Биомедицинская химия, 2003, том 49 №5, с.443-450

УДК 577.152.3
©Коллектив авторов

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФАКТОРА X ЧЕЛОВЕКА С ТКАНЕВЫМ ТРОМБОПЛАСТИНОМ

С.В. Киселев, Д.М. Зубаиров, В.Н. Тимарбаев

Казанский государственный медицинский университет, 420012 Казань, ул. Бутлерова, 49; факс: (8432) 360-393, эл. почта: plem-mu@ mi.ru

Исследовали связывание меченного [^{125}I] фактора X человека с нативным и обработанным папаином тканевым тромбопластином в присутствии $CaCl_2$ или ЭДТА. Кривые связывания в координатах Скэтчарда свидетельствуют о наличии на тромбопластине двух типов центров связывания - высокоаффинных (с кажущейся K_d=1,8·10^{-9} М) и низкоаффинных. Удаление Ca^{2+} уменьшало сродство фактора X к высокоаффинным центрам и сопровождалось некоторым увеличением их числа. Протеолиз папаином снижал аффинность высокоаффинных центров и приводил к увеличению их числа в присутствии Ca^{2+}. В отсутствие Ca^{2+} сродство не менялось, а количество центров уменьшалось. При низких концентрациях фактора X выявлялась положительная кооперативность связывания по высокоаффинным центрам, которая не зависила от наличия Ca^{2+}. Результаты косвенно подтверждают роль гидрофобных взаимодействий в Ca^{2+}-зависимое связывание фактора X с тромбопластином, а также то, что гетерогенность этого связывания определяется мезофазной структурой фосфолипидов тромбопластина.

Ключевые слова: фактор X человека, тканевой тромбопластин, центры связывания фактора X.

ВВЕДЕНИЕ. В каскаде генерации тромбина при свертывании крови абсолютно необходимы только те реакции, в которых участвуют витамин К-зависимые факторы VII, IX, X и протромбин [1]. Они последовательно активируются при участии ионов Ca^{2+} в нескольких ферментных комплексах. Развертывание каскада инициируется, главным образом, комплексом тканевого фактора с фактором VIIa. Комплексы имеют однотипную организацию, включающую наряду с ферментом и субстратом белок-кофактор и каталитическую фосфолипидную поверхность. При самосборке комплекса витамин К-зависимые факторы взаимодействуют с отрицательно заряженными фосфолипидами клеточных мембран, главным образом, фосфатидилсерином. Связывание факторов обеспечивается образованием кальциевых хелатных мостиков между фосфатидилсерином мембраны и остатками γ-карбоксиглутаминовой кислоты в белке. Концепции структуры и механизма работы ферментных комплексов при генерации тромбина разработаны применительно к чисто фосфолипидной поверхности, поскольку взаимодействие их компонентов изучалось в основном на модельной поверхности фосфолипидых везикул. Между тем, нативным клеточным мембранам присуща асимметрия фосфолипидного бислоя с отсутствием отрицательно заряженных фосфолипидов во внешнем монослое [2], а интегральные белки мембран могут модифицировать фосфолипидную поверхность и влиять на взаимодействие с ней витамин К-зависимых факторов. Без каталитической фосфолипидной поверхности активные факторы и кофакторы

не могут обеспечить достаточную скорость генерации тромбина и свертывания крови. Известно, что тканевой фактор постоянно экспонирован на поверхности многих клеток, соприкасающихся с кровью и лимфой [3], однако свертывание в норме не происходит. Таким образом, имеется достаточно данных в пользу того, что инициирование свертывания крови как процесса, включающего сосудисто-тромбоцитарный и плазменный гемостаз, связано с перестройкой структуры мембран клеток, соприкасающихся с кровью. Однако до недавнего времени ничего не было известно о том как образуется каталитически активная фосфолипидная поверхность и каково значение ее структуры для формирования ферментных комплексов витамин К-зависимых факторов. Согласно данным современной биомембранологии, бислойная структура нативных клеточных мембран животных термодинамически неустойчива. Она поддерживается регулируемым энергозатратным механизмом переноса фосфатидилсерина и фосфатидил-этаноламина из внешнего монослоя во внутренний. Асимметрия состава фосфолипидов может в определенных пределах обратимо и локально изменяться, обеспечивая изменение кривизны и гибкости мембраны для выполнения различных клеточных функций. При накоплении фосфатидилсерина и фосфатидилэтаноламина во внешнем монослое (вследствие особенностей геометрии их молекул и взаимодействия с ионами Ca^{2+} внеклеточной жидкости) эти фосфолипиды образуют домены и кластеры различной небислойной структуры - т.н. мезофазы. При нарушении целостности мембрана превращается в конгломерат бислойных и небислойных участков, т.е. приобретает гетерофазную структуру [4,5]. Повреждения клеточных мембран при свертывании крови неизбежно приводят к формированию различных мезофаз фосфолипидов. Кажется ясным, что взаимодействие ферментных комплексов витамин К-зависимых факторов должно изучаться на фосфолипопротеиновой поверхности, максимально воспроизводящей структуру клеточных мембран в момент свертывания. Наиболее подходящим аналогом такой поверхности представляется тканевой тромбопластин (фактор Ш). Это промытый ацетоном порошок мозга, используемый как стандартный препарат для биохимического тестирования системы свертывания крови. В предыдущих работах, выполненных в нашей лаборатории показано, что тканевой тромбопластин сохраняет мало фрагментов клеточных мембран с типично бислойной структурой [6]. Фосфолипиды тромбопластина организованы в гексогональную ($H_п$) липотропную мезофазу с экспонированием в водную среду 10-20% полярных головок фосфолипидов. В предыдущем исследовании радиолигандным методом мы выявили на тромбопластине низко- и высокоаффинные фосфолипидные центры связывания протромбина [7]. Для понимания общих черт и особенностей взаимодействия витамин К-зависимых факторов с трансформированной фосфолипидной поверхностью клеточных мембран нам представляется важным изучить связывание с тромбопластином также фактора Х, в связи с чем было предпринято настоящее исследование.

МЕТОДИКА. Фактор Х человека получали из цитратной плазмы крови, используя в различных сочетаниях молекулярную адсорбцию, высаливание, диализ, ионообменную, гель-проникающую и аффинную хроматографии. Витамин К-зависимые факторы свертывания крови адсорбировали на цитрате бария, образующимся после добавления к плазме 1 М раствора $BaCl_2$ (80 мл на 1 л плазмы). Сорбент с белками промывали 0,15 М раствором $BaCl_2$ и суспендировали в воде. Белки высаливали непосредственно из суспензии кристаллическим сульфатом аммония в пределах 40-70% насыщения. Концентрат витамин К-зависимых белков обессоливали гель-фильтрацией через колонку (2,4×60 см) с сефадексом G-25 ("Pharmacia", Швеция). Фактор Х далее очищали хроматографией на колонке (2,2×7 см) с ДЭАЭ-сефадексом А-50 ("Pharmacia"). Использовали стартовый 0,05 М цитратный буфер, с последующим элюированием линейным градиентом NaCl до 0,6 М. Фракции, содержащие фактор Х (нисходящая часть основного белкового пика, состоящего из витамин К-

зависимых факторов), объединяли и диализовали против 0,05 М цитратного буфера pH 7,0, содержащего 0,001 М солянокислого бензамидина для предотвращения аутоактивации фактора X. Белок хроматографировали далее на колонке (1,4×4,5 см) с ДЭАЭ-аффигелем блю 15 ("Bio-Rad", США), уравновешенным тем же буфером. После элюции прочих витамин К-зависимых факторов (главным образом, протромбина) создавали градиент NaCl до 0,7 М. Все операции выполняли при 0-4°С.

Чистоту фактора X исследовали электрофорезом в полиакриламидном геле с DS-Na [8]. Концентрацию фактора X определяли УФ-адсорбционной спектроскопией при 280 нм, используя коэффициент удельного поглощения 11,6 и молекулярную массу 58,9 кДа [9]. Активность фактора X определяли, используя субстрат-дефицитную плазму человека ("Behringwerke AG", Германия), а наличие фактора Xa - хромогенный субстрат S2222 ("Kabi Diagnostica", Швеция), следуя инструкциям фирм-изготовителей. По данным электрофореза, фактор X был гомогенен и не содержал примеси других белков.

Фактор X метили ^{125}I хлораминовым методом [10], используя [^{125}I]Na без носителя ("Изотоп", Россия). Несвязанный изотоп удаляли гель-фильтрацией через сефадекс G-25 (колонка 1,5×21 см), уравновешанный 0,05 М трис-HCl-буфером с 0,1 М NaCl, pH 7,4. Радиоактивность препаратов фактора X была в пределах $(1,3\text{-}2,7)\cdot10^9$ расп/ мин на 1 мг (1 атом связанного йода на 57-27 молекул белка).

Тромбопластин из мозга человека (Каунас, Литва) суспендировали (4 мг/мл) в 0,05 М Трис-HCl-буфере, pH 8,4, в течение 10 мин в гомогенизаторе Поттера-Эвельгейма с тефлоновым пестиком при 1-2°С. Интегральные белки тромбопластина модифицировали ограниченным протеолизом папаином ("Merck", Германия). Протеолиз проводили в присутствии 0,01 М солянокислого цистеина в течение 3 ч при 37° при весовом отношении фермента и тромбопластина 1:36. По окончании протеолиза фермент ингибировали, добавляя монойодуксусную кислоту до конечной концентрации 0,005 М. В предыдущем исследовании показано, что обработка папаином ведет к снижению активности тромбопластина в тесте Квика. При этом отщепляется 4,7% пептидного материала, а липидная часть тромбопластина остается неизменной [11]. Модифицированный тромбопластин отделяли центрифугированием при 8000 g в течение 30 мин и ресуспендировали в соответствующем буфере для связывания с фактором X. В тех же условиях параллельно готовили препарат тромбопластина, не модифицированный папаином. Фермент к этому препарату добавляли после монойодуксусной кислоты.

Связывание радиоактивного фактора X исследовали в четырех сочетаниях состава инкубационных смесей: с нативным и модифицированным тромбопластином, в присутствии 0,005 М $CaCl_2$ или ЭДТА в 0,05 М трис-HCl-буфере с 0,1 М NaCl, pH 7,4. Концентрации фактора X варьировали в пределах $5,4\cdot10^{-11}$-$5,4\cdot10^{-9}$ М. Использованная концентрация тромбопластина (3,6 мг/ мл), обеспечивала оптимальную активацию протромбина в тесте Квика. Для каждой концентрации фактора X проводили 3-кратное дублирование смесей. К 0,9 мл суспензии тромбопластина добавляли 0,1 мл раствора меченого фактора X в таком же буфере. Смеси выдерживали 1 час при комнатной температуре, затем центрифугировали 30 мин при 8000 g. Радиоактивность аликвот супернатантов и осадков измеряли на счетчике Минигамма ("LKB Wallac", Финляндия).

Экспериментальные данные (средние значения 3-кратного дублирования каждой концентрации) представляли в координатах Скэтчарда. Раздельно по каждому типу центров рассчитывали кажущиеся параметры связывания - (константу диссоциации - K_d и число центров - Q) как коэффициенты линейной регрессии. Использовали специализированную программу расчета по методу наименьших квадратов [12]. Взаимный вклад связывания с разными типами центров в величины наблюдаемых параметров связывания учитывали по Klotz и Hanston [13]. Для высокоаффинных центров вычисления были продублированы

разностным методом по программе "Лиганд" [14]. Достоверность различий параметров связывания определяли регрессионным анализом по критерию Стьюдента при уровне значимости $p< 0,05$ [15].

Всем исследованиям предшествовал эксперимент по установлению времени наступления равновесия при связывании радиоактивного фактора X с тромбопластином. Для оценки специфичности их взаимодействия был поставлен эксперимент по связыванию с тромбопластином меченного ^{125}I сывороточного альбумина человека ("Reanal", Венгрия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. При достаточно низкой концентрации фактора X $5,4 \cdot 10^{-11}$М максимум связывания его с тромбопластином достигался за 1 ч инкубации. Это время было принято как достаточное для достижения равновесного связывания в опытах. В контрольном эксперименте связывание альбумина с тромбопластином происходило по одному типу центров ($K_d=2,8 \cdot 10^{-9}$М, $Q=2,2 \cdot 10^{-10}$М) и не зависило от присутствия ионов Ca^{2+}[8].

Связывание фактора X с тромбопластином в диапазоне исследованных концентраций ($5,4 \cdot 10^{-10}$-$5,4 \cdot 10^{-9}$ М, что соответствует 0,54-5,4% от содержания в плазме) в координатах Скэтчарда характеризовалось прямыми линиями параллельными оси абсцисс (рис. 1, А и Б). При наиболее низких концентрациях белка ($5,4 \cdot 10^{-11}$-$5,4 \cdot 10^{-10}$ М, что соответствует 0,054-0,54% от содержания в плазме) кривые образовывали купол. Форма кривой свидетельствует о наличии двух типов центров связывания: с высоким сродством и с более низким сродством. Связывание фактора X с низкоаффинными центрами в пределах концентраций $5,4 \cdot 10^{-9}$-$5,4 \cdot 10^{-10}$ М оказалось ненасыщаемым (горизонтальные участки кривых). Это означает, что при данных концентрациях белка низкоаффинные центры связывания оказываются в подавляющем избытке, в связи с чем само связывание не может быть корректно охарактеризовано константой диссоциации и числом центров. Параметры связывания с высокоаффинными центрами приведены в таблице.

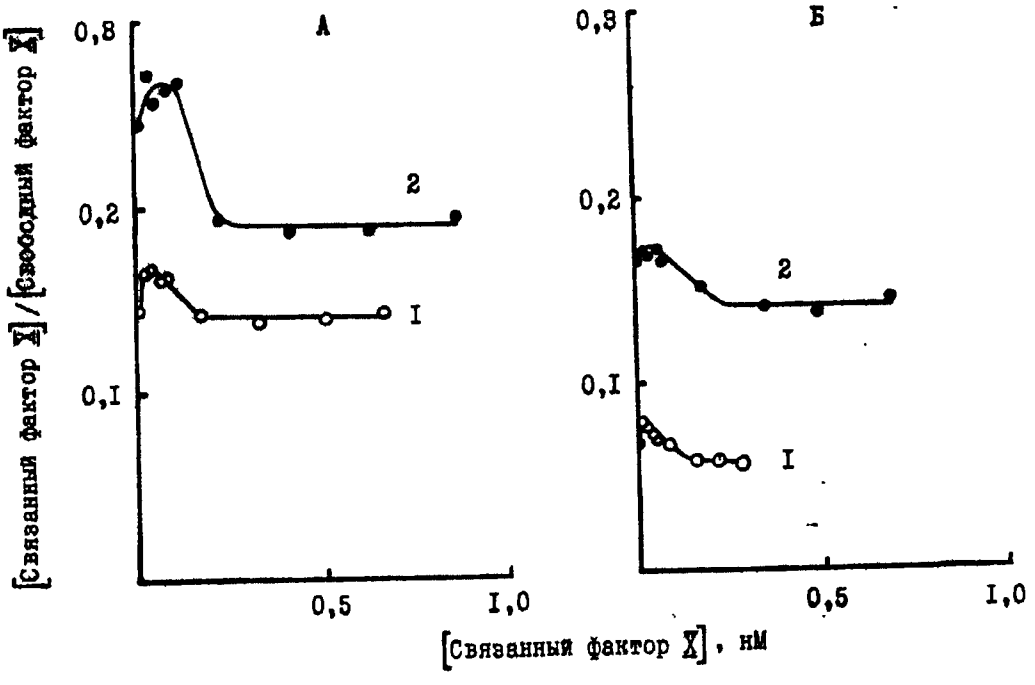

Рисунок 1.
График Скэтчарда по данным связывания фактора X с тромбопластином. А - связывание в присутствии $CaCl_2$; Б - связывание в присутствии ЭДТА; 1 - тромбопластин, обработанный папаином; 2 - нативный тромбопластин.

Таблица. Наблюдаемые параметры связывания фактора X с высокоаффинными центрами тромбопластина

Параметры связывания	Состав смеси	Модифициров. тромбопластин	Нативный тромбопластин	p
K_d, нМ	$CaCl_2$	5,2 ± 1,1	1,8 ± 0,5	<0,001
	ЭДТА	6,6 ± 0,6	5,9 ± 0,8	>0,1
	p	< 0,01	< 0,001	
Q, нМ	$CaCl_2$	0,9 ± 0,2	0,6 ± 0,2	<0,01
	ЭДТА	0,5 ± 0,05	1,1 ± 0,2	<0,001
	p	< 0,001	< 0,001	
%	$CaCl_2$	13,9 ± 0,3	20,6 ± 0,3	<0,001
	ЭДТА	6,9 ± 0,2	14,3 ± 0,2	<0,001
	p	< 0,001	< 0,001	

Связывание фактора X с высокоаффинными центрами характеризуется положительной кооперативностью, которая не зависит от присутствия ионов кальция. Однако, при удалении ионов Ca^{2+} уменьшается сродство фактора X к высокоаффинным центрам (увеличение K_d). У нативного тромбопластина число центров при этом несколько возрастает. Эти изменения в конечном счете обеспечивают снижение общего связывания фактора X (с 20,6 до 14,3 %).

Обработка тромбопластина папаином приводила к снижению сродства (увеличение K_d) и некоторому повышению числа центров при наличии ионов кальция, а в их отсутствие - к уменьшению числа центров связывания. Общее связывание фактора X при этом снижалось.

В нашей предыдущей работе по изучению взаимодействия другого витамин К-зависимого фактора свертывания - протромбина с тканевым тромбопластином, были обнаружены высокоаффинные и низкоаффинные центры связывания [7]. Из результатов настоящего исследования следует, что связывание фактора X с тромбопластином специфично и зависит от ионов Ca^{2+}. Совокупность приведенных во введении данных о механизме связывания витамин К-зависимых факторов с фосфолипидными мембранами свидетельствует о том, что центры связывания фактора X на тканевом тромбопластине образованы фосфолипидами. Сохранение формы кривых связывания фактора X после частичного расщепления интегральных белков тромбопластина и снятие влияния белков на аффинность центров при удалении ионов Ca^{+2} указывает на то, что белки тромбопластина непосредственно не участвуют в специфическом связывании фактора X.

При изучении взаимодействия фактора X с фосфолипидными везикулами выявлен только один тип центров связывания [16]. Эффективность взаимодействия зависела от содержания фосфатидилсерина в везикулах и концентрации ионов Ca^{2+}. При значениях этих параметров, близких к физиологическим (15-20 мол. % фосфатидилсерина и 1-5 мМ ионов Ca^{2+}, что соответствует условиям наших экспериментов), K_d для фактора X составляет $0{,}2\text{-}0{,}3 \cdot 10^{-6}$ М [17]. Эта величина в 5 раз ниже, чем K_d протромбина, что отражает известный факт более высокого сродства фактора X к фосфолипидной поверхности по сравнению с протромбином.

В наших экспериментах связывание фактора X с низкоаффинными центрами тромбопластина было ненасыщаемым и измеренная величина K_d характеризует связывание с высокоаффинными центрами. Их сродство в 6000-9000 раз выше, чем у центров связывания фактора X на однородной поверхности фосфолипидных везикул. В значительно большей степени, и это кажется естественным для высокоаффинного связывания, проявилось более высокое сродство фактора X к тромбопластину по сравнению с протромбином.

Удаление ионов кальция, несколько снижая сродство центров связывания, не сказывается принципиальным образом на высокой специфичности

взаимодействия с ними фактора X. Проявляется еще более высокий уровень остаточного связывания его, чем у протромбина. Эти факты означают, что связывание фактора X с тромбопластином (как и у протромбина) обеспечивается наряду с Ca^{2+}-опосредованным также и Ca^{2+}-независимым взаимодействием. В Гла-домене фактора X (как в протромбине и других витамин К-зависимых факторах свертывания) в идентичных положениях имеются консервативные остатки неполярных аминокислот (Фен-4, Лей-5 и Вал-9) [18]. Они образуют поверхностно расположенный гидрофобный узел, критически важный для связывания фактора с фосфолипидной поверхностью [19]. Учитывая совокупность известного фактического материала, естественно предположить, что аналогично протромбину Ca^{2+}-независимое связывание фактора X с тромбопластином обусловлено гидрофобными взаимодействиями. Как и у протромбина вначале должно происходить Ca^{2+}-опосредованное взаимодействие фактора X с кластерами фосфатидилсерина, проявляющими себя как низкоаффинные центры связывания. Затем присоединяется взаимодействие гидрофобного узла Гла-домена фактора X с остатками жирных кислот по структурным дефектам поверхности на границах мезофаз фосфатидилэтаноламина, проявляющих себя как высокоаффинные центры связывания.

Из двух типов взаимодействия - Ca^{2+}-опосредованного электростатического и гидрофобного относительный вклад первого из них при связывании фактора X оказывается менее значимым, чем при связывании протромбина. Это следует из ненасыщаемости связывания по низкоаффинным центрам, более высокого остаточного связывания, нивелирования эффекта расщепления белков тромбопластина и сохранения положительной кооперативности связывания фактора X с высокоаффинными центрами в отсутствие ионов Ca^{2+}. Принципиальное сходство основных черт взаимодействия протромбина и фактора X с тромбопластином показывает, что центры связывания их имеют единую природу. Однако, более сильное гидрофобное взаимодействие с высокоаффинными центрами обеспечивает более высокое сродство к ним фактора X по сравнению с протромбином. Это обстоятельство объясняет также более заметное уменьшение сродства и менее выраженное изменение числа высокоаффинных центров при удалении ионов Ca^{2+} по сравнению с протромбином. При этом, как отмечалось выше, должны снижаться размер и число структурных дефектов фосфолипидной поверхности, а также понижаться упорядоченность гидрофобного узла в Гла-домене белка. При более высокой выраженности гидрофобного взаимодействия для фактора X это ведет к более заметному уменьшению такого взаимодействия по каждому дефекту (что проявляется в повышении K_d), но меньше, чем для протромбина сказывается на числе дефектов (высокоаффинных центров), по которым происходит взаимодействие. Преобладание гидрофобного вклада над Ca^{2+}-зависимым электростатическим при взаимодействии фактора X с высокоаффинными центрами, по-видимому, должно приводить также к сохранению положительной кооперативности связывания в отсутствие ионов Ca^{2+} за счет димеризации белка, как это было показано для протромбина [20].

Различие в сродстве протромбина и фактора X к высокоаффинным центрам связывания на поверхности тромбопластина должно обеспечиваться отличием в структуре N-концевых участков этих белков. Кардинальным отличием является наличие двух дополнительных остатков Гла [21]. Кроме того, в факторе X, в отличие от протромбина, после Гла-домена следует не кринглл, а домен подобный эпидермальному фактору роста (ЭФР-домен). По данным рентгеноструктурного анализа, добавочные остатки Гла достаточны для организации в факторе X дополнительного по сравнению с протромбином высокоаффинного центра связывания ионов Ca^{2+}, располагающегося на границе между Гла-доменом и ЭФР-доменом [22]. Подобно протромбину, фактор X при связывании ионов Ca^{2+} претерпевает конформационный переход [23]. Гла-домен и первый ЭФР-домен

фактора X взаимно влияют на формирование их структуры в присутствии ионов Ca^{2+}. При наличии в Гла-домене фактора X дополнительного центра связывания ионов кальция можно ожидать усиления Ca^{2+}-зависимого компонента его взаимодействия с тромбопластином по сравнению с протромбином. Однако, необходимо учесть, что на 7 ионов кальция, связываемых Гла-доменом протромбина, 4 взаимодействуют с высоким сродством и скрыты в толще домена и только 3 иона кальция взаимодействуют менее сильно, доступны растворителю и могут вступать также во взаимодействие с фосфолипидами [22]. Поэтому представляется вероятным, что наличие дополнительного пограничного с ЭФР-доменом центра связывания ионов кальция в факторе X косвенно усиливает Ca^{2+}-зависимое гидрофобное взаимодействия белка с тромбопластином через гидрофобный узел аминокислот Гла-домена (сам по себе или в кооперации с ЭФР-доменом).

Проведенные нами исследования показывают принципиальное сходство основных черт взаимодействия протромбина и фактора X с тромбопластином. К ним относятся необходимость одной и той же структуры фосфолипидной поверхности с двумя типами центров для Ca^{2+}-опосредованного связывания каждого белка, наличие непосредственно Ca^{2+} независимого компонента в специфичном взаимодействии белков с этой поверхностью, вовлечение общего механизма связывания, обеспечивающего положительную кооперативность процесса. Принципиальное сходство выявленных закономерностей позволяет считать их общими для взаимодействия всех витамин К-зависимых факторов с мезоморфной фосфолипидной поверхностью тканевого тромбопластина и фрагментов клеточных мембран при свертывании крови в организме. В предыдущих работах мы показали, что фазовый переход бислойной структуры клеточных мембран в мезоморфную представляет центральное звено механизма инициирования свертывания крови [24, 25]. Образования центров связывания с разным сродством необходимо для формирования ферментных комплексов и последовательной активации витамин К-зависимых факторов, приводящей к появлению тромбина.

Экспериментальные данные, полученные в Казанском государственном медицинском университете, выполнены в рамках научных исследований по программе: "Инициальные механизмы диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови", шифр 0.69.05, финансируемой из бюджета МЗ России.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Зубаиров Д.М.* (2000) Молекулярные основы свертывания крови и тромбообразования. ФЭН, Казань.
2. *Op den Kamp J.A.F.* (1979) Ann. Rev **48**, 47-71.
3. *Broze G.J.* (1982) J. Clin. Invest., **70**, 526-535.
4. *Devaux Ph.* (1991) Biochemistry, **30**, 1163-1173.
5. *Seddon J.M.* (1990) Biochem et Biophys. Acta: Rev. Biomembr., **1031**, 1-69.
6. *Зубаиров Д.М., Тимербаев В.Н., Байкеев Р.Ф., Киселев С.В., Попова Л.Г., Соболева И.В., Ченборисова Г.Ш., Киршин С.В.* (1989) Биохимия животных и человека, **13**, 1-10.
7. *Зубаиров Д.М., Тимербаев В.Н., Киселев С.В., Киршин С.В., Соболева И.В.* (1989) Биохимия, **54**, 1046-1054.
8. *Weber K., Osborn M.* (1969) J. Biol. Chem., **244**, 4406-4412.
9. *Di Scipio R.G., Hermodsen M.A., Yates S.G., Davie E.W.* (1977) Biochemistry, **16**, 698-706.
10. *Hunter W.M., Greenwood F.C.* (1962) Nature, **194**, 495-496.
11. *Сторожев А.Л Зубаиров Д.М., Соболева И.В., Важинская З.В., Ченборисова Г.Ш., Тимербаев В.Н.* (1981) Биохимия, **46**, 1210-1214.
12. *Пеккель В.А.* (1987) Лаб. дело, **5**, 344-354.

13. *Klotz M., Hunston D.L.* (1971) Biochemistry, **10**, 3065-3069.
14. *Зайцев С.В., Курочкин И.Н., Варфоломеев С.Д., Березин И.В.* (1985) Докл. АН СССР, **281**, 727-731.
15. *Урбах В.Ю.* (1975) Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях.М., Медицина.
16. *Burri B., Edgington T-S., Fair D.S.* (1987) Biochim et Biophys. Acta: Gen. Subj., **923**, 176-186.
17. *Mertens K., Cupers R., Van Wijngaarden A., Bertina R.M.* (1984) Biochem. J., **223**, 599-605.
18. *Fung M.R., Hay C.M., MacGillivray R.T.A.* (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **82**, 3591-3595.
19. *Sunnrhagen M., Forsen S., Hoffren A., Drakenberg T., Teleman O., Stenflo J.* (1995) Trombos. Haemostas., **73**, 1207.
20. *Jackson C.M., Brenckle G.M., Hogg Ph. J., Winzor D.* (1987) J. Biol. Chim., **262**, 13472-13475.
21. *Fung M.R., Hay C.W., MacGillivray R.T.A.* (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **82**, 3591-3595.
22. *Soriano-Garcia M., Padmanabhan K., de Vos A.M., Tulinsky A.* (1992) Biochemistry, **31**, 2554-2566.
23. *Church W.R., Boulanger L.L., Messier T.l., Mann K.G.* (1989) J. Biol. Chem., **264**, 17882-17887.
24. *Тимербаев В.Н., Зубаиров Д.М., Киселев С.В., Киршин С.В., Соболева И.В.* (1992) Биохимия, **57**, 77-90.
25. *Зубаиров Д.М., Тимербаев В.Н.* (1991) Гематология и трансфузиология, **36**, 5-9.

Поступила 21.11.2001

HUMAN FACTOR X INTERACTION WITH THROMBOPLASTIN

S.V. Kiselev, D.M. Zubairov, V.N. Timerbaev

Kazan Medical University, Butlerova st. 49, Kazan, 420012; Russia; fax: (8432) 360-393;
e-mail: plem-mu@mi.ru

The binding of ^{125}I-labeled human factor X to native and papaine-treated tissue tromboplastin in the presence of $CaCl_2$ or EDTA was studied. The Scatchard analysis suggests the existence of high (K_d=1,8·10^{9} M) and low affinity binding sites on the thromboplastin surface.

The removal of Ca^{2+} reduced affinity of factor X to the highl affinity sites. This was accompanied by some increase of their number. Proteolysis by papaine decreased affinity of high affinity sites and caused the increase of their number in the presence of Ca^{2+}. In the absence of Ca^{2+} the affinity remained unchanged, but the number of sites decreased. At low concentrations of factor X positive cooperativity for high affinity binding sites was observed. It did not depend on the presence of Ca^{2+}. The results indirectly confirm the role of hydrophobic interactons in Ca^{2+} dependent binding of factor X to thromboplastin and the fact that heterogeneity of this binding is determined by mesophase structure of the thromboplastin phospholipids.

Key words: human factor X, tissue thromboplastin, factor X binding sites.