

СИСТЕМА СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ И ЕСТЕСТВЕННЫЕ АНТИКОАГУЛЯНТЫ

Д. М. Зубаиров

*Кафедра биохимии (зав.— академик АН Татарстана, проф. Д. М. Зубаиров)
Казанского ордена Трудового Красного Знамени медицинского института
имени С. В. Курашова*

Свертывание крови — сложный ферментативный процесс, в конце которого плазменный глобулин фибриноген превращается в волокнистый фибрин. Факторы свертывания крови вносят важный вклад в гемостаз. Это видно из того, что нарушения в системе свертывания крови могут вызывать, с одной стороны, кровоточивость, а с другой — тромбозы и эмболии. Кроме гемостатической функции, многие плазменные факторы свертывания крови участвуют и в ряде других реакций, обеспечивающих гомеостаз.

Сейчас общепринята терминология, предложенная Международным комитетом по номенклатуре факторов свертывания крови. В соответствии с его рекомендациями римскими цифрами обозначаются ферменты, белки и ионы кальция в хронологической последовательности их открытия и исследования. Однако вместе с этой номенклатурой применяются и исторически сложившиеся названия (протромбин, тромбин, фибриноген, кальций, тромбопластин). Факторы гемокоагуляции, открытые после тринадцатого, цифрового обозначения не получили. Некоторые характеристики факторов свертывания крови приведены в таблице.

Поскольку свертывание крови является сложным процессом, дидактически оказалось полезным выделение при анализе его внешнего и внутреннего механизмов. Основным критерием для подобного подразделения служит источник липопротеинов, преимущественно участвующих в свертывании. Во внешней активирующей системе таким источником является не кровь, а иные, внешние по отношению к крови мембраны клеток (других тканей), из которых они просачиваются в кровь или, наоборот, кровь проникает к ним. Во внутренней активирующей

системе источником липопротеинов служит сама кровь — ее плазменные элементы, главным образом тромбоцитарный фактор З. Исключение представляют моноциты — носители липопротеинов, принимающих участие во внешней активирующей системе. Кроме того, существуют факторы, общие для внешней и внутренней активирующих систем: фактор V, фактор IX, фактор X, протромбин, фибриноген, Ca^{2+} и фактор XIII.

Внутренняя активирующая система

Последовательность реакций, необходимых для активации фактора X, требует участия факторов VIII—XII, прекалликреина, высокомолекулярного кининогена, фосфолипидов и Ca^{2+} . Схема, ориентирующая в современных представлениях о последовательности процессов, которые ведут к свертыванию крови по внутреннему пути, приведена на рис. 1. Она основана на каскадной гипотезе с включением тромбоцитарных фосфолипидов.

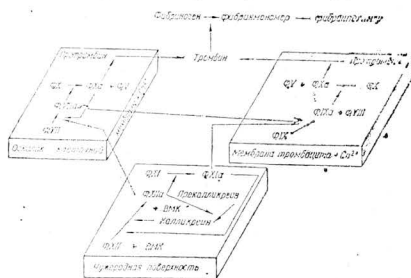


Рис. 1. Блочная схема внутренней и внешней систем образования тромбина.

Начало процесса свертывания крови обеспечивает ее контакт с чужеродной поверхностью, то есть со всякой другой поверхностью, кроме неповрежденного эндотелия сосудов. При контакте происходят адсорбция и активация фактора XII. Человеческий фактор XII — гликопротеин, который

состоит из одной полипептидной цепи, имеющей внутреннюю дисульфидную петлю. Он является проферментом сериновой протеазы, полная активация которой связана с ограниченным протеолизом в пределах дисульфидной петли. В результате гидролиза одной пептидной связи возникает двуцепочечная форма фермента (фактор XIIa), состоящая из полипептидов с молекулярными массами 52000 и 28000 Да (рис. 2). Второй разрыв пептидной связи за пределами дисульфидной петли ведет к отделению от карбоксильного конца молекулы активного фермента с молекулярной массой 28000 Да, обозначаемого как β фактор XIIa. NH_2 -концевой полипептид α фактор XIIa содержит большой участок для связывания с отрицательно заряженными поверхностями, а COOH -концевой полипептид — активный центр фермента. Поэтому α фактор XIIa связывается с отрицательно заряженными поверхностями, а β фактор XIIa — нет.

В принципе механизм протеолитической активации фактора XII весьма сходен с активацией трипсиногена и химотрипсиногена: появляется ионная пара между новообразованными NH_2 -концевым остатком легкой цепи и кар-

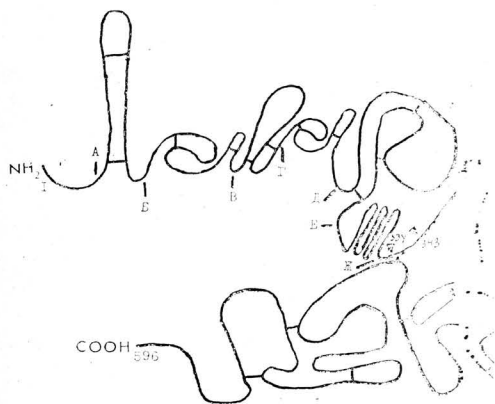


Рис. 2. Модульная структура фактора XII по Леммле. NH_2 -концевая область (1—353) ответственна за связывание с поверхностью. Модули фибронектинового типа II (А—В), эпидермального фактора роста (В—В), фибронектинового типа I (В—Г), эпидермального фактора роста (Г—Д), крингл (Д—Е), участок, обогащенный пролином (Е—Ж). COOH -концевая часть (354—596) — сериновая протеаза. Гидролиз пептидной связи у Арг 353 под действием калликреина или α фактора XIIa (аутокатализ) ведет к образованию α фактора XIIa. Дальнейшее расщепление калликреином пептидной связи у Арг 334 и Арг 343 дает β фактор XIIa.

боксильной группой остатка аспарагиновой кислоты, который находится рядом с серилом активного центра.

Расщепление аналогичных внутренних пептидных связей типично для активации почти всех других проферментов гемокоагуляционного каскада. Превращение фактора XII в двуцепочечную форму происходит в основном под действием калликреина, но может также осуществляться плазмином и фактором XIa [7].

Вопрос об инициальном механизме активации фактора XII при контакте с чужеродными поверхностями остается невыясненным. Если ранее преобладало предположение о конформационном обнажении активного центра, то недавние кинетические исследования с очищенным фактором XII [7] и наши с И. М. Баишевым опыты на цельной плазме крови показали, что наряду с реципрокной активацией калликреином возможна аутоактивация под действием следовой ферментативной активности фактора XII или такого же следового присутствия α фактора XIIa в плазме крови. Кроме того, возможно, что адсорбция дает специфическое неферментативное расщепление с образованием α фактора XIIa. Наконец, высказывается гипотеза, что начальная активация фактора XII представляет собой субстратиндуцированный катализ. По данным Г. А. Яровой активация прекалликреина может иницироваться катептическими протеиназами в местах повреждения тканей.

К числу эффективных поверхностей, обеспечивающих контактную активацию фактора XII, относятся кварц, стекло, каолин, целит, асбест, декстрансульфат, а из физиологических — кожа, коллаген, сульфатиды — составные части клеточных мембран, адреналин, бактериальные липополисахариды. Например, в присутствии декстрансульфата каталитическая эффективность активации увеличивалась для фактора XII в 11000 раз, а для калликреина — в 70 раз. Хотя полные количественные параметры ферментативной активности α фактора XIIa и β фактора XIIa еще не получены, имеющиеся данные свидетельствуют, что они оба являются результативными активаторами прекалликреина, а в процессе активации фактора XI α фактор XIIa по крайней мере в 100 раз более деятелен, чем β фактор XIIa. Кроме

прекалликреина и фактора XI, а фактор XIIa активизирует, хотя и значительно слабее, плазминоген, CI компонент комплемента и фактор VII. Таким образом, даже на самом начальном этапе внутренний и внешний пути свертывания крови соединены.

Протеолитическая активация фактора XII, адсорбированного на чужеродных поверхностях, под действием калликреина, равно как и протеолитическая активация прекалликреина под действием фактора XIIa, усиливается в 10—30 раз высокомолекулярным кининогеном, который, как и фактор XII, в эквимоларных количествах сорбируется на отрицательно заряженных поверхностях.

Высокомолекулярный кининоген, гликопротеин, состоящий из одной полипептидной цепи (см. табл.; рис. 3), выполняет роль кофактора в реакциях контактной активации. В его молекуле, кроме преформированного ва-

Комплекс α фактора XIIa с высокомолекулярным кининогеном на чужеродной поверхности эффективно подвергает ограниченному протеолизу прекалликреин и тем самым переводит его в активную форму. В ходе этой реакции высокомолекулярный кининоген способствует специфическому присоединению к комплексу прекалликреина, а фактор XIIa осуществляет протеолитическую атаку.

Плазменный прекалликреин тоже представляет собой гликопротеин, состоящий из одной полипептидной цепи (см. табл.). Прекалликреин в комплексе с высокомолекулярным кининогеном в плазме крови находится в γ -глобулиновой фракции. По данным гель-фильтрации, в этом комплексе содержится и фактор XII. Расщепление специфической пептидной связи под действием фактора XIIa приводит к образованию фрагментов с молекулярными массами 50000 и 35000 Да,

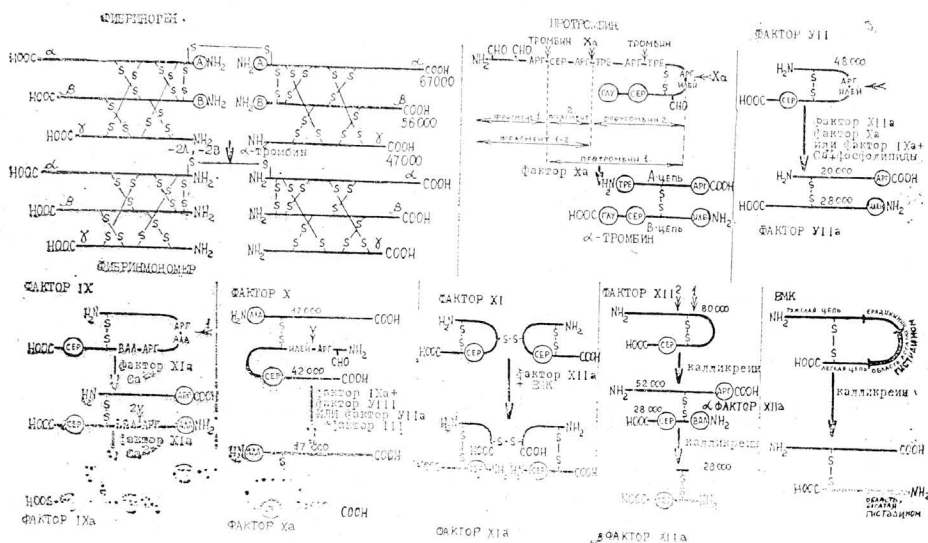


Рис. 3. Схемы строения и превращения некоторых факторов свертывания крови. Объяснения в тексте.

зоактивного пептида брадикинина, имеется весьма необычная последовательность 50 аминокислотных остатков с преобладанием гистидина (30%), глицина (30%) и лизина (10%). Этот участок молекулы с положительным зарядом, очевидно, ответственный за взаимодействие с отрицательно заряженными поверхностями, вместе с COOH-концевой областью молекулы обеспечивает кофакторную активность в процессе контактной активации фактора XII и прекалликреина.

соединенных дисульфидными связями, и к генерации ферментативной активности калликреина. Активный центр этой сериновой протеиназы находится в легкой цепи.

Основные субстраты калликреина — это кининоген и фактор XII, который подвергается реципрокной активации. При врожденном недостатке плазменного прекалликреина (фактора Флетчера) активация фактора XII происходит замедленно, как и свертывание крови по внутреннему пути. Активный

комплекс α фактора XIIa с высокомолекулярным кининогеном помимо взаимодействия с прекалликреином активрует фактор XI, представляющий собой конечное звено в контактной фазе свертывания крови.

Фактор XI, выделенный из плазмы крови человека, является гликопротеином (см. табл.), состоящим из двух похожих или идентичных полипептидных цепей с молекулярными массами 83000 Да, соединенных дисульфидными мостиками. При активации комплексом α фактора XIIa с высокомолекулярным кининогеном на чужеродной поверхности общая масса фактора XI не меняется, но обе цепи расщепляются на фрагменты с молекулярными массами 48000 и 33000 Да (рис. 3). Следовательно, активация происходит путем ограниченного протеолиза. Адсорбции фактора XI на отрицательно заряженных поверхностях, видимо, способствует его положительный заряд, обусловленный большой пропорцией основных аминокислот. Кроме того, как и в случае с прекалликреином, взаимодействию с α фактором XIIa стерически содействует высокомолекулярный кининоген, на молекуле которого, вероятно, располагается комплементарный участок для связывания тяжелой цепи фактора XI.

У трех ферментов контактной фазы свертывания крови активный центр находится в легкой цепи, а тяжелая цепь служит для адсорбции. Поэтому допустимо предположение, что они имеют общего эволюционного предшественника, тем более что между первичными структурами прекалликреина и фактора XI выявлена далеко идущая гомология. Все реакции контактной фазы свертывания крови (вплоть до образования фактора XIa) могут протекать без Ca^{2+} .

Основной функцией фактора XIa является протеолитическое расщепление фактора IX, ведущее к его активации. Для этой реакции необходимы Ca^{2+} .

Тестирование всех факторов контактной фазы свертывания крови связано с клинико-лабораторным выявлением пациентов, имеющих врожденный дефицит одного из факторов. Такой дефицит характеризуется замедлением свертывания крови, а кровоточивость закономерно встречается лишь у лиц с недостатком фактора XI (ге-

мофилия С). Биохимическое определение фактора XII основано либо на функциональных тестах, либо на иммунологических методах. В отличие от калликреина, который довольно легко десорбируется из комплекса на чужеродной поверхности, фактор XIa остается длительное время связанным, что, по-видимому, обеспечивает локализацию гемостатического процесса. Активация контактной фазы свертывания крови — это существенный процесс, лимитирующий вживание в организм аллопластических протезов сосудов и сердца, и также использование экстракорпорального кровообращения.

Следующий этап свертывания крови, инициируемый фактором XIa, включает превращение фактора IX в сериновую протеазу — фактор IXa и образование комплекса с фосфолипидными мицеллами, ионами кальция и фактором VIII. Этот мультимолекулярный комплекс ферментативно превращает фактор X в фактор Xa.

Полученный высокоочищенный препарат фактора IX является гликопротеином, который состоит из одной полипептидной цепи. Глутамильные остатки в NH_2 -концевой области молекулы модифицированы в остатки γ -карбоксиглутаминовой кислоты. Активация под действием фактора XIa в присутствии Ca^{2+} протекает посредством ограниченного протеолиза двух пептидных связей (одна арг-ала-связь с NH_2 -конца и вторая арг-вал-связь с COOH -конца молекулы) в два этапа. Вначале разрывается арг-ала-связь с возникновением неактивного промежуточного продукта, фактора IXa, затем происходит более медленная реакция — разрыв арг-вал-связи и образование активного фактора IXa β . Высокомолекулярный кининоген не оказывает влияние на активацию [5]. Тот же продукт активации получается под влиянием комплекса фактора VIIa с тканевым тромбопластином и Ca^{2+} [9]. Кроме этих двух путей, фактор IX, по-видимому, может быть превращен в фактор IXa под действием активатора, содержащегося в гранулярной фракции полиморфноядерных лейкоцитов, в присутствии Ca^{2+} . Обнаружение альтернативных способов активации фактора IX, вероятно, служит объяснением тому, что у больных гемофилией С (дефицит фактора XI) кровоточивость выражена намного

меньше, чем у больных гемофилиями А и В. Мутации в гене фактора IX вызывают гемофилию В.

Специфическая биологическая активность фактора IXa, заключающаяся в ограниченном протеолизе фактора X, проявляется после формирования комплекса с фактором VIII, для этого требуется наличие Ca^{2+} и фосфолипидной матрицы (рис. 1). В качестве последней физиологически используется тромбоцитарный фактор 3, представляющий собой липопротеиновый фрагмент тромбоцитарной мембраны. В экспериментальных условиях матрицей могут быть везикулы из смеси фосфатидилэтаноламинов и фосфатидилсеринов. Ионы кальция выполняют роль связывающих мостиков между полярными головками этих фосфолипидов и карбоксильными группами остатков γ -карбоксиглутаминовой кислоты в NH_2 -концевой области фактора IX (рис. 3). В отличие от липопротеинового комплекса фактора III, в тромбоцитарном факторе 3 участие белкового компонента, по-видимому, необязательно, так как переваривание его протеолитическими ферментами не сказывается на биологической гемокоагуляционной активности. Сродство фактора IX в присутствии Ca^{2+} к фосфатидилсеринам, определенное методом твердофазной ELISA, высоко — $K_a = 8,4 \cdot 10^8 \text{M}^{-1}$ [6].

Фактор VIII — это нестабильный гликопротеин, циркулирующий в крови в комплексе с другим белком — фактором Виллебранда. Ввиду чрезвычайной трудности очистки нативного белка данные о его структуре получены по результатам молекулярного клонирования. Молекулярная масса единственной полипептидной цепи (образующей 5 доменов) составляет около 265000. В плазме крови фактор VIII обнаруживается как комплекс тяжелого аминоконцевого фрагмента (200000 Да) с карбоксиконцевым фрагментом (76000 Да), который стабилизирован ионами металла.

Высокомолекулярный компонент (фактор Виллебранда VIII : Вф) является гетерогенной популяцией белковых мультимеров, которые регулируют адгезию и агрегацию отмытых тромбоцитов к поврежденным тканям сосудов, и его отсутствие в крови приводит к болезни Виллебранда, характеризующейся нарушением гемостаза с длительным кровотечением. Синте-

зируется в эндотелиальных клетках и мегакариоцитах. Зрелый фактор Виллебранда состоит из субъединиц с молекулярной массой около 250000 Да, которые образуют мультимеры, варьирующие от димеров до 10 миллионов дальтон по массе.

Коагуляционный фактор VIII (VIII : K) исправляет замедленное свертывание плазмы крови больных гемофилией А. Таким образом, на уровне фактора VIII пересекаются два гемостатических механизма — тромбоцитарный и гемокоагуляционный.

Синтез VIII : K зависит от гена X-хромосоме, а образование VIII : Вф в эндотелиальных клетках регулируется аутосомально. Нарушения синтеза фактора VIII у больных гемофилией А могут быть вызваны как делециями, так и точечными мутациями в соответствующем гене.

Коагуляционная активность фактора VIII резко возрастает под действием следовых количеств тромбина, плазмина и трипсина и более значительных концентраций фактора IXa. В ходе активации происходит протеолиз фактора VIII с образованием семейства пептидных цепей, но затем, видимо, в результате продолжающегося протеолиза коагуляционное действие исчезает. В ходе естественного свертывания крови происходит аналогичный процесс, и сыворотка содержит этот белок уже в неактивной форме.

Коагуляционная активность фактора VIII (VIII : K) заключается не в выполнении им ферментативной функции, как это предполагалось на основании каскадной теории свертывания крови, а в обеспечении благоприятного пространственного взаимодействия фактора IXa с его субстратом — фактором X. Фосфолипиды и кальций служат для диссоциации VIII : K и VIII : Вф, так что первый из них может связывать фактор IXa. Активированный тромбоном фактор VIII увеличивает V_{\max} реакции активации фактора X, а фосфолипиды первично снижают величину K_m .

Гликопротеин — фактор X находится в плазме крови в неактивной форме (в виде профермента). С его активации начинается общий путь свертывания крови. Двухцепочечное строение фактора X отличает его от профер-

ментов сериновых протеаз, в том числе и от других факторов протромбинового комплекса, которые существуют в форме одноцепочечных белков. Молекулярная масса тяжелой цепи составляет 4200, а легкой — 17000 Да. Обе цепи соединены одной дисульфидной связью.

В тяжелой цепи содержится остаток серина, входящего в активный центр. В процессе активации под действием фактора IXa или фактора VIIa от NH_2 -концевой области тяжелой цепи путем расщепления специфической арг-илей-связи отделяется гликопептид с молекулярной массой 14000 Да и образуется фактор Ха (рис. 3 и 4).

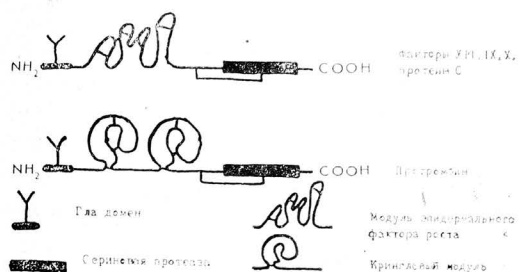


Рис. 4. Модульная структура протромбина, факторов VII, IX, X и протеина С.

Легкая цепь человеческого фактора X состоит из 139 аминокислотных остатков, в число которых входят 11 остатков γ -карбоксиглутаминовой кислоты, служащих для связывания Ca^{2+} , и фосфолипидов. В 63-м положении этой цепи идентифицирована ранее неизвестная в белках α -эритро- β -гидроксиаспарагиновая кислота, функция которой неясна.

Внешняя активирующая система

Схема, ориентирующая в последовательности процессов, которые ведут к свертыванию крови по внешнему пути, приведена на рис. 1. Свертывание крови по этому пути начинается с возникновения комплекса тканевого тромбопластина (фактор III), фактора VII и Ca^{2+} . Липопротеиновую природу тканевого тромбопластина впервые продемонстрировал Э. Чаргафф. Нашими исследованиями обнаружено, что тромбопластическая активность гомогенатов мозга, селезенки, аорты, костного мозга и других органов при ультрафильтрации задерживается вме-

сте с клеточными мембранами, а ультрафильтрат (клеточный сок) вообще неактивен.

Белковая часть (апопротеин III) тромбопластина из ткани мозга человека имеет молекулярную массу 52000 Да. По данным молекулярного клонирования, он синтезируется в форме предшественника с лидерной последовательностью из 32 аминокислотных остатков, которые отщепляются. Зрелый белок построен из 263 аминокислотных остатков, которые, видимо, образуют 3 домена: внеклеточный (остатки 1—219), гидрофобный (220—242), проникающий сквозь мембрану, и внутриклеточный (243—263). Иммунологическое картирование дает основание предполагать, что NH_2 -концевая часть экстрацеллюлярной части апопротеина участвует в связывании фактора VII.

Фосфолипидный состав препаратов тромбопластина из разных тканей неодинаков. Отдельно фосфолипиды и апопротеин III неактивны. Фосфатидилэтаноламинам присуща слабая, но существенная способность восстанавливать активность апопротеина, в то время как фосфатидилхолины и фосфатидилсерина такого свойства лишены. Двухкомпонентные смеси этих фосфолипидов, а тем более трехкомпонентные более эффективны, чем отдельные фракции фосфолипидов. Включение небольшой пропорции фосфатидилсерина было очень важно для получения препарата тромбопластина, обладающего высокой активностью.

Синтез апопротеина III осуществляется во многих клетках тканей человека, но не происходит в клетках крови, за исключением моноцитов. Полуколичественное определение антигена тканевого фактора иммуноферментным методом в гистологических срезах позволило обнаружить его наибольшую локализацию в мозге, легких, гломерулах почек, эпителии пищевода, прямой кишки, шейки матки, плаценте. Вопреки прежним данным, авторы не обнаружили антиген тканевого фактора в интиме и меди аорты [8].

Фактор VII присутствует в плазме крови в виде белка, состоящего из одной полипептидной цепи (406 аминокислотных остатков) с очень низкой или нулевой ферментативной активностью (рис. 3 и 4). Подобно протромбину, факторам IX и X, в процессе

его пострибосомальной модификации с образованием 9 остатков γ -карбоксиглутаминовой кислоты требуется витамин К. Однако некоторые свойства отличают фактор VII от других витамин-К-зависимых белков. В частности, человеческий фактор VII в очищенной форме и в плазме крови присоединяется к сериловому гидроксилу активного центра необратимый ингибитор ДФФ, хотя и при использовании более высоких концентраций ингибитора и более длительном периоде инкубации, чем бычий фактор VII. Сериловый гидроксил активного центра активированной формы (фактора VIIa) намного доступнее для ДФФ, в присутствии же тканевого тромбопластина и Ca^{2+} взаимодействие с ДФФ не отличается от других сериновых протеаз.

Фактор VII под действием фактора Ха или фактора IXa при наличии фосфолипидов и Ca^{2+} , а также фактора XIIIa без дополнительных кофакторов превращается в фактор VIIa, который состоит из двух полипептидных цепей (по 152 и 254 аминокислотных остатка), соединенных дисульфидными связями. Легкая цепь содержит остатки гамма-карбоксиглутаминовой кислоты, а тяжелая — серинпротеазную часть молекулы.

Первоначальный механизм активации фактора VII не вполне выяснен. Во-первых, это может быть конформационное изменение структуры при взаимодействии одноцепочечного фактора VII с апопротеином фактора III, которое ведет к переходу малодеятельной формы фермента в активную. Во-вторых, возможно, речь идет о протеолитической активации другими ферментами исходно недействительной формы профермента. В этом случае начало активации отодвигается до момента инициирования внутреннего пути свертывания крови или до начала воздействия катепсинов.

В плазме крови, лишенной факторов контактной фазы свертывания крови и фактора VII, какие-либо альтернативные механизмы инициирования свертывания крови отсутствуют, и такая плазма не свертывается в присутствии Ca^{2+} и тканевого тромбопластина. В любом случае освобождение из клеток тканевого тромбопластина составляет непереносимое физиологическое условие дальнейшего действия фактора VII. Путем использования

синтетических пептидов для конкурентного связывания установлено, что аминокислотные остатки со 195 по 206 положение в факторе VII необходимы для его связывания с внеклеточным доменом тканевого фактора [12].

Главным субстратом комплекса фактора VIIa с тканевым тромбопластином и Ca^{2+} является фактор X. Механизм активации фактора X был рассмотрен и схематически представлен на рис. 3. В этом комплексе апопротеин III способствует связыванию не только фактора VIIa, но и фактора X. Как уже упоминалось, другой субстрат этого комплекса представляет фактор IX. Почти все пациенты с дефицитом факторов VII и XI страдают кровоточивостью, но не всегда выраженный дефицит их приводит к такой тяжелой клинической картине гемофилии, как недостаток факторов VIII и IX. Объяснение этому кроется в том, что внешний и внутренний пути активации фактора X не полностью изолированы, как предполагали ранее, а взаимодействуют почти на каждом возможном этапе.

Общий путь свертывания крови

Общий путь начинается с активации фактора X по внутреннему или внешнему механизму (рис. 1). Полный протромбинактивирующий комплекс (протромбиназа) включает помимо фактора Ха (КФ. 3.4.21.6) липопротеин, представленный либо тканевым тромбопластином, либо тромбоцитарным фактором 3, Ca^{2+} и фактором V.

Человеческий фактор V — лабильный высокомолекулярный асимметричный одноцепочечный гликопротеин, который в активированном виде функционирует как кофактор в превращении протромбина в тромбин под действием фактора Ха (рис. 1). Предсказанная по данным молекулярного клонирования аминокислотная последовательность состоит из 224 единиц, включая 28 остатков лидерного пептида. Выявлена значительная гомология с фактором VIII: триплицированный А-домен, дублицированный С-домен и единичный В-домен. Этот белок синтезируется в эндотелии аорты, гепатоцитах и мегакариоцитах. Около 20% фактора V, находящегося в крови, сосредоточено в тромбоцитах. Эта запасная форма фактора V способна секретироваться при активации тром-

боцитов и, очевидно, играет важную роль в гемостазе.

Активация фактора V путем ограниченного протеолиза тромбином формирует четыре главных фрагмента, из которых аминоконцевой (105000 Да) и карбоксиконцевой (74000 Да) образуют вместе фактор Va. Фактор V связывается с фосфолипидами, фактором III и фактором X с высоким сродством. Представляя детерминанты для соединения с компонентами протромбиназного комплекса, фактор Va в 200 раз и более повышает V_{\max} превращения протромбина в тромбин. При взаимодействии беспротромбиновой плазмы с иммобилизованным на сепарозе протромбином специфической сорбции фактора V не выявлено, однако активированный тромбином фактор V адсорбировался на 99%. Активация фактора V сопровождается появлением иммунных эпитопов на каждой из двух полипептидных цепей фактора Va. Последний уменьшает в 50—160 раз константы диссоциации комплексов с фосфолипидами протромбина, фактора X и фактора Ха, но не изменяет максимальной емкости фосфолипидной матрицы.

Таким образом, фактор V, подобно фактору VIII, являясь кофакторным белком, может рассматриваться как структура, образующая рецептор на поверхности клеточных мембран для сериновых протеаз и их субстратов. Способность фактора V не только к активации под действием тромбина или фактора Ха, но и к дальнейшей деградации с потерей активности заключает в себе возможность первоначального усиления каталитического воздействия фактора Ха на протромбин, а также последующего самоограничения процесса свертывания крови по принципу обратной связи.

Субстратом протромбиназного комплекса, в котором фактор Ха функционирует как сериновая протеаза, является протромбин.

Концепция о предшественнике тромбина — протромбине — возвращает нас к работам основателя ферментативной теории свертывания крови профессора Дерптского университета Александра Шмидта (1831—1891). Многочисленные исследования, проведенные с тех пор, завершились полной расшифровкой первичной структуры протромбина. Это асимметричный гликопротеин, состоящий из одной полипептид-

ной цепи (см. табл.). Структура протромбина становится понятной при рассмотрении механизма его активации в тромбин, во время которой отщепляется несколько фрагментов (доменов) под действием физиологических протеолитических ферментов: фактора Ха и тромбина (рис. 3 и 4).

Фрагмент 1 — первый активационный продукт, который содержит 10 остатков γ -карбоксиглутаминовой кислоты, внутренние дисульфидные петли (kringles). Фрагмент 1 связывается с фосфолипидами через ионы кальция, которые вступают в хелатные комплексы с карбоксильными группами γ -карбоксиглутаминовых остатков (находящихся на NH_2 -конце молекулы) и полярными группами фосфолипидов, то есть выполняет роль якоря на фосфолипидной мицелле. Установленный в нашей лаборатории кооперативный механизм комплексообразования протромбина и фрагмента 1 с тканевым тромбопластином дает основание заключить, что связи между ними не ограничиваются только кальциевыми мостиками, а включают, по-видимому, и гидрофобные взаимодействия. Дисульфидные петли служат, вероятно, для связывания с фактором Ха.

Фрагмент 2 способен связываться с фактором Va. Таким образом, фактор Va ориентирует протромбин и фактор Ха относительно друг друга и содействует специфическому протеолизу связи арг-273-тре-274 и отделению нетромбогенных фрагментов 1·2, а другая молекула фактора Ха (предположительно) расщепляет пептидную связь арг-322-тре-323 и ведет к возникновению α -тромбина, состоящего из двух полипептидных цепей A и B, соединенных одним дисульфидным мостиком.

Посредством возвратного механизма тромбин может сам атаковать протромбин по связям арг-155-сер-156 и арг-286-тре-287. Последняя реакция укорачивает человеческую A-цепь тромбина на 13 аминокислотных остатков. Фрагмент 1·2, а не фрагмент 1 обнаруживается в сыворотке. Следовательно, расщепление тромбином связи между ними имеет второстепенное значение.

Витамин K важен для биосинтеза протромбина, факторов VII, IX и X. Кроме них, к числу витамин-K-зависи-

мых белков в плазме крови относятся протенины С, S, Z. После открытия витамина К прошло более 30 лет, прежде чем стал известен этап белкового синтеза, в котором он принимает участие. Витамин К в гидрохинонной форме выполняет роль кофермента карбоксилазы, осуществляющей карбоксилирование обычно рядом расположенных остатков глутаминовой кислоты в белках в остатки γ -карбоксиглутаминовой кислоты. Подобно реакции гликозилирования, имеет место посттрансляционная модификация, которая происходит после проникновения секретируемых белков в эндоплазматический ретикулум гепатоцитов. Витамин-К-зависимая карбоксилаза является интегральным мембранным ферментом, для функционирования которой необходимы CO_2 и O_2 . Хинонная форма витамина К переходит в гидрохинонную с помощью НАД/Ф/Н дегидрогеназы и (или) витамин-К-редуктазы. В процессе γ -кабоксилирования гидрохинонная форма витамина К превращается в эпоксид, который снова восстанавливается до хинона витамина К под действием редуктазы. По последним данным, возможен механизм γ -карбоксилирования, предусматривающий окисление гидрохинонной формы витамина в гидропероксид.

Биохимическая функция остатков γ -карбоксиглутаминовой кислоты заключается в связывании Ca^{2+} . При авитаминозе К или приеме его антагонистов, непрямым антикоагулянтов, синтезируются предшественники протромбина, факторов X, IX и VII, неспособные связывать Ca^{2+} и участвовать в свертывании крови.

Первоначально протромбин синтезируется в печени в виде предшественника — препро-протромбина, который отличается большей длиной полипептидной цепи. В бычьем препро-протромбине с NH_2 -конца отмечается лидерная последовательность из 43 преимущественно гидрофобных аминокислотных остатков. Аналогичная сигнальная последовательность обнаружена и в других секретируемых белках: альбумине, человеческом протромбине, цепях фибриногена и в ряде факторов свертывания крови. Сначала отщепляется сигнальный пептид с образованием про-протромбина, а затем вторая протеаза дает выход плазменному протромбину.

Тромбин (КФ. 3.4.21.5), отделяю-

щийся от протромбина, не содержит остатков γ -карбоксиглутаминовой кислоты и переходит в жидкую фазу. По данным нашей лаборатории, в присутствии ионов кальция его сродство к тромбопластину уменьшается. Он относится к семейству сериновых протеаз, обладающих трипсиноподобным действием. Его каталитические свойства подавляются ДФФ и тозиллизил-хлорметилкетонем, реагирующими с остатками серина и соответственно — гистидина в активном центре.

Совокупность наших данных по связыванию фрагмента 1, претромбина и α -тромбина с тромбопластином позволяет заключить, что связывание протромбина с мембранами при свертывании крови обеспечивается NH_2 -концевым участком его молекулы, соответствующем домену фрагмента 1. Претромбиновый домен непосредственно не участвует во взаимодействии профермента с фосфолипидной поверхностью. Этот вывод подтверждается недавно полученным экспериментальным доказательством вертикального положения протромбина на фосфолипидной поверхности, причем наиболее далеко от нее располагается тромбиновый домен. Вместе с тем при связывании протромбина с фрагментами клеточных мембран в организме претромбиновый домен, по-видимому, вступает в неспецифическое взаимодействие с мембранными белками.

Полученные данные в известной мере проясняют механизм Ca^{2+} -специфического взаимодействия протромбина и других витамин-К-зависимых белков с фрагментами мембран в организме. Привлекает внимание сохранение остаточного связывания фрагмента 1 с тромбопластином при отсутствии существенных изменений аффинитета центров связывания после удаления ионов Ca^{2+} . Это означает, что ионы Ca^{2+} необходимы для организации центров обоого типа, но некоторое количество центров возникает и связывает фрагмент 1 и без ионов Ca^{2+} . Этот результат приводит к необходимости признать наличие определенного Ca^{2+} -независимого вклада во взаимодействие протромбина со специфичными центрами связывания тромбопластина.

Присоединение ионов Ca^{2+} к фрагменту 1 протромбина или к соответствующему участку исходной молекулы профермента ведет к изменению

их конформации и обнажению области, вступающей в гидрофобное взаимодействие. По данным рентгеноструктурного анализа, близко к поверхности фрагмента 1 находится гидрофобный кластер из остатков ароматических аминокислот, консолидирующий группу остатков Гла в домен, через посредство которого происходит связывание белка с фосфолипидами. Ca^{2+} -опосредованное связывание протромбина с везикулами вполне обеспечивается первыми 44 N-концевыми аминокислотными остатками. В то же время привлекает внимание весьма напоминающие наши результаты близость величин K_d Ca^{2+} -независимого связывания дез-(1—41)-протромбина и Ca^{2+} -опосредованного связывания протромбина с фосфолипидами. С учетом наших результатов об отсутствии специфического взаимодействия протромбина 1 с тромбопластином можно заключить, что в протромбине в области фрагмента 1 имеются структуры, способные к взаимодействию с мембраной без ионов Ca^{2+} . Наличие фосфатидилсерина в мембране для связывания витамин-К-зависимых факторов свертывания обязательно. Однако ранее отмечалось, что максимальной прокоагулянтной активностью обладают мембраны, в которых фосфатидилсерин смешан с нейтральными фосфолипидами, главным образом с фосфатидилэтаноламином и фосфатидилхолином. По современным данным, ионы Ca^{2+} стабилизируют кластеры из молекул фосфатидилсерина в мембране. Вследствие Ca^{2+} -индуцированного фазового разделения фосфолипидов фосфатидилэтаноламин в бислойных мембранах смешанного состава склонен образовывать обращенную гексагональную мезофазу (H_{II}). Результаты наших исследований в совокупности с приведенными данными подтверждают предположение, сделанное нами при изучении взаимодействия с тромбопластином протромбина [2]. Связывание протромбина с неоднородной фосфолипидной поверхностью фрагментов клеточных мембран наряду с основным Ca^{2+} -опосредованным электростатическим взаимодействием с молекулами фосфатидилсерина должно обеспечиваться дополнительным гидрофобным взаимодействием с молекулами нейтральных фосфолипидов в ближайшем окружении. По-видимому, гидрофобный участок на N-конце

молекулы протромбина взаимодействует с остатками жирных кислот фосфатидилэтаноламина на границе его мезофаз и кластеров фосфатидилсерина в тромбопластине. В этих местах гидрофильная фосфолипидная поверхность находится в напряженном состоянии, может иметь дефекты и разрыхления, облегчающие гидрофобные взаимодействия. В отсутствии ионов Ca^{2+} должно возрастать электростатическое отталкивание фрагмента 1 или протромбина от мембраны и уменьшаться число дефектов гидрофильной поверхности на границах мезофаз. Поэтому число возможных гидрофобных контактов будет сокращаться пропорционально по обоим типам центров связывания, но без значительного изменения аффинитета центров. В то же время определенное число центров связывания должно оставаться и в отсутствие ионов Ca^{2+} , потому что гетерофазная структура тромбопластина при этом в целом сохраняется.

Гидрофобное взаимодействие протромбина с мембраной непосредственно связано с неоднородностью фосфолипидной поверхности. Оно не возникает на бислойных фосфолипидных везикулах, а характерно лишь для обрывков и участков клеточных мембран, претерпевших фазовую перестройку (переход $\text{L}_2 \rightarrow \text{H}_{II}$).

Кажется ясным, что наличие среднеаффинных и высокоаффинных центров связывания фрагмента 1 и протромбина на тромбопластине является следствием его гетерофазной структуры. Фактическое совпадение K_d для центров связывания на фосфолипидных везикулах и среднеаффинных центров тромбопластина позволяет считать последние просто участками фосфолипидной поверхности, включающими молекулы как кислых, так и нейтральных фосфолипидов. Высокоаффинные центры, по-видимому, представляют межфазные разрыхления модифицированной мембраны. Связывание протромбина происходит сначала за счет дальнедействующих электростатических взаимодействий через ионы Ca^{2+} с кластерами фосфатидилсерина, затем становится возможным присоединение гидрофобных взаимодействий, благодаря которым достигается более прочное связывание белка по межфазным разрыхлениям мембраны.

Мембрана неповрежденных и не-

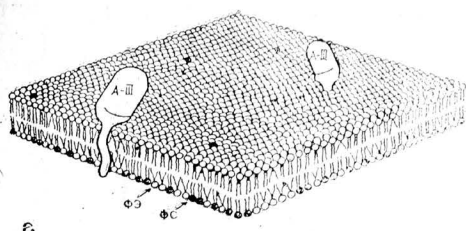
стимулированных клеток атромбогена, и связывание неактивных витамин-К-зависимых факторов с ней минимально. Формирование протромбиназного комплекса и активация протромбина происходят на поверхности стимулированных тромбоцитов, лейкоцитов, эндотелия сосудов, макрофагов тканей и многих опухолевых клеток. Неоднократно отмечалось, что образование протромбиназного комплекса на клетках происходит благодаря связыванию фактора Ха и протромбина с фактором Va, проявляющим себя как рецептор, синтезируемый клетками или связываемый ими извне. Вклад фосфолипидов клеточной поверхности в связывание витамин-К-зависимых факторов отчетливо не выявлялся. Считается, что он реализуется таким же образом, как и на фосфолипидных везикулах. Лишь недавно на опухолевых клетках, поверхность которых существенно изменена по сравнению с нормой, по-видимому, удалось выявить влияние специфики структуры фосфолипидной поверхности на связывание фактора Ха. Связывание происходило независимо от экспрессированного на поверхности фактора V/Va, хотя он был необходим для последующей активации протромбина связанным фактором Ха. Связывание было Ca^{2+} -зависимым и специфичным, но 70 % фактора X связывалось и без ионов Ca^{2+} [11]. Мы установили, что высокоаффинное и среднеаффинное связывание с тромбопластином присуще также фактору X. Обнаружение неоднородности связывания фрагмента 1, протромбина и фактора X на тромбопластине означает, что приобретение клеточной мембраной тромбогенных свойств связано с утратой ею исключительно бислойной структуры и с образованием мезоморфной структуры. Этот вывод подтверждается последними исследованиями, показавшими, что способность тромбоцитов и эритроцитов стимулировать протромбиназную активность под действием ряда агонистов (в том числе естественных активаторов тромбоцитов) непосредственно определяется везикуляцией их мембран.

Результаты наших исследований и последние достижения в понимании механизмов поддержания стабильности клеточных мембран позволили нам разработать представления об иницировании свертывания крови Ca^{2+} -опо-

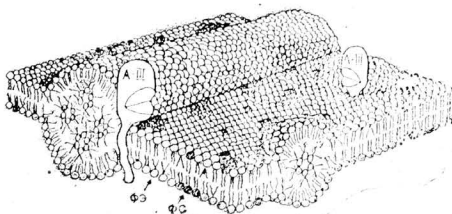
средованной фазовой перестройкой мембран (Зубанов Д. М., Тимербаев В. Н., 1991). Различные воздействия на клетки, опосредуемые через специфические рецепторы, или непосредственно механически повреждающие мембрану, повышающие внутриклеточную концентрацию ионов Ca^{2+} , вызывают нарушение естественной асимметрии мембран и появление фосфатидилсерина и фосфатидилэтаноламина во внешнем монослое. Это ведет к возникновению обращенных мезофаз фосфолипидов, появлению межфазных дефектов, понижению прочности мембраны. Участки клеточной мембраны с перестроенной структурой образуют везикулы (фосфолипидные микрокастицы), которые при нарастании структурных изменений отщипываются в кровоток в виде фрагментов клеточных мембран. Они должны представлять конгломераты мезофаз с гидрофильной поверхностью, с экспонированными кластерами отрицательно заряженных фосфолипидов и интегральными мембранными белками. Такая мезоморфная структура является необходимым условием выполнения мембраной матрично-каталитической функции в активации витамин-К-зависимых факторов. Среднеаффинные центры необходимы для обеспечения латеральной подвижности факторов на поверхности мембраны, без этого невозможно образование ферментных комплексов и активация факторов. Высокоаффинные центры нужны для самосборки 3-компонентных ферментных комплексов (поверхность — активный фактор — белок-кофактор), каталитическая активность которых поддерживается благодаря внутренним белок-фосфолипидным и белок-белковым взаимодействиям (рис. 5).

Кроме того, наличие на мембране неоднородных участков связывания кажется наиболее простой молекулярной основой обеспечения каскада активации факторов в ансамбле близко расположенных ферментных комплексов.

Следует отметить существенное физиологическое значение обнаруженного характера взаимодействия α -тромбина с тромбопластином. В организме на поверхности различных клеток имеются специфические рецепторы α -тромбина, опосредующие его регуляторные эффекты. Таким образом, на поверхности мембран с перестроенной струк-



а



б

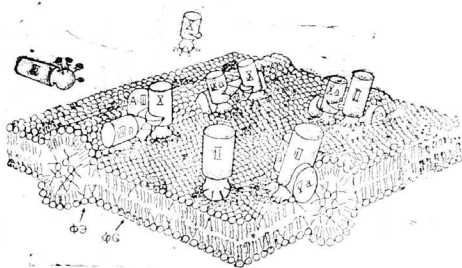


Рис. 5. Гипотетическая схема трансформации тромбогенной поверхности клеточной мембраны в тромбогенную: а) нативная клеточная мембрана с бислойной структурой, ФЛ и ФЭ — во внутреннем монослое мембраны, А-III — неактивный апопротеин тканевого фактора; б) модифицированная клеточная мембрана с кластерами ФЛ и обращенными цилиндрической и мицеллярной мезофазами ФЭ, А-III — активный апопротеин тканевого фактора; в) ансамбль ферментных комплексов витамин-К-зависимых факторов свертывания крови на поверхности модифицированной клеточной мембраны (черные точки — ионы Ca^{2+} , связывающие глутаминовые факторы с кластерами ФЛ).

турой должно преобладать неспецифическое электростатическое взаимодействие фермента с фосфолипидами и интегральными белками. Подавление связывания α -тромбина ионами Ca^{2+} обеспечивает быстрое освобождение фермента от протромбиназного комплекса в водную фазу, что делает свертывание фибриногена массивным и распространенным. Вместе с тем высокое остаточное связывание фермен-

та с тромбогенной мембраной обеспечивает, в первую очередь, пристеночную локализацию сгустка и наиболее прочное связывание его с местом повреждения.

Наиболее очевидным субстратом α -тромбина является фибриноген. Кроме того, выполняя регуляторную функцию, он не только принимает участие на конечном этапе гемокоагуляции, но и осуществляет ограниченный протеолиз факторов V, VIII и XIII, переводя их в активные формы. При аутолитической деградации α -тромбин превращается в β - и γ -формы, которые состоят соответственно из 3 и 4 полипептидных цепей. β - и γ -тромбины сохраняют эстеразные свойства, но лишены свертывающей функции, так как у них нарушен центр связывания макромолекулярных субстратов, локализованный в NH_2 -концевой области В-цепи α -тромбина. Более подробные сведения о строении и особенностях катализа α -тромбина приведены в обзоре [4].

Фибриноген — единственный субстрат, из которого под действием тромбина создается волокнистая сеть фибрина — материальная основа сгустка крови. По своим общим свойствам эта крупная молекула (см. табл.) классифицируется как зуглобулин, так как он растворим лишь в разбавленных солевых растворах и выпадает в осадок при снижении и высаливается при увеличении ионной силы раствора. Молекула фибриногена состоит из трех пар полипептидных $\text{A}\alpha$ -, $\text{B}\beta$ - и γ -цепей, соединенных рядом дисульфидных связей, причем все 6 концевых NH_2 -групп сгруппированы друг около друга (рис. 3). Из шести полипептидных цепей формируется три домена, то есть компактно обособленные области, из которых один домен Е (или дисульфидный узел), включающий NH_2 -концевые участки цепей, является центральным, а два симметричных домена D, присоединенных спирализованными участками полипептидных цепей, находятся по краям домена Е. Длина молекулы равна приблизительно 45 нм. COOH -концевые половины α -цепей обнажены и выдаются из латеральных доменов. Синтез каждой из трех полипептидных цепей в печеночных клетках кодируется отдельным геном.

Катализируемое тромбином удаление 2 пар фибринопептидов А и В

(рис. 3) уменьшает избыток отрицательного заряда в центральном домене с -8 до $+5$. Благодаря отщеплению фибринопептидов А и В в домене Е возникают центры полимеризации, комплементарные центрам, которые имеются в подготовленном виде в периферических доменах D, несущих отрицательный заряд -4 . Противоположные заряды дают толчок к комплементарному электростатическому взаимодействию. Сборка начинается с латерального соединения молекул мономерного фибрина, совершающегося со смещением на половину длины молекулы [1], то есть происходит соединение конца (один из доменов D) с серединой (домен Е), что ведет к образованию протофибрилл — волокон толщиной в два мономера (рис. 6). Они связываются межмолекулярными латеральными взаимодействиями доменов D и Е, а также линейно — концами периферических доменов соседних молекул. В месте этого контакта при стабилизации фибрина, осуществляемой ферментом — фактором XIIIa, возникают ковалентные связи. Фибрин, не подвергшийся действию фактора XIIIa, может быть растворен в 5 М мочеvine, 1 М NaBr, 1% монобромуксусной кислоте и поэтому обозначается как фибрин (p) — растворимый фибрин.

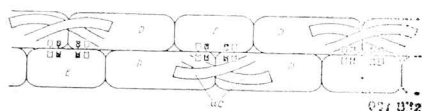


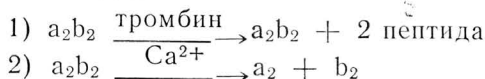
Рис. 6. Схема образования протофибриллы по Б. А. Белицеру (1982). Обозначения: С — домены; 1 и 2 — центры полимеризации, принадлежащие соответственно доменам D и Е.

Трансформация в нерастворимый фибрин катализируется фактором XIIIa путем образования ковалентных связей, соединяющих между собой мономерные единицы. У человека и высших животных этим этапом завершается свертывание крови, а у некоторых животных, находящихся на низших стадиях эволюционного развития, подобное превращение служит главным механизмом получения фибрина из фибриногена. По каталитической активности этот фермент можно определить как ϵ -лилиз- γ -глутамил-аминоацил-трансферазу. В плазме крови

он содержится в виде профермента, который переходит в активную форму под действием тромбина в присутствии Ca^{2+} . Он синтезируется в печени. Мегакариоциты тоже синтезируют подобный фермент — тромбоцитарный фактор XIII.

Плазменный фактор XIII является гликопротеином, тетрамером, в котором две пары неидентичных цепей соединены друг с другом нековалентными связями. Субъединичный состав может быть представлен символами a_2b_2 , где a_2 включает SH-группу цистеина, принадлежащую активному центру.

В процессе активации тромбином и некоторыми другими протеазами от NH_2 -концевого участка каждой А-цепи в результате гидролиза арг-гли-связи отщепляется активационный пептид с массой 4000:



В отсутствие ионов кальция сохраняется тетрамерное строение, но молекула неактивна. Ионы Ca^{2+} требуются для диссоциации тетрамера на энзиматически активный димер a_2 и неактивный димер b_2 . Первоначально образуется по 2 ковалентные связи (рис. 7) между γ -цепями в области

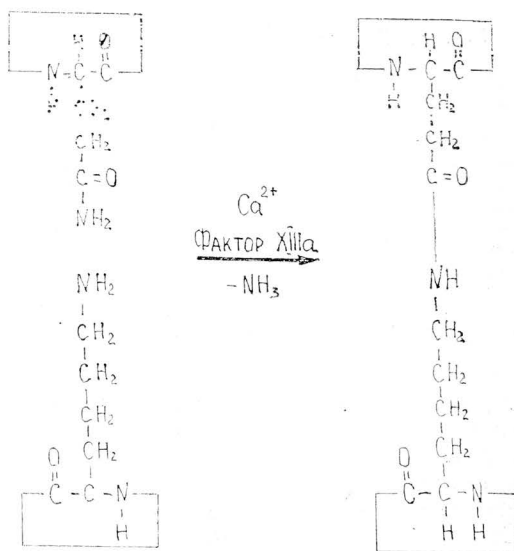


Рис. 7. Образование эпсилон-гамма-глутамильных связей, катализируемое фактором XIIIa. Прямоугольники обозначают полипептидные цепи фибрина.

СООН-конца соседних антипараллельно и реципрочно расположенных молекул фибрин-мономера. Впоследствии между цепями также устанавливаются перекрестные связи, но более медленно. Исследование ковалентного сшивания фибрина в тромбах, появляющихся в кровеносных сосудах кролика, позволило обнаружить, что этот процесс протекает очень быстро, практически параллельно с самим процессом полимеризации.

Под действием фактора XIIIa в присутствии Ca^{2+} в состав фибринового сгустка дополнительно включается фибронектин (см. табл.), который, благодаря способности связываться с разными макромолекулами, обеспечивает адгезию фибрина на субэндотелии, а также распластывание клеток на фибриновом субстрате. Такое взаимодействие важно для аффинного отложения нитей фибрина на местах повреждения, он предопределяет специфику участия фибрина в гомеостазе [3]. Кроме того, под влиянием фактора XIIIa возможна сополимеризация с нитями фибрина тромбоспондина — основного белка, секретируемого α -гранулами тромбоцитов и связываемого с их поверхностью.

Скорость внутрисосудистого фибринолиза зависит не только от концентрации ферментов фибринолитической системы, то есть плазминогена, активаторов плазминогена и α_2 -антиплазмина, она регулируется также катализируемой фактором XIIIa ковалентной сшивкой с фибрином α_2 -антиплазмина. При экстравазации плазмы или цельной крови образующийся сгусток играет важную роль в предупреждении дальнейшего повреждения ткани и в последующем заживлении раны. Экстравазальный фибринолиз зависит в заметной мере от лейкоцитарных протеаз. Катализируемая фактором XIIIa поперечная сшивка α -цепей фибрина важна для предохранения экстравакулярного сгустка от преждевременного фибринолиза этими протеазами.

В заключение следует отметить, что фактор XIII циркулирует в крови в тесном комплексе с фибриногеном ввиду аффинности их молекул.

Физиологические и патологические антикоагулянты

В ходе гемостатического процесса часть тромбина из области поврежде-

ния кровеносного сосуда может проникать в кровоток. Тем не менее циркулирующая в кровеносном русле кровь продолжает оставаться жидкой. Среди предохранительных механизмов, обеспечивающих сохранение крови в сосудах в жидком состоянии, большое значение принадлежит системе ингибиторов протеолитических ферментов. На их долю приходится около 10% общего белка в плазме. Характерной их особенностью является поливалентность действия, то есть способность тормозить активность не одного, а нескольких активированных факторов свертывания крови. Механизм их конкурентного действия заключается в образовании связи между ферментом и субстратоподобным участком ингибитора. В плазме крови обнаружены по крайней мере девять ингибиторов протениназ. Из их числа, вне сомнения, участвуют в регуляции свертывания крови четыре. Кроме того, к ингибиторам свертывания крови относятся гепарин и протейн С.

α_2 -Макроглобулин — это гликопротеин, состоящий из двух субъединиц, каждая из которых содержит две полипептидные цепи с молекулярной массой около 185000 Да, соединенных дисульфидными связями (см. табл.). α_2 -макроглобулин взаимодействует со многими протеиназами крови и других тканей. Из компонентов свертывающей системы крови он ингибирует плазменный калликреин и тромбин, но не взаимодействует с факторами XIIa, IXa и VIIa. Высокомолекулярный кининоген уменьшает скорость инактивации калликреина α_2 -макроглобулином посредством высокоаффинного взаимодействия с тяжелой цепью калликреина. Около четверти общего антитромбинового потенциала плазмы крови приходится на α_2 -макроглобулин. Торможение тромбиновой активности под действием α_2 -макроглобулина происходит медленно. Фермент лишается протеолитической активности, но может гидролизовать низкомолекулярные субстраты. Это означает, что ингибитор вызывает лишь частичное блокирование субстратсвязывающего участка активного центра. Комплексы α_2 -макроглобулина с другими белками подвергаются очищению клетками ретикулоэндотелия.

С1-ингибитор — гликопротеин, состоящий из одной полипептидной цепи (см. табл.). Он тормозит активность

Факторы свертывания крови и их ингибиторы

Название	Фактор	Активная форма	Молекулярная масса	Концентрация в плазме, мкМ	Природа	Функция
Фибриноген	I		340000	5,9—11,7	структурный белок	образование волокон
Протромбин	II	IIa	72000	1,4—2,1	вит. К-зависимый профермент сериновой протеазы	ограниченный протеолиз факторов I, V, VIII, XIII, протейна C, активация тромбоцитов
Тканевый тромбопластин	III				комплекс аполипротеина III с фосфолипидами	активатор фактора VII
Кальций	IV		40,08	1030—1270	ион Ca^{2+}	посредник в комплексообразовании между белками и липидами, индуктор транслокации фосфолипидов между монослоями клеточных мембран
Акцелератор-глобулин, проакцелерин	V	Va	350000	0,02—0,04	церулоплазминоподобный связывающий белок	кофактор активации фактором Xa протромбина
Проконвертин	VII	VIIa	48000	0,002—0,04	вит. К-зависимый профермент сериновой протеазы	активация путем ограниченного протеолиза факторов X и IX
Антигемофильный глобулин	VIII	VIIIa	330000	0,0003—0,003	церулоплазминоподобный связывающий белок	кофактор активации фактором IXa фактора X
Кристмас фактор	IX	IXa	57500	0,2	вит. К-зависимый профермент сериновой протеазы	активация путем ограниченного протеолиза фактора X
Фактор Стюарта-Провисера, тромботропин	X	Xa	66000	0,3—0,4	вит. К-зависимый профермент сериновой протеазы	активация путем ограниченного протеолиза протромбина
Плазменный предшественник тромбопластина	XI	XIa	160000	0,025—0,003	профермент сериновой протеазы	активация путем ограниченного протеолиза фактора IX
Фактор Хагемана	XII	XIIa	80000	0,2—0,5	профермент сериновой протеазы	активация путем ограниченного протеолиза фактора XI, прекалликреина и фактора VII
Фибринстабилизирующий фактор, фибринолизин газа	XIII	XIIIa	340000	0,08	профермент трансклутаминазы	поперечная сшивка фибрина и других белков
Фактор фон Виллебранда	—	—	800000—20 млн.	0,05	структурный белок	связывает фактор VIII, опосредует адгезию тромбоцитов

Прекалликреин, фактор Флетчера	—	Калликреин	88000	0,2—0,6	профермент сериновой группы	активация путем ограничения протеолиза фактора VII, высокомолекулярного кининогена
Высокомолекулярный кининоген, фактор Фитцджеральда	—	—	120000	0,2—0,6	связывающий белок	кофактор рецепторной активации факторов XII, XI и прекалликреина
Фибриноктин	—	—	440000	0,45—1,0	структурный белок	опосредует адгезию клеток
Антитромбин III	—	—	58000	3,0—5,0	серпин	ингибирует тромбин, факторы IXa, Xa, XIa
Гепарин	—	—	6000—35000	?	гликозаминогликан	кофактор инактивации тромбина, фактора Xa антитромбином III и гепариновым кофактором II
Гепариновый кофактор II	—	—	55000	0,6—1,0	серпин	ингибирует тромбин
Протенин С	—	Протенин Са	62000	0,06	вит. К-зависимый профермент сериновой протеазы	инактивация путем протеолиза факторов V и VIII
Протенин S	—	—	69000	0,4	вит. К-зависимый связывающий белок	кофактор инактивации протеином С факторов V и VIII, связывает C4
С1-ингибитор	—	—	104000	2,0	серпин	ингибирует C1q, C1s, калликреин, фактор XIIa
α -2-Макроглобулин	—	—	720000	3,5	белок	ингибирует тромбин, калликреин

фактора XIIa, калликреина, фактора XIa, то есть оказывает преимущественное воздействие на начальный этап свертывания крови.

α_2 -Антиплазмин — основной быстродействующий ингибитор пламина; кроме того, он медленнее угнетает фактор XIIa, калликреин, фактор XIa. Гепарин не влияет на ингибиторные свойства α_2 -антиплазмينا. По химической природе он является одноцепочечным гликопротеином (см. табл.).

Антитромбин III — гликопротеин, состоящий из одной полипептидной цепи с шестью дисульфидными связями (см. табл.), осуществляет постепенное прогрессирующее воздействие на тромбин путем формирования эквимольного комплекса. Взаимодействие между ферментом и ингибитором заключается в образовании кинетически стабильного комплекса, который диссоциирует на активный тромбин и протеолитически модифицированный, недействительный антитромбин III по реакции 1 порядка с полужизнью приблизительно 3 дня. Ингибирование заключается в протеолитической реакции (гидролиз пептидной связи арг-385-сер-386), одна из промежуточных стадий которой протекает очень медленно. Впоследствии получаются агрегаты, которые очень плохо диссоциируют и, видимо, очищаются РЭС. Около 70—75% антитромбинового действия плазмы приходится на долю антитромбина III. Постепенное действие антитромбина III позволяет свободно-му тромбину вначале выполнить свою специфическую биологическую функцию, а затем ингибироваться. Помимо тромбина, антитромбин III нейтрализует факторы IXa, Xa, XIa и плазмин. Ингибиторная активность антитромбина III в присутствии гепарина возрастает в 50—100 раз; кроме того, он приобретает способность тормозить калликреин и фактор VIIa. Однако вполне возможно, что все реакции антитромбина III, кроме взаимодействия с тромбином, не особенно важны физиологически даже в присутствии гепарина. Небольшая часть антитромбина III связана со специфической популяцией протеогликанов гепарансульфата на поверхности эндотелиальных клеток крупных и мелких кровеносных сосудов [10]. Благодаря этому ингибитор эффективно активируется на границе раздела поверхности сосуд — кровь.

Гепарин — гликозаминогликан, обладающий самыми сильными из всех органических соединений клеток кислотными свойствами. Он не имеет единой химической структуры; под названием «гепарин» по признаку подобного чередования углеводных единиц и функциональных групп объединяется ряд соединений с различной длиной цепи и неодинаковой молекулярной массой — от 6000 до 35000 Да (в среднем около 17000). В отечественных препаратах гепарина содержится относительно более высокая пропорция низкомолекулярных фракций. Молекула гепарина расщепляется на три составляющих его углевода: D-глюкозамин, D-глюкуроновую и L-идуруновую кислоты. Число остатков глюкозамина равно сумме остатков глюкуроновой и идуруновой кислот. Остатки глюкуроновой кислоты и глюкозамина, идуруновой кислоты и глюкозамина ковалентно соединены гликозидными (1→4) связями. Такие дисахариды представляют собой повторяющиеся единицы гетерополисахарида, соединенные последовательно также 1→4 связями. Каждая дисахаридная единица несет еще три ковалентно присоединенных остатка серной кислоты, которые образуют сульфонамидные связи с глюкозамином и кислые эфиры с идуруновой кислотой во втором положении и глюкозаминном в шестом положении цепи молекулы (рис. 8).

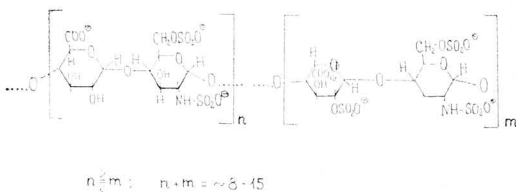


Рис. 8. Гепарин.

Гепарин ускоряет реакцию антитромбин III — тромбин в субстехиометрическом соотношении и не влияет на количество тромбина, которое может быть нейтрализовано. Более того, гепарин может освобождаться для повторного связывания с антитромбином III после формирования комплекса ингибитор — тромбин, ибо средство гепарина с комплексом ингибитор — фермент существенно ниже, чем со свободным антитромбином III, то есть гепарин в этой реакции ведет себя как катализатор.

Согласно кинетическому анализу, во-первых, гепарин, непосредственно взаимодействуя с антитромбином III, вызывает в молекуле последнего конформационные изменения, благоприятствующие быстрому взаимодействию с α -тромбином; во-вторых, этому же способствует сближение α -тромбина с антитромбином III вследствие связывания фермента со свободным участком молекулы гепарина рядом с ингибитором. Антикоагуляционный эффект гепарина обусловлен дополнительным ускорением инактивации факторов Ха, IXa, XI, XII и VIIa, а также замедлением активации протромбина и фактора X в результате нарушения их связывания с поверхностью фосфолипидов.

Протеин С — гликопротеин, состоящий из тяжелой и легкой полипептидных цепей, соединенных дисульфидными связями. Это витамин-К-зависимый профермент сериновой протеиназы, в легкой цепи которого содержится 11 остатков γ -карбоксиглутаминовой кислоты. Превращается в активную форму под действием тромбина, трипсина и протеаз яда гадюки. Проявляет антикоагулянтное действие в присутствии фосфолипидов, тромбомодулина и Ca^{2+} путем протеолитической инактивации факторов Va и VIIIa. Схема антикоагуляционного действия протеина С, тромбомодулина и протеина S представлена на рис. 9. Врожденный дефицит протеина С характеризуется тенденцией к тромбозам.

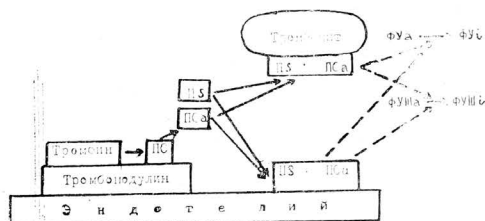


Рис. 9. Схема антикоагуляционного действия тромбомодулина и протеинов С и S.

Тромбомодулин — присущий эндотелиальным клеткам рецептор, находящийся на их поверхности. Предсказанная аминокислотная последовательность содержит 576 аминокислотных остатков, включая 16 остатков сигнального пептида. Две трети карбоксиконцевого участка молекулы у человека гомологичны рецептору липопротеинов низкой плотности. Аминоконцевая часть молекулы не имеет сходства и обеспечивает специфичность

межмолекулярных взаимодействий с тромбином и протеином С.

Ассоциация α -тромбина с интегральным мембранным белком тромбомодулином в присутствии Ca^{2+} увеличивает скорость активации протеина С в 10000 раз и изменяет активность α -тромбина по отношению к фактору V и фибриногену.

Протеин S — гликопротеин, состоит из одной полипептидной цепи и выполняет роль кофактора протеина С. Он обладает высоким сродством к отрицательно заряженным фосфолипидам и образует комплекс 1:1 с протеином С на поверхности фосфолипидов. После отщепления тромбином аминоконцевого фрагмента, содержащего остатки гамма-карбоксиглутаминовой кислоты, протеин S теряет Ca^{2+} -связывающие места и кофакторную активность в инактивации фактора Va, находящегося на клеточной поверхности.

Протеин S циркулирует в крови по крайней мере в 2 формах: в свободном и в виде комплекса с С+Ь-связывающим белком. Пониженный уровень свободного протеина S предрасполагает к тромбозам. Поэтому определение этого белка в крови рассматривается как важный элемент скрининга больных с идиопатической тромбофилией.

Под определенным углом зрения к физиологическим антикоагулянтам могут быть отнесены ингибиторы свертывания крови, вырабатываемые кровососущими животными. Среди них наибольшее фармакологическое значение имеет содержащийся в пиявках *Hirudo medicinalis* гирудин. В очищенной форме он впервые был выделен в 1955 г. Ф. Марквардом. Исследование первичной структуры выявили три главных варианта этого белка Hv1, Hv2 и Hv3. Гирудины являются однопептидными полипептидами, состоящими из 65 или 66 аминокислотных остатков, с тремя дисульфидными мостиками. Рекombинантные гирудины имеют те же аминокислотные последовательности и структуру, как и их естественные изоформы, но лишены сульфатной группы при тирозине 63.

Гирудин тормозит протеолитическую активность тромбина, образуя тесный комплекс с этим ферментом. Взаимодействие гирудина с тромбином весьма специфично. Неизвестна ни одна другая протеаза, которая ингибирует

ся гирудином. Исследование кристаллических структур тромбин-гирудинового комплекса позволило создать основу для понимания специфичности. Гирудин тормозит тромбиновую активность посредством ранее неизвестного механизма, который охватывает активный центр фермента, а также область тромбина, лежащую за пределами щели, где располагается активный центр. Три N-концевых аминокислотных остатка (Вал 1, Вал 2, Тир 3) связаны со щелью активного центра путем образования ряда гидрофобных взаимодействий. Однако, в отличие от других ингибиторов протеолитических ферментов, полипептидный скелет ориентирован в другом направлении. Более того, первичный карман специфичности тромбина не занят гирудином. С-концевая область гирудина, содержащая остаток глутамата, связана с положительно заряженным желобком на поверхности тромбина. Специфичность взаимодействия гирудина с тромбином, очевидно, обусловлена не малым, а большим числом контактов, вовлекающих обширные площади на обеих молекулах. Гирудин задерживает генерацию тромбина из протромбина, по-видимому, путем снижения локальной концентрации тромбина, необходимой для аутоактивации путем включения обратной связи. В то же время он существенно не конкурирует с фибриногеном за тромбин.

Липоидный (волчаночный) антикоагулянт представляет собой аутоантитела (IgG, IgM), направленные против отрицательно заряженных фосфолипидов. Наличие таких аутоантител обнаруживается по замедлению фосфолипидзависимых тестов свертывания крови. Волчаночный антикоагулянт был впервые описан у пациентов, страдающих системным волчаночным эритематозом. Однако в настоящее время он обнаружен и при других аутоиммунных заболеваниях, неоплазмах, инфекционных процессах и даже у здоровых людей.

Заключение

Известные в настоящее время ферменты, катализирующие реакции свертывания крови, образуют мультиферментную систему. Основные белки мультиферментной системы представляют собой ансамбли, возникающие путем адсорбции на границе раздела

фаз (рис. 1). В первый блок входят фактор XII, прекалликреин, высокомолекулярный кининоген и фактор XI. Они создают ансамбль при адсорбции на чужеродных отрицательно заряженных поверхностях (матрицах), хотя возможно его слабое функционирование в жидкой фазе под действием катехоламинов. Второй блок включает факторы VIII, IX, X, протромбин, фактор V, Ca^{2+} и тромбоциты. Под влиянием продукта контактной активации на поверхности осколков тромбоцитов они формируют ансамбль, генерирующий тромбин. Третий блок зарождается на матрице мембранных осколков клеток (тканевого тромбопластина) из факторов VII и X, протромбина, фактора V, Ca^{2+} . Среди этих реакций имеются две ключевые — возникновение фактора XII и фактора VIIa. Учитывая многие перекрестные реакции между названными блоками и реципрокные реакции, мы можем заключить, что генерация тромбина при гемостатических процессах в колотых и резаных ранах протекает одновременно во всех трех блоках.

Активация фактора XII на поверхности коллагеновых волокон ведет не только к инициированию реакций внутренней активирующей системы, но и к превращению одноцепочечной формы фактора VII в двуцепочечную, которая вместе с мембранами поврежденных клеток является мощным активатором фактора X и, кроме того, преобразует фактор IX в фактор IXa на поверхности тканевого тромбопластина. Таким путем факторы свертывания крови создают не просто цепь реакций, а разветвленную сеть с системой самоусиления (положительная обратная связь: калликреин → фактор XII, фактор Xa → фактор VII, тромбин → фактор V и др., характерная для начальной стадии генерации тромбина) и самоограничения (отрицательная обратная связь: фактор Xa → фактор VIIa, тромбин → протромбин и др., выявляющаяся при более глубоком протеолизе на поздних этапах). С учетом физиологических антикоагулянтов в системе факторов свертывания крови представлены совершенные способы регуляции гемостатической функции организмов, которые достигнуты в процессе эволюции ферментов, осуществляющих реакции ограниченного протеолиза.

1. Белицер В. А. Биохимия животных и человека. Свертывание крови и фибринолиз.— Киев, 1982.— Вып. 6.— С. 38—57.
2. Зубаиров Д. М., Тимербаев В. Н., Байкеев Р. Ф. Биохимия животных и человека.— Киев, 1982.— Вып. 6.— С. 26—28.
3. Литвинов Р. Н.//Казанский мед. ж.— 1984.— № 3.— С. 203—213.
4. Струкова С. М. Биохимия животных и человека. Свертывание крови и фибринолиз.— Киев, 1982.— Вып. 6.— С. 26—38.
5. Baglia F. A., Sinha D., Walsch P. N.// Blood.— 1989.— Vol. 74.— P. 244—251.
6. Bloom.//Thromb. Res.— 1989.— Vol. 54.— P. 261—268.

7. Cochrane C. G., Griffin J. H.//Adv. Immunol.— New-York, 1982.— Vol. 33.— P. 241—306.
8. Fleck R. A., Rao L. V. M., Rapaport S. J., Varki N.//Thromb. Res.— 1990.— Vol. 57.— P. 765—781.
9. Komiyama Y., Pedersen A. H., Kisiel W.//Biochemistry.— 1990.— Vol. 29.— P. 9418—9425.
10. Resenberg R. D.//Am. J. Med.— 1989.— Vol. 87.— P. 3—12.
11. Sakai T., Kisiel W.//J. Biol. Chem.— 1990.— Vol. 265.— P. 9105—9113.
12. Wildgoose F., Kazim A. L., Kisiel W.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1990.— Vol. 87.— P. 7290—7294.

Поступила 30.11.93.

УДК 616—089.8—072.1

НОВЫЕ ИНСТРУМЕНТЫ ДЛЯ ЭНДОХИРУРГИИ

А. Е. Морошек, А. Н. Чугунов, В. В. Одинцов,
И. В. Федоров, Р. Ф. Гайфуллин, Л. Л. Попович

Казанская фирма «Эндомедиум» (директор — А. Е. Морошек), кафедра травматологии и хирургии (зав.— проф. Р. А. Зулкарнеев) Казанского ордена Трудового Красного Знамени медицинского института имени С. В. Курашова, городская клиническая больница № 18 (главврач — К. Ш. Зиятдинов), г. Казань

Расширение спектра лапароскопических операций требует создания новых инструментов, обеспечивающих простоту и надежность хирургических вмешательств, сокращающих их продолжительность и частоту осложнений.

За последний год инженерами и хирургами фирмы «Эндомедиум» созданы оригинальные инструменты, отвечающие указанным выше требованиям.

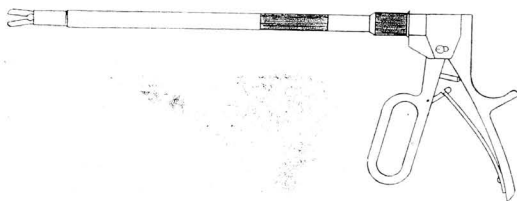


Рис. 1. Апликатор для наложения клипс.

Данный инструмент предназначен для клипирования сосудов, пузырного протока и других трубчатых структур в эндохирургии. При использовании апликаторов зарубежных фирм («К. Шторц» и др.) сжатие клипсы обеспечивается браншами за счет их втяжения в гильзу корпуса инструмента. При этом бранши неизбежно отступают от клипируемого образования на 2—3 мм. Предотвращение

этого нежелательного момента требует встречного движения руки хирурга с инструментом в момент наложения клипсы.

Предлагаемый инструмент отличается тем, что в момент сжатия ручек апликатора гильза надвигается на бранши, причем сжимая клипсу не перемещается относительно тканей. Это упрощает манипуляцию и делает ее более безопасной.

Рационализаторское предложение № 1010/16 зарегистрировано в Казанском медицинском институте 22.12.1993 г.



Рис. 2. Петлевой электрод для лапароскопической хирургии.

Это устройство используется для рассечения, коагуляции и тупой препаровки тканей. Традиционно применяемый Л-образный электрод предназначен для рассечения и коагуляции тканей. Однако по ходу операции нередко возникает необходимость в препаровке тканей, особенно в зоне треугольника Кало, в области устья маточной артерии и др. Л-образный же электрод может повредить жизненно важные структуры.