

УДК 612.115 1:547 96

©Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ ДВУХВАЛЕНТНЫХ КАТИОНОВ НА ОБРАЗОВАНИЕ И ЛИЗИС ФИБРИНОВОГО СГУСТКА

Т. Ф. Субботина, Л. В. Галебская, И.Г.Щербак

Санкт-Петербургский государственный медицинский институт им. акад. И.П.Павлова
197022, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, 6/8
тел. (812)238-70-10, факс: (812)234-01-25

Изучали влияние двухвалентных катионов (ДК) Co^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} и Ni^{2+} на тромбин-индуцированное формирование фибринового сгустка в разведенной плазме крови и лизис сгустка, обусловленный активацией плазменного плазминогена стрептокиназой. Пулированную цитратную плазму здоровых доноров, разведенную изотоническим буфером, не содержащим Ca^{2+} , инкубировали с различными (0,01 мМ - 1,0 мМ) концентрациями сульфатов ДК. После добавления стрептокиназы и тромбина регистрировали изменения оптической плотности при 340 нм. В присутствии всех изученных ДК, за исключением Fe^{2+} , были выявлены дозозависимые изменения ряда параметров турбидиметрической кривой: (1) сокращение индукционного периода, что может свидетельствовать об активации тромбина, об уменьшении антитромбиновой активности плазмы, либо об активации процесса самосборки фибрина; (2) возрастание максимальной скорости фибринообразования и оптической плотности пика; (3) укорочение времени лизиса сгустка и возрастание максимальной скорости лизиса в присутствии низких концентраций Cd^{2+} , Zn^{2+} и Ni^{2+} , но замедление фибринолиза в присутствии больших концентраций ДК. Таким образом, ионы Co^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} и Ni^{2+} , но не Fe^{2+} , влияют на динамику формирования и оптические свойства тромбин-индуцированного фибринового сгустка.

Ключевые слова: двухвалентные катионы, фибриноген, фибринолиз, турбидиметрический метод, свертывание крови

ВВЕДЕНИЕ. Значительное количество работ посвящено изучению роли ионов кальция в заключительном этапе гемостаза, т. е. непосредственно в процессе полимеризации фибрина и образования фибринового сгустка [1 - 3]. Показано, что ионы Ca^{2+} связываются с молекулой фибриногена в С-концевой области γ -цепи, в непосредственной близости от центра полимеризации и оказывают влияние на размер и толщину фибриновых волокон, на структуру формирующегося геля, его механические и оптические свойства. В связи с этим представляет интерес изучение влияния на процесс фибринообразования и других двухвалентных катионов (ДК). Известно немного работ [1, 2, 4, 5], авторы которых изучали воздействие ионов Zn^{2+} и Mg^{2+} на тромбин-индуцированное фибринообразование. Показано, что в присутствии микромолярных концентраций ионов Zn^{2+} происходит существенная модификация свойств фибринового сгустка: он формируется из более толстых, но слабо сшитых между собой волокон. Это приводит к увеличению его оптической плотности, но снижению механической прочности. Целью данной работы являлось изучение эффектов более широкого спектра ДК. Поскольку опубликованные ранее исследования проводились в модельной системе "фибриноген - тромбин", представляло интерес изучение эффектов ДК в разведенной плазме крови. Это дает возможность оценить многочисленные

компоненты системы гемостаза в их взаимодействии, т.е. в условиях, максимально приближенных к физиологическим

МЕТОДИКА В качестве источника фибриногена использовали пул бедной тромбоцитами цитратной плазмы здоровых доноров. Плазму диализовали против физиологического раствора для минимизации содержания в ней кальция. В работе также использовали коммерческий препарат очищенного фибриногена человека ("Технология - Стандарт", Россия), который растворяли до концентрации 3 мг/мл. Для активации свертывания применяли тромбин человека ("Ренам", Россия), а для активации фибринолиза - коммерческий препарат стрептокиназы Awelysin. Тромбин растворяли в физиологическом растворе до активности 12 - 13 с по тромбиновому тесту (около 2 мг/мл) и диализовали для удаления кальция, который содержится в коммерческих препаратах тромбина. Рабочий раствор стрептокиназы содержал 2000 МЕ/мл. В опытах использовали сульфаты ДК (Co^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} и Ni^{2+}) и хлорид Ca^{2+} квалификации "чда". Регистрацию образования и последующего лизиса сгустка фибрина осуществляли турбидиметрическим методом: по изменению светопоглощения инкубационной среды с помощью фотозлектроколориметра МКМФ-02М со светофильтром 340 нм в кювете толщиной 1 см, термостатируемой при 37° С. Процесс регистрировали графически с использованием самописца ЛКД-4-003.

За основу была взята методика, опубликованная нами ранее [6]. Стандартная процедура исследования состояла в следующем. В кювету с толщиной оптического слоя 1 см вносили 1,69 мл 0,02 М вероналового буфера, содержащего 0,13 М NaCl, pH 7,4, 0,1 мл плазмы крови, а также 0,1 мл раствора одного из ДК, концентрация которого в инкубационной среде составляла 0,01 - 1,0 мМ, либо раствор хлорида Ca^{2+} (конечная концентрация 0,5 - 20 мМ). После прединкубации (37° С, 3 мин) вносили 0,01 мл рабочего раствора стрептокиназы и через 1 мин после этого - 0,1 мл рабочего раствора тромбина регистрируя после перемешивания динамику изменений светопоглощения. Восходящая часть кривой соответствовала образованию фибринового сгустка, нисходящая - его лизису. По турбидиметрической кривой рассчитывали следующие показатели: (1) длительность скрытого, или индукционного периода, когда не происходит изменений мутности среды; (2) период нарастания оптической плотности, связанный с латеральной агрегацией протофибрилл, оценивали двумя величинами: максимальной скоростью свертывания (она пропорциональна тангенсу угла наклона касательной в точке наибольшей крутизны) и его длительностью; (3) максимальная оптическая плотность сгустка; (4) время сохранения максимума светопоглощения; (5) по нисходящей части кривой оценивали показатели фибринолиза - его максимальную скорость и длительность. Значение всех перечисленных показателей подробно обсуждалось ранее [6].

Исследование образования сгустка в модельной системе проводили сходным образом. В этом случае в инкубационную смесь вносили вместо плазмы 0,1 мл раствора фибриногена, а стрептокиназу не добавляли. Регистрировали только восходящую часть кривой, по которой оценивали максимальную скорость процесса. Индукционный период практически отсутствовал из-за высокой активности тромбина, а максимальную оптическую плотность оценить невозможно, поскольку медленное нарастание светопоглощения продолжается в течение очень длительного времени.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. В предварительных опытах было установлено, что изучаемые нами ДК, за исключением Ca^{2+} , сами по себе неспособны вызвать коагуляцию цитратной плазмы; давно известный феномен рекальцификации, по-видимому, присущ лишь ионам Ca^{2+} . При индуцировании фибринообразования тромбином в модельной системе было установлено, что в отсутствие ДК фибриновый сгусток образуется достаточно медленно. Преинкубация фибриногена с различными концентрациями ДК приводит к быстрому нарастанию оптической плотности после добавления тромбина.

Исключение составляют только ионы Fe^{2+} , которые не оказывают влияния на образование сгустка. Ионы же Zn^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} и, в меньшей степени, Ni^{2+} эффективны в значительно меньших концентрациях, чем ионы Ca^{2+} (рис. 1). Следует отметить, что при концентрациях ДК в инкубационной среде 0,025 мМ для Zn^{2+} , 0,5 мМ для Co^{2+} и Ni^{2+} и выше формируются мягкие сгустки, тогда как при любых, даже самых высоких из исследованных концентраций Ca^{2+} механическая прочность сгустков не претерпевает видимых изменений. Эти данные согласуются с данными других исследователей о том, что, в частности, ионы Zn^{2+} обладают более высоким сродством к фибриногену, не вытесняются кальцием и, следовательно, имеют различные с кальцием места связывания [7].

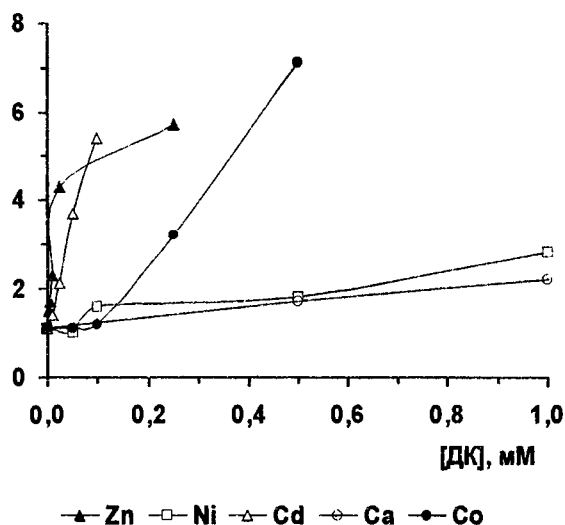


Рисунок 1.

Влияние ДК на скорость свертывания фибриногена.

Вид турбидиметрических кривых, полученных при прединкубации цитратной плазмы с различными концентрациями ионов Ca^{2+} , представлен на рисунке 2. Наблюдаются дозозависимые изменения следующих показателей: уменьшаются индукционный период и время лизиса, возрастают максимальные значения оптической плотности, скорости свертывания и лизиса. Время свертывания незначительно увеличивается. Время сохранения максимума оптической плотности существенно не меняется, отмечается тенденция к его уменьшению, т.е. при высоких концентрациях Ca^{2+} пик становится более острым. Характерно, что изменения всех показателей стремятся к какому-то предельному значению, и кривые, соответствующие 10 и 20 мМ концентрации Ca^{2+} в инкубационной среде, почти не отличаются между собой.

Эффекты ионов Zn^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} и Ni^{2+} на тромбин-индуцированное фибринообразование в цитратной плазме и лизис сгустка отмечаются при их концентрациях на 1-2 порядка меньших, чем концентрации Ca^{2+} . Они сходны между собой, но существенно отличаются от эффектов Ca^{2+} . На рисунке 3 представлены турбидиметрические кривые, полученные в опытах с различными концентрациями ионов Zn^{2+} . Наблюдается резкое укорочение индукционного периода, возрастание как времени, так и скорости свертывания, более чем 8-кратное увеличение максимума оптической плотности. Существенным отличием от эффектов Ca^{2+} является увеличение времени сохранения максимума оптической плотности и замедление фибринолиза при высоких концентрациях Zn^{2+} . С увеличением концентрации ДК все описанные выше изменения нарастают более резко, что не характерно для действия ионов Ca^{2+} . Зависимость одного из показателей от концентрации ДК представлена на рисунке 4. Наименьшие

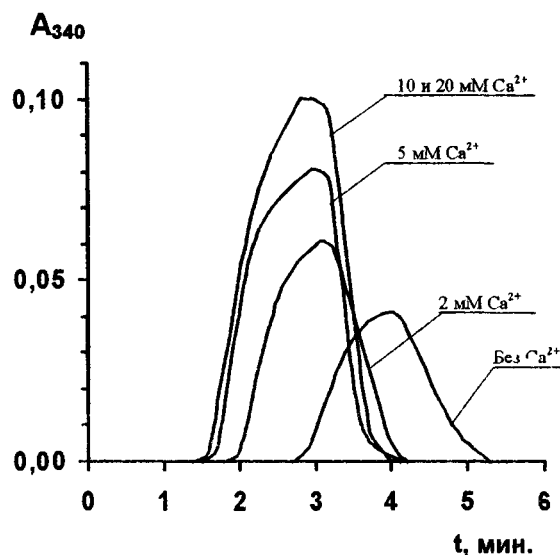


Рисунок 2

Турбидиметрические кривые при различных концентрациях ионов Ca^{2+}

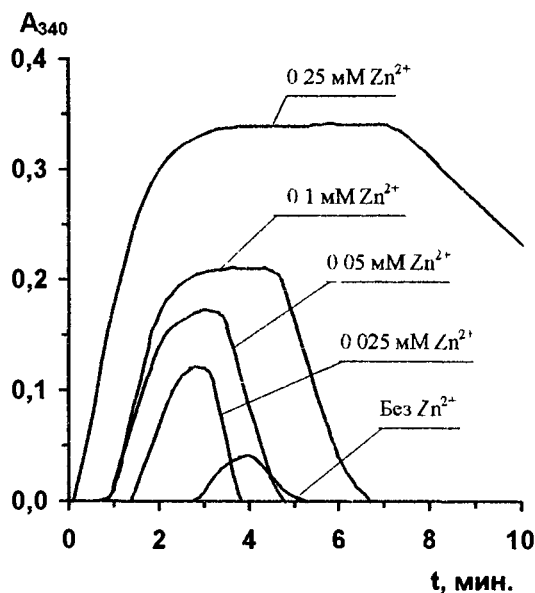


Рисунок 3

Турбидиметрические кривые при различных концентрациях ионов Zn^{2+}

эффективные концентрации ДК в инкубационной среде составляют 0,01 мМ для Zn^{2+} и Ni^{2+} , 0,025 мМ для Cd^{2+} и 0,1 мМ для Co^{2+} . При наибольших из исследованных концентраций ДК отмечалось уменьшение механической прочности плазматических сгустков, подобно тому, как это наблюдалось в опытах с очищенным фибриногеном.

Воздействие ДК на показатели свертывания - восходящую часть кривой - объясняется, по-видимому, активацией процесса самосборки протофибрилл (латеральной агрегации). Маловероятна непосредственная активация тромбина, поскольку не отмечается тенденции к насыщаемости эффекта. Кроме того, в опытах с очищенными препаратами фибриногена и тромбина было показано, что ни один из ДК не увеличивает скорость освобождения фибринопептидов [8]. Укорочение индукционного периода при свертывании плазмы крови может

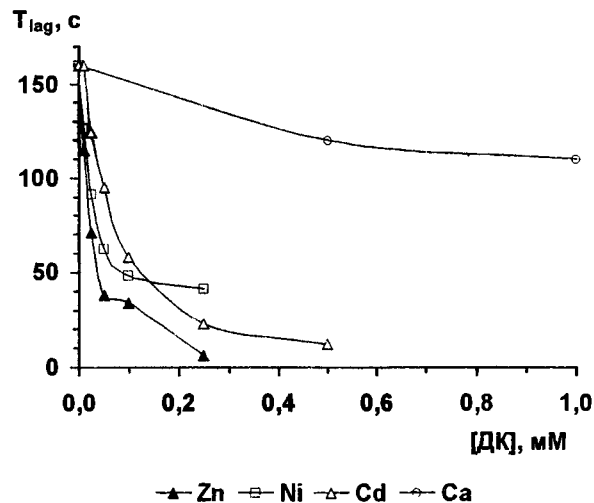


Рисунок 4

Зависимость длительности индукционного периода от концентрации ДК

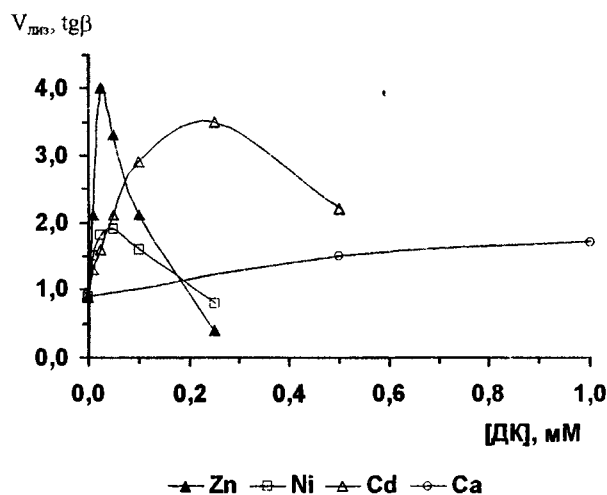


Рис 5

Зависимость максимальной скорости лизиса от концентрации ДК

объясняться также снижением ингибирующей активности антитромбина III в отношении тромбина. Данный эффект показан для ионов Zn^{2+} [4]. Увеличение максимальной оптической плотности сгустка возникает при формировании фибрина с аномальной структурой.

Влияние ДК на фибринолиз неоднозначно. Низкие концентрации Zn^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} и Ni^{2+} активируют его, а высокие - тормозят практически полностью. На рисунке 5 представлена зависимость максимальной скорости лизиса от концентраций всех исследованных ДК. Изменения двух других показателей - времени лизиса и времени сохранения максимума оптической плотности - реципрокны данному графику. Скорее всего, торможение фибринолиза связано с тем, что аномальный фибриновый сгусток плохо поддается протеолиту комплексом стрептокиназа-плазминоген, либо хуже его сорбирует. В присутствии же низких концентраций ДК возможно образование сгустка, структура которого близка к нормальной, и в таком случае фибринолиз протекает обычным образом.

В заключение следует отметить, что поскольку наименьшая исследованная нами эффективная концентрация Zn^{2+} в пересчете на количество плазмы, введенное в опыт, сопоставимо с нормальной концентрацией этого иона в крови

здорового человека (по данным [9] равна $(17,1 \pm 1,8)$ мкмоль/л) изучаемая нами проблема может иметь не только теоретическое, но и практическое значение.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Fatah K., Hessel B.* (1998) Blood Coagul. Fibrinolysis, **9**, 629 - 635.
2. *Marx G.* (1988) Thromb. Haemost., **59**, 500 - 503.
3. *Varadi A., Scheraga H.A.* (1986) Biochemistry, **25**, 519 - 528.
4. *Marx G., Eldor A.* (1985) Am. J. Hematol., **19**, 151 - 159.
5. *Carr M.E., Powers P.L.* (1991) Blood Coagul. Fibrinolysis, **2**, 741 - 747.
6. *Щербак И.Г., Субботина Т.Ф., Фаенкова В.П., Рюмина Е.В.* (2001) Вопросы мед. химии, N1, 80 - 90.
7. *Marx G.* (1988) Arch. Biochem. Biophys., **266**, 285 - 288.
8. *Kanaide H., Uranishi T., Nakamura M.* (1982) Am. J. Hematol., **13**, 229 - 237.
9. *Туз Н.У.* (ред) (1986) Клиническая оценка лабораторных тестов. М.: Медицина, 393.

Поступила 18.05.2002

THE EFFECTS OF DIVALENT CATIONS ON THE FIBRIN CLOT FORMATION AND ITS LYSIS

T.F.Subbotina, L.V. Galebskaya, I.G.Shcherbak

Saint-Petersburg Pavlov Medical University, 6/8 Lev Tolstoy Street
Saint-Petersburg, 197022 Russia

Hemocoagulation is a Ca^{2+} -dependent process, and we suppose that other bivalent cations (BC) can also influence this system. The effects of some BC (Ca^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} and Ni^{2+}) on thrombin-induced plasma clotting and clot lysis caused by streptokinase have been studied. All BC studied, except Fe^{2+} , maintained the formation of fibrin clot followed by its lysis. In the presence of BC the coagulation part of the turbidimetry curve changed in a dose-dependent manner and was characterized by: (1) the decrease of the induction period which seems to be due to thrombin activation or accelerating fibrin self-association; (2) the elevation of the maximal optical density of the fibrin clot and the velocity of its achievement. The fibrinolytic part of the curve was characterized by the optical density downfall acceleration at low Co^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} and Ni^{2+} concentrations but marked delay of the process at BC higher concentrations. So, ions of Co^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} and Ni^{2+} but not Fe^{2+} significantly influence the dynamics of thrombin-induced clot formation and optical clot characteristics. At different ion concentrations BC may activate or inhibit fibrinolysis.

Key words: bivalent cations, fibrinogen, fibrinolysis, turbidimetric assay, blood clotting