

ТКАНЕВОЙ ТРОМБОПЛАСТИН

Р. Ф. Байкеев

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

Появление в кровяном русле тканевого тромбопластина (фактор III, тканевой фактор) приводит к одному из наиболее опасных неспецифических нарушений гемокоагуляции — диссеминированно-внутрисосудистому свертыванию крови (ДВС). Хотя компоненты тромбопластической реакции известны, до настоящего времени не детализована молекулярная организация тканевого тромбопластина в той мере, которая необходима для понимания инициации внешнего пути свертывающей системы крови.

Тромбопластическим действием обладают мембраны клеток, способные активировать фактор VII свертывающей системы плазмы крови в присутствии Ca^{2+} [16]. Раздельно белковая и липидная части мембран лишены тромбопластической активности. Из всей массы мембранных белков определяющую роль в проявлении гемокоагуляционной активности фактора III играет интегральный гликопротеид — апопротеид III с молекулярной массой 43 000—47 000 дальтон [6, 8]. Электронно-микроскопически тканевой тромбопластин представляет собой концентрически организованные мембранные структуры. Тканевой тромбопластин образует очень стабильный стехиометрический комплекс с фактором VII (1:1) в присутствии Ca^{2+} [5], где фактор VII трансформируется в свою активную форму — фактор VIIa [16]. Не удается вызвать диссоциацию этого комплекса. Фактор VII можно выделить из этого комплекса только после разрушения фосфолипидной части тромбопластина фосфолипазой С. Сам фактор VII при этом не повреждается: при добавлении новых порций тканевого тромбопластина он реактивируется.

Комплекс тромбопластин — фактор VIIa инициирует реакции и внутреннего пути системы свертывания плазмы крови посредством активирования фактора IX в фактор IXa путем протеолитического расщепления связей arg146-ала147 и arg181-вал182 с отщеплением активационного пептида в 10 000 дальтон [19]. Эта связь может служить объяснением сравнительно слабой кровотоковости у людей с врожденными нарушениями начальной части внутреннего пути свертывания (дефицит факторов XII, XI, прекалликреина, высокомолекулярного кининогена).

Основными объектами исследования в процессе изучения структуры тромбопластина являются: 1) молекулярная организация плазматических мембран клеток, способных синтезировать апопротеид III; 2) препараты тканевого тромбопластина из головного мозга, легких и плаценты как органы, обладающие высокой удельной тромбопластической активностью; 3) модельные системы путем рекомбинации высокоочищенных препаратов апопротеида III и бинарных, тройных или поликомпонентных смесей липидов.

В целом клетки можно разделить на три категории: постоянно синтезирующие апопротеид III (трофобласты, клетки глиомы), приобретающие эту способность после индукции различными биохимическими агентами (моноциты, макрофаги, эндотелиальные клетки), лишённые способности

синтезировать апопротеид III (лимфоциты, гранулоциты).

Форболовые диэстеры из ряда опухолевых промоторов, из которых наиболее активен 12-О-тетрадеканойлфорбол-13-ацетат, являются стимуляторами возрастания тромбопластической активности ряда клеток, включая фибробласты [10]. Пределы возрастания тромбопластической активности клеток весьма велики. Например, тромбопластическая активность эндотелиальных клеток при инкубации с α -тромбином увеличивается в 12 раз, а с эндотоксином — в 60 раз. Менингококковая инфекция вызывает 300-кратное возрастание тромбопластической активности моноцитов человека [18]. В клинических исследованиях наблюдалась строгая корреляция между повышением уровня фибринопептида А в крови и прокоагулянтной активностью моноцитов. Указанное возрастание активности на 40—60% ингибируется актиномицином-D или α -аманитином, что свидетельствует об участии РНК и белкового синтеза. Кроме этого, на процесс синтеза апопротеида III влияет уровень циклических нуклеотидов, внутриклеточных ионов Ca^{2+} и трансметилирование [20]. Возрастание тромбопластической активности клеток является причиной тромбозов в воспаленных органах и в некоторых случаях при злокачественных опухолях, миеломоноцитарной лейкемии, гломерулонефритах, ревматоидных артритах и синдроме ДВС [14]. Даже 20—40-кратное увеличение тромбопластической активности клеток, имеющих контакт с циркулирующими в кровяном русле факторами гемокоагуляции, приводит к летальному исходу [18].

Повышение тромбопластической активности клеток можно объяснить несколькими причинами. Во-первых, увеличением количества центров связывания фактора VII на поверхности клеток в ходе синтеза апопротеида III. Показано, что 60—80% вновь синтезированного апопротеида III в структуре плазматических мембран моноцитов экспонировано на поверхности клетки [17]. Во-вторых, большинство из биохимических агентов, усиливающих тромбопластическую активность клеток, обладает многообразными воздействиями на плазматическую мембрану, проявляющимися в усилении синтеза фосфолипидов, возрастании жидкости мембраны, а также изменениями в морфологии, свойствах роста и гликопротеидах клеточной поверхности. Указанные изменения могут вызывать фрагментацию плазматических мембран в виде везикул [11] и появление в кровяном русле активных комплексов между фактором VII/VIIa и фосфолипидами [14]. В-третьих, возможно, моноциты и мононуклеарные клетки периферической крови после стимулирования биохимическими агентами синтезируют факторы VII, V и выделяют их в активной форме на своей поверхности [22].

Препараты мембран, обладающие высокой удельной тромбопластической активностью, в частности тромбопластин из головного мозга человека, находят широкое применение в экспериментальных и клинических лабораториях, занимающихся изучением гемокоагуляции. Образцы тканевого тром-

бопластина, полученные из разных органов и даже разных видов млекопитающих, идентичны препарату тканевого тромбопластина из головного мозга человека по ряду критериев: 1) нейтрализация специфическими антителами к апопротеиду III из мембран головного мозга; 2) инактивация очищенной фосфолипазой С (КФ 3.3.4.3); 3) отсутствие ускорения гемокоагуляции в плазме с дефицитом фактора VII. Однако максимальная гемокоагуляционная активность тромбопластина проявляется в системах с гомологичной плазмой.

Видовая специфичность тканевого тромбопластина определяется его белковым компонентом — апопротеидом III. Из всех аминокислот в структуре апопротеидов фактора III, полученных из различных органов и даже разных видов животных, около 40 моль% приходится на долю гидрофобных аминокислот. Показано, что апопротеид III, подобно другим мембранным белкам, имеет неупорядоченную структуру с малым содержанием α - и β -конформаций. Гипотетически в структуре апопротеида III выделяются 3 различных домена [21]: вневелеточный (с 1 по 219-й аминокислотный остаток), гидрофобный (с 220 по 242-й остаток) и цитоплазматический (с 243 по 263-й остаток). Наличие маннозы в составе апопротеида III коррелирует со способностью фактора III связывать конканавалин А, так как известно, что последний может вступать в связь с α -D-глюкопиранозильными или α -D-маннопиранозильными остатками. Установлено, что конканавалин А взаимодействует с фактором III и ингибирует его гемокоагуляционную активность. При этом одновременно изменяются и адгезивные свойства клеток, хотя тканевой тромбопластин не является синонимичным с центрами адгезии на клеточной поверхности [24]. По данным трансмиссионной электронной микроскопии, тканевой тромбопластин не подвергается никаким внешним различиям и изменениям в ходе гемокоагуляции.

До настоящего времени считалось, что апопротеид III проявляет свое прокоагулянтное действие будучи внедренным только в бислойную фосфолипидную мембрану [5]. Проведенные нами исследования показали, что электронно-микроскопически основная масса вещества в препарате тканевого тромбопластина из головного мозга человека представлена детритом, состоящим из конгломератов липопротеидных комплексов. Сохранены лишь отдельные мембраноподобные структуры. По данным ^{31}P - и ^1H -ЯМР-исследований, фосфолипиды организованы в гексагональную (H_{11}) лиотропную мезофазу. Наружу экспонировано 10—20% полярных головок фосфолипидов, а остальная часть находится внутри конгломерата, где она образует как чисто липидные гексагональные цилиндры, так и комплексы с белками [2]. По данным ^{31}P -ЯМР-исследований микросомальной фракции печени (мембранных структур, обладающих тромбопластической активностью), фосфолипиды в этих препаратах организованы в мицеллярную лиотропную мезофазу. Более того, переход фосфолипидов из мицеллярной в биламеллярную мезофазу приводит к снижению тромбопластической активности препаратов микросом [13]. Таким образом, организация фосфолипидного компонента мембран, обладающих активностью фактора III, в бислойную структуру, по всей вероятности, не является непременным условием для проявления их гемокоагуляционной активности.

Активность тканевого тромбопластина, полученного рекомбинацией апопротеида III и фосфолипидов, зависит от пропорции рекомбинируемых частей. Оптимальное молекулярное соотношение

фосфолипид : очищенный апопротеид III варьирует в широких пределах и по одним данным составляет 80 [7], а по другим — 30 000 [6] и даже 86 300 [5]. Это соотношение увеличивается по мере возрастания степени очистки апопротеида III.

На основании имеющихся в настоящее время данных можно полагать, что попытки выделить специфический индивидуальный фосфолипид, участвующий в свертывании крови, не удалось. Фосфатидилэтанолламины и фосфатидилхолины составляют основную часть липидов, участвующих в свертывании крови. Включение небольшого количества фосфатидилсерина оказалось очень важным для получения препарата, обладающего высокой тромбопластической активностью. В исследованиях методом ^{31}P -ЯМР показано, что добавление апопротеида III к смеси фосфатидилэтанолламина и фосфатидилхолина приводит к иммобилизации на белке полярных головных групп этих липидов [12]. За счет отрицательного заряда в присутствии ионов Ca^{2+} фосфолипиды в структуре тканевого тромбопластина притягивают факторы II, VII, X, а также фактор V. По данным ^{31}P -ЯМР-исследований, ионы Ca^{2+} при взаимодействии с тканевым тромбопластином не изменяют фазового состояния липидов, однако при этом возрастает ригидность фосфолипидного компонента [1]. Отдельно белковый компонент тромбопластина связывает ионы Ca^{2+} слабо, а в мембранных тромбопластических структурах выявлено наличие сильных ($K_d=5 \cdot 10^{-6}\text{M}$), средних ($K_d=3 \cdot 10^{-6}\text{M}$) и двух типов слабых центров связывания ионов Ca^{2+} [23].

Структурная организация модельных систем отличается от таковой нативных мембранных структур, обладающих тромбопластической активностью. Подтверждением этого являются следующие экспериментальные данные.

1. Суммарная тромбопластическая активность ацетонového порошка из головного мозга составляет 4×10^4 единиц тканевого тромбопластина на 1 г препарата, а экстракция апопротеида III с последующей релипидацией увеличивает этот показатель до 8×10^5 единиц, то есть в 20 раз [6].

2. Воздействие трипсина, химотрипсина и тромбина не изменяет прокоагулянтной активности очищенного апопротеида III [6], хотя в структуре исходного препарата тканевого тромбопластина из головного мозга модификация белкового компонента протеолитическими ферментами (папаином или трипсином) существенно снижает гемокоагуляционную активность тромбопластина [3, 4].

3. Радиоактивно меченный фактор VII и антитела к апопротеиду III были использованы как гистохимические маркеры для определения локализации тканевого тромбопластина. В этих экспериментах было показано, что центры связывания фактора VII, предполагаемого маркера для тромбопластической активности, и иммунные детерминанты расположены на наружной поверхности плазматической мембраны эндотелиальных клеток [15]. Однако в структуре липидного бислоя, полученного обработкой фосфолипидов ультразвуком, апопротеид III распределялся равномерно между наружной и внутренней поверхностью везикул [5].

4. Иммобилизованный на сефарозе фактор VII способен взаимодействовать с апопротеидом III и в отсутствие фосфолипидов [8]. Однако тканевой тромбопластин даже после взаимодействия с фактором VII в присутствии ионов Ca^{2+} теряет активность после деградации липидной части под воздействием фосфолипазы С.

5. На модельных мембранных структурах константа диссоциации для факторов VII и VIII соста-

вила 13,2 и 4,5 нмоль, соответственно, а результаты, полученные при исследовании моноцитов человека, существенно различались. Константа диссоциации для этих факторов — около 80 пкмоль [9].

Несмотря на перечисленные различия, нативные мембраны и модельные системы сходны в том, что они характеризуются высокой удельной тромбопластической активностью.

Таким образом, для понимания инициации свертывания крови по внешнему пути и успешной разработки патогенетических лечебных средств, предотвращающих развитие ДВС-синдрома, необходимо сочетанное исследование как модельных, так и нативных мембранных структур, обладающих тромбопластической активностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Байкеев Р. Ф., Зинин В. Н., Ильясов А. В. // В кн.: Тезисы докладов VII республиканской конференции молодых ученых-химиков. Часть I. Биоорганическая и органическая химия. — Таллин, 1987.
2. Байкеев Р. Ф., Зубаиров Д. М., Ильясов А. В. // В кн.: Тезисы Всесоюзной конференции «Фундаментальные достижения нейробиологии — медицина». — Горький, 1987.
3. Байкеев Р. Ф., Свинтёнок Г. Ю., Соболева И. В. и др. // В кн.: Клинические и экспериментальные аспекты регуляции агрегатного состояния крови. — Саратов, 1984.
4. Зубаиров Д. М., Соболева И. В., Важинская З. В. и др. // Биохимия. — 1981. — № 7. — С. 1210—1214.
5. Bach R., Gentry R., Nemerson Y. // Biochemistry. — 1986. — Vol. 25. — P. 4007—4020.
6. Bach R., Nemerson Y., Konigsberg W. // J. Biol. Chem. — 1981. — Vol. 256. — P. 8324—8331.
7. Bjorklid E., Storm E., Prydz H. // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1973. — Vol. 55. — P. 969—976.
8. Bom J. J., Ram I. E., Alderkamp G. H. J.

- et al. // Thromb. Research. — 1986. — Vol. 17. — P. 635—644.
9. Broze G. J. // J. Clin. Invest. — 1982. — Vol. 68. — P. 526—526.
10. Diamond L., O'Brien S., Donaldson C. et al. // Int. J. Cancer. — 1974. — Vol. 13. — P. 721—730.
11. Dvorak H. F., De Water L. van Bitter A. M. et al. // Cancer Res. — 1983. — Vol. 43. — P. 4334—4342.
12. Gardiner J. E., Howell R. M. // Biochem. Soc. Trans. — 1981. — Vol. 9. — P. 149—150.
13. Jordan F., Howell R. M. // Biochem. Soc. Trans. — 1982. — Vol. 9. — P. 49—50.
14. Lyberg T. // Haemostasis. — 1984. — Vol. 51. — P. 430—440.
15. Maynard J. R., Heckman C. A., Pitlick F. A. et al. // J. Clin. Invest. — 1975. — Vol. 55. — P. 814—824.
16. Nemerson Y. // Biochemistry. — 1966. — Vol. 5. — P. 601—608.
17. Osterud B., Bjorklid E. // Scand. J. Haematol. — 1982. — Vol. 21. — P. 175—184.
18. Osterud B., Flagstad T. // Thrombos. Haemostas. — 1983. — Vol. 49. — P. 5—7.
19. Osterud B., Rapaport S. I. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1977. — Vol. 74. — P. 5260—5264.
20. Prydz H., Helland O., Johnson U. et al. // Thrombos. Haemostas. — 1983. — Vol. 50. — P. 175—175.
21. Spicer E. R., Horton R., Boem L. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1987. — Vol. 24. — P. 5148—5152.
22. Tracy P. B., Rohrbach M. S., Mann K. G. // Thrombos. Haemostas. — 1983. — Vol. 50. — P. 176—176.
23. Wijngaards G., Immerzeel J. // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1977. — Vol. 77. — P. 658—664.
24. Zacharski L. R., Rosenstein R., Phillips R. G. // Blood. — 1974. — Vol. 44. — P. 783—787.

Поступила 14.06.88.

УДК 616.151.5—008.6—001.36—092—07

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ДИАГНОСТИКИ СИНДРОМА ДИССЕМНИРОВАННОГО ВНУТРИСОСУДИСТОГО СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ ПРИ ШОКЕ

Р. И. Литвинов, Г. М. Харин

Кафедра биохимии (зав.— проф. Д. М. Зубаиров), кафедра судебной медицины (зав.— доц. Р. Я. Якупов) Казанского ордена Трудового Красного Знамени медицинского института имени С. В. Курашова

Изменения системы гемостаза при экстремальных воздействиях на организм являются на протяжении многих лет предметом пристального внимания клиницистов и патологов. Особый интерес к данной проблеме обусловлен наиболее часто встречающейся в практике совокупностью нарушений, известной под названием диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови (синонимы: тромбогеморрагический синдром, коагулопатия потребления, вторичный фибринолиз, гипофибриногенемия, коагулопатический синдром и др.). Исходя из современных представлений о шоке как о процессе, в основе которого лежит системное на-

рушение микрогемодикуляции: неадекватной оксигенацией тканей и нарушением клеточного метаболизма, патогенетическая роль ДВС становится особенно значимой. Наличие ДВС при шоке признается почти безоговорочно, причем независимо от этиологии постагрессивных состояний синдром ДВС нередко является самым ярким и хорошо документируемым признаком шоковой реакции [10, 23, 34, 35, 52]. Обычно синдром ДВС рассматривается как проявление и важный патогенетический компонент шока, однако в ряде ситуаций этот процесс выступает как этиологический фактор, обуславливающий вторичное развитие шока в ре-