

ТРОМБОПЛАСТИН, ИММОБИЛИЗОВАННЫЙ НА ПОЛИСТИРОЛОВОЙ ПОВЕРХНОСТИ, ОБЛАДАЕТ КИНЕТИЧЕСКИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ, БЛИЗКИМИ К ТАКОВЫМ ДЛЯ НАТИВНОГО БЕЛКА, И АКТИВИРУЕТ СВЕРТЫВАНИЕ КРОВИ *in vitro* АНАЛОГИЧНО ТРОМБОПЛАСТИНУ НА ФИБРОБЛАСТАХ

© 2010 г. О.А. Фадеева^{1*}, М.А. Пантелеев^{1,3}, С.С. Карамзин¹,
А.Н. Баландина³, И.В. Смирнов¹, Ф.И. Атауллаханов^{1,2,3}

¹ Гематологический научный центр РАМН, 125167 Москва,
Новый Зыковский проезд, 4а; факс: (495)612-0839,
электронная почта: anela5@yandex.ru

² Физический факультет Московского
государственного университета им. М.В. Ломоносова,
119991 Москва; факс: (495)939-0126

³ Центр теоретических проблем физико-химической
фармакологии РАН, 117977 Москва, ул. Косыгина, 4;
факс: (495)938-2533

Поступила в редакцию 21.08.09

Описан метод иммобилизации трансмембранного белка – тромбопластина (тканевого фактора) на полистироловой поверхности. Этот фактор является главным активирующим фактором, запускающим процесс свертывания крови. Он является кофактором фактора VIIa – первой протеазы в каскаде протеолитических реакций свертывания. Предложенный метод сохраняет кинетические характеристики фактора, свойственные для нативного тканевого фактора на поверхности фибробластов. Кинетика связывания с фактором VIIa и ферментативной активности образующегося комплекса подчиняются кинетике Михаэлиса–Ментен, что характерно и для нативного комплекса. Небольшое отличие состоит в том, что константа диссоциации для тканевого фактора, иммобилизованного на полистироловую поверхность, в 2,7 раз больше, чем для нативного. Предлагаемый метод иммобилизации обеспечивает плотность белка на активирующей поверхности, соответствующей плотности тканевого фактора на поверхности фибробластов. Иммобилизованный тканевой фактор может быть использован для активации свертывания крови в методах, имитирующих пространственную динамику роста тромба *in vitro*. Исследование в этом направлении позволит регистрировать как гипо-, так и гиперкоагуляционные состояния системы. Этот подход выгодно отличается от традиционных методов оценки состояния системы свертывания, регистрирующих, в основном, только гипокоагуляцию. Исследование времени хранения показало, что активаторы с иммобилизованным тканевым фактором можно хранить и использовать в методе по изучению пространственной динамики образования фибринового сгустка минимум 100 дней.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: тромбопластин, тканевой фактор, иммобилизация, кинетика комплекса фактор VIIa – тромбопластин, пространственная динамика свертывания крови.

Нарушения свертывания крови являются одной из ведущих причин смертности в современном мире, поскольку непременно возникают при сепсисе, травме, многих видах рака, тяжелых кровопотерях, любых существенных операционных вмешательствах и т.д. [1]. Диагностика

этих нарушений до сих пор остается очень несовершенной и позволяет выявлять далеко не все нарушения в системе гемостаза. Основным идейным недостатком большинства существующих тестов является то, что свертывание протекает одновременно во всем объеме исследуемой пробы, и это принципиально отличается от условий, в которых сгусток-тромб образуется в живом организме. Сейчас нет сомнений в том, что результаты таких тестов мало чувствительны к ряду стадий процесса.

Принятые сокращения: ТФ – тканевой фактор, СТИ – corn trypsin inhibitor.

* Адресат для корреспонденции.

Система гемостаза представляет собой сложный каскад ферментативных реакций [2]. В этом каскаде серия сериновых протеаз активирует одна другую. Предшественники этих протеаз присутствуют в плазме крови в неактивной форме и могут быть активированы в результате сайт-специфического протеолиза. Результатом работы этого каскада последовательных активаций факторов свертывания является протеолитическая активация фибриногена — белка, составляющего 4% всех белков плазмы крови. Фибриноген превращается в фибрин, который полимеризуется и образует гелеобразный сгусток.

Свертывание начинается с контакта крови с поверхностью клеток, находящихся в зоне повреждения стенки сосуда. Клетки, находящиеся под эндотелием, имеют на поверхности белок, который является сигналом для запуска свертывания. Этим главным активатором свертывания является интегральный мембранный белок — тромбопластин (тканевой фактор, ТФ) [3]. Он находится на поверхности всех клеток нашего организма, не имеющих прямого контакта с кровью. Тканевой фактор не обладает ферментативной активностью, но является кофактором фактора свертывания VIIa — сериновой протеазы, присутствующей в крови и имеющей очень низкую протеазную активность. Эта протеаза специфически расщепляет один фактор каскада — фактор X, активируя его. Образование комплекса фактора VIIa с тканевым фактором увеличивает активность VIIa на семь порядков, что и запускает весь каскад и приводит к образованию сгустка [2].

Процесс довольно сложен не только с точки зрения биохимических превращений. Он начинается локально, в зоне повреждения сосуда. Тканевой фактор, как интегральный белок клеточных мембран, не уносится током крови, а остается локализованным в зоне повреждения. Вместе с ним локализуется и его комплекс с фактором VIIa. Но остальные активные факторы свертывания диффундируют в глубь кровотока, вызывая распространение границы сгустка в виде фронта твердой фазы [4]. Предшественники факторов свертывания присутствуют во всей плазме, и существуют множественные обратные связи, в результате которых последний фермент каскада — тромбин, может сам вызывать активацию своего предшественника. Это приводит к сложной динамике процесса, когда в разных частях сгустка и в разные моменты времени происходят определенные биохимические реакции. Пространственная динамика свертывания может быть условно разделена на несколько стадий:

1. Активация: в зоне повреждения кровь контактирует с клетками, имеющими на клеточ-

ных мембранах иммобилизованный тканевой фактор; при этом образуется комплекс VIIa-ТФ, который начинает процесс свертывания, активируя фактор X на поврежденной поверхности.

2. Рост сгустка, который определяется диффузией и образованием новых активных факторов, связанных уже не с активностью комплекса VIIa-ТФ, а обусловленных специальными реакциями поддержания роста.

3. Остановка роста сгустка, которая происходит на довольно большом расстоянии от зоны активации. Она обусловлена особой сетью биохимических реакций, инактивирующих активные факторы свертывания.

В традиционных тестах на свертывание, активаторы добавляются в объем плазмы и все активно перемешивается. В результате доминирующими оказываются реакции только первой стадии. Нарушения в остальных стадиях обнаруживаются такими методами довольно плохо.

Исследование пространственной динамики свертывания крови позволяет наиболее полно смоделировать ту пространственную ситуацию, в которой кровь свертывается непосредственно в кровеносном сосуде. В кровеносной системе человека сгусток пространственно образуется только в небольшой зоне повреждения стенки кровеносного сосуда. При этом можно измерять такие важные характеристики процесса как скорость роста, размер сгустка, образование спонтанных сгустков — информацию, которая недоступна гомогенным методам [5]. Это позволяет одновременно и независимо регистрировать нарушения на всех стадиях процесса. Таким образом было показано, что при классических гемофилиях, когда генетически дефектен один из факторов свертывания, нарушения происходят в фазе роста сгустка, но не активации свертывания, что оказалось довольно неожиданным. Клинические перспективы исследования пространственной динамики свертывания велики, однако его внедрение в клиническую практику тормозится тем, что в представленном в литературе варианте метода для активации свертывания был использован монослой фибробластов, получаемых в первичной культуре клеток [5]. Такая технология является дорогостоящей и трудоемкой и вряд ли может стать рутинной.

В настоящее время рядом компаний производятся разные формы тромбопластина, включая генно-инженерный. Поэтому задачи данного исследования были следующие: 1) разработка поверхности, несущей на себе иммобилизованный тромбопластин; 2) исследование способности этой поверхности активировать свертывание; 3) сравнение разных препаратов тромбопластина и выбор такой технологии, которая могла

бы дать активатор, который явился бы хорошим имитатором зоны контакта поврежденной стенки сосуда с кровью.

Существует два основных метода иммобилизации ферментов: физический – сорбция, и химический – ковалентная сшивка. Мы выбрали химический метод иммобилизации, так как при этом достигается более прочное закрепление белка на поверхности. Кроме того, иммобилизованные белки, как правило, гораздо более стабильны.

Известны многочисленные способы иммобилизации белков на поверхностях различной природы. Один из наиболее распространенных подходов – это химическая модификация поверхности. Например, обработка стеклянной поверхности (3-аминопропил) триэтоксисиланом приводит к связыванию с поверхностью стекла молекул, имеющих в своем составе первичные аминогруппы. В дальнейшем, эти группы ковалентно связываются с белками [6]. Описан способ нитрования поверхности из полистирола нитротетрафторборатом в тетраметилсульфон с последующим восстановлением нитрогрупп хлоридом олова (II), также приводящий к образованию на поверхности первичных аминогрупп [7].

Другой подход состоит в формировании на поверхности пленки из полимера, содержащего в своем составе активные группы, например, аминогруппы. Описан способ подготовки носителя для иммобилизации ферментов, который включает осаждение полиамиона на носителе типа неорганической окиси (пористого стекла, кремнезема) и обработку покрытого полимером носителя бифункциональным реактивом (глутаровым альдегидом), который образует поперечные сшивки в полиамине с целью его закрепления на носителе в виде однородной пленки [8]. Недостатком этого метода является то, что хорошая пленка образуется только на тонкоизмельченных макропористых поверхностях с сильно развитой поверхностью. На гладких поверхностях такая пленка не держится и растрескивается. Этот метод был взят нами за основу и модифицирован так, чтобы получить активатор с нужными свойствами.

В результате была создана методика получения поверхности, покрытой иммобилизованным тканевым фактором, плотность которого примерно равна плотности этого белка на наиболее активных в отношении активации свертывания клетках – фибробластах. Иммобилизованный ТФ обладает хорошей активностью и имеет функциональную константу диссоциации K_s комплекса VIIa/ТФ равную $0,94 \pm 0,28$ нМ. Полученная поверхность так же хорошо активи-

рует свертывание, как и фибробласты. Иммобилизованный фактор инактивируется с характерным временем ~100 дней.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Реактивы. Полиэтиленимин («ICN Biomedicals», США), глутаровый альдегид («Serva Feinbiochemica», Германия), глицин («Panreac Quimica», Испания), растворимый тромбопластин («Ренам», Россия), Innovin – растворимый рекомбинантный человеческий тромбопластин («Dade Behring», Германия), фактор VIIa («Ново Нордиск, Дания»), фактор X («Enzyme Research Laboratories», США), хроматогенный субстрат для фактора Ха S-2765 («Chromogenix», США), ингибитор трипсина из кукурузы (Corn trypsin inhibitor – СТИ, Институт белка РАН, Пушкино, Россия). Альбумин, цитрат натрия, молочная кислота, CaCl_2 , ЭДТА, NaCl, ПЭГ-6000, Tris (hydroxymethyl) aminomethane hydrochloride и Tris (hydroxymethyl) aminomethane были фирмы «Sigma», США.

Метод иммобилизации тромбопластина на полистироловую поверхность. Полистироловую поверхность покрывали тонким слоем полиэтиленимина, содержащим первичные аминогруппы [8]. Для образования прочно прикрепленной пленки полиэтиленимин (2%-ный), глутаровый альдегид (1%-ный), альбумин (4 г/л) смешивали в соотношении 2 : 1 : 1 и наносили на полистироловую поверхность тонким слоем из расчета 13 мкл/см², в этом случае после высушивания образуется слой ~10 мкм толщиной. Пленку высушивали в течение суток при комнатной температуре. Тромбопластин присоединяли к аминированной поверхности ковалентно, используя глутаровый альдегид. Полистироловую поверхность с высушенной пленкой инкубировали в 0,5%-ном растворе глутарового альдегида (0,2 мл/см²) 1 ч при комнатной температуре. Образцы отмывали от несвязавшегося глутарового альдегида 1 ч четырьмя сменами дистиллированной воды по 10 мл. Полученную поверхность инкубировали в растворе тромбопластина 12 нМ (0,2 мл/см²) 1 ч при комнатной температуре. Несвязавшийся тромбопластин отмывали в течение 30 мин двумя сменами воды по 10 мл. Оставшиеся альдегидные группы блокировали глицином; для этого поверхность инкубировали 1 ч в 1 М растворе глицина (0,2 мл/см²). После этого поверхность промывали 1 ч четырьмя сменами воды по 10 мл. Далее полистироловую поверхность с пришитым тканевым фактором высушивали 30 мин при 37°, запаковывали герметично в полиэтилен и хранили в холодильнике при 4–8°. В течение

времени наблюдали изменение активности иммобилизованного ТФ и способность активировать свертывание плазмы крови.

Методы исследования кинетики связывания иммобилизованного тканевого фактора с фактором VIIa. 1. Определение плотности иммобилизованного ТФ на полистироловой поверхности. *Принцип метода.* ТФ, иммобилизованный на поверхности заданного размера, обрабатывали избытком фактора свертывания VIIa для образования активного комплекса VIIa/ТФ, после чего добавляли определенное количество фактора X. Последний под действием комплекса VIIa/ТФ превращался в активную форму фактора Xa. Скорость активации фактора X при выбранных условиях пропорциональна количеству ТФ. Реакцию останавливали добавлением ЭДТА, поскольку без ионов кальция комплекс не работает. Концентрацию фактора Xa определяли фотометрически по кинетике расщепления хромогенного субстрата [9].

В лунку 96-луночного планшета помещали пластинку с нанесенным на нее ТФ (размер 1×4 мм), добавляли 0,02 мл буфера А (1 М Tris-буфер, 150 мМ NaCl, 0,1% ПЭГ-6000, pH 8,7). Для построения калибровочной кривой в лунки планшета вносили тромбопластин с концентрацией от 0 до 40 пМ с шагом 4. Далее вносили 0,02 мл раствора фактора VIIa (0,3 мкМ), содержащего хлорид кальция (15 мМ) в буфере А. Далее добавляли 0,02 мл раствора фактора X (1,5 мкМ) в буфере А. Через 30 мин инкубации при 37° активаторы вынимали и во все лунки добавляли 0,04 мл раствора, содержащего ЭДТА (25 мМ) и субстрат S-2765 (3,76 мМ) к фактору Xa, в буфере А.

Скорость расщепления хромогенного субстрата S-2765 определяли по поглощению при 405 нм с помощью микропланшетного ридера Thermomax (Molecular Devices) в кинетическом режиме. Концентрацию ТФ определяли по калибровочной кривой, используя программу анализа данных Origin (Версия 6,0, Microcal Software, Inc.).

2. Определение функциональной константы диссоциации (K_s) комплекса VIIa/ТФ. *Принцип метода* заключается в титровании тканевого фактора, иммобилизованного на поверхности, разными концентрациями фактора VIIa. Количество образовавшегося комплекса VIIa/ТФ определяли по скорости активации фактора X. K_s полагали равной концентрации фактора VIIa, при которой достигается полумаксимальная скорость активации фактора X [10, 11]. Для сравнения исследовали K_s монослой фибробластов и растворимых форм тромбопластина фирмы Ренам, Innovin или Dade Behring. Поверхностная плотность тканевого фактора на пленках с фибробластами и иммобилизованным тромбо-

пластином была предварительно определена по иммунофлуоресценции и максимальной активности в активации фактора X в присутствии избытка фактора VIIa.

В лунки вносили пленку с присоединенным ТФ (размер 1×4 мм) и пленку с фибробластами (размер 2×2 мм) и добавляли 0,02 мл буфера А. В другие лунки вносили 0,02 мл раствора ТФ (40 пМ). Добавляли 0,02 мл раствора фактора VIIa в диапазоне концентраций от 0 до 8 нМ в буфере А, содержащем хлорид кальция (15 мМ). Далее добавляли 0,02 мл раствора фактора X (1,5 мкМ) в буфере А. Через 30 мин инкубации при 37° нерастворимые активаторы вынимали из лунок и добавляли 0,04 мл раствора, содержащего ЭДТА (25 мМ) и субстрат S-2765 (3,76 мМ) к фактору Xa, в буфере А. В случае растворимых факторов реакцию останавливали добавлением 0,04 мл раствора, содержащего ЭДТА (25 мМ) и субстрат S-2765 (3,76 мМ). Скорость расщепления хромогенного субстрата S-2765 оценивали согласно методике определения плотности иммобилизованного ТФ. K_s -функциональную константу диссоциации комплекса фVIIa/ТФ определяли, аппроксимируя данные уравнением реакции с одним центром связывания в программе Origin (Версия 6,0, Microcal Software, Inc.).

Исследование пространственной динамики роста фибринового сгустка в плазме крови при активации свертывания иммобилизованным тканевым фактором. 1. Подготовка плазмы крови. Кровь доноров заготавливали на 3,8%-ном цитратном буфере (pH 5,5), соотношение кровь : цитрат составляло 9 : 1. После предварительного осаждения эритроцитов (1600 g, 15 мин), плазму центрифугировали 5 мин при 10 000 g для удаления тромбоцитов. Затем, чтобы стабилизировать pH на уровне 7,2–7,4, проводили инкубацию плазмы в течение 1 ч с 10%-ной молочной кислотой (на 1 мл плазмы — 14 мкл кислоты) [5]. Плазму хранили при -80° и размораживали за 2 ч до эксперимента.

Перед экспериментом плазму инкубировали 10 мин с веществом Corn trypsin inhibitor (СТИ, 0,2 мг на 1 мл плазмы) для ингибирования фактора XII, отвечающего за контактную фазу свертывания. Плазму рекальцифицировали, т.е. добавляли 20 мкл 1,0 М раствора хлорида кальция на 1 мл плазмы, при этом концентрация свободных ионов кальция доходила до физиологической. Измерение концентрации ионов кальция проводили на приборе AVL 988-3 (Vital Scientific N.V., Netherland).

2. Исследование пространственной динамики образования тромба в плазме крови проводили с помощью прибора Thromboimager-09. Принцип работы прибора, основанный на регистрации

роста сгустка по светорассеянию методом темного поля, описан в [5]. Рекальцифицированный образец плазмы крови помещали в плоскую тонкую кювету и приводили в соприкосновение с поверхностью, покрытой иммобилизованным тканевым фактором (активатор). Под действием активатора начинался рост сгустка, изображение которого непрерывно регистрировали с помощью высокочувствительной цифровой камеры прибора. Полученную серию изображений анализировали с помощью специального программного обеспечения. Результатом эксперимента является серия фотографий растущего сгустка. Контролем служил эксперимент, в котором в той же плазме активацию свертывания проводили монослоем фибробластов как в работе [5]. Образец такого эксперимента приведен на рис. 1.

Для получения количественных характеристик роста сгустка программное обеспечение прибора Tromboimager-09 позволяет выбрать участок на изображении растущего тромба и измерить профили светорассеяния в направлении, перпендикулярном поверхности активатора, в разные моменты времени от контакта активатора с плазмой (рис. 1, б). Выбрав уровень светорассеяния, соответствующий сформировавшемуся фибриновому сгустку (горизонтальная линия на рис. 1, б), можно построить график зависимости размера тромба от времени (рис. 1, в).

Данный уровень обычно выбирается равным половине от максимального уровня плато процесса распространения фронта фибринового сгустка. Как видно из рис. 1, в, некоторое время рост отсутствует, потом начинается, и затем можно выделить два участка с разной скоростью роста. Это дает нам три главных параметра, характеризующих процесс: время задержки роста сгустка (лаг-тайм, T_{lag}) определяется как время, за которое размер сгустка достигает 50 мкм; начальная скорость роста сгустка ($V_{initial}$) – средняя скорость роста сгустка в течение 10 мин после лаг-тайма; стационарная скорость роста сгустка ($V_{stationar}$) – средняя скорость роста сгустка в интервале времени от 30 до 40 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Зависимость плотности ТФ, пришитого к поверхности полистирола, от концентрации ТФ в растворе, в котором проводилось связывание фактора представлена на рис. 2 а. Если концентрация ТФ ~4 нМ (и меньше) плотность связанного тканевого фактора растет линейно с ростом концентрации фактора в растворе. При инкубации пластинок в растворе с концентрацией выше 5–6 нМ плотность ТФ на поверхности перестает расти, и график выходит на плато. При этом максимальная плотность ТФ на поверх-

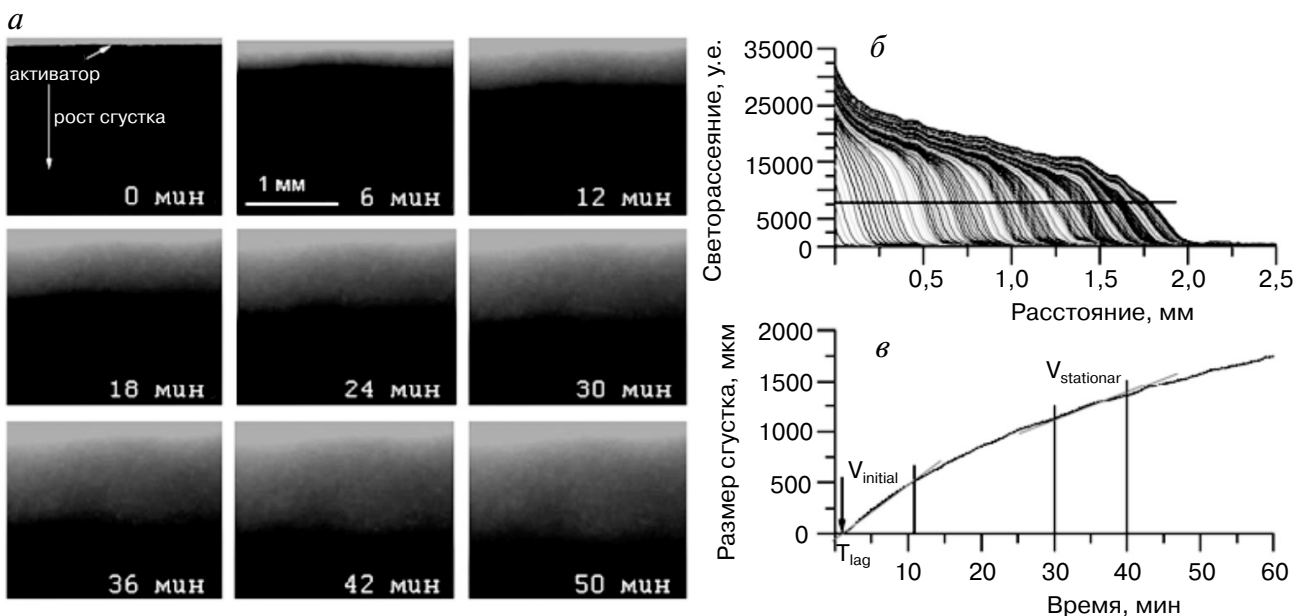


Рис. 1. Исследование пространственной динамики образования тромба в плазме крови при активации монослоем фибробластов. а – Последовательная серия фотографий растущего сгустка; б – профили светорассеяния сгустка, построенные по результатам эксперимента, изображенного на а; в – зависимость размера сгустка от времени. Количественные характеристики роста сгустка в этом эксперименте: лаг-тайм $T_{lag} = 1,5$ мин; начальная скорость роста сгустка $V_{initial} = 52$ мкм/мин; стационарная скорость роста сгустка $V_{stationar} = 22$ мкм/мин)

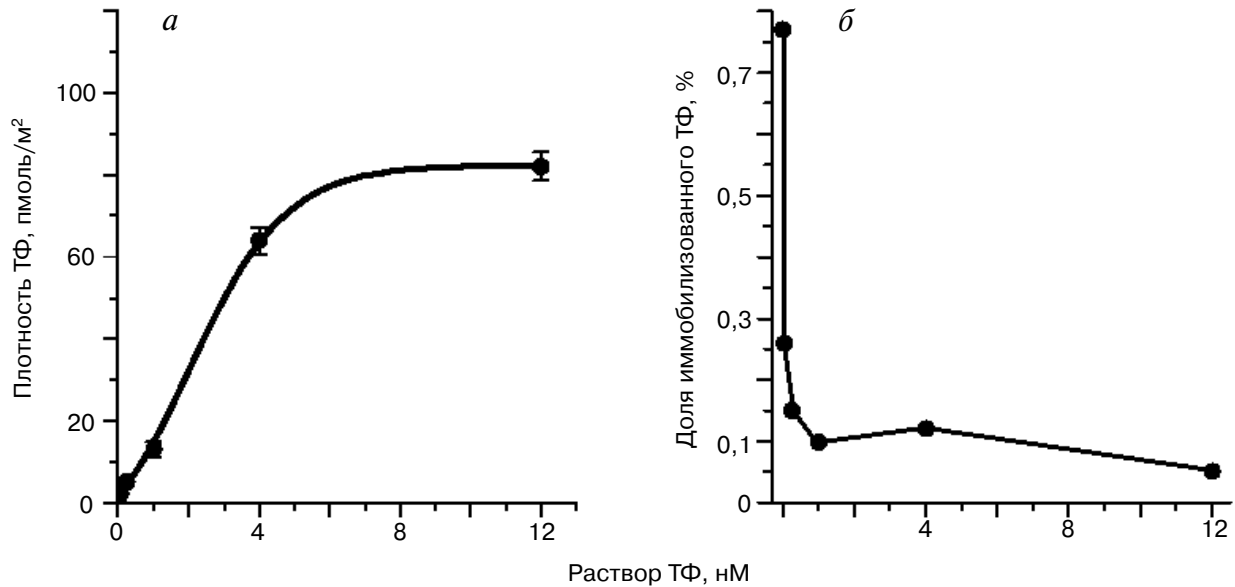


Рис. 2. Зависимость плотности ТФ на поверхности активатора от концентрации раствора ТФ, в котором происходило связывание ТФ с поверхностью – *a*. Плотность определяли по функциональной активности ТФ (см. раздел «Методы исследований») ($N = 3$); *б*–з – зависимость доли иммобилизованного ТФ от концентрации раствора ТФ

ности достигает $98 \pm 12,5$ пмоль/м², $N = 2$ (N – количество опытов). Плотность ТФ на поверхности фибробластов, покрывающих поверхность сплошным монослоем, оказалась незначительно больше – $113 \pm 12,3$ пмоль/м², $N = 3$.

Изучение вопроса, не определяется ли насыщение недостатком ТФ в растворе, в котором проводится инкубация, показало, что из раствора связывается не более 1% белка даже при минимальных концентрациях (рис. 2, б). Так, при концентрации ТФ в растворе выше 1 нМ доля связанного белка не превышает 0,1%.

Кинетика связывания иммобилизованного тканевого фактора с фактором VIIa. Для того, чтобы исследовать изменения кинетических характеристик иммобилизованного тканевого фактора, мы сначала провели изучение кинетики комплекса фактора VIIa в растворе с тканевым фактором разного происхождения. Кинетика активации фактора X растворимым комплексом ТФ/VIIa для генно-инженерного тромбопластина Innovin фирмы «Dade Behring» представлена на рис. 3. Кривая явно имеет максимум, и начиная с концентраций VIIa выше 1 нМ тромбопластин Innovin ингибирует активацию фактора X. В тканевом факторе, выделенном из природных источников, всегда присутствует фосфолипидная компонента, поскольку ТФ является интегральным белком мембраны клеток [12]. Видимо, синтетические фосфолипиды, входящие в сос-

тав генно-инженерного тромбопластина фирмы «Dade Behring» влияют на конформацию образующегося комплекса.

Для кроличьего тромбопластина фирмы «Ренам» данные по кинетике, представленные на

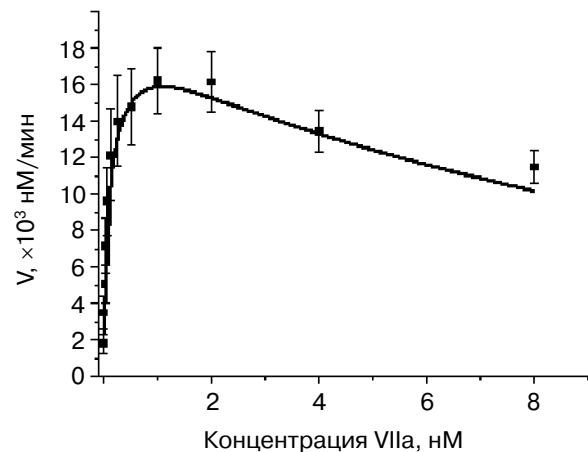


Рис. 3. Зависимость скорости активации фактора X от концентрации фактора VIIa в комплексе с генно-инженерным водорастворимым тромбопластином фирмы «Dade Behring». Концентрация ТФ – 40 пМ; V – скорость образования хромогенного субстрата в тесте определения активности комплекса ТФ/VIIa (см. раздел «Методы исследования»)

рис. 4, *a*, хорошо описываются гиперболой. В двойных обратных координатах наблюдаются некоторые регулярные отклонения от прямой, указывающие на незначительную отрицатель-

ную кооперативность (рис. 4, *б*). Но эти отклонения лежат в пределах ошибок измерения. Поэтому мы полагаем, что связывание фактора VIIa с ТФ подчиняется простой бимолекулярной ки-

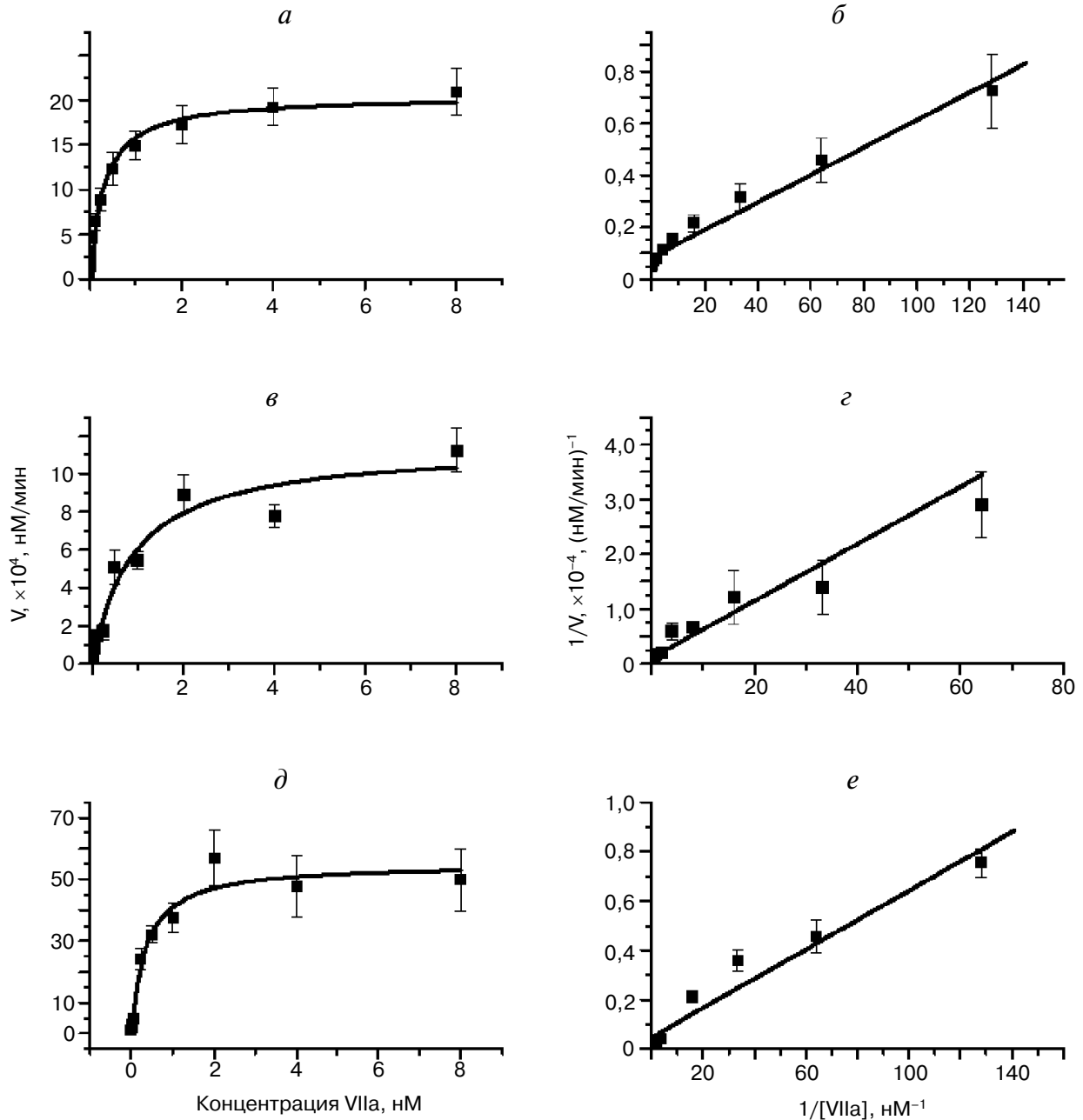


Рис. 4. Зависимость скорости активации фактора Xa от концентрации фактора VIIa в комплексе с тканевым фактором из разных источников. *a* – Источник тканевого фактора – водорастворимый тромбопластин фирмы «Ренам». Концентрация ТФ 40 пМ; *a* – обычные координаты, *б* – двойные обратные; *в* – источник тромбoplastина – тканевой фактор фирмы «Ренам», иммобилизованный на поверхность полистирола. Размер активатора 1×4 мм с плотностью ТФ – 90 пмоль/м^2 ; *в* – обычные координаты, *г* – двойные обратные; *д* – источник тканевого фактора – тканевой фактор на поверхности монослоя фибробластов. Размер пленки с монослоем фибробластов 2×2 мм с плотностью ТФ на поверхности, измеренной по функциональному тесту, – 89 пмоль/м^2 . *д* – Обычные координаты, *е* – двойные обратные. V – скорость образования хромогенного субстрата в тесте определения активности комплекса ТФ/VIIa (см. раздел «Методы исследования»)

нетике. Функциональная константа диссоциации K_s для этого комплекса равна $0,31 \pm 0,05$ нМ (табл. 1).

Иммобилизация тромбопластина фирмы «Ренам» на поверхности не меняет качественно кинетику взаимодействия ТФ с фактором VIIa (рис. 4, в). В обратных координатах точки также хорошо ложатся на прямую (рис. 4, з). Однако константа диссоциации при этом оказалась втрое больше, чем для растворимого ТФ, а именно, $0,90 \pm 0,28$ нМ (табл. 1).

Кинетика комплексообразования нативного тканевого фактора на поверхности монослоя фибробластов с фактором VIIa тоже имеет гиперболическую зависимость (рис. 4, д). Это подтверждает анализ графика, построенного в обратных координатах (рис. 4, д). Константы диссоциации для тканевого фактора на поверхности клеток и для растворимого тромбопластина фирмы «Ренам» оказались очень близки (табл. 1).

Таким образом, иммобилизация тканевого фактора с помощью метода, представленного в данной работе, сохраняет его кофакторную активность, но несколько меняет его кинетические характеристики по сравнению с ТФ на поверхности клеток, и с его растворимой формой. Это, по всей вероятности, указывает на некоторое нарушение нормальной конформации комплек-

Таблица 1. Функциональная константа диссоциации комплекса фактора VIIa с тканевым фактором, полученным из разных источников

Источник ТФ	Среднее значение K_s , нМ
Растворимый ТФ (Ренам) ($N = 3$)	$0,31 \pm 0,05$
Растворимый ТФ (Инновин)* ($N = 3$)	$0,03 \pm 0,005$
Иммобилизованный ТФ ($N = 3$)	$0,90 \pm 0,28$
Пленка с монослоем фибробластов ($N = 5$)	$0,35 \pm 0,05$

* Кинетика сильно отличается от гиперболической.

са при иммобилизации. Насколько эти различия важны для активации свертывания и нормального роста сгустка, мы исследовали в опытах по пространственной динамике.

Пространственная динамика роста фибринового сгустка в плазме крови при активации свертывания иммобилизованным тканевым фактором. Была изучена способность иммобилизованного ТФ активировать свертывание в донорской плазме. На рис. 5 приведена последовательная

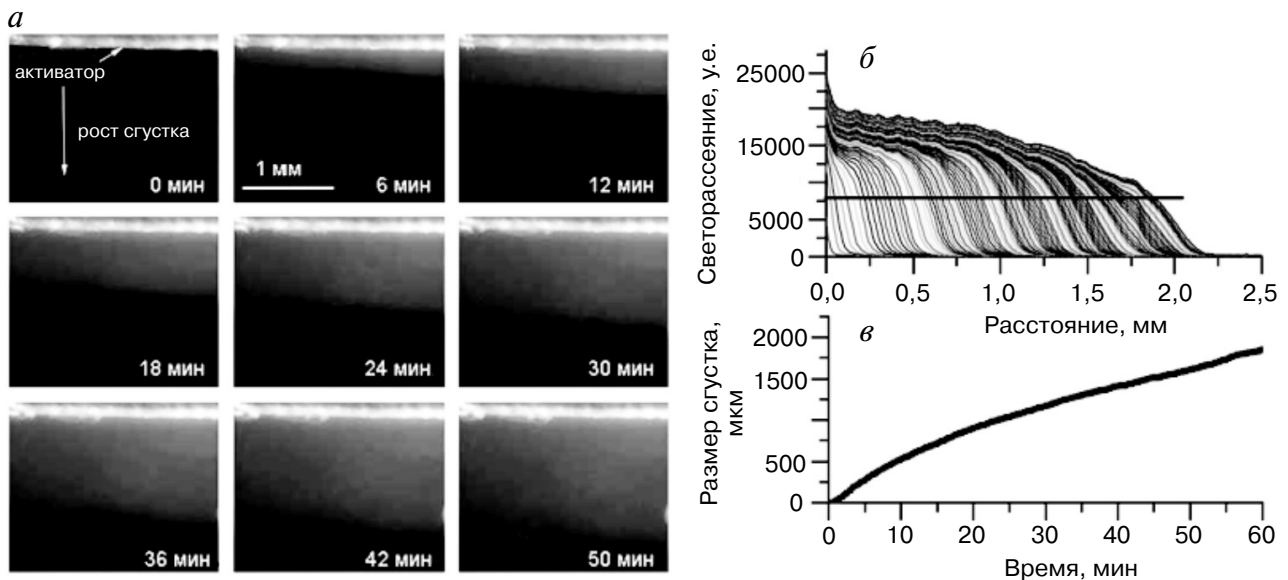


Рис. 5. Исследование пространственной динамики образования тромба в плазме крови при активации тканевым фактором, иммобилизованным на поверхности полистирола. *a* – Последовательная серия фотографий растущего сгустка; *б* – профили светорассеяния сгустка, построенные по результатам эксперимента, изображенного на *a*; *в* – зависимость размера сгустка от времени. Количественные характеристики роста сгустка в этом эксперименте: лаг-тайм $T_{lag} = 1,0$ мин, начальная скорость роста сгустка $V_{initial} = 54,7$ мкм/мин, стационарная скорость роста сгустка $V_{stationar} = 22$ мкм/мин

серия фотографий растущего сгустка, полученная при активации образования фибринового сгустка тканевым фактором, иммобилизованным на поверхности полистирола.

Активатор вызывает инициацию и рост нормального сгустка в плазме. Качественно и количественно все стадии процесса протекают так же, как и при активации фибробластами (рис. 1 и рис. 5). Количественный анализ кинетики роста подтвердил сходство искусственного активатора с естественным. Профили светорассеяния сгустка при активации свертывания тканевым фактором, иммобилизованным на поверхности полистирола (рис. 5, б) очень похожи на аналогичные для фибробластов. Как оказалось, искусственный активатор даже несколько лучше, поскольку полистироловая поверхность, покрытая ТФ, дает меньше паразитного рассеяния в приактиваторной области, чем подложка, на которой выращиваются фибробласты. Это проявляется в том, что пик светорассеяния вблизи активатора на полистироловой подложке значительно меньше. Основные количественные характеристики роста сгустка (время задержки свертывания, начальная и стационарная скорость роста сгустка) для иммобилизованного тканевого фактора и тканевого фактора на поверхности монослоя фибробластов достаточно идентичны (рис. 5, в, табл. 2).

Исследование зависимости параметров роста сгустка от плотности тканевого фактора на поверхности показало, что лаг-тайм начинает увеличиваться только, когда плотность уменьшается ниже 20 $\mu\text{моль}/\text{м}^2$ (рис. 6, а) и увеличивается довольно быстро по мере снижения плотности. Как начальная (рис. 6, б), так и стационарная (рис. 6, в) скорости роста сгустка тоже практически не меняются при увеличении плотности ТФ выше 20 $\mu\text{моль}/\text{м}^2$.

Хранение активаторов с иммобилизованным ТФ. При хранении высушенных полистироловых пластинок, покрытых тканевым фактором при 4–8° наблюдается медленное снижение активности иммобилизованного тканевого фактора на единицу площади активатора (рис. 7, а).

Характерное время уменьшения активности равно 96 ± 13 дней. Поскольку снижение активности тканевого фактора на активирующей поверхности начинает влиять на параметры роста сгустка только при снижении активности в 4–5 раз, влияние этого снижения начинает сказываться не сразу. На рис. 7, б показано, как меняется лаг-тайм в ходе хранения активаторов. Видно, что первые изменения начинаются только после 100 дней хранения. Аналогичные характеристики были получены и для скоростей роста сгустка (данные не приведены).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Тканевой фактор – это интегральный белок мембран большинства клеток нашего организма. Как отмечалось выше, он отсутствует только на клетках эндотелия сосудов и клетках крови. Такая его локализация нужна для выполнения

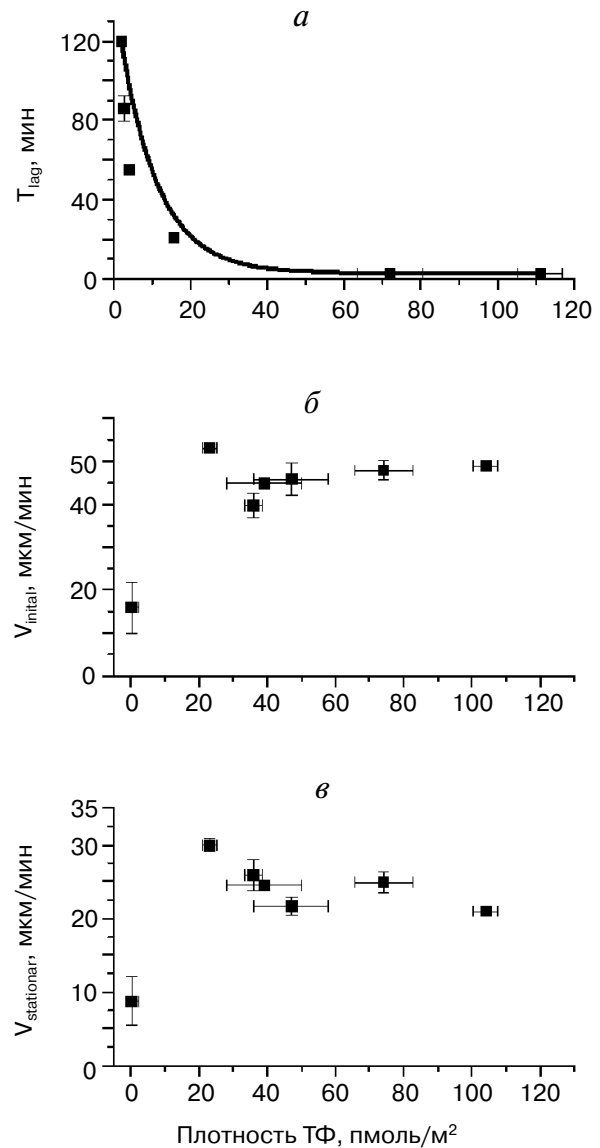


Рис. 6. Зависимость основных характеристик роста сгустка от плотности тканевого фактора на поверхности, активирующей свертывание. а – Зависимость времени задержки свертывания от плотности тканевого фактора на поверхности. Данные аппроксимированы экспонентой $A = A_0 \exp(-t/\tau)$; б – зависимость начальной скорости роста сгустка от плотности тканевого фактора на поверхности; в – зависимость стационарной скорости роста сгустка от плотности тканевого фактора на поверхности

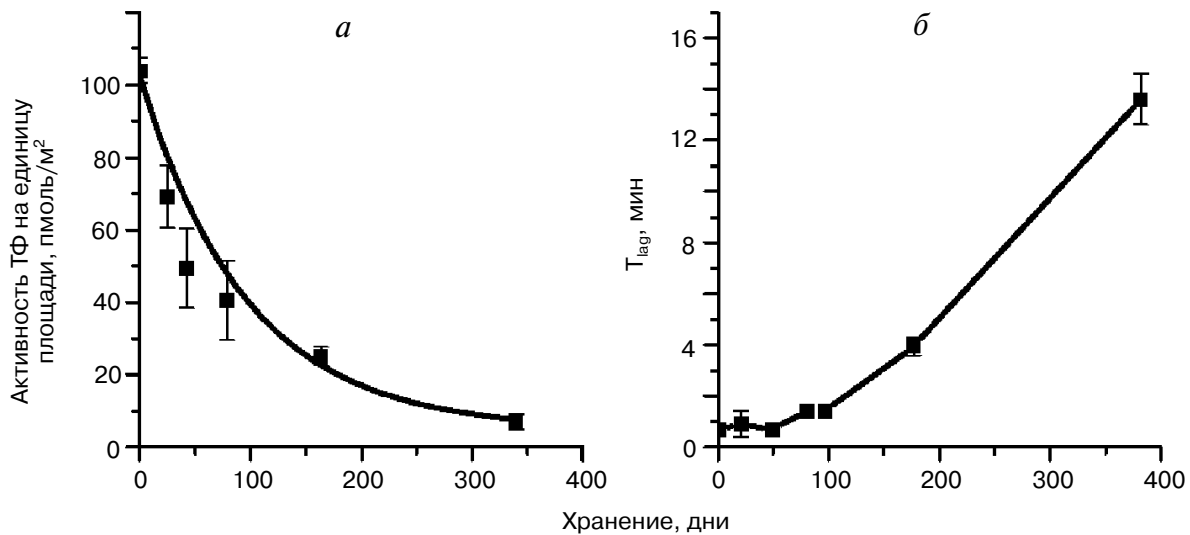


Рис. 7. Зависимость характеристик активаторов – полистироловых пластинок, покрытых тканевым фактором, от времени хранения в герметично запакованном виде при 4–8°. *a* – Снижение активности ТФ на единицу площади при хранении активаторов. Данные аппроксимированы экспонентой $A = A_0 \exp(-t/\tau)$, где $A_0 = 97,7 \pm 4,3$ пмоль/м², $\tau = 96 \pm 13$ дней; *б* – зависимость времени задержки свертывания (T_{lag}) от времени хранения активаторов

главной физиологической функции системы свертывания крови. Комплекс тканевого фактора с фактором VIIa образуется в месте локализации тканевого фактора и там проявляет свою ферментативную активность, расщепляя фактор X [5]. Поэтому растворимые формы этого белка могут обладать кинетическими характеристиками, отличными от нативного, локализованного в мембране. Ковалентная иммобилизация растворимых форм белка может вызвать дальнейшие его изменения. В качестве эталона для сравнения разных модификаций тканевого фактора мы выбрали монослой фибробластов, выращенный в первичной культуре. Эти клетки хорошо растут и хорошо дифференцированы. Тканевой фактор на их поверхности имеет большую плотность [13]. Как показали наши эксперименты, этот фактор образует высокоактивный комплекс с фактором VIIa. Кинетика такого комплекса подчиняется простой кинетике Михаэлиса–Ментен и имеет эффективную константу K_s равную $0,35 \pm 0,05$.

Кинетические характеристики растворимого тромбопластина, выделенного из мембран мозга кролика (фирма «Ренам»), в отличие от генно-инженерного тромбопластина Innovin (фирма «Dade Behring»), оказались близки к таковым для тканевого фактора мембран фибробластов (табл. 1). Генно-инженерный растворимый тромбопластин характеризуется кинетикой, сильно отличающейся от Михаэлисовской и демон-

стрирует ингибирование субстратом. По всей видимости, это связано с синтетической липидной компонентой. Фактор, выделенный из мембран, выделяется с достаточно большой липидной компонентой и, видимо, при растворении образует липидные везикулы, которые позволяют белку принять конформацию, близкую к нативной.

Чтобы получить активатор свертывания с необходимыми нам свойствами, был выбран метод формирования реакционно-способной пленки на поверхности полистирола. Ковалентную пришивку осуществляли через аминокгруппы белка – наиболее распространенный и простой метод иммобилизации. Необходимые механические свойства пленки: прочность ее закрепления, эластичность, равномерное покрытие были достигнуты за счет добавления в раствор полиэтиленimina, глутарового альдегида и альбумина.

Полученная плотность тромбопластина на поверхности пластика близка по значению к плотности для мембран фибробластов. Кинетические свойства тромбопластина несколько изменились при иммобилизации, но не драматично. Кинетика процесса осталась Михаэлисовской, но константа K_s выросла в три раза (табл. 1). Несмотря на отличия в кинетике связывания фактора VIIa от нормального фактора, на поверхности фибробластов полученный активатор неплохо активировал свертывание и рост сгустка.

Таблица 2. Количественные характеристики роста сгустка при активации свертывания иммобилизованным тканевым фактором и монослоем фибробластов (нативный тканевой фактор мембран клеток)

Активатор свертывания	T_{lag} , мин	$V_{initial}$, МКМ/МИН	$V_{stationary}$, МКМ/МИН
Иммобилизованный ТФ ($N = 26$)	$1,82 \pm 0,33$	$38,1 \pm 3,3$	$23,3 \pm 1,56$
ТФ на поверхности монослоя фибробластов ($N = 6$)	$2,59 \pm 0,74$	$45,5 \pm 4,58$	$26,5 \pm 2,57$

Его способность активировать свертывание близка к таковой для фибробластов. Все параметры роста сгустка для обоих типов активаторов близки (табл. 2) и мало изменяются при уменьшении (до пяти раз) плотности иммобилизованного тканевого фактора. Иммобилизация резко увеличивает стабильность активатора к хранению. При хранении при 4–8° активность

тканевого фактора снижается не более, чем в три раза в течение 100 дней.

Работа была частично финансово поддержана программами Президиума Российской академии наук «Молекулярная и клеточная биология» и «Фундаментальные науки – медицине» и РФФИ (гранты 07-04-00146, 09-04-00232, 09-04-92427).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Воробьев А.И., Городецкий В.М., Шулутко Е.М., Васильев С.А. Острая массивная кровопотеря. М., ГЭОТАР-МЕД, 2001.
2. Бутенас С., Манн К.Г. (2002) *Биохимия*, **67**, 5–15.
3. Monroe, D.M., and Key, N.S. (2007) *J. Thromb. Haemost.*, **5**, 1097–1105.
4. Panteleev, M.A., Ovanesov, M.V., Kireev, D.A., Shibeko, A.M., Sinauridze, E.I. et al. (2006) *Biophys J.*, **90**(5), 1489–1500.
5. Ovanesov, M.V., Krasotkina, J.V., Ul'yanova, L.I., Abushinova, K.V., Plyushch, O.P. et al. (2002) *Biochim. Biophys. Acta*, **1572**, 45–57.
6. Messing, R.A., US Patent 3556945, 1971.
7. Clark, B., US Patent 6361936, 2002.
8. Rohrbach, R.P., US Patent 4268419, 1981.
9. Ruf, W., Kalnik, M.W., Lund-Hansen, T., and Edgington, T.S. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**(24), 15719–15725.
10. Sabharwal, A.K., Birktoft, J.J., Gorka, J., Wildgoose, P., Petersen, L.C., and Bajaj, S.P. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**(26), 15523–15530.
11. Schullek, J.R., Ruf, W., and Edgington, T.S. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**(30), 19399–19403.
12. Broze, G.J., Leykam, J.E., Schwartz, B.D., and Miletich J.P. (1985) *J. Biol. Chem.*, **260**(20), 10917–10920.
13. Ovanesov, M.V., Ananyeva, N.M., Panteleev, M.A., Ataulakhanov, F.I., and Saenko, E.L. (2005) *J. Thromb. Haemost.*, **3**, 321–331.

**THROMBOPLASTIN IMMOBILIZED ON POLYSTYRENE
SURFACE HAS KINETIC CHARACTERISTICS CLOSE TO
NATIVE PROTEIN AND ACTIVATES BLOOD COAGULATION
in vitro SIMILARLY TO THROMBOPLASTIN
ON FIBROBLASTS**

**O. A. Fadeeva^{1*}, M. A. Pantelev^{1,3}, S. S. Karamzin¹,
A. N. Balandina³, I. V. Smirnov¹, F. I. Ataulakhanov^{1,2,3}**

¹ *National Research Center for Hematology, Novozykovskiy proezd, 4a,
125167 Moscow, Russia; fax: (495) 612-0839,
E-mail: anela5@yandex.ru*

² *Lomonosov Moscow State University, Physical Department,
Leninskie gory, 119991 Moscow, Russia, fax: (495) 939-0126*

³ *Center for Theoretical Problems of Physico-Chemical Pharmacology,
ul. Kosygina 4, 117977 Moscow, Russia, fax: (495) 938-2533*

Received August 21, 2009

A method for immobilization of the transmembrane protein thromboplastin (tissue factor) on polystyrene surface is described. Tissue factor is the main activating factor starting the process of blood coagulation. It is a cofactor of factor VIIa - the first protease in the cascade of proteolytic reactions of coagulation. The suggested method preserves the kinetic characteristics of tissue factor close to those for native tissue factor on the surface of fibroblasts. The kinetics of bound tissue factor with factor VIIa and enzymatic activity of the formed complex obey Michaelis–Menten kinetics, as well as for native complex. The only difference is the fact that the dissociation constant for immobilized tissue factor is 2.7 times greater than for the native protein. The suggested method of immobilization provides protein density on the activating surface corresponding to the density of tissue factor on the surface of fibroblasts. The immobilized tissue factor can be used for activation of blood coagulation in methods simulating spatial dynamics of clot growth *in vitro*. The investigation of spatial dynamics of blood coagulation has been shown earlier to allow registration of both hypo- and hyper-coagulation conditions of the system. This approach differs favorably from traditional methods of coagulation that register only hypocoagulation. The activators with immobilized tissue factor can be kept and used for studying spatial dynamics of clot growth for at least 100 days.

Key words: thromboplastin, tissue factor, immobilization, kinetics of factor VIIa-thromboplastin complex, spatial dynamics of blood coagulation