

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ

ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ім. О.В. Палладіна

На правах рукопису

ЧУДНОВЕЦЬ Віктор Степанович

РОЛЬ NH₂-КІНЦЕВОГО ФРАГМЕНТУ ЛАНЦЮГА ВВ
В ПРОЦЕСІ САМОСКЛАДАННЯ ФІБРИНУ

03.00.04 - біохімія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ 1995

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у відділі молекулярної біохімії ім. О.В. Палладіна Національного

ЛННБ України ім.В.Стефаніка



00761184 (R)

Науковий керівник

кандидат біологічних наук, с.н.с.,
в.о. завідуючого відділу молекулярної
імунології Луговський Е.В.

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук,
професор Веремеєнко К.М.

доктор біологічних наук,
с.н.с. Варецька Т.В.

Провідна організація

Інститут біоорганічної хімії та
нафтохімії НАН України.

Захист відбудеться 30 жовтня 1995 року о 14:00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 01.84.01 в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України за адресою: 252601, Київ-30, вул. Леонтовича, 9.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України.

Автореферат розісланий 30 вересня 1995 року.

Вчений секретар

спеціалізованої ради
ЛННБ ім. В. Стефаніка
АН України

О.В. Кірсенко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ.

АКТУАЛЬНІСТЬ ПРОБЛЕМИ. Фібриноген є центральною компонентою системи зсідання крові, який під дією тромбіну перетворюється в фібрин, здатний спонтанно полімеризуватися з утворенням фібринового гелю (Doolittle, 1984). Асоціація фібрину проходить ступінчасто і є високоупорядкованим процесом, в якому функціональна роль і просторове положення кожної молекули детерміновано. Полімеризація обумовлена взаємодією мономерних молекул та їх надмолекулярних структур за допомогою специфічних центрів "А", "В", розташованих в N-кінцевих ділянках α - та β -ланцюгів одної молекули (Doolittle R. et al., 1980), з комплементарними їм центрами "а", "б", які знаходяться в C-кінцевих ділянках γ - та β -ланцюгів другої молекули (Shimizu A. et al., 1992, Medved L.V. et al., 1993). Самоскладання фібрину стає можливим після відщеплення FpA (Blomback B. et al., 1979). При цьому утворюється $f_{III}desAA$, який має здатність асоціювати з утворенням повноцінного згустку. При відщепленні FpB тромбіном утворюється $f_{III}desAABB$, у якого полімеризаційна активність більша, ніж у $f_{III}desAA$ (Siebenlist K.R. et al., 1990, Weisel J.W. et al., 1986). В літературі представлені різні міркування про роль відщеплення FpB (Doolittle R. et al., 1984, Pandya V.V. et al., 1991), але функція його вивільнення на сьогоднішній день остаточно не визначена. З мономерів за рахунок взаємодії центрів "А" - "а" спочатку формуються протофібрили, товщина яких дорівнює товщині двох молекул фібрину (Ferry J., 1952, Krakow et al., 1972). Після досягнення певної довжини протофібрили латерально асоціюють, утворюючи основний елемент трьохвимірної фібринової сітки - фібрили (Hantgan R. et al., 1980). Механізм латеральної асоціації протофібрил в фібрили остаточно не з'ясований до цього часу.

МЕТА РОБОТИ ТА ЗАВДАННЯ ДОСЛІДЖЕННЯ. Метою роботи було вивчення ролі N-кінцевої ділянки ланцюга В β при полімеризації мономерного фібрину в згусток, а також ролі вивільнення FpB та впливу Ca^{2+} на цей процес. Виходячи з мети дослідження та враховуючи стан проблеми самоскладання фібрину, були визначені такі завдання експериментальних досліджень:

1. Вивчити функціональну роль N-кінцевої ділянки ланцюга В β фібриногену в процесі самоскладання фібрину, використовуючи моноклональні антитіла, з епітопами для них в цій ділянці молекули.

2. Вивчити вплив D- та D-D-фрагментів на процес полімеризації двох форм мономерного фібрину.

3. Провести дослідження механізму взаємодії N-кінцевої ділянки ланцюга В β фібрину з D- та D-D-фрагментами.

4. Порівняти полімеризацію двох форм мономерного фібрину та її залежність від концентрації іонів Ca²⁺.

НАУКОВА НОВИЗНА. Для виконання роботи було розроблено метод отримання поліпептидних ланцюгів - фрагментів фібрин(оген)у: A α 1-51, B β 1-118, α 17-51, β 15-118, γ 1-78. Також були отримані моноклольні антитіла 2d-2a та їх Fab-фрагменти (з епітопами для них в N-кінцевій ділянці молекули), які були високо-специфічними та ефективними інгібіторами полімеризації фібрину. За допомогою цих моноклональних антитіл показана участь N-кінцевої ділянки пептидного фрагменту 15-53 β -ланцюга фібрину, що означає участь центрального E-домену молекули в процесі латеральної асоціації протофібрил. На отриманих високоактивних плазмінних фрагментах (D- та D-D-) фібрину людини показано, що D-D-фрагмент є вдвічі сильніший інгібітор полімеризації фібрину. Показано комплексоутворення β 15-118 з цими фрагментами фібрину при низькій температурі, яке моделювало зв'язування центрів "B" - "b" в процесі полімеризації. Знайдено, що при утворенні комплексу з β 15-118 фрагмент D-D втрачав властивості інгібітора полімеризації фібрину, тоді як D-фрагмент їх зберігав. При цьому знайдено, що D-фрагмент набував здібності до утворення димерів, що свідчило про збільшення обопільної спорідненості D-доменів фібрину після зв'язування центрів "B" - "b" типу.

ПРАКТИЧНА ЗНАЧИМІСТЬ РОБОТИ. Показана можливість використання моноклональних антитіл та їх Fab-фрагментів як молекулярних зондів при вивченні механізму полімеризації фібрину. Отримані результати дозволяють глибше з'ясувати механізм полімеризації фібрину та можуть бути корисними для розробки діагностики тромбозів.

АПРОБАЦІЯ РОБОТИ. Матеріали дисертації доповідались на Всесоюзному симпозіумі по хімії пептидів (Рига, 1990), на VIII

Симпозіуми по хімії пептидів та білків FRG-USSR (Aachen, 1991), на II Симпозіумі по хімії пептидів та білків, Росія-Ізраїль (Москва, 1992), на XII Міжнародній школі по фібриногену (Wrightsville Beach USA, 1993), на XIII Міжнародній школі по фібриногену (Manchester, 1994) та на наукових семінарах відділу молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України.

СТРУКТУРА ДИСЕРТАЦІЇ. Дисертаційну роботу викладено на 104 сторінках машинописного тексту. Робота складається зі вступу, чотирьох глав, списку літератури, з 185-и посилань на роботи вітчизняних та зарубіжних авторів, 43-х рисунків, 9-и таблиць.

КОНКРЕТНИЙ ОСОБИСТИЙ ВНЕСОК ДИСЕРТАНТА. Експериментальна частина роботи виконана дисертантом особисто.

МЕТОДОЛОГІЯ, МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.

Фібриноген одержували із плазми крові людини методом висолювання сульфатом натрію (Варецкая и др., 1960).

Фібрин-мономер desAABB одержували при обробці фібриногену тромбіном з наступним розчиненням згустку в 0,15% розчині оцетової кислоти (Белицер и др., 1968).

Фібрин-мономер desAA одержували, використовуючи обмежений тромбіновий гідроліз фібриногену (Луговской и др., 1978).

Моноклональні антитіла (монАТ) до центральної частини молекул фібриногену та фібрину, виготовлені при гібридизації 50% поліетиленгліколем спленоцитів мишей лінії BALB/c, які були імунізовані внутрічеревно NDSK/desAABB-NDSK з клітинами мієломи X63-Ag8.6.5.3. Специфічність монАТ визначали методом твердофазного імуноферментного аналізу (Колесникова и др., 1991).

Fab-фрагменти моноклональних антитіл одержували, застосовуючи папаїновий гідроліз при ваговому співвідношенні ферменту до субстрату 32:100. Гідроліз зупиняли, додаючи моноіодоцетову кислоту до кінцевої концентрації 10 μ М, а суміш Fab- та Fc-фрагментів розділяли методом афінної хроматографії на колонках з носіями: протеїн А-сефарозою та фібриноген-сефарозою (Луговской и др., 1995).

D-фрагменти одержували плазміновим гідролізом непрошитого фібрину в присутності кальцію.

D-D-фрагменти одержували плазміновим гідролізом прошитого фібрину в присутності кальцію.

NDSK та desAABB-NDSK одержували шляхом бромціанового розщеплення фібриногену (1,3г BrCN на 1г фібриногену) в 70% мурашиній кислоті. Очищені фрагменти виділяли хроматографічно (Чудновец и др., 1991).

Очистку відновлених та карбосиметильованих фрагментів поліпептидних ланцюгів, які складали NDSK та desAABB-NDSK проводили методом HPLC на колонці Zorbax C-18 (Чудновец и др., 1991).

N-кінцеву послідовність амінокислотних залишків у поліпептидних ланцюгах визначали на амінокислотному сіквенаторі в лабораторії І.В. Назімова в Інституті біоорганічної хімії ім. Шемякіна АН Росії. Антиполімеризаційну активність антитіл та фрагментів реєстрували по зміні параметрів, характерних для формування згустків (Furlan et al., 1973) на спектрофотометрі СФ-26 (ЛОМО).

ОСНОВНІ РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ.

ВПЛИВ МОНОКЛОНАЛЬНИХ АНТИТІЛ ТА ЇХ Fab-ФРАГМЕНТІВ НА ПРОЦЕС САМОСКЛАДАННЯ ФІБРИНУ.

Перша частина роботи включає результати, які були отримані при вивченні впливу моноклональних антитіл та їх Fab-фрагментів на процес самоскладання фібрину.

З ряду моноклональних антитіл, отриманих проти N-кінцевих дисульфідних вузлів фібриногену та фібрину, були відібрані три іммуноглобуліни класу G, які мали різну специфічність до фібриногену та фібрину.

З Таблиці 1 видно, що епітопи всіх трьох монАТ були розташовані в N-кінцевому фрагменті ланцюга В β до 54 амінокислотного залишку (епітоп для монАТ 2d-2a включав пептидний зв'язок В β Arg14-Gly15).

Таблиця 1

Антиген	монАТ		
	2d-2a*	B-4C**	D-1B**
фібриноген	$1,0 \times 10^{-9} \text{M}$	$2,3 \times 10^{-7} \text{M}$	$3,4 \times 10^{-7} \text{M}$
NDSK	$6,4 \times 10^{-8} \text{M}$	$1,0 \times 10^{-7} \text{M}$	$1,7 \times 10^{-7} \text{M}$
desAABB-NDSK	-	$2,7 \times 10^{-8} \text{M}$	$5,6 \times 10^{-7} \text{M}$
E $_3$	-	-	-
A α (1-51)	$5,8 \times 10^{-6} \text{M}$	$3,0 \times 10^{-6} \text{M}$	-
α (17-51)	-	-	-
B β (1-118)	$5,3 \times 10^{-8} \text{M}$	$1,2 \times 10^{-7} \text{M}$	$3,0 \times 10^{-7} \text{M}$
β (15-118)	-	$2,6 \times 10^{-7} \text{M}$	$2,7 \times 10^{-7} \text{M}$
γ (1-78)	-	$1,4 \times 10^{-7} \text{M}$	$6,8 \times 10^{-7} \text{M}$

* - антитіла отримані проти NDSK;

** - антитіла отримані проти desAABB-NDSK

Вплив моноклональних антитіл на полімеризацію фібрину вивчали методом розсіювання світла. Хантган із співробітниками показали, що характерні криві змінювання світлорозсіювання при полімеризації фібрину відображають двостадійність процесу самоскладання. Період від початку полімеризації до різкого зростання розсіювання світла відповідає стадії формування протофібрил. Період різкого зростання розсіювання світла відповідає другій стадії самоскладання і відображає латеральну асоціацію протофібрил у фібрили. Для характеристики першої стадії самоскладання користуються параметром τ , який відповідає оберненій величині швидкості формування протофібрил, а другій стадії параметром V , який відповідає максимальній швидкості зростання розсіювання світла і характеризує швидкість латеральної асоціації протофібрил.

Нами було встановлено, що збільшення концентрації монАТ 2d-2a суттєво зменшувало швидкість латеральної асоціації протофібрил у фібрили, як при активації фібриногену тромбіном, так і при полімеризації $f_{\text{m}}\text{desAA}$ (Рис. 1). Присутність монАТ 2d-2a не впливала на полімеризаційні властивості $f_{\text{m}}\text{desAABB}$ (Рис. 1).

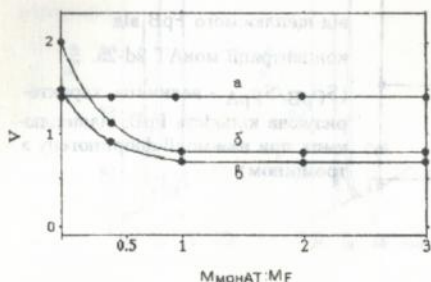


Рис. 1. Залежність швидкості латеральної асоціації протофібрил (V) від концентрації монАТ 2d-2a;

а - полімеризація $f_{\text{m}}\text{desAABB}$ в присутності монАТ; б - зсідання фібриногену в присутності тромбіну монАТ; в - полімеризація $f_{\text{m}}\text{desAA}$ в присутності монАТ

Слід відзначити, що гальмування полімеризації фібрину монАТ 2d-2a було високоспецифічним, на що вказувало максимальне інгібування процесу вже при еквімолярному співвідношенні антитіл до полімеризуючого білка.

На Рисунку 2 видно, що при еквімолярному співвідношенні антитіл до полімеризуючого білка (в системі фібриноген + тромбін) кількість відщеплюємих FrB зменшувалась вдвічі і залишалась постійною при подальшому збільшенні концентрації антитіл (Рис. 2a). Таким чином, в присутності антитіл від димерної молекули фібриногену відщеплювався лише один моль FrB .

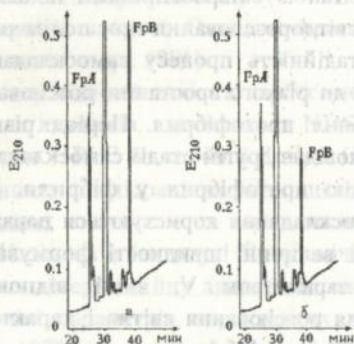


Рис. 2. Хроматографічний розподіл суміші фібринопептидів через три години реакції фібриногену з тромбіном:

а - при відсутності монАТ 2d-2a;
б - в присутності монАТ 2d-2a.

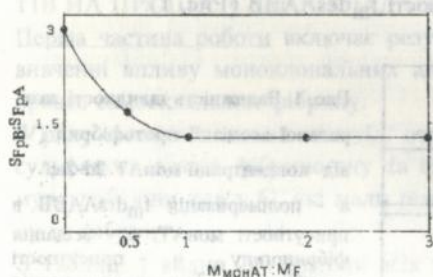


Рис. 3а. Залежність кількості відщеплюючого FpB від концентрації монАТ 2d-2a.

($S_{\text{FpB}}/S_{\text{FpA}}$ - величина, характеризує кількість FpB, відщеплюємих при взаємодії фібриногену з тромбіном)

Оскільки в димерній молекулі фібриногену знаходяться два епітопи до монАТ 2d-2a, то було зроблено висновок, що одна молекула IgG з молекулярною масою 150 кДа з'єднувалась з одним зі своїх епітопів та блокувала один пептидний зв'язок $\beta 14-15$. Другий зв'язок залишався доступним дії тромбіну, що обумовлювало відщеплення одного моля FpB від одного моля субстрату.

Присутність Fab-фрагментів монАТ 2d-2a у кількості, яка перебільшувала два молі на один моль фібриногену, призводила майже до повного інгібування полімеризації фібрину. При такій концентрації Fab-фрагментів швидкість латеральної асоціації протофібрил була близькою до нуля (Рис. 3).

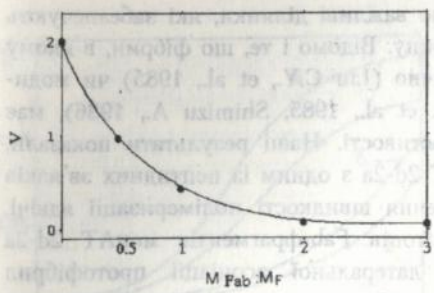


Рис. 3. Залежність швидкості латеральної асоціації від концентрації Fab-фрагментів монАТ 2d-2a

На Рисунку 4 видно, що коли у реакційній суміші знаходився подвійний молярний надлишок Fab-фрагментів монАТ 2d-2a, FpB майже не відщеплювалися.

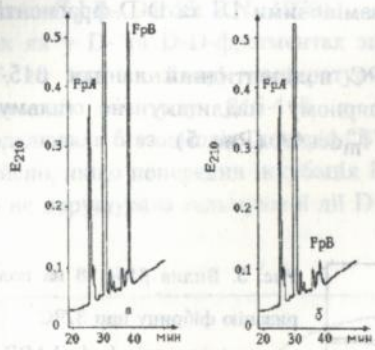


Рис. 4. Хроматографічний розподіл суміші фібринопептидів через три години реакції фібриногену з тромбіном:

- а - при відсутності Fab-фрагментів монАТ 2d-2a;
- б - в присутності Fab-фрагментів монАТ 2d-2a.

Такі дані свідчили про те, що дві молекули Fab-фрагментів монАТ 2d-2a з'єднувалися з обома пептидними зв'язками β14-15 молекули фібриногену. Отже, з молекулою фібрин(оген)у мали можливість одночасно взаємодіяти або одна молекула монАТ 2d-2a, або дві молекули Fab-фрагментів. Виходячи з цього факту, можна зробити висновок про те, що відстань між двома пептидними зв'язками β14-15 менша, ніж два діаметри молекули IgG, але більша, ніж два діаметри Fab-фрагменту.

З літературних даних відомо, що N-кінцевий фрагмент β -ланцюга фібрину містить функціонально важливі ділянки, які забезпечують нормальну полімеризацію фібрину. Відомо і те, що фібрин, в якому ці ділянки пошкоджені генетично (Liu C.Y., et al., 1985) чи модифіковані хімічно (Pandya B.V. et al., 1985, Shimizu A., 1986), має ослаблені полімеризаційні властивості. Наші результати показали, що взаємодія молекули монАТ 2d-2a з одним із пептидних зв'язків β 14-15, призводила до зменшення швидкості полімеризації вдвічі. Приєднання до обох цих епітопів Fab-фрагментів монАТ 2d-2a повністю подавляло процес латеральної асоціації протофібрил фібрину. Виходячи з цього, ми зробили висновок, що один з центрів латеральної асоціації протофібрил фібрину розташований в центральному E-домени молекули, а саме в N-кінцевому фрагменті ланцюга В β .

Друга частина роботи містить результати детального вивчення взаємодії ланцюга β 15-118 з плазміновими D- та D-D-фрагментами фібрину.

Було встановлено, що при 37°C поліпептидний ланцюг β 15-118 навіть в десятикратному молярному надлишку не гальмував полімеризації ні $f_{m\text{des}}\text{-AABB}$, ні $f_{m\text{des}}\text{AA}$ (Рис. 5).

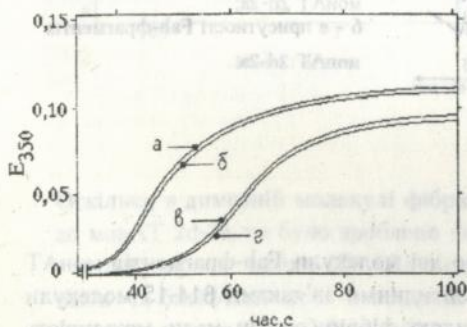


Рис. 5. Вплив β 15-118 на полімеризацію фібрину при 37°C

а - полімеризація $f_{m\text{des}}\text{AABB}$; б - полімеризація $f_{m\text{des}}\text{AABB}$ в присутності β 15-118; в - полімеризація $f_{m\text{des}}\text{AA}$; г - полімеризація $f_{m\text{des}}\text{AA}$ в присутності β 15-118;

Однак при зниженні температури до 12°C було виявлено гальмування полімеризації, як $f_{m\text{des}}\text{AABB}$, так і $f_{m\text{des}}\text{AA}$ (Рис. 6).

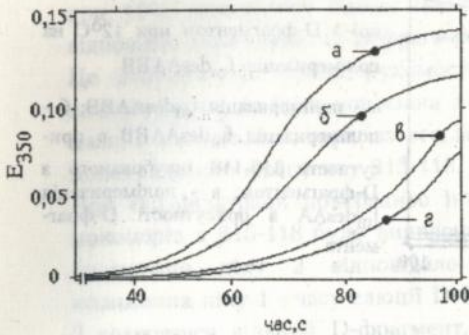


Рис. 6. Вплив β 15-118 на полімеризацію фібрину при 12°C

а - полімеризація $f_{m\text{desAABB}}$; б - полімеризація $f_{m\text{desAABB}}$ в присутності β 15-118; в - полімеризація $f_{m\text{desAA}}$; г - полімеризація $f_{m\text{desAA}}$ в присутності β 15-118;

Це погоджується з даними Шайнова і Дардік, які визначили, що взаємодія центрів "В" - "b" збільшується при низьких температурах (Shainoff J.R., Dardik B.N., 1979).

Так як у D- та D-D-фрагментах знаходились центри полімеризації "b", то при зниженні температури можна було очікувати пряму взаємодію пептиду β 15-118 з D- та D-D-фрагментами, яка моделювала б взаємодію центрів "В" - "b".

Дійсно, якщо попередня інкубація D-D з β 15-118 при 37°C практично не порушувала гальмуючої дії D-D-фрагменту (Рис. 7),

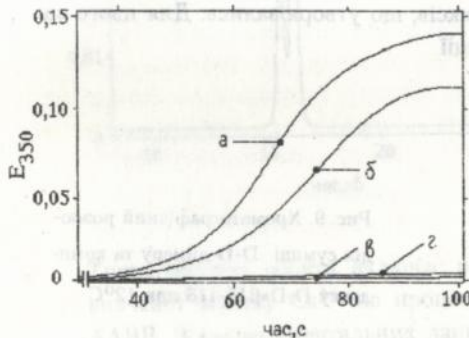


Рис. 7. Вплив β 15-118 інкубованого з D-D-фрагментом при 37°C та 12°C на полімеризацію $f_{m\text{desAABB}}$

а - полімеризація $f_{m\text{desAABB}}$; б - полімеризація $f_{m\text{desAABB}}$ у присутності β 15-118 інкубованого з D-D-фрагментом при 12°C; в - полімеризація $f_{m\text{desAA}}$ в присутності β 15-118 інкубованого з D-D-фрагментом при 37°C; г - полімеризація $f_{m\text{desAABB}}$ у присутності D-D-фрагмента

то інкубація десятикратного молярного надлишку пептиду β 15-118 з D-D при 12°C суттєво послаблювала його гальмівну дію (Рис. 8).

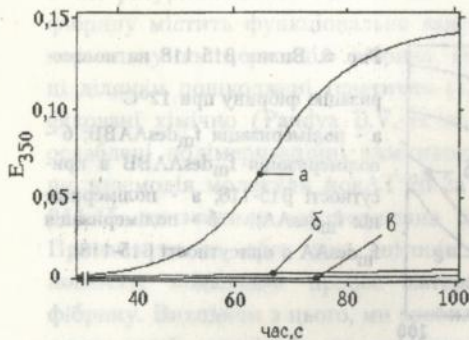


Рис. 8. Вплив $\beta 15-118$ інкубованої з D-фрагментом при 12°C на полімеризацію $f_m \text{ des AABV}$

а - полімеризація $f_m \text{ des AABV}$; б - полімеризація $f_m \text{ des AABV}$ в присутності $\beta 15-118$ інкубованого з D-фрагментом; в - полімеризація $f_m \text{ des AA}$ в присутності D-фрагмента

Це свідчило про специфічну взаємодію $\beta 15-118$ з D-D-фрагментом, в результаті якої утворювався комплекс D-D* $\beta 15-118$ без гальмівних властивостей. Очевидно, зв'язування комплементарних центрів полімеризації "В" та "b" призводило до взаємного блокування. Попередня інкубація фрагменту ланцюга $\beta 15-118$ з D-фрагментом не впливала на гальмівну властивість останнього при утворенні комплексу.

Взаємодію $\beta 15-118$ з D- та D-D-фрагментами, внаслідок якої утворювались комплекси, було підтверджено методом "нативного" електрофорезу в ПААГ. Але дані, отримані вказаним методом, вірогідно вказували тільки на зміну заряду. Цього було недостатньо для повної характеристики комплексів. Перш за все, необхідно було порівняти молекулярну масу комплексів, що утворювались. Для цього застосовували метод гел'фільтрації

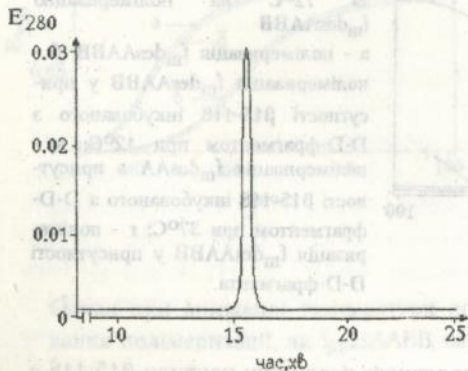


Рис. 9. Хроматографічний розподіл суміші D-D-димеру та комплексу D-D* $\beta 15-118$ при 12°C

Хроматографічний аналіз суміші показав, що комплекс D-D• β 15-118 при 12°C елюювався одним гомогенним піком, час елюції якого відповідав часу елюції D-D-фрагменту (Рис. 9).

Це значило, що зміна рухомості комплексу D-D• β 15-118 при електрофорезі не була пов'язана з збільшенням його молекулярної маси, а визначалася, перш за все, зміною заряду за рахунок низькомолекулярного фрагменту β 15-118.

При гел'фільтрації попередньо інкубованої при 12°C суміші D-мономерів з β 15-118 було виявлено два піки (Рис. 10). При цьому положення піку 2 відповідало часу елюції D-фрагменту, а положення піку 1 - часу елюції D-D-фрагменту. Таким чином, в піку 2 елюювався вільний D-фрагмент, який знаходився в суміші поза комплексом, а виявлення піку з подвоєною молекулярною масою було обумовлено димеризацією D-фрагменту після його взаємодії з β 15-118.

Таким чином, D-D-фрагмент після взаємодії з β 15-118 повністю втрачав здатність гальмувати полімеризацію фібрину, а D-фрагмент виявляв тенденцію до димеризації.

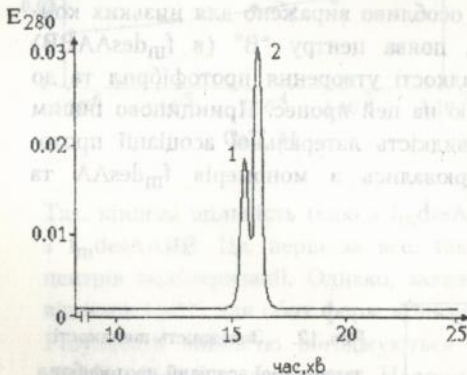


Рис. 10. Хроматографічний розподіл суміші D-фрагменту та димерного комплексу D• β 15-118 при 12°C

1 - димерний комплекс D• β 15-118;
2 - D-фрагмент

Третя частина роботи включає результати, які були отримані при вивченні впливу Ca^{2+} на процес полімеризації $f_{\text{m}}\text{desAA}$ та $f_{\text{m}}\text{desAABB}$. З експериментальних даних, поданих на Рисунку 11, видно, що швидкість утворення протофібрил з мономерів desAABB та desAA залежить від концентрації Ca^{2+} .

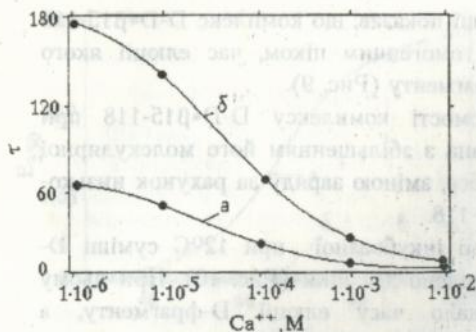


Рис. 11. Залежність (оберненої величини швидкості) формування протофібрил $f_{m\text{desAABB}}$ (а) та $f_{m\text{desAA}}$ (б) від концентрації Ca^{2+}

Вона значно зростає (τ - зменшується) зі збільшенням концентрації цього іону. За всіх концентрацій Ca^{2+} швидкість утворення протофібрил з $f_{m\text{desAABB}}$ була вищою, ніж для $f_{m\text{desAA}}$. Вплив Ca^{2+} особливо виражений за низьких концентрацій. В зоні фізіологічних концентрацій Ca^{2+} (1×10^{-3} М) вплив цього іону на даний процес знижується. Щодо двох форм мономерного фібрину, то вплив Ca^{2+} на швидкість формування протофібрил з $f_{m\text{desAA}}$ значно сильніший, ніж для $f_{m\text{desAABB}}$, що особливо виражено для низьких концентрацій цього іону. Тобто, поява центру "В" (в $f_{m\text{desAABB}}$) призводить до зростання швидкості утворення протофібрил та до зниження впливу іонів кальцію на цей процес. Принципово іншим виявився вплив Ca^{2+} на швидкість латеральної асоціації протофібрил (Рис. 12), які утворювались з мономерів $f_{m\text{desAA}}$ та $f_{m\text{desAABB}}$.

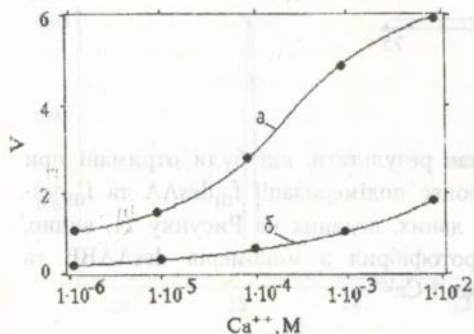


Рис. 12. Залежність швидкості латеральної асоціації протофібрил з $f_{m\text{desAABB}}$ (а) та протофібрил з $f_{m\text{desAA}}$ (б) від концентрації Ca^{2+}

Спостерігається різке збільшення швидкості цього процесу для $f_{m\text{desAABB}}$ та значно сильніший вплив іонів кальцію для цієї форми мономеру особливо в зоні концентрацій, близьких до фізіологічних.

Даний феномен пов'язаний ні з чим іншим, як з появою "В" центру полімеризації, який формується в результаті відщеплення GrB , тобто при переході фібрин-мономеру із форми $f_{m\text{desAA}}$ в форму $f_{m\text{desAABB}}$.

Як виявилось, і властивості гелів, сформованих з $f_{m\text{desAA}}$ чи $f_{m\text{desAABB}}$, теж відрізняються за наявності іонів кальцію. На Рисунку 13 показана залежність світлорозсіювання (щільності) гелів з $f_{m\text{desAA}}$ від концентрації Ca^{2+} .

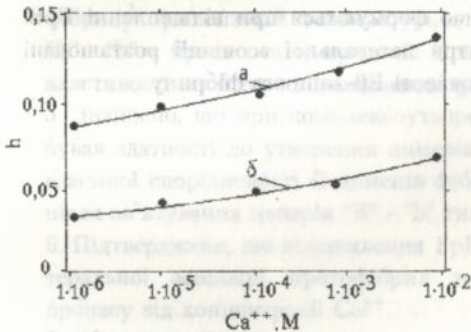


Рис. 13. Залежність світлорозсіювання гелів з $f_{m\text{desAABB}}$ (а) та з $f_{m\text{desAA}}$ (б) від концентрації Ca^{2+}

Так, кінцева щільність гелю з $f_{m\text{desAA}}$ значно нижча, ніж для гелю з $f_{m\text{desAABB}}$. Це, перш за все, також зумовлюється появою "В" центрів полімеризації. Однак, залежність кінцевої мутності гелів від іонів Ca^{2+} для обох форм мономеру абсолютно однакова.

Результати повністю погоджуються з даними, які були отримані раніше іншими авторами. Наприклад, за даними Лаудано та Дулітла, взаємодія фібриногену з тетрапептидом Gly-His-Arg-Pro , який є N-кінцевим фрагментом β -ланцюга, значно збільшується в присутності Ca^{2+} в концентрації 2×10^{-3} М (Laudano A.P., Doolittle R.F., 1981). Міхалі було встановлено, що кінетика вивільнення GrB корелювала з вмістом вільного кальцію в середовищі для полімеризації фібрину (Mihalyi E., 1988). Наші результати виявили суттєвий вплив саме Ca^{2+} на латеральну асоціацію протофібрил, яка різко збільшується при відщепленні GrB .

ВИСНОВКИ:

1. Розроблено метод одержання поліпептидних ланцюгів - фрагментів фібрин(огену): $\text{A}\alpha 1-51$, $\alpha 17-51$, $\text{B}\beta 1-118$, $\beta 15-118$, $\gamma 178$.
2. Одержано моноклональні антитіла 2d-2a та їх Fab-фрагменти, які виявились високоспецифічними та ефективними інгібіторами полімеризації фібрину. За допомогою цих моноклональних антитіл показана участь N-кінцевого фрагменту β -ланцюга фібрину в процесі латеральної асоціації протофібрил.
3. Одержано високоактивні плазмінові фрагменти (D та D-D) фібрину людини. Показано, що в молярному відношенні D-D-фрагмент двічі сильніший інгібітор полімеризації фібрину ніж D-фрагмент.
4. Показано комплексоутворення $\beta 15-118$ з D- та D-D-фрагментами фібрину при низькій температурі, яке моделює складання центрів "В" - "b" в процесі полімеризації. При цьому фрагмент D-D втрачав властивості інгібітора полімеризації фібрину.
5. Знайдено, що при комплексоутворенні з $\beta 15-118$ D-фрагмент набував здатності до утворення димерів, що свідчило про збільшення взаємної спорідненості D-доменів фібрину, в процесі полімеризації після зв'язування центрів "В" - "b" типу.
6. Підтверджено, що відщеплення GrV призводить до посилення латеральної асоціації протофібрил та показана залежність цього процесу від концентрації Ca^{2+} .
7. На підставі експериментальних та літературних даних подана доповнена та детальніша схема послідовних подій, які мають місце в процесі полімеризації фібрину.

ЛНБ ім. В. Стефанишина
АН України

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ НАУКОВИХ ПРАЦЬ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Колесникова И.Н., Буханевич А.М., Ситак И.Н., Ляшко Е.Д., Луговской Э.В., Макогоненко Е.М., Чудновец В.С., Гоголинская Г.К., Дерзкая Г.К., Комиссаренко С.В. Определение специфичности моноклональных антител к NH₂-концевым дисульфидным узлам фибриногена и фибрина // Докл. АН Украины, 1991, №12,6 С. 101-103.
2. Луговской Э.В., Макогоненко Е.М., Чудновец В.С., Гоголинская Г.К., Колесникова И.Н., Буханевич А.М., Ситак И.Н., Ляшко Е.Д., Дерзкая Г.К., Комиссаренко С.В. Исследование процессов ассоциации фибрина с помощью моноклональных антител // Биохим. Животных и человека, 1991, 15, С. 77-86.
3. Чудновец В.С., Луговской Э.В., Гоголинская Г.К., Дерзкая Г.К., Назимов И.В., Комиссаренко С.В. Получение и использование полипептидных цепей составляющих NH₂-концевой дисульфидный узел фибриногена и фибрина // Всесоюзный симпозиум по химии пептидов, Рига, 1990, С. 49.
4. Чудновец В.С., Луговской Э.В., Гоголинская Г.К., Дерзкая Г.К., Назимов И.В., Комиссаренко С.В. Выделение NH₂-концевых дисульфидных узлов фибриногена и фибрина человека и фрагментов полипептидных цепей, входящих в их состав // Докл. АН СССР, 1991, 317, №6 С. 1496-1499.
5. Lugovskoy E.V., Makogonenko E.M., Chudnovets V.S., Derskaja S.G., Gogolinskaja G.K., Kolesnikova I.N., Buchanevich A.M., Sitak I.N., Ljashko E.D., Komissarenko S.V. The study of fibrin polymerization with monoklonal antibodies // Biomed. Sci., 1991, 2, P. 249-256.
6. Lugovskoy E.V., Chudnovets V.S., Derskaja S.G., Gogolinskaja G.K., Kolesnikova I.N., Komissarenko S.V. The study of fibrin polymerization with monoclonal antibodies. 8-th Symposium on chemistry of peptides and proteins. FRG-USSR, Aachen, 1991.
7. Lugovskoy E.V., Chudnovets V.S., Derskaja S.G., Gogolinskaja G.K., Kolesnikova I.N., Komissarenko S.V. The study of fibrin polymerization with monoclonal antibodies. II-nd Symposium on peptides and proteins Russia-Israel, Moscow, 1992.
8. Lugovskoy E.V., Chudnovets V.S., Derskaja S.G., Gogolinskaja G.K., Kolesnikova I.N., Komissarenko S.V. Fibrin fragment β 15-118. Its inhibitory and complex formation properties. XIII Int. Fibrinogen Workshop, Manchester, September 14-16, 1994.

9. Луговской Э.В., Макогоненко Е.М., Чудновец В.С., Дерзкая Г.К., Гоголинская Г.К., Колесникова И.Н., Михаловская Л.И., Комиссаренко С.В. Исследование полимеризации фибрина с помощью моноклональных антител 2d-2a и их Fab-фрагментов // Укр. Біохім. журн., 1995, №1, С. 64-70.

10. Луговской Э.В., Макогоненко Е.М., Чудновец В.С., Дерзкая Г.К., Гоголинская Г.К., Михаловская Л.И., Комиссаренко С.В. Фибриновый фрагмент β 15-118. Ингибиторные и комплексообразующие свойства // Укр. Біохім. журн., 1995, №4, С. 57-64.

Кудряков С.В., Луговская Э.В., Чудновец В.С., Дерзкая Г.К., Гоголинская Г.К., Колесникова И.Н., Михаловская Л.И., Комиссаренко С.В. Исследование полимеризации фибрина с помощью моноклональных антител 2d-2a и их Fab-фрагментов // Укр. Біохім. журн., 1995, №1, С. 64-70.

Кудряков С.В., Луговская Э.В., Чудновец В.С., Дерзкая Г.К., Гоголинская Г.К., Колесникова И.Н., Михаловская Л.И., Комиссаренко С.В. Фибриновый фрагмент β 15-118. Ингибиторные и комплексообразующие свойства // Укр. Біохім. журн., 1995, №4, С. 57-64.

Кудряков С.В., Луговская Э.В., Чудновец В.С., Дерзкая Г.К., Гоголинская Г.К., Колесникова И.Н., Михаловская Л.И., Комиссаренко С.В. Исследование полимеризации фибрина с помощью моноклональных антител 2d-2a и их Fab-фрагментов // Укр. Біохім. журн., 1995, №1, С. 64-70.

Кудряков С.В., Луговская Э.В., Чудновец В.С., Дерзкая Г.К., Гоголинская Г.К., Колесникова И.Н., Михаловская Л.И., Комиссаренко С.В. Фибриновый фрагмент β 15-118. Ингибиторные и комплексообразующие свойства // Укр. Біохім. журн., 1995, №4, С. 57-64.

Кудряков С.В., Луговская Э.В., Чудновец В.С., Дерзкая Г.К., Гоголинская Г.К., Колесникова И.Н., Михаловская Л.И., Комиссаренко С.В. Исследование полимеризации фибрина с помощью моноклональных антител 2d-2a и их Fab-фрагментов // Укр. Біохім. журн., 1995, №1, С. 64-70.

Чудновец В.С. Роль NH_2 -концевого участка цепи $\text{B}\beta$ в процессе самосборки фибрина.

Рукопись. Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 - биохимия. Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины, Киев, 1995.

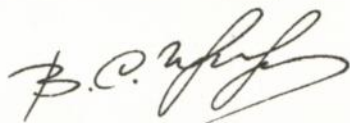
Представленная работа содержит результаты изучения роли NH_2 -концевого участка цепи $\text{B}\beta$ в процессе самосборки фибрина. Установлено участие фрагмента 15-53 β -цепи фибрина, что означает участие центрального E-домена молекулы в процессе латеральной ассоциации протофибрилл. Показано комплексообразование $\beta 15-118$ с D- и D-D-фрагментами фибрина при низкой температуре. Найдено, что при образовании комплекса фрагмент D-D утрачивал свойства ингибитора полимеризации фибрина, тогда как D-фрагмент их сохранял. При этом было обнаружено, что D-фрагмент приобретал способность к образованию димеров. Полученные данные подтвердили, что отщепление FpB приводит к усилению латеральной ассоциации протофибрилл фибрина и показали зависимость этого процесса от концентрации Ca^{2+} .

Chudnovets V.S. Role of NH_2 -terminal part of $\text{B}\beta$ -chain in the process of fibrin association.

The Dissertation Thesis for Obtaining a Scientific Degree of Philosophy Doctor (Biology) in the Speciality 03.00.04 - Biochemistry. A.V. Palladin Institute of Ukraine National Academy of Science. Kiev. Ukraine.

This work contains study results of the role of NH_2 -terminal part of $\text{B}\beta$ chain in the process of fibrin association. The participation of 15-53 fragment of fibrin β -chain is ascertained, which proved molecule central E-domain participation in the process of protofibrils lateral association. A complex formation of $\beta 15-118$ with fibrin D- and DD-fragments under low temperature is proved. It is specified, that in the process of complex formation D-D-fragment lost its properties of fibrin polymerization inhibitor, while D-fragment preserved them. Notwithstanding, it was found out, that D-fragment obtained dimer formation ability. Data obtained have proved, that FpB splitting off can cause strengthening of protofibrils lateral association of fibrin and have explained the relation of the process and Ca^{2+} concentration.

Ключові слова: фібриноген, фібрин, моноклональні антитіла, D- та DD-фрагменти.



442877

AB 33.056