УДК 577.151.4

ІНГІБУВАННЯ α-2-АНТИПЛАЗМІНОМ ПРОЦЕСУ АКТИВАЦІЇ Glu-ПЛАЗМІНОГЕНУ ТКАНИННИМ АКТИВАТОРОМ НА ФІБРИНІ, DDE-КОМПЛЕКСІ ТА D-ДИМЕРІ

Т. В. ГРИНЕНКО, М. Б. ЗАДОРОЖНА, Т. М. ПЛАТОНОВА, Г. Л. ВОЛКОВ

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

Исследовали влияние α-2-антиплазмина на процесс активации Glu-плазминогена тканевым активатором на фибрине и фрагментах фибрин(оген)а. Изучена кинетика активации и рассчитана скорость этого процесса в присутствии и при отсутствии ингибитора. Установлено, что α-2-антиплазмин снижает скорость активации Glu-плазминогена на дезAABBфибрине, DDE-комплексе и D-димере и не влияет на активацию профермента на бромциановом фрагменте фибриногена – Но1-DSK. Скорость активации очищенного плазминогена или профермента, содержащегося в эуглобулиновой фракции, в присутствии фибрина прямо пропорциональна количеству внесенного тканевого активатора в пределах исследуемых концентраций от 5 до 50 ед/мл. Показано, что α-2-антиплазмин снижает скорость процесса активации при всех используемых концентрациях тканевого активатора. Установлено, что гидролиз фибрина плазмином, образующимся на его поверхности в процессе активации плазминогена тканевым активатором, также ингибируется α-2-антиплазмином. Предполагается, что полученные результаты обусловлены влиянием ингибитора на образование тройного комплекса плазминоген–тканевой активатор–фибрин, конкуренцией α-2-антиплазмина за лизинсвязывающие участки кринга 2 молекулы тканевого активатора или за участки связывания активатора на фибрине.

К л ю ч е в ы е с л о в а: α-2-антиплазмин, фибрин, фрагменты фибрин(оген)а, Glu-плазминоген, тканевой активатор.

Одним із компонентів фібринолітичної системи є α-2-антиплазмін (АП). Основна його функція – швидка інактивація плазміну, що вивільнюється у кровотік після розщеплення фібрину, запобігаючи неспецифічному протеолізу білків плазми. Процес інгібування плазміну АП у розчині добре вивчено, розраховано його кінетичні параметри [1, 2], проте регуляторну роль АП у процесі фібринолізу остаточно не з'ясовано. Вважають, що інгібітор може впливати на адсорбцію плазміногену на поверхні фібрину та сповільнювати початкові етапи фібринолізу шляхом ковалентної іммобілізації інгібітора на αС-доменах молекули фібрину за участю активованого фактора XIII. У разі використання нормальної та виснаженої на інгібітор плазми встановлено, що АП лише на 10% зменшує зв'язування Glu-плазміногену з фібрином [3]. Дослідження впливу АП на взаємодію міченого I^{125} Glu-плазміногену з фібрином показало, що навіть за 50-кратного молярного надлишку інгібітора він спричинює слабкий ефект [4]. З іншого боку, близько 30% АП циркулює в комплексі з плазміногеном [5], тому ковалентна іммобілізація інгібітора може опосередковано збільшувати кількість плазміногену, що сорбується на фібрині.

Вважають, що утворення ізопептидного зв'язку між Gln 2 в молекулі АП [6] та Lys 303 α-ланцюга молекули фібрину [7] підвищує стійкість згустка проти руйнування плазміном, захищаючи його від передчасного лізису.

Утворення плазміну фібринзалежним шляхом відбувається за участю тканинного активатора плазміногену. Швидкість активації за присутності фібрину більше швидкості цього процесу в розчині майже в 1000 разів [8, 9]. Здатність прискорювати процес активації встановлено також для фрагментів фібрин(оген)у, що утворюються за гідролізу його плазміном (X, D, DD, DDE), і для розчинних бромціанових фрагментів фібриногену – Но1-DSK та Но3-DSK.

Показано, що крім активації, фібрин і DDE-фрагмент впливають на процес інгібування плазміну АП, зменшуючи константу швидкості інгібування плазміну АП у 10 та 5 разів відповідно. Інші фрагменти не виявляють протекторної дії [10].

Раніше нами встановлено, що АП зв'язується з фібрином, X_2-, DD- та DDE-фрагментами за відсутності активованого фактора XIII, але не з Е-фрагментом [11]. Варто зауважити, що взаємодія інгібітора відбувається в місцях локалізації активаторного комплексу і в такий спосіб може впливати на процес активації Glu-плазміногену

тканинним активатором. Дані щодо цього питання в літературі відсутні.

Мета роботи – дослідити вплив АП на швидкість активації Glu-плазміногену тканинним активатором на фібрині та його фрагментах і руйнування фібринових згустків плазміном, що утворюється внаслідок активації.

Матеріали і методи

Glu-плазміноген та АП одержували методом афінної хроматографії на Lys-сефарозі [12] та крингл 1–3 (II форма)-сефарозі [13] з цитратної донорської плазми, в яку додавали контрикал (10 тис. од/л плазми).

Фібриноген виділяли з оксалатної плазми бика або плазми крові людини [14].

ДезААВВфібрин одержували активацією фібриногену тромбіном [15] за присутності 0,05 М 6-аміногексанової кислоти для видалення домішок плазміногену та 0,09 М *п*-хлормеркурійбензоату для інактивації фактора XIII. Препарат зберігали при 0 °С.

D-димер та DDE-комплекс одержували з плазмінового гідролізату фібрину, стабілізованого фактором XIII. Реакцію зупиняли додаванням діізопропілфторфосфату до кінцевої концентрації $5 \cdot 10^{-5}$ М. Плазмін видаляли афінною хроматографією на лізин-сефарозі. D-димер одержували гель-фільтрацією гідролізату на сефакрилі S-300 в 0,05 М Tris-HCl-буфері, що містив 1 М KCNS [16]. Для одержання DDE-комплексу використовували іонообмінну хроматографію на КМ-сефадексі [17] з наступною гель-фільтрацією на сефакрилі S-300.

Ho1-DSK одержували шляхом бромціанового розщеплення фібриногену в 70%-й мурашиній кислоті з наступним розділенням фрагментів на сефадексі G-100 [18].

Плазмін одержували активацією Glu-плазміногену урокіназою, що іммобілізована на активованій бромціаном сефарозі 4В [19]. Препарат зберігали при -20 °С.

Активність препаратів АП, яку визначали за здатністю гальмувати розщеплення плазміном специфічного хромогенного субстрату S 2251 (H-D-Val-L-Leu-L-Lys-*п*-нітроанілід), складала 80–90% за еквімолярного співвідношення ферменту та інгібітора.

Еуглобулінову фракцію білків плазми крові одержували у такий спосіб. До 1,0 мл плазми додавали 8,25 мл охолодженої води та 0,75 мл 0,25%-ї оцтової кислоти, витримували протягом 30 хв при 0 °С. Після центрифугування (2500 об/хв, 30 хв, 5 °С) осад розчиняли в 1,0 мл 0,05 М Tris-HCl-буфера, pH 7,4, що містив 0,13 М NaCl.

Активацію Glu-плазміногену тканинним активатором («Актилізе», Німеччина) у присутності дезААВВфібрину та фрагментів фібрин(оген)у вивчали за швидкістю звільнення плазміном, що утворюється, *п*-нітроаніліну з S 2251. Поглинання *п*-нітроаніліну реєстрували при довжині хвилі 405 нм на мікроридері через певні проміжки часу. У лунки планшетів для імуно-ферментного аналізу вносили по 5 мкл досліджуваних білків у зазначених нижче концентраціях: фібрин або його фрагменти – 200 мкг/мл, Glu-плазміноген – 15 мкг/мл, тканинний активатор – 5–50 од/мл. Відлік часу розпочинали від моменту додавання S 2251 (0,3 мМ) в 0,02 М вероналовому буфері, pH 7,4, що містив 0,13 М NaCl та 1 мМ $CaCl_2$. Реакцію проводили при 37 °С. Об'єм реакційної суміші – 0,25 мл. Для вивчення впливу АП на процес активації додавали інгібітор у концентрації 6 мкг/мл.

Швидкість активації Glu-плазміногену тканинним активатором розраховували за формулою:

$$V = \Delta A_{405}/\Delta t,$$

де ΔA_{405} – зміна світлопоглинання за довжини хвилі 405 нм, Δt – проміжок часу, за який проводили її вимірювання.

Лізис фібринових згустків за відсутності та у присутності АП досліджували, вимірюючи зміну мутності розчину при 350 нм. У різні кутки термостатованої спектрофотометричної кювети вносили такі компоненти: Glu-плазміноген – 15 мкг/мл; тканинний активатор – 5–50 од/мл та у разі необхідності АП – 6 мкг/мл. Після цього додавали 0,02 М вероналовий буфер, pH 7,4, що містив 0,13 М NaCl і 1 мМ $CaCl_2$, та якнайшвидше – фібрин-мономер (200 мкг/мл), ретельно перемішували та починали відлік часу. Об'єм реакційної суміші дорівнював 1 мл. Реакцію проводили при 37 °С. Час напівлізису визначали від моменту початку полімеризації фібрину до моменту зменшення його максимальної мутності наполовину при 350 нм.

Чистоту одержаних білкових препаратів контролювали за допомогою DS-Na електрофорезу в ПААГ [20].

Концентрацію білків визначали спектрофотометрично, вимірюючи оптичне поглинання при довжини хвилі 280 нм і віднімаючи значення світлорозсіювання при 320 нм. Для розрахунку концентрацій використовували відповідні значення коефіцієнтів адсорбції (1%, 1 см) і молекулярної маси досліджуваних білків: Glu-плазміноген – 17,0 і 92 кДа; АП – 6,7 і 70 кДа; фібрин(оген) – 15,06 (pH 7,4) і 340 кДа; D-димер – 20,0 і 190 кДа; DDE- фрагмент – 15,0 і 240 кДа; Ho1-DSK – 13,6 і 45 кДа.

Представлені на рисунках дані є типовими для серій повторюваних дослідів (не менше трьох у кожній серії).

Результати та обговорення

Активація Glu-плазміногену тканинним активатором до плазміну є ключовою реакцією фібринолітичної системи і здійснюється на полімерному фібрині. Плазмін у кровотоці гідролізує фібрин, стабілізований активованим фактором XIII до розчинних DDE-комплексів, які надалі деградують до D-димеру та E-фрагмента.

Для вивчення процесу активації плазміногену тканинним активатором та впливу на нього АП як ефектори ми використовували дезAABBфібрин та його фрагменти: DDE-комплекс, D-димер та бромціановий фрагмент фібриногену Ho1-DSK. Останній є фрагментом D-домену молекули фібрин(оген)у, що складається з ділянок трьох ланцюгів (Aα 148–208, Bβ 191–224, 225–242, 243–305, γ 95–295). Він використовується як модельна система для вивчення процесу активації. Всі зазначені фрагменти здатні зв'язувати плазміноген та (або) тканинний активатор, що забезпечує їхні ефекторні властивості.

Результати дослідження впливу АП на процес активації Glu-плазміногену тканинним активатором у присутності фібрину представлено на рис. 1. Кількість плазміну, що утворюється в процесі активації, визначали за поглинанням *n*-нітроаніліну, який звільняється під дією плазміну зі специфічного хромогенного субстрату S 2251. За фізіологічних концентрацій досліджуваних білків АП виявляється потужним інгібітором процесу активації – кількість плазміну, що утворюється у присутності АП, зменшується майже на порядок.

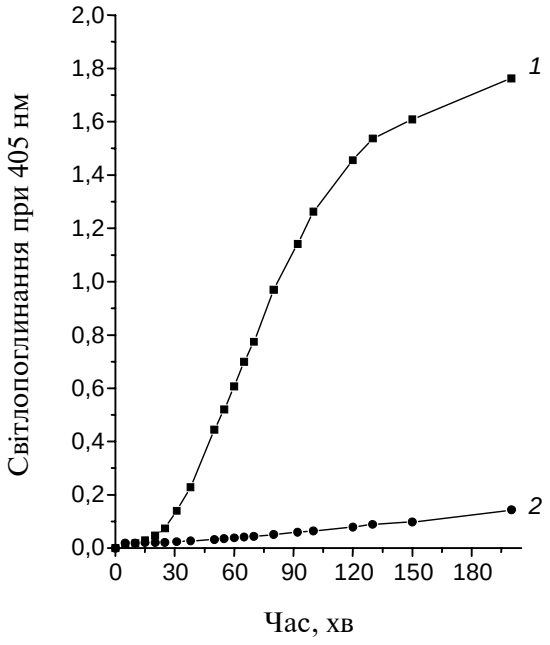

Рис. 1. Вплив α-2-антиплазміну на активацію Glu-плазміногену тканинним активатором на дезAABBфібрині: 1 – без інгібітора, 2 – у присутності α-2-антиплазміну.

Криві, що відображають кінетику активації за використання фібрину та фрагментів фібрин(оген)у як ефекторів, мають типову S-подібну форму; лаг-період характеризується незначним збільшенням поглинання. Використовуючи кінетичні криві активації проферменту тканинним активатором на різних фрагментах фібрин(оген)у, було розраховано швидкість цього процесу. Представлені на рис. 2 дані показують, що фібрин та DDE-комплекс є ефективними стимуляторами процесу активації. Аналогічні закономірності виявлені Стюартом та співавторами, які встановили, що фібрин та DDE-комплекс стимулюють активацію Glu-плазміногену тканинним активатором в 360 та 350 разів відповідно [21]. За використання D-димеру та Ho1-DSK-фрагмента спостерігається збільшення лаг-періоду та зменшення швидкості процесу активації. АП значною мірою знижує швидкість процесу активації плазміногену тканинним активатором на фібрині, DDE-комплексі та D-димері і не впливає на процес активації у присутності Ho1-DSK-фрагмента.

Порівняння K_d взаємодії АП з D- та DD-фрагментами фібрин(оген)у, що дорівнюють 119 та 65 нМ відповідно [11], та відсутність ефекту АП на процес активації плазміногену тканинним активатором на Ho1-DSK свідчать на користь зробленого нами раніше припущення про локалізацію ділянок зв'язування АП не тільки на αC-доменах фібрину, але і в ділянці DD-контакту. Слід відмітити, що E-фрагмент, який не впливає на процес активації плазміногену тканинним активатором, не взаємодіє з АП [11].

На наступному етапі вивчали вплив АП на активацію плазміногену за різних концентрацій тканинного активатора. У межах досліджуваних концентрацій тканинного активатора від 5 до 50 од/мл швидкість реакції прямо пропорційна концентрації активатора. В усіх випадках АП гальмує процес активації (рис. 3). Навіть за використання 50 од активатора/мл, що більш ніж на порядок перевищує його фізіологічну концентрацію, АП гальмує швидкість реакції у 35 разів.

Одержані нами результати про інгібування АП процесу активації плазміногену тканинним активатором на фібрині та фрагментах фібрин(оген)у були несподіваними, оскільки вони не узгоджуються з існуючим на сьогодні уявленням про молекулярний механізм фібринолізу. Він базується на тому, що плазміноген та тканинний активатор адсорбуються на поверхні фібрину, де відбувається процес активації. Плазмін, який

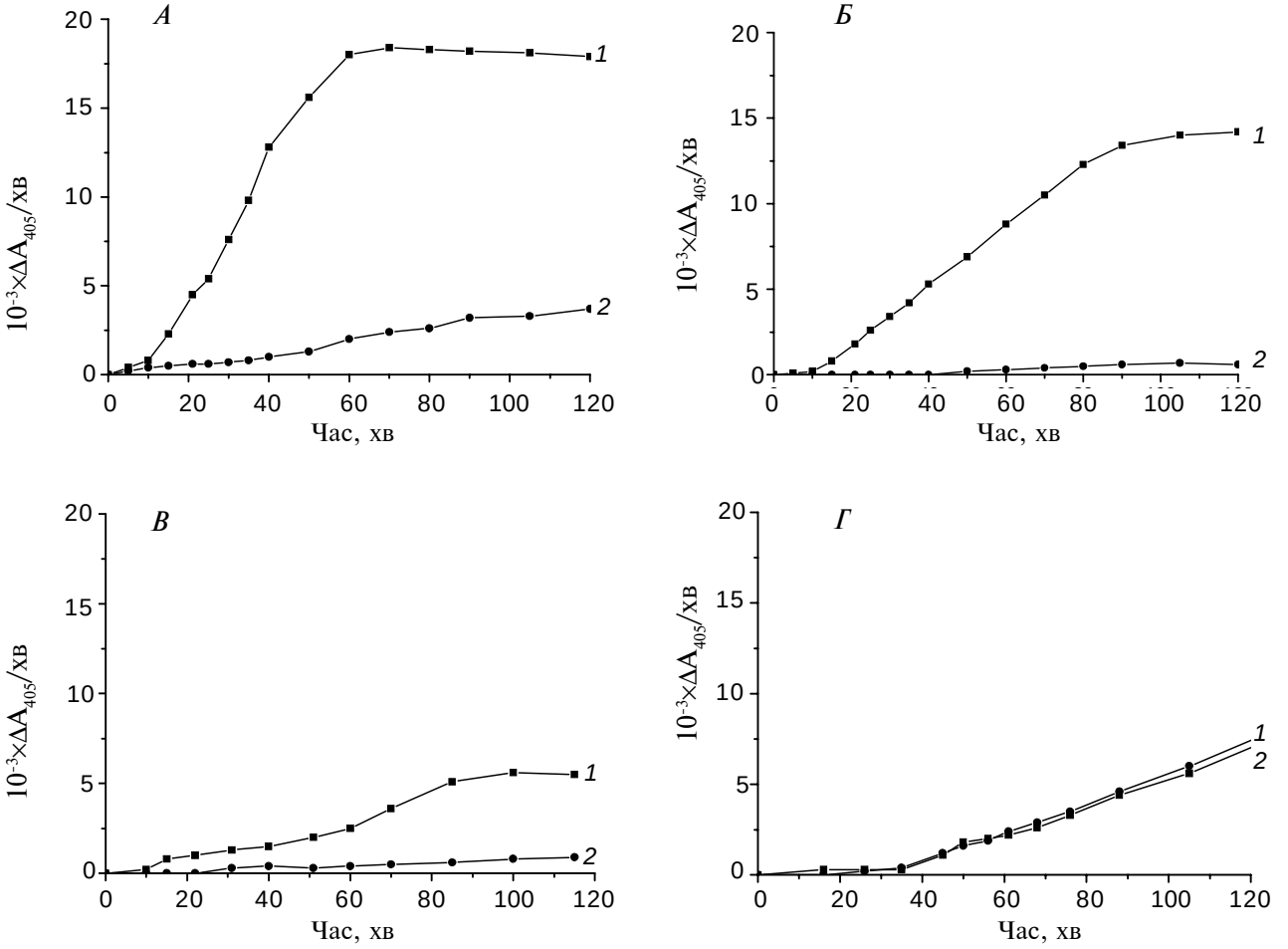

Рис. 2. Вплив α-2-антиплазміну на швидкість активації Glu-плазміногену тканинним активатором на дезААВВфібрині (А), DDE-комплексі (Б), D-димері (В) та Но1-DSK-фрагменті фібриногену (Г): 1 – без інгібітора, 2 – у присутності α-2-антиплазміну.

знаходиться на поверхні фібрину, захищений від дії АП: зв'язаний з фібрином фермент інактивується на три порядки повільніше, ніж у розчині [5].

Одержані результати можна було б пояснити конкуренцією АП з фібрином за лізинзв'язувальні ділянки плазміногену. Але АП лише на 10% знижує кількість проферменту, зв'язаного з фібрином, і не впливає на дисоціацію комплексу плазміноген–фібрин [3].

Зниження швидкості активації плазміногену у присутності АП можна пояснити або впливом інгібітора на взаємодію тканинного активатора з фібрином, або тим, що АП, зв'язуючись із фібрином у місцях локалізації активаторного комплексу, створює стеричні перешкоди для утворення потрійного комплексу плазміноген–тканинний активатор–фібрин.

Наведені вище дані одержано на модельних системах із використанням очищених білків. Можливо, за фізіологічних умов якісь компоненти плазми змінюють дію АП на процес активації. Для перевірки цього в реакційне середовище у присутності тканинного активатора в кількості 5–50 од/мл та 6 мкг/мл АП замість плазміногену додавали 25 мкл еуглобулінової фракції, що містила таку саму кількість проферменту, яку використовували в попередніх експериментах. Відомо, що до складу еуглобулінової фракції крім плазміногену входять його активатори, фібриноген та низка факторів зсідання крові. У контрольних дослідах у середовищі реакції, яке містило еуглобулінову фракцію без додавання тканинного активатора та фібрину, згодом спостерігали появу амідолітичної активності, що свідчить про активацію деякої кількості плазміногену (рис. 4, *А*, крива *1*). Швидкість процесу активації за використання еуглобулінової фракції є прямо пропорційна концентрації внесеного тканинного активатора, як і в дослідах із плазміногеном (рис. 4, *А*, криві *2–6*). Додавання АП до середовища, що містило різну кількість тканинного активатора та

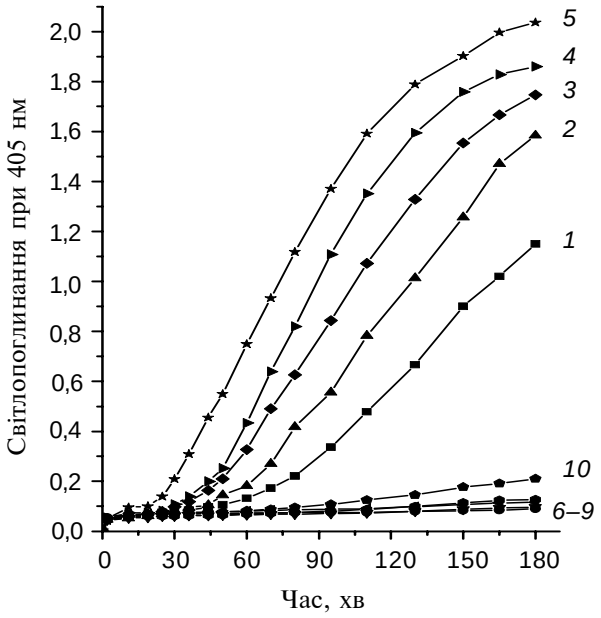

Рис. 3. Вплив різних концентрацій тканинного активатора на активацію Glu-плазміногену на дезAABBфібрині у присутності та за відсутності α-2-антиплазміну. Криві 1–5 відповідно 5, 10, 20, 25 та 50 од активатора/мл за відсутності α-2-антиплазміну. Криві 6–10 відповідно 5, 10, 20, 25 та 50 од активатора/мл у присутності α-2-антиплазміну.

фібрин, призводить до зниження швидкості активації до величини, одержаної у разі використання тільки еуглобулінової фракції (рис. 4, *Б*).

Появу амідолітичної активності в еуглобуліновій фракції можна пояснити активацією плазміногену ендогенними активаторами плазми, до яких, крім тканинного активатора, відносяться урокіназа або фактор XII системи зсідання крові [22–24].

На рис. 5 наведено криві, що відображають полімеризацію та наступний гідроліз дезAABBфібрину плазміном, який утворюється за активації плазміногену (15 мкг/мл) тканинним активатором (10 од/мл) у присутності та за відсутності АП. Час напівлізису згустка за відсутності інгібітора дорівнює 9 хв. Якщо утворення і руйнування фібринового згустка проводили у присутності АП, час напівлізису подовжується в 6 разів.

Раніше ми довели, що препарати дезAABB-фібрину, які використано в роботі, не містять фактора XIII і за створення умов його активації одержані згустки ковалентно непрошиті [11]. Дані щодо гальмуючого впливу АП на швидкість гідролізу фібринових згустків можна пояснити тим, що інгібітор під час утворення полімерного фібрину адсорбується на його поверхні і впливає не на активність фібринзв'язаного плазміну, а саме

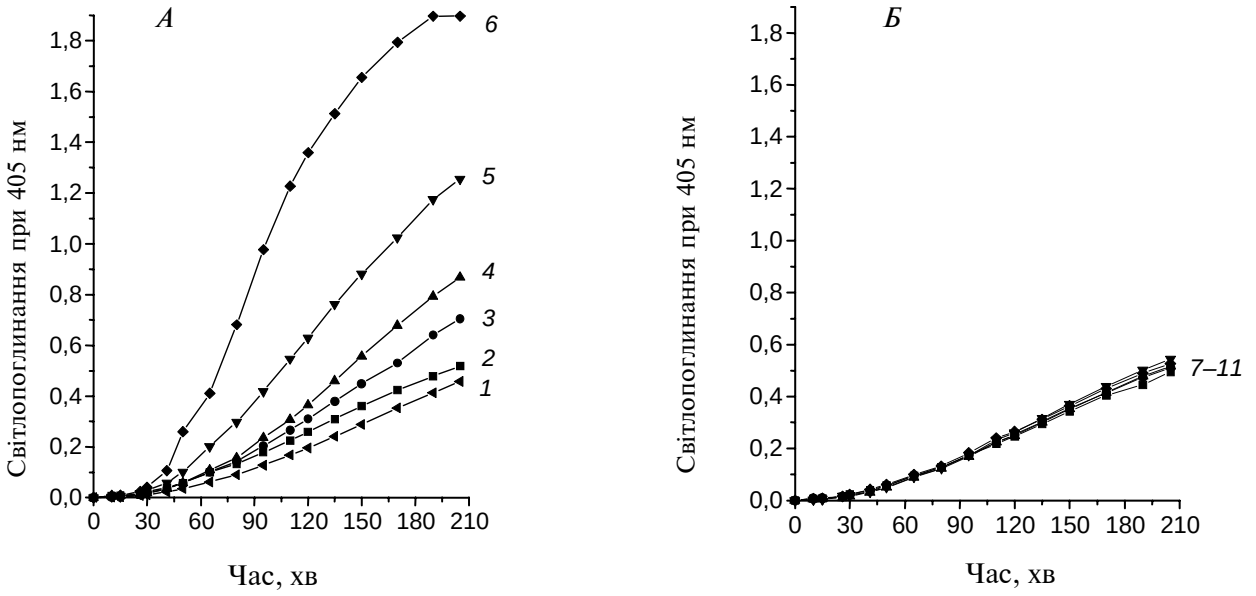

Рис. 4. Активація плазміногену еуглобулінової фракції в різних концентраціях тканинним активатором за відсутності (А) та у присутності (Б) α-2-антиплазміну. Крива 1: активаторна активність еуглобулінової фракції. Криві 2–6 відповідно 5, 10, 20, 25 та 50 од активатора/мл, доданого до еуглобулінової фракції за відсутності α-2-антиплазміну. Криві 7–11 відповідно 5, 10, 20, 25 та 50 од активатора/мл, доданого до еуглобулінової фракції у присутності α-2-антиплазміну.

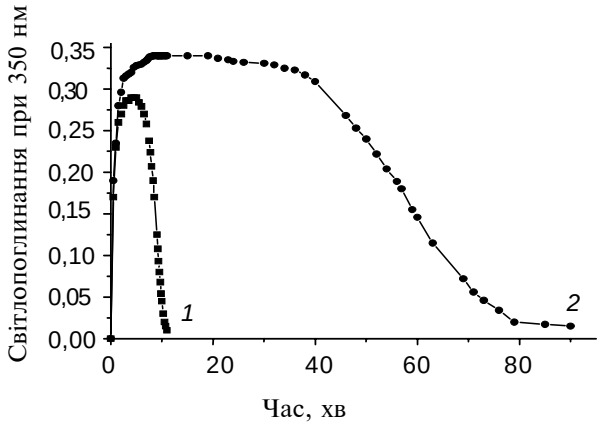

Рис. 5. Утворення та руйнування фібринового згустка за активації Glu-плазміногену тканинним активатором за відсутності (1) та у присутності (2) α-2-антиплазміну.

на процес активації Glu-плазміногену тканинним активатором.

Таким чином, АП інгібує процес активації Glu-плазміногену тканинним активатором на фібрині і внаслідок цього лізис фібринових згустків. Зроблено припущення, що ефект інгібітора обумовлено впливом на тканинний активатор, а саме АП може: а) конкурувати із тканинним активатором за місця зв'язування на фібрині; б) перешкоджати взаємодії тканинного активатора з фібрином, опосередкованої лізин-зв'язувальними сайтами кринглу другого; в) створювати стеричні перешкоди для взаємодії плазміногену та тканинного активатора на поверхні фібрину. З'ясування цих питань потребує подальших експериментальних досліджень.

INHIBITION OF THE PROCESS OF Glu-PLASMINOGEN ACTIVATION BY TISSUE ACTIVATOR ON FIBRIN, DDE-COMPLEX AND D-DIMER BY α-2-ANTIPLASMIN

T. V. Grinenko, M. B. Zadorozhnaya, T. M. Platonova, G. L. Volkov

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

S u m m a r y

The α-2-antiplasmin influence on the Glu-plasminogen activation by tissue activator both on fibrin and fibrin(ogen) fragments was investigated. The kinetics of activation was studied and velocity of this process in the absence and presence of the inhibitor was calculated. It was established that α-2-antiplasmin decreased the velocity of Glu-plasminogen activation on desAABBfibrin, DDE-complex and DD-dimer and did no influence upon proenzyme activation on fibrinogen fragment − Ho1-DSK. In the presence of fibrin plasminogen activation linear related to the amount added tissue activator in limit concentration from 5 before 50 units/ml. It was shown that α-2-antiplasmin reduced the activation velocity with used concentration of tissue activator. Fibrin hydrolysis by plasmin, forming on its surface during the plasminogen activation by tissue activator, was also inhibited with α-2-antiplasmin. The obtained results are explained by the influence of the inhibitor on formation of the triple complex between plasminogen, tissue activator and fibrin, and competition of the α-2-antiplasmin for lysine-binding sites of tissue activator kringle 2 or for binding sites of the activator on fibrin.

K e y w o r d s: α-2-antiplasmin, fibrin, fibrin(ogen) fragments, Glu-plasminogen, tissue activator, inhibition of activation process.

1. *Christensen U., Clemensen I.* // Biochem. J. − 1978. − **75**, N 2. − P. 635−641.
2. *Wiman B., Collen D.* // J. Biol. Chem. − 1979. − **254**, N 18. − P. 9291−9297.
3. *Rakoczi I., Wiman B., Collen D.* // Biochim. Biophys. Acta. − 1978. − **540**, N 2. − P. 295−300.
4. *Suenson E., Thorsen S.* // Biochem. J. − 1981. − **197**, N 3. − P. 619−628.
5. *Collen D.* // Thromb. And Haemost. − 1980. − **43**, N 2. − P. 77−89.
6. *Tamaki T., Aoki N.* // J. Biol. Chem. − 1982. − **257**, N 22. − P. 14767−14772.
7. *Kimura S., Aoki N.* // Ibid. − 1986. − **261**, N 33. − P. 15591−15595.
8. *Hoylaerts M., Rijken D. C., Lijnen H. R., Collen D.* // Ibid. − 1982. − **257**, N 6. − P. 2912−2919.
9. *Ranby M.* // Biochim. Biophys. Acta. − 1982. − **704**, N 3. − P. 461−469.
10. *Lee A. Y. Y., Fredenburgh J. C., Stewart R. J. et al.* // Thromb. Haemost. − 2001. − **85**, N 1. − P. 502−508.
11. *Задорожна М. Б., Гриненко Т. В., Юсова О. І., Волков Г. Л.* // Укр. біохім. журн. − 2004. − **76**, № 5. − С. 71−77.
12. *Deutsch D. G., Mertz E. T* // Science. − 1970. − **170**, N 3962. − P. 1095−1096.
13. *Гриненко Т. В., Юсова О. І., Задорожна М. Б., Макогоненко Є. М.* // Укр. біохім. журн. − 2002. − № 6. − С. 83−90.
14. *Варецька Т. В., Лосєва А. Л., Яценко В. Н.* // Там само. − 1961. − **33**, № 5. − С. 657−666.
15. *Posdnjakova T. M., Musjalkovskaja A. A., Ugarova T. B. et al.* // Thromb. Res. − 1979. − **16**, N 1/2. − P. 283−288.

16. *Платонова Т. Н., Лукинова Н. И., Медведь Л. В.* // ДАН Украины. – 1993. – № 6. – С. 134–137.
17. *Платонова Т. Н., Мусялковская А. А., Толстых В. М., Белицер В. А.* // Биохимия. – 1980. – **46**, № 10. – С. 1780–1787.
18. *Blomback B., Blomback M., Henschen A. et al.* // Nature. – 1968. – **218**, N 2861. – P. 130–134.
19. *Norrman B., Wallen P., Ranby M.* // Eur. J. Biochem. – 1985. – **149**, N 1. – P. 193–200.
20. *Laemmli U. K.* // Nature. – 1970. – **227**, N 5259. – P. 680–685.
21. *Stewart R. J., Fredenburgh J. C., Rischke J. A. et al.* // J. Biol. Chem. – 2000. – **275**, N 47. – P. 36612–36620.
22. *Баишев И. М.* // Казанский мед. журн. – 1984. – **65**, № 3. – С. 230.
23. *Kluft C., Dooijewaard G., Emeis J. J.* // Sem. Thromb. Haemost. – 1987. – **13**, N 1. – P. 50–68.
24. *Ong E. B., Jonson A. J., Scheellman G.* // Biochim. Biophys. Acta. – 1976. – **429**, N 1. – P. 252–257.

Отримано 24.05.2005