

UDC 616.155.2; 612.128

Вплив плазміногену/плазміну на агрегаційну здатність тромбоцитів

Я. М. Рока-Мойя, Д. Д. Жерносков, Т. В. Гриненко

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України
Вул. Леонтовича, 9, Київ, Україна, 01601

chemikdd@mail.ru

Мета. Визначити вплив Глу- і Ліз-форм плазміногену та плазміну на агрегацію тромбоцитів, індуковану різними агоністами. **Методи.** Агрегатометрія. Спектрофотометрія. **Результати.** Отримано дані щодо інгібувального впливу Ліз-плазміногену на агрегацію відмитих тромбоцитів людини. Дію проферменту спостерігали на другій хвилі агрегації тромбоцитів. Показано дозозалежний характер його інгібувального ефекту на агрегацію тромбоцитів, стимульованих тромбіном. Ристоміцин-індукована агрегація не пригнічується Ліз-плазміногеном. Глу-плазміноген і плазмін не впливають на функціональні властивості клітин за умов експерименту. Інгібітор серинових протеїназ апротинін не впливає на ефект інгібування агрегації Ліз-плазміногеном. **Висновки.** Вперше встановлено інгібувальний вплив Ліз-плазміногену на агрегацію тромбоцитів, стимульованих тромбіном і колагеном. Відсутність дії проферменту на агрегацію, індуковану ристоміцином, вказує на те, що Ліз-плазміноген не впливає на ланку агрегації, яка реалізується за участі ГП Іb/ІХ. Інгібування Ліз-плазміногеном агрегації тромбоцитів за присутності апротиніну робить неможливою участь плазміну в реалізації інгібувального ефекту зимогену.

Ключові слова: агрегація відмитих тромбоцитів, плазміноген, плазмін.

Вступ. Плазміноген/плазмінова система бере участь у багатьох фізіологічних і патологічних процесах, серед яких фібриноліз, запалення та онкогенез [1, 2]. Плазміноген може взаємодіяти з клітинами крові, причому найбільшу здатність до зв'язування цього білка виявляють тромбоцити [3].

За нормальних умов мембрана тромбоцитів слугує поверхнею для адсорбції плазміногену і тканинного активатора плазміногену (ТПА). Існує припущення, що Глу-плазміноген, який циркулює в плазмі, зв'язується з тромбоцитарною мембраною і перетворюється спочатку на Ліз-плазміноген, з якого надалі утворюється плазмін (рис. 1) [4]. Таким чином, активний фермент стає захищеним від дії його первинного інгібітора альфа-2-антиплазміну, а поверхня тромбоцита набуває профібринолітичних властивостей. Показано, що афінність тромбоцитів втричі більша для Ліз-плазміногену порівняно з його Глу-формою, хоча кількість сайтів для Глу- і Ліз-

плазміногену приблизно однакова ($4,1 \cdot 10^4$ і $5,5 \cdot 10^4$ сайтів на клітину відповідно) [5]. Сорбція компонентів плазміноген/плазмінової системи на клітинній поверхні має певний вплив на функціональні властивості тромбоцитів, зокрема, на агрегаційну здатність. Автори робіт [6, 7] продемонстрували, що додавання плазміну (1 СУ/мл) до суспензії тромбоцитів призводить до стимуляції агрегації. Однак іншими авторами показано, що в разі інкубації тромбоцитів з меншою концентрацією плазміну, або з тією ж концентрацією, але за умов збільшеного часу інкубації (20 хв і більше) спостерігається зниження агрегації [8–10].

Нами встановлено, що Ліз-плазміноген, на відміну від Глу-плазміногену, пригнічує АДФ-індуковану агрегацію тромбоцитів у препаратах збагаченої тромбоцитами плазми [11]. Але інгібувальна дія цього препарату може бути доведена лише після експериментів з відмитими тромбоцитами. До того ж важливим є встановлення механізму інгібувальної дії Ліз-плазміногену на поверхні тромбоцитів.

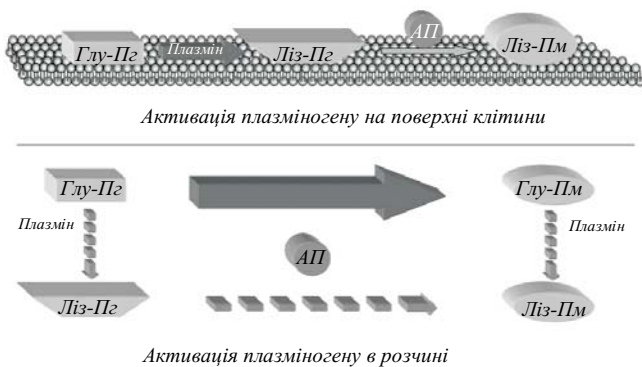


Рис. 1. Схема активзації плазміногену (ПГ) [4]

Мета цієї роботи полягала у дослідженні впливу компонентів плазміноген/плазмінової системи на агрегацію відмитих тромбоцитів, стимульованих різними агоністами.

Матеріали та методи. Агрегацію тромбоцитів вивчали на препаратах відмитих тромбоцитів, отриманих за модифікованим методом [12]. Нативні відмиті тромбоцити отримували постадійним центрифугуванням крові людини, антикоагульованої цитратним буфером (100 мМ цитрат натрію, 80 мМ лимонна кислота, 110 мМ глюкоза) у співвідношенні кров/антикоагулянт 9/1.

Збагачену тромбоцитами плазму (ЗТП) отримували після центрифугування крові при 1000 об/хв протягом 20 хв за кімнатної температури. Надалі ЗТП знову центрифугували (1500 об/хв, 20 хв), осад тромбоцитів ресуспендували у буфері для відмивання тромбоцитів (20 мМ HEPES, рН 6,8, 137 мМ NaCl, 4 мМ KCl, 0,2 мМ MgCl₂ із додаванням 0,2 % глюкози і 0,2 % сироваткового альбуміну бика, БСА). Суспензію клітин вдруге центрифугували за тих же умов і ресуспендували у буфері, об'єм якого становив 1/2 об'єму ЗТП. Відмиті тромбоцити зберігали за температури 37 °С.

Агрегацію виконували в перші три години після забору крові на оптичному агрегометрі «SOLAR AT-02» за методом [13]. Агрегацію тромбоцитів стимулювали внесенням тромбіну (1 НН/мл), колагену (1,25 мг/мл) і ристоміцину (1,5 мг/мл). Концентрації агоністів брали згідно з рекомендаціями, наведеними у роботі [14]. Процес агрегації реєстрували протягом 5 хв. Кількість тромбоцитів у пробі становила 300–350 тис/мкл. Перед внесенням

стимулятора агрегації проби інкубували за температури 37 °С протягом 3 хв для забезпечення зв'язування компонентів плазміноген/плазмінової системи з поверхнею тромбоцитів [3].

Дані агрегатометрії аналізували за допомогою пакету «Агрегометр 2.01». Оцінювали ступінь, час і швидкість агрегації. Препарати Глу-, Ліз-плазміногену і плазміну отримано співробітниками відділу згідно з відповідними методиками [15]. У роботі використано препарати колагену, ристоміцину і тромбіну виробництва «Технологія стандарт» (РФ). Дію плазміну пригнічували за допомогою інгібітора серинових протеїназ апротиніну – препарату «Контривен» («Біофарма», Україна).

Кількість плазміну у препараті Ліз-плазміногену та можливість його утворення у реакційній суміші під час агрегації тромбоцитів визначали методом реєстрації амідолітичної активності ферменту щодо хромогенного субстрату S2251 (НПО «Ренам, РФ).

Результати і обговорення. Проведені експерименти на відмитих тромбоцитах виявили інгібувальний вплив Ліз-плазміногену на тромбін- і колаген-індуковану агрегацію (рис. 2 і 3), в обох випадках ступінь агрегації знижується принаймні вдвічі. Ці дані підтверджують наші попередні дослідження, у яких показано інгібування Ліз-плазміногеном АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів у плазмі, причому інгібувальний вплив Ліз-плазміногену спостерігали, головним чином, під час другої хвили агрегації, коли відбувається секреція вмісту тромбоцитарних альфа-гранул [11].

Аналогічний ефект ми виявили на відмитих тромбоцитах при стимуляції колагеном, оскільки відомо, що дія колагенового індуктора пов'язана з другою хвилею агрегації.

Крім того, вивчали вплив Ліз-плазміногену на ристоміцинову агрегацію, яка реалізується за іншим механізмом. Ристоміцин, зв'язуючися з плазматичною мембраною тромбоцитів, запускає процес асоціації фактора фон Віллебранда з рецептором ГП Іb/ІХ і наступну активацію й аглютинацію тромбоцитів. Нами показано, що агрегація тромбоцитів, індукована ристоміцином за присутності аутологічної плазми крові як джерела фактора фон Віллебранда, не пригнічується Ліз-плазміногеном (рис. 4). Таким чином, відсутність ефекту проферменту на рис-

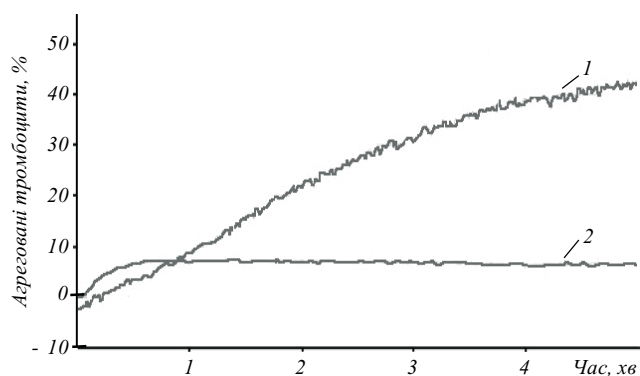


Рис. 2. Вплив Ліз-плазміногену на агрегацію тромбоцитів, індуковану 1 нН/мл тромбіну: 1 – контроль; 2 – 1,2 мкМ Ліз-плазміноген

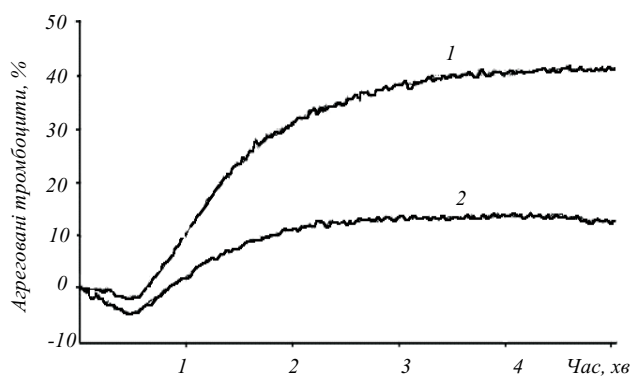


Рис. 3. Вплив Ліз-плазміногену на агрегацію тромбоцитів, індуковану 1,25 мг/мл колагену: 1 – контроль; 2 – 1,2 мкМ Ліз-плазміноген

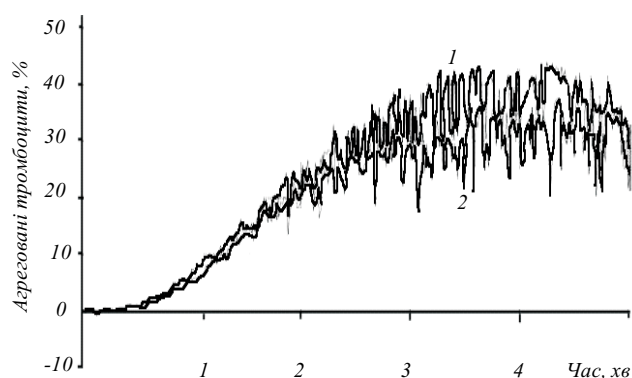


Рис. 4. Вплив Ліз-плазміногену на агрегацію тромбоцитів, індуковану 1,5 мг/мл ристоміцину: 1 – контроль; 2 – 1,2 мкМ Ліз-плазміноген

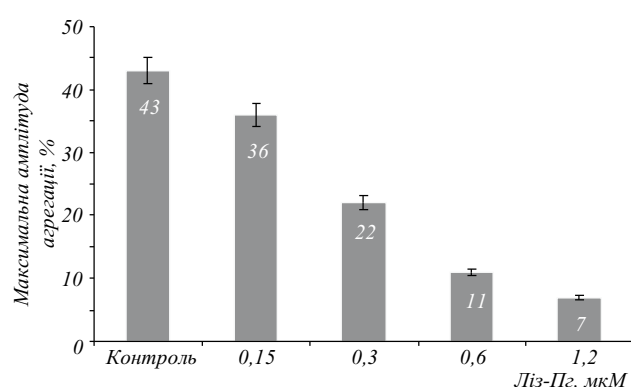


Рис. 5. Вплив Ліз-плазміногену (0,15–1,2 мкМ) на агрегацію тромбоцитів, індуковану тромбіном

томіцин-індуковану агрегацію вказує на селективність Ліз-плазміногену щодо механізму агрегації.

Нами встановлено дозозалежний характер інгібувального впливу Ліз-плазміногену під час індукованої тромбіном агрегації. Найвираженіший інгібувальний ефект екзогенного Ліз-плазміногену спостерігали за концентрації 1,2 мкМ (рис. 5). Збільшення концентрації не призводило до посилення інгібіторної дії.

Оскільки препарати Ліз-плазміногену здатні виявляти спонтанну плазмінову активність, ми провели дослідження впливу плазміну (1 нМ) на тромбін-індуковану агрегацію тромбоцитів (попередня інкубація з плазміном тривала протягом 3 хв). Концентрацію плазміну обрано із розрахунку його вмісту в препараті Ліз-плазміногену. За результатами експерименту не встановлено впливу плазміну на індуковану тромбіном агрегацію. Отримані результати узгоджуються з даними роботи [16], де показано відсутність впливу наномолярних концентрацій

плазміну на стимульовану тромбіном агрегацію, якщо час інкубації не перевищував 3 хв.

У наших попередніх експериментах із використанням збагаченої тромбоцитами плазми встановлено, що Глу-плазміноген, який характеризується закритою конформацією, в однакових концентраціях з Ліз-плазміногеном не впливає на АДФ-індуковану агрегацію. На відмитих тромбоцитах нами підтверджено відсутність впливу Глу-плазміногену на індуковану тромбіном агрегацію.

Цікавим є встановлення механізму, за яким діє Ліз-плазміноген. Можливо, виявлений ефект обумовлений дією плазміну, який утворюється внаслідок активації Ліз-плазміногену на поверхні тромбоцитарної мембрани (як зазначалося раніше, спонтанна активність плазміну у препараті Ліз-плазміногену не чинить впливу на тромбін-індуковану агрегацію). У такому разі інгібувальний ефект може бути знятий при додаванні інгібітора серинових протеїназ. Для перевірки цього припущення ми ви-

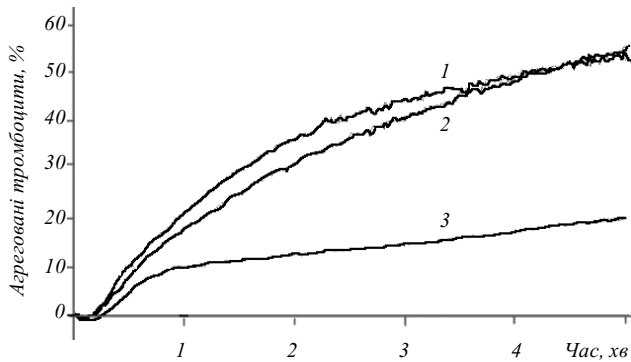


Рис. 6. Вплив апротиніну на інгібування Ліз-плазміногеном індукованої тромбінної агрегації тромбоцитів: 1 – контроль; 2 – агрегація тромбоцитів за присутності апротиніну (5,5 МЕ/мл); 3 – Ліз-плазміноген (1,2 мкМ) за присутності апротиніну

конали серію експериментів з інгібітором серинових протеїназ апротиніном. Показано, що апротинін у концентрації 5,5 МЕ/мл повністю інгібує активність плазміну, присутню в препараті Ліз-плазміногену та середовищі агрегації. Додавання апротиніну (5,5 МЕ/мл) до реакційної суміші не впливає на інгібувальний ефект Ліз-плазміногену тромбін-індукованої агрегації тромбоцитів (рис. 6). Варто зазначити, що така концентрація апротиніну не пригнічує тромбоцитарної агрегації. Таким чином, участь плазміну в реалізації інгібувального ефекту Ліз-плазміногену стає неможливою.

З іншого боку, Ліз-плазміноген може зв'язуватися з білковими компонентами, які вивільняються під час секреції альфа-гранул і обумовлюють агрегаційні властивості активованих тромбоцитів, – фібриногеном, тромбоспондином і вітронектином. Так, наприклад, фібриноген утворює зв'язки між тромбоцитами за допомогою активованого інтегрину ІІb/ІІа. Хоча у плазмі фібриноген не взаємодіє з плазміногеном, цілком імовірно, що Ліз-плазміноген здатний зв'язуватися з фібриногеном, іммобілізованим на тромбоцитарній мембрані, та перешкоджати утворенню агрегатів. Тромбоспондин секретується з активованих тромбоцитів і залишається зв'язаним з тромбоцитарною мембраною завдяки наявності специфічного рецептора CD47. Відомо, що тромбоспондин може утворювати специфічний зв'язок з плазміногеном. Нещодавно показано, що він є важливим компонентом, який впливає на ефективність колаген- і тромбін-індукованої адгезії відмитих тромбоцитів [17]. З цього приводу

висунуто припущення, що тромбоспондин сприяє адгезії тромбоцитів та зв'язуванню фібриногену, активуючи інтегрин ІІb/ІІа. Вітронектин тромбоцитів, який секретується під час активації, на відміну від вітронектину плазми, є необхідним компонентом для ефективної агрегації. У тварин з вітронектин-дефіцитними тромбоцитами другої хвилі агрегації не спостерігалось [18]. У структурі вітронектину існують сайти, відповідальні за зв'язок з плазміногеном. Не виключено, що блокування цих сайтів екзогенним Ліз-плазміногеном буде пригнічувати тромбоцитарну агрегацію.

Визначити, який саме компонент або компоненти тромбоцитарних гранул опосередковують інгібувальний ефект Ліз-плазміногену, стане можливим після проведення низки подальших досліджень.

Висновки. Вперше встановлено інгібувальний ефект Ліз-плазміногену на агрегацію тромбоцитів, стимульованих тромбіном і колагеном.

Відсутність впливу проферменту на ристоміцин-індуковану агрегацію вказує на те, що Ліз-плазміноген не діє на ланку агрегації, яка реалізується за участі ГП Іb/ІХ.

Виявлено дозозалежний характер інгібувальної дії Ліз-плазміногену на агрегацію тромбоцитів. Найбільший ефект спостерігається за концентрації Ліз-плазміногену 1,2 мкМ.

Глу-плазміноген і плазмін не впливають на агрегацію тромбоцитів за умов експерименту.

Інгібування Ліз-плазміногеном агрегації тромбоцитів за присутності апротиніну робить неможливою участь плазміну у реалізації інгібувального ефекту зимогену.

Y. M. Roka-Moya, D. D. Zhernossekov, T. V. Grinenko

Plasminogen/plasmin influence on platelet aggregation

Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine
9, Leontovicha Str., Kyiv, Ukraine, 01601

Summary

Aim. Determination of the influence of Glu- and Lys-plasminogen/plasmin on the platelet aggregation induced by different agonists. **Methods.** Platelet aggregometry. Spectrophotometry. **Results.** We have shown the inhibitory effect of Lys-plasminogen on human platelet aggregation. The pro-enzyme action is related to the second wave of aggregation. The inhibitory effect of Lys-plasminogen possesses dose-dependent manner in case of thrombin-induced aggregation. The inhibitory effect of pro-enzyme with ristocetin as an inductor has not been observed. Glu-plasminogen and plasmin do not influence on platelet

aggregation under studied conditions. A serine protease inhibitor aprotinin does not change the inhibitory effect of Lys-plasminogen. **Conclusions.** The results proved the inhibitory effect of Lys-plasminogen on thrombin- and collagen-induced platelet aggregation. The absence of inhibitory effect of Lys-plasminogen in the case of ristocetin-induced aggregation leads us to conclusion, that GP Ib/IX is not involved into the inhibited aggregation pathway. The unchanged inhibitory effect of Lys-plasminogen in the presence of aprotinin excludes plasmin participation in the inhibitory phenomenon.

Keywords: platelet aggregation, plasminogen, plasmin.

Я. М. Рока-Мойя, Д. Д. Жерносеков, Т. В. Гриненко

Влияние плазминогена/плазмина на агрегационные свойства тромбоцитов

Резюме

Цель. Изучить влияние Глу-, Лиз-форм плазминогена и плазмина на агрегацию тромбоцитов, индуцируемую различными агонистами. **Методы.** Агрегатометрия. Спектрофотометрия. **Результаты.** Получены данные об ингибирующем влиянии Лиз-плазминогена на агрегацию отмывых тромбоцитов человека. Действие профермента проявлялось во время второй волны агрегации. Показан дозозависимый характер его ингибирования агрегации тромбоцитов, стимулированных тромбином. Ристомидин-индуцированная агрегация не подавляется Лиз-плазминогеном. Глу-плазминоген и плазмин не влияют на функциональные свойства клеток в условиях эксперимента. Ингибитор сериновых протеиназ аprotинин не изменяет характера ингибирования агрегации Лиз-плазминогеном. **Выводы.** Впервые установлен ингибирующий эффект Лиз-плазминогена на агрегацию тромбоцитов, стимулированных тромбином и коллагеном. Отсутствие влияния профермента на ристомидин-индуцированную агрегацию указывает на то, что Лиз-плазминоген не действует на путь агрегации, реализуемый при участии GPIIb/IX. Ингибирование Лиз-плазминогеном агрегации тромбоцитов в присутствии аprotинина исключает участие плазмина в реализации ингибирующего эффекта.

Ключевые слова: агрегация отмывых тромбоцитов, плазминоген, плазмин.

REFERENCES

- Irigoyen J. P., Munoz-Canoves P., Montero L., Koziczak M., Nagamine Y. The plasminogen activator system: biology and regulation // *Cell Mol. Life Sci.*—1999.—**56**, N 1–2.—P. 104–132.
- Herren T., Swaisgood C. M., Plow E. F. Regulation of plasminogen receptors // *Front Biosci.*—2003.—**8**.—d. 1–8.
- Miles L. A., Plow E. F. Binding and activation of plasminogen on the platelet surface // *J. Biol. Chem.*—1985.—**260**, N 7.—P. 4303–4311.
- Miles L. A., Hawley S. B., Baik N., Andronicos N. M., Castellino F. J., Parmer R. J. Plasminogen receptors: the sine qua non of cell surface plasminogen activation // *Front. Biosci.*—2005.—**10**.—P. 1754–1762.
- Miles L. A., Dahlberg C. M., Plow E. F. The cell-binding domains of plasminogen and their function in plasma // *J. Biol. Chem.*—1988.—**263**, N 24.—P. 11928–11934.
- Niewiarowski S., Senyi A. F., Gillies P. Plasmin-induced platelet aggregation and platelet release reaction // *J. Clin. Invest.*—1973.—**52**, N 7.—P. 1647–1659.
- Schafer A. I., Maas A. K., Ware J. A., Johnson P. C., Rittenhouse S. E., Salzman E. W. Platelet protein phosphorylation, evaluation of cytosolic calcium, and inositol phospholipid breakdown in platelet activation induced by plasmin // *J. Clin. Invest.*—1986.—**78**, N 1.—P. 73–79.
- Torr S. R., Winters K. J., Santoro S. A., Sobel B. E. The nature of interaction between tissue-type plasminogen activator and platelets // *Thromb. Res.*—1990.—**59**, N 2.—P. 279–293.
- Fry E. T. A., Grace A. M., Sobel B. E. Interactions between pharmacologic concentrations of plasminogen activators and platelets // *Fibrinolysis.*—1989.—**3**, N 3.—P. 127–136.
- Winters K. J., Eisenberg P. R., Jaffe A. S., Santoro S. A. Dependence of plasmin-mediated degradation of platelet adhesive receptors in temperature and Ca^{2+} // *Blood.*—1990.—**76**, N 8.—P. 1546–1557.
- Roka-Moya Y. M., Zhernossekov D. D., Zolotareva E. M., Grinenko T. V. The influence of exogenous Lys-plasminogen on ADP-induced platelet aggregation // *Bulletin of the University of Kiev, series: Biology.*—2011.—**58**.—P. 34–36.
- Gear A. R., Suttitanamongkol S., Viisoreanu D., Polanowska-Grabowska R. K., Raha S., Camerini D. Adenosine diphosphate strongly potentiates the ability of the chemokines MDC, TARC, and SDF-1 to stimulate platelet function // *Blood.*—2001.—**97**, N 4.—P. 937–945.
- Zubovskaya E. T., Svetlitskaya S. G. Hemostasis system. Theoretical base and methods of investigation.—Minsk: BGUFK, 2010.—310 p.
- Barkagan Z. S., Momot A. P. Diagnostics and controlled therapy of hemostasis abnormalities.—Moscow: Newdiamed, 2008.—289 p.
- Aisina R. B., Mukhametova L. I., Gulin D. A., Levashov M. Y., Prisyazhnaya N. V., Gershkovich K. B., Varfolomeyev S. D. Inhibitory effect of angiotatins on activity of the plasminogen/plasmin activator system // *Biochemistry (Moscow).*—2001.—**74**, N 10.—P. 1104–1113.
- Pasche B., Ouimet H., Francis S., Loscalzo J. Structural changes in platelet glycoprotein IIb/IIIa by plasmin: determinants and functional consequences // *Blood.*—1994.—**83**, N 2.—P. 404–414.
- Isenberg J. S., Romeo M. J., Yu C., Yu C. K., Nghiem K., Monsale J., Rick M. E., Wink D. A., Frazier W. A., Roberts D. D. Thrombospondin-1 stimulates platelet aggregation by blocking the anti-thrombotic activity of nitric oxide/cGMP signaling // *Blood.*—2008.—**111**, N 2.—P. 613–623.
- Reheman A., Gross P., Yang H., Chen P., Allen D., Leytin V., Freeman J., Ni H. Vitronectin stabilizes thrombi and vessel occlusion but plays a dual role in platelet aggregation // *J. Thromb. Haemost.*—2005.—**3**, N 5.—P. 875–883.

Received 12.03.12