

Активация протеїну С в процесі тромболізу *in vitro*

І.І. Паталах, С.А. Таланов, О.В. Ревка, Т.Ф. Дроботько

Інститут біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України, Київ; E-mail: ipatalakh@ukr.net

У дослідях in vitro були відтворені фізіологічні умови формування та наступного лізису кров'яного тромбу. Тромбоутворення ініціювали тромбіном або контактом крові з аніонною поверхнею, що стимулює спонтанне згортання. У зразок крові попередньо додавали тканинний активатор плазміногену або/та протеїн С. Контролювали час початку та повної деградації сформованих тромбів, а також зміни вмісту протеїну С у лізатах. Встановлено, що лише додавання протеїну С, як окремо, так і в поєднанні з тканинним активатором плазміногену призводило до найбільш ефективного лізису тромбів: їх остаточної маса становила 18 та 5 % відповідно відносно контролю. Препарат тканинного активатора плазміногену за окремого внесення та у поєднанні з препаратом протеїну С призводив до зниження вмісту протеїну С в лізатах згустків крові, утворених спонтанно, на 83 та 74 %, відповідно. В лізатах згустків, утворених тромбіном, це зниження було 72 і 56 % відповідно. Без додавання тканинного активатора плазміногену лізати згустків, утворених тромбіном, містили протеїну С на 54 % менше, ніж ті, що були сформовані спонтанно. Отже, зміни вмісту протеїну С в ізольованому об'ємі тромбу мають контролюватися тромбіном на стадії тромбоутворення та системою фібринолізу на стадії тромболізу. Вміст протеїну С в лізатах згустків, утворених екзогенним тромбіном, поступово знижувався протягом наступних 10 год тромболізу, що додатково має свідчити про взаємодію систем фібринолізу та активації протеїну С. Сформульовано гіпотезу про існування в плазмі крові за участі клітин крові ендотеліального механізму активації протеїну С, ефективність якого підвищується в процесі тромболізу.

Ключові слова: протеїн С; активація; тромбін; тканинний активатор плазміногену; тромбоутворення; тромболізис.

ВСТУП

Згортання плазми крові – це процес гідролітичного розщеплення розчинного фібриногену за участі тромбіну та наступного спонтанного утворення нерозчинної полімерної фібринової сітки. Дуалістична природа тромбіну зумовлює його можливість регулювати як прокоагулянтні шляхи, спрямовані на утворення фібринових згустків, так і антикоагулянтні, які стримують надмірну продукцію фібрину [1]. Коли тромбін функціонує як антикоагулянт, його головною мішенню є неактивний профермент протеїн С (ПС), попередник активованого протеїну С (АПС). Тромбін забезпечує конверсію ПС до АПС, здійснюючи його обмежений протеоліз. Окрім тромбіну, ПС може бути активований фактором згортання Ха, позитивним

регулятором цієї реакції є кофактор Va. Для активації ПС важливе значення мають також мембранні фосфоліпіди та інші від'ємно заряджені сполуки [2]. За певних умов конвертація ПС в АПС може здійснюватися плазміном чи безпосередньо самим АПС за механізмом автоактивації [3, 4].

У судинному руслі утворення АПС тромбіном відбувається переважно на поверхні ендотеліальних клітин, де локалізовані інші ключові кофактори системи активації ПС, а саме тромбомодулін та ендотеліальний рецептор протеїну С (ЕРПС). Проте тромбомодулін було виявлено й на поверхні клітин крові, зокрема моноцитів та тромбоцитів [5, 6]. Ці клітини затримуються у сітці фібрину при формуванні повноцінного тромбу та контактують з тромбіном і ПС, інкорпорованими

в об'ємі фібринового згустку. Отже, тромбоутворення створює передумови для запуску механізму активації ПС *in situ*. Однак нині існування та ефективність цього механізму абсолютно не досліджені.

Фібрин, що утворюється тромбіном під час формування кров'яного згустку, ініціює роботу системи фібринолізу, виступаючи кофактором так званого тричленного активаторного комплексу. Подібне комплексоутворення забезпечує високоспецифічну активацію проензиму плазміногену тканинним активатором плазміногену на поверхні фібрину. При цьому утворюється протеолітичний ензим плазмін, фізіологічним субстратом якого є саме фібрин. Розщеплюючи його, плазмін забезпечує протеолітичну деградацію фібринових згустків і кров'яних тромбів, зокрема. У досліджах з розчинами очищених білків було показано здатність плазміну активувати ПС через обмежений протеоліз [3]. Проте, чи має ця властивість плазміну певне значення для активації ПС в об'ємі тромбу, наразі невідомо.

Мета роботи – вивчити можливість активації ПС в ізолюваному об'ємі тромбу за ендотелійнезалежним механізмом, а саме в процесі тромбоутворення та наступного тромболізу згустків, отриманих *in vitro* з цільної крові.

МЕТОДИКА

Тромбоутворення та тромболізис кров'яного згустку досліджували таким чином. Безпосередньо перед проведенням досліду в пробірку або лунку планшета вносили 20 мкл тканинного активатора плазміногену (кінцева концентрація – 1,68 од/мл) та 20 мкл ПС (кінцева концентрація – 0,268 мкг/мл), а також 10 мкл тромбіну (кінцева концентрація 1 НІН од/мл). Венозну кров людини (без антикоагулянтів) якомога швидше після забору додавали по 0,452 мл в кожен лунку планшета (або пробірку) та струшували декілька разів до утворення згустку. Контролем щодо дії тромбіну були згустки, утворені з аналогічно

підготовлених зразків крові після її спонтанного зсідання на аніонній поверхні скляної пробірки, тобто без додавання тромбіну.

В усіх варіантах дослідів візуально фіксували час утворення повноцінного згустку в момент максимального ущільнення зразка крові, а також час початку лізису за появою рідкої фази (лізату). За лізисом спостерігали протягом доби, після чого переносили згустки, які залишилися, на 5 хв на фільтрувальний папір для зневоднення, а потім зважували.

Під час лізису в момент накопичення 100 мкл рідини відбирали проби, піддавали їх центрифугуванню та зберігали супернатанти протягом кількох діб при -20°C для наступного визначення концентрації вільного ПС. Його проводили після п'ятихвилинної інкубації зразка з нефізіологічним активатором з отрути змії *A. contortrix contortrix*, що дає можливість в подальшому реєструвати кількість ПС, переведеного в активований стан. Для цього застосовували загальноприйнятий метод оцінки амідолітичної активності АПС за його здатністю специфічно гідролізувати хромогенний субстрат S2366 (pGlu-Pro-Arg-pNA) [7]. Деякі інші протеази плазми крові також можуть розщеплювати S2366, забезпечуючи так звану фонову амідолітичну активність зразків. Крім того, зростання цієї активності може бути індикатором накопичення АПС у результаті фізіологічної активації проензиму ПС. Тому кожний зразок досліджували, паралельно оцінюючи його фонову та ПС-залежну амідолітичну активність, індуковану нефізіологічним активатором. Згідно з методикою, реєстрували зміни оптичної густини D (в одиницях оптичної густини) на довжині хвилі 405 нм для розчину пара-нітроаніліну, який утворювався протягом 5 хв в об'ємі реакційного середовища 130 мкл. Отже, кількість вільного ПС визначали за різницею швидкостей гідролізу хромогенного субстрату за наявності активатора в зразку та без нього.

Результати обробляли загальноприйнятими статистичними методами за допомогою

прикладних пакетів програм Excel 97 та Origin. Відмінності між окремими варіантами вважали статистично значущими при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Як відомо, тромбін здійснює пряму ініціацію коагуляційного каскаду із залученням загальної ланки внутрішнього та зовнішнього шляхів згортання [8]. У наших досліджах екзогенний тромбін з активністю 1 НН од/мл забезпечував швидке (протягом 1-ї хвилини) згортання цільної крові та утворення міцних згустків. Зразки крові без додавання тромбіну також утворювали згусток, але протягом 5–10 хв. Як відомо, спонтанне згортання крові здійснюється завдяки уповільненому фібриноутворенню, що регулюється поступовим накопиченням ендogenous тромбіну. За його продукцію відповідає каскадна система білків внутрішнього шляху згортання, початкові стадії якої чутливі до контактної активації аніонною поверхнею. В цій системі є дві мішені, на які спрямована антикоагулянтна активність АПС. Це теназний і протромбіназний комплекси. Натомість тромбоутворення, спричинене екзогенним тромбіном, не підпадає під антикоагулянтну дію АПС.

Під час дослідів було виявлено здатність

всіх штучно утворених згустків крові до лізису, як спонтанного (рис. 1, варіанти 1, 3, 5 і 7), так і стимульованого екзогенним тканинним активатором плазміногену (див. рис. 1, варіанти 2, 4, 6 і 8). Треба відзначити, що тканинний активатор плазміногену більш ефективно прискорював лізис згустків, утворених тромбіном, ніж сформованих контактною активацією: маса згустків у варіанті 6 зменшувалася на 24-ту годину лізису відносно варіанта 5 на 54 %, а у варіанті 2 відносно варіанта 1 – лише на 24 % (див. рис. 1).

Візуальні спостереження за динамікою тромболізу та кінцева маса згустків на 24-ту годину лізису (див. рис. 1) свідчили про значне прискорення деградації згустків екзогенним ПС. Його додавання як окремо, так і в поєднанні з тканинним активатором плазміногену призводило до значної деградації згустків, утворених тромбіном: остаточна маса згустку у варіанті 7 становила лише 18 % відносно варіанту 5, де ПС не додавали. Поєднання ПС і тканинного активатора плазміногену зумовило майже повний лізис, в результаті маса деградованих згустків у варіанті 8 зменшувалася приблизно до 5 % відносно варіанту 5. Ще суттєвішим був стимулювальний вплив ПС на швидкість лізису згустків, сформованих спонтанно, що призводило до повної їх деградації (варіанти 3 і 4).

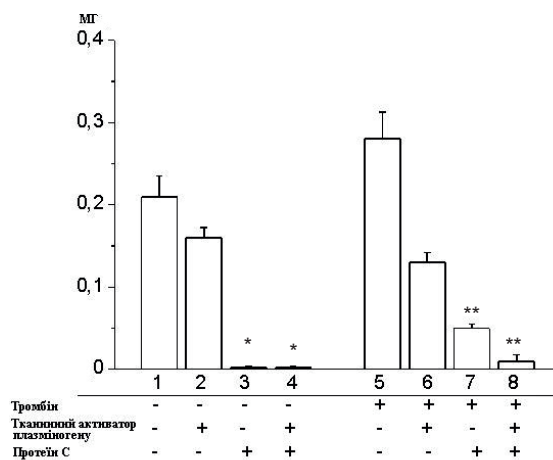


Рис.1. Маса деградованих згустків крові (n=5) через 24 год від ініціації зсідання. Варіанти 1-4 – спонтанно утворені згустки, 5-8 – згустки, утворені екзогенним тромбіном. * $P < 0,05$ – відносно варіанту 1; ** $P < 0,05$ – відносно варіанту 5

Слід зазначити, що ПС не проявляє будь-якої самостійної протеолітичної активності, оскільки є неактивним попередником ферменту АПС. Перевірка спонтанної амідолітичної чи клотингової активності препарату протеїну С, який було використано у дослідах, показала повну відсутність слідів АПС. Отже, виявлене нами прискорення тромболізу, спричинене додаванням ПС, може бути функціональним тестом, який опосередковано вказує на його залучення до реакції активації в процесі тромбоутворення чи тромболізу. Новоутворений АПС здатен стимулювати тромболізис як антикоагулянт, змінюючи структуру фібринового згустку в процесі тромбоутворення [9] або як профібринолітик, знижуючи активність інгібіторів фібринолізу, що прискорює тромболізис [10, 11]. Ймовірно, тромболітичний ефект ПС відносно згустків, утворених спонтанно, зумовлений поєднанням його профібринолітичної та антикоагулянтної дії. Натомість застосування екзогенного тромбіну для згортання крові значно обмежує антикоагулянтну функцію ПС внаслідок швидкого утворення згустків та сприяє його профібринолітичній дії.

Виявлення функціональної активності, притаманної для АПС, у зразках з екзогенним ПС є непрямим доказом його активації в про-

цесі тромбоутворення та тромболізу. Прямим доказом конверсії ПС в АПС, вочевидь, має бути зменшення кількості проензиму в об'ємі зразка з одночасним наростанням кількості його ензимної форми, про що свідчать зміни амідолітичної активності лізатів (рис. 2).

Представлені на рис. 2 результати визначення індукованої та фонові амідолітичної активності лізатів свідчать, що на початку лізису в усіх контрольних і дослідних варіантах фонові активності були несуттєвою (навіть у варіантах із додаванням тромбіну). Індукована активність, яка відображує кількість вільного ПС, знижувалася відносно відповідних контрольних значень (варіанти 1 та 3) в усіх варіантах з додаванням тканинного активатора плазміногену і тромбіну. А саме інкорпорування екзогенного тканинного активатора плазміногену до згустків, утворених спонтанно, призводило до зникнення 83 % індукованої активності ендogenous ПС у варіанті 2 відносно варіанту 1 та 74 % сумарного ПС (ендогенний та екзогенний) у варіанті 4 відносно варіанту 3. Якщо до плазми додавали лише тромбін і не вносили інших білків (варіант 5), також спостерігали зниження кількості ендogenous ПС: вона зменшувалася на 53 % відносно контрольного варіанту 1. Екзогенний тканинний актива-

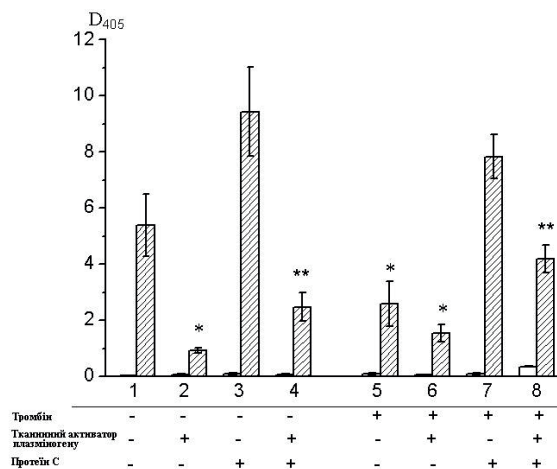


Рис.2. Фонова (білі стовпці) та індукована (смугасті стовпці) амідолітична активність лізатів на початку лізису. Варіанти 1-4 – спонтанно утворені згустки, 5-8 – згустки, утворені екзогенним тромбіном. * P<0,05 – відносно варіанту 1, ** P<0,05 – відносно варіанту 3

тор плазміногену у варіанті 6 підсилював ефект зниження кількості ендогенного ПС тромбіном ще на 19 %, а загальне зниження становило 72 %.

Слід зазначити, що внесення екзогенного ПС у варіанті 3 в кількості, що дорівнювала 6,5 % від його концентрації в плазмі, призвело до додаткового збільшення індукованої амідолітичної активності у лізатах на 75 % відносно варіанта 1. У лізатах згустків, утворених тромбіном, у варіанті 7 кількість сумарного ПС знижувалась лише на 17 % порівняно з варіантом 3, в якому тромбін не додавався; втім після інкорпорування в згусток тканинного активатора плазміногену (варіант 8) в лізатах залишалось всього 44 % ПС від його кількості у варіанті 3.

Як уже відмічалось, зростання фонові амідолітичної активності (як індикатора накопичення АПС) наразі було незначним порівняно з індукованою активністю. Ймовірно, новоутворений АПС швидко інактивується потужним інгібіторним потенціалом крові. Зокрема, АПС можуть нейтралізувати такі інгібітори тромбоцитарного походження, як РАІ-1 та нексин 1 [10]. У нативній плазмі крові АПС зв'язується також з α_2 -макроглобуліном та α_2 -антиплазміном [11]. Як відомо, саме здатність АПС незворотно

зв'язувати інгібітори фібринолізу зумовлює його профібринолітичну дію.

Виявлені в процесі тромболізу зміни кількості ПС у лізатах свідчать про більш суттєве витрачання проферменту за умов стимуляції системи фібринолізу екзогенним тканинним активатором плазміногену, що зумовлює більш потужну продукцію плазміну. За даними літератури, тромбін, внесений у плазму чи незмінену кров повністю інактивується інгібіторами плазми протягом 20–30 хв [12, 13]. Тому максимальна здатність екзогенного тромбіну до активації ПС має обмежуватися часом утворення і стабілізації тромбу. В нашому експерименті лізис утворених тромбіном згустків крові починався не раніше ніж через 2 год від моменту згортання. Отже, активаторна дія тромбіну під час тромбоутворення мала знижувати вміст ПС у лізатах лише на початковій стадії лізису, надалі не впливаючи на його кількість. Втім, як видно з рис. 3, протягом наступних 10 год руйнації згустків вміст ПС у лізатах поступово знижувався, що вказує на певний зв'язок між системами плазміноген/плазміну та активації ПС.

Отже, зміни вмісту ПС в об'ємі ізольованого згустку мають контролюватись тромбіном на стадії тромбоутворення та системою фібринолізу на стадії тромболізу.

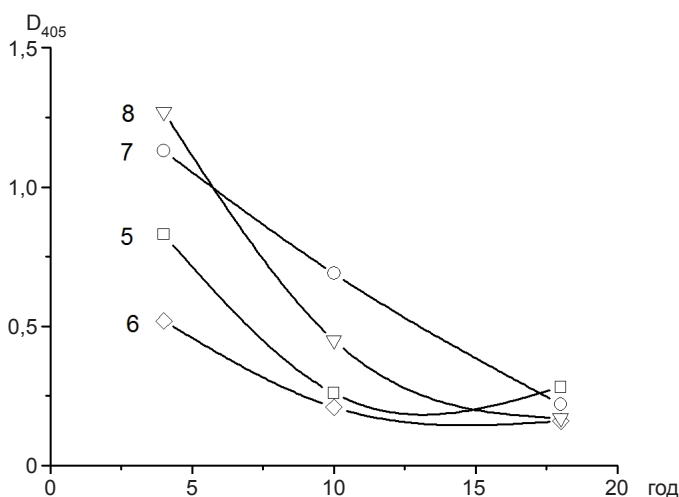


Рис.3. Зміни індукованої амідолітичної активності в процесі деградації згустків, утворених тромбіном з крові: 5 – без внесення інших білків; 6 – внесення тканинного активатора плазміногену; 7 – внесення протеїну С; 8 – внесення тканинного активатора плазміногену разом із протеїном С

Аналізуючи можливі причини змін вмісту ПС у розчинній фазі в процесі тромболізу, не можна відкидати можливість його фізичного утримування в об'ємі недеградованої частини згустку. При цьому в рідкому оточенні менш деградованих згустків мала виявлятися менша кількість ПС. Щоб перевірити зв'язок між масою деградованого згустку та кількістю вивільненого ПС, згустки переносили в 0,5 мл робочого буфера через годину після ініціації тромболізу та продовжували відслідковувати кількісні зміни вільного ПС в процесі деградації згустків. З'ясувалося, що дійсно існує зворотний зв'язок між масою згустків та вмісту в них індукційного ПС під час активного лізису (рис.4).

Однак ця залежність має квазілінійний характер лише для варіантів, де не вносили тканинний активатор плазміногену (див. рис. 4, 1). Поряд з цим тканинний активатор плазміногену, інкорпорований в об'єм згустку, сприяв більш ефективному його розчиненню та суттєво зменшував вміст ПС в лізаті (див. рис. 4, 2). Про це свідчить зміщення кривої 2 вниз та вліво відносно кривої 1. Напевне, це зниження вмісту ПС зумовлене не лише його фізичною затримкою в об'ємі згустків, а й незворотним перетворенням у певних

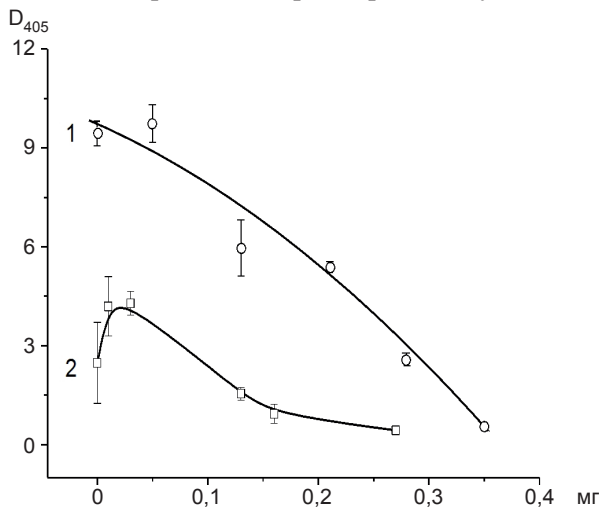


Рис.4. Залежність між індукційною амідолітичною активністю ПСа та розміром згустків: 1 – спонтанний лізис, 2 – лізис, індукований тканинним активатором плазміногену (n=3)

біохімічних взаємодіях. Ці результати дають змогу припустити, що тканинний активатор плазміногену регулює механізм залучення проферменту ПС до процесу тромболізу. Проте, тромбін в умовах нашого експерименту не відіграє ключової ролі в метаболічних перетвореннях ПС, а виконує лише функцію ущільнення та зміцнення згустку, що сприяє концентруванню та утриманню неактивного проферменту в його об'ємі. Можливо, залучення ПС у біохімічні взаємодії з тромбіном маскується більш вираженим ефектом фізичного утримання, залежного від стабільності згустку.

На підставі отриманих результатів нами сформульовано гіпотезу про існування ендотелійнезалежного шляху активації протеїну С у плазмі крові за участі клітин крові, ефективність якого підвищується в процесі тромболізу. Біохімічний механізм подібного способу активації ПС залишається нез'ясованим, що спонукає на продовження наукового пошуку.

**І.І. Паталах, С.А. Таланов, О.В. Ревка,
Т.Ф. Дроботько**

АКТИВАЦИЯ ПРОТЕИНА С В ПРОЦЕССЕ ТРОМБОЛИЗИСА *IN VITRO*

В опытах *in vitro* были воспроизведены физиологические условия формирования и последующего лизиса кровяного тромба. Тромбообразование инициировали тромбином либо контактом крови с анионной поверхностью, стимулирующей спонтанное свертывание. В образец крови предварительно добавляли тканевой активатор плазминогена или/и протеин С. Контролировали время начала и полной деградации сформированных тромбов, а также изменение содержания протеина С в лизатах. Установлено, что только добавление протеина С, как отдельно, так и в сочетании с тканевым активатором плазминогена приводило к наиболее эффективному лизису тромбов: их остаточная масса составляла соответственно 18 % и 5 % относительно контроля. Препарат тканевого активатора плазминогена при отдельном внесении либо в сочетании с протеином С приводил к снижению содержания протеина С в лизатах сгустков крови, образованных спонтанно, на 83 % и 74 %, соответственно. В лизатах сгустков, образованных тромбином, это снижение составляло, соответственно, 72 % и 56 %. Без добавления тканевого активатора плазминогена лизаты сгустков, образованных тромбином, содержали протеина С на 54 % меньше, чем те, что были сформированы спонтанно. Таким образом, изменение содержания протеина С в изолированном объе-

ме тромба должно контролироваться тромбином на стадии тромбообразования и системой фибринолиза – на стадии тромболитического. Содержание протеина С в лизатах сгустков, образованных экзогенным тромбином, постепенно снижалось в течение последующих 10 час тромболитического, что дополнительно свидетельствует о взаимодействии систем фибринолиза и активации протеина С. Сформулирована гипотеза о существовании в плазме с участием клеток крови эндотелийнезависимого механизма активации протеина С, эффективность которого повышается в процессе тромболитического.

Ключевые слова: протеин С; активация; тромбин; тканевой активатор плазминогена; тромбообразование; тромболитический; моделирование.

I.I. Patalakh, S.A.Talanov, O.V. Revka, T.F. Drobotko

ACTIVATION OF PROTEIN C IN THE IN VITRO THROMBOLYSIS

Physiological conditions of formation and subsequent lysis of thrombus were reconstituted *in vitro* in our research. Thrombus formation was initiated either by addition of exogenous thrombin or by contact of blood with anionic surface, which stimulates spontaneous coagulation of blood. Tissue plasminogen activator and/or protein C were previously added in the blood sample. The time of the beginning and total degradation of formed thrombi as well as the level of PC in lysates was controlled then. Only an addition of protein C alone or in combination with tissue plasminogen activator led to the most effective lysis of thrombi: their residual weight was 18% and 5% comparing to control. Addition of exogenous tissue plasminogen activator alone or in combination with protein C caused a 83% and 74% decrease of PC level in lysates of spontaneously formed thrombi, and 72% and 56% decrease for thrombi formed by thrombin, respectively. Without an addition of tissue plasminogen activator protein C level in lysates of thrombi formed by thrombin was 54% down on spontaneously formed thrombi. Thus, changes of PC concentration in isolated volume of clot seem to be controlled by thrombin at the stage of thrombus formation and by fibrinolytic system at the stage of fibrinolysis. Concentration of PC in lysates from clots formed by exogenous thrombin was decreasing over the next 10 hours of thrombolysis, which can also be the evidence of the interaction between the fibrinolytic and PC activation systems. A hypothesis is formulated about an existence of endothelium-independent mechanism of PC activation in blood plasma with blood cells participation, which effectiveness increases in the process of thrombolysis.

Key words: protein C; activation; thrombin; tissue plasminogen activator; thrombus formation; thrombolysis; modeling.

Palladin Institute of biochemistry National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

REFERENCES

1. Di Cera E. Thrombin as procoagulant and anticoagulant. *J Thromb Haemost* 2007;5(Suppl. 1):196-202.
2. Rezaie A.R. Rapid Activation of Protein C by Factor Xa and Thrombin in the Presence of Polyanionic Compounds. *Blood*. 1998;91(12):4572-80.
3. Varadi K., Philapitsch A., Santa T., Schwarz H.P. Activation and inactivation of human protein C by plasmin. *Thromb Haemost* 1994;71(5):615-21.
4. Hassouna H., Quinn C. Proteolysis of protein C in pooled normal plasma and purified protein C by activated protein C (APC). *Biophys Chem*. 2002;95(2):109-24.
5. McCachren S.S., Diggs J., Weinberg J.B., Dittman W.A. Thrombomodulin expression by human blood monocytes and by human synovial tissue lining macrophages. *Blood*. 1991;78:3128-32.
6. Suzuki K., Nishioka J., Hayashi T., Kosaka Y. Functionally active thrombomodulin is present in human platelets. *J Biochem*. 1988;104:628-63.
7. Takahashi H., Hanano M., Tatewaki W., Shibata A. Fast functional assay of protein C in whole plasma using a snake venom activator: evaluation in patients with congenital and acquired protein C deficiencies. *Clin Chim Acta*. 1988;175(3):217-25.
8. Anand M., Rajagopal K., Rajagopal K.R. A model for the formation, growth, and lysis of clots in quiescent plasma. A comparison between the effects of antithrombin III deficiency and protein C deficiency. *J Theor Biol*. 2008;253:725-38.
9. Gruber A., Mori E., del Zoppo G.J., Waxman L., Griffin J.H. Alteration of fibrin network by activated protein C. *Blood*. 1994;83(9):2541-48.
10. Wohner N. Role of cellular elements in thrombus formation and dissolution. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. 2008;6(3):224-28.
11. Heeb M.J., Gruber A., Griffin J.H. Identification of divalent metal ion-dependent inhibition of activated protein C by alpha 2-macroglobulin and alpha 2-antiplasmin in blood and comparisons to inhibition of factor Xa, thrombin, and plasmin. *J Bio. Chem*. 1991;266(26):17606-12.
12. Varin R., Mirshahi S., Mirshahi P., Klein C., Jamshedov J., Chidiac J., Perzborn E., Mirshahi M., Soria C., Soria J. Whole blood clots are more resistant to lysis than plasma clots - greater efficacy of rivaroxaban. *Thromb Res*. 2013;131:e100-e109.
13. Hemker H. C., Giesen P. L. A., Ramjee M., Wagenvoort R., Beguin S. The Thrombogram: Monitoring Thrombin Generation in Platelet Rich Plasma. *Thromb Haemost*. 2000;83:589-91.

Матеріал надійшов до редакції 30.09.2015