

РОЛЬ ГЕПАРИНА В ПРОЦЕССЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ ИНАКТИВАЦИИ α -ТРОМБИНА

О. А. Семенова

Институт экспериментальной кардиологии (директор — акад. АМН СССР, чл.-корр. АН СССР проф. В. Н. Смирнов) Всесоюзного кардиологического научного центра АМН СССР

Гепарин как сильный и быстро действующий антикоагулянт нашел широкое применение в клинической практике. Этот препарат используется для лечения и профилактики тромбоэмболических осложнений самой различной локализации и этиологии. Гепаринотерапия успешно проводится при тромбгеморрагическом синдроме, инфаркте миокарда, хронической ишемической болезни сердца, атеросклерозе и других заболеваниях [1]. Установлено, что антикоагулянтные свойства гепарина в значительной степени определяются его способностью резко ускорять инактивацию α -тромбина и других ферментов системы свертывания крови антитромбином-ингибитором, присутствующим в плазме [38, 39, 47]. Выяснение вопроса о механизме действия гепарина в этих реакциях представляется существенным для совершенствования методов профилактики и лечения тромбгеморрагических состояний с помощью указанного антикоагулянта.

Целью данного обзора было обобщение полученных к настоящему времени данных о молекулярном механизме физиологической инактивации α -тромбина, протекающей при участии гепарина.

Одним из важнейших физиологических механизмов предотвращения тромбозов является инактивация ферментов системы свертывания крови, в частности α -тромбина, в кровеносном русле. Частичная нейтрализация активности α -тромбина обеспечивается его адсорбцией сгустком фибрина [2, 43], однако основная антитромбиновая активность крови обусловлена присутствием в плазме специфических белков, способных связывать α -тромбин и другие протеазы, что вызывает их инактивацию [27, 43].

Установлено, что основным ингибитором α -тромбина в плазме является анти-тромбин¹ [10, 43], представляющий собой одноцепочечный гликопротеин с молекулярной массой около 58000 [20, 28]. Его концентрация в плазме в норме составляет 190—300 мг/л или 3—5 мкмоль/л [43]. По данным Розенберга и Дамуса (1973), анти-тромбин нейтрализует активность α -тромбина путем образования с этим ферментом эквимольного стехиометрического комплекса. В основе данной реакции лежит специфическое взаимодействие серина — активного центра фермента и аргинина — «реактивного центра» ингибитора. Согласно Оуэну (1977), в процессе инактивации между α -тромбином и антитромбином образуется ковалентная, по-видимому, ацильная связь.

Гепарин² значительно ускоряет инактивацию α -тромбина, не оказывая при этом влияния на стехиометрию комплекса фермент-ингибитор и природу образующейся между белками связи [39].

Розенберг и соавт. (1973, 1977) установили, что остатки лизина в молекуле анти-тромбина принимают непосредственное участие в связывании гепарина. Хотя химическая модификация этих остатков не отражалась на способности анти-тромбина к взаимодействию с α -тромбином, скорость инактивации фермента модифицированным ингибитором в присутствии гепарина не возрастала. На основании этих данных авторы предположили, что избирательное связывание гепарина с остатками лизина анти-тромбина вызывает в молекуле последнего конформационный сдвиг, способствующий более благоприятному расположению реактивного центра, что в конечном счете приводит к ускорению взаимодействия ингибитора с ферментом.

Данная гипотеза получила ряд экспериментальных подтверждений. Как известно, препараты гепарина неоднородны и представляют собой смесь молекул, отличающихся по молекулярной массе [16, 22], химической структуре [8, 9, 15] и антикоагулянтной активности [7, 22]. Препараты гепарина, применяемые в нашей стране (производства

¹ Другие названия: анти-тромбин II, анти-тромбин III, α_2 -анти-тромбин, анти-тромбин-кофактор гепарина, кофактор гепарина, ингибитор фактора Ха [6, 44а, б].

² Этот антикоагулянт, обнаруженный в тучных клетках ряда тканей, по химической природе является гликозаминогликаном [2]. Мы не будем останавливаться на его химической структуре, так как она неоднократно рассматривалась ранее [2, 16, 40].

Минска, Каунаса, Баку, ВНР и ЧССР) неомогенны по молекулярной массе. В отдельных препаратах содержится относительно большая доза низкомолекулярных фракций гепарина [4]. Эксперименты, основанные на использовании способности гепарина специфически связываться с антитромбином, позволили разделить гетерогенные препараты гепарина на две фракции [5, 13, 21]. Фракция, обладающая способностью связываться с антитромбином с высоким средством, составляла приблизительно $\frac{1}{3}$ от массы исходного препарата и содержала около 90% его антикоагулянтной активности (так называемый высокоактивный гепарин). Остальная часть исходного материала была практически лишена способности связываться с антитромбином и имела низкую активность (низкоактивный гепарин). Корреляция антикоагулянтной активности гепарина с его способностью связывать антитромбин свидетельствует о существенной роли взаимодействия ингибитора с гепарином в процессе инактивации α -тромбина. В последующих экспериментах, включающих химическую или ферментативную деградацию высокоактивного гепарина [23, 56, 57], были выделены углеводные фрагменты, представляющие собой, по мнению авторов [14, 41, 42], участки связывания антитромбина. Оказалось, что для осуществления специфического связывания этого ингибитора гепарином необходима определенная последовательность моносахаридных единиц, отдельные структурные компоненты которой были идентифицированы [24, 25, 41, 42]. Следует отметить, что наименьший фрагмент молекулы гепарина, сохраняющий способность ускорять взаимодействие α -тромбина с антитромбином, образован 14 моносахаридными единицами [34].

В ряде работ [17, 19, 29, 30] было установлено, что высокоактивный гепарин с молекулярной массой от 6000 до 35000 образует с антитромбином эквимольный стехиометрический комплекс с константой диссоциации 10^{-7} — 10^{-8} М. Согласно данным адсорбционной и флуоресцентной спектроскопии [17, 29, 30, 32, 33], при взаимодействии гепарина с антитромбином в молекуле последнего происходит конформационный сдвиг. Взаимодействие гепарина с α -тромбином может играть существенную роль в процессе инактивации фермента.

Итак, гепарин способен с высоким средством связываться как с α -тромбином, так и с антитромбином, что приводит к появлению двух альтернативных гипотез механизма действия указанного антикоагулянта в реакции инактивации α -тромбина. С учетом данных, согласно которым связывание гепарина как с антитромбином, так и с α -тромбином существенно для увеличения скорости инактивации фермента [39], Померантэ и Оуэн (1978) предположили, что в процессе инактивации фермент и ингибитор одновременно связываются с одной молекулой гепарина; это ускоряет их взаимодействие. Группа авторов, анализируя зависимость антикоагулянтной активности гепарина от его молекулярной массы, заключила, что для достижения максимальной скорости инактивации α -тромбина необходимо связывание молекулы фермента со свободным участком полисахаридной цепи гепарина рядом с молекулой ингибитора [23, 45]. На основании этих данных Холмер и соавт. (1979) выдвинули следующую гипотезу механизма действия гепарина в реакции инактивации α -тромбина. Первоначально антитромбин связывается со специфическим участком в молекуле гепарина, что вызывает конформационный переход, способствующий ускорению взаимодействия ингибитора с α -тромбином. Затем свободный участок полисахаридной цепи гепарина связывает молекулу α -тромбина, которая на следующем этапе процесса инактивируется ранее связавшимся ингибитором. Взаимодействие α -тромбина со свободной молекулой гепарина замедляет инактивацию, поскольку это явление препятствует связыванию фермента с молекулой гепарина, уже вступившей в комплекс с антитромбином [17, 18].

В некоторых работах [11, 17, 40] отмечается существенная особенность, характеризующая механизм влияния гепарина на скорость инактивации α -тромбина, а именно «каталитический» характер действия этого антикоагулянта, заключающийся в том, что для увеличения скорости взаимодействия α -тромбина с антитромбином вплоть до максимальных значений достаточно присутствие гепарина в молярной концентрации, значительно более низкой, чем концентрации реагирующих белков. Как было установлено Йорданом и др. (1979), данное явление обусловлено тем, что после образования стабильного комплекса α -тромбина с антитромбином молекула гепарина диссоциирует и способна вновь связаться со свободным ингибитором. Следовательно, одна молекула гепарина может последовательно ускорять взаимодействие многих пар молекул α -тромбина и антитромбина. Этому процессу в значительной степени способствует то, что средство гепарина к стабильному комплексу фермент-ингибитор существенно ниже, чем к свободному антитромбину [11, 17].

В заключение необходимо отметить, что мы рассмотрели механизм действия гепарина лишь в одной из гемостатических реакций, осуществляемых при его участии. Однако антикоагулянтный эффект, наблюдаемый при взаимодействии гепарина с плазмой крови, обусловлен целым рядом процессов: ускорением инактивации антитромбином наряду с α -тромбином факторов Ха [47], IXa, XIa, XIIa [38], ингибированием активации факторов X и протромбина, вызванным нарушением связывания факторов свертывания с поверхностью фосфолипидов [31, 46], и, наконец, образованием комплексов с целым рядом белков плазмы, что препятствует свертыванию фибриногена и создает фон неферментативной фибринолитической активности [3]. Некоторые полученные к настоящему времени данные [5, 45, 46] позволяют заключить, что структур-

ные характеристики, обеспечивающие активное функционирование гепарина в различных гемостатических реакциях, осуществляемых при его участии, неодинаковы. Более того, гомогенная фракция гепарина, обладающая определенной химической структурой, по-видимому, не может служить полноценным аналогом природного материала в обеспечении всех многообразных аспектов его антикоагулянтного действия [45].

ЛИТЕРАТУРА

1. Грицюк А. И. Клиническое применение гепарина. Киев, Здоров'я, 1981.—
2. Зубаиров Д. М. Биохимия свертывания крови. М., Медицина, 1978.—
3. Кудряшов Б. А. Биологические проблемы регуляции жидкого состояния крови и ее свертывания. М., Медицина, 1975.—
4. Ченборисова Г. Ш., Киселев А. О. Казанский мед. ж., 1982, 3.—
5. Andersson L.-O., Barrowcliff T. W., Holmer E. a. o. *Thromb. Res.*, 1976, 9, 6.—
6. Chang T.-L., Feiman R. D., Landis B. H., Fenton J. W. *Biochemistry*, 1979, 18, 1.—
7. Cifonelli J. A. In: *Heparin—Structure, Function and Clinical Implications*. New York—London, Plenum Press, 1975.—
8. Cifonelli J. A., King J., *Biochim. Biophys. Acta*, 1973, 320, 2.—
9. Danishefsky I., Steiner H., Bella A., Friedlander A. J. *biol. Chem.*, 1969, 244, 7.—
10. Downing M. R., Bloom J. W., Mann K. G. *Biochemistry*, 1978, 17, 13.—
11. Feinman R. D. In: *The Physiological Inhibitors of Coagulation and Fibrinolysis*. Elsevier, North-Holland Biomed. Press, 1979.—
12. Holmer E., Söderström G., Andersson L.-O. J. *Biochem.*, 1979, 93, 1.—
13. Höök M., Björk I., Nopwood J., Lindahl U. *FEBS Lett.*, 1976, 66, 1.—
14. Hopwood J., Höök M., Linker A., Lindahl U. *Ibid.* 1976, 69, 1.—
15. Hovingh P., Linker A. J. *biol. Chem.*, 1970, 245, 22.—
16. Jeanlos R. W. In: *Heparin—Structure, Function and Clinical Implications*. New York—London, Plenum Press, 1975.—
17. Jordan R. E., Beeler D., Rosenberg R. J. *biol. Chem.*, 1979, 254, 8.—
18. Jordan R. E., Oosta G. M., Cardner W. T., Rosenberg R. D. J. *biol. Chem.*, 1980, 255, 21.—
19. Jordan R. E., Favreau L. V., Braswell E. H., Rosenberg R. D. *Ibid.*, 1982, 257, 1.—
20. Kurachi K., Shmer G., Hermodson M. A. a. o. *Biochemistry*, 1976, 15, 2.—
21. Lam L. H., Silbert J. E., Rosenberg R. D. *Biophys. Res. Commun.*, 1976, 69, 2.—
22. Laurent T. C. *Arch. Biochem. biophys.*, 1961, 92, 2.—
23. Laurent T. C., Tengblad A., Thunberg L. a. o. *Biochem. J.*, 1978, 175, 2.—
24. Lindahl U., Bäckström G., Höök M. a. o. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, 76, 7.—
25. Lindahl U., Bäckström G., Thunberg L. a. o. *Ibid.*, 1980, 77, 11.—
26. Machovich R. *Biochim. biophys. Acta*, 1975, 412, 1.—
27. Machovich R., Borsodi A., Blasko G., Orakzai S. A. *Biochem. J.* 1977, 167, 2.—
28. Hordenman B., Nyström C., Björk I. *Eur. J. Biochem.*, 1977, 78, 1.—
29. Nordenman B., Björk I. *Biochemistry*, 1978, 17, 16.—
30. Nordenman B., Danielsson A., Björk I. *Eur. J. Biochem.*, 1978, 90, 1.—
31. Ofosu F. A., Modi G., Cerskus A. L. a. o. *Thromb. Res.*, 1982, 28, 4.—
32. Olson S. T., Shore J. D. J. *Biol. Chem.*, 1981, 256, 21.—
33. Olson S. T., Srinivasan K. R., Björk I., Shore J. D. *Ibid.*—
34. Oosta G. M., Gardner W. T., Beeler D. L., Rosenberg R. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, 78, 2.—
35. Owen W. G. *Biochim. biophys. Acta*, 1977, 494, 1.—
36. Pomerantz M. W., Owen W. G. *Ibid.*, 1978, 535, 1.—
37. Radoff S., Danishefsky I. *Arch. Biochem. biophys.*, 1982, 215, 1.—
38. Rosenberg R. D. *Fed. Proc.*, 1977, 36, 1.—
39. Rosenberg R. D., Damus P. S. J. *biol. Chem.*, 1973, 248, 18.—
40. Rosenberg R. D., Jordan R. E. In: *Chemistry and Biology of Thrombin*. Ann. Arbor. Sci. Publ., 1977.—
41. Rosenberg R. D., Armand G., Lam L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978, 75, 7.—
42. Rosenberg R. D., Lam L. *Ibid.* 1979, 76, 3.—
43. Shapiro S. S., Anderson D. B. In: *Chemistry and Biology of Thrombin*. Ann. Arbor. Sci. Publ., 1977.—
44. Smith G. F. a) *Ibid.*; b) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1977, 77, 1.—
45. Thunberg L., Lindahl U., Tengblad A. a. o. *Biochem. J.*, 1979, 181, 1.—
46. Walker F. J., Esmon C. T. *Thromb. Res.*, 1979, 14, 1.—
47. Yin E. T., Wessler S., Stoll P. J. J. *biol. Chem.*, 1971, 246, 11.

Поступила 10 сентября 1984 г.

ОБМЕН ОПЫТОМ И АННОТАЦИИ

УДК 614.2

З. С. Садыков (Казань). Опыт улучшения охраны здоровья трудовых коллективов

Важным и наиболее информативным критерием здоровья трудовых коллективов является заболеваемость с временной утратой трудоспособности. Как известно, ее уровень и структура зависят от различных по силе и направленности причинно-следственных связей, включающих целый комплекс природно-климатических, социально-