

УДК 612.115.1

©Коллектив авторов

ТУРБИДИМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОЛИМЕРИЗАЦИИ ФИБРИНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ

И.Г.ЩЕРБАК, Т.Ф.СУББОТИНА, В.П.ФАЕНКОВА, Е.В.РЮМИНА

Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад.
И.П.Павлова. 197022, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, 6/8
Телефон 238-70-10, Факс 234-01-25

Турбидиметрический метод регистрации формирования фибринового сгустка под действием экзогенного тромбина позволяет количественно оценить два этапа этого процесса: образования протофибрилл и их латеральной агрегации. Начальная фаза оценивается временем, в течение которого не происходит изменений оптических свойств инкубационной среды. Вторая фаза наступает по достижении достаточного уровня протофибрилл и сопровождается нарастанием оптической плотности среды.

Использовали пул цитратной плазмы здоровых доноров. Процесс гемокоагуляции инициировали добавлением бычьего тромбина в присутствии ионов Ca^{2+} . Изучены изменения турбидиметрических параметров этой системы под воздействием гепарина, экстракта *Laminaria digitata* и препарата коллагеназы из *Cl. histolyticum*. Экстракт ламинарии содержит сильный антикоагулянт, действующий подобно гепарину. Противосвертывающий эффект развивается вне зависимости от времени прединкубации с плазмой. Оба агента замедляли процесс образования и накопления протофибрилл, т.е. проявляли себя как ингибиторы тромбина. Однако кинетические характеристики выявленного эффекта различались: время накопления критической массы протофибрилл росло пропорционально количеству экстракта ламинарии, а в опытах с гепарином этот прирост был гораздо значительнее степени увеличения концентрации антикоагулянта.

Преинкубация плазмы крови с коллагеназой приводит к изменению только второй фазы турбидиметрической кривой – снижается скорость латеральной агрегации. Степень снижения находилась в линейной зависимости от концентрации коллагеназы. Это означает, что фибриноген является субстратом коллагеназы, однако его расщепление происходит вне области, атакуемой тромбином, поскольку темп накопления протофибрилл оставался неизменным.

Полученные результаты свидетельствуют о новых возможностях, которые открывает турбидиметрический метод в изучении механизмов действия эффекторов на гемокоагуляцию в условиях, близких к физиологическим.

Ключевые слова: фибриноген, турбидиметрический метод, свертывание крови, антикоагулянты.

ВВЕДЕНИЕ. В современных клинических и научных исследованиях турбидиметрические методы изучения компонентов системы гемостаза находят все более широкое применение [1 – 3]. Эти методы регистрируют изменения оптических свойств инкубационной среды при образовании фибринового сгустка и его лизисе. В качестве источника фибрина может использоваться как фибриноген в составе плазмы крови, так и очищенные препараты этого белка. Исследование процессов коагуляции и фибринолиза в цельной плазме представляет большой интерес для клинической практики, поскольку дает возможность оценить многочисленные компоненты системы гемостаза в их взаимодействии, т.е. в условиях, максимально приближенных к физиологическим. С другой стороны, с помощью турбидиметрического метода возможен кинетический анализ процессов превращения фибриногена в фибрин и лизиса фибрина, что может использоваться в научных исследованиях. Целью настоящей работы являлось изучение воздействия ряда факторов, влияющих на процесс образования фибринового сгустка, с помощью турбидиметрического метода.

МЕТОДИКА. В качестве источника фибриногена использовали пул бестромбоцитарной цитратной плазмы здоровых доноров. Для активации свертывания применяли бычий тромбин Каунасского завода бактериальных препаратов, а для активации фибринолиза - коммерческий препарат стрептокиназы Awelysin. В приготовлении и использовании реактивов руководствовались рекомендациями [3]. Тромбин растворяли в физиологическом растворе до активности 13 – 15 с по тромбиновому тесту (около 2 мг/мл). Рабочий раствор стрептокиназы содержал 2000 МЕ/мл. В опытах использовали также коммерческий препарат коллагеназы из *Cl. histolyticum* (Serva) активностью 150 ед./мг, коммерческий гепарин (Biochemie), а также водный экстракт из высушенных и измельченных водорослей *Laminaria digitata*, который получали следующим образом: навеску порошка водоросли (5 г) заливали 10 мл кипящего физиологического раствора, кипятили на водяной бане 5 минут, после чего центрифугировали и использовали прозрачную надосадочную жидкость светло-коричневого цвета.

Регистрацию светопоглощения инкубационной среды проводили с помощью фотоэлектрокалориметра МКМФ-02М со светофильтром 340 нм в кювете толщиной 1 см, термостатируемой при 37° С. Графическую регистрацию процесса осуществляли с использованием самописца ЛКД-4-003.

Стандартная процедура исследования состояла в следующем. В кювету с толщиной оптического слоя 1 см вносили 1,79 мл 0,02 М вероналового буфера, содержащего 0,13 М NaCl и 1 мМ CaCl₂; 0,1 мл плазмы крови, 0,01 мл рабочего раствора стрептокиназы и 0,1 мл рабочего раствора тромбина, быстро перемешивали и регистрировали динамику изменений светопоглощения во времени. Пример кривой светопоглощения представлен на рис. 1.

Восходящая часть кривой соответствует образованию фибринового сгустка; нисходящая – его лизису. Как видно из рис.1, в процессе образования сгустка можно выделить 2 фазы: 1) Скрытый период, когда не происходит изменений мутности среды. Он оценивается временем T_{lag} . Эта величина характеризует время образования растворимого фибрин-полимера и двунитчатых протофибрилл [1,4]. В этот период среда остается жидкой.

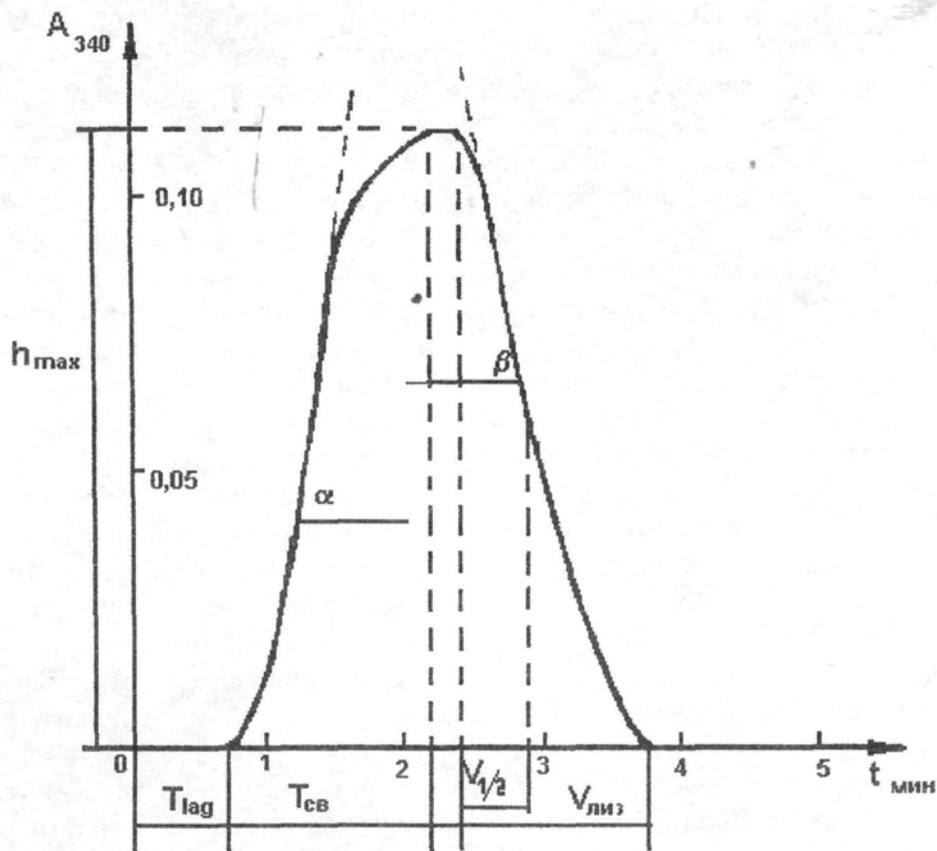


Рисунок 1.

Кривая свертывания и фибринолиза. $\text{tg } \alpha$ - максимальная скорость свертывания ($V_{\text{св}}$)
 $\text{tg } \beta$ - максимальная скорость фибринолиза ($V_{\text{лиз}}$), pH вероналового буфера 7,4.

2) Период нарастания оптической плотности, что связано с латеральной агрегацией протофибрилл и появлением твердой фазы. Очевидно, латеральная агрегация начинается тогда, когда концентрация протофибрилл достигнет определенного уровня. Период возрастания оптической плотности характеризуется величинами $V_{\text{св}}$ - максимальной скоростью процесса и $T_{\text{св}}$ - его длительностью.

Параметр h_{max} прямо пропорционален концентрации фибриногена в плазме. Величина h_{max} не уменьшается в присутствии использованных нами количеств стрептокиназы и не изменяется с увеличением используемого количества тромбина. Значение максимума кривой четко коррелировало с результатами параллельного определения фибриногена по Рутберг ($r=0,893$).

Показатели фибринолиза - $V_{\text{лиз}}$, $T_{1/2}$, $T_{\text{лиз}}$ - зависят от количества активного плазмина, образующегося из плазминогена под действием стрептокиназы. Используемые нами количества стрептокиназы позволяют активировать весь имеющийся плазминоген. Таким образом, метод дает представление о концентрации плазминогена в плазме, хотя на показатели, безусловно, влияет и концентрация ингибиторов плазмينا. Величина скоростных

параметров ($V_{св}$ и $V_{лиз}$) коррелирует с количеством субстратов – соответственно фибриногена и фибрина.

В ряде случаев была целесообразна запись только процесса свертывания. Тогда стрептокиназу в инкубационную среду не добавляли, а кривая приобретала вид, показанный на рис. 2. По этой кривой оценивали два показателя: скрытый период T_{lag} и максимальную скорость свертывания, - точнее, латеральной агрегации протофибрилл ($V_{св}$), которая пропорциональна $tg\alpha$. Данный график не дает возможности оценки концентрации фибриногена, поскольку медленное нарастание светопоглощения продолжается в течение очень длительного времени (часы). Видимо, это связано со стабилизацией фибринового сгустка и другими физико-химическими процессами, не относящимися непосредственно к агрегации.

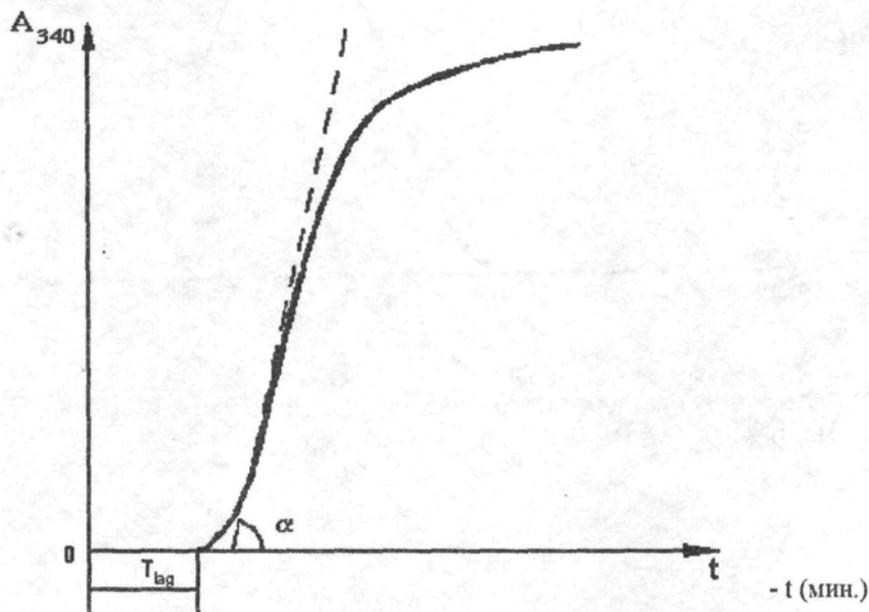


Рисунок 2.

Кривая свертывания. $tg\alpha$ - максимальная скорость свертывания.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. На рис. 3 представлены кривые турбидиметрической регистрации свертывания при добавлении различных количеств рабочего раствора тромбина. Оказалось, что по мере уменьшения количества тромбина изменяются обе характеристики – увеличивается T_{lag} и уменьшается тангенс угла наклона кривой, ($V_{св}$). Наиболее четкие и простые закономерности выявляются для T_{lag} : в исследованном нами диапазоне величина, обратная T_{lag} , линейно зависела от количества тромбина, добавленного в пробу, а полученная прямая проходит через начало координат. На рис.4 представлены результаты двух серий опытов с разными пулами плазмы. Наклон прямой, как нам представляется, зависит от суммарного уровня ингибиторов тромбина в данном образце плазмы и, возможно, от количества фибриногена. Зависимость же скорости латеральной агрегации протофибрилл от концентрации тромбина оказывается S-образной, что указывает на более сложный характер процесса, в том числе на участие в нем иных компонентов плазмы.

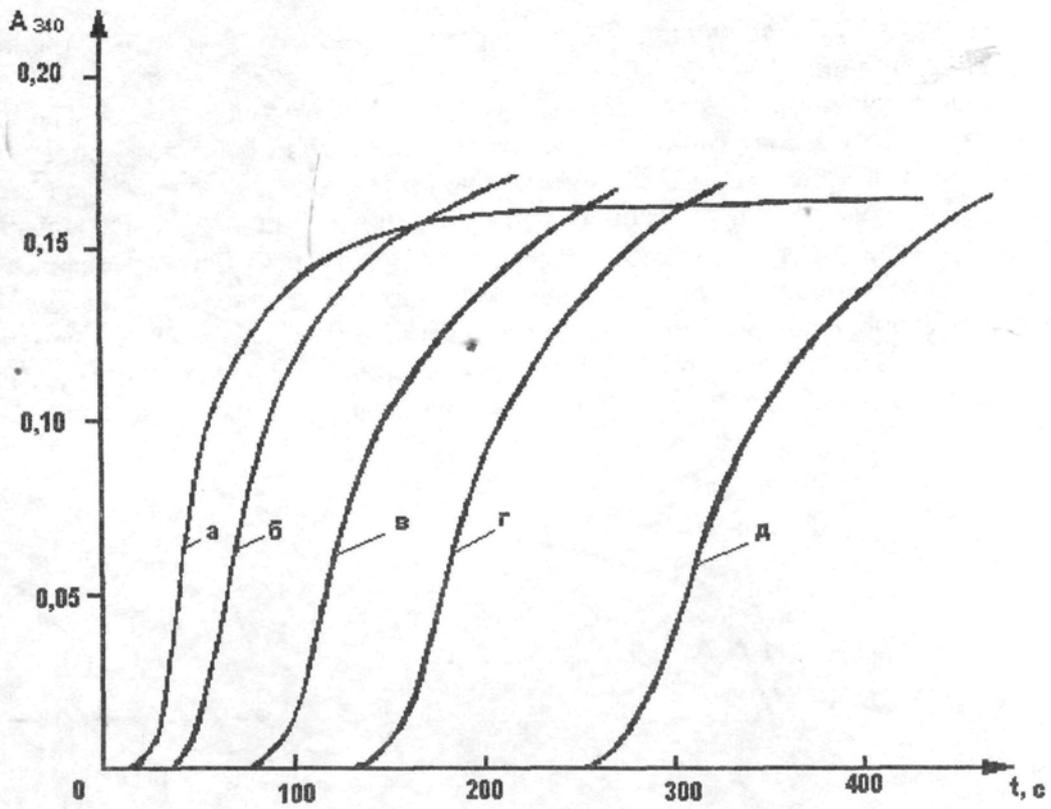


Рисунок 3.
Кривые свертывания при добавлении различных количеств тромбина:
А - 0,1 мл; Б - 0,05 мл; В - 0,025мл; Г - 0,0125 мл; Д - 0,00625 мл

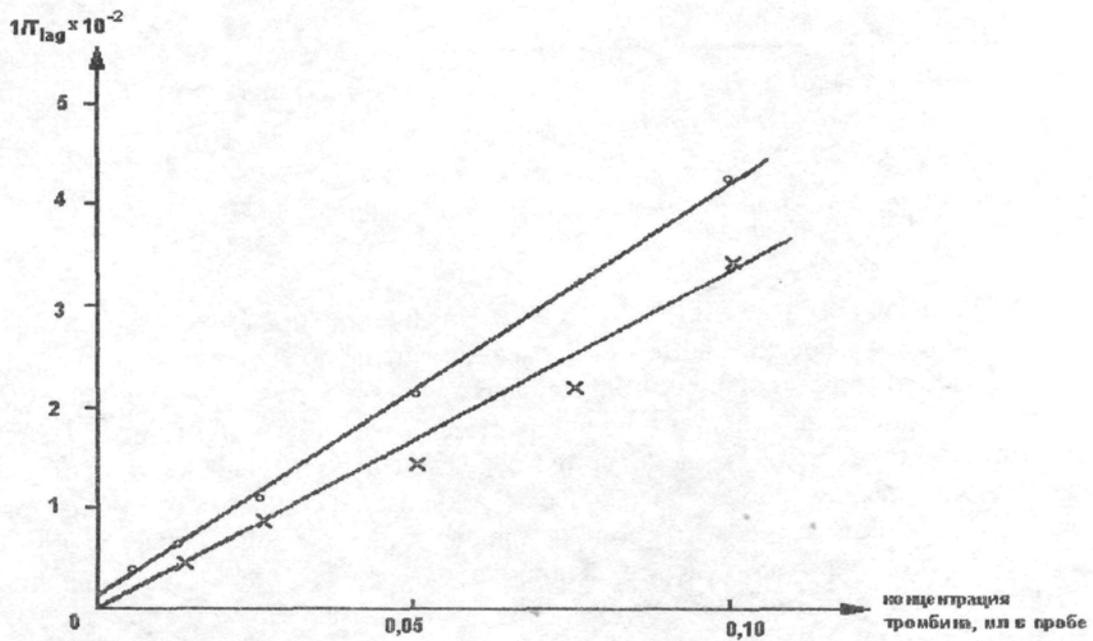


Рисунок 4.
Зависимость величин, обратных T_{lag} , от количества тромбина в пробе.

Основанием для сравнительного изучения действия гепарина и экстракта ламинарии на показатели турбидиметрической кривой послужили данные о наличии в этих водорослях антикоагулянтов с гепариноподобным действием – сульфатированных полисахаридов фукоиданов [5]. Нами установлено, что при внесении в инкубационную среду уже 2 мкл экстракта ламинарии (соответствует 1 мг сухого порошка) последующее добавление тромбина не приводит к образованию фибринового сгустка. Выявленный эффект, аналогично эффекту гепарина, развивался практически сразу, т.е. не зависел от времени прединкубации с плазмой крови. В последующих опытах в инкубационную смесь вносили 0,1 мл экстракта или гепарина в различных разведениях, инкубировали 1 минуту при 37° С и затем добавлением тромбина начинали реакцию. Турбидиметрические кривые, полученные при добавлении возрастающих количеств гепарина, представлены на рис. 5. Аналогичная серия кривых получена и в опытах с экстрактом водоросли. В обоих случаях отмечается отчетливое дозозависимое увеличение скрытого периода. Такой эффект вполне ожидаем для гепарина, который, активируя антитромбин III, уменьшает количество активного тромбина. Можно предположить, что действующее начало экстракта ламинарии тоже является ингибитором тромбина. Оба фактора нарушают также и процесс латеральной агрегации – уменьшается угол наклона кривых и снижается высота пика. Эти явления более выражены у гепарина. Иными словами, при одинаковом значении T_{lag} в присутствии гепарина отмечается меньшая величина скорости свертывания и меньшая высота пика, чем в присутствии экстракта.

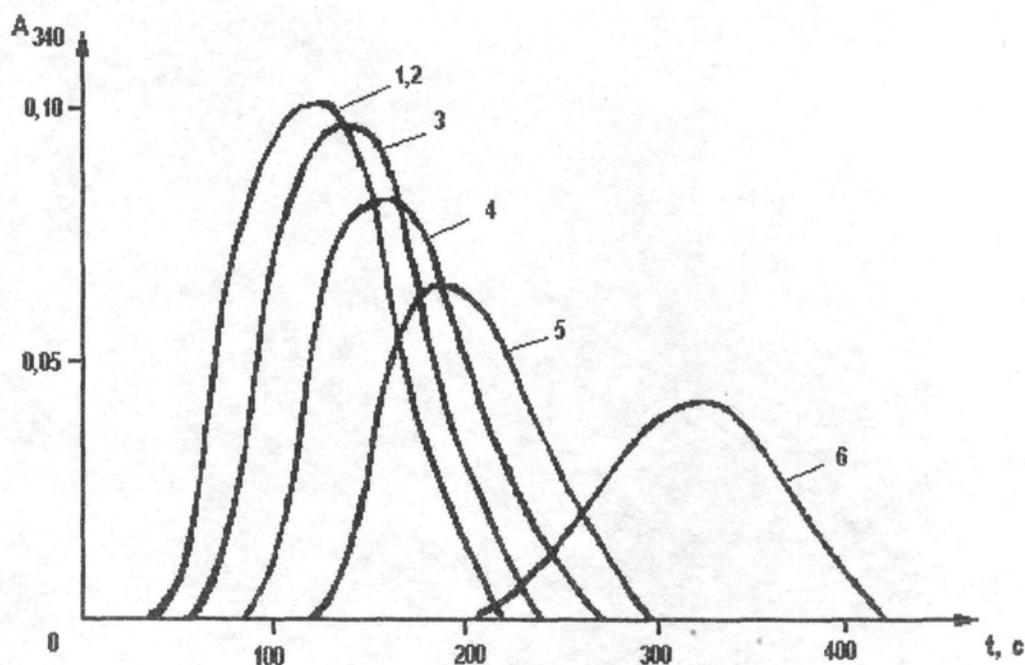


Рисунок 5.

Влияние гепарина на процессы образования и лизиса фибрина.

1 – контроль (без гепарина); 2 – 6 – гепарин в конечных концентрациях: 2 – 0,00125 ЕД/мл; 3 – 0,0025 ЕД/мл; 4 – 0,005 ЕД/мл; 5 – 0,0075 ЕД/мл; 6 – 0,01 ЕД/мл.

Наконец, для обоих агентов выявляются пороговые концентрации, ниже которых эффект не проявляется. Для гепарина порогом является конечная концентрация 0,0025 ЕД, а для экстракта - 0,0125 мкл в пробе.

Все изложенное свидетельствует, что антикоагулянт из экстракта ламинарии, как и гепарин, не является прямым ингибитором тромбина, а действует опосредованно, через какой-либо компонент плазмы, поскольку прединкубация тромбина с экстрактом не приводит к снижению его активности в отношении фибриногена.

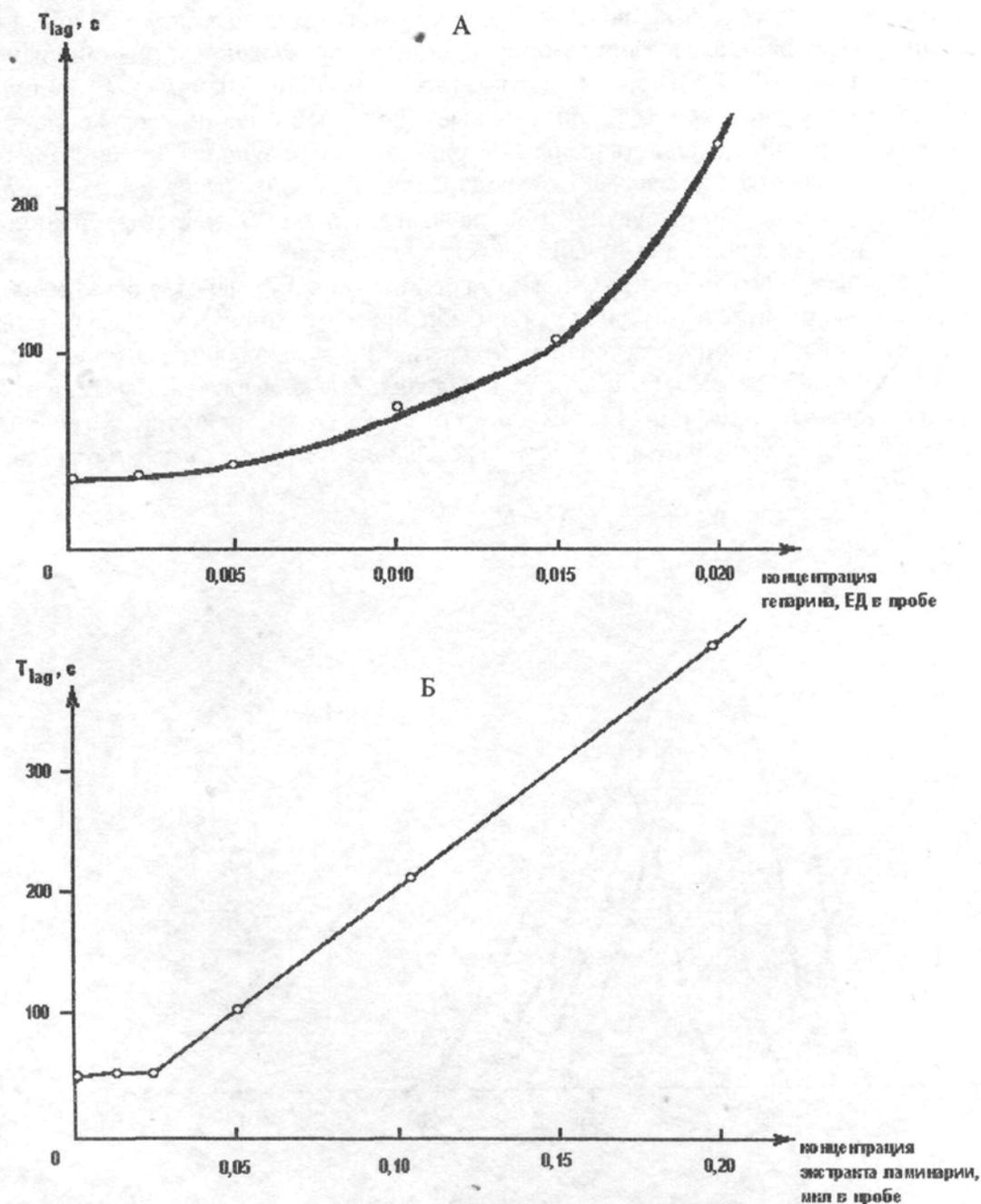


Рисунок 6.

Зависимость длительности скрытого периода от концентрации антикоагулянта.

А - гепарин; Б - экстракт ламинарии.

Несмотря на отмеченное сходство между гепарином и экстрактом ламинарии, механизмы их антикоагулянтного действия не идентичны. Наиболее демонстративно различия между ними обнаруживаются при изучении зависимости T_{lag} от концентрации эффекторов (рис. 6). Если в опытах с экстрактом время накопления протофибрилл прямо пропорционально концентрации действующего начала, то для гепарина аналогичная зависимость не линейна. Это позволяет заключить, что антикоагулянт из экстракта ламинарии либо оказывает свое влияние не через антитромбин III, либо взаимодействует с ним иначе. Исследованный нами антикоагулянт растительного происхождения обладает высокой термостойкостью (выдерживает 30-минутное кипячение) и стабильностью при хранении (после двух недель хранения при 4°C не отмечается достоверного снижения активности). Изучение его представляет определенный интерес, главным образом, по причине доступности этого растительного сырья.

В отличие от описанных эффектов антикоагулянтов полисахаридной природы, воздействие ферментного белка – коллагеназы – приводит к совсем другим изменениям турбидиметрической кривой. Как известно, этот металлофермент весьма избирательно расщепляет коллаген и ему подобные белки. Фибриноген не относится к коллагеноподобным белкам, однако его первичная структура имеет несколько участков, уязвимых для коллагеназы. Они расположены в средней части Aa цепи и в С-концевой области Bb цепи.

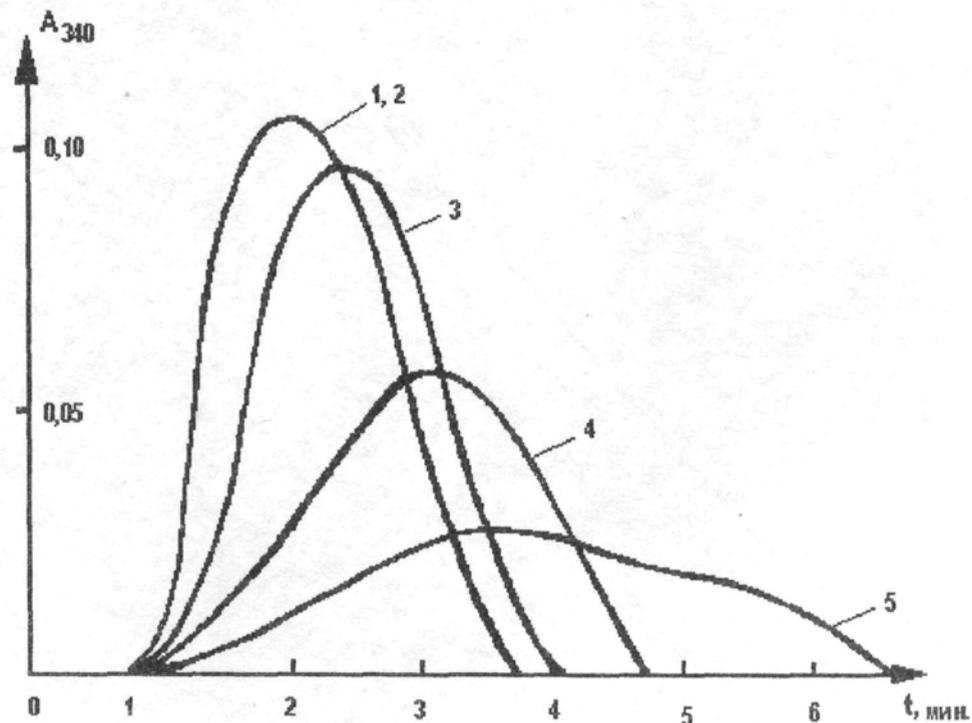


Рисунок 7.

Влияние преинкубации плазмы с коллагеназой на процессы свертывания и фибринолиза.
 1 – контроль; 2 – 5 – коллагеназа в конечных концентрациях: 2 – 0,1 мг/мл; 3 – 0,2 мг/мл;
 4 – 0,4 мг/мл; 5 – 0,8 мг/мл.

Как видно из рис. 7, преинкубация плазмы с различными количествами коллагеназы (37° С, 15 мин.) приводит к снижению высоты пика h_{\max} , что закономерно при протеолитическом расщеплении фибриногена. Степень этого снижения по сравнению с контролем ($d h_{\max}$) линейно зависит от концентрации коллагеназы в диапазоне 0,1 – 0,4 мг/мл (рис. 8). Прямая на рис. 8 экстраполируется не к началу координат, а к некоторой величине на оси абсцисс, что свидетельствует о присутствии ингибиторов коллагеназы в плазме крови и дает возможность их количественной оценки.

Установлено также, что протеолитическое расщепление фибриногена коллагеназой на 80–90% предотвращается предварительным добавлением к плазме 5мМ ЭДТА, что доказывает участие металлофермента в этом процессе. Изменения показателя T_{lag} незначительны; это свидетельствует о том, что коллагеназа не действует в той области фибриногена, которая атакуется тромбином. На рис. 7 видно также, что с увеличением концентрации коллагеназы снижается показатель $V_{\text{св}}$ и возрастает $T_{\text{св}}$, т.е. нарушен процесс латеральной агрегации протофибрилл. Эти данные позволяют предположить, что расщепление молекулы фибриногена под действием коллагеназы идет ступенчато: вначале образуются продукты ограниченного протеолиза, способные активироваться тромбином, но в какой-то степени утратившие готовность к латеральной агрегации. В дальнейшем образуются более мелкие фрагменты молекулы, неспособные к латеральной агрегации (снижение h_{\max}).

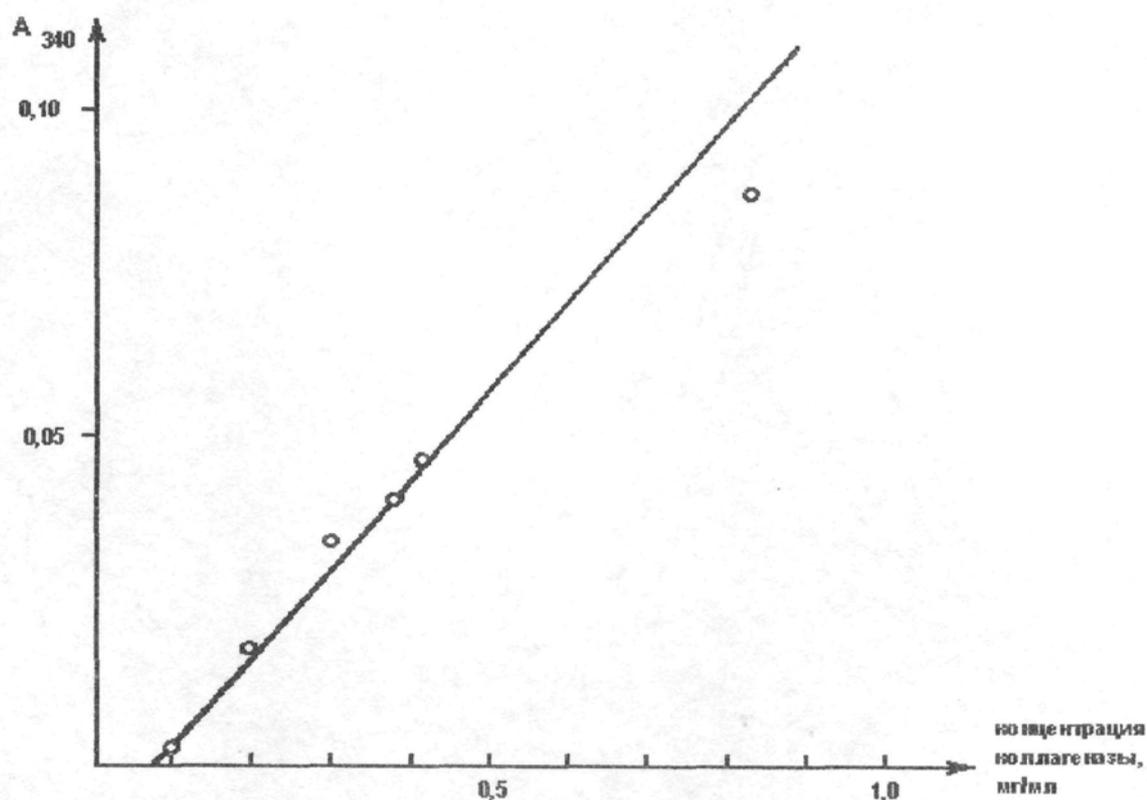


Рисунок 8.
Зависимость количества расщепленного фибриногена ($d h_{\max}$) от концентрации коллагеназы.

Обращает на себя внимание снижение активности фибринолиза при высоких концентрациях коллагеназы (рис. 7). Проведенные нами эксперименты пока не позволяют однозначно судить о причине этого снижения: возможно, образующийся фибрин имеет аномальное строение и хуже сорбирует плазминоген и плазмин. Возможно также ингибирование фибринолиза продуктами расщепления фибриногена коллагеназой. Во всяком случае, протеолитическое действие коллагеназы на белки гемостатической системы представляет интерес для дальнейших исследований, учитывая присутствие в крови эндогенных металлоферментов, сходных по свойствам с микробными коллагеназами.

Приведенные данные свидетельствуют об информативности турбидиметрического метода для оценки механизма действия самых различных факторов, влияющих на процессы фибринообразования и фибринолиза.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Sato H., Nakajima A.* (1984) *Thrombosis Research*, **33**, 645 – 651.
2. *Carlson R.H., Garnick R.L., Jones A.J.S.* (1988) *Anal. Biochem.*, **168**, 428 – 435.
3. *Лежен Т.И., Соколовская Л.И., Пруская В.В., Кудинов С.А.* (1993) *Укр. Биохим. Журнал*, **65** (2), 23 – 30.
4. *Луговской Э.В., Чудновец В.С., Макогоненко Е.М. и др.* (1995) *Укр. Биохим. Журнал*, **67** (1), 64 – 70.
5. *Гаврилова Е.А., Барбанова И.И., Усов А.И. и др.* (1997) *Эксп. и клин. фармакология*, **60** (1), 42 – 44.

Поступила 14.10.2000.

THE TURBIDIMETRICAL ANALYSIS OF FIBRIN POLYMERIZATION IN BLOOD PLASMA

I.G.SHCHERBAK, T.F.SUBBOTINA, V.P.FAENKOVA, E.V.RIUMINA

Pavlov Saint-Petersburg Medical University
197022, 6/8, L.Tolstoy st., St-Petersburg, Russia.
Fax: 234-01-25

The turbidimetical assay of thrombin-induced plasma coagulation provides a possibility to estimate both stages of fibrinogen- fibrin conversion. The initial one, which proceeds without any change of turbidity, reflects the process of protofibril formation, and the second stage of lateral aggregation, is characterized by the rise of turbidity. The influence of heparin, alga (*Laminaria digitata*) aqueous extracts, and collagenase on the indices of the turbidity-time curve has been studied.

It was established that the alga extracts possessed the powerful heparin-like anticoagulant activity. The both agents influenced the first stage of the turbidity-time curve, suppressing protofibril formation, which reflects the thrombin inhibition. Nevertheless, they differed in their mode of dose- dependence. While the time of protofibril formation was direct proportional to the alga extract concentration, it was rising more intensively with heparin dose elevation. Plasma pre incubation with alga extract or heparin did not influence their action.

Treatment with plasma collagenase changed only the second stage of the coagulation curve. It inhibited the process of protofibril lateral aggregation in the direct proportional manner. It must be due to fibrin digestion by the enzyme. We propose that fibrin cleavage by collagenase occurred out of the thrombin action sites, because the velocity of protofibril accumulation stayed unchanged.

Our data illustrate the usefulness of the turbidimetical analysis in the studies of the agents' action mechanisms on blood coagulation, in conditions close to physiological ones.

Key words: fibrinogen, turbidimetical method, blood coagulation, anticoagulants.