

КЛІТИНИ РС-12 ГІДРОЛІЗУЮТЬ ФІБРИНОВИЙ ЗГУСТОК ШЛЯХОМ ПРОДУКЦІЇ ПЛАЗМІНОГЕНУ ТА ЙОГО ТКАНИННОГО АКТИВАТОРА

Ю. І. ПЕТРОВА¹, О. М. САВЧУК¹, О. М. КАЛАШНИК¹, Т. М. ПЛАТОНОВА¹, М. В. СКОК¹,
С. СЕДЕРХОЛЬМ-ВІЛЬЯМС²

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

²Лаборатория биологических исследований, Оксфорд, Великобритания;
e-mail: julia@biochem.kiev.ua

Показано, что клеточная линия феохромоцитомы РС-12 способствует деградации фибринового сгустка в культуре. Методами SDS-электрофореза в полиакриламидном геле разной плотности и иммуноблоттинга с моноклональными антителами против DD- и D-фрагментов фибрина найдено, что в результате гидролиза образуются как высоко-, так и низкомолекулярные фрагменты, соответствующие продуктам плазминового гидролиза фибрина. С помощью энзим-электрофореза, хромогенного субстрата и иммуноферментного анализа обнаружено, что клетки РС-12 конститутивно продуцируют как плазминоген, так и тканевой активатор плазминогена. Полученные результаты позволяют использовать клетки РС-12 в качестве модели для исследования взаимодействия нервных клеток и фибринового сгустка.

К л ю ч е в ы е с л о в а: клетки РС-12, гидролиз фибрина, плазминоген, тканевой активатор плазминогена.

Зсідання крові є складним каскадним процесом, під час якого відбувається утворення фібринового згустка з його наступною деградацією протеолітичними ферментами. Головну роль в елімінації фібрину із кровотоку відіграє плазмін, який продукується у вигляді зимогену (плазміногену). Основним джерелом тканинного активатора плазміногену (ТАП), що каталізує перетворення плазміногену у плазмін, вважають ендотеліальні клітини. Гранулоцити експресують на своїй поверхні рецептори для урокіназного активатора плазміногену і таким чином сприяють утворенню плазміну [1]. За певних умов ці клітини секретують еластазу, яка розщеплює фібрин(оген) незалежно від плазмінової системи [2]. Нейтрофіли руйнують фібриновий згусток за допомогою мембранних протеїназ [3].

Особливий інтерес викликає взаємодія фібрину і нервових клітин. У разі відновлення після травми або хірургічного втручання фібриновий матрикс істотно прискорює регенерацію нервів [4]. Його використовують як клей для обробки хірургічних ран і для безпосереднього відновлення нервів [5–7], для доставки певних речовин в місця відновлення [8]. Також фібриновий матрикс привертає увагу як середовище для трансплантації нервових клітин при нейродегенеративних захворюваннях, таких як хвороба Паркінсона [9], для полегшення стану при хро-

нічних болях [10], для покращення моторних функцій в осіб похилого віку [11].

За взаємодії нервових клітин з фібриновим згустком спостерігається їхній взаємний вплив: клітини стимулюють гідроліз фібрину, що є необхідним для проростання нервів крізь відновлену рубцеву тканину, а продукти гідролізу, відповідно, є біологічно активними по відношенню до клітин.

Метою наших досліджень було вивчення особливостей взаємного впливу нервових клітин і фібринового згустка. Представлена робота є першим кроком в цих дослідженнях. Її метою було вивчення продуктів гідролізу фібринового згустка клітинами сімпато-адреналового походження РС-12 і характеристика фрагментів фібрину, що утворюються при цьому.

Матеріали і методи

Як модель нервових клітин було використано пухлинну клітинну лінію РС-12, що походить із хромафінних клітин наднирникової залози щура і диференціюється в культурі у клітини, подібні до симпатичних нейронів [12]. Культуру було одержано з Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України (Київ). Клітини вирощували в культуральних флаконах у поживному середовищі RPMI-1640 з додаванням 20 мМ NEPES, 20 мМ L-глутаміну, $5 \cdot 10^{-5}$ М β -меркаптоетанолу, 40 мкг/мл гентаміцину та 10% теля-

чої сироватки («Gibco BRL», Німеччина). Для експерименту клітини знімали з пластика піпетуванням або 0,2%-м розчином ЕДТА, відмивали та засівали у 96-, 48- або 24-лункові планшети з густиною $2 \cdot 10^4$ клітин/мл. Перед додаванням до поживного середовища розчини фібриногену, тромбіну та інгібіторів ферментів стерилізували фільтруванням крізь фільтри з діаметром пор 0,22 мікрона.

Фібриноген і плазміноген одержували з донорської цитратної плазми крові. Фібриноген виділяли за присутності 100 мг/мл соєвого інгібітора трипсину переосадженнями з 8,5%-м сірчаноокислим натрієм за методом Т. В. Варецької [13]. Плазміноген отримували за методом [14]. Для культивування разом із клітинами згусток готували з суміші розчинів фібриногену (20 мг/мл) та тромбіну («Merck», Німеччина) – 4 НІН/мл білка. Цю суміш витримували 30 с у пробірці і вносили в лунки із розрахунку 20 мкл на 1 мл поживного середовища. Як контроль використовували фібриновий згусток у поживному середовищі, але без клітин. Під час культивування згусток спостерігали візуально і рівень його деградації клітинами РС-12 оцінювали вимірюванням його діаметра безпосередньо або після фотографування.

Після повної деградації згустка відбирали проби для електрофорезу та імуноблотингу. Відібрані проби очищали на КМ-сефадексі С-50 («Pharmacia Fine Chemicals», Швеція), з яким зв'язуються всі білки, що містять домен D фібриногену і частина E-фрагменту завдяки утворенню DD : E-комплексів. Для визначення низькомолекулярних продуктів гідролізу гідролізат фракціонували ультрафільтрацією із границею розділення 30 кДа. Електрофорез високомолекулярних продуктів деградації проводили в 7%-му поліакриламідному гелі за присутності Ds-Na методом Леммлі [15], а низькомолекулярних продуктів – в 13%-му поліакриламідному гелі методом Свенка [16]. За допомогою напівсухого блоту білки переносили на нітроцелюлозну мембрану Hybond-C («Amersham», Великобританія). Мембрану обробляли послідовно або кролячими антитілами (АТ) проти фібрин(оген)у та його фрагментів, отриманими нами раніше, і пероксидазним кон'югатом антитіл кози проти імуноглобулінів кроля («Sigma», США) або моноклональними АТ (МАТ) III–3В і мишачим комплексом пероксидаза-антипероксидаза («ДАКО», Данія). МАТ III–3В були одержані і люб'язно надані нам для досліджень групою к.б.н. Е. В. Луговського (Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАНУ, Київ). Для візуалізації білкових зон використовували хромогенний субстрат пер-

оксидази 4-хлор-1-нафтол («Sigma», США).

Визначення плазміну в еуглобуліновій фракції супернатантів клітин проводили методом ензим-електрофорезу (без додавання плазміногену в гель), активатори плазміногену визначали трьома різними методами: сорбційним імуноферментним аналізом (СІФА), ензим-електрофорезом і хромогенним аналізом. Еуглобулінову фракцію культурального середовища і супернатантів після вирощування клітин РС-12 готували за методом, описаним у роботі [17]. Для СІФА проби адсорбували на полістиролових планшетах, потім, після блокування вільних сайтів зв'язування 2%-м розчином бичачого сироваткового альбуміну в 0,05 М натрій фосфатному буфері протягом 1 год при 37 °С рН 7,4 (PBS), обробляли козячими АТ, специфічними до ТАП. Первинні АТ виявляли пероксидазним кон'югатом кролячих антитіл до імуноглобулінів кози («Sigma», США) з подальшою проявкою хромогеном («Sigma», США). Ензим-електрофорез проводили за методом [18] із невеликими модифікаціями: готували 10%-й поліакриламідний гель, в який під час полімеризації додавали бичачий фібриноген і плазміноген до кінцевої концентрації 2 мг/мл і 1,2 мкг/мл відповідно. Після електрофорезу і видалення SDS з допомогою 2,5% тритону Х-100 гель вимочували в розчині із тромбіном, 0,1 НІН/мл, для полімеризації фібрину всередині поліакриламідного гелю. Хромогенний аналіз із синтетичним субстратом плазміну S-2251 («Chromogenic», Швеція) проводили за допомогою методу [19] в модифікації О. М. Савчука [20].

Результати та обговорення

Під час культивування клітин РС-12 за присутності фібринового згустка відбувається деградація останнього (рис. 1). Гідроліз згустка спостерігається також за інкубації із супернатантами клітин РС-12, які культивували за відсутності згустків, але не з чистим культуральним середовищем. Рівень деградації залежить як від кількості клітин або об'єму супернатанта, так і від об'єму згустка і вихідної концентрації фібриногену.

Зроблено висновок, що клітини РС-12 конститутивно секретують протеїназу (протеїнази), що руйнує фібриновий згусток. Дія цього ферменту пригнічується діізопропілфторфосфатом (ДФФ), апротиніном і апротинівмісною сумішшю, але не ЕДТА, пепстатином, N-тозил-L-фенілаланінхлорометилкетонем (ТФХК) і фенілметилсульфонілфторидом (ФМСФ), завдяки чому було висунуто припущення, що ми маємо справу з сериною протеїназою – плазміном.

Електрофорез в 7%-му поліакриламідному



Рис. 1. Руйнування фібринового згустка клітинами PC-12. 24 години після посадки. Стрілками зазначено порожнини, заповнені клітинами, що утворилися в згустку внаслідок гідролізу.

гелі показав, що після повного руйнування згустка за дії клітин PC-12 у культуральному середовищі виявляються такі самі фрагменти фібрину, як після його гідролізу плазміном, а саме DD-, D- і E-фрагменти [21] (рис. 2, треки 2–3). У відновлювальних умовах DD-фрагмент розпадається на компоненти з M_m 78, 40 і 12 кДа, що відповідає масі його $\gamma\gamma$ -, β - і α -ланцюгів (рис. 3). Поряд із цим, утворювалися і низькомолекулярні фрагменти з M_m 25–26, 7–8 і 6 кДа (рис. 2, трек 4). Оскільки сайти розщеплення фібрину плазміном відрізняються лише декількома амінокислотами від сайтів розщеплення його еластазою [22], результати електрофорезу не дають змоги диференціювати ці два типи гідролізу. Використання МАТ III-3В, специфічних до D- і DD-фрагментів фібрину, що утворюються за

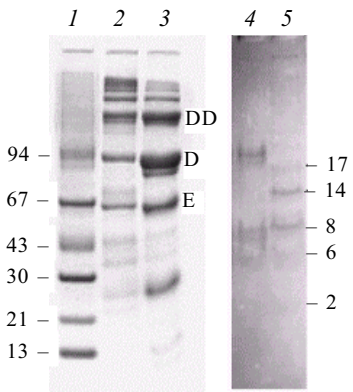


Рис. 2. Електрофореграма продуктів клітинного і плазмінового гідролізу фібрину в культуральному середовищі: 1 – маркери високої молекулярної маси; 2 – високомолекулярні продукти гідролізу згустка клітинами PC-12; 3 – плазміновий гідролізат, 6 год; 4 – низькомолекулярні продукти гідролізу згустка клітинами PC-12; 5 – маркери низької молекулярної маси.

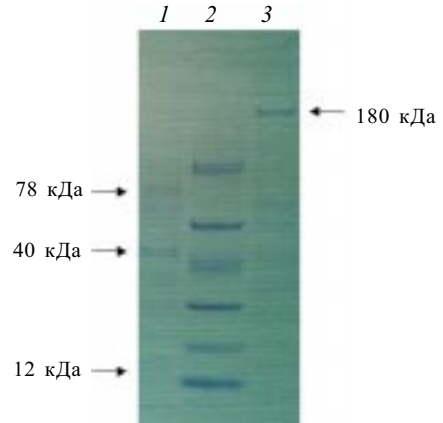


Рис. 3. Електрофореграма продуктів клітинного гідролізу після очищення на КМ-целюлозі: 1 – з β -меркаптоетанолом; 3 – без β -меркаптоетанолу; 2 – маркери молекулярної маси (94, 67, 43, 30, 21 і 13 кДа). Стрілки вказують на положення DD-фрагменту (180 кДа) та його $\gamma\gamma$ (78 кДа), β (40 кДа) і α (12 кДа) ланцюгів.

плазмінового типу гідролізу, показало, що МАТ III-3В виявляють лише продукти, які утворювалися під час розщеплення фібрину плазміном і клітинами PC-12, але не еластазою (рис. 4). Одержані результати добре узгоджуються з даними літератури відносно МАТ IF-123, які зв'язуються з епітопами, утвореними за гідролізу фібрину еластазою, а не плазміном [2]. Таким чином, було з'ясовано, що клітини PC-12 стимулюють плазміновий тип гідролізу фібринового згустка.

За допомогою ензим-електрофорезу в супер-

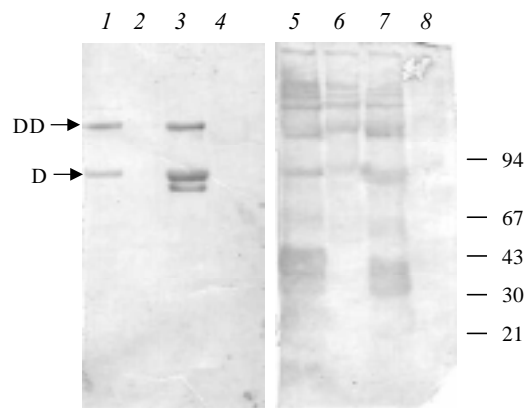


Рис. 4. Імуноблоти продуктів деградації фібрину клітинами PC-12 (1, 5), еластазою (2, 6) або плазміном (3, 7), оброблені МАТ III – 3В (1–4) або поліклональними кролячими АТ, специфічними до фібриногену (5–8). Треки 4 і 8 – супернатант клітин PC-12. Праворуч показано розташування маркерів молярної маси.

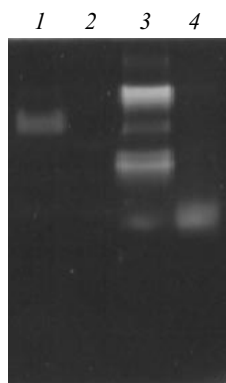


Рис. 5. Ензим-електрофорез без додавання в гель плазміногену: 1 – еуглобулінова фракція супернатанта клітин РС-12; 2 – еуглобулінова фракція культурального середовища без клітин; 3 – контрольний плазмін; 4 – еластаза (комерційний препарат).

натанті клітин РС-12 було виявлено фермент, який розщеплює фібрин і має таку ж молекулярну вагу, як одна з форм контрольного препарату плазміну (рис. 5). У культуральному середовищі без клітин ферментна активність не спостерігається. Оскільки активний плазмін утворюється із плазміногену за дії певного активатора, одержані дані означають, що клітини продукують як плазміноген, так і його активатор.

У наступних експериментах ми визначали, який саме активатор плазміногену продукують клітини РС-12. Ензим-електрофорез з плазміногеном, який додавали в гель під час полімеризації, показав в супернатанті клітин наявність ензиматичної активності на рівні контрольного зразка ТАП (рис. 6). Цей результат було підтверджено імуноферментним аналізом еуглобулінових фракцій культурального середовища і супернатанта клітин з анти-ТАП антитілами (дані не наведено). Аналіз за допомогою хромогенного субстрату S-2251 дозволив кількісно оцінити активність ТАП у триденному супернатанті РС-12, яка становила 0,34 IU/мл. Певно, ми спостерігали деяку фонову секреторну активність цих клітин на відміну від дослідів R. J. Parmer, який знаходив у супернатантах значно вищу кількість ТАП за дії на хромафінні клітини таких активаторів, як нікотин, хлорид барію чи калію, що, на його думку, відображало швидке зростання у кров'яному руслі концентрації ТАП при стресах, фізичних навантаженнях чи операційних втручаннях [23]. Результати наших досліджень показали, що клітини РС-12 сприяють гідролізу фібринового згустка шляхом конститутивної секреції як плазміногену, так і ТАП. При цьому утворюються як високо-, так і низькомолекулярні фрагменти фіб-

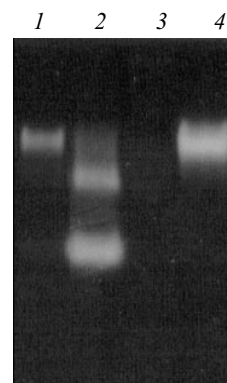


Рис. 6. Ензим-електрофорез із додаванням плазміногену в гель: 1 – тканинний активатор плазміногену (комерційний препарат); 2 – урокіназа (комерційний препарат); 3 – еуглобулінова фракція культурального середовища без клітин; 4 – еуглобулінова фракція супернатанта клітин РС-12.

рину, характерні для плазмінового гідролізу. Це відповідає даним літератури щодо присутності плазміногенового активатора в нейронах більшості відділів головного мозку [24], продукцію його нейронами у разі проростання крізь фібриновий матрикс [25] та участі плазмінової системи деградації фібрину в нейрональній міграції [26]. Таким чином, клітинна лінія РС-12, яка постійно продукує невелику кількість і ТАП, і плазміногену, напевно, може модулювати процеси, що відбуваються під час контакту нервових клітин із фібриновим матриксом.

PC-12 CELLS HYDROLYZE THE FIBRIN CLOT BY PRODUCING BOTH PLASMINOGEN AND ITS TISSUE ACTIVATOR

Yu. I. Petrova¹, O. M. Savchuk¹,
O. M. Kalashnik¹, T. M. Platonova¹,
M. V. Skok¹, [S. Cederholm-Williams²]

¹Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Science of Ukraine, Kyiv;
²Oxford Bioresearch Laboratory, UK;
e-mail: julia@biochem.kiev.ua

S u m m a r y

It has been shown that rat pheochromocytoma PC-12 cells degraded fibrin clots in vitro. SDS-PAGE performed in the gels of different density and Western blotting using monoclonal antibodies against DD- and D-fibrin fragments demonstrated that both high and low molecular weight degradation products similar to those of fibrin hydrolysis by plasmin had been formed. Enzyme electrophoresis, chromogenic assay and enzyme-linked immunosorbent assay using

tPA-specific antibodies demonstrated that PC-12 cells constitutively secreted both plasminogen and tPA. The results obtained allow using PC-12 cells as a model to examine the interaction of nerve cells with the fibrin clot.

К е у w o r d s: PC-12 cells, fibrin hydrolysis, plasminogen, tissue plasminogen activator.

1. *Herijgers N., Vettel U., Schaefer B. et al. // Immunobiology. 1995. 194, N 4–5. P. 363–375.*
2. *Kohno L., Inuzuka K., Itoch Y. et al. // Blood. 2000. 95, N 5. P. 1721–1728.*
3. *Adams S. A., Kelly S. L., Kirsch R. E. et al. // Blood Coagul. Fibrinolysis. 1995. 6(8). P. 693–702.*
4. *Zeng L., Huck S., Redl H., Schlag G. // Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Hand Surg. 1995. 29. P. 199–204.*
5. *Wang K. K., Nemeth I. R., Seckel B. R. et al. // Microsurgery. 1998. 18, N 4. P. 270–275.*
6. *Sames M., Blahos J. Jr., Rokyta R. and Benes V. Jr. // Physiol. Res. 1997. 46, N 4. P. 303–306.*
7. *Dagum A. B. // J. Hand Ther. 1998. 11, N 2. P. 111–117.*
8. *Guest J. D., Hesse D., Schnell L. et al. // J. Neurosci. Res. 1997. 50, N 5. P. 888–905.*
9. *Tresco P. A., Winn S. R., Aebischer P. // ASAIJ. 1992. 3. P. 17–23.*
10. *Sagen G. // Ibid. P. 24–8.*
11. *Emerich D. F., McDermott P. E., Krueger P. M. et al. // Exp. Neurol. 1993. 122, N 1. P. 37–47.*
12. *Greene L. A., Tischler A. S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1976. 73. P. 2424–2428.*
13. *Варецька Т. В. // Укр. біохім. журн. 1960. 32, № 1. С. 13–24.*
14. *Deutch D., Mertz E. // Science. 1970. 170. P. 1085–1096.*
15. *Laemmli K. U. // Nature. 1970. 227. P. 680–685.*
16. *Swank R. T., Munkers K. D. // Anal. Biochem. 1971. 39, N 2. P. 462–477.*
17. *Verheijen J., Mullaart E., Chang G. T. et al. // Tromb. Haemostasis. 1982. 48, N 3. P. 266–269.*
18. *Heussen C., Dowdle E. B. // Anal. Biochem. 1980. 102. P. 196–202.*
19. *Chmielewska I., Ranby M., Wiman B. // Tromb. Res. 1983. 31. P. 427–436.*
20. *Савчук О. М., Гамісонія М. С., Кізім А. І., Платонова Т. М. // Фізіол. журн. 2001. № 3. С. 15–17.*
21. *Walker J. B., Nesheim M. E. // J. Biol. Chem. 1999. 274, N 8. P. 5201–5212.*
22. *Gaffney P. J. // Ann. NY Acad. Sci. 2001. 936. P. 594–610.*
23. *Parmer R. J., Mahata M., Mahata S. et al. // J. Biol. Chem. 1997. 272, N 3. P. 1976–1982.*
24. *Sappino A.-P., Madani R., Huarte J. et al. // J. Clin. Invest. 1993. 92. P. 679–685.*
25. *Krystosek A., Seeds N. W. // Science. 1981. 213. P. 1532–1534.*
25. *Moonen G., Grau-Wagemans M. P., Selak I. // Nature. 1982. 298. P. 753–758.*

Отримано 10.10.2003