

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ім. О.В. Палладіна

На правах рукопису

ЛУКІНОВА Ніна Іванівна

ОСОБЛИВОСТІ СТРУКТУРИ ПРОДУКТІВ ДЕГРАДАЦІЇ
СТАБІЛІЗОВАНОГО ФІБРИНУ, ЩО МІСТЯТЬ D-ДОМЕН,
ТА ЇХ ВПЛИВ НА ПОЛІМЕРИЗАЦІЮ ФІБРИНУ

03.00.04 - біохімія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ 1996



Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у відділі структури та функцій білка Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна Національної академії наук України.

Науковий керівник

кандидат біологічних наук
Платонова Тетяна Миколаївна

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, професор
Кібірев Володимир Констянтиневич

кандидат біологічних наук
Верьовка Сергій Вікторович

Провідна організація

Національний університет
ім. Тараса Шевченка

Захист відбудеться *23 березня* 1996 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 ознайомитись у бібліотеці Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України.

Автореферат розісланий *22 серпня* 1996 року.

Вчений секретар
спеціалізованої ради

О.В.Кірсенко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

АКТУАЛЬНІСТЬ ПРОБЛЕМИ. Гемостатичний баланс можна розцінювати як рівновагу між двома протилежними процесами - зсіданням крові та фібринолізом. Система зсідання крові являє собою каскад біохімічних реакцій, спрямованих на утворення фібринового згустка з його неактивного попередника фібриногену під дією протеолітичного ферменту тромбіну. Точність і ефективність самоскладання фібрину зумовлена наявністю специфічних центрів полімеризації, частина яких активна в молекулі фібриногену, а комплементарні їм центри експонуються в молекулі мономерного фібрину після відщеплення фібринопептидів від фібриногену. За рахунок неповного набору активних центрів фібриноген та продукти його ферментативного розщеплення виступають інгібіторами полімеризації фібрину. Взаємодія продуктів ферментативного розщеплення фібрину (огену) з фібрином під час полімеризації є зручною моделлю вивчення механізмів утворення надмолекулярних біологічних структур.

Раніше нами було показано, що у присутності Ca^{2+} під дією фібринолітичної протеази плазміну в D_H -фрагменті відбувається розщеплення міждоменого пептидного зв'язку в С-кінцевій ділянці $B\beta$ -ланцюга. Це розщеплення призводить до появи D_{LA} -фрагмента, який має підвищену антиполімеризаційну активність. Як відомо, D-димер є фактично двома D_H -фрагментами з двох різних молекул фібрину, що стабілізовані за γ -ланцюгами. Було важливо дослідити можливість аналогічного механізму підвищення антиполімеризаційної активності у D-димеру. Крім того, раніше було доведено, що D-димер та D-фрагмент гальмують процес полімеризації фібрину за різними механізмами. Цю різницю з точки зору як їх структурних особливостей, так і функціонування центрів полімеризації у вищезазначених специфічних інгібіторів було необхідно дослідити детальніше.

Водночас, наявність продуктів деградації фібриногену/фібрину (ПДФ) у плазмі крові є показником порушення гемостатичного балансу. Підвищений рівень цих продуктів супроводжує тромбоз глибоких вен, синдром дисемінованого внутрішньосудинного зсідання, травми, хірургічні втручання, інфекції, розвиток пухлин, серповидно-клітинну анемію. Таким чином, рівень ПДФ у плазмі крові є дуже важливим показником для підтвердження діагнозу хвороб, пов'язаних з активацією чи пригніченням зсідуючої та

ЛІБІМ В. С. Франківка
АН України

протизсідуючої систем. Спостереження за зміною рівня ПДФ під час терапії тромболітиками може показувати ефективність лікування. Тому розробка нових підходів до виявлення ПДФ у плазмі крові людини має велике значення для лабораторної клінічної діагностики.

МЕТА РОБОТИ ТА ЗАВДАННЯ ДОСЛІДЖЕННЯ. Метою роботи було вивчення структурних і функціональних особливостей продуктів ферментативного розщеплення стабілізованого фібрину, що містять D-домени, та порівняльне дослідження процесу гальмування полімеризації фібрину різними формами D-фрагментів фібриногену та D-димерів стабілізованого фібрину. Виходячи з цього, було визначено такі завдання експериментальних досліджень:

1. Вивчити процес ферментативного розщеплення димерного фрагмента D зі стабілізованого фібрину та дослідити структуру продуктів розщеплення.
2. Провести дослідження антиполімеризаційних властивостей різних форм D-димеру.
3. Вилучити та дослідити структурні та функціональні особливості C-кінцевої ділянки β -ланцюга D-димеру.
4. Вивчити вплив специфічних інгібіторів, які містять D-домени, на різні стадії полімеризації фібрину - стадію утворення протофібрил (лаг-фаза) та стадію латеральної асоціації протофібрил та фібрил.
5. Дослідити чутливість скринінг-тесту "анцистроновий час" до різних концентрацій продуктів деградації стабілізованого фібрину.

НАУКОВА НОВИЗНА. В результаті проведених досліджень вперше показано, що коровий димерний фрагмент D стабілізованого фібрину бика може гідролізуватися плазміном до більш низькомолекулярних форм з підвищеною антиполімеризаційною активністю. Вивчення структури очищених форм D-димеру та вилученої C-кінцевої ділянки β -ланцюга показало, що підвищення антиполімеризаційної активності відбувається в результаті збільшення доступності центру полімеризації d2 за рахунок розщеплення поліпептидного зв'язку Lys₃₉₃-Thr₃₉₄ у C-кінцевої ділянки β -ланцюга. Також показано, що D-димер проявляє свої антиполімеризаційні властивості більше на стадії латеральної агрегації протофібрил і фібрил, на відміну від D-фрагмента, який є ефективним інгібітором обох стадій полімеризації фібрину. Крім того, під час дослідження гальмування процесу самоскладання фібрину вихідними та

активованими фрагментами D та DD знайдено, що розщеплення зв'язку Lys₃₉₃-Thr₃₉₄ у С-кінцевій ділянці β-ланцюга не призводить до зміни механізму гальмуючої дії специфічного інгібітора. Для D-димеру знайдено новий термодинамічний перехід у зоні 60-70°C, який відсутній у D-фрагмента, що вказує на можливість появи нової структури, утвореної під час взаємодії двох D-доменів, яка може визначати різницю механізмів гальмування самоскладання фібрину D-фрагментом і D-димером. Також показано, що скринінг-тест "анцистроповий час" може використовуватися для визначення продуктів деградації стабілізованого фібрину в плазмі крові людини.

ПРАКТИЧНА ЗНАЧИМІСТЬ РОБОТИ. Одержані результати дозволяють глибше зрозуміти механізм гальмування процесу полімеризації фібрину специфічними інгібіторами, які є маркерами багатьох патологічних процесів в організмі. Запропоновано та опрацьовано новий метод виявлення продуктів деградації фібрину в плазмі крові людини.

АПРОБАЦІЯ РОБОТИ. Матеріали дисертації доповідалися на XII Міжнародній школі з фібриногену (Wrightsville Beach, USA, 1993), на V Науковій конференції "Наука і виробництво - охороні здоров'я", Київ, 1993), на II Міжнародному симпозиумі з фібриногену при серцево-судинних захворюваннях (Edinburgh, UK, 1994), на симпозиумі "Біологічні механізми старіння", (Харків, 1994), на Міжнародній конференції з фібриногену та фібринолізу (Ялта, 1995), на наукових семінарах Лабораторії біологічних досліджень в Оксфорді (Oxford Bioresearch, UK) та відділу структури і функцій білка Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України.

СТРУКТУРА ДИСЕРТАЦІЇ. Дисертаційну роботу викладено на 120 сторінках машинописного тексту. Робота складається зі вступу, чотирьох глав, списку літератури, з 175 посилань на роботи вітчизняних та зарубіжних авторів, 35 малюнків, 2-х таблиць.

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

МЕТОДОЛОГІЯ, МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Фібриноген вилучали з плазми великої рогатої худоби методом висолювання сульфатом натрію (Варецька та ін., 1960).

Фібрин-мономер дезААВВ одержували активацією фібриногену тромбіном з наступним розчиненням згустка в 20мМ оцтової кислоті при 0°C (Беліцер та ін., 1968).

Фібрин-мономер дезАА одержували після обробки фібриногену Ащитроном-Н з наступними стадіями, аналогічними отриманню фібрин-мономеру дезААВВ.

D-димер одержували гідролізом згустка плазміном за концентрацією останнього 0,4 к.е./мл після стабілізації фібрину протягом 16 годин при 22°C (Платонова Т.П. та ін., 1980).

D₁₂- і D₁₄-фрагменти одержували з фібриногену бика плазміновим гідролізом у присутності Ca²⁺ (Privalov and Medved', 1982; Medved', 1988).

Вплив специфічних інгібіторів на різні стадії полімеризації фібрину досліджували турбідиметричним методом за допомогою Spereord-M40 (Німеччина) при довжині хвилі 350 нм.

Калориметричні дослідження проводили на скануючому мікрокалориметрі ДАСМ-4, при швидкості прогрівання 1 градус за хвилину в діапазоні від 10 до 120°C. Обробку температурних переходів проводили за допомогою програм "Corplot" та "EMF Software 1985" на ІВМ XT.

Визначення антиполімеризаційної активності проводили при 37°C в 0,05 М ТРИС·НСІ буфері, рН 7,5, + 0,15 М NaCl + 1x10⁻⁴М CaCl₂ за кінцевої концентрації фібрин-мономеру 0,3 мг/мл. Гальмуючий ефект представляли у вигляді одиниць гальмування (t-t₀)/t₀, де t₀ - час зсідання мономерного фібрину у контролі, t - час зсідання мономерного фібрину в пробі у присутності різної кількості інгібітора. За одиницю активності приймали кількість інгібітора, яка у даних умовах експерименту подовжувала час зсідання фібрину в 10 разів.

N-кінцеві послідовності амінокислотних залишків визначали в лабораторії Д-ра А.Хеншен Каліфорнійського університету (г.Ервайн, США) на газо-рідинному амінокислотному сиквенаторі "Applied Biosystem-777" (США).

Молекулярні маси отриманих фрагментів визначали за допомогою ДСН-електрофорезу в поліакриламідному гелі за білками-маркерами (Weber K., Osborn M., 1969).

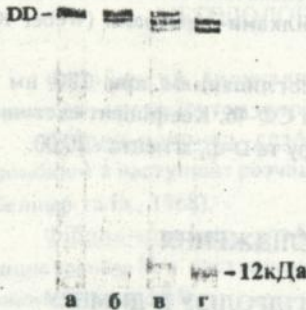
Концентрації білків визначали за поглинанням при 280 нм у нейтральному середовищі на спектрофотометрі СФ-46. Коефіцієнт екстинції для фібриногену - 15,06, для всіх форм D-димеру та D-ф, агмента - 20,00.

ОСНОВНІ РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

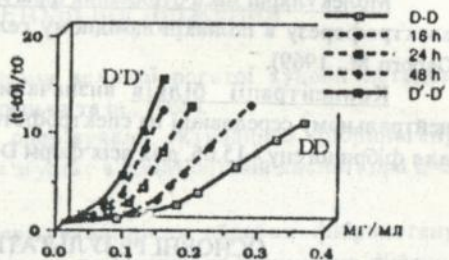
1. ВИВЧЕННЯ ХОДУ ПЛАЗМІНОВОГО ГІДРОЛІЗУ D-ДИМЕРУ У ПРИСУТНОСТІ Ca^{2+}

На першому етапі було проведено дослідження ходу плазмінового гідролізу D-димеру в присутності фізіологічних концентрацій Ca^{2+} при концентрації плазміну 0,4 к.е./мл. На Мал. 1 представлені електрофореграми вихідного D-димеру, 16-, 24- та 48-годинного гідролізатів, з яких видно, що вихідний DD з молекулярною масою 195 кДа розщеплюється плазміном до двох більш низькомолекулярних форм, які відрізняються від вихідної на 12 та 24 кДа відповідно. Через 48 годин гідролізат вміщував загалом третю форму D-димеру з молекулярною масою 171 кДа. Дослідження антиполімеризаційних властивостей гідролізатів у порівнянні з вихідною формою показали, що активність форм димеру із зниженням молекулярної маси підвищується з 3,0 до 7,6 од. питомої активності (Мал. 2).

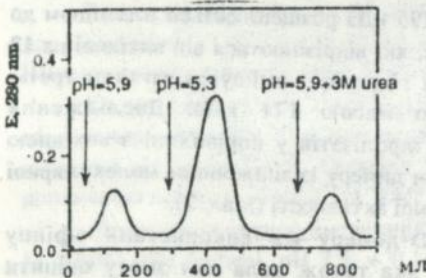
Для розділення трьох форм D-димеру ми використали афіну хроматографію на фібрин-сефарозі, яка також дала нам змогу оцінити спорідненість різних форм димеру до імобілізованого фібрину. 48-годинний гідролізат D-димеру, заінгібований PMSF, наносили на колонку 2,8x19 см з фібрин-сефарозою, врівноважену буфером 0,05M $TRIS \times H_3PO_4$, pH 7,0, + 0,1M NaCl + 1×10^{-4} M $CaCl_2$ + 0,025M ϵ -амінокапронової кислоти. Для елюції зв'язаних з фібрин-сефарозою білків використовували буфери, описані в (Belltser V.A. et al., 1980). На Мал. 3 представлена відповідна хроматограма, стрілками вказані буферні розчини. За даними ДСН-електрофорезу (Мал. 4), другий пік елюції мав вихідну форму D-димеру (DD) у висхідній та проміжну форму (D'D) у нисхідній частині піка. Третя форма димеру (D'D') так сильно зв'язувалася з імобілізованим фібрином, що елювати її було можливо тільки буфером з 3M сечовиною (третій пік).



Мал. 1. Електрофореграми вихідного D-димеру (а), 16, 24, 48-годинного гідролізітів (б, в, г відповідно).



Мал. 2. Гальмуючий ефект вихідного D-димеру, 16, 24, 48-годинного гідролізітів та третьої форми димеру (D'D').



Мал. 3. Афінна хроматографія 48-годинного гідролізіту D-димеру на фібрин-сефарозі.

DD D'D D'D'

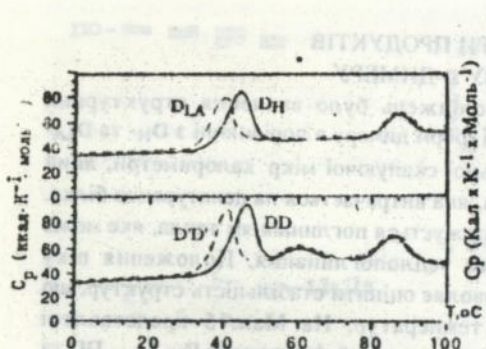
-12 кДа

Мал. 4. Електрофореграми трьох очищених форм димеру (DD, D'D та D'D').

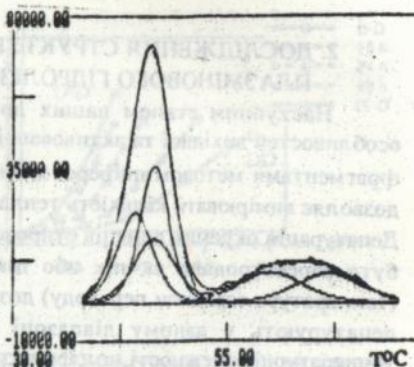
З Мал. 2 видно, що третя форма димеру мала в 3,5 рази вищу антиполімеризаційну активність у порівнянні з вихідним D-димером. З цього випливає, що коровий димерний фрагмент DD стабілізованого фібрину може розщеплюватися плазмінном у присутності Ca^{2+} до більш низькомолекулярних форм, що супроводжується підвищенням антиполімеризаційної активності.

2. ДОСЛІДЖЕННЯ СТРУКТУРИ ПРОДУКТІВ ПЛАЗМІНОВОГО ГІДРОЛІЗУ D-ДИМЕРУ

Наступним етапом наших досліджень було вивчення структурних особливостей вихідної та активованої форм димеру в порівнянні з D_H - та D_{LA} -фрагментами методом диференціальної скануючої мікр калориметрії, який дозволяє вимірювати кількість тепла, яка витрачається на денатурацію білка. Денатурація окремих доменів супроводжується поглинанням тепла, яке може бути зареєстроване як пік або піки теплопоглинання. Положення піку (температура середини переходу) дозволяє оцінити стабільність структур, що денатурують у даному діапазоні температур: На Мал. 5 представлені температурні залежності молярних теплоємностей фрагментів D_H , D_{LA} , DD та D'D'. З малюнка видно, що високотемпературний перехід (BT), який відповідає, як було показано раніше, плавленню термостабільного домену (Privalov and Medved', 1982), зберігає свій максимум у всіх чотирьох фрагментах. Низькотемпературний перехід (HT), який відповідає температурній денатурації термолабільних C-кінцевих ділянок β - та γ -ланцюгів (Litvinovich et al., 1995), у випадку активованих форм (D_{LA} та D'D') зміщений у напрямку більш низьких температур на 50°C. Як було показано нами раніше для D_{LA} -фрагмента (Medved' et al., 1988), це зв'язано з дестабілізацією термолабільних ділянок молекули фрагмента без втрати компактною структури в результаті розщеплення поліпептидного зв'язку Lys₃₉₃-Thr₃₉₄ у C-кінцевій ділянці β -ланцюга. Таким чином, ми можемо зробити висновок, що перетворення вихідного D-димеру в активовану форму D'D' також супроводжується дестабілізацією термолабільних доменів, які формуються C-кінцевими ділянками β - та γ -ланцюгів. Але в порівнянні з D_H та D_{LA} -фрагментами криві плавлення димерних фрагментів мають ще один температурний перехід в зоні 60-70°C. Дегонволюція функції надлишкової теплоємності відповідно алгоритма, розробленого для аналізу кривих плавлення мультидоменних білків (Філімонов та ін., 1982) показала, що цей температурний перехід описується двома майже однаковими за площиною переходами з максимумами 60,7 та 66,3°C, тобто відображає денатурацію двох взаємодіючих структур (Мал. 6). Наявність додаткового у порівнянні з D-фрагментом температурного переходу можна пояснити виникненням нової компактною структури у D-димера, яка, можливо, формується при взаємодії двох D-доменів сусідніх молекул фібрину.



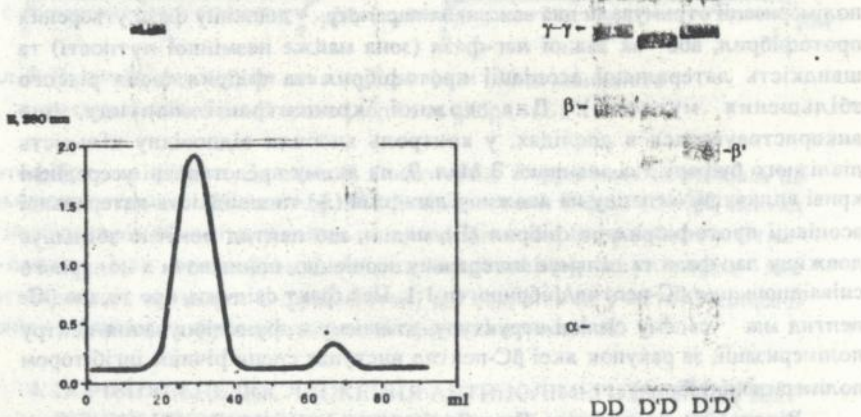
Мал. 5. Температурна залежність молярних теплоємностей D_H , D_{LA} , DD та $D'D'$ у $0,05\text{ M}$ гліциновому буфері, $\text{pH } 3,5$.



Мал. 6. Деконволюція додаткового температурного переходу (HT_2) у D -димера.

Як видно з Мал. 1, при протеолітичному розщепленні D -димеру на електрофореграмах гідролізатів з'являється низькомолекулярна компонента з масою 12 кДа , яка накопичується паралельно підвищенню антиполімеризаційної активності. Ця компонента присуття також і на електрофореграмах очищених фрагментів $D'D$ та $D'D'$ (див. Мал. 3). Раніше нами було показано, що у D_{LA} -фрагмента аналогічна 12 кДа частина молекули відокремлюється від високомолекулярної частини фрагмента тільки в денатуруючих умовах. Ми вилучили цю компоненту з фрагмента $D'D'$ гел'фільтрацією на Сефадексі $G-75$ у буфері $0,05\text{ M TRIS} \times \text{HCl}$, $\text{pH } 7,4$, який вміщував $0,15\text{ M NaCl}$ та 6 M сечовини (Мал. 7). У цих умовах ми розділили високомолекулярну частину $D'D'$ -фрагмента та низькомолекулярну компоненту (електрофореграми очищених препаратів представлені). Щоб дізнатися, з якого поліпептидного ланцюга походить ця компонента, ми дослідили всі три форми димеру електрофоретично у відновлених умовах. На Мал. 8 представлені відповідні електрофореграми, з яких видно, що γ - γ та α -ланцюги мають однакову елек. рофоретичну рухливість у всіх трьох форм, а β -ланцюг зменшується на 12 кДа у третьої форми порівняно з вихідною. У

проміжної форми β -ланцюг представлений двома зонами - 45 та 33 кДа. Виходячи з цих даних, ми можемо зробити висновок, що низькомолекулярна компонента, присутня на електрофореграмах проміжної та третьої форм димеру у невідновлених умовах представляє собою 12 кДа фрагмент β -ланцюга. Відповідно до уявлень про порядок відщеплення доменів у периферичних фрагментах фібриногену та за аналогією до D_{LA} -фрагмента ми можемо віднести низькомолекулярну компоненту $D'D'$ -фрагмента, що відщеплюється у денатуруючих умовах, до С-кінцевої ділянки β -ланцюга.



Мал. 7. Гель-фільтрація $D'D'$ -фрагмента на сефадексі G-75 у присутності 6 М сечовини.

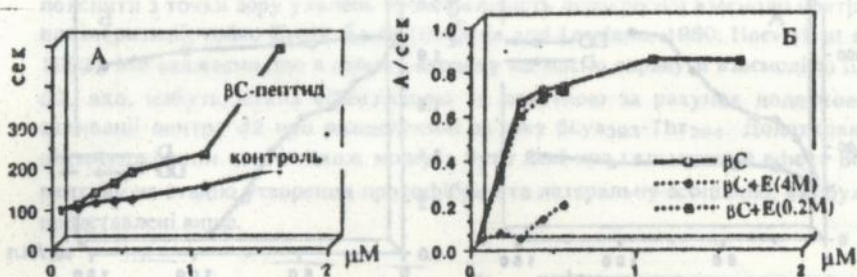
Мал. 8. Електрофореграми трьох форм димеру (DD, $D'D$, $D'D'$) у відновлених умовах.

3. ВИВЧЕННЯ СТРУКТУРНИХ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНИХ ОСОБЛИВОСТЕЙ С-КІНЦЕВОЇ ДІЛЯНКИ β -ЛАНЦЮГА

Структура ізольованої гель-фільтрацією в присутності 6М сечовини компоненти, яку ми відповідно назвали β С-пептидом, була вивчена різними методами. Мікрокалориметричні дослідження довели, що β С-пептид має певну компактну структуру, бо на кривій його плавлення знайдений один температурний перехід з максимумом $35,5^{\circ}\text{C}$. Для пептида була встановлена N-кінцева послідовність амінокислот Thr-Thr-Asp-Pro, за допомогою якої можна точно локалізувати місце розщеплення β -ланцюга - Lys₃₉₃-Thr₃₉₄. N-

кінцева амінокислота Thr була раніше знайдена для β C-пептиду з фрагмента D_{LA}. Відповідно до поведінки β C-пептиду у розчині ми можемо сказати, що він проявляє гідрофобні властивості, тобто не тримається у розчині без солюбілізатора. Це ускладнило наші функціональні дослідження за допомогою методу турбідиметрії, бо сечовина гальмує самоскладання фібрину. В кювету вносили фібриноген, Ca²⁺, відповідну кількість інгібітора (у даному випадку β C-пептиду), потім тромбін, запускаючи при цьому вимірювання мутності розчину в часі. З експериментальних кривих полімеризації отримували два важливих параметри - довжину фази утворення протофібрил, або так званої лаг-фази (зона майже незмінної мутності) та швидкість латеральної асоціації протофібрил та фібрил (зона різкого збільшення мутності). Для кожної концентрації пептиду, що використовувалася в дослідах, у контроль вносили відповідну кількість діалізного буферу з сечовиною. З Мал. 9, на якому представлені усереднені криві впливу β C-пептиду на довжину лаг-фази (А) та швидкість латеральної асоціації протофібрил та фібрил (Б), видно, що пептид помітно збільшує довжину лаг-фази та гальмує латеральну асоціацію, починаючи з молярного співвідношення β C-пептид/фібриноген 1:1. Цей факт свідчить про те, що β C-пептид має в своєму складі структуру, втягнену в функціонування центру полімеризації, за рахунок якої β C-пептид виступає специфічним інгібітором полімеризації фібрину.

Відповідно до гіпотези Д-ра Дуліттла про місцезнаходження центру полімеризації d2, комплементарного центру E₂, експонованому після відщеплення фібринопептидів В, яка спирається, по-перше, на експериментальні дані, що свідчать про місцезнаходження центру полімеризації d1 у С-кінцевій ділянці γ -ланцюга, а, по-друге, на високу ступінь гомології β - та γ -ланцюгів, ми можемо припустити, що β C-пептид або його частина входить до структури центру полімеризації d2. Раніше нами було показано, що D_{LA}-фрагмент з розщепленим поліпептидним зв'язком β lys₃₉₃-Thr₃₉₄ ефективно накопичує мічений дансілом тетрапептид Gly-His-Arg-Pro, який моделює центр d2, що свідчить про активність цього центру у фрагмента D_{LA}. Для того, щоб підтвердити специфічну активність β C-пептиду, ми вилучили ранній Е-фрагмент з DD-E комплексу та використали його як конкурента за β C-пептид у дослідах з гальмування полімеризації фібрину. На Мал. 9 (Б) пунктиром представлені криві ефекту суміші β C-пептиду та Е-фрагменту у двох концентраціях (0,2М та 4М) на стадію латеральної асоціації



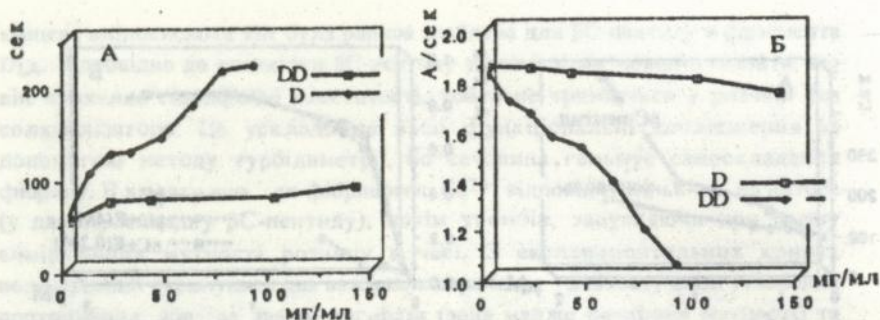
Мал. 9. Вплив βC-пептиду на довжину лаг-фазу (А) та швидкість латеральної асоціації протофібрил та фібрил (Б).

протофібрил та фібрил. За низької концентрації E-фрагмент не впливав на гальмуючу активність βC-пептиду. За співвідношенням E-фрагмент/βC-пептид 4:1 інгібуюча дія βC-пептиду майже повністю знімалася E-фрагментом. Отже βC-пептид мав специфічну антиполімеризаційну активність, яка пригнічувалася активним E-фрагментом, що свідчить за участь C-кінцевої ділянки β-ланцюга у функціонуванні центру полімеризації d2.

4. ПОРІВНЯЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИПОЛІМЕРИЗАЦІЙНОЇ ДІЇ РІЗНИХ СПЕЦИФІЧНИХ ІНГІБІТОРІВ, ЩО МІСТЯТЬ D-ДОМЕНІ

Для того, щоб зрозуміти різницю механізмів антиполімеризаційної дії D-димеру та D-фрагмента, ми вивчали інгібіторні властивості вищезазначених продуктів деградації фібриногену та фібрину за допомогою методу турбідиметрії. На Мал. 10, А представлений графік залежності довжини лаг-фазу від концентрації інгібітора, з якого видно, що D-фрагмент проявляє свою активність уже на початку полімеризації на відміну від D-димеру, який на стадії утворення протофібрил є малоефективним інгібітором. Стадію латеральної асоціації протофібрил та фібрил обидва інгібітори гальмують ефективно (Мал. 10, Б), димер навіть ефективніше за D-фрагмент.

Пояснити ці дані можна з точки зору швидкості комплексоутворення D та DD з фібрином. Відомо (Платонова Т.М. та ін., 1983), що обидва інгібітора можуть утворювати комплекси з фібрином, але з різною кінетикою. D-фрагмент швидше входить в комплекс, але останній є досить нестабільним. Навпаки, D-димер повільніше взаємодіє з фібрином, але його



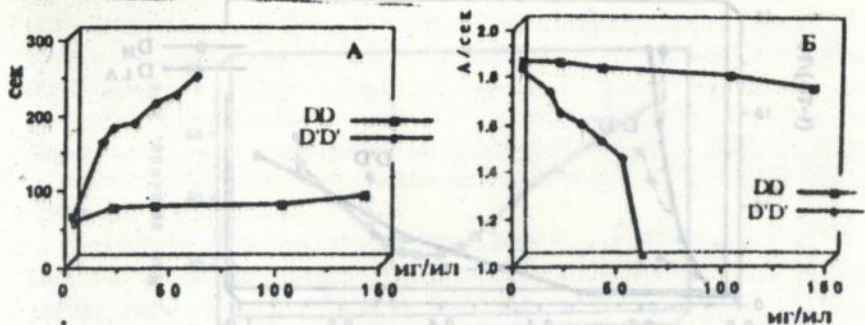
Мал. 10. Вплив D-фрагмента (D) та D-димеру (DD) на довжину лаг-фази (А) та швидкість латеральної асоціації протофібрил та фібрил (Б).

комплекс значно стабільніший, ніж у D-фрагмента. Виходячи з цього, можна пояснити розбіжність у дії інгібіторів на різні стадії полімеризації фібрину: менший за розміром D-фрагмент швидко взаємодіє з молекулами фібрин-мономеру, гальмуючи вже стадію утворення протофібрил, тоді як D-димер зв'язується повільніше, але значно міцніше, тому його антиполімеризаційна активність проявляється на пізніших стадіях полімеризації фібрину.

У подальших експериментах ми використовували фібрин-мономери дезААББ та дезАА в оцтовій кислоті та ініціювали полімеризацію шляхом переведення мономерів у нейтральне середовище. Ми досліджували вплив вихідної та активованої форм D-димеру на різні стадії полімеризації двох форм мономеру (Мал. 11). Як очікувалося, D-димер ефективніше гальмує полімеризацію нормального фібрин-мономеру з експонованими центрами полімеризації E_1 та E_2 , ніж полімеризацію фібрину дезАА, у якого експоновані тільки центри E_1 . Це додаткове свідчення важливості обох центрів полімеризації при взаємодії як фібрин-мономерів між собою, так і у випадку взаємодії фібрину зі специфічним інгібітором. Але коли в модельних експериментах з фібрин-мономером дезАА використовувався як специфічний інгібітор D'D'-фрагмент, ми спостерігали збільшення антиполімеризаційного ефекту на обох стадіях полімеризації (Мал. 11 А, Б).

Отже димер з додатково активованим центром полімеризації d_2 ефективно взаємодіє з фібрин-мономером, у якого комплементарний центр E_2 не експонований зовсім. Цей цікавий експериментальний факт можна

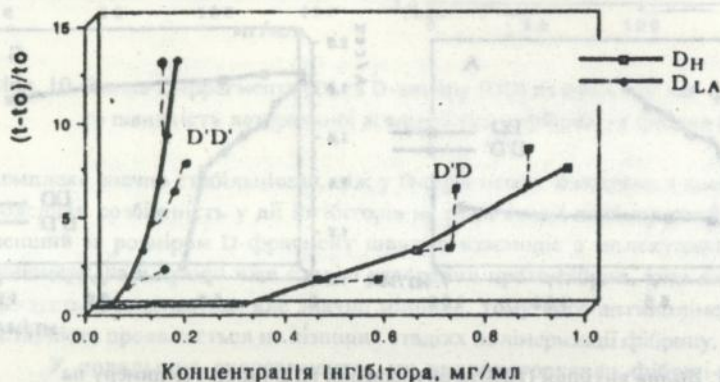
пояснити з точки зору уявлень про можливість перехресної взаємодії центрів полімеризації, тобто E₁-d₂, E₂-d₁ (Doolittle and Laudano, 1980, Haeverli et al. 1992). Ми вважаємо, що в даному випадку ми маємо справу зі взаємодією E₁-d₂, яка, мабуть, стала ефективною та помітною за рахунок додаткової активації центру d₂ при розщепленні зв'язку β Ly₃₉₃-T_Hg₃₉₄. Додатковим підтвердженням цього також можуть бути дані про гальмуючий ефект β C-пептиду на стадію утворення протофібрил та латеральну асоціацію, які були представлені вище.



Мал. 11. Вплив вихідної (DD) та активованої (D'D') форм D-димеру на довжину лаг-фази (А) та швидкість латеральної асоціації протофібрил та фібрил (Б).

Щодо механізму антиполімеризаційної дії D-фрагмента та D-димеру, то, як було показано раніше при дослідженні впливу сумішей інгібіторів на час утворення згустка (Беліцер В.А. та ін., 1986), додавання D-димеру за низької концентрації D_n-фрагмента не приводить до збільшення гальмуючого ефекту, але за більших концентрацій фрагмента додавання навіть невеликої кількості D-димеру різко збільшує антиполімеризаційну дію суміші. На відміну від димеру всі інші специфічні інгібітори полімеризації фібрину мають адитивну дію. Виникає питання, чи не змінює механізм гальмуючого ефекту розщеплення зв'язку β Ly₃₉₃-T_Hg₃₉₄? Ми перевірили дію фрагмента D'D' на фоні D_{LA}-фрагмента. З Мал. 12 видно, що механізм антиполімеризаційної дії D-димеру після його активації до D'D'-фрагмента не змінюється, тобто характер кривих залишається тим же, але у випадку активованих форм для

досягнення відповідного гальмуючого ефекту інгібітора потрібно значно менше. Таким чином, ми можемо зробити висновок, що розщеплення зв'язку $\beta\text{Lys}^{393}\text{-Thr}^{394}$ приводить тільки до збільшення антиполімеризаційної активності фрагментів, але не до зміни механізму їхнього гальмуючого ефекту. Тому можна припустити, що центр полімеризації d2 не зумовлює різницю механізмів гальмування полімеризації фібрину D-димером та D-фрагментом.



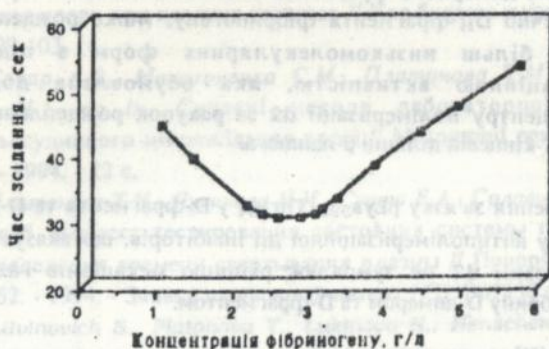
Мал. 12. Гальмуючий ефект специфічних інгібіторів на полімеризацію фібрину.

5. ЧУТЛИВІСТЬ ТЕСТУ "АНЦИСТРОНОВИЙ ЧАС" ДО РІВНЯ ПДФ У ПЛАЗМІ КРОВІ ЛЮДИНИ

Відомо, що ПДФ накопичуються *in vivo* за різних патологій і є маркерами цілого ряду тяжких захворювань. Тому своєчасне виявлення ПДФ у плазмі крові є важливою задачею клінічної лабораторної діагностики.

Раніше у нашому відділі був вилучений та охарактеризований тромбіноподібний фермент Анцистрон-Н з отрути Щитомордника звичайного (*Aegtstrodon halys halys*). На основі цього ферменту було розроблено та опрацьовано на плазмах хворих за різних патологій скринінг-тест "анцистроновий час", за допомогою якого можна охарактеризувати останній етап зсідання крові - перетворення фібриногену на фібрин і полімеризацію останнього в плазмі. Час зсідання плазми в анцистроновому тесті залежить від концентрації фібриногену: нормальний час зсідання плазми в умовах теста

Анцистроном-Н (30 сек) спостерігається за нормальної концентрації фібриногену 2,5-3,5 г/л (Мал. 13). У випадку зниження або підвищення концентрації фібриногену анцистроновий час збільшується. Але ми спостерігали підвищений анцистроновий час і за нормальної концентрації фібриногену. Це могло бути результатом впливу ПДФ на полімеризацію фібрину в плазмі. Ми створили модельну систему, додавши різні кількості D-димеру до донорської плазми, та дослідили змінення часу з'єднання такої плазми в анцистроновому тесті. З Таблиці 1 можна побачити, що



Мал. 13. Залежність часу з'єднання плазми Анцистроном-Н від концентрації фібриногену.

Таблиця 1. Залежність часу з'єднання плазми Анцистроном-Н від концентрації продуктів деградації стабілізованого фібрину

Кількість ПДФ (мкг/мл)	Анцистроновий час (сек)	Тромбіновий час (сек)
10	30	14
40	32	14
60	33	14
80	35	15
160	36	15
200	38	15
300	45	15

анцистроновий час, на відміну від розповсюдженого у клінічних лабораторіях тромбінового, є чутливим до наявності продуктів деградації стабілізованого фібрину в плазмі. Тому, подовження часу зсідання плазми анцистрономом за наявності нормального рівня фібриногену корелює з рівнем ПДФ в плазмі. Таким чином, ми вважаємо, що скрінінг-тест "анцистроновий час" може бути використаним для визначення ПДФ у плазмі крові людини.

ВИСНОВКИ

1. Молекула димерного фрагмента D зі стабілізованого фібрину (D-димеру), аналогічно D_n-фрагмента фібриногену, може розщеплюватися плазміном до більш низькомолекулярних форм з підвищеною антиполімеризаційною активністю, яка обумовлена додатковим експонуванням центру полімеризації d2 за рахунок розщеплення зв'язку Luв₃₉₃-Thг₃₉₄ у С-кінцевій ділянці β-ланцюга.

2. Розщеплення зв'язку βLuв₃₉₃-Thг₃₉₄ у D-фрагмента та D-димеру не змінює механізму антиполімеризаційної дії інгібіторів, що вказує на те, що центр полімеризації d2 не зумовлює різницю механізмів гальмування полімеризації фібрину D-димером та D-фрагментом.

3. Експериментально показана участь С-кінцевої ділянки β-ланцюга в роботі центру полімеризації d2.

4. D-димер є більш ефективним інгібітором стадії латеральної асоціації, на відміну від D-фрагмента, який ефективно гальмує як лаг-фазу полімеризації фібрину, так і латеральну асоціацію протофібрил та фібрил.

5. Для D-димеру знайдено новий температурний перехід у зоні 60-70°C, відсутній у D-фрагмента, який можна віднести до денатурації нової структури, що утворюється при взаємодії двох D-доменів, і яка, можливо, зумовлює різницю механізмів антиполімеризаційної дії D-димеру та D-фрагмента.

6. Скрінінг-тест "анцистроновий час" може використовуватися для визначення продуктів деградації стабілізованого фібрину в плазмі крові.

СПИСОК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ
ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Платонова Т.Н., Лукинова Н.И., Медведь Л.В. Выделение и анализ активированных форм димерного D-фрагмента молекулы фибрина // ДАН Украины. - 1993. - сер.Б, №6. - С.134-138.
2. Платонова Т.М., Сушко О.О., Лукинова Н.И., Соловьев Д.О. Спосіб експрес-тестування стану системи гемокоагуляції за допомогою тесту "анцистронівий час" // Фізіол. журн. - 1994. - №3. - С.21-25.
3. Лукинова Н.И., Платонова Т.Н., Жесткова И.В., Петров А.В., Сушко Е.А. Комплексная лабораторная диагностика синдрома внутрисосудистого свертывания крови при поздних гестозах // Укр.биохим. журн. - 1995. - Т.67, №4. - С. 99-103.
4. Токар А.В., Макогоненко Є.М., Платонова Т.М., Сушко О.О., Лукинова Н.И. та ін. Сучасні методи лабораторної діагностики внутрішньосудинного мікрозідання крові // Методичні рекомендації МОЗ України. - 1994. - 22 с.
5. Платонова Т.Н., Лукинова Н.И., Сушко Е.А., Соловьев Д.А., Угарова Т.П. Спосіб експрес-тестування стану системи гемокоагуляції путем определения времени свертывания плазмы // Приоритетная справка №93020162. - 1994. - Заявка на явочный патент №В3В07530 от 25.04.1995.
6. Litvinovich S., Platonova T., Lukinova N., Henschen A., Medved' L. Preparation and characterization of the fibrinogen DD-fragment with increased ant clotting activity // Blood Coagulation and Fibrinolysis. - 1993. - N4. - P.832-833.
7. Сушко Е.А., Платонова Т.Н., Лукинова Н.И., Белая И.И. Маркеры старения системы свертывания крови // Тезисы докл., Симпозиум "Биологические механизмы старения". - Харьков. - 1994. - С.144.
8. Lukinova N., Sushko N., Platonova T. Investigation of Plasma Fibrinogen Level by Ancystron-H // Blood Coagul. Fibrinolysis. - 1994. - Vol.5, suppl.2 (Materials of 2nd International Symposium on Fibrinogen and Cardiovascular Disease). - P.23.
9. Platonova T., Loukinova N. Inhibitory Effect of D and DD Fragments on Fibrin Polymerization // Укр.биохим. журн. - 1996. - №4. С.17-18.
10. Yakubenko V., Loukinova N., Platonova T. C-terminal Effect of B β -chain of Fibrinogen on Fibrin Polymerization // Укр.биохим. журн. - 1996. - №4. - С.18-19.

Лукинова Н.И. Особенности структуры продуктов деградации стабилизированного фибрина, содержащих D-домен, и их влияние на полимеризацию 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, 1996.

Представленная работа содержит результаты исследования структуры и антиполимеризационных свойств димерного фрагмента D из стабилизированного фибрина быка. Показано, что коровий D-димер может гидролизироваться плазмином до более низкомолекулярных форм с повышенной антиполимеризационной активностью в результате увеличения доступности центра полимеризации d2 за счет расщепления пептидной связи Lys₃₉₃-Thr₃₉₄ в C-концевой области β-цепи. При этом расщепление данной связи не приводит к изменению механизма тормозящего действия фрагментов. Для D-димера обнаружен новый температурный переход в зоне 60-70°C, отсутствующий у D-фрагмента, что, возможно, указывает на появление новой структуры при взаимодействии двух D-доменов соседних молекул фибрина. Установлено, что скрининг-тест "анцистронное время" может использоваться для выявления продуктов деградации фибрина в плазме человека.

Loukinoва N.I. Structure of D-domain containing degradation products of cross-linked fibrin and their effect on fibrin polymerization.

The Dissertation Thesis for Obtaining a Scientific Degree of Philosophy Doctor (Biology) in the Speciality 03.00.04 - Biochemistry. A.V.Palladin Institute of Biochemistry of National Ukrainian Academy of Sciences, Kiev, 1996.

This work contains study results on structure and ant clotting properties of D-dymer from cross-linked fibrin. It was shown that bovine D-dymer can be hydrolyzed to lower-weight forms with higher ant clotting activity which is a result of additional activation of d2 polymerization site because of internal cleavage of peptide bond Lys₃₉₃-Thr₃₉₄ in C-terminal part of β-chain. Moreover this cleavage doesn't change the mechanism of ant clotting effect. New thermodynamic transition in 60-70°C zone was found for D-dymer. It is absent on melting curves of D-fragment so it could be be the result of new structure appears after D-D interaction. Besides it was shown that diagnostic kit "Ancystron time" can be used for FDP determination in blood plasma.

Ключові слова: фібриноген, фібрин, центри полімеризації, D-димер, D-фрагмент

Handwritten signature

Підп. до друку 25.07.99.

Формат 80x84/16. Понітр. офс. Друж. офс.

Ум. друк. арк. 0,9 Обл. - вид. арк. 1,0, Тираж 100 прим.

№ 117

Поліграфічна дільниця Інституту економіки НАН України,
252011, Київ-11, вул. Паласа Марного, 26.

438895

AB 35.466