	0,5
Прошитий	0,37	0,067	0,052	0,017	0,14	0,25

Ковалентна модифікація фібрину фактором XIIIa порушує взаємне розташування α C- та D-доменів, стерично утруднює доступ Glu-плазміногену і t-PA до ділянок зв'язування на коровій частині молекули фібрину.

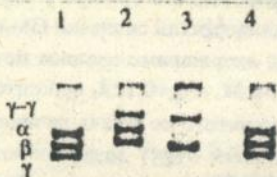


Рис. 8. Електрофореграма зразків полімерного фібрину: непрошитий (1), прошитий лише по γ -ланцюгам (2), та повністю прошитий як по γ - так і по α -ланцюгам фактором XIIIa. Електрофореграма фібрину (4), що був проінкубований при 37°C протягом 120хв. за наявності тромбіну подано як контроль очистки фібрину від домішок фактора XIII. Згустки утворювали за наявності фібронектину. Розподіл проваджит у 10% ПААГ з DS-Na, за наявності відновлювача - дигіотрейтолу.

У процесі формування фібринового згустка, крім фібрину, до нього залучаються і деякі інші білки плазми крові, зокрема фібронектин, вміст якого у згустку складає 4% від маси білків (Mosher, Johnson, 1983). Відомо, що фібронектин не прискорює активації плазміногену t-PA у розчині (Beckman, et al., 1991). Ми досліджували вплив фібронектину, що залучений до згустка за відсутності фактора XIIIa, на активацію Glu-плазміногену тканинним активатором плазміногену та на швидкість лізису згустка плазміном. Методом визначення терміну напівлізису згустка було показано, що ні швидкість гідролізу фібрину, що відбувався по всьому об'єму згустка, плазміном, ні кінетичні параметри активації Glu-плазміногену t-PA не змінювалися за наявності у реакційному середовищі фібронектину.

Проте, відомо, що фібронектин є субстратом для фактора XIIIa, який ковалентно приєднує його до α -ланцюга фібрину. Прошивка фібронектину з α -ланцюгами фібрину під дією фактора XIIIa відбувається із швидкістю близькою до подібної для прошивки самих α -ланцюгів фібрину. У роботі вивчали процес активації Glu-плазміногену t-PA на моделях фібринових згустків з різним ступенем прошивки фактором XIIIa та залученим до них фібронектином (Рис. 8). Швидкість вивільнення ^{125}I -мічених продуктів деградації фібрину з непрошитих фібринових згустків, що містять фібронектин, не відрізнялась від подібної фібринових згустків без фібронектину. Повністю прошитий фактом XIIIa фібриновий згусток, модифікований фібронектином, гальмує швидкість активації Glu-плазміногену t-PA. Константа Міхаеліса у такому згустку збільшувалася від $K_m=0,08\text{мкМ}$ (згусток без фібронектину) до $K_m=0,21\text{мкМ}$ за наявності фібронектину (Табл. 2). Таким чином було показано, що фібронектин у непрошитому фібриновому згустку не впливає на ефекторні властивості фібрину, а ковалентне включення фібронектину в фібриновий згусток, прошитий по γ - та α -ланцюгам фактором XIIIa, гальмує активацію Glu-плазміногену t-PA і зменшує швидкість руйнування фібрину. Одним з можливих пояснень цього факту може бути припущення про включення фібронектину в α C-домени фібрину під дією фактора XIIIa, що зменшує прошивку α C-доменив між собою і зберігає структурну відокремленість α C-доменив. Ймовірно, що прошивка фібронектину з α -ланцюгами фібрину поряд з прошивкою самих α -ланцюгів фібрину, блокує ділянки зв'язування

на α C-доменах для плазміногену і тканинного активатора плазміногену. Залучення фібронектину до згустка модулює зв'язування плазміногену і t-PA з фібрином. З іншого боку було показано (Salonen et al., 1985), що імобілізований фібронектин зв'язує тканинний активатор плазміногену. Не виключено, що на модифікованому фактором XIIIa згустку за наявності фібронектину, частина t-PA і плазміногену зв'язується не з фібрином, а з фібронектином, що гальмує активацію.

Залучення фібронектину до фібринового згустка має значення для стабілізації згустка і збільшення його резистентності до плазмінолізу.

Таблиця 2. Кінетичні параметри активації Glu-плазміногену t-PA на полімерному фібрині з різним ступенем прошивки фактором XIIIa за наявності та без фібронектину

	Непрошитий		Частково прошитий		Повністю прошитий	
	з Фн		з Фн		з Фн	
Km(мкМ)	0,019	0,019	0,065	0,078	0,08	0,21
k _{cat} (с ⁻¹)	0,1	0,1	0,09	0,08	0,06	0,05
k _{cat} /Km (мкМ ⁻¹ *с ⁻¹)	5,3	5,3	1,38	1,02	0,75	0,24

2. Роль деяких структур полімерного фібрину в активації Glu-плазміногену тканинним активатором плазміногену

2.1. Дослідження активації Glu-плазміногену t-PA на фібринових згустках, утворених з дезAA• і дезAABВфібрину

Початковий етап полімеризації фібрину полягає в утворенні мономеру дезAAфібрину та його полімеризації у протофібрили, які потім латерально асоціюють, формуючи фібрили. Відщеплення В-пептидів тромбіном та перехід фібрину в дезAABВ-форму важливий для забезпечення високої швидкості формування структури згустка і для стабілізації внутрішньо- та міжпротофібрилярних взаємодій молекул фібрину. Для того, щоб

визначити, чи змінює перехід дезААфібрину в дезААВВформу ефекторні властивості фібрину, ми вивчали кінетику активації Glu-плазміногену t-PA на фібринових згустках, які утворені із мономерів дезАА- та дезААВВфібрину. У вибраних нами умовах, з використанням модифікованого методу визначення кількості плазміну, що утворюється в процесі активації, за швидкістю руйнування специфічного хромогенного субстрату S2251, швидкість активації Glu-плазміногену t-PA виявилась однаковою на фібринових згустках, що утворені з мономерів як дезАА-, так і дезААВВфібрину. Кінетичні константи активації склали для дезААфібрину $K_m=0,056\text{мкМ}$, $k_{cat}=0,1\text{с}^{-1}$, на дезААВВфібрині $K_m=0,053\text{мкМ}$, $k_{cat}=0,1\text{с}^{-1}$.

Тонкі відмінності у структурі дезАА- та дезААВВфібрину, зокрема наявність В-пептидів у дезААфібрині, Ca^{2+} , що зв'язаний з дезААВВфібрином (Shainoff, Dardik, 1983), певно не суттєві для ефекторних властивостей полімерного фібрину.

2.2. Активація Glu-плазміногену тканинним активатором плазміногену за наявності комплексів НДСВ фібрину з фібриногеном та фрагментами фібрино(ген)у, які містять D домен

У вивченні стимулюючої здатності, що притаманна фібрину в процесі активації плазміногену t-PA, нашу увагу привернуло дослідження ролі окремих структур полімерного фібрину, які відповідають за зв'язування плазміногену та t-PA та важливі для забезпечення активаційного процесу. Серед таких структур у літературі виділяють олігомери α C-доменів, D-E-D тріади полімерного фібрину (Suenson, Peterson, 1989), міждомену суперспіралізовану ділянку, яка прилягає до D-домену та містить Lys 157 α -ланцюга фібрину (Voskuilen et.al., 1987), а також ділянку γ -ланцюга 311-379, що локалізована у D-домени (Yonekawa, et.al., 1990). Для дослідження ролі певних структур фібринового згустка в активації нативного Glu-плазміногену тканинним активатором плазміногену були вибрані декілька моделей - комплекси фібриноген-НДСВ фібрину, D-D-НДСВ фібрину та X₂-НДСВ фібрину.

Комплекс фібриноген-НДСВ фібрину - це модель полімерного фібрину (Позднякова и др., 1985), яку одержано сополімеризацією фібриногену та вилученого з фібрину за допомогою ВгСN високомолекулярного фрагменту, що містить S-S зв'язані N-кінцеві ділянки поліпептидних ланцюгів фібрину (N-кінцевий дисульфідний вузол). НДСВ фібрину - схожий з E фрагментом і зберігає E-центри полімеризації. У комплексі фібриноген-НДСВ фібрину молекула фібриногену має видовжену, як і молекула фібрину, форму. D-домени сусідніх молекул з'єднані кінець-до кінця фрагментами НДСВ, створюючи подібність одноланцюгових протофібрил і D-E-D триад. Протофібрили здатні латерально асоціювати у великі агрегати, які містять основні елементи фібрили полімерного фібрину: D-E-D триади, міжпротофібрилярні контакти D-E-D триад і в незначчій мірі «6%·αC-доменів».

Додавання НДСВ фібрину до розчину фібриногену або фібрину до розчину НДСВ фібрину супроводжується зміною ступеня мутності середовища подібно до того, як змінюється мутність середовища (E350) при дії тромбіну на фібриноген.

Попередньо було встановлено, що фрагменти фібрин(о)гену, які містять D домен, здатні утворювати комплекси з НДСВ фібрину (Позднякова и др., 1983). До таких фрагментів належать X₂ фрагмент фібриногену, який позбавлений αC-доменів і N-кінцевих (1-42) пептидів Вβ-ланцюга, та D-D - фрагмент прошитого фактором XIIIа фібрину, що являє собою ковалентно з'єднані два фрагменти D. Комплекси X₂-НДСВ фібрину і, в найбільшій мірі, D-D-НДСВ фібрину є аналогами D-E-D триади, містять Lys157 і Val152 α-ланцюга, які доступні для взаємодії з плазміногеном і t-РА. Проте ці комплекси не змінюють мутності середовища протягом 24 год при 37°C.

Для вивчення активації Glu-плазміногену тканинним активатором плазміногену на комплексах фібриноген-НДСВ фібрину, X₂-НДСВ фібрину, D-D-НДСВ фібрину та на фрагментах X₂ і D-D, узятих окремо, використовували метод реєстрації швидкості утворення плазміну за швидкістю руйнування специфічного хромогенного субстрату S2251. Підраховані кінетичні параметри активації Glu-плазміногену тканинним активатором плазміногену за наявності різних ефекторів представлені у табл. 3.

Таблиця 3. Кінетичні параметри активації Glu-плазміногену t-PA за наявності різних ефекторів

Ефектор активації	K _m (мкМ)	K _{кат} (с ⁻¹)	K _{кат} /K _m (мкМ ⁻¹ с ⁻¹)
Фібриноген-НДСВ	0,125	0,06	0,45
Х ₂ -НДСВ	0,83	0,04	0,046
Д-Д-НДСВ	0,15	0,06	0,37
Х ₂	1,2	0,02	0,017
Д-Д	0,62	0,04	0,071
Фібриноген+тромбін	0,017	0,13	7,64
дезААВВфібрин	0,053	0,1	1,88
дезААфібрин	0,056	0,1	1,78

Вперше було показано, що комплекси фібриноген-НДСВ фібрину та Д-Д-НДСВ фібрину здатні стимулювати активацію плазміногену тканинним активатором плазміногену. Комплекс Х₂-НДСВ фібрину і фрагменти Х₂ та Д-Д, узяті окремо, мали менш виражені ефекторні властивості у процесі активації. Вцілому швидкість реакції збільшувалась (к_{кат}/К_m), а К_m зменшувалась у ряду ефекторів, що досліджувалися, таким чином: Х₂ → Х₂-НДСВ → Д-Д → Д-Д-НДСВ, фібриноген-НДСВ → фібриновий згусток.

Для того, щоб пояснити відмінності у ефекторних властивостях, слід розглянути особливості у структурах полімерного фібрину, комплексів фібриноген-НДСВ фібрину, Х₂-НДСВ фібрину і Д-Д-НДСВ фібрину. У комплексі фібриноген-НДСВ фібрину суперспіралізовані міждоменні ділянки і Д-Е-Д тріади розташовані вдвічі далі одне від одного, ніж у полімерному фібрині. У цьому комплексі деяка частина αС-доменів («20%») може бути у формі олігомерів. У комплексі Х₂-НДСВ фібрину утворюються нестійкі розчинні лише олігомерні структури, що містять аналоги Д-Е-Д тріад та міждоменні суперспіралізовані структури з Lys157 α-ланцюга, які доступні для плазміногену і t-PA. Комплекс Д-Д-НДСВ фібрину є аналогом тріади полімерного фібрину і містить ділянки 311-379 γ-ланцюга та Lys157, Val152 α-ланцюга.

Як уже згадувалося, процес активації плазміногену t-PA двостадійний. Перша стадія - із низькою спорідненістю t-PA до плазміногену та невеликою швидкістю - починається після відщеплення фібринопептидів А від фібриногену та формування протофібрил (Suenson et al., 1990); друга - з високою спорідненістю t-PA до плазміногену і значною швидкістю активації - триває після початкової деградації полімерного фібрину плазміном, що утворився. Можна припустити, що кожній фазі (стадії) процесу активації відповідає свій активаторний комплекс. Протягом першої стадії до активаторного комплексу, певно, залучені α C-домени. Свідченням цього є те, що α C-домени полімерного фібрину афінно зв'язують плазміноген і t-PA (Lloyd et al., 1981), а часткове відщеплення α C-доменив призводить до переходу реакції до другої більш швидкої стадії (Norman et al., 1985), і підвищення спорідненості t-PA до плазміногену (Suenson et al., 1984), що, очевидно, є результатом збільшення спорідненості Glu-плазміногену і t-PA до фібрину. Збільшення спорідненості тканинного активатора та плазміногену до частково деградованого фібрину спричинене окрім збільшення доступності локуса на α -ланцюгу фібрину, який містить Lys157, утворенням С-кінцевого лізину на α -ланцюгу на поверхні D-домену.

У наших дослідженнях K_m і k_{cat} активації Glu-плазміногену t-PA відповідають другій фазі реакції активації, що пов'язано з високою концентрацією тканинного активатора плазміногену та особливостями методу, який не давав можливості точно зареєструвати швидкість реакції на її початковій стадії. Подібні величини підрахованих кінетичних констант реакції активації Glu-плазміногену t-PA за наявності комплексів фібриноген-НДСВ фібрину і D-D-НДСВ фібрину дають підстави припустити, що активаторний комплекс другої фази локалізований на D-E-D тріаді. На рис. 9, 10 запропоновані гіпотетичні схеми розташування Glu-плазміногену та t-PA на комплексі фібриноген-НДСВ фібрину і D-E-D тріаді. На поверхні комплексу фібриноген-НДСВ фібрину Glu-плазміноген і t-PA розташовані на D-E-D тріадах, що підтверджується даними Вейселя (Weisel, Papsun, 1987); α C-домени фібриногену прилягають до E-доменив, скоріше за все олігомери α C-доменив, які можуть утворюватися у цьому комплексі, не беруть участі у формуванні активаторного комплексу. Активалія плазміногену і утворення плазміну спричинює відщеплення α C-доменив та N-кінцевих 1-42

пептидів В β -ланцюга, розташованих поруч. Після вилучення останніх, хоча це питання остаточно не з'ясоване, комплекс фібриноген-НДСВ фібрину розпадається. У випадку Д-Е-Д тріади, Glu-плазміноген локалізований на "бічній" поверхні тріади і звернений до міжтріадного простору у протофібрилі, а t-PA - на субдомени TSD фрагмента Д. Утворений в процесі активації плазмін відщеплює $\beta(1-42)$ пептиди, і тріада розпадається. Слід відзначити важливу роль фрагмента Е в утворенні активаторного комплексу на тріаді, оскільки швидкість активації на Д-Д димері на порядок нижча.

Для полімерного фібрину Km активації менша за таку для комплексів і фрагментів, що досліджувалися. Можна припустити, що у полімерному фібрині утворенню активаторного комплексу другої фази активації і збільшенню спорідненості t-PA до плазміногену сприяє більш близьке розташування суперспіральних міждомених ділянок та Д-Е-Д тріад.

Втрата стимулюючої дії комплексу X₂-НДСВ фібрину на процес активації напевно відбувається через нестабільність цього комплексу, який не утворює полімерних структур при заданих умовах проведення експериментів ($t^0=37^{\circ}\text{C}$, $\mu=0,15$), а олігомери швидко розпадаються.

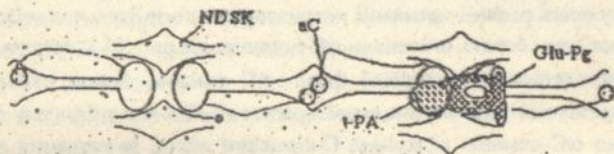


Рис. 9. Схеми розташування Glu-плазміногену і t-PA на поверхні комплексу фібриноген-НДСВ. Glu-плазміноген і t-PA розташовані на Д-Е-Д тріадах, αC -домени фібриногену прилягають до Е-доменив.

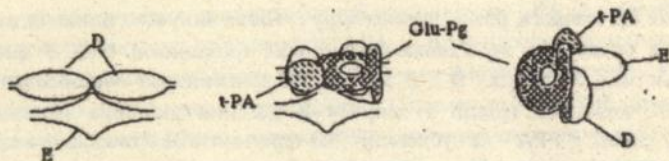


Рис. 10. Схема Д-Е-Д триади та локалізація Glu-плазміногену і t-PA на її поверхні. Glu-плазміноген розташований на "бічній" поверхні триади, t-PA - на субдомени TSD Д-фрагменту.

Отже, на основі зроблених припущень можна конкретизувати уявлення про структури активаторних комплексів тканинний активатор плазміногену-фібрин-плазміноген і запропонувати схему просторового розташування компонентів комплексу на різних етапах процесу активації Glu-плазміногену t-PA та гідролізу полімерного фібрину плазміном, що утворився.

На першому етапі реакції активації активаторний комплекс локалізований на структурах, що містять олігомери α C-доменів. На рис. 11 наведено схему активаторного комплексу першої фази; α C-димери, певно, створюють стеричні перешкоди для оптимальної орієнтації Glu-плазміногену і t-PA. Відщеплення α C-доменів відкриває С-кінцевий лізин, зв'язування з яким викликає зміну конформації молекули Glu-плазміногену. Процес активації переходить у другу фазу, де активація прискорюється в 15-20 разів. Активаторний комплекс переміщується на міждомени суперспіралізовані ділянки, які прилягають до Д-Е-Д триад.

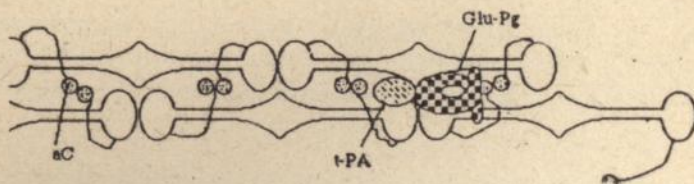


Рис. 11. Схема активаторного комплексу першої фази реакції активації. α C-димери, певно, створюють стеричні перешкоди для оптимальної орієнтації Glu-плазміногену і t-PA.

Висновки

1. Показано, що ковалентна прошивка фібрину по γ - та α -ланцюгах гальмує швидкість активації Glu-плазміногену тканинним активатором плазміногену і погіршує ефекторні властивості фібрину в процесі активації у порівнянні з непрошитим фібрином.

2. Виявлено, що фібронектин у непрошитому фібриновому згустку не впливає на ефекторні властивості фібрину в процесі активації; включення фібронектину в фібриновий згусток, в умовах його прошивки по γ - і α -ланцюгах фактором XIIIa, гальмує активацію Glu-плазміногену t-PA та зменшує швидкість руйнування фібрину.

3. У фібринових згустках, утворених з мономерів дезАА- та дезААВВ-фібрину, кінетичні параметри активації Glu-плазміногену t-PA залишаються без змін.

4. Вперше показано, що комплексам фібриноген-НДСВ фібрину та Д-Д-НДСВ фібрину притаманна стимулююча здатність щодо процесу активації Glu-плазміногену тканинним активатором плазміногену.

5. Запропонована схема взаємного просторового розташування компонентів потрібного циклічного активаторного комплексу t-PA-фібри-

плазміноген на різних етапах процесу активної деградації фібрина утворюється за участю α C-доменів, на другий етап процесу активної деградації фібрина міждоменних суперспіралізованих ділянок сусідніх ниток протофібрил.

Основні положення дисертації надруковано в наступних роботах:

1. Колесник Л.А., Дружина Н.Н., Макогоненко Е.М. Выделение и очистка фибринстабилизирующего фактора (ФХП) из плазмы бычьей крови // Тез. докл. Всесоюзной конференции "Методы выделения, анализа и применения ферментов", Юрмала, 1990, С. 65.

2. Makogonenko E.M., Lugovskoy E.V., Druzhina N.N., Kolesnik L.A., Kudinov S.A. Fibrinogen-NDSK complex stimulates the plasminogen activation by t-PA // Abstracts of the Tenth International Congress on Fibrinolysis: Indianapolis, USA. Fibrinolysis. -1990. -4, suppl. 3. -P. 86.

3. Макогоненко Е.М., Дружина Н.Н., Луговской Э.В., Колесник Л.А., Кудинов С.А. Активация плазминогена тканевым активатором и эфektorные свойства комплекса фибриноген - N-концевой дисульфидный узел (N-ДСУ) фибрина. // Укр.біохім.журн. -1991. -63, №3. -С. 17-23.

4. Дружина Н.М., Яковлев С.О., Колесник Л.О., Макогоненко Е.М., Кудинов С.О. Кінетичні характеристики активації Глу-плазміногену тканинним активатором плазміногену на полімерному фібрині, що модифікований ФХПш у присутності фібронектину// VI Український біохімічний з'їзд. Київ, 1992, С. 12.

5. Дружина Н.Н., Макогоненко Е.М., Яковлев С.А. Роль отдельных структур полимерного фибрина в активации Глу-плазминогена тканевым активатором плазминогена // Докл. АН Украины. -1993. -2. -С. 151-154.

Підп. до друку 15.12.93. Формат 60x84/16. Папір друк. Сфс. друк.
 Ум. друк. арк. 1.39. Ум. фарбо-відб. 1.39. Обл.-вид. арк. 11
 Тираж 100 пр. Зам. 458 Безкоштовно.

Віддруковано в Інституті математики АН України
 252601 Київ 4, ГСП, вул. Терещенківська, 3