

МЕХАНИЗМЫ И КИНЕТИКА АКТИВАЦИИ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ КОМПЛЕКСОМ ВНЕШНЕЙ ТЕНАЗЫ

© 2017 г. Т.А. Коваленко* **, М.А. Пантелеев* ** *** ****, А.Н. Свешникова* ** *** *****

*Физический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1/2;

**Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, 119991, Москва, ул. Косыгина 4;

***Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева, 117997, Москва, ул. Саморы Машела, 1;

****Факультет биологической и медицинской физики Московского физико-технического института, 141700, Долгопрудный Московской области, Институтский пер., 9;

*****Терапевтический факультет Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова Минздрава России, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1

E-mail: after-ten@yandex.ru

Поступила в редакцию 25.07.16 г.

Система гемостаза включает в себя свертывание плазмы крови и образование агрегата тромбоцитов. Плазменное звено – это каскад ферментативных реакций, запускающийся при контакте плазмы крови с любыми тканями организма, кроме здорового эндотелия. Вследствие этого контакта происходит сборка ферментного комплекса из растворимого белка плазмы фактора VIIa и связанного с мембраной белка тканевого фактора. Этот комплекс называется внешней теназой – основным инициатором свертывания крови. Субстратами внешней теназы являются белки плазмы факторы X и IX, которые подвергаются протеолизу с образованием активных сериновых протеаз – факторов Xa и IXa. Фактор Xa в комплексе со своим кофактором – белком плазмы крови фактором Va – катализирует образование тромбина, приводящее к полимеризации фибрина и желированию плазмы. Несмотря на то что все участники этого процесса давно известны, остаются неясными такие вопросы, как роль поверхности, на которой происходит сборка комплекса, участия мембраносвязанных мультимеров факторов X и Xa и пути активации фактора VII. В настоящем обзоре проводится описание последних экспериментальных и теоретических работ, посвященных биофизическим механизмам работы комплекса внешней теназы, и обсуждаются некоторые из перечисленных проблем.

Ключевые слова: свертывание крови, внешняя тенеза, фактор X, димеризация, математическое моделирование.

Гемостаз – процесс остановки кровотечения – принято делить на сосудисто-тромбоцитарный и плазменный. Сосудисто-тромбоцитарный заключается в сужении просвета сосуда при повреждении, активации специальных клеток крови – тромбоцитов и образовании тромбоцитарной пробки. Плазменный – это процесс желирования плазмы крови за счет полимеризации белка фибрина. Совместное действие обоих звеньев приводит к формированию клеточного агрегата, «цементированного» нитями фибрина и предотвращающего выход крови из сосуда при его повреждении [1]. В дальнейшем

под свертыванием крови мы будем понимать плазменное звено. В основе свертывания лежит система биохимических реакций (рис. 1), участниками которой являются белки плазмы крови, называемые факторами свертывания и в большинстве являющимися сериновыми протеазами или их кофакторами [2]. В кровотоке факторы свертывания обычно присутствуют в виде зимогенов, не обладающих протеазной активностью, за исключением фактора VII, 1% которого присутствует в форме активной протеазы, фактора VIIa.

Результатом системы реакций (рис. 1) является реакция протеолитического расщепления фактора II (протромбина) с образованием активного фермента тромбина, который осуще-

Сокращения: TF – тканевый фактор, С6PS – 1,2-дикапроил-*sn*-глицеро-3-фосфо-L-серин.

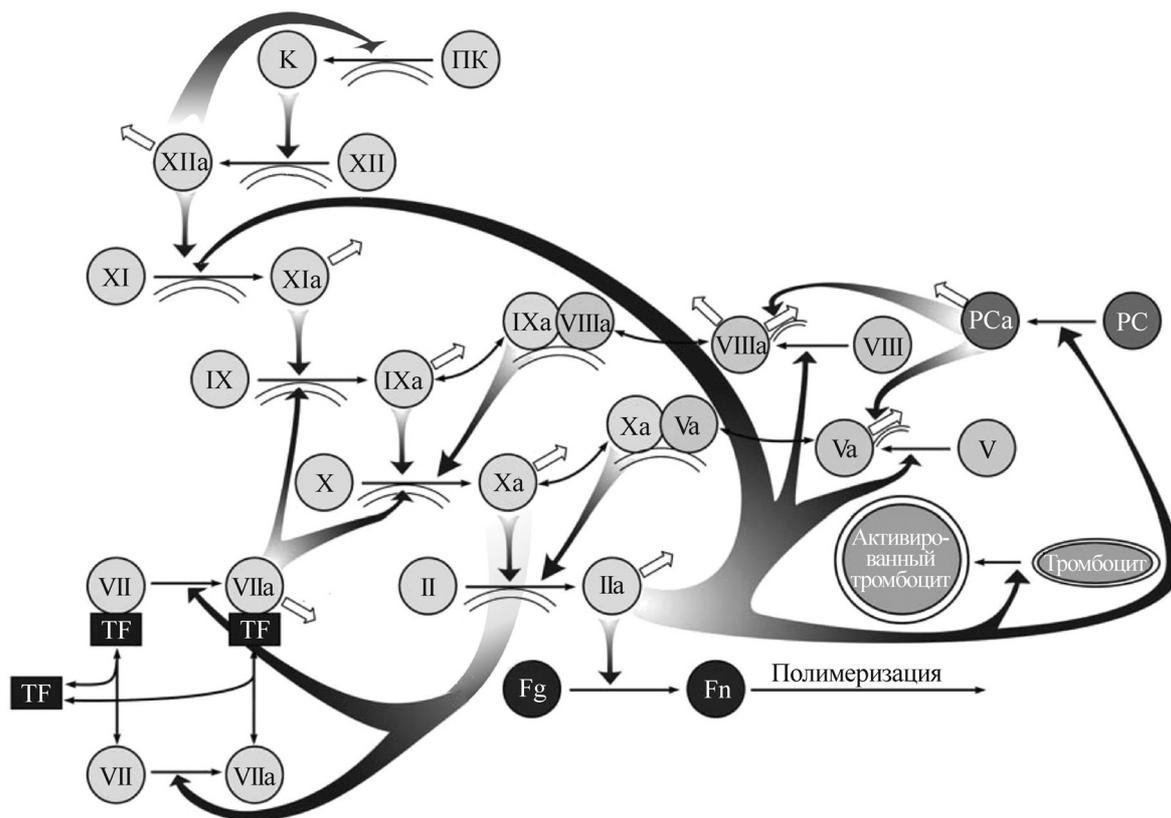


Рис. 1. Упрощенная схема реакций свертывания (из работы [69] с изменениями). Римскими цифрами обозначены факторы свертывания. Суффикс «а» обозначает активную форму фактора (активную протеазу или активный кофактор), его отсутствие – неактивный зимоген. Черными двусторонними стрелками показаны реакции формирования комплексов из протеаз и их кофакторов. Черными односторонними стрелками – реакции преобразования неактивного зимогена в активную протеазу или кофактор. Серыми стрелками – действие фермента на соответствующую реакцию активации зимогена. На схеме не показаны пути ингибирования каскада свертывания во избежание перегруженности. Кроме того, не показана активация пути комплекса VII–TF (или фактора VII) факторами IXa и IIa, поскольку эти реакции идут гораздо хуже обозначенной автоактивации комплекса VII–TF и активации комплекса VII–TF фактором Xa [42].

ствяет гидролиз растворимого белка фибриногена с образованием мономеров фибрина, способных к быстрой полимеризации, что ведет к переходу крови из жидкого состояния в состояние геля [2].

В 1964 г. две группы исследователей независимо друг от друга и практически одновременно предложили каскадную модель свертывания [3,4], согласно которой каждая предыдущая протеаза свертывания активирует последующую. Подобный механизм приводит к усилению незначительного начального стимула инициации свертывания и к быстрому формированию тромбина [4].

В 2001 г. была предложена более сложная теоретическая модель [5], получившая название клеточной модели гемостаза и учитывающая, что различные реакции каскада свертывания происходят на мембранах различных клеток (рис. 1). Так каскад был разделен на три по-

следовательных стадии – инициацию, усиление и распространение.

В настоящем обзоре проводится подробное описание процессов, происходящих при инициации свертывания крови по внешнему пути, обсуждается влияние поверхности, на которой происходит сборка внешней теназы, и других факторов на скорость работы этого ключевого фермента.

ИНИЦИАЦИЯ СВЕРТЫВАНИЯ ПО ВНЕШНЕМУ ПУТИ

Хотя в лабораторных условиях при контакте со стеклом свертывание крови может быть инициировано по контактному пути (с участием фактора XII), основную роль в инициации *in vivo* играет внешний путь, названный так по причине участия в нем компонентов, расположенных вне кровеносного сосуда.

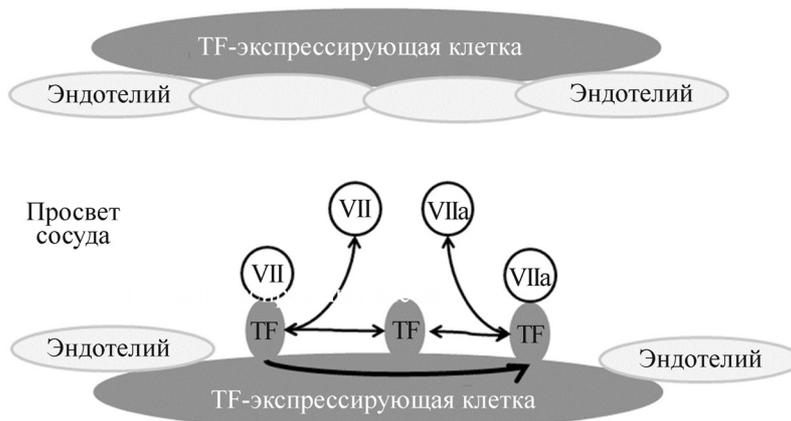


Рис. 2. Схема инициации свертывания при повреждении эндотелия сосуда. TF – тканевый фактор; VII – седьмой фактор свертывания. Черной односторонней стрелкой показана активация комплекса VII-TF.

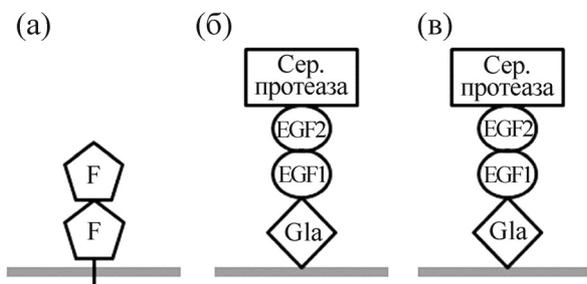


Рис. 3. Схематическое изображение тканевого фактора (а), седьмого активного фактора свертывания VIIa (б), девятого IX и десятого X факторов свертывания (в). F – Два внеклеточных домена тканевого фактора, Gla – Gla-домен факторов VIIa, X, IX; EGF1, EGF2 – два EGF-домена факторов VIIa, X, IX; сер. протеаза – протеазный домен факторов VIIa, X, IX.

Внутри неповрежденного сосуда кровь сохраняет жидкое состояние, так как факторы свертывания остаются в форме неактивных предшественников, и эндотелий сосуда и присутствующие в плазме ингибиторы способны ингибировать свертывание [2]. При повреждении сосуда кровь контактирует с тканями организма, клетки которых имеют на поверхности тканевый фактор (TF) – интегральный мембранный белок, являющийся основным инициатором свертывания [2]. При этом факторы VII (зимоген) и VIIa (активная протеаза) присоединяются к тканевому фактору, в результате чего формируется комплекс VIIa-TF, так называемая внешняя теназа, являющийся первым активным комплексом каскада свертывания (рис. 2).

Тканевый фактор и его локализация. Тканевый фактор, называемый еще тромбопластином или CD142, имеет молекулярную массу

около 47 кДа [2] в полностью гликозилированном состоянии и состоит из 261 или 263 аминокислот [6]. В состав белка входит короткий цитоплазматический домен внутри клетки, который не играет роли в свертывании [7], гидрофобный домен внутри мембраны, за счет которого белок удерживается на поверхности клетки, и два домена вне клетки, принимающие участие в свертывании (рис. 3а) [7].

Тканевый фактор распределен неравномерно в тканях организма, его экспрессия зависит от органа, в котором она происходит. Изменение «активности» тканевого фактора (его способности ускорять активацию фактора X фактором VIIa) в тканях кролика [8] и исследования при помощи моноклональных [9] и поликлональных антител [10] показали, что экспрессия TF велика в легких, миокарде сердца, мозге, слизистой оболочке кишечника, эпидермисе кожи, почечных клубочках. Тканевый фактор отсутствует или содержится в незначительном количестве в печени, скелетных мышцах, суставах [9,10].

Тканевый фактор значительно экспрессируется в фибробластах адвентициальной оболочки артерий, в меньших количествах – в меди [8–10]. Экспрессия TF различна в различных артериях – в стенке сонной артерии тканевого фактора гораздо больше, чем в аорте, почечной или бедренной артериях [8]. В капиллярах тканевый фактор не экспрессируется [9], его также нет в нормальном эндотелии сосуда [9,10].

Таким образом, тканевый фактор формирует так называемую «гемостатическую оболочку» вокруг кровеносных сосудов, эффективно препятствуя вытеканию крови при повреждении сосуда.

Внутри кровеносного сосуда моноциты экспрессируют тканевый фактор под действием эндотоксина (компонента клеточной мембраны грамотрицательных бактерий) [9,11]. Более новые экспериментальные данные о содержании и активности тканевого фактора внутри кровеносного сосуда в отсутствие эндотоксина очень противоречивы. Существуют данные, согласно которым тканевый фактор присутствует в кровотоке на поверхности нейтрофилов, моноцитов и фосфолипидных везикул [12], а также в растворимой форме белка, лишенной трансмембранного и внутриклеточного доменов, образующейся в результате альтернативного сплайсинга РНК [13], и этот тканевый фактор функционально активен [12,13]. Однако согласно экспериментальным данным, полученным в других лабораториях, активный тканевый фактор присутствует в кровотоке в пренебрежимо малой концентрации (<20 фМ) или вообще отсутствует [11].

Витамин К-зависимые белки: факторы VII, IX, X. Остальные факторы, принимающие участие в инициации свертывания по внешнему пути (факторы VII, IX, X), а также протромбин и белки C, S и Z, принимающие участие в ингибировании свертывания, являются так называемыми витамин К-зависимыми белками [14–16]. Витамин К абсолютно необходим для важной посттрансляционной модификации этих белков в печени – γ -карбоксилирования остатка глутаминовой кислоты.

Фактор свертывания VII состоит из одной полипептидной цепи с молекулярной массой 50 кДа, его концентрация в плазме крови равна приблизительно 10 нМ [17]. Фактор свертывания IX состоит из одной полипептидной цепи с молекулярной массой 57 кДа, его концентрация в плазме составляет 90 нМ [18]. Фактор X имеет массу приблизительно 58,5 кДа и состоит из двух цепей – легкой с молекулярной массой 16,2 кДа и тяжелой с молекулярной массой 42 кДа, связанных одной дисульфидной связью [19]. Его концентрация в плазме равна примерно 170 нМ.

Факторы VII, IX, X являются зимогенами и не проявляют каталитической активности. Каталитической активностью обладают их соответствующие активные формы – факторы VIIa, IXa и Xa, которые образуются в результате активации зимогенов.

Факторы VII, IX, X имеют очень похожее доменное строение. В их состав входят четыре домена: Gla-домен, в котором много γ -карбоксиглутаминовой кислоты, два EGF-домена, похожих на эпидермальный фактор роста, и про-

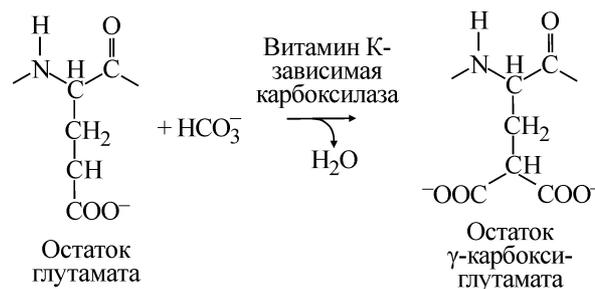


Рис. 4. Механизм действия витамин К-зависимой ферментной системы при карбоксилировании остатков глутаминовой кислоты в составе Gla-домена фактора свертывания.

теазный домен, которым осуществляется реакция ограниченного протеолиза (рис. 3б,в) [14].

Gla-домен витамин К-зависимых белков служит для обратимого Ca^{2+} -зависимого связывания с мембраной через отрицательно заряженные остатки γ -карбоксиглутаминовой кислоты, входящие в состав этого домена. Эти остатки присоединяют несколько ионов Ca^{2+} , что приводит к смене конформации белка и позволяет ему обратимо связываться с мембраной. Но сразу после биосинтеза белка в рибосомах в состав Gla-домена входят остатки глутаминовой кислоты, которые способны только слабо связывать ионы Ca^{2+} . Витамин К требуется для функционирования ферментной системы – витамин К-зависимой карбоксилазы, которая в процессе посттрансляционной модификации белка преобразует остатки глутаминовой кислоты в Gla-доме в остатки γ -карбоксиглутаминовой кислоты (рис. 4). Последняя способна правильным образом связывать ионы Ca^{2+} и обеспечивать присоединение белка к отрицательно заряженной мембране [14,20].

Связывание факторов VII и X с мембранами. Хотя Gla-домен витамин К-зависимых белков очень консервативен, экспериментально определенные значения равновесной константы диссоциации для взаимодействия факторов VII, IX и X с мембраной различаются как минимум в 1000 раз [15,21].

Фактор VII связывается с мембраной очень слабо, равновесная константа диссоциации $K_d = 15$ мкМ [21], хотя человеческий фактор VIIa связывается лучше бычьего [22]. Заявленные в литературе величины K_d для взаимодействия фактора X (Xa) с мембраной приблизительно постоянного состава значительно варьируют (данные приведены в таблице). Из таблицы видно, что измеренные кинетические константы связывания на три порядка меньше для связывания с плоскими липидными бислоями, чем

Экспериментальные данные по взаимодействию факторов X и Xa с мембранами

Лиганд	PS/PC, [Ca ²⁺], r	Метод	K _d , нМ	k _a , нМ ⁻¹ мин ⁻¹	k _d , мин ⁻¹	N	Ссылка
Связывание с плоскими липидными слоями, r = ∞							
X _{бычий}	PS/PC = 25/75 [Ca ²⁺] = 10 мМ	Плазмонный резонанс	39 ± 9	0,05 ± 0,01	1,92 ± 0,12		[62]
Xa _{бычий}	PS/PC = 25/75 [Ca ²⁺] = 10 мМ	Плазмонный резонанс	80 ± 15	0,027 ± 0,005	2,16 ± 0,12		[62]
	PS/PC = 20/80 [Ca ²⁺] = 3 мМ	Эллипсометрия	46,5 ± 7,9			46	[63]
X _{чел}	PS/PC = 30/70 [Ca ²⁺] = 5 мМ	Эллипсометрия	34,2 ± 2,9			106	[59]
Xa _{чел}	PS/PC = 30/70 [Ca ²⁺] = 5 мМ	Эллипсометрия	53,9 ± 2,6			52,1	[59]
	PS/PC = 30/70 [Ca ²⁺] = 5 мМ	Проточный реактор	33 ± 6				[64]
	PS/PC = 25/75 [Ca ²⁺] = 3 мМ	Эллипсометрия	42,0 ± 2,9				[65]
Связывание с фосфолипидными везикулами							
X _{бычий}	PS/PC = 25/75 [Ca ²⁺] = 10 мМ r = 13 нм	RVV-X	60			119	[31]
	PS/PC = 26/74 [Ca ²⁺] = 2 мМ r = 18 нм	Светорассеяние	250			64	[29]
	PS/PC = 20/80 [Ca ²⁺] = 3 мМ r = 150 нм		180			91	[66]
Xa _{бычий}	PS/PC = 25/75 [Ca ²⁺] = 2 мМ r = 16,3 нм	Светорассеяние	114	1,74	198 ± 13	46	[67]
	PS/PC = 20/80 [Ca ²⁺] = 3 мМ r = 150 нм		185			91	[66]
X _{чел}	PS/PC = 20/80 [Ca ²⁺] = 3 мМ r = 10,5 нм	Светорассеяние	150 ± 80			63	[30]
	PS/PC = 25/75 [Ca ²⁺] = 2 мМ r = 16,3 нм	Светорассеяние	470	2,7	1272 ± 108	116	[50]
	PS/PC = 25/75 [Ca ²⁺] = 2,5 мМ r = 400 нм	Проточная цитометрия	223 ± 79			188	[68]

Примечание. PS/PC – соотношение фосфатидилсерина и фосфатидилхолина в используемых липидных слоях или везикулах; [Ca²⁺] – используемая концентрация ионов кальция; r – радиус фосфолипидных везикул, используемых в эксперименте; k_a и k_d – кинетические константы ассоциации и диссоциации; N – число молекул фосфолипида на один связанный X (Xa).

для связывания с везикулами, и причина этого различия пока неизвестна.

При посадке на мембрану положение факторов свертывания близко к вертикальному, каталитический домен расположен на большом расстоянии над плоскостью мембраны [23]. Рас-

стояние от каталитического домена фактора VIIa, связанного с мембраной, до поверхности мембраны, определенное при помощи резонансного переноса энергии флуоресценции [22,24] или при помощи молекулярного моделирования [25], составляет приблизительно 8,2–8,5 нм. Для

связывания фактора Xa с мембраной определение расстояния от его активного сайта до поверхности мембраны при помощи резонансного переноса энергии флуоресценции [23,24,26] или молекулярного моделирования [27] дало существенно больший разброс значений (от 6,1 до 8,4 нм), а в 2007 г. для фактора Xa было показано, что положение флуоресцентной метки, связанной с активным сайтом, возможно, не отражает реальное положение активного сайта над мембраной [26].

Молекулярное моделирование связывания Gla-домена фактора VIIa с мембраной показало, что Gla-домен достаточно глубоко входит внутрь липидного бислоя [28]. ω -Петля (остатки 1–11 в составе Gla-домена) и связанные с Gla-доменом ионы Ca^{2+} лежат ниже поверхности мембраны. К Gla-домену присоединяются семь ионов Ca^{2+} , из которых два требуются для поддержания конформации домена, обеспечивающей возможность присоединения к мембране, три взаимодействуют с отрицательными зарядами мембраны, а еще два выполняют обе эти функции. Кроме того, показано, что взаимодействия между положительно заряженными полипептидными цепями Gla-домена и отрицательно заряженными фосфолипидами также имеют место при посадке фактора VIIa на мембрану [28].

На связывание фактора X с фосфолипидной мембраной значительно влияют концентрация ионов Ca^{2+} и состав фосфолипидной мембраны. Так, увеличение концентрации ионов Ca^{2+} приводит к уменьшению значения равновесной константы диссоциации для взаимодействия фактора X с мембраной [29]. Исследования связывания фактора X с фосфолипидными везикулами различного состава показали, что увеличение процентного содержания фосфатидилсерина в мембране от 0 до 50% (остальное – фосфатидилхолин) приводит к уменьшению как равновесной константы диссоциации, так и числа молекул фосфолипида, приходящихся на один связанный фактор X [29–31]. Аналогичные данные были получены для связывания фактора X с фосфолипидными нанодисками [32]. При изменении процентного содержания фосфатидилсерина в нанодиске от 0 до 100% равновесная константа диссоциации уменьшается. Ее значение приближается к значениям измеренной K_d для связывания фактора X с везикулами, на 20–30% состоящими из фосфатидилсерина, когда нанодиск состоит из фосфатидилсерина на 80–100% [32].

Связывание фактора VII (VIIa) с тканевым фактором. Тканевый фактор не обладает протеолитической активностью, являясь кофакто-

ром для активной протеазы плазмы крови – фактора VIIa. Связывание с тканевым фактором абсолютно необходимо для проявления полной протеолитической активности фактора VIIa относительно его субстрата фактора X. Так, связывание с тканевым фактором в отсутствие фосфолипидов в 4900 раз увеличивает скорость активации фактора X фактором VIIa, а в присутствии фосфолипидов – в 40500 раз [33].

Тканевый фактор с приблизительно одинаково высокой афинностью присоединяет как фактор VIIa, так и фактор VII [34,35], но образующийся комплекс VII–TF протеолитически неактивен [36].

Связывание тканевого фактора с фактором VIIa является зависимым от ионов Ca^{2+} [22]. Для формирования комплекса VIIa–TF также важна связь тканевого фактора с фосфолипидной мембраной. Равновесная константа диссоциации для связывания фактора VIIa с мембраносвязанным тканевым фактором составляет по разным экспериментальным данным 12–60 пМ [32,37]. По одним данным K_d зависит от состава мембраны, уменьшаясь от 60 до 12 пМ с увеличением процентного содержания фосфатидилсерина в мембране от 10 до 40% [32], по другим – K_d приблизительно одинакова для везикул, состоящих только из фосфатидилхолина или на 20% из фосфатидилсерина (остальное фосфатидилхолин) [37]. K_d для присоединения фактора VIIa (VII) к внеклеточному домену тканевого фактора (остатки 1–219), иммобилизованному на подложке, на два порядка больше, по разным данным составляя 2–13,5 нМ [35,37–39]. Присоединение к внеклеточному домену тканевого фактора в растворе приводит к увеличению K_d еще на порядок ($K_d \approx 100$ нМ) [40].

Связывание с тканевым фактором приводит к значительным изменениям в структуре фактора VIIa. Исследования при помощи резонансного переноса энергии флуоресценции [22] и молекулярного моделирования [25] показали, что связывание с тканевым фактором приводит к сокращению на ~ 0,6–0,8 нм расстояния от активного сайта фактора VIIa до поверхности мембраны, т.е. положение активного сайта фактора VIIa в комплексе с тканевым фактором значительно отличается от положения активного сайта вне комплекса. Это изменение положения активного сайта может быть важно для правильного ориентирования фермента и субстрата на поверхности мембраны, что приводит к большей эффективности фермента [22].

Гораздо большая эффективность связанного с тканевым фактором фактора VIIa может быть связана и со структурными особенностями мо-

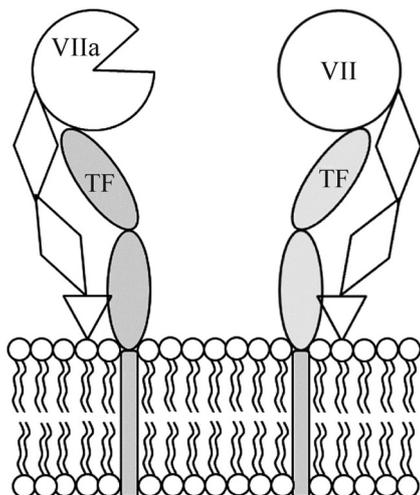


Рис. 5. Схема автоактивации фактора VII на фосфолипидной мембране. Связанный с тканевым фактором фактор VIIa активирует связанный с тканевым фактором фактор VII.

лекул TF и VIIa [41]. Молекула фактора VIIa обладает большой подвижностью и гибкостью как в растворе, так и после присоединения к мембране, в то время как молекула тканевого фактора – жесткая. После образования комплекса внешней теназы тканевый фактор ограничивает движения молекулы фактора VIIa и ориентирует ее протеазный домен относительно субстрата [41].

Активация комплекса VII–TF. Как уже упоминалось, комплекс VII–TF протеолитически неактивен. Однако многие протеазы плазмы крови способны его активировать, преобразуя его в активный комплекс VIIa–TF.

Самым эффективным активатором является фактор Xa [42], который способен активировать как фактор VII в присутствии отрицательно заряженных фосфолипидных мембран, так и комплекс VII–TF не только на отрицательно заряженной, но и на нейтральной мембране [43]. В отсутствие фосфолипидов или в присутствии только фосфатидилхолина активация фактора VII (без тканевого фактора) фактором Xa не детектирована [42,43]. Присутствие внеклеточного домена тканевого фактора (остатки 1–219) в растворе никак не влияет на активацию фактора VII фактором Xa [44]. Существуют противоречивые экспериментальные данные о влиянии мембраносвязанного тканевого фактора на активацию фактора VII фактором Xa. Есть данные, согласно которым присутствие тканевого фактора не влияет на эту реакцию [42], и данные, согласно которым тканевый фактор значительно ускоряет реакцию [43,44].

Фактор VIIa в отсутствие тканевого фактора не активирует фактор VII [42]. В присутствии внеклеточного домена тканевого фактора (остатки 1–219) активации тоже не происходит [44]. Только в присутствии мембраносвязанного тканевого фактора идет автоактивации фактора VII [44,45]. Таким образом, для автоактивации фактора VII абсолютно необходимо присутствие тканевого фактора, прикрепленного к фосфолипидной мембране. В 1993 г. была предложена модель автоактивации фактора VII, согласно которой фактор VII в комплексе с тканевым фактором активируется фактором VIIa в комплексе с тканевым фактором (рис. 5) [45]. Известно, что, в отличие от остальных реакций свертывания, автоактивация фактора VII идет лучше на нейтральной мембране из фосфатидилхолина, чем на отрицательно заряженной мембране [45].

Активаторами фактора VII также являются фактор XIIa [46], фактор IXa и тромбин [42], однако последние два являются гораздо более слабыми активаторами, чем фактор Xa [42].

Функционирование комплекса VIIa–TF. Хотя комплекс VIIa–TF способен активировать и фактор IX [47], основным его субстратом считается фактор X.

Активация фактора X с образованием фактора Xa происходит после обратимого формирования тройного комплекса VIIa–TF–X, который превращается в комплекс VIIa–TF–Xa. В научной литературе существуют данные, согласно которым фактор X присоединяется к частям внешней теназы, отдаленным от активного сайта комплекса – так называемым экзосайтам, причем большую роль в этом взаимодействии играет фосфолипидная мембрана [48,49]. После активации тройной комплекс VIIa–TF–Xa распадается на фактор Xa и комплекс внешней теназы [49].

Для функционирования комплекса VIIa–TF большое значение имеет закрепление тканевого фактора в отрицательно заряженной мембране. Реакция активации фактора X фактором VIIa происходит значительно эффективнее в присутствии мембраносвязанного тканевого фактора по сравнению со скоростью той же реакции в отсутствие фосфолипидов и/или тканевого фактора [33]. Но природа домена, удерживающего тканевый фактор на мембране, для свертывания не важна [7].

Состав мембраны также оказывает влияние на функционирование комплекса VIIa–TF. На нейтральных мембранах начальная скорость реакции составляет около 4% от начальной скорости реакции на отрицательно заряженных мембранах [50]. Кроме того, скорость реакции

зависит от состава мембраны. При увеличении количества фосфатидилсерина от 0 до 40% эффективность реакции увеличивается за счет увеличения наблюдаемой каталитической константы и значительного уменьшения константы Михаэлиса [32,51]. Известно также, что многие фосфолипиды (фосфатидилинозитол, фосфатидилэтаноламин, фосфатидная кислота) синергизуются с фосфатидилсерином, значительно сокращая количество фосфатидилсерина, необходимое для достижения максимальной скорости реакции, с ~ 25–30% до 5–10% [51,52].

Поскольку фактор X способен обратимо связываться с мембранами, важным является вопрос того, какой фактор X – связанный или свободный (в растворе) – является предпочтительным субстратом для внешней теназы. В литературе приводятся противоречивые данные о преобладающем механизме доставки субстрата к комплексу VIIa–TF.

Измерение скорости активации фактора X в зависимости от концентрации фосфолипидов показало, что скорость растет с ростом концентрации фосфолипидов, что привело к выводу о доставке субстрата по мембране [50,53].

Напротив, эксперименты по измерению скорости реакции активации фактора X с добавлением фрагмента 1 протромбина показали, что при добавлении этого фрагмента скорость реакции увеличивается [54]. Поскольку фрагмент 1 протромбина конкурирует с фактором X за сайты связывания на мембране, при его добавлении меньше фактора X может связаться с мембраной, и в растворе фактора X становится больше. Так как скорость реакции при этом растет, был сделан вывод, что основным субстратом для внешней теназы является фактор X из раствора.

Кроме того, в экспериментах с нанодисками были получены данные, согласно которым эффективность комплекса внешней теназы на нанодиске сравнима с эффективностью этого комплекса на липосоме, т.е. функционирование внешней теназы не зависит от большого пула субстрата, заранее связанного с мембраной [32].

ФОРМИРОВАНИЕ ОЛИГОМЕРОВ ФАКТОРА Xa НА ПОВЕРХНОСТИ ФОСФОЛИПИДНОЙ МЕМБРАНЫ

Фактор Xa способен формировать димеры в растворе в присутствии растворимых молекул фосфолипида 1,2-дикапроил-*sn*-глицеро-3-фосфо-L-серина (С6PS) и ионов Ca^{2+} [55,56] и на отрицательно заряженной фосфолипидной мембране в присутствии ионов Ca^{2+} [57]. Димеризация фактора Xa сильно зависит от концен-

трации кальция и фосфолипидов в системе [55,56]. Равновесная константа диссоциации димеров падает с ростом концентрации ионов Ca^{2+} при постоянном значении концентрации С6PS и с ростом концентрации С6PS при постоянном значении концентрации ионов Ca^{2+} ; при 5 мМ Ca^{2+} и 400 мкМ С6PS K_d составляет порядка 14–20 нМ [55,56]. Равновесная константа диссоциации для формирования димеров на отрицательно заряженной мембране составляет 40 фмоль/дм² в присутствии 4 мМ Ca^{2+} [57]. В присутствии 1 мМ Ca^{2+} димеры не образуются [57]. Флуоресцентное мечение активного сайта фактора Xa приводит к значительному увеличению равновесной константы диссоциации для формирования димеров на мембране от 40 фмоль/дм² до 0,7–5 нмоль/дм² [57].

Димеры фактора Xa как на мембране, так и в растворе как минимум в 10^6 – 10^7 раз менее эффективно активируют протромбин по сравнению с мономерами [56,57]. Участие димеров в работе внешней теназы пока не изучено.

Более новые экспериментальные данные свидетельствуют, что фактор Xa на отрицательно заряженной мембране способен формировать не только димеры, но и олигомеры [58]. Кроме того, на мембране могут формироваться «смешанные» олигомеры из факторов X и Xa [58]. Олигомеризация фактора Xa приводит к возникновению эффекта «гистерезиса» в связывании фактора Xa с мембраной – феномена, заключающегося в том, что при связывании фактора Xa с мембраной с последующим разбавлением количество связанного с мембраной фактора Xa после разбавления оказывается в ~10 раз больше, чем можно было бы ожидать, исходя из экспериментов по связыванию той же концентрации фактора Xa с мембраной. В работе была также представлена математическая модель олигомеризации фактора Xa, согласно которой димер формируется из двух уже связанных с мембраной факторов Xa, а олигомер – из димера и связанного с мембраной фактора Xa (рис. 6а) [58]. В модели было принято, что олигомеры не способны диссоциировать от мембраны. Такая модель олигомеризации хорошо описывала эмпирические данные [58].

В 2003 г. была предложена теоретическая модель для димеризации фактора Xa в растворе на основе экспериментальных данных по изменению флуоресценции фактора Xa при титровании растворимыми фосфолипидами С6PS и при изменении концентрации фактора Xa в присутствии фосфолипидов С6PS и ионов кальция [55]. В модели было принято, что на факторе Xa имеются два сайта связывания для

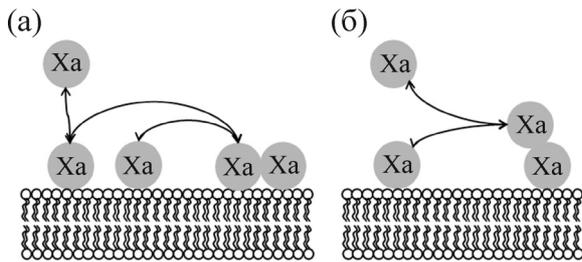


Рис. 6. Схема димеризации фактора Ха: (а) – димер формируется из двух связанных с мембраной факторов Ха; (б) – димер формируется при посадке фактора Ха из раствора на связанный с мембраной фактор Ха.

молекул С6PS: сайт 1 на EGF-доменах фактора Ха и сайт 2 на его каталитическом домене, причем связывание с этими сайтами происходит последовательно – сначала с сайтом 1, затем с сайтом 2. В димеризации принимает участие только сайт 1. При помощи этой модели были получены равновесные константы диссоциации димеров при различных концентрациях ионов кальция и С6PS [55].

В 2005 г. была предложена модель димеризации фактора Ха на отрицательно заряженной фосфолипидной мембране [59]. Согласно этой модели, фактор Ха из раствора сначала присоединяется к сайту связывания на мембране, после чего вторая молекула фактора Ха из раствора присоединяется к первой (рис. 6б). Исходя из этой модели, были объяснены экспериментальные данные, согласно которым при насыщении на мембране умещается в два раза больше фактора Ха, чем фактора Х, и тот факт, что при конкуренции за сайты связывания большую часть мембраны занимает фактор Ха [59].

МОДЕЛИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ВНЕШНЕЙ ТЕАЗЫ

В исследованиях функционирования системы свертывания крови широко распространено математическое моделирование.

В 1994 г. была опубликована математическая кинетическая модель каскада свертывания от инициации по внешнему пути до формирования тромбина [60]. При помощи этой модели была исследована роль отдельных реакций в каскаде, а также роль концентрации активатора – комплекса VIIa–TF – в системе. Увеличение концентрации активатора значительно влияло не на максимальную скорость формирования тромбина, а на длительность задержки перед появлением тромбина в системе, сокращая ее время при увеличении концентрации

активатора. Однако в модели никак не учитывалось связывание витамин К-зависимых белков с мембраной. Поскольку известно, что это связывание имеет большое значение для протекания реакций свертывания и, возможно, является лимитирующей стадией в реакции активации фактора Х комплексом внешней теназы [53], пренебрежение им может привести к некорректным предсказаниям модели, хотя при определенном наборе подобранных констант-параметров модели можно удовлетворительно описать экспериментальные данные.

В 1995 г. была опубликована стохастическая модель внешней теназы, локализуемой как на везикулах (радиус везикулы 80 нм), так и на плоской мембране [61]. В модели учитывались диффузия факторов Х и Ха в растворе и на фосфолипидной поверхности и кинетика активации, но не учитывалась возможность распада комплекса VIIa–TF. При помощи модели было исследовано влияние афинности фактора Х к мембране, площади фосфолипидной поверхности, приходящейся на один комплекс VIIa–TF, а также пути доставки субстрата и отвода продукта на кинетические параметры реакции. Было предсказано, что только изменение равновесной константы диссоциации для взаимодействия фактора Х с мембраной не может привести к значительному изменению константы Михаэлиса, происходящему при изменении состава мембраны. Однако исследование было проведено лишь для одного случая: продукт внешней теназы фактор Ха может отсоединиться от теназы, оставаясь мембраносвязанным, или уходить в раствор. Влияние афинности фактора Ха к мембране может оказывать существенно большее влияние на кинетические параметры реакции в том случае, если отвод продукта производится только по мембране [53]. Кроме того, было предсказано, что при доставке субстрата и отведении продукта только по мембране наблюдаемая в эксперименте каталитическая константа должна быть гораздо меньше реальной [61].

В 2006 г. была предложена математическая модель активации мембраносвязанного фактора Х комплексом внешней теназы [53]. В модели учитывалось, что факторы Х и Ха могут связываться с поверхностью мембраны и отсоединяться от нее, а также диффундировать по ней. Диффузия по поверхности мембраны была представлена броуновским движением факторов Х и Ха с двумерным коэффициентом диффузии $D = 2 \times 10^{-8} \text{ см}^2/\text{с}$. Если вблизи фактора Х или Ха на мембране находился комплекс внешней теназы, формировался тройной комплекс, который не распадался в течении $1/k_{\text{cat}}$,

где k_{cat} – каталитическая константа. При этом количество факторов X и Xa в растворе оставалось постоянным, что реализуется в присутствии потока. С помощью этой модели было показано, что плотность продукта, фактора Xa, быстро растет на мембране, и при большей площади мембраны он может диффундировать дальше от теназы, что минимизирует ингибирование теназы продуктом. Однако если судить по приведенным в статье результатам моделирования, сравнение плотности продукта на мембране было произведено исключительно качественно. Количественных оценок и описания экспериментальных результатов моделью в статье не приведено. Кроме того, моделирование было проведено только при одном наборе значений констант, характеризующих связывание факторов X и Xa с мембраной [62]. Выбор других констант (к примеру, большей скорости связывания и диссоциации факторов X и Xa – сравните работы [62] и [50]), возможно, дал бы существенно отличные результаты моделирования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на то что все белки, принимающие участие в свертывании, были открыты более двадцати лет назад, осталось множество невыясненных вопросов. В настоящее время общепризнанной является существенная роль мембранной поверхности в функционировании теназы, однако до сих пор споры вызывает механизм подвода субстрата к ферменту. Кроме того, все больше экспериментальных данных говорит о формировании олигомеров мембраносвязанного фактора Xa, включая возможные гетероолигомеры с фактором X. Существующие на настоящий момент модели функционирования каскада свертывания крови практически не учитывают перечисленные особенности внешней теназы, хотя они потенциально могут изменить представления об инициации каскада свертывания. Эти вопросы представляют немалый интерес и требуют дальнейших исследований инициации каскада свертывания.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантами Президента РФ для молодых кандидатов наук МК-5879.2016.4 и МД-6347.2015.4, а также Российского фонда фундаментальных исследований (гранты №№ 14-04-00670, 15-54-45036 и 15-34-70009).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. A. Pantelev, N. M. Dashkevich, and F. I. Ataulkhanov, *Thromb. Res.* **136**, 699 (2015).

2. H. H. Versteeg, J. W. M. Heemskerk, M. Levi, and P. H. Reitsma, *Physiol. Rev.* **93**, 327 (2013).
3. E. W. Davie and O. D. Ratnoff, *Science* **145**, 1310 (1964).
4. R. G. Macfarlane, *Nature* **202**, 498 (1964).
5. M. Hoffman and D. M. Monroe 3rd, *Thromb. Haemost.* **85**, 958 (2001).
6. J. H. Morrissey, H. Fakhrai, and T. S. Edgington, *Cell* **50**, 129 (1987).
7. L. R. Paborsky, I. W. Caras, K. L. Fisher, and C. M. Gorman, *J. Biol. Chem.* **266**, 21911 (1991).
8. B. Osterud, A. Tindall, J. H. Brox, and J. O. Olsen, *Thromb. Res.* **42**, 323 (1986).
9. T. A. Drake, J. H. Morrissey, and T. S. Edgington, *Am. J. Pathol.* **134**, 1087 (1989).
10. R. A. Fleck, L. V Rao, S. I. Rapaport, and N. Varki, *Thromb. Res.* **59**, 421 (1990).
11. S. Butenas, B. A. Bouchard, K. E. Brummel-Ziedins, et al., *Blood* **105**, 2764 (2005).
12. P. L. Giesen, U. Rauch, B. Bohrmann, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 2311 (1999).
13. V. Y. Bogdanov, V. Balasubramanian, J. Hathcock, et al., *Nat. Med.* **9**, 458 (2003).
14. R. F. Zwaal, P. Comfurius, and E. M. Bevers, *Biochim. Biophys. Acta* **1376**, 433 (1998).
15. J. F. McDonald, A. M. Shah, R. A. Schwalbe, et al., *Biochemistry* **36**, 5120 (1997).
16. M. Koren-Michowitz, N. Rahimi-Levene, Y. Volcheck, et al., *Isr. Med. Assoc. J.* **8**, 53 (2006).
17. G. J. J. Broze and P. W. Majerus, *J. Biol. Chem.* **255**, 1242 (1980).
18. K. Kurachi and E. W. Davie, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 6461 (1982).
19. S. P. Leytus, D. W. Chung, W. Kisiel, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 3699 (1984).
20. C. Vermeer, *Biochem. J.* **266**, 625 (1990).
21. G. L. Nelsestuen, W. Kisiel, and R. G. Di Scipio, *Biochemistry* **17**, 2134 (1978).
22. C. D. McCallum, R. C. Napak, P. F. Neuenschwander, et al., *J. Biol. Chem.* **271**, 28168 (1996).
23. E. J. Husten, C. T. Esmon, and A. E. Johnson, *J. Biol. Chem.* **262**, 12953 (1987).
24. S. Yegneswaran, G. M. Wood, C. T. Esmon, and A. E. Johnson, *J. Biol. Chem.* **272**, 25013 (1997).
25. C. M. Colina, D. Venkateswarlu, R. Duke, et al., *J. Thromb. Haemost.* **4**, 2726 (2006).
26. S. H. Qureshi, L. Yang, S. Yegneswaran, and A. R. Rezaie, *Biochem. J.* **407**, 427 (2007).
27. D. Venkateswarlu, L. Perera, T. Darden, and L. G. Pedersen, *Biophys. J.* **82**, 1190 (2002).
28. Y. Z. Ohkubo and E. Tajkhorshid, *Structure* **16**, 72 (2008).
29. G. L. Nelsestuen and M. Broderius, *Biochemistry* **16**, 4172 (1977).
30. G. A. Cutsforth, R. N. Whitaker, J. Hermans, and B. R. Lentz, *Biochemistry* **28**, 7453 (1989).

31. G. van Dieijen, G. Tans, J. van Rijn, et al., *Biochemistry* **20**, 7096 (1981).
32. A. W. Shaw, V. S. Pureza, S. G. Sligar, and J. H. Morrissey, *J. Biol. Chem.* **282**, 6556 (2007).
33. V. J. Bom and R. M. Bertina, *Biochem. J.* **265**, 327 (1990).
34. R. Bach, R. Gentry, and Y. Nemerson, *Biochemistry* **25**, 4007 (1986).
35. D. P. O'Brien, G. Kembal-Cook, A. M. Hutchinson, et al., *Biochemistry* **33**, 14162 (1994).
36. L. V. Rao and S. I. Rapaport, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 6687 (1988).
37. P. Sen, P. F. Neuenchwander, U. R. Pendurthi, and L. V. M. Rao, *Blood Coagul. Fibrinolysis* **21**, 376 (2010).
38. H. Mei, Y. Hu, H. Wang, et al., *J. Huazhong Univ. Sci. Technolog. Med. Sci.* **30**, 42 (2010).
39. K. Ke, J. Yuan, and J. H. Morrissey, *PLoS One* **9**, e88675 (2014).
40. W. Ruf, M. W. Kalnik, T. Lund-Hansen, and T. S. Edgington, *J. Biol. Chem.* **266**, 15719 (1991).
41. Y. Z. Ohkubo, J. H. Morrissey, and E. Tajkhorshid, *J. Thromb. Haemost.* **8**, 1044 (2010).
42. S. Butenas and K. G. Mann, *Biochemistry* **35**, 1904 (1996).
43. Y. Nemerson and D. Repke, *Thromb. Res.* **40**, 351 (1985).
44. P. F. Neuenchwander and J. H. Morrissey, *J. Biol. Chem.* **267**, 14477 (1992).
45. P. F. Neuenchwander, M. M. Fiore, and J. H. Morrissey, *J. Biol. Chem.* **268**, 21489 (1993).
46. W. Kisiel, K. Fujikawa, and E. W. Davie, *Biochemistry* **16**, 4189 (1977).
47. M. Zur and Y. Nemerson, *J. Biol. Chem.* **255**, 5703 (1980).
48. R. J. Baugh, C. D. Dickinson, W. Ruf, and S. Krishnaswamy, *J. Biol. Chem.* **275**, 28826 (2000).
49. B. V. Norledge, R. J. Petrovan, W. Ruf, and A. J. Olson, *Proteins* **53**, 640 (2003).
50. S. Krishnaswamy, K. A. Field, T. S. Edgington, et al., *J. Biol. Chem.* **267**, 26110 (1992).
51. P. F. Neuenchwander, E. Bianco-Fisher, R. Rezaie, and J. H. Morrissey, *Biochemistry* **34**, 13988 (1995).
52. N. Tavoosi, R. L. Davis-Harrison, T. V. Pogorelov, et al., *J. Biol. Chem.* **286**, 23247 (2011).
53. J. J. Hathcock, E. Rusinova, H. Andree, and Y. Nemerson, *Blood Cells. Mol. Dis.* **36**, 194 (2006).
54. S. D. Forman and Y. Nemerson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 4675 (1986).
55. R. Majumder, J. Wang, and B. R. Lentz, *Biophys. J.* **84**, 1238 (2003).
56. R. Chattopadhyay, R. Iacob, S. Sen, et al., *Biophys. J.* **96**, 974 (2009).
57. T. Koklic, R. Majumder, G. E. Weinreb, and B. R. Lentz, *Biophys. J.* **97**, 2232 (2009).
58. N. A. Podoplelova, A. N. Sveshnikova, J. H. Kurasawa, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1858**, 1216 (2016).
59. J. J. Hathcock, E. Rusinova, R. D. Gentry, et al., *Biochemistry* **44**, 8187 (2005).
60. K. C. Jones and K. G. Mann, *J. Biol. Chem.* **269**, 23367 (1994).
61. R. Gentry, L. Ye, and Y. Nemerson, *Biophys. J.* **69**, 362 (1995).
62. E.-M. Erb, J. Stenflo, and T. Drakenberg, *Eur. J. Biochem.* **269**, 3041 (2002).
63. P. L. Giesen, G. M. Willems, H. C. Hemker, and W. T. Hermens, *J. Biol. Chem.* **266**, 18720 (1991).
64. H. A. Andree, P. B. Contino, D. Repke, et al., *Biochemistry* **33**, 4368 (1994).
65. G. M. Willems, M. P. Janssen, I. Salemink, et al., *Biochemistry* **37**, 3321 (1998).
66. P. van de Waart, H. Bruls, H. C. Hemker, and T. Lindhout, *Biochemistry* **22**, 2427 (1983).
67. S. Krishnaswamy, K. C. Jones, and K. G. Mann, *J. Biol. Chem.* **263**, 3823 (1988).
68. M. A. Panteleev, N. M. Ananyeva, N. J. Greco, et al., *FEBS J.* **273**, 374 (2006).
69. A. M. Shibeko, S. S. Karamzin, A. A. Butylin, et al., *Biochem. Suppl. Ser. A. Membr. Cell Biol.* **3**, 388 (2009).

Mechanisms and Kinetics of Initiation of Blood Coagulation by Extrinsic Tenase Complex

Т.А. Kovalenko* **, М.А. Pantelev* ** * ****, and А.Н. Sveshnikova* ** *** ******

**Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/2, Moscow, 119991 Russia*

***Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences,
ul. Kosygina 4, Moscow, 119991 Russia*

****Federal Research and Clinical Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology,
ul. Samory Mashela 1, Moscow, 117997 Russia*

*****Faculty of Biological and Medical Physics, Moscow Institute of Physics and Technology,
Institutskii per. 9, Dolgoprudnyi, Moscow Region, 141700, Russia*

******Therapeutic Faculty, Pirogov Russian National Research Medical University,
ul. Ostrovitianova 1, Moscow, 117997 Russia*

The system of hemostasis includes coagulation of blood plasma and formation of platelet aggregate. Plasma clotting is the cascade of proteolytic reactions, triggered by the contact of blood plasma with any tissue except the normal vessel endothelium. During the contact an enzymatic complex is formed of the soluble blood plasma protein, factor VIIa, and a membrane-anchored protein, tissue factor. This complex is called extrinsic tenase and it is the key initiator of blood coagulation. The main substrates of the extrinsic tenase are blood plasma factors X and IX. During the reaction they undergo proteolytic cleavage and become active serine proteases, factors Xa and IXa, correspondingly. Factor Xa in complex with its cofactor factor Va catalyzes formation of the key coagulation enzyme, thrombin, which leads to fibrin polymerization and plasma gelation. Although all proteins participating in this process have been known for a long time, several questions remain unanswered. For example, what is the role of the reaction surface, on which the complex is formed, what is the role of membrane-bound multimeres of factor X (Xa) and in what way does the activation of the factor VII proceed? Here we review recent theoretical and experimental works focused on biophysical mechanisms of extrinsic tenase functioning and discuss some of the listed problems.

Key words: blood coagulation, extrinsic tenase, factor X, dimerization, mathematical modeling