

УДК 577.112.7

ОСОБЛИВОСТІ ВПЛИВУ СПЕЦИФІЧНИХ ІНГІБІТОРІВ ПОЛІМЕРИЗАЦІЇ, ЩО МІСТЯТЬ D-ДОМЕНИ, НА ПРОЦЕС САМОЗБИРАННЯ ФІБРИНУ

Т. М. ПЛАТОНОВА, Т. М. ЧЕРНИШЕНКО, Л. І. СОКОЛОВСЬКА

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: sokludmila@yandex.ru

Дослідження інгібіторних властивостей фрагментів фібриногену/фібрину D та DD, а також їхніх сумішей на процес зсідання плазми крові за дії тромбіну свідчать про значне зростання ефективності сумарної інгібіторної дії.

Вивчення впливу інгібіторів на окремі фази полімеризації фібрину – лаг-фазу та латеральну асоціацію протофібрил – проводили методом турбідиметрії в модельних системах in vitro з використанням концентрації фрагментів, наближеної до показників вмісту продуктів розщеплення фібриногену/фібрину при патологічному стані організму. Показано, що ковалентна прошивка γ - γ -ланцюгів молекули D-димеру впливає на його інгібіторні властивості і механізм взаємодії з молекулами мономерного фібрину. D-фрагмент інгібує обидві стадії полімеризації, в той час як DD-фрагмент – тільки латеральну асоціацію.

Ключові слова: полімеризація, фібрин, фрагменти D, DD.

Відомо, що основним механізмом полімеризації фібрину є нековалентна міжмолекулярна взаємодія специфічних центрів полімеризації доменів E (E_A , E_B) та комплементарних їм центрів D-доменів (D_A , D_B) молекули фібрину [1–3].

Дослідження впливу специфічних інгібіторів полімеризації (фрагментів фібриногену та фібрину) на процес самозбирання фібрину має великий теоретичний інтерес у зв'язку з тим, що специфічне комплексоутворення за участю фрагментів відтворює елементи загального механізму цього процесу. Таким чином, дослідження взаємодії автономних частин, простіших і доступніших для детального вивчення, дають можливість отримати інформацію про роботу всього механізму системи. Експериментальні дані, одержані на таких моделях, можуть бути використані для з'ясування тонких механізмів взаємодії окремих функціональних доменів молекул фібрину і характеристики процесу полімеризації в цілому [4–7].

Водночас, ці дослідження мають практичне значення, оскільки під час розвитку дисемінованого внутрішньосудинного мікрозсідання крові у кровотоці спостерігається накопичення продуктів деградації фібриногену/фібрину. Основним кінцевим продуктом ферментативного розщеплення стабілізованого фібрину є димерний фрагмент D. Появу останнього у кровотоці розглядають як маркер тромбемії. Фрагменти фібриногену/фібрину впливають

на функцію клітин крові та інших тканин різних органів. У зв'язку з цим вивчення властивостей специфічних інгібіторів має важливе значення для розроблення інформативних діагностичних тестів [8].

Метою роботи було з'ясувати роль ковалентного прошивання γ - γ -ланцюгів у молекулі D-димеру на його інгібіторні властивості шляхом порівняння впливу фрагментів D і DD на процес полімеризації фібрину дез-AABB.

Матеріали та методи

Фібриноген виділяли із плазми крові людини та бика шляхом висолювання сульфатом натрію [9]. Вміст білка, що згортається тромбіном, становив 96–98%.

Мономерний фібрин дез-AABB одержували дією тромбіну на фібриноген бика (0,5 од./мл 0,25%-го розчину фібриногену). Утворені згустки фібрину розчиняли в 0,02 М оцтовій кислоті при температурі 4 °С [10].

Для одержання фрагментів використовували фібриноген людини. Димерний фрагмент D виділяли із плазмінових гідролізатів фібрину за таких умов. Стабілізацію фібрину здійснювали в 0,05 М Tris-HCl-буфері (pH 7,4), що містив 0,13 М NaCl, 0,02 М $CaCl_2$, 0,001 М NaN_3 (концентрація його становила 15 мг/мл; до 1 мг фібриногену додавали 1,0 од. тромбіну). Інкубацію здійснювали протягом 3 год при температурі 37 °С. Стабілізований фібрин гідролізували плазміном протягом 6 год

(0,4 од./мл гідролізату). Гідроліз зупиняли додаванням діізопропілфторфосфату, після чого вилучали плазмін на Lys-сефарозі. Виділення фрагментів проводили афінною хроматографією [11]. Суміш наносили на колонку з іммобілізованим фібрин-мономером у 0,05 М Tris- H_3PO_4 -буфері (pH 6,85), що містив 0,1 М NaCl, 0,025 М ϵ -АКК, 10^{-4} М $CaCl_2$. Домішки D-фрагмента елюювали 0,05 М Tris- H_3PO_4 -буфером (pH 5,9), що містив 0,25 М NaCl, 0,025 М ϵ -АКК і 10^{-4} М $CaCl_2$. DD-фрагмент елюювали 0,05 М Tris- H_3PO_4 -буфером (pH 5,3), що містив 1,0 М NaCl, 0,025 М ϵ -АКК та 10^{-4} М $CaCl_2$.

Фрагмент D одержували із плазмінових гідролізатів фібриногену людини в 0,05 М Tris-HCl-буфері (pH 7,4), що містив 0,13 М NaCl, 0,001 М $CaCl_2$ і 0,001 М NaN_3 . Концентрація фібриногену становила 15 мг/мл. Фібриноген гідролізували плазміном протягом 6 год (0,2 од./мл гідролізату). Гідроліз зупиняли додаванням діізопропілфторфосфату, після чого плазмін відділяли на Lys-сефарозі. Для вилучення D-фрагмента використовували іонообмінну хроматографію на КМ-сефадексі С-50. Високомолекулярні домішки видаляли гель-фільтрацією на сефакрилі S-200. Гомогенність одержаних препаратів контролювали за допомогою диск-електрофорезу у присутності додецилсульфату натрію (рис. 1).

Концентрацію білків визначали спектрофотометрично (λ 280 нм), використовуючи спектрофотометр СФ-46.

Процес полімеризації реєстрували за зростанням світлорозсіювання при 350 нм на спектрофотометрі СФ-26, застосовуючи метод турбідиметрії. Експерименти проводили при 37 °С у 0,05 М Tris-HCl-буфер (pH 7,4), що містив 0,13 М NaCl та $1 \cdot 10^{-4}$ М $CaCl_2$. Кінцева концентрація фібрин-мономера – 0,25 мг/мл. Одержані дані дозволяють визначити тривалість лаг-фази в секундах (відповідає часу утворення протофібрил), для якої не характерне підвищення світлорозсіювання при 350 нм [13]. Швидкість утворення протофібрил обчислювали як величину, оборотну до лаг-періоду. Швидкість латеральної агрегації протофібрил визначали як тангенс кута нахилу дотичної, яку проводили до найкрутішої частини кривої визначення світлорозсіювання (A_{350}/c).

Гальмування полімеризації визначали за тривалістю згортання фібрину при 37 °С у 0,05 М Tris-HCl-буфері (pH 7,4), що містив 0,13 М NaCl та $1 \cdot 10^{-4}$ М $CaCl_2$. Кінцева концентрація фібрин-мономера – 0,3 мг/мл. Ефективність дії інгібітора полімеризації (ЕІ) визначали як відношення приросту ефекту гальмування

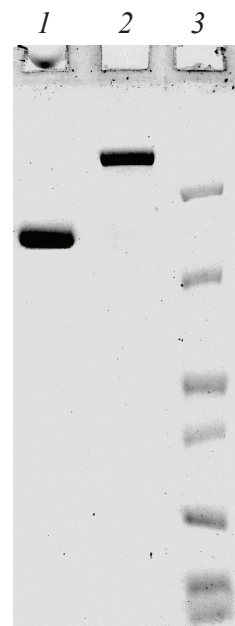


Рис. 1. Електрофореграма препаратів DD- та D-фрагментів: 1 – D-фрагмент; 2 – DD-фрагмент; 3 – маркери, молекулярна маса яких становила 116; 66,2; 45; 35,0; 25,0; 18,0 та 14,4 кДа відповідно.

(ΔT) до приросту концентрації інгібітора ($\Delta[I]$) [11]. Обчислення здійснювали за формулою: $EI = \Delta T / \Delta[I]$, де $\Delta T = (t_2 - t_1 / t_0)$, $\Delta[I] = [I_2] - [I_1]$; t_0 – тривалість зсідання мономерного фібрину в контролі, t_1 і t_2 – тривалість зсідання мономерного фібрину у пробі за концентрації інгібітора $[I_1]$ та $[I_2]$ відповідно. Ефект гальмування виражали в одиницях гальмування ($t - t_0 / t_0$). За одиницю активності приймали таку кількість інгібітора, яка в умовах експерименту збільшувала тривалість зсідання фібрину в 10 разів.

Результати та обговорення

Дослідження властивостей специфічних інгібіторів полімеризації та їхній вплив на процес самозбирання фібрину, які було проведено В. О. Беліцером та співроб., показали, що ефективність дії інгібіторів залежить від його концентрації: у розведеному розчині ефективність їхньої дії низька, в той час як у зоні високих концентрацій – досягає постійного максимуму. Перехід від низького рівня ефективності дії інгібітора до високого в середній зоні концентрацій відбувається як кооперативна реакція. Кінетичний аналіз процесу інгібування полімеризації фібрину у присутності D-фрагмента свідчить, що підвищення ефективності дії специфічного інгібітора відбувається під час взаємодії молекули фібрин-мономера із трьома молекулами D-фрагмента [14].

Фібриноген, фрагменти фібриногену X та D є адитивними інгібіторами і можуть взаємозамінюватися [14, 15]. Це підтверджує подібність механізму їхньої дії і функціональну єдність фібриногену та його фрагментів – X і D, які мають однакові специфічні ділянки спорідненості до фібрин-мономера. Специфічний інгібітор полімеризації DD-фрагмент праву адитивності не підлягає [11, 16].

Порівняння інгібіторної дії D- та DD-фрагментів на тривалість зсідання фібрин-мономера свідчить, що зона низької ефективності інгібіторів полімеризації значно збільшується для DD-фрагмента (рис. 2). Ефективність дії суміші фрагментів D та DD, якщо співвідношення між ними становить 1 : 1, значно перевищує сумарну ефективність окремих інгібіторів.

Подальше вивчення дії специфічних інгібіторів показує, що механізм дії D-димеру на процес полімеризації зберігається як під час взаємодії із препаратами фібрин-мономера, попередньо розчинених в оцтовій кислоті, так і в разі взаємодії їх із фібрином, що утворюється безпосередньо у плазмі крові людини при

дії тромбіну у присутності фрагментів (рис. 3). Для таких досліджень було розроблено модельну систему, яка містила плазму крові людини (вміст фібриногену 2,5 мг/мл), фрагменти фібриногену/фібрину, тромбіну (0,024 од.) та 0,05 М Tris-HCl-буфер (pH 7,4), до якого додавали 0,13 М NaCl та $1 \cdot 10^{-4}$ М $CaCl_2$.

У цій серії експериментів визначали час зсідання плазми крові у присутності фрагмента D (рис. 3, крива 1) та суміші фрагментів D і DD (рис. 3, крива 2) – за постійної кількості димерного D-фрагмента ($0,25 \cdot 10^{-6}$ М) та дедалі більшої кількості D-фрагмента. Така кількість DD-фрагмента практично не інгібує процес полімеризації фібрину, але у присутності D-фрагмента значно підвищує інгібіторний ефект суміші фрагментів. Ефективність дії суміші фрагментів D та DD на процес зсідання плазми крові перевищує сумарну ефективність дії окремих інгібіторів, тобто відбувається підвищення одночасної інгібіторної дії (синергізм).

Ця інформація має певне практичне значення, оскільки при деяких патологіях вміст

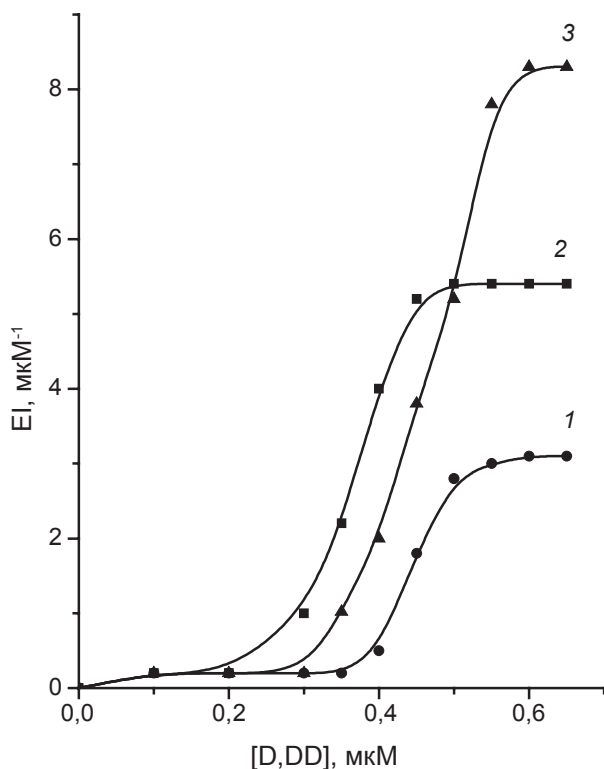


Рис. 2. Ефективність антиполімеризаційної дії фрагментів DD (крива 1), D (крива 2) та їхньої еквімолярної суміші (крива 3) на полімеризацію фібрину дез-ААВВ. EI – ефективність дії інгібітора.

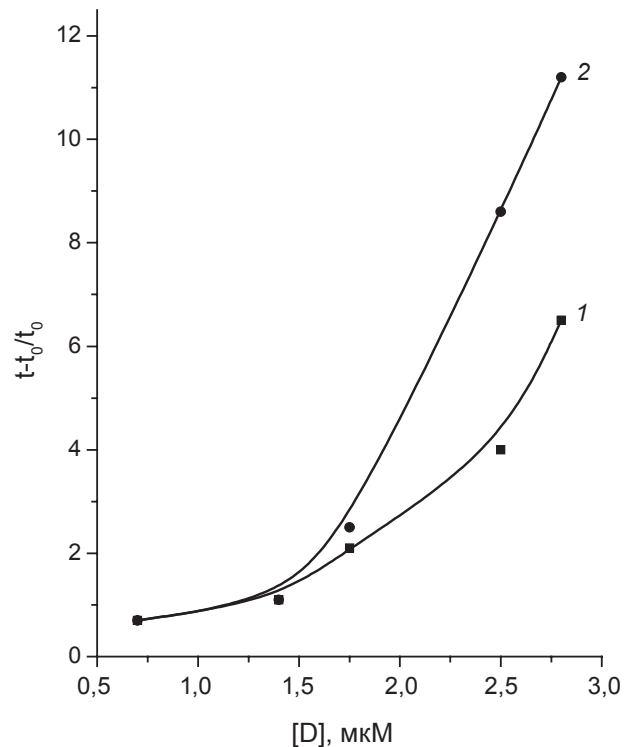


Рис. 3. Вплив фрагмента DD (крива 1) та суміші фрагментів D та DD (крива 2) на зсідання плазми крові: t_0 – час зсідання мономерного фібрину за відсутності інгібітора (контроль), t – тривалість зсідання мономерного фібрину у присутності інгібітора.

продуктів деградації фібриногену/фібрину значно збільшується, передусім під час проведення тромболітичної терапії стрептокіназою при гострому інфаркті міокарда. Так, через дві години після введення стрептокінази визначити вміст нативного фібриногену практично неможливо: у кровотоці накопичується значна кількість його фрагментів. Згодом рівень фібриногену у плазмі крові поступово відновлюється (на третю добу) після проведення тромболітичної терапії [17, 18].

Поява у кровотоці значної кількості фрагментів, особливо суміші D- та DD-фрагментів, сумарна інгібіторна дія яких вища, може сприяти геморагічним ускладненням. У зв'язку з цим при патологіях, що пов'язані з підвищенням вмісту фібриногену та порушеннями балансу між системами зсідання крові та фібринолізу, а також під час проведення тромболітичної терапії необхідна інформативна лабораторна діагностика стану системи гемостазу.

Вивчення впливу специфічних інгібіторів на процес полімеризації фібрину у плазмі крові людини дало можливість розробити алгоритм проведення тесту, що характеризує кінцевий етап зсідання крові (перетворення фібриногену на фібрин під дією тромбіну або тромбіноподібного ферменту), та дозволяє виявляти продукти деградації фібриногену/фібрину [19].

Таким чином, експериментальні дані з вивчення інгібіторних властивостей фрагментів фібриногену/фібрину D і DD на процес полімеризації фібрину дез-ААВВ за гальмуванням часу зсідання фібрин-мономера показали, що ковалентне прошивання γ - γ -ланцюгів молекули D-димеру впливає на його інгібіторні властивості та механізм взаємодії з молекулами фібрин-мономера.

Незважаючи на те, що DD-фрагмент має меншу ефективність при гальмуванні тривалості зсідання фібрин-мономера (рис. 2), відомо, що він є найефективнішим інгібітором латеральної асоціації протофібрил і утворює стабільні еквімолярні комплекси з фібрином [20, 21].

Для з'ясування механізму взаємодії DD-та D-фрагментів з фібрин-мономером та причини відсутності адитивної дії на процес полімеризації було проведено дослідження впливу інгібіторів на окремі фази полімеризації фібрину: лаг-фазу та латеральну асоціацію протофібрил методом турбідиметрії.

Приведені нами раніше роботи з дослідження впливу фрагментів лише на процес латеральної асоціації протофібрил в зоні високих концентрацій інгібіторів є далекими від реаль-

ного вмісту фрагментів, що можуть з'являтися у кровотоці при різних патологіях.

Під час експериментів нами було використано фрагменти в концентраціях, які наближені до можливих показників за патологічних станів системи гемостазу. Так, концентрація фібрин-мономера становила 0,76 мкМ, а D- та DD-фрагментів – від 0,05 до 0,2 мкМ. У разі такого співвідношення інгібітора та фібрин-мономера було встановлено вплив фрагментів на утворення протофібрил і на латеральну асоціацію. Показано, що D-димер практично не інгібує швидкість утворення протофібрил, на відміну від D-фрагмента (рис. 4). Стадію латеральної асоціації гальмують обидва фрагменти.

Таким чином, зазначені підходи вивчення інгібіторної дії фрагментів D та DD (визначення часу зсідання фібрин-мономера та підвищення світлорозсіювання у присутності інгібіторів) свідчать про різні властивості інгібіторів. Вочевидь, механізм взаємодії DD з фібрин-мономером відмінний від дії інших специфічних інгібіторів, у складі яких є D-домени. Це пов'язано з конформаційною перебудовою D-доменів, яка відбувається під час побудови протофібрили внаслідок взаємодії

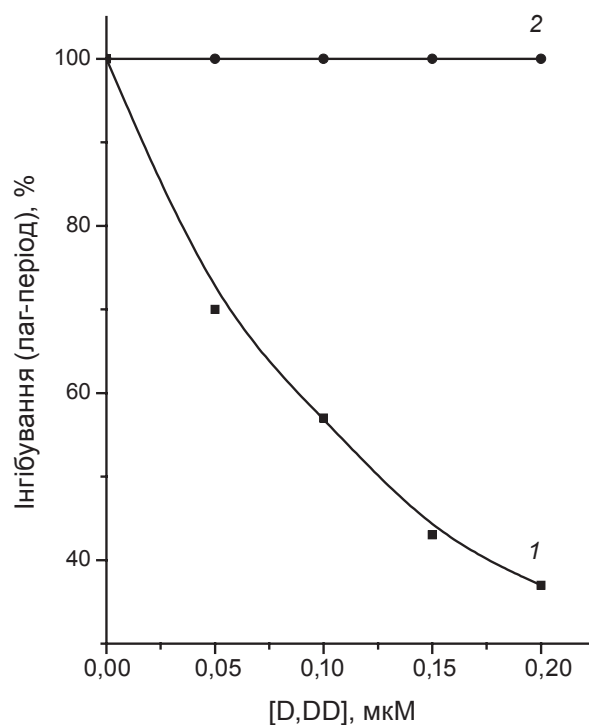


Рис. 4. Вплив фрагментів D (крива 1) та DD (крива 2) на швидкість формування протофібрил дез-ААВВ.

центрів E_A-Da. Про конформаційну перебудову D-доменів у процесі полімеризації свідчать і рентгеноструктурні дослідження [22–24]. Ковалентне прошивання фактором XIIIa фіксує D-домени та їхні центри полімеризації у тій конформації, що відтворює конформацію в основному вузлі протофібрили. Під час ферментативного розщеплення стабілізованого фібрину конформація молекули DD-фрагмента зберігається.

ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ИНГИБИТОРОВ ПОЛИМЕРИЗАЦИИ, СОДЕРЖАЩИХ D-ДОМЕНЫ, НА ПРОЦЕСС САМОСБОРКИ ФИБРИНА

*Т. Н. Платонова, Т. М. Чернышенко,
Л. И. Соколовская*

Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев;
e-mail: sokludmila@yandex.ru

Исследования ингибиторных свойств фрагментов фибриногена/фибрина D и DD, а также их смеси на процесс свертывания плазмы крови под действием тромбина свидетельствуют о значительном увеличении эффективности суммарного ингибиторного действия.

Изучение влияния ингибиторов на отдельные фазы полимеризации фибрина: лаг-фазу и латеральную ассоциацию протофибрилл проводили методом турбидиметрии в модельных системах *in vitro* с использованием концентрации фрагментов, которые близки к показателям продуктов расщепления фибриногена/фибрина при патологических состояниях. Показано, что ковалентная прошивка γ - γ -цепей молекулы D-димера влияет на его ингибиторные свойства и механизм взаимодействия с молекулами фибрин-мономера. D-фрагмент ингибирует обе стадии полимеризации, в то время как DD-фрагмент только латеральную ассоциацию.

Ключевые слова: полимеризация, фибрин, фрагменты D, DD.

EFFECT PECULIARITIES OF D-DOMAIN-CONTAINING SPECIFIC INHIBITORS OF POLYMERIZATION ON THE FIBRIN SELF-ASSEMBLY PROCESS

*T. M. Platonova, T. M. Chernyshenko,
L. I. Sokolovska*

Palladin Institute of Biochemistry, National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: sokludmila@yandex.ru

S u m m a r y

The inhibitory effect of D- and DD-fragments and their mixture on plasma blood coagulation process under the action of thrombin has been studied. The significant increase of total efficiency of the inhibitory action has been shown.

The inhibitors have influence on a lag-phase and lateral association of protofibrils of fibrin polymerization carried out by turbidimetry method in the model systems *in vitro*. The concentration of fragments which are close to parameters of fibrinogen/fibrin degradation products in pathological conditions was used. It is shown, that the covalent cross-link of D-dimer γ - γ -chains affects the inhibitory features and mechanism of interaction with fibrin monomer molecules. D-fragments inhibit the both phases of polymerization, whereas DD-fragments effectively inhibit the lateral association of protofibrill.

Key words: polymerization, fibrin, D- and DD-fragments.

1. *Laudano A. P., Doolittle R. F.* // *Biochemistry.* – 1980. – **19**, N 5. – P. 1013–1019.
2. *Olexa S., Budzynski A.* // *PNAS.* – 1980. – **77**, N 3. – P. 1274–1378.
3. *Mosesson M. W., Siebenlist K. R., Meh D. A.* // *Fibrinogen XVIth Intern. fibrinogen workshop New York.* – 2001. – P. 11–30.
4. *Husain S. Sh., Weisel J. W., Budzynski A. Z.* // *J. Biol. Chem.* – 1989. – **264**, N 19. – P. 11414–11420.

5. Furlan M., Rupp C., Beck E. A. // *BBA*. – 1983. – N 742. – P. 25–32.
6. Платонова Т. Н., Лукинова Н. И, Медведь Л. В. // *ДАН Украины*. – 1993. – № 6. – С. 134–137.
7. Medved L. V., Tsurupa G., Yakovlev S. // *Fibrinogen XVIth International fibrinogen workshop New York*. – 2001. – P. 185–204.
8. Kawasaki T., Shinoki N., Iwamoto S. // *Thromb. Res.* – 1998. – **91**, N 2. – P. 101–104.
9. Варецька Т. В. // *Укр. біохім. журн.* – 1961. – **32**, N 1. – С. 13–24.
10. Rozdnjakova T. M., Musjalkovskaja A. A., Ugarova T. P. et al. // *Thromb. Res.* – 1979. – **16**, N 1/2. – P. 283–288.
11. Платонова Т. Н., Мусялковская А. А., Толстых В. М., Белицер В. А. // *Биохимия*. – 1980. – **45**, № 10. – С. 1780–1787.
12. Варецька Т. В., Цынкаловская С. Н., Демченко А. П. // *Укр. біохім. журн.* – 1972. – **44**, № 4. – С. 418–423.
13. Cristofaro R., Cera E. // *J. Protein Chem.* – 1991. – **10**, N 5. – P. 455–468.
14. Белицер В. А., Варецька Т. В., Костерин С. А. // *Биохимия*. – 1980. – **45**, № 1. – С. 157–164.
15. Белицер В. А., Варецька Т. В., Цынкаловская С. Н. // *Thromb. Res.* – 1973. – **3**. – P. 251–264.
16. Белицер В. А., Платонова Т. Н., Мусялковская А. А. // *ДАН СССР*. – 1986. – **291**, № 4. – С. 1001–1004.
17. Платонова Т. Н., Ровенская И. М., Савчук А. Н. и др. // *Лаб. діагн.* – 2001. – № 1. – С. 3–6.
18. Mentzer R. L., Budzynski A. Z., Sherry S. // *Am. J. Cardiol.* – 1986. – **57**, N 15. – P. 1220–1226.
19. Платонова Т. М., Чернишенко Т. М., Горницькая О. В. и др. // *Лаб. діагн.* – 2000. – № 1. – С. 3–9.
20. Луговской Э. В., Чудновец В. С., Макогоненко Е. М. и др. // *Укр. біохім. журн.* – 1995. – **67**. – С. 57–64.
21. Ugarova T. P., Budzynski A. Z. // *J. Biol. Chem.* – 1992. – **267**, N 19. – P. 13687–13693.
22. Spraggon G., Everse S. J., and Doolittle R. F. // *Nature*. – 1997. – **389**. – P. 455–462.
23. Everse S. J., Spraggon G., Veerapandian L., Doolittle R. F. // *Biochemistry*. – 1999. – **38**. – P. 2941–2946.
24. Belitser V. A., Rozdnjakova T. M., Platonova T. N., Vovk E. V. // *Thromb Res.* – 1981. – **21**, N. 6. – P. 565–572.

Отримано 12.05.2006