

ТЕОРИИ ИНИЦИИРОВАНИЯ ВНЕШНЕЙ СВЕРТЫВАЮЩЕЙ СИСТЕМЫ КРОВИ

Р. Ф. Байкеев

*Кафедра биохимии (зав.—акад. АН РТ, проф. Д. М. Зубаиров)
Казанского медицинского института*

Общепринято, что инициирование внешнего пути через фактор VII для соматических клеток возможно в результате травматического воздействия на ткань. К настоящему времени выдвинуты три гипотезы, объясняющие инициацию свертывания крови по внешнему пути. Первая гипотеза предполагает инициацию свертывания крови при обнажении торцовых граней мембран разрушенных клеток. Согласно второй гипотезе, в основе специфического взаимодействия тканевого тромбопластина с факторами, участвующими во внешнем пути свертывания крови, лежит асимметричное размещение не только фосфолипидов, но и интегрального апопротенида III в клеточной мембране. Центр связывания факторов VII, V и X находится на цитоплазматической поверхности цитомембраны. Это обеспечивает как сохранение жидкого состояния крови в циркуляции, так и начало гемостатического процесса при повреждении наружной клеточной мембраны.

Третья гипотеза основывается на данных, что фосфатидилсерины и фосфатидилэтаноламины сосредоточены на цитоплазматической поверхности липидного бислоя клеточной мембраны, а апопротенид III выступает на внешнюю поверхность клеточной мембраны. При таком расположении компонентов тромбопластина на разных сторонах интактной мембраны фактор III может пребывать до разрушения клетки в латентной форме.

Что касается первой гипотезы, то полученные нами результаты методом ^1H и ^{31}P -ЯМР свидетельствуют о том, что в тканевом тромбопластине, как и в водной липидной дисперсии, торцовых граней как таковых нет, так как углеводородная область жирнокислотных радикалов фосфолипидопротеиновых комплексов тканевого тромбопластина не контактирует с водным раствором.

Как следует из двух других гипотез, появление тромбопластической ак-

тивности в мембране связывают с механическим повреждением.

Активация внешнего пути свертывания является частным случаем взаимодействия по типу лиганд-рецептор, так как наши исследования ^1H , ^{19}F , ^{23}Na , ^{31}P -ЯМР и ЭПР не выявили корреляцию между фазовым состоянием, коэффициентом самодиффузии липидов и гемокоагуляционной активностью тромбопластина.

Топология центров связывания и активации фактора VII в структуре плазматической мембраны клетки длительное время была предметом экспериментальных исследований. Установлено, что эти центры локализованы преимущественно на наружной поверхности клеток. Обнаружены единичные клетки, в которых они расположены исключительно на внутренней поверхности плазматической мембраны. Степень экспонирования апопротенида III-содержащих центров на наружную поверхность плазматической мембраны в нативных неповрежденных клетках колеблется от 100% до 0%. Соответственно степень увеличения тромбопластической активности клеток при их механическом разрушении варьирует от 0 до 62 раз.

Само по себе механическое повреждение тканей не обязательно приводит к изменению биологической активности комплекса апопротенид III—фосфолипиды плазматических мембран клеток. Деструкция мембран не всегда является иницирующим моментом активации фактора VII. Более того, именно целостность плазматической мембраны клетки определяет величину k_{cat} . Так, значения k_{cat} уменьшаются в ряду цельная клетка — апопротенид III-содержащие фосфолипидные везикулы — неочищенный тканевой фактор и составляют соответственно 14—14,1 с^{-1} , 5—6 с^{-1} и 1,1 с^{-1} .

Согласно третьей гипотезе, решающим моментом в обретении клеточной поверхностью способности связывать и

активизировать витамин К-зависимые факторы является индуцированная ионами Ca^{+2} транслокация (переход «флип-флоп») фосфатидилсеринов и фосфатидилэтаноламинов из внутреннего во внешний монослой клеточной мембраны. Этот переход, по мнению авторов, вызывает дальнейшую Ca^{2+} -опосредованную перестройку мембраны, появление в ней обращенной цилиндрической и мицеллярной мезофаз и утрату исключительно бислойной структуры.

По нашему мнению, переходы типа «флип-флоп» имеют значение при активации только внутреннего пути свертывания. В пользу этого свидетельствуют данные и других исследователей.

1. Трансбислойное движение липидов происходит с частотой $2,7\text{--}3,8\text{ мин}^{-1}$, латеральное перемещение липидной молекулы — за $100\text{--}200\text{ нс}$, температурная фазовая перестройка липида — за $1\text{--}10\text{ нс}$, тогда как время свертывания по внешнему пути составляет всего несколько секунд.

2. Одним из механизмов, ускоряющих трансбислойный переход, считали образование обращенных мицелл или иных небислойных мезофаз в местах формирования везикул из плазматических мембран клеток. Однако последние исследования показали, что везикуляция не влияет на скорость подобных переходов в клетке.

3. Посттрансляционная модификация апопротеида III в виде гликозилирования необходима для транспортировки, экспонирования на наружную поверхность и везикуляции плазматической мембраны апопротеид III-содержащих клеток. При везикуляции плазматических мембран имеют место образование инвертированных мицелл и увеличение удельной тромбопластической активности на единицу белка в составе мембран. Однако временной интервал между экспонированием апопротеида III на поверхность цельных клеток, сформировавшихся из них везикул и проявлением этими структурами максимальной тромбопластической активности превышает 2 часа.

4. Активация протромбина фактором Ха в присутствии фактора Va возможна на поверхности фосфолипидной матрицы, имеющей суммарный положительный заряд. Критическим является содержание фосфатидилсерина, которое должно быть не

менее 3 моль %. В наружном монослое природных плазматических мембран находится 6% от общего количества ФС, однако этот показатель может превышать и 50%.

5. Возрастание концентрации в цитоплазме Ca^{2+} увеличивает частоту транслокации липидов, и этот процесс коррелирует с активацией тромбоцитов.

Обобщая полученные результаты и данные по изучению взаимодействия фактора VII с апопротеид III-содержащими модельными мембранами и культурой клеток, мы можем сделать следующее заключение. Иницирующим моментом тромбопластической реакции является контакт фактора VII в присутствии Ca^{2+} с поверхностью апопротеид III-содержащей мембраны. Если это сопровождается повреждением ткани, то увеличивается число контактирующих с плазмой крови центров связывания и активации фактора VII. Фосфолипиды при этом реорганизуются из биламеллярной в мицеллярную, гексагональную (H_{11}) или в какую-то иную лиотропную мезофазу, и возрастает подвижность жирнокислотных радикалов липидов. Удельную тромбопластическую активность мембраны, помимо числа центров связывания фактора VII, определяет специфичность ориентации фосфолипидов вокруг апопротеида III. Это зависит как от динамического конформационного состояния апопротеида III, так и от состава спектра пограничных фосфолипидов.

Возрастание подвижности пограничных липидов коррелирует с увеличением тромбопластической активности мембран. Клеточные мембраны не следует рассматривать как чисто механическую матрицу с определенной мозаикой зарядов, на поверхности которой идет свертывание крови, так как нормальные и опухолевые клетки обнаруживают способность к регуляции свертывания крови. Это происходит не только за счет физической перестройки плазматической мембраны в результате изменения фазового состояния, диффузии, «флип-флопа» липидов и белков, но и за счет синтеза де novo белковых факторов, экспрессируемых на поверхности клетки и активно воздействующих на реакции свертывающей и противосвертывающей систем крови.

Поступила 17.01.94.

Summary

The correlation of our results and well-

known experimental data with theoretical conceptions of molecular mechanisms of the initiation of external coagulant blood system is performed.

УДК 612.112.31+612.115+612.112.3

ФИБРОНЕКТИН, ГЕМОСТАЗ И ФАГОЦИТОЗ

Р. И. Литвинов

Кафедра биохимии (зав.— акад. АНТ, проф. Д. М. Зубаиров)
Казанского медицинского института

Известно, что важнейшая роль в поддержании гомеостаза и неспецифической защите организма принадлежит совокупности клеток и гуморальных агентов, осуществляющих процессы гемостаза и фагоцитоза. Каждый из этих механизмов в отдельности изучен весьма подробно, однако сравнительно мало известно об их взаимодействии между собой, от которого может существенно зависеть интегральная реакция организма на повреждение. Одним из материальных связующих звеньев между фагоцитами и компонентами системы гемостаза может служить белок фибронектин, доказательством этого являются приводимые ниже данные.

Фибронектин (ФН) представляет собой гетерогенную популяцию молекул, незначительно отличающихся по структуре, но выполняющих разные функции в зависимости от места синтеза и локализации. Одна из форм этого белка присутствует в крови в концентрации около 0,3 г/л и известна под названием плазменного ФН. Его отличительной чертой является способность к множественным взаимодействиям с разнообразными макромолекулами, в том числе с такими, которые прямо или косвенно причастны к гемостатическим процессам.

Первыми тромбогенными веществами, для которых было показано высокое средство к ФН, оказались фибриноген и фибрин-мономер [16, 18]. Однако особенность подобных исследований состоит в том, что связывание ФН с фибриногеном и фибрин-мономером демонстрируется либо в осадке, что не исключает возможности неспецифического соосаждения белков, либо в гетерофазной системе, далекой от физиологических условий. Из полученных нами данных следует, что взаимо-

действие ФН с предшественниками фибрина существует и в растворе. Модельные опыты прямо указывают на включение плазменного ФН в состав растворимых комплексов фибрин-мономера (РКФМ) в процессе активации системы свертывания крови. Важно подчеркнуть, что комплексообразование ФН происходит как при ингибировании фактора XIIIa, так и с его участием. Иными словами, ковалентной сшивке ФН предшествует его нековалентное присоединение к растворимым предшественникам фибрина (неопубликованные данные).

В чистой системе, содержащей фибриноген, ФН и фактор XIIIa, происходило образование сополимера ФН и фибриногена, названного гетеронектином [15]. При концентрации ФН, которая соответствует его нормальному содержанию в плазме, фибриноген образовывал олигомеры различной длины, вплоть до гептамера, прежде чем присоединялась молекула ФН. Растворимые ковалентно сшитые комплексы ФН с фибриногеном обнаружены также в плазме крови пациентов с лейкозом; при этом фракция ФН, выявляемая методом перекрестного иммуноэлектрофореза в составе растворимых комплексов с фибрин(оген)ом, была названа фибронектином С [11].

Совокупность приведенных данных убедительно подтверждает, что плазменный ФН способен взаимодействовать с фибриногеном и, особенно, с промежуточными продуктами его превращения в фибрин. Возникает естественный вопрос о том, каково физиологическое значение этого взаимодействия.

Первая гипотеза связана с предположением о воздействии ФН на скорость и полноту образования фибринового сгустка. Известно, что много-