

## ВЛИЯНИЕ ЛЕКТИНА GLYCINE MAX НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПРОТРОМБИНА С ЭРИТРОЦИТАМИ

Д. М. ЗУБАЙРОВ, С. В. КИСЕЛЕВ., А. И. БУЛАТОВА

Кафедра биохимии Казанского государственного медицинского университета, 420012 Казань, ул. Бутлерова, 49; факс: 007 (8-432) 36-03-93, электронная почта: Dilja@ant.iasnet.com

Эритроциты свиньи хотя не инициируют, однако вызывают слабое, но достоверное активирующее влияние на свертывание крови, связывая с невысокой аффинностью на своей мембране  $^{125}\text{I}$ -меченый протромбин ( $K_d=4,25\pm 0,35\mu\text{M}$ ). На один эритроцит приходится  $11,9 \cdot 10^7$  мест связывания. При физиологических концентрациях протромбина поверхность эритроцита далека от насыщения. Связывание на поверхности эритроцитов лектина *Glycine max* подавляет его способность ускорять свертывание крови. Связывание  $^{125}\text{I}$ -меченого протромбина эритроцитами увеличивается после предварительной инкубации белка с лектином *Glycine max* и становится ненасыщенным при всех использованных концентрациях лиганда.

**Ключевые слова:** протромбин, эритроциты, лектин соевых бобов.

**Введение.** Ускоряющее влияние эритроцитов на свертывание крови *in vitro* было отмечено еще в прошлом столетии в классической работе А. Шмидта [1]. Позднее было показано, что в эритроцитах имеется вещество, которое по своему действию аналогично тромбоцитарному фактору 3 [2 — 4]. Считается, что активирующее влияние тромбоцитов на свертывание крови зависит от нарушения асимметричного расположения глицерофосфолипидов в их наружной мембране с экспонированием фосфатидилхолином [5]. Однако и нейтральные фосфатидилхолиновые мембраны в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$  могут стимулировать активацию протромбина под действием фактора Ха [6]. Именно последний вид глицерофосфолипидов, наряду со сфингомиелинами, преобладает во внешнем листке бислоя мембраны эритроцита человека и свиней.

С отщеплением под влиянием трипсина от эритроцитарной мембраны гликопротеинов снижается не только ее электроотрицательность, но и коагуляционная активность [4]. В нашей предыдущей работе было показано, что на поверхности эритроцитов свиней происходит связывание  $^{125}\text{I}$ -протромбина с относительно невысоким сродством, которое по своей силе близко к взаимодействию протромбина с глицерофосфолипидными везикулами или монослоями. Между тем на поверхности эритроцитов кроме них имеются гликопротеины и гликолипиды, предопределяющие их антигенность.

Блокирование углеводных детерминант экзо- и эндолектинами, имеющими сродство к N-ацетилгалактозамину, N-ацетилглюкозамину, галактозе, маннозе и фукозе, в препарате тканевого тромбопластина из мозга человека приводило к значительному подавлению его способности ускорять превращение протромбина в тромбин [7, 8]. В настоящей работе была поставлена задача изучить взаимодействие протромбина с поверхностью эритроцитов и влияние лектинов на этот процесс, а также их влияние на способность эритроцитов ускорять свертывание крови. Из большого числа лектинов, использованных нами ранее, в качестве реагента был использован очищенный гликопротеин соевых бобов *Glycine max*, обладающий специфическим сродством к остаткам N-ацетил-D-галактозамина и D-галактозе [9], подавляющий коагуляцион-

ную активность тканевого тромбопластина приблизительно на 60% [8], но который связываясь с нормальными эритроцитами, не агглютинирует их. Последнее свойство важно для выполнения эксперимента по определению параметров связывания протромбина, именно оно определило выбор лектина.

**Методика.** Протромбин получали из цитратной плазмы крови свиней адсорбцией на цитрате бария с последующим высаливанием сульфатом аммония и доочищением на ДЭАЭ-сефадексе А-50 [10]. Чистоту протромбина исследовали электрофорезом в полиакриламидном геле с DS-Na [11]. Биологическую активность протромбина измеряли двухэтапным методом в прописи Магнуссона [12].

Протромбин метили  $^{125}\text{I}$ -хлораминовым методом [13], используя  $^{125}\text{I}$ Na без носителя ("Изотоп" Россия). Несвязанный изотоп удаляли гель-фильтрацией через сефадекс G-25 (колонка 1,5x21 см), уравновешенный 0,05 М трис-HCl-буфером с 0,1 М NaCl, pH 7,4. Радиоактивность препарата протромбина составляла 2,3 мКи/мг (1 атом связанного иода на 360 молекул протромбина).  $^{125}\text{I}$ -меченый протромбин сохранял биологическую активность по выходу тромбина [Magnusson]. Часть  $^{125}\text{I}$ -меченого протромбина инкубировали 1 ч. в 1 мл 10 мМ трис-HCl-буфера pH 7,4, содержащем 137 мМ NaCl, 4 мМ KI, 11 мМ глюкозы (буфер А) и 0,9 мМ лектина соевых бобов при температуре 20°C. Несвязавшийся лектин отделяли после осаждения протромбина двойным объемом насыщенного раствора  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  при температуре 0°C.

Эритроциты выделяли из цитратной крови свиней путем центрифугирования 2000 g 30 мин при температуре 0–4°C и трижды промывали равным объемом охлажденного до 4°C 10 мМ трис-HCl-буфера pH 7,4, содержащего 137 мМ NaCl, 4 мМ KCl, 2 мМ ЭДТА и 11 мМ глюкозы. После отмывания эритроциты ресуспендировали в буфере для связывания протромбина. Часть эритроцитов инкубировали 1 ч при 20°C с 0,9 мМ лектином соевых бобов в буфере А. Несвязавшийся лектин отделяли от эритроцитов однократным центрифугированием.

Связывание  $^{125}\text{I}$ -меченого протромбина исследовали в трех сочетаниях состава инкубационных смесей в буфере А с добавлением 2 мМ CaCl<sub>2</sub> и 1% человеческого сывороточного альбумина: 1) нативные эритроциты, с протромбином, 2) эритроциты, обработанные лектином, с протромбином, 3) эритроциты с протромбином, обработанным лектином. Каждая инкубационная смесь содержала  $5 \times 10^6$  /мл эритроцитов и протромбин в концентрации от  $6,9 \times 10^{-7}$  М до  $138 \times 10^{-7}$  М. Для каждой концентрации протромбина проводилось трехкратное повторение. Связывание проводили в иммунологических планшетах с объемом ячейки 2 мл при постоянном помешивании при температуре 20°C. Через 1 ч (время достижения равновесия) эритроциты отделяли фильтрацией через фильтровальную бумагу Whatman 3ММ. Радиоактивность меченого протромбина, связанного эритроцитами, определяли в гамма счетчике "Гамма 12". Данные о количестве свободного и связанного протромбина представляли в координатах Скэтчарда, расчеты параметров связывания делали по специализированной программе [14].

Неспецифическое связывание исключалось в эксперименте, в котором использовался 30-кратный избыток "холодного" протромбина.

Гемокоагуляционную активность эритроцитов определяли по их способности ускорять свертывание цитратной плазмы крови при рекальцификации [15].

**Результаты и обсуждение.** Добавление взвеси эритроцитов к бестромбоцитарной стабилизированной цитратом плазме крови свиней приводило к ускорению ее свертывания при рекальцификации. Без эритроцитов свертывание происходило за

$126,5 \pm 2,1$  с, а при добавлении  $5 \cdot 10^6$  эритроцитов/мл — за  $95,2 \pm 0,2$  с. Это показатели находятся в пределах результатов, полученных другими исследователями [4, 16].

Изотерма связывания  $^{125}\text{I}$ -меченого протромбина эритроцитами (рис. 1) показала, что при физиологических концентрациях этого белка (1,4 — 2,1 мкМ) поверхность клеток далека от насыщения. Насыщение лигандом мест связывания достигалось лишь при концентрациях, превосходящих естественные в 5 — 10 раз (8,3 — 13,8 мкМ). При этом в координатах Скэтчарда связывание протромбина характеризовалось линейной зависимостью (рис. 2), что указывает на наличие одного типа центров связывания на поверхности эритроцитов ( $K_d = 4,25 \pm 0,35$  мкМ и  $Q = 0,99 \pm 0,1$  мкМ). При пересчете на один эритроцит приходится  $11,9 \cdot 10^7$  центров связывания протромбина. Так как поверхность эритроцита составляет около  $130 \text{ мкм}^2$  [17], то на один центр связывания приходится  $1,09 \text{ нм}^2$ . Если принять [18], что площадь проекции эритроцитарных общих липидов и фосфолипидов составляет от 0,5 до  $0,64 \text{ нм}^2$ , то можно предположить, что участок связывания образован не более, чем двумя полярными головками мембранных липидов. Следует однако учитывать, что в рассматриваемом мало специфичном взаимодействии могут участвовать не только липиды, но и белки мембраны красных кровяных клеток.

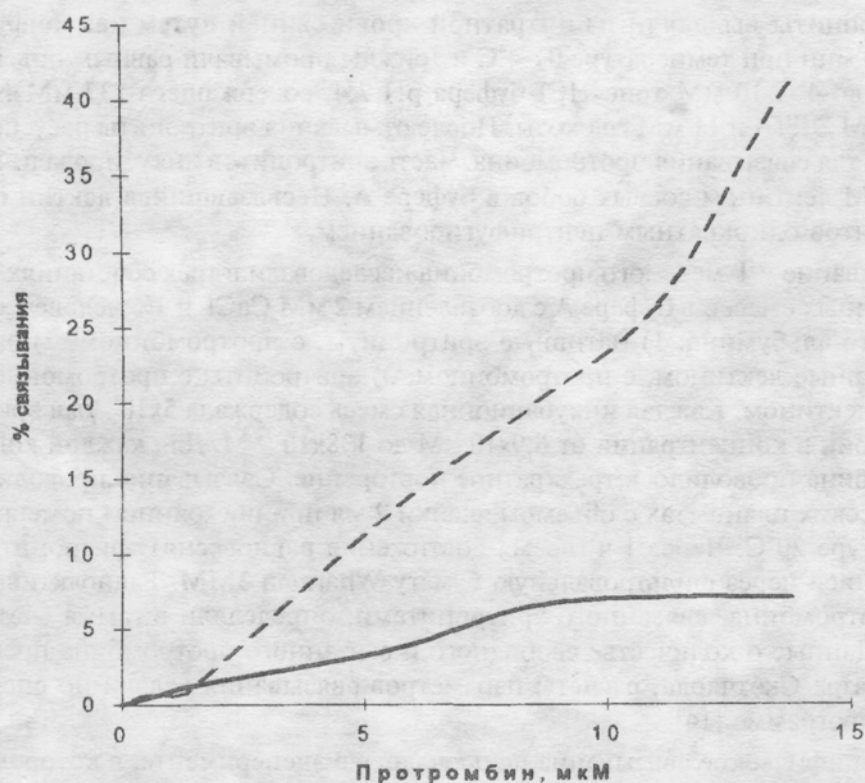


Рис. 1. Изотерма связывания  $^{125}\text{I}$ -меченого протромбина эритроцитами.

Обозначения: сплошная линия — нормальные эритроциты; прерывистая линия — эритроциты, обработанные лектином.



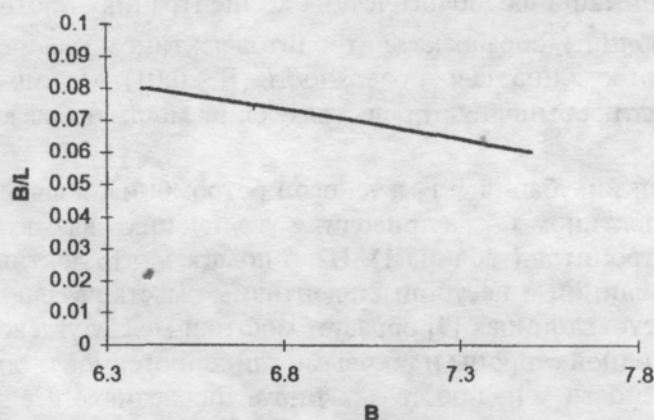


Рис.2. График Скэтчарда.

В исследованиях [19, 20], направленных на изучение связывания протромбина с фосфолипидными везикулами, содержащими фосфатидилхолина и фосфатидилсерины (3:1), была определена  $K_d = 2,3$  мкМ. Несколько меньшее сродство протромбина к эритроцитам, выявленное в наших опытах, следует полагать, обусловлено отсутствием фосфатидилсеринов на внешней листке бислоя свиной эритроцитарной мембраны.

При использованном нами количестве эритроцитов, которое в 10 раз меньше физиологического, от 21 до 38% мест связывания могут быть заняты протромбином при физиологических концентрациях этого белка плазмы крови. Если абстрагироваться от изменений  $K_d$ , обусловленных небольшими отличиями ионной силы, и конкуренцией других плазменных белков, априорно можно заключить, что при физиологическом числе эритроцитов (около  $5 \cdot 10^6$  мм<sup>3</sup>) в крови доля занятых протромбином мест связывания будет значительно меньше.

Связывание на поверхности эритроцитов лектина соевых бобов *Glycine max.* ( $K_d = 100$  мкМ) в количестве, достаточном для покрытия всей поверхности эритроцитов резко изменяло их влияние на свертывание плазмы крови и взаимодействие с протромбином. Во-первых, эритроциты полностью теряли способность ускорять реакции гемокоагуляционного каскада. В присутствии взвеси  $5 \cdot 10^6$  обработанных лектоном эритроцитов/мл бестромбоцитарная плазма крови свиней свертывалась за  $126,7 \pm 1,7$  с, т. е. с той же скоростью, что и контрольная.

Таблица  
Влияние лектина *Glycine max* на связывание <sup>125</sup>I-меченого протромбина эритроцитами

Концентрация протромбина, мкМ	Эритроциты — протромбин, %	[Эритроциты+лектин] - [протромбин], %	[эритроциты] - [протромбин + лектин], %
2,8	$3,5 \pm 0,1$	$12,0 \pm 2,3$	$7,5 \pm 0,5$
1,4	$1,0 \pm 0,3$	$6,0 \pm 0,8$	$4,0 \pm 0,6$

Во-вторых, (рис. 1) связывание <sup>125</sup>I-меченого протромбина эритроцитами, после того как их поверхность через доступные остатки N-ацетил-D-галактозы гликопротеинов и гликолипидов была покрыта лектином, становится ненасыщенным при всех примененных концентрациях лиганда. Поэтому для дальнейшего анализа остается возможность использовать только лишь показатели среднего процента связывания



при разных концентрациях протромбина. В табл. приведены результаты среднего процента связывания при физиологических концентрациях протромбина.

Как видно из таблицы, обработка эритроцитов лектином увеличивает в несколько раз связывание протромбина на их поверхности ( $P < 0,01$ ). Можно предполагать, что сами молекулы лектина выполняют роль связующих мостиков между эритроцитом и протромбином.

Предварительная инкубация  $^{125}\text{I}$ -меченого протромбина, являющегося гликопротеином [21, 22], с лектином также приводит к увеличению связывания этого лиганда поверхностью эритроцитов (таблица 1). Надо полагать, что лектин *Glucine max*, состоящий из 4 субъединиц и несущий 2 идентичных места связывания гликосахаридов на отдельных субъединицах [9] образует мостики между углеводными радикалами протромбина с одной стороны и таковыми гликопротеинов и гликолипидов эритроцитарной поверхности, а не просто оккупирует последнюю. Связанный таким образом протромбин становится неудобным субстратом для протромбиназы. Можно считать, что и многие другие компоненты гемокоагуляционного каскада, являющиеся гликопротеинами (факторы V, VII, VIII, IX, X и фибриноген) оказываются в таком же положении. Поэтому после обработки эритроцитов лектином ферментативные реакции свертывания крови протекают только лишь в жидкой фазе и ускоряющее действие мембраны этих форменных элементов крови на коагуляцию исчезает.

На основании выполненных экспериментов можно однозначно отклонить предположение о том, что нарушение гемокоагуляционных свойств клеточных мембран под действием лектинов вызвано лишь специфическим блокированием углеводного компонента апопротеина тканевого фактора свертывающей системы крови [7, 8].

Установленные в настоящем исследовании параметры связывания протромбина эритроцитами можно с хорошим приближением отнести и к нативным эритроцитам человека, т. к. в использованных нами эритроцитах свиньи, липидный состав которых очень сходен с человеческими, отсутствует "скремблаза" — активность осуществляющая  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированное перемешивание липидов между листками бислоя наружной клеточной мембраны и выносящая фосфатдилсерины на поверхность клетки [5]. Поэтому липидный состав наружного листка мембраны свиных эритроцитов, в отличие от человеческих, не изменяется во время процедуры их выделения.

Таким образом, нативные эритроциты, хотя сами не инициируют свертывание крови, но могут незначительно ускорять этот процесс благодаря сорбции на своей поверхности с невысокой аффинностью протромбина, а также, видимо, факторов VII, IX и X, которые имеют много общего в этом отношении. Согласно исследованиям [23, 24], именно ассоциированный с мембранами протромбин представляет собой предпочтительный или "истинный" субстрат для протромбиназы. В частности, границы кажущейся величины  $K_m$  для активации протромбина протромбиназой определяются аффинностью протромбин — мембранного взаимодействия и степенью насыщения доступных мест на поверхности мембраны. Но это взаимодействие должно носить специфический характер, приводя либо к конформационной перестройке молекулы протромбина [25], допускающей ее активацию, либо к обеспечению образования ансамбля из протромбиназы и протромбина [22, 26].

Полученные нами результаты подтверждают принципиальную важность этой специфики в работе протромбиназы, т. к. связывание протромбина через лектин приводило к полной потере способности поверхности эритроцита ускорять свертывание крови. Слабое взаимодействие протромбина с мембраной эритроцита, по-видимому, представляет собой модель лишь первого этапа последующего, более тесного свя-

зывания протромбина тканевым тромбопластином, которое обеспечивается кластерами фосфатидилсеринов, мезофазными структурами фосфатидилэтаноламинов и гидрофобными контактами [27], который отсутствуют на поверхности нативных свинных эритроцитов.

Итак, даже слабая ассоциация на поверхности эритроцитов ( $K_d = 4,25 \pm 0,35$  мкМ) протромбина, которая ограничивается проекцией площади только двух полярных головок мембранных фосфолипидов, приводит, хотя и к небольшому, но достоверному ускорению процесса свертывания крови.

Работа поддержана грантом Межведомственного экспертного Совета Миннауки РФ и грантом АНТ.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Schmidt A. // Arch. Anatom. Physiol. u. Wissensch. Med. -1862. -1, 428 — 469.
2. Quick A. J. // Nature, 1961. V. 192, 882 — 883.
3. Quick A. J., Hickey M. E. // Am. J. Med. Sci. -1960, V. 239, 101 — 110.
4. Ашкинази И. Я. Эритроцит и внутреннее тромбопластинообразование. Наука, Ленинград, 1977. -154.
6. Govers-Riemslog J. W., Janssen M. P., Zwaal R. F., Rosling J. // Eur. J. Biochem. -1994. - V. 220, 131 — 138.
7. Pitlick F. A. // J. Clin. Invest. -1975. -55, 1. -175 — 179.
8. Зубаиров Д. М., Ченборисова Г. Ш. // Гематолог и трансфузиолог. -1990. -35, N 9. -6 — 8.
9. Wells J. A., de Vos A. M. // Ann. Rev. Biochem. -1996. -V. 65. -609 — 634.
10. Зубаиров Д. М., Тимербаев В. Н., Киселев СМ. В., Кишин С. В., Соболева И. В. // Биохимия. -1989. -54, N 6. -1046 — 1054.
11. Weber K., Osborn M. // J. Biol. Chem. -1969. V. 244, 16. -4406 — 4412.
12. Hunter W. M., Greenwood F. C. // Nature. -1962. V. 194, 4827. -495 — 496.
14. Пеккель В. А. // Лаб. дело. 1987. N 5. -344 — 354.
15. Струкова С. М. // Биохимия. -1976. V. 41, 643 — 649.
16. Kawakami S., Kaibara M., Kawamoto Y., Yamanaki K. // Biorheology. -1995. V. 32, 4. - 521 — 536.
17. Семенов Н. В. Биохимические компоненты и константы жидких сред и тканей человека, Медицина. Москва, 1971.
18. Ивков В. Г., Берестовский Г. Н. Динамическая структура липидного бислоя, Наука, Москва, 1981.
19. Nesheim M. E. // Surv. Sunth. Path. Res. -1984. V. 3. -219 — 232.
20. Mann K. G., Jenny R. J., Krishnaswamy S. // Ann. Rev. Biochem. -1988. V. 57, 915 — 956.
21. Nelsestuen G. L., Suttie J. W. // Biochim. Biophys. Acta. -1971. V. 45, -198 — 203.
22. Тимербаев В. Н., Ченборисова Г. Ш., Зубаиров Д. М. // Биохимия. -1977. -42,5. -839 — 842.
23. Зубаиров Д. М. В кн. Биохимия животных и человека. Свертывание крови и фибринолиз. (под ред. Белицера В. А.) Наукова думка, Киев. -1982. -3 — 14.
24. Mann K. G., Nesheim M. E., Church W. R., Haley P., Krishnaswamy S. // Blood. -1990. V. 76, — 16.
25. Wu J. R., Lentz B. R. // Thromb. Haemost. -1994. V. 71, -596 — 604.

26. Billy D., Willems G. M., Hemker H. C., Lindhout T. // J. Biol. Chem. -1995. V. 270. 26883 — 26889.
27. Зубаиров Д. М., Тимербаев В. Н. // Гематол. трансфузиол. -1991. Т. 36. -5 — 9.

# INFLUENCE OF LECTIN GLYCINE MAX TO INTERACTION PROTHROMBIN WITH ERYTHROCYTES

D. M. Zubairov, S. V. Kiselev, A. I. Bulatova

Department of Biochemistry of Kazan state medical university, 420012 Kazan, Butlerov str., 49;  
Fax: 007 (8-432) 36-03-93, electronic post (mail): Dilja@ant.ksc.iasnet.com

Native porcine erythrocytes do not initiate blood coagulation, though even the weak association ( $K_d = 4,25 \pm 0,35 \mu M$ ) of prothrombin with their surface which is limited to the projection of two phospholipid polar head groups onto the external cell membrane, exerts a slight but authentic influence on the acceleration of blood clotting. There are  $11,9 \cdot 10^7$  sites for  $^{125}I$ -prothrombin on one erythrocyte. At physiological concentration of prothrombin the surface of erythrocytes is far from saturation. The binding of  $^{125}I$ -labelled prothrombin to erythrocytes after their surface was covered by lectin *Glycine max* by means of the accessible residues of N-acetyl-D-galactosamine and D-galactose, glycoproteins and dlycolipids can never become saturated with any used concentration of the ligand. In the presence of the suspension of erythrocytes treated lectin platelet free plasma coagulates at the same speed as the control plasma.

**Key Words:** prothrombin, erythrocytes, lectin *Glycine max*.