УДК 615.15-577.112

Я. Рока-Мойя, асп, Д. Жерносєков, канд. біол. наук,
Е. Золотарьова, канд. біол. наук, Т. Гриненко, д-р біол. наук

ВПЛИВ ЕКЗОГЕННОГО ЛІЗ-ПЛАЗМІНОГЕНУ НА АДФ-ІНДУКОВАНУ АГРЕГАЦІЮ ТРОМБОЦИТІВ

Розглянуто вплив Ліз-плазміногену на АДФ-індуковану агрегацію тромбоцитів людини. Показано, що екзогенний Ліз-плазміноген знижував агрегаційну здатність тромбоцитів, впливаючи, головним чином, на другу хвилю агрегації. Фібриновий DD-фрагмент пригнічував АДФ-індуковану агрегацію тромбоцитів, а також підсилював інгібуючий ефект Ліз-плазміногену. В роботі обговорені можливі молекулярні механізми впливу плазміногену на агрегаційні властивості тромбоцитів.

The influence of Lys-plasminogen on ADP induced aggregation of human platelets has been observed. It was shown, that exogenous Lys-plasminogen decreased platelet aggregation, making the main effect on the second wave of the process. DD-fragment of fibrin inhibited ADP-induced platelet aggregation and enhanced the inhibitory effect of Lys-plasminogen. The possible mechanisms of plasminogen effect have been discussed.

Вступ. Плазміноген, який є зимогеном плазміну, разом зі своїми активаторами та інгібіторами становить плазміноген-плазмінову систему, що бере участь у багатьох фізіологічних та патологічних процесах. Так, окрім своєї головної функції – лізису фібринового згустку, система плазміногену відповідає за процес міграції клітин та тканинної трансформації [5]. Нещодавно з'явилися дані, де плазміноген розглядають як адгезивний ліганд для інтегринових молекул – адгезивних білків, що розташовані на поверхні лейкоцитів та тромбоцитів [9].

Відомо, що плазміноген здатен зв'язуватися з поверхнею тромбоцитів, причому активовані тромбоцити мають підвищену афінність до плазміногену [6].

Вивчаючи фізіологічне значення зв'язування плазміногену з тромбоцитами, вчені прийшли до висновку, що за нормальних умов мембрана тромбоцитів виступає поверхнею для адсорбції плазміногену та тканинного активатору плазміногену, таким чином полегшуючи активацію плазміногену. Плазмін, що утворюється внаслідок активації, буде захищений від дії свого первинного інгібітору α_2-антиплазміну. Отже, тромбоцити в такий спосіб сприяють прояву фібринолітичної активності плазміну.

Існують суперечливі дані щодо впливу плазміну на функціонування тромбоцитів. Автори роботи [14] показали, що додавання плазміну (1 CU/мл) до суспензії тромбоцитів призводило до стимуляції агрегації. З іншого боку, при дії на тромбоцити меншої концентрації плазміну або за умов тривалого часу інкубації (20 хв і більше) спостерігали зниження агрегації [3]. Дані щодо

© Рока-Мойя Я., Жерносєков Д., Золотарьова Е., Гриненко Т., 2011

впливу плазміногену на агрегацію тромбоцитів в літературі відсутні. Проте, аналізуючи показники фібринолітичної системи діалізних хворих, автори роботи [13] виявили позитивну кореляцію між рівнем плазміногену плазми крові та ступенем агрегації тромбоцитів. Було висунуто припущення про існування реципрокного механізму, який регулює взаємодію між тромбоцитами та системою активації плазміногену.

На поверхні тромбоцитів виявлено низку білків, що зв'язують плазміноген. Серед них глікопротеїн IIbIIIa, тромбоспондин та гістидин-багатий білок. Найбільшу увагу привертає можлива взаємодія плазміногену з інтегрином IIbIIIa, що відповідає за утворення контактів між тромбоцитами під час агрегації. Відомо, що фібриноген відіграє роль контактного білка між двома тромбоцитами, оскільки його молекула має симетричну структуру з двома головними тромбоцит-зв'язуючими доменами [4]. Сайти зв'язування фібриногену з інтегрином IIbIIIa є послідовність Арг-Глі-Асп (амінокислотні залишки 95-97 та 572-574 кожного з двох Aα-ланцюгів) та послідовність додекапептиду (амінокислотні залишки 400-411 на С-кінці кожного з двох γ-ланцюгів) [11]. Щодо відповідних сайтів на молекулі IIbIIIa, існує думка, що субодиниця IIIa цього інтегрину зв'язується з послідовністю Арг-Глі-Асп, тоді як субодиниця IIb – з додекапептидом γ-ланцюга [10] .

Зв'язування плазміногену з інтегрином IIbIIIa може бути опосередковано фібриногеном, хоча деякі автори не виключають можливості безпосереднього зв'язку плазміногену з цим інтегрином [1]. До того ж показано, що іммобілізований плазміноген здатен підтримувати клітинну адгезію завдяки безпосередньому зв'язку з лейкоцитарними інтегринами αMβ2 та α5β1 [9]. Є повідомлення про те, що ці інтегрини також експресуються на поверхні активованих тромбоцитів [8].

Взаємодія плазміногену з фібриногеном, що зв'язаний з тромбоцитами, залишається невивченою. Можливо, такий фібриноген має більшу авідність для плазміногену. Було показано, що конформація фібриногену на поверхні тромбоцитів відрізняється від конформації цього білка у плазмі. Не виключено, що фібриноген, зв'язаний з тромбоцитами, може взаємодіяти з плазміногеном [3].

Таким чином, при утворенні адгезивних контактів між тромбоцитами під час агрегації відбувається взаємодія між поверхневими тромбоцитарними білками (в першу чергу інтегринами) та адгезивними лігандами (фібриноген та ін). Плазміноген, що адсорбується на поверхні активованих тромбоцитів, також може розглядатися як адгезивний ліганд.

Метою роботи було дослідити вплив екзогенного Ліз-плазміногену на АДФ-залежну агрегацію тромбоцитів.

Матеріали та методи. Збагачену тромбоцитами плазму крові (ЗТПК) отримували з цільної крові з додаванням 3,8% розчину цитрату натрію у співвідношенні 9:1 шляхом центрифугування при 160 g впродовж 20 хв при температурі 20 ˚С [15].

Агрегацію тромбоцитів вивчали в ЗТПК людини. Агрегометрію проводили в перші дві години після забору крові на оптичному агрегометрі "SOLAR AT-02" за методом [15]. Агрегацію тромбоцитів стимулювали внесенням АДФ як індуктора агрегації, кінцева концентрація у пробі складала 5 мкМ згідно рекомендаціям авторів роботи [1], де було досліджено зв'язування плазміногену з тромбоцитами. Процес агрегації реєстрували протягом 5 хв. В кювету агрегометру (загальний об'єм – проби 400 мкл) вносили 280 мкл ЗТПК, розчин Ліз-плазміногену та робочий буфер (10 мМ HEPES pH 7,4, 177 мМ NaCl, 2,8 мМ KCl, 1мМ $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 12 мМ $NaHCO_3$, 0,4 мМ NaH_2PO_4, 0,35 % бичачого сироваткового альбуміну, 5 мМ глюкози). Молярне співвідношення фібриноген:плазміноген у пробі становило 1:1.

Аналіз даних агрегометрії проводили за допомогою пакету програм "Агрегометр 2.01". Ступінь агрегації оцінювали як максимальний рівень світлопропускання ЗТПК після додавання індуктора агрегації (ΔH); час агрегації – як час досягнення максимального ступеню агрегації. Швидкість агрегації визначали як тангенс кута нахилу агрегаційної кривої до осі абсцис – tgα. Кожен експеримент був повторений тричі, на рисунках представлено типові агрегаційні криві.

Фібринові DD-фрагменти були люб'язно надані співробітниками відділу структури та функції білку Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАНУ. Молярне співвідношення DD-фрагмент (кінцева концентрація – 0,732 мг/мл):фібриноген у реакційній суміші було 1:1.

6-Аміногексанову кислоту додавали до кінцевої концентрації 10 мМ.

Результати досліджень та їх обговорення. Проведені експерименти свідчать про негативний вплив Ліз-плазміногену на АДФ-індуковану агрегацію тромбоцитів. На рис. 1 (1) наведено типову агрегатограму, що була отримана в разі двохвильової агрегації. Інгібуючий вплив екзогенного Ліз-плазміногену виявлено при дії двох концентрацій індуктора (1 мкМ та 5 мкМ). У разі двохвильової агрегації Ліз-плазміноген пригнічував другу необоротну стадію агрегації, можливо, впливаючи на білки, що секретуються (або активуються) під час вивільнення вмісту α-гранул та забезпечують другу хвилю агрегації (рис. 1 (2)).

Відомо, що плазміноген адсорбується на поверхні клітин за допомогою лізин-зв'язуючих сайтів, що розташовані в його кринглових структурах. 6-Аміногексанова кислота, блокуючи лізин-зв'язучі сайти плазміногену, впливає на його адгезивні властивості. В наших експериментах 6-аміногексанова кислота частково інгібувала процес АДФ-індукованої агрегації, зменшуючи ступінь агрегації приблизно на 10 % порівняно з контролем. Водночас, додавання цього реагенту до реакційної суміші, що містила екзогенний Ліз-плазміноген, певною мірою підвищувало швидкість агрегації тромбоцитів, яка пригнічувалась плазміногеном, хоча ступінь агрегації при цьому суттєво не відновався (Рис. 2).

В разі використання в якості інгібітору агрегації тромбоцитів DD-фрагменту фібрину, що містить інтактні γ-ланцюги, в яких розташовані сайти зв'язування фібриногену, спостерігали зниження ступеню агрегації приблизно на 30 % (Рис. 3). Додавання DD-фрагменту до реакційної суміші, що містила Ліз-плазміноген, посилювало його інгібуючий ефект.

Отримані результати не дають змоги однозначно зробити висновок щодо механізму інгібуючого впливу Ліз-плазміногену. В попередніх дослідженнях було окреслено можливі шляхи такого впливу [1]. Ми хотіли б зупинитися на деяких з них, беручи до уваги роботи останніх років. По-перше, інгібуючий ефект може бути обумовлений конкуренцією Ліз-плазміногену з фібриногеном за інтегрин IIbIIIa під час агрегації. По-друге, інгібування може бути наслідком безпосередньої взаємодії Ліз-плазміногену з білками, секретованими під час другої хвилі агрегації та що, як відомо, знаходиться в активованому мультимерному стані та здатен зв'язуватися не лише зі своїм специфічним тромбоцитарним рецептором αVβ3, але й з інтегрином IIbIIIa завдяки наявності у його складі послідовності Арг-Глі-Асп. Показано, що мультимерна форма вітронектину позитивно впливає на агрегацію тромбоцитів [2].

Цікаво, що в структурі вітронектину виявлено сайти зв'язування з плазміногеном [12]. Таким чином, цілком

імовірно, що екзогенний Ліз-плазміноген буде зв'язуватися з вітронектином тромбоцитів та перешкоджати агрегації цих клітин. З іншого боку, треба взяти до уваги, що дія плазміногену на агрегацію тромбоцитів може бути наслідком його зв'язку з тромбоцитарним білком тромбоспондином, який після секреції α-гранул також залишається на поверхні тромбоцитів. За даними роботи [7] тромбоспондин є необхідним компонентом тромбоцитарної агрегації. Таким чином, остаточний висновок стосовно конкретного білку або сайту, який підлягає дії екзогенного плазміногену під час агрегації, можна буде зробити лише після серії додаткових експериментів на відмитих тромбоцитах, де буде виключено вплив різноманітних чинників плазми.

Висновки. 1. Показано інгібуючий вплив екзогенного Ліз-плазміногену на АДФ-стимульовану агрегацію тромбоцитів. 2. Інгібуючий ефект спостерігався під час другої хвилі агрегації тромбоцитів. 3. Фрагмент DD-фібрину підсилював інгібуючий ефект екзогенного Ліз-плазміногену.

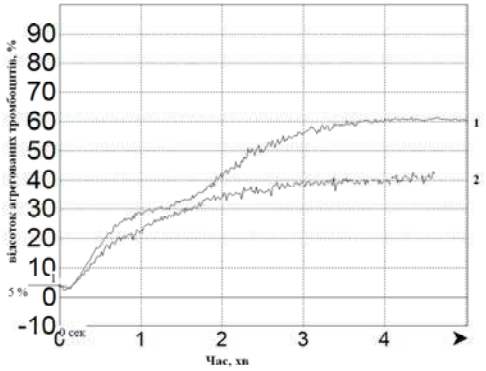

Рис. 1. Вплив Ліз-плазміногену на двохвильову агрегацію тромбоцитів, індуктор – 5 мкМ АДФ:
1 – контрольна агрегація під впливом АДФ (5 мкМ);
2 – агрегація тромбоцитів у присутності екзогенного Ліз-плазміногену

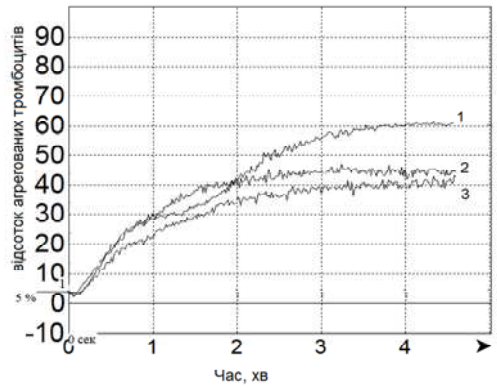

Рис. 2. Вплив 6-аміногексанової кислоти на агрегацію тромбоцитів за присутності Ліз-плазміногену, індуктор – 5 мкМ АДФ: 1 – контрольна агрегація під впливом АДФ (5 мкМ); 2 – агрегація тромбоцитів у присутності Ліз-плазміногену та 6-аміногексанової кислоти;
3 – агрегація тромбоцитів у присутності Ліз-плазміногену

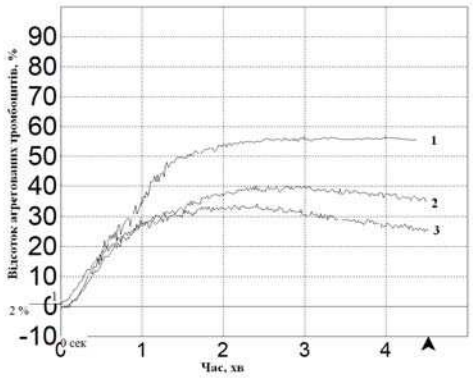

Рис. 3. Вплив DD-фрагменту фібрину на агрегацію тромбоцитів без та за присутності Ліз-плазміногену, індуктор – 5 мкМ АДФ: 1 – контрольна агрегація під впливом АДФ (5 мкМ); 2 – агрегація тромбоцитів у присутності DD-фрагментів фібрину; 3 – агрегація тромбоцитів у присутності DD-фрагментів фібрину та Ліз-плазміногену

1. Asch E., Podack E. Vitronectin binds to activated human platelets and plays a role in platelet aggregation. //J. Clin. Invest. – 1990. – Vol.85, № 5 – P.1372-1378. 2.Fry E.T.A., Grace A.M., Sobel B.E. Interactions between pharmacologic concentrations of plasminogen activators and platelets // Fibrinolysis. – 1989. – Vol. 3 – P. 127-136. 3.Hantgan R.R., Stahle M.C., Lord S.T. Dynamic regulation of fibrinogen: integrin αIIbβ3 binding // Biochemistry. – 2010. – Vol. 49, № 43. – P. 9217-9225. 4.Herren T., Swaisgood C.M., Plow E.F. Regulation of plasminogen receptors // Front Biosci. – 2003. – Vol. 8. – P.1-8.5.Horne III M.K., Merryman P.K., Cullinane A.M. Plasminogen interaction with platelets: the importance of carboxyterminal lysines // Thromb. Res. – 2005. – Vol. 116. – P. 499-507. 6.Isenberg J.S.., Romeo M.J., Yu C. et al Thrombospondin-1 stimulates platelet aggregation by blocking the antithrombotic activity of nitric oxide / cGMP signaling // Blood. – 2008. – Vol.111, № 2. – P. 613-623. 7. Karlheinz P. Platelet function // Contemporary cardiology. – 2005. – Vol. 1. – P. 21-42. 8.Lishko V.K., Novokhatny V.V., Yakubenko V.P., Skomorovska-Prokvolit H.V., Ugarova T.P. Characterization of plasminogen as an adhesive ligand for integrins αM β2 (Mac-1) and α5β1 (VLA-5) // Blood. – 2004. – Vol. 104, № 3. – P. 719-726. 9.Mohri H., Okubo T. Affinity of fibrinogen binding to platelet membrane glycoprotein IIbIIIa increases with RGDS and γ-chain fibrinogen peptide.10.Peerschke E.I. B., Lopez J.A. Platelet membranes and receptors. In Loscalzo J., Schafer A.I. (eds) Thrombosis and Hemorrhage 2nd ed. Baltimore. Williams and Wilkins. – 1998. – P. 229-260. 11.Preissner K.T., Seiffert D. Role of vitronectin and its receptors in haemostasis and vascular remodeling.//Thrombosis Res. – 1998. – Vol. 89, № 1, – P.1-21. 12.Salobir B., Sabovic M., Zupan I.P., Ponikvar J.B. Platelet (dys)function and plasma plasminogen levels in hemodialysis patients // Ther. Apher. Dial. – 2008. – Vol. 12, № 2. – P. 133-136. 13.Schafer A.I., Maas A.K., Ware A. et al. Platelet protein phosphorylation, evaluation of cytosolic calcium, and inositol phospholipid breakdown in platelet activation induced by plasmin // J. Clin. Invest. – 1986. – Vol. 78. – P.73-79. 14.Зубовская Е.Т., Светлицкая С.Г. Система гемостаза. Теоретические основы и методы исследования. – Минск, 2010.

Надійшла до редколегії 23.02.11