

Marta Michalska

ODDZIAŁYWANIE FIBRYNY ZE ZWIĄZKAMI
RTEŃCI, ANGIOGENNYMI CZYNNIKAMI ORAZ
Z NOWOZSYNTETYZOWANYMI ZWIĄZKAMI
FOSFOHYDRAZONOWYMI POCHODNYMI CHROMONU
I KUMARYNY

CZ. I. FIBRYNA JAKO CZYNNIK ANGIOGENNY

Zakład Biochemii Farmaceutycznej Katedry Chemii Farmaceutycznej
i Biochemii Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

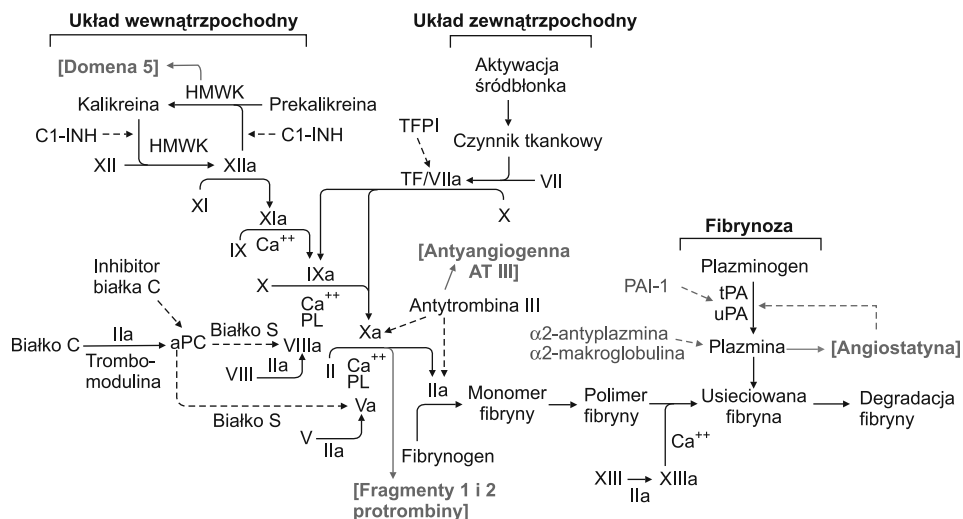
Kierownik: prof. dr hab. *M. Mirowski*

Hasła kluczowe: hemostaza, fibryna, angiogeneza.

Key words: hemostasis, fibrin, angiogenesis.

Proces krzepnięcia krwi polega na przeprowadzeniu krwi z fazy płynnej w formę zakrzepu. Biorą w nim udział liczne białka o charakterze enzymów aktywowanych w reakcjach ograniczonej proteolizy w układzie zewnątrz- i wewnątrzpochodnym (1, 2, 3). Oba te szlaki przebiegają oddzielnie pozostając jednak w ścisłej zależności w przypadku uszkodzenia i regeneracji naczynia. Białka generowane w procesie hemostazy koordynują stabilizację skrzepu, wzrost komórek śródbłonna oraz proces naprawy tkanek. Ścisłe związane ze szlakiem krzepnięcia jest proces angiogenezy, który jest odpowiedzialny za powstawanie nowych naczyń krwionośnych z już istniejących. Ukryte białka antyangiogenne (cryptic antiangiogenic proteins) powstające w procesie koagulacji i fibrynolizy są regulatorami układu angiogenezy. Domena 5 wysokocząsteczkowego kininogenu (HMWK), fragmenty protrombiny 1 i 2, antyangiogenna antytrombina III, wywierają antagonistyczne działanie względem proangiogennych czynników płytkowych, trombiny i fibryny. Fibrynoliza i angiogeneza mogą być inicjowane przez urokinazowy (uPA) i tkankowy (tPA) aktywator plazminogenu lub ich receptory oraz przez metaloproteazę -1 (MMP-1) (ryc. 1).

Podstawę wytworzonego skrzepu stanowi fibryna powstająca z fibrynogenu wskutek prokoagulacyjnej aktywności trombiny [EC 3.4.4.13]. W warunkach *in vivo* kaskada krzepnięcia jest zapoczątkowana poprzez uszkodzenie tkanki, uwolniony czynnik tkankowy (TF) i odsłonięcie kolagenu obecnego w macierzy śródbłonna oraz aktywację czynnika VII (FVIIa) na torze zewnątrzpochodnym. Czynniki tkankowy jest glikoproteina odgrywającą decydującą rolę w procesie krzepnięcia, tworzącą kompleks z czynnikiem VIIa (TF/VIIa). W obecności jonów wapnia i fosfolipidów, które aktywują czynniki IX i X dochodzi do wytworzenia kompleksu TF-IX – F VIIa, którego działanie jest hamowane przez inhibitor czynnika tkankowego (tissue factor pathway inhibitor, TFPI). Od wytworzonego kompleksu czynnika tkankowego i czynnika VII jest również uzależniona aktywacja czynnika X.



Ryc. 1. Ukryte antiangiogenne fragmenty pochodzące z układu krzepnięcia i fibrynozy: domena 5 HMWK, antiangiogenna AT III, fragmenty 1,2 protrombiny, PAI-1, α_2 antyplazmina, α_2 makroglobulina, angiotatyna (3).

HMWK – wysokocząsteczkowy kininogen, C1 INH – inhibitor esterazowy C1, TF – czynnik tkankowy, TFPI – inhibitor czynnika tkankowego, TPA – tkankowy aktywator plazminogenu, uPA – urokinazowy aktywator plazminogenu, PAI – inhibitor aktywatora plazminogenu, ATIII – antytrombina III, PAI – inhibitor aktywatora plazminogenu.

Fig. 1. Cryptic – antiangiogenic fragments derived from coagulation and fibrinolytic systems: domena 5 of HMWK, antiangiogenic antithrombin III, prothrombin fragments 1,2, PAI-1 inhibitor plasminogen activator1, α_2 antiplasmin, α_2 macroglobulin, angiotensin (3).

HMWK – high molecular weight kininogen, C1-INH factor – 1 esterase inhibitor, TF – tissue factor, TFPI – tissue factor pathway inhibitor, TPA – tissue plasminogen activator, uPA – urokinase plasminogen activator, PAI – inhibitor plasminogen activator.

W układzie wewnątrzpochodnym do aktywacji czynnika XII niezbędny jest wysokocząsteczkowy kininogen (HMWK) oraz aktywna prekalikreina (kalikreina). W obecności HMWK i kalikreiny przy udziale fosfolipidów płytkowych i jonów wapnia zaktywowany zostaje również czynnik IX do IXa. Na powierzchni płytek przy udziale czynnika IXa dochodzi do aktywacji czynnika VIII (VIIIa). Oba te czynniki w połączeniu z fosfolipidami przy udziale jonów wapnia aktywują czynnik X do Xa, który w obecności czynnika Va przekształca protrombinę w trombinę, wielofunkcyjny enzym odpowiedzialny za konwersję fibrynogenu w fibrynę (4, 5).

Zasadniczym białkiem w procesie hemostazy jest fibrynogen, którego masa cząsteczkowa wynosi 340 kDa. Jest to glikoproteina składająca się z 3 par łańcuchów polipeptydowych połączonych przez 29 mostków disiarczkowych (6). Cząsteczka fibrynogenu o dł. 45 nm obejmuje trzy globularne domeny połączone α helikalnym wiązaniem. Struktura i funkcja fibrynogenu zależy od obecności jonów wapnia o wysokim i niskim powinowactwie wiązania z białkiem. Odszczepienie przez trombinę od cząsteczki fibrynogenu dwóch fibrynopeptydów A i B zlokalizowanych w *N*-końcowej części łańcuchów $A\alpha$ i $B\beta$ przez trombinę powoduje przekształcenie rozpuszczalnego fibrynogenu w nierozpuszczalne monomery fibrynowe, a następnie

w protofibryle. W wyniku bocznych połączeń poszczególnych podjednostek dochodzi do wytworzenia trójwymiarowej sieci skrzepu fibrynowego, niezbędnego w procesie hemostazy. Ostatecznie transglutaminaza (czynnik XIIIa), katalizuje wytworzenie specyficznych wiązań ϵ (γ -glutamyl-lizynowych) między glutaminą i lizyną tworząc w ten sposób dodatkowe izopeptydowe połączenia pomiędzy łańcuchami γ i α monomerów. Dochodzi do stabilizacji skrzepu, czyniąc go jednocześnie opornym na czynniki chemiczne, mechaniczne oraz na działanie enzymów proteolitycznych. Fibrynogen posiada również w swojej budowie specyficzne miejsca wiązania dla fibronektyny, albuminy, trombospondyny, czynnika von *Willebranda* (vWF), fibuliny oraz czynników angiogennych – zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów (bFGF), czynnika wzrostu śródbłonna (VEGF), interleukin. Na powierzchni płytek krwi przy udziale fibrynowego dochodzi do wiązania integryny $\alpha_2\beta_3$ i tworzenia mostków niezbędnych w procesie ich agregacji.

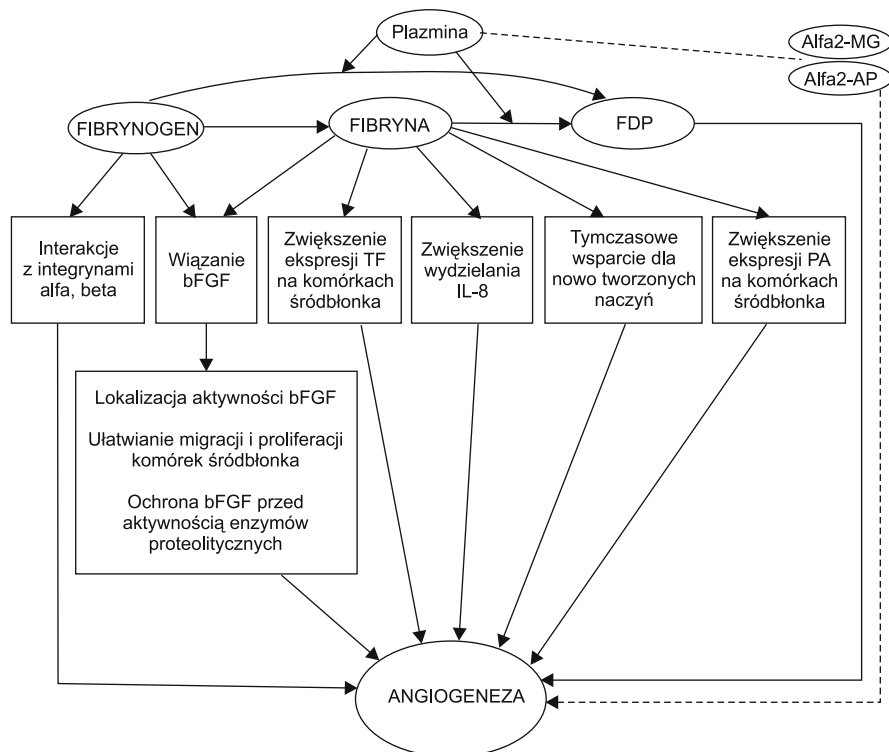
Z piśmiennictwa wynika, że istnieje ścisła zależność pomiędzy występowaniem choroby nowotworowej a powikłaniami zakrzepowo-zatorowymi (7, 8, 9, 10). Okazuje się, że wzrost guza jest ściśle związany z aktywnością specyficznych białek zaangażowanych w proces neoangiogenezy, aktywnością koagulacyjną układu odpornościowego oraz ekspresją genów.

Aktywacja krzepnięcia krwi stanowi integralny mechanizm rozwoju nowotworów i przerzutów (11, 12). W wielu guzach nowotworowych (rak jelita grubego, piersi) zaobserwowano zwiększoną gęstość naczyń krwionośnych i nabycie właściwości angiogennych, tzw. fenotypu angiogenne, który koreluje z postępowaniem choroby. Taką aktywację układu krzepnięcia krwi oraz zmiany w strukturze fibryny mogą powodować między innymi metale ciężkie uznane jako szczególne czynniki kancerogenne (13, 14, 15). Dotyczy to również czynników środowiskowych (16), rtęci metalicznej i jej związków (17, 18).

Angiogeneza jest procesem tworzenia się nowych naczyń krwionośnych z istniejących już drobnych naczyń włosowatych obejmującym proteolizę błony podstawnej naczyń krwionośnych, pobudzenie komórek śródbłonna do proliferacji, migrację i dojrzewanie naczyń (19, 20). Nowopowstałe naczynia dostarczają składników odżywczych i tlenu komórkom guza, a przez syntezę licznych czynników wzrostu i białek macierzy międzykomórkowej przez komórki śródbłonna stymulują komórki nowotworowe. Powikłania zakrzepowo-zatorowe występują w każdym stadium zaawansowania choroby nowotworowej. Ich występowanie może o kilka lat wyprzedzać rozpoznanie choroby nowotworowej lub mogą się one pojawiać w trakcie jej trwania. Czynniki układu krzepnięcia zarówno fibrynogen i fibryna sprzyjają powstawaniu nowych naczyń w obrębie wytworzonego guza (21, 22, 23). Wytworzona w procesie krzepnięcia fibryna stanowi w angiogenezie ważny czynnik proangiogeny o pleiotropowym działaniu (ryc. 2).

Fibryna posiada zdolność wiązania angiogennych czynników wzrostu między innymi zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów (bFGF), markera procesów angiogenezy nowotworowej. Identyfikacja miejsc wiązania czynników angiogennych w fibrynie, badanie stopnia oraz kinetyki ich uwalniania z białka może stanowić podstawę do poszukiwania nowych potencjalnych leków anti- i pro-angiogennych. Przykładem tego typu związków są pochodne chromonu i kumaryny, które mają wpływ na tworzenie wiązania między fibryną i zasadowym czynnikiem wzrostu fi-

broblastów (bFGF) w procesie jej polimeryzacji (24, 25). Wpływają one w zależności od stężenia i struktury związku na biosyntezę bFGF i jego receptora (FGFR1) w hodowlach komórkowych.



Ryc. 2. Udział fibrynogeny i fibryny w procesie angiogenezy (8).

bFGF – zasadowy czynnik wzrostu, TF – czynnik tkankowy, IL – 8 interleukina 8, FDP – produkty degradacji plazminowej fibrynogeny, PA – aktywator plazminogeny, alfa 2MG – alfa2 makroglobulina, alfa2AP – alfa2 antyplazmina

Fig. 2. Participation of fibrinogen and fibrin in angiogenesis process (8).

bFGF – basic growth factor, TF – tissue factor, IL-8 interleukine 8, FDP – fibrinogen degradation products, PA – plasminogen activator, alfa 2 MG – alfa 2 macroglobulin, alfa 2 AP- alfa 2 antyplasmin

Fibryna stanowi szkielet dla migrujących komórek śródbłonna naczyń oraz formowania nowych kapilar, ochrania wytworzony czop płytkowy oraz jest źródłem uwalnianych śródbłonkowych czynników wzrostu (3). Pośredniczy w adhezji komórek śródbłonna i rozprzestrzenianiu integrzyn $\alpha\beta_3$ wiążących się do sekwencji RGD w pozycji 252–254 oraz 572–574 łańcucha α . Podobnie fibrynogen łącząc się z tymi integrzynami do sekwencji 572–574 łańcucha α staje się odpowiedzialny za przekazywanie komórkom śródbłonna tzw. sygnałów przeżycia. W procesie tworzenia fibryny usieciowanej bierze udział czynnik stabilizujący fibrynę (FSF, cz. XIIIa), który jest ligandem dla antyapoptotycznej integryny $\alpha\beta_3$ (7, 23). Czynnik XIII a wykazuje aktywność proangiogenną, związaną z obniżeniem stężenia trombospondyny (TSP-1), stymuluje wzrost komórek śródbłonna, ich migrację oraz jest

inhibitorem procesu apoptozy (26). Jest on niezbędny w procesie angio- i waskułogenezy wspomagając implantację zarodka, remodeling tkanek i ich regenerację. Czynniki stabilizujący fibrynę wykazują swoje proangiogenne działanie poprzez katalizowanie dodatkowych wytwarzanych wiązań między integrynami alfa(v)beta3 i VEGFR2 (receptor 2 śródbłonkowego czynnika wzrostu), nasila fosforyzację tyrozyny zwiększając aktywność regulacyjną białek c-Jun i Egr-1 oraz obniża biosyntezę trombospondyny (TSP-1) regulowaną przez c-Jun (27).

Fibryna pobudza ekspresję czynnika tkankowego, proangiogennej interleukiny 8 (IL-8), ułatwia aktywację wielu czynników angiogennych VEGF, bFGF, IGF-1, TGF-beta1. W procesie tworzenia fibryny z cząsteczki fibrynoгену z N-końca łańcuchów A α i B β odszczepiane są fibrynopeptydy A i B. Po odszczepieniu fibrynopeptydu B odsłonięta zostaje sekwencja łańcucha β 15-42 w cząsteczce fibryny odpowiedzialna za wiązanie z czynnikami wzrostu bFGF i VEGF, za wiązanie heparyny, zwiększenie proliferacji fibroblastów. Fragment β 15-42 oddziałuje ze śródbłonkowym białkiem (kadheryna śródbłonkowa) i śródbłonkowymi receptorami promując w ten sposób proces angiogenezy i aktywację ważnych czynników proangiogennych. Stanowi to z jednej strony czynnik sprzyjający wzrostowi naczyń krwionośnych, z drugiej zaś jest mechanicznym wsparciem dla migrujących komórek. Nasiloną zostaje synteza czynników wzrostu, stymulacja proliferacji i migracji komórek śródbłonka.

Fibryna ze względu na swoje właściwości, w połączeniu z innymi polimerami – chitozanem, kolagenem może być wykorzystana do wytwarzania membran, które są nośnikami (scaffolds) proangiogennych czynników wzrostu (TGF-beta1, bFGF oraz PDGF-BB). Na kinetykę uwalniania czynników wzrostu z przygotowanych membran, obok ich właściwości fizykochemicznych, istotny wpływ mają leki stosowane w trakcie leczenia (między innymi przeciwbólne np. ketoprofen).

W badaniach z zakresu inżynierii tkankowej prowadzi się poszukiwania nośników czynników wzrostu mających szerokie zastosowanie w regeneracji tkanek (chirurgia plastyczna, implantologia, przeszczepy, regeneracja kości) (28, 29, 30, 31). Fibryna jest zasadniczym biopolimerem stosowanym obecnie w inżynierii tkankowej w postaci membran Tisseł[®], Eviceł[®], Crosseal[®] uznanych przez FDA (Food and Drug Administration) jako preparaty lecznicze. Wiązanie fibryny z innymi białkami i peptydami zostało wykorzystane do wytwarzania klejów fibrynowych (Fibrin Glue) stosowanych w procesach gojenia (Tachocomb, Tissucol) oraz jako nośnika czynników wzrostu (scaffold) znajdującego zastosowanie w nowoczesnych metodach regeneracji tkanek.

M. Michalska

INTERACTION OF FIBRIN WITH MERCURIC COMPOUNDS, ANGIOGENIC FACTORS
AND NEW PHOSPHOHYDRAZONE DERIVATIVES OF CHROMONE AND COUMARIN
PART. I. FIBRIN AS ANGIOGENIC FACTOR

PIŚMIENNICTWO

1. *Staton C.A., Lewis C.E.*: Angiogenesis inhibitors fund within the haemostasis pathway. *J. Cell Mol. Med.*, 2005; 9(2): 286-302. – 2. *Elodi S., Elodi P.*: Surface govermed molecular regulation of blood coagulation. *Mol. Aspects Med.*, 1983; 6: 291-353. – 3. *Browder T., Folkman J., Pirie-Shepherd S.*: The hemostatic system as a regulator of angiogenesis. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275(3): 1521-24. – 4. *Saenko E.L., Shima M., Sarafanov A.G.*: Role of activation of the coagulation factor VIII in interaction with vWF, phospholipids and functioning within the factor X complex. *Trends Cardiovasc. Med.*, 1999; 9: 185-92. – 5. *Weisel J.W.*: Fibrinogen and fibrin. *Adv. Protein Chem.*, 2005; 70: 247-99. – 6. *Clark R.A.F.*: Fibrin is a many splendored thing. *J. Invest. Dermatol.*, 2003; 121: 1210-15. – 7. *Castelli R.*: Cancer and thromboembolism: from biology to clinics. 2006; 97(2): 175-89. – 8. *Sierko E., Zawadzki R.J., Wojtukiewicz M.Z.*: Nowotwory. 2001; 51(4): 399-409. – 9. *Shoji M., Abe K., Nawroth P.P., Rickles F.R.*: Molecular mechanisms linking thrombosis and angiogenesis in cancer. *Trends Cardiovasc. Med.*, 1997; 7(2): 52-59. – 10. *Wojtukiewicz M.Z., Sierko E., Rak J.*: Contribution of the hemostatic system to angiogenesis. *Semin. Thromb. Hemost.*, 2004; 30(1): 5-20.
11. *Wojtukiewicz M.Z., Rucińska M., Zimnoch L., Jaromin J., Piotrowski Z., Różańska-Kudelska M., Kisiel W., Kudryk B.J.*: Expression of prothrombin fragment 1+2 in cancer tissue as an indicator of local activation of blood coagulation. *Thromb. Res.*, 2000; 97: 335-342. – 12. *Wojtukiewicz M.Z., Sierko E., Klement P., Rak J.*: The hemostatic system and angiogenesis in malignancy. *Neoplasia*, 2001; 3(5): 371-384. – 13. *Green K.B., Silverstein R.L.*: Hypercoagulability in cancer. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, 1966; 10(2): 499-530. – 14. *Hayes R.B.*: The carcinogenicity of metals in human. *Cancer Causes Control.*, 1997; 8(3): 371-85. – 15. *Durham T.R., Snow E.T.*: Metal ions and carcinogenesis. *Cancer: Cell structures, carcinogens and genomic instability*. Ed. Bignold L.P. 2006, Birkhäuser Verlag/Switzerland. – 16. *Yanbaeva D.G., Deniener M.A., Creutzberg E.C., Wesseling G, Wouters E.F.M.*: Systemic effects of smoking. 2007; 131(5): 1557-66. – 17. *Boffeta P., Merler E., Väinö H.*: Carcinogenicity of mercury and mercury compounds. *Scand J. Work Environm. Heath*, 1993; 19: 1-7. – 18. *Michalska M., Plewiński J., Wierzbička R.*: Badania tromboelastograficzne osocza sznurów narażonych na octan fenylortęciowy. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 1980; 12(1): 55-58. – 19. *Hanahan D., Folkman J.*: Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; 86: 353-364. – 20. *Staton C.A., Stribbling S.M., Tazzyman S., Hughes R., Brown N.J., Lewis C.E.*: Current methods for assaying angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Int. J. Exp. Path.*, 2004; 85: 233-248.
21. *Folkman J.*: Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other diseases. *Nat. Med.*, 1995; 1: 27-31. – 22. *Mosseson M.W.*: Fibrinogen and fibrin structure and functions. *Thromb Haemost.*, 2005; 3: 1894-1904. – 23. *Dardic R., Loscalzo J., Inbal A.*: Factor XIII (FXIII) and angiogenesis. *J. Thromb. Haemost.*, 2005; 4: 19-25. – 24. *Michalska M., Pająk W., Kołodziejska J., Łazarenkow A., Nawrot-Modranka J.*: Influence of phosphorohydrazone derivatives of benzopyrones on polymerization and viscosity of fibrin. *Acta Bioch. Pol.*, 2008; 55(3): 613-617. – 25. *Michalska M., Łazarenkow A., Kaplińska K., Mirowski M., Nawrot-Modranka J.*: Influence of phosphorohydrazone derivatives of benzopyrones in presence of basic fibroblast growth factor (bFGF) on fibrin polymerization. *Acta Biochim. Pol.*, 2011; (w druku). – 26. *Darlik R.*: Novel proangiogenic effect of factor XIII associated with suppression of thrombospondin1 expression. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2003; 23(8): 1472-77. – 27. *Darlik R.*: Molecular mechanisms underlying the proangiogenic effect of factor XIII. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2005; 25(3): 526-32. – 28. *Ye Q., Zund G., Benedict P., Jockenhoevel S., Hoerstrup S.P., Sakyama S.*: Fibrin gel as a three dimensional matrix in cardiovascular tissue engineering. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.*, 2000; 17: 587-591. – 29. *Wong C., Inman E., Spaethe R., Helgersson S.*: Fibrin – based biomaterials to deliver human growth factors. *Thromb Haemost.*, 2003; 89: 573-582. – 30. *Spotnitz W.D.*: Commercial fibrin sealant in surgical care. *Am. J. Surg.*, 2001; 182: 8S-14S.
31. *Risbut M.*: Tissue engineering. *Ann. Rev. Biomed. Eng.*, 2001; 2: 117-125.