

АКТИВАЦІЙНА ДІЯ СОРБОВАНОГО ПЛАЗМІНУ. МОДЕЛЮВАННЯ *IN VITRO*

С. В. ВЕРЬОВКА¹, Н. Г. РАКША², О. М. САВЧУК²

¹Державна установа «Інститут отоларингології ім. О. С. Коломійченка НАМН України»
03680, Київ, вул. Зоологічна, 3

²Навчально-науковий центр «Інститут біології»
Київського національного університету імені Тараса Шевченка
01601, Київ, вул. Володимирська, 64/13
e-mail: nkudina@ukr.net

*Одним з основних факторів розвитку запальних та онкологічних процесів є надмірна активаційна дія плазміну - ключового ферменту фібринолітичної ланки системи крові. Така значна активація обумовлена зв'язуванням плазміногену не лише з поверхнею фібринової сітки, а й з поверхнею судин, зокрема, з дипольними парами амінокислотних залишків, які є структурними аналогами лігандів лізин-зв'язуючих ділянок плазміногену і експонуються на зовнішній бік клітинних мембран при їх взаємодії з білковими та пептидними продуктами ендogenous інтоксикації. Досліджено активаційну дію специфічно сорбованого на лізин-агарозному носіїв плазміну по відношенню до розчинного протромбіну плазми крові. Показано розвиток значної тромбін-подібної амідолітичної активності, яка не пригнічується наявним в системі антитромбіном III. Одержані результати свідчать про здатність сорбованого лізин-зв'язуючими ділянками плазміну до протеолітичного ушкодження та нефункціональної активації розчинних білків крові. Обговорюються механізми формування подібної активації *in vivo* та її можлива роль за розвитку патологічних станів, зокрема, синдрому дисемінованого внутрішньосудинного зсідання крові.*

Ключові слова: плазмін, тромбін, ДВЗ-синдром.

Вступ. Ферментативний гідроліз білків становить невід'ємну складову процесів обміну речовин – молекулярної основи життя. Відомо понад п'ятсот протеїназ, які різняться за будовою активного центру, направленістю дії та локалізацією в компартментах організму (Puente, Lopez-Otin, 2004). Окрім деградації відпрацьованих, денатурованих та харчових білків, протеолітичні ферменти опосередковують активаційні процеси за рахунок високовибіркового розщеплення так званих активаційних зв'язків в проформах найрізноманітніших білків. Нерідко проактивована молекула також виявляє активаційні властивості, що призводить до формування складних та розгалужених активаційних каскадів. При цьому надмірна протеолітична активність та активаційна здатність обмежується блокуванням ферментів відповідними високоспецифічними білковими інгібіторами. Сформований таким чином протеолітично-інгібіторний баланс забезпечує належне функціонування незлічених систем організму. Однак за різних патологічних станів відбувається істотний зсув балансу в бік надмірного протеолізу з подальшим розвитком комплексних порушень на молекулярному та тканинному рівнях. Зокрема, надмірна активація протеолізу є невід'ємною рисою запальних процесів найрізноманітнішої етіології (Lindstedt et al., 2004) та визнається одним з провідних чинників канцеро-

генезу (Kassenbrock et al., 2010). При цьому на особливу увагу заслуговують ферменти системи гемостазу, задіяні в різноманітних фізіологічних та патофізіологічних процесах, що виходять далеко за межі забезпечення нормального кровообігу (Волков и др., 2005). Так, надмірна активаційна дія ключового ферменту фібринолітичної системи крові плазміну (Пм, КФ 3.4.21.7) визнається одним з основних чинників розвитку запальних та онкологічних процесів (Mc Intyre J., Matrisian L., 2003). Зумовлена вона здатністю проферменту плазміну – плазміногену (Пг) та його тканинного активатора (т-ПА, КФ 3.4.21.68) до нефункціонального зв'язування зі структурами, утвореними білковими компонентами ендogenous інтоксикації під впливом клітинних мембран. Закономірності взаємодії клітинних мембран зі структурно-незбалансованими білками та пептидами призводять до формування на зовнішній поверхні клітин дипольних пар амінокислотних залишків, що розпізнаються та ефективно зв'язуються лізин-зв'язуючими ділянками циркулюючих в кров'яному руслі Пг та тПА з подальшим розвитком нефункціональних активаційних та протеолітичних процесів (Verevka, Grinenko, 2011). За фізіологічних умов подібне зв'язування відбувається на поверхні фібринової сітки, призводить до перетворення Пг в Пм та послідовного розщеплення фібрину (Фн), під час

якого Пм за допомогою специфічних ділянок міжмолекулярної взаємодії мігрує по поверхні Фн з розщепленням останнього на відносно великі розчинні фрагменти. Натомість, активація Пг на поверхні судин може призвести до нефункціональної активації та протеолітичного ушкодження найрізноманітніших білків крові. Відомо, що сорбція плазміну на Фн захищає його від інактивації нативним інгібітором – α_2 -антиплазміном (Волков и др., 2005). Видається за доцільне перевірити, чи здатен сорбований Пм до активації розчинних білків. Чи не найбільший інтерес при цьому становить питання про можливість активації сорбованим плазміном протромбіну – проформи ключового ферменту зсідуючої ланки системи гемостазу тромбіну (КФ 3.4.21.5). Тому метою даної роботи було експериментально перевірити можливість активації протромбіну плазми крові плазміном, специфічно зв'язаним лізин-зв'язуючими ділянками з нерозчинним лізин-агарозним носієм.

Матеріали та методи дослідження. Плазміноген людини отримували з цитратної плазми крові за стандартним методом афінної хроматографії на лізин-агарозі (Deutsch, Mertz, 1970). Активацію Пг в Пм здійснювали відповідно до стандартної методики з використанням стрептокінази, ковалентно іммобілізованої на активованій BrCN-агарозі (Wiman, Wallen, 1973). Специфічну сорбцію Пм на лізин-агарозі проводили наступним чином: розчин Пм (2,5 мг/мл) за умови постійного перемішування на шейкері інкубували впродовж 5 хв при 20°C з суспензією лізин-агарози в 0,05 М трис-НСІ буфері, рН 7,4, що містив 0,2 М NaCl. Після інкубації лізин-агарозу з сорбованим плазміном поміщали в хроматографічну колонку, яку послідовно промивали 0,05 М трис-НСІ буфером, рН 7,4 та 0,05 М трис-НСІ буфером, рН 7,4, що містив 0,2 М NaCl. Для дослідження процесу активації протромбіну використовували цитратну плазму крові людини, відтестовану за параметрами тромбінового, протромбінового часу та активованого часткового тромбoplastинного часу, при цьому значення вказаних показників зберігалися в межах, характерних для нормального функціонування гемостатичного каскаду. З метою одержання плазми, збідненої на Пг, її пропускали через колонку з лізин-агарозою, урівноважену 0,05 М трис-НСІ буфером, рН 7,4, що містив 0,2 М NaCl. Перевірку повноти очищення плазми від Пг проводили за стандартним методом визначення амідолітичної активності з використанням хромогенного субстрату S₂₂₅₁ після активації плазміногену стрептокіназою (Fareed et al., 1983). Для визначення активаційної дії специфічно сорбованого на лізин-агарозі Пм, плазму, позбавлену Пг інкубува-

ли з лізин-агарозою з сорбованим Пм при 37°C впродовж 15 хв. Після закінчення інкубації агарозу осаджували шляхом центрифугування при 10 000g, 15 хв та відбирали надосадову рідину. Для оцінки активаційної дії сорбованого на лізин-агарозі Пм в лунку мікропланшету послідовно вносили 0,05 М трис-НСІ буфер, рН 7,4, 3 мМ хромогенний субстрат тромбіну S₂₂₃₈ та досліджували плазму (Fareed et al., 1983). Реєстрацію поглинання вивільнення п-нітроаніліну проводили в двоххвильовому режимі за довжини хвиль 405 та 492 нм на спектрофотометрі для мікропланшет Biotek (*Bio-Tek Instruments*, США). Як контроль використовували плазму, одержану за аналогічною процедурою з лізин-агарозою, що не містила Пм. Математичну обробку даних проводили з використанням комп'ютерної програми *Origin 7.0*. Достовірність різниці показників оцінювали за допомогою *t*-критерію Стьюдента.

Результати та їх обговорення. Як впливає з даних, наведених на рис. 1, застосована процедура очистки плазми від плазміногену є достатньо ефективною, лишаячи в розчині лише його слідові кількості. Разом з тим видно, що за тривалої інкубації розвивається певна амідолітична активність стосовно хромогенного субстрату S₂₂₅₁. Практично повна відсутність плазмін-подібної амідолітичної активності впродовж перших 15 хвилин інкубації та її поступове наростання з часом можна пояснити розвитком молекулярних змін *ex vivo*, що хоч і створюють певні ускладнення за клінічної діагностики, однак за належного вивчення можуть слугувати джерелом цінної інформації щодо притаманних патологічним процесам молекулярних порушень (Liotta, Petricoin, 2006).

На рис. 2 наведено показники тромбін-подібної амідолітичної активності позбавленої власного Пг плазми крові після інкубації з лізин-агарозою, що містила попередньо сорбований Пм. У порівнянні з контролем спостерігається розвиток значної тромбін-подібної амідолітичної активності. Характерно, що як і у випадку остаточної плазмін-подібної амідолітичної активності (рис. 1), гідроліз хромогенного субстрату S₂₂₃₈ відбувається незважаючи на присутність достатніх кількостей білкових інгібіторів плазміну та тромбіну.

Відомо, що розвиток запальних та онкологічних процесів супроводжується зростанням тромбін-подібної амідолітичної активності не зважаючи на цілком достатній рівень інгібітору тромбіну – антитромбіну III (Верьовка и др., 2012). Подібне явище може бути пояснено за рахунок утворення протеолітично ушкоджених похідних тромбіну, які виявляються за багатьох патологічних процесів (Chen, Dorling, 2009).

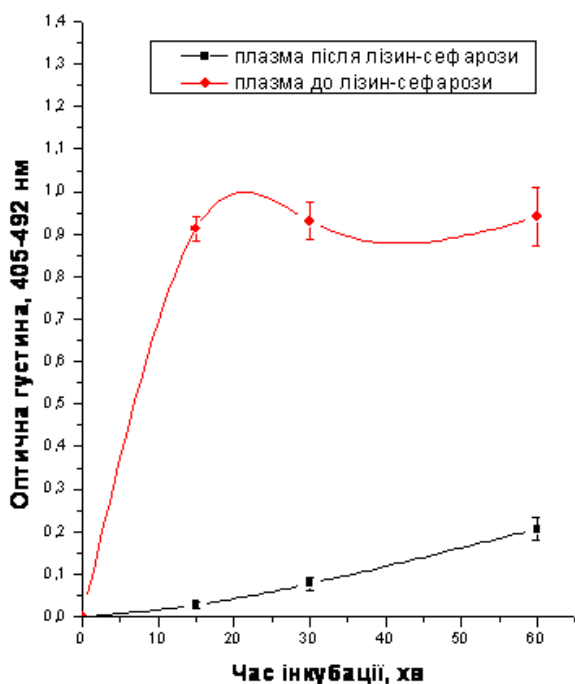


Рис. 1. Плазмин-подібна амідолітична активність у плазмі крові людини
 Fig. 1. Plasmin-like amidolytic activity in human plasma

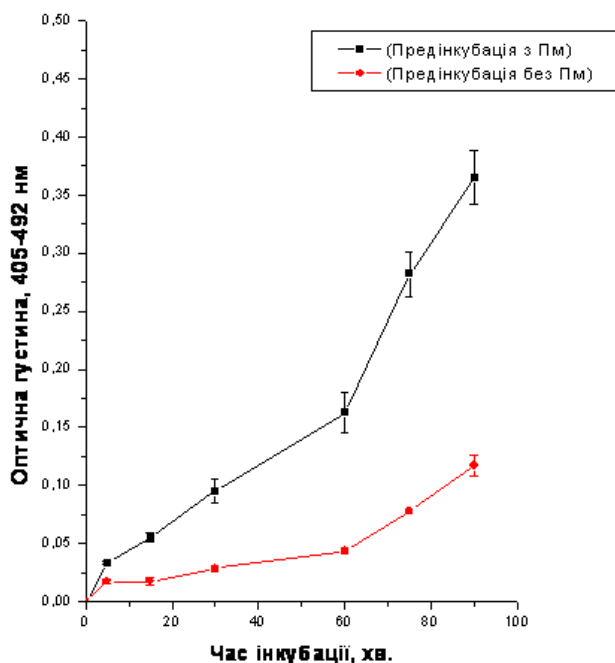


Рис. 2. Тромбін-подібна амідолітична активність у плазмі крові людини
 Fig. 2. Thrombin-like amidolytic activity in human plasma

Отже, наведені дані однозначно свідчать про здатність сорбованого лізин-зв'язуючими ділянками Пм до ефективної протеолітичної активації та ушкодження розчинних білків крові.

Варто зазначити, що виявлений нами ефект може мати безпосереднє відношення до такого ускладнення гемостазу, як дисеміноване внутрішньосудинне зіднання крові (ДВЗ-синдром). Як відомо, ДВЗ-синдром спостерігається за багатьох захворювань, що супроводжуються розвитком ендогенної інтоксикації (Rak et al., 2006). Білкові та пептидні компоненти ендогенної інтоксикації розподіляються між тканинами та рідинами організму, сорбуються на клітинних мембранах ендотелію. Закономірності взаємодії розбалансованих пептидних структур з асиметричним подвійним фосфоліпідним шаром клітинних мембран забезпечують експозицію на зовнішньому боці мембрани взаємно компенсованих пар амінокислотних залишків – структурних аналогів лігандів лізин-зв'язуючих ділянок Пг. Сорбція Пг та його активація до Пм може призводити до нефункціональної активації проферментів та протеолітичного ушкодження розчинних білків (Verevka, Grinenko, 2011). Згідно з нашими даними, протеолітична дія сорбованого Пм забезпечує не лише активацію протромбіну в тромбін, але й його протеолітичне ушкодження, що виключає або істотно обмежує його інгібування присутнім в плазмі антитромбіном III.

Якою мірою подібні процеси розповсюджуються на інші розчинні білки крові, зокрема, на фібрин, наскільки ефективно розщеплюється утворений за участі протеолітично ушкодженого фібриногену фібриновий згусток? Розв'язання даних питань може пролити світло на причини утворення стабільного фібринового згустку за ДВЗ-синдрому (Standeven et al., 2005). З тих же міркувань заслуговує на увагу й така властивість клітинних мембран, як здатність до пошарової β -агрегації сорбованих білків (Verevka, 2013). У випадку тромбоутворення це створює передумови для формування “прикордонного шару” фібрину, структура якого відзначається підвищеною опірністю до фібринолізу (Savchuk et al., 2009). Варто підкреслити, що з огляду на геометричні причини вплив всіх цих факторів зростає зі зменшенням розміру судин, оскільки визначається співвідношенням периметру судини до його площини ($2\pi R/\pi R^2 = 2/R$). Не менш важливою обставиною є зменшення швидкості потоку зі зменшенням просвіту судини. Тобто фізичні властивості саме мікросудин забезпечують формування своєрідної “камерності” з розвитком процесів, для більших судин нехарактерних.

Висновки. Таким чином, наведені дані свідчать про здатність сорбованого лізин-зв'язуючими ділянками плазміну до протеолітичного ушкодження та активації розчинних білків крові. Обговорюються функціональні наслідки

подібного явища, зокрема, його можлива участь в розвитку ДВЗ-синдрому.

Список літератури.

1. Chen D., Dorling A. Critical roles for thrombin in acute and chronic inflammation // *J. Thromb. Haemost.* – 2009. – Vol. 7 (Suppl. 1). – P.122-126.
2. Contact denaturation of proteins and the problem of biocompatibility of implants / In: *Molecular pathology of proteins* / Savchuk A.N., Zinchenko D.A., Zabolotny D.I.– NY: Nova science Publishers, 2009. – P.159-168.
3. Deutsch D., Mertz E. Plasminogen: purification from human plasma by affinity chromatography // *Science*. – 1970. – V. 170, № 3962. – P. 1095-1096.
4. Fareed J., Messmore H., Walenga J., Bermes E. Diagnostic efficacy of newer synthetic-substrates methods for assessing coagulation variables: a critical overview // *Clin. Chem.* – 1983. – Vol. 29, № 2. – P.225-236.
5. Kassenbrock K., Zlaks V., Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of tumor microenvironment // *Cell*. – 2010. – Vol. 141, № 2. – P. 52-67.
6. Lindstedt K.A., Leskinen M. J., Kovanen P. T. Proteolysis of the pericellular matrix. A novel element determining cell survival and death in the pathogenesis of plaque erosion and rupture // *Arterioscler. Thromb Vasc. Biol.* – 2004. – Vol. 24. – P. 1350-1358.
7. Liotta L., Petricoin E. Serum peptidome for cancer detection: spinning biologic trash into diagnostic gold // *J. Clin. Invest.* – 2006. – Vol. 116, № 1. – P.26-30.
8. McIntyre J., Matrisian L. Molecular imaging of proteolytic activity in cancer // *J. Cell. Biochem.* – 2003. – Vol. 90, № 6. – P.1087-1097.
9. Parametabolic β -Aggregation of proteins: familiar mechanisms with diverse sequels / In: *Advances in Medicine and Biology* / Verevka S.V. – NY: Nova Science Publishers, 2013, Vol. 72. – P 29-48.
10. Pseudo-functional interactions of plasminogen: molecular mechanisms and pathologic appearance / in: *Advances in Medicine and Biology* / Verevka S., Grinenko T. – NY: Nova Science Publishers, 2011, Vol. 34. – P.35-62.
11. Puente X., Lopez-Otin C. Genomic analysis of rat proteases and protease inhibitors // *Genome Res.* – 2004. – Vol.14, № 4. – P.609-622.
12. Rak J., Yu J., Luyendyk J., Mackman N. Oncogenes, trousseau syndrome, and cancer-related changes in the coagulome of mice and humans // *Cancer Res.* – 2006. – Vol. 66, № 22. – P.10643–10646.
13. Standeven K., Ariens R., Grant P. The molecular physiology and pathology of fibrin structure/function // *Blood Rev.* – 2005. – Vol. 19. – P.275-288.
14. Wiman B., Wallen P. Activation of human plasminogen by an insoluble derivative of urokinase. Structural changes of plasminogen in course of activation to plasmin and demonstration of a possible intermediate compound // *Eur. J. Biochem.* – 1973. – Vol. 36, № 1. – P.25-31.
15. Показники гемостатичної системи для оцінки перебігу захворювання на рак верхніх дихальних шляхів: Методичні рекомендації (27.11/183.11) / Верьовка С.В., Голобородько О.П., Кизим О.Й., Клись Ю.Г. - Київ, 2012 - 20 с.
16. Современные представления о системе гемостаза / Волков Г.Л., Платонова Т.Н., Савчук А.Н. Київ: Наукова думка, 2005 - 296 с.

ACTIVATION EFFECT OF THE SORBED PLASMIN. MODELLING *IN VITRO*

S. V. Verevka, N. G. Raksha, A. N. Savchuk

One of the major factors of cancer and inflammatory processes development is excessive activation action of plasmin - a key enzyme of the fibrinolytic system. Such significant activation was caused not only physiological plasminogen binding on the fibrin mesh surface but also pathological-mediated interaction of plasminogen with dipole pairs of amino acid residues on the vessels surface. These amino acid pairs are structural analogues of ligands for lysine-binding sites of plasminogen. Their exposition on external side of cell membranes is result of interaction of protein and peptide products of endogenous intoxication with membranes phospholipids. Activation action of plasmin specifically sorbed on lysine-agarose state against soluble plasma prothrombin had been studied. The development of significant amidolytic thrombin-like activity that was insensitive to antithrombin III inhibition was noted. The obtained results show the ability of sorbed plasmin to proteolytic damage and non-functional activation of soluble proteins of blood. Mechanisms of formation of such activation in vivo and its possible role in the development of various pathologic states, particularly at disseminated intravascular coagulation were discussed.

Key words: plasmin, thrombin, disseminated intravascular coagulation.

Одержано редколлегією 15.12.2013