

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.112+577.152.3+534.29-7/-8

©Коллектив авторов

ЭКСТРАКЦИОННОЕ ДЕЙСТВИЕ УЛЬТРАЗВУКА ПРИ РАЗРУШЕНИИ ПЛАЗМЕННОГО СГУСТКА

Е.А. Чернявский¹, И.Э. Адзериho², В.М. Шкуматов^{1}*

¹Учреждение Белорусского государственного университета
“Научно-исследовательский институт физико-химических проблем”,
Минск, 220030 Беларусь, ул. Ленинградская 14; тел./факс: (375-17) 209-5461;
эл. почта: biopharm@bsu.by

²Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Беларусь

Сочетанием методов SDS-Na-ПААГ-электрофореза, гель-проникающей хроматографии и сканирующей электронной микроскопии проведен анализ продуктов разрушения плазменного сгустка низкочастотным ультразвуком (УЗ). Установлено, что УЗ (27 кГц) не приводил к активации плазминовой системы и разрушению ковалентных связей в молекулах фибрина. При интенсивностях УЗ менее 21,6 Вт/см² происходила экстракция белков сыворотки крови, находящихся в порах фибриновой сети. Увеличение интенсивности ультразвукового воздействия приводило к диссоциации протофибрил, что сопровождалось дальнейшим высвобождением в раствор белков сыворотки крови, находящихся внутри фибриновых волокон. Экстрагированные из плазменного сгустка белки в поле УЗ кавитации подвергались агрегации. Свободные протофибриллы взаимодействовали между собой, образуя нерастворимые частицы фибрина.

Ключевые слова: ультразвук, плазменный сгусток, фибрин, тромболизис.

ВВЕДЕНИЕ. Перспективным подходом для разрушения венозных и артериальных тромбов, позволяющим существенно снизить время достижения реперфузии и увеличить эффективность тромболитической терапии, является применение ультразвука (УЗ) [1]. Для разрушения сгустков используются ультразвуковые энергии, лежащие выше порога кавитации, в то время как для усиления ферментативного лизиса применяется УЗ с энергией ниже порога кавитации [2, 3]. В исследованиях на моделях плазменного и кровяного сгустка *in vitro*, на моделях тромбозов периферических и коронарных артерий животных, а также в начальных клинических исследованиях установлено, что локальное применение низкочастотного УЗ высокой интенсивности является безопасным и эффективным методом разрушения тромбов, не требующим дополнительного введения тромболитических препаратов [3-5]. Вместе с тем, уже на первых этапах клинической апробации была установлена возможность развития рестенозов и ретромбозов после успешно проведенной реканализации сосудов. Среди большого количества факторов, способных вызвать эти процессы можно отметить, в частности, формирование конгломератов частиц после разрушения тромбов с помощью УЗ, что может вести к развитию дистальной эмболии [6]. Кроме образования частиц в результате акусто-механического разрушения тромба, пусковыми механизмами развития ретромбозов могут быть

* - адресат для переписки

структурно-функциональные изменения различных белков системы гемостаза. Так, при УЗ-обработке мощностью выше 26 Вт/см² белковый активатор плазминогена стрептокиназа подвергается необратимой агрегации с разворачиванием молекулы и экспонированием новых пептидных связей, доступных для протеолитической атаки плазмином [7]. Ингибитор сериновых протеиназ антитромбин III под действием УЗ превращается в неактивные формы – латентную и полимерные агрегаты, а неактивированные факторы свертывания крови относящиеся к надсемейству α -химотрипсина, в составе PPSB-комплекса не изменяют своих структурно-функциональных параметров [8]. В тоже время, функциональная модель активации эквимольной смеси α -химотрипсиногена и трипсиногена позволила установить, что наиболее чувствительным белковым компонентом к воздействию УЗ является трипсин [9].

Цель настоящей работы заключалась в идентификации белково-пептидных продуктов, образующихся при разрушении плазменных сгустков под действием УЗ. Учитывая высокую специфичность протеолитического расщепления фибрина, по селективным продуктам этого процесса можно установить возможность активации эндогенного протеолиза, промотируемого действием УЗ. Установление соотношения биохимического и механического путей разрушения сгустков необходимо для проведения соответствующей фармакотерапии до и после разрушения тромбов и определения безопасных режимов УЗ обработки.

МЕТОДИКА. В работе использовали: трис-(гидроксиметил)-аминометан, акриламид, N,N'-метилден-бис-акриламид, ("Reanal", Венгрия); додецилсульфат натрия (SDS), 2-меркаптоэтанол, кумасси G-250, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин, глицин, персульфат аммония ("Serva", Германия); набор белковых стандартов для гель-электрофореза: фосфорилаза В (97400 Да), бычий сывороточный альбумин (67000 Да), овальбумин (45000 Да), карбоангидраза (29000 Да) ("Serva", Германия), смесь ингибиторов протеаз ("Roche", Германия), тромбин (700 ед/флакон) ("Республиканская станция переливания крови", Минск, Беларусь) и другие реактивы классификации не ниже х.ч.

Ультразвуковая система. В работе использована ультразвуковая система "Пульсар", разработанная в Белорусском национальном техническом университете (г. Минск). В состав аппарата входит УЗ-генератор, пьезоэлектрический преобразователь и волновод. Генератор оснащен системой автоматической подстройки частоты на резонанс электроакустического преобразователя по принципу экстремального регулирования. Выходная мощность генератора - 80 Вт. Рабочая частота пьезопреобразователя - 27 кГц. УЗ-генератор работает в импульсном режиме с 50% скважностью цикла (параметр импульсного ультразвука, определяющий отношение периода действия ультразвука к длительности импульса) периодом 0,9 сек. В работе использовали волноводы длиной 45 см, диаметром 0,6 мм. На конце волновода сфера диаметром 0,8 мм. Удельная мощность регулировалась ступенчато 11,4; 21,6; 30,2; 42,4; 51,2 Вт/см².

УЗ разрушение плазменного сгустка. Аликвоты свежзамороженной цитратной плазмы здоровых доноров хранили при -20°C до использования. Для формирования сгустка к 3 мл плазмы добавляли 600 мкл раствора тромбина (25 ед/мл) и термостатировали при 37°C в течение 1 часа. Полученный сгусток отмывали 5 раз в 10 mM натрий фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 0,15 M NaCl, помещали в полипропиленовую пробирку, содержащую равный исходной плазме объем натрий фосфатного буфера, и термостатировали на водяной бане при 37°C. После 15 мин инкубирования в пробирку вводили волновод и начинали озвучивание. По окончании УЗ обработки сгусток удаляли, а от фильтрата отбирали пробы для электрофореза, непосредственно добавляя к ним смесь для денатурации белков, содержащую 2-меркаптоэтанол и без восстанавливающего реагента.

Эффективность разрушения плазменного сгустка оценивали по убыли содержания белка в нём [10]. Оставшуюся после воздействия часть сгустка извлекали из пробирки, отжимали на стекле от буфера, а затем трижды отмывали

в изотоническом растворе NaCl. После этого сгусток переносили в колбу, содержащую 1 мл 1 М NaOH и медленно нагревали при 60°C в течение 30 минут. Общее содержание белка определяли спектрофотометрическим методом при 560 нм с использованием реактива Фолина.

Жидкостную хроматографию низкого давления проводили с использованием автоматической системы GradiFrac ("Pharmacia Biotech", США) с проточным УФ-монитором (λ 280 нм) в режиме изократического элюирования. Для гель-проникающей хроматографии использовали колонку (950×16 мм), заполненную Сефарозой 4В CL. Белки элюировали 0,05 М Na-фосфатным буфером (pH 7,4), содержащем 0,15 М NaCl, при скорости потока 0,1 мл/мин. Голубой декстран (2×10^6 Да) использовали для определения свободного объема колонки для гель-проникающей хроматографии, которую калибровали с использованием ферритина (450 кДа), бычьего сывороточного альбумина (67 кДа) и цитохрома с (12,5 кДа). При проведении гель-проникающей хроматографии к анализируемым пробам добавляли основной раствор смеси ингибиторов протеолитических ферментов из расчета 1:100.

SDS-ПААГ-электрофорез проводили по методу [11] в 7,5% или 10%-ном полиакриламидном геле. Образцы белков денатурировали кипячением в диссоциирующей смеси (10%-ный додецилсульфат натрия в буфере фокусирующего геля). В случае восстанавливающих условий к этому раствору добавляли 2-меркаптоэтанол до конечной концентрации 25%. Электрофорез проводили в 0,1 М Трис-HCl буфере (pH 8,8) с 0,1% раствором додецилсульфата натрия при силе тока 40 мА на пластинку в течение 5-6 часов. После электрофореза белки фиксировали в растворе 10% трихлоруксусной кислоты в течение 30 мин, после чего гели промывали смесью этанол:дистиллированная вода:уксусная кислота (5:1:1, по объему). Белковые зоны окрашивали 0,1% раствором кумасси G-250 в 3,5% растворе HClO₄ в течение 3 часов при комнатной температуре. От не связавшегося красителя гель отмывали 7% раствором уксусной кислоты. Расчет молекулярных масс и обработку денситограмм осуществляли при помощи программного обеспечения "Phoretix 1D" (Nonlinear Dynamics Ltd, США).

Сканирующая электронная микроскопия. Полученные после воздействия УЗ сгустки и образовавшиеся частицы подготавливали путём фиксации, дегидратации, высушивания и покрытия токопроводящим слоем золота толщиной 15-20 нм [6]. Съемка велась на сканирующем электронном микроскопе Nanolab-7 (Германия) при ускоряющем напряжении 20 кВ и при увеличении 1000×, 2500×, 5000×, 10000×. Исследование размера образующихся частиц, а также параметров структуры фибринового сгустка проводилось с помощью программного комплекса для анализа изображения Autoscan (ЗАО "Спектроскопические системы", Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Обработка низкочастотным, высокоинтенсивным (27 кГц; 51,2 Вт/см²) УЗ вызывала уменьшение массы плазменного сгустка на 50% уже в первые 1,5 мин (рис. 1.1), что достаточно для адекватного восстановления кровотока *in vivo* [12]. Дальнейшее увеличение времени озвучивания в указанном режиме приводило к экспоненциальному снижению массы сгустка, которая составляла около 30% в промежутке 2-4 мин и лишь 10% в интервале 4-10 мин. Уменьшение массы сгустка сопровождалось параллельным накоплением белково-пептидных продуктов в растворимой фракции, что отражалось в виде гиперболической зависимости поглощения при 280 нм от времени озвучивания (рис. 1.2). При воздействии ультразвука на сгусток, наряду с уменьшением самого сгустка, визуально наблюдалось появление нерастворимых частиц сгустка, что выражалось в опалесценции раствора. Последующее высокоскоростное центрифугирование (100000 g, 60 мин) позволило получить растворимую фракцию белков. Таким образом, при воздействии УЗ на сгусток образовывалось три фракции: остаточный сгусток, нерастворимые мелкие фрагменты сгустка, а также белки и пептиды растворимой фракции.

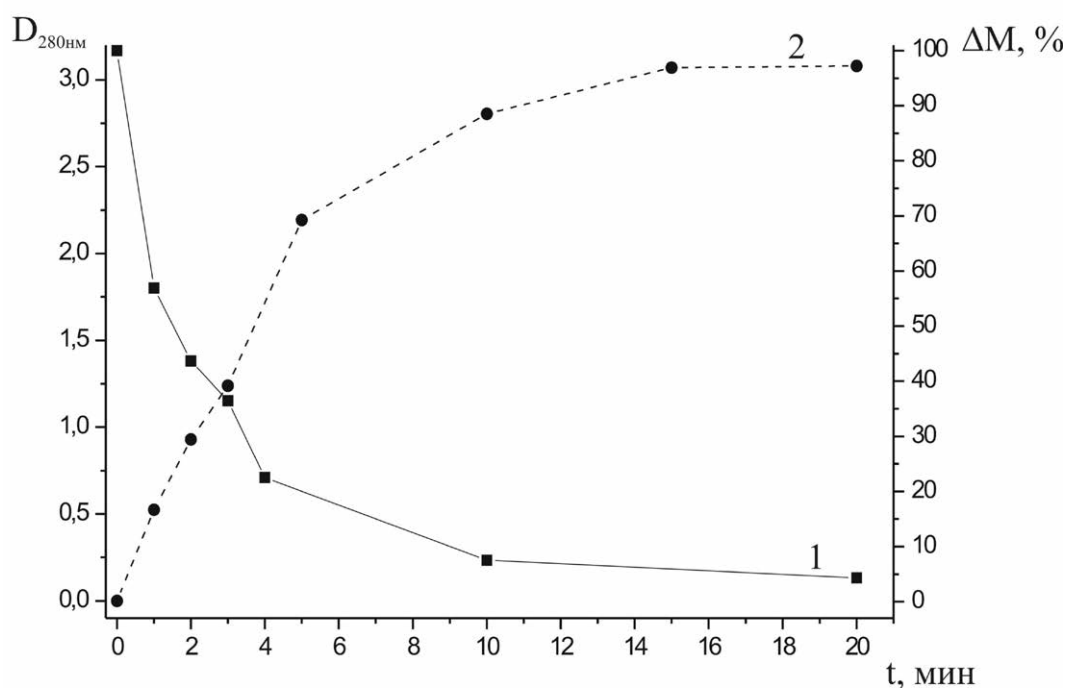


Рисунок 1.

Зависимость убыли массы плазменного сгустка (1) и возрастания оптической плотности в супернатанте (2) от времени обработки плазменного сгустка ультразвуком (здесь и на рис. 2-5 представлены результаты типичного эксперимента).

Для разрушения нековалентных ассоциатов и для определения молекулярных масс белков и пептидов в растворимой фракции проводили гель-электрофорез без восстановления внутри- и межмолекулярных дисульфидных связей. SDS-ПААГ-электрофорез образцов супернатанта, полученных после 15 мин УЗ воздействия ($51,2 \text{ Вт/см}^2$) на плазменный сгусток (рис. 2.А, кривая 1) позволил установить в водорастворимой фракции наличие следующих белковых компонентов: высокомолекулярные полипептидные цепи с молекулярной массой более 200 кДа (I), сложный набор белков в районе 150 кДа (II) и пять полипептидов с молекулярными массами 105 (III), 80 (IV), 67 (V), 58 (VI) и 45 (VII) кДа. В соответствии с данными одномерного гель-электрофореза [13], в образцах плазмы крови идентифицированы семь доминантных белков: иммуноглобулин М (Ig M), иммуноглобулин G (Ig G), гаптоглобин (Hp), трансферрин (Tf), альбумин (Alb), α_2 -антитрипсин ($\alpha_2\text{AT}$) и α_1 кислый гликопротеин ($\alpha_1\text{S}$). Однако, из представленных денситограмм для образцов фибрина, фибриногена и продуктов их ограниченной протеолитической модификации видно, что доминантные белки плазмы способны маскировать нативные и модифицированные молекулы фибриногена и фибрина (рис. 2А, кривые 2,3). Для обнаружения в водорастворимой фракции фибрин(оген)а и определения возможных продуктов протеолитического расщепления нативных полипептидных цепей, проводили гель-электрофорез в восстанавливающих условиях. Идентификацию продуктов протеолитической модификации фибрина и фибриногена проводили на основании молекулярных масс, согласно модели плазминолиза фибрина и фибриногена [14]. На денситограммах обработанного 2-меркаптоэтанолом супернатанта (рис. 2Б, линия 1) присутствовало 9 пиков, соответствующих пептидам с молекулярными массами 155, 102, 92, 80, 67, 60, 57, 50 и 36 кДа. Исходя из известного состава полипептидных цепей доминантных белков плазмы, можно сделать вывод о том, что полипептид с молекулярной массой 92 кДа (рис. 2.Б, кривая 1, пик I)

соответствовал γ - γ -цепям нативного фибрина (рис. 2Б, кривая 2) [15]. Присутствие данных полипептидных цепей свидетельствовало о наличии в супернатанте нативных молекул фибрина и/или продуктов его начальной протеолитической деградации (фрагментов X). Известно, что фрагменты X фибрина, характеризующиеся наличием деградированных α -цепей и нативных β - и γ - γ цепей, присутствует даже в нативной плазме [16]. Сравнение денситограмм для восстановленных образцов протеолитически модифицированных препаратов фибрина и фибриногена с образцами супернатанта (рис 2Б, линии 2,3) показало, что в последнем отсутствовали полипептиды, соответствующие нативным γ , деградированным γ' , γ'' , и γ''' - цепям фибриногена и β'' -цепям фибрина и фибриногена. Отсутствие в восстановленных образцах супернатанта данных полипептидных цепей свидетельствовало об отсутствии в водорастворимой фракции фибриногена, а также продуктов протеолитической деградации фибрина и фибриногена.

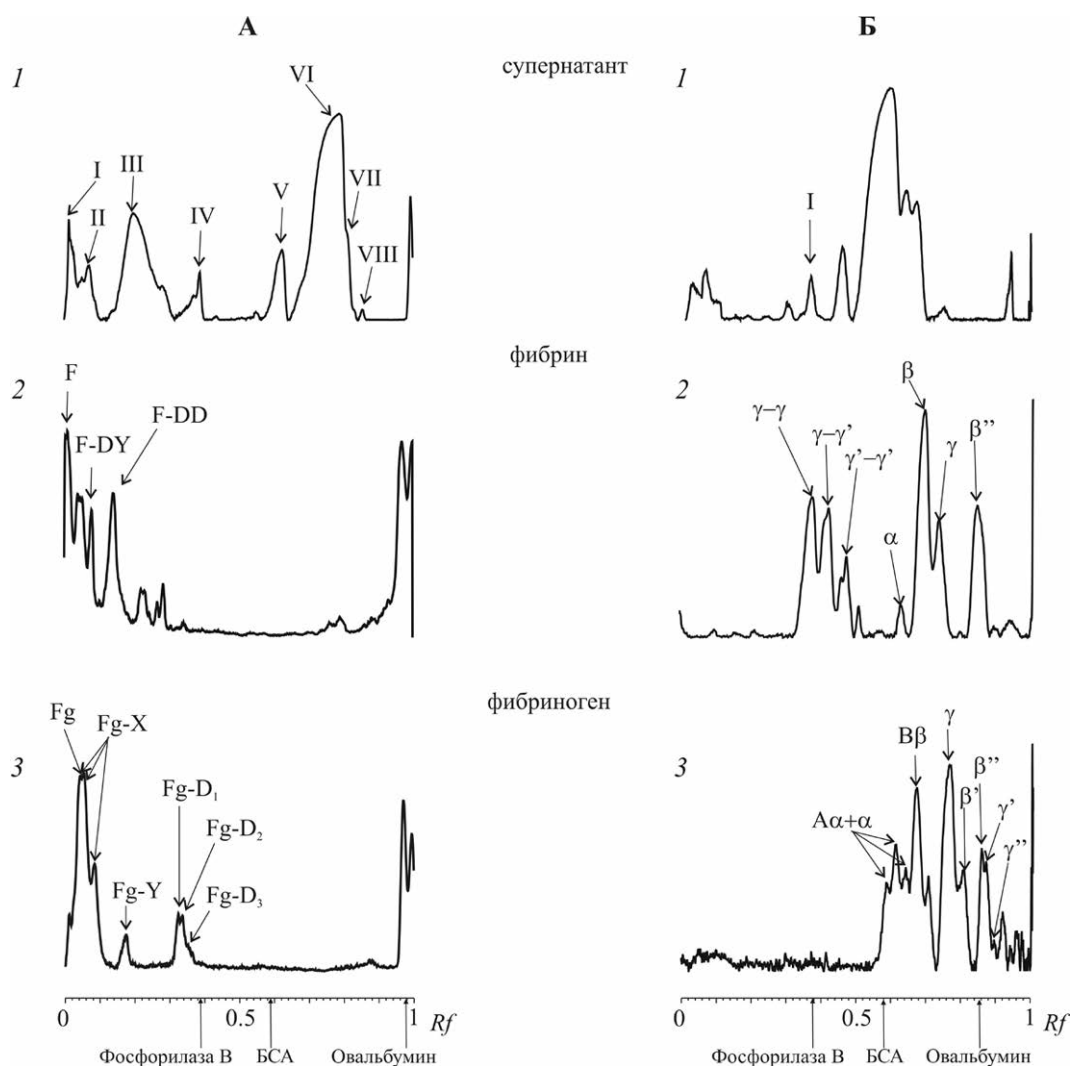


Рисунок 2.

Денситограммы SDS-ПААГ электрофореза невосстановленных (А) и восстановленных (Б) образцов: 1 – белки супернатанта после УЗ-воздействия в течение 20 мин; 2 – продукты ограниченного протеолиза плазмином молекулы фибрина; 3 – продукты ограниченного протеолиза плазмином молекулы фибриногена. F, F-DY, F-DD – фибрин и продукты его протеолитической деградации; Fg, Fg-X, Fg-Y, Fg-D₁, Fg-D₂, Fg-D₃ – фибриноген и продукты его протеолитической деградации соответственно; $A\alpha$, α , $B\beta$, β , β' , β'' , γ , γ - γ , γ - γ' , γ' - γ' , γ' , γ'' – соответствующие цепи фибрин(оген)а.

ДЕЙСТВИЕ УЛЬТРАЗВУКА ПРИ РАЗРУШЕНИИ ПЛАЗМЕННОГО СГУСТКА

Параллельно с Ds-Na-ПААГ электрофорезом, проведен анализ образцов супернатанта гель-проникающей хроматографией на колонке с поперечно сшитой сефарозой 4В-CL (рис 3). Хроматографическое разделение образца супернатанта, полученного после УЗ-обработки сгустка в течение 1 мин, сопровождалось распределением белкового материала в виде трех фракций (рис. 3а). Установлено, что фракция I содержит белки с молекулярной массой более 1000 кДа, фракция II – белки с молекулярными массами в диапазоне 30-450 кДа и фракция III – белки (пептиды) менее 10 кДа. Интегрирование площадей пиков показало, что 88% всех белков содержалось во фракции II. Основные белки плазмы имеют молекулярную массу протомеров и мультимеров от 40 кДа (α_1 кислый гликопротеин) до 400 кДа (гаптоглобин 2-2) [15], поэтому в условиях гель-проникающей хроматографии они элюировались во фракции II. Фракция I ($M_r > 1000$ кДа), содержала полимерные растворимые формы фибрина, Ig M (M_r 950 кДа), а также агрегатные формы и/или комплексы белков. Ds-Na-ПААГ электрофорез невосстановленных образцов супернатанта после 5 и 10 мин УЗ-воздействия (вставки к рис. 3 б,в) позволил установить, что в процессе УЗ-обработки сгустка не наблюдалось перераспределения белковых полос, что могло указывать на активацию эндогенного протеолиза. При увеличении времени экспонирования УЗ происходило лишь увеличение концентрации данных белков в супернатанте, проявляющееся в увеличении интенсивности белковых полос на электрофореграммах. При гель-хроматографии установлено, что в процессе УЗ обработки происходило увеличение содержания белковой фракции I ($M_r > 1000$ кДа) с параллельным уменьшением относительного содержания основных белков плазмы во фракции II. Полученные данные свидетельствовали об образовании агрегатов и межмолекулярных комплексов белков в растворимой фракции, получаемой при разрушении сгустка с помощью УЗ. Эти результаты согласуются с данными об образовании агрегатов стрептокиназы, антитромбина III и альбумина под действием УЗ [7, 8, 17].

Данные SDS-ПААГ электрофореза и гель-проникающей хроматографии позволили установить, что при ультразвуковом разрушении сгустка водорастворимая фракция представляла собой плазменные белки, содержащиеся в сгустке, и лишь в незначительном количестве фибрин. Принципиально важным представляется тот факт, что в процессе ультразвукового разрушения сгустка не образовывались специфические продукты протеолитической деградации фибрина.

Следующим этапом работы было исследование влияния интенсивности ультразвукового воздействия на разрушение плазменного сгустка. В качестве параметров, характеризующих процесс УЗ разрушения сгустка, были выбраны начальная скорость убыли массы и время, необходимое для разрушения половины массы сгустка (таблица). При увеличении интенсивности начальная скорость потери массы сгустка пропорционально увеличивалась от 8,97 до 42,95 %/мин с одновременным уменьшением времени полуразрушения сгустка. Так, при интенсивности 51,2 Вт/см² сгусток терял половину своей массы уже в первые 1,5 мин УЗ обработки. При интенсивности 30,2 Вт/см² наблюдалось прямо пропорциональное увеличение времени полуразрушения сгустка, в то время как уменьшение интенсивности до 21,6 Вт/см² приводило к резкому уменьшению степени разрушения сгустка и даже после 20 мин УЗ воздействия потеря массы сгустка составляла лишь 45%.

Таблица. Кинетические параметры УЗ-разрушения плазменного сгустка*.

Интенсивность, Вт/см ²	Начальная скорость, % (массы)/мин	t _{1/2} , мин
21,6	8,97 ± 0,95	> 20
30,2	21,03 ± 2,32	4 ± 0,5
42,4	33,08 ± 4,31	2,6 ± 0,4
51,2	42,95 ± 6,44	1,5 ± 0,2

Примечание: *- приведенные данные - среднее значение ± стандартное отклонение из трёх независимых измерений.

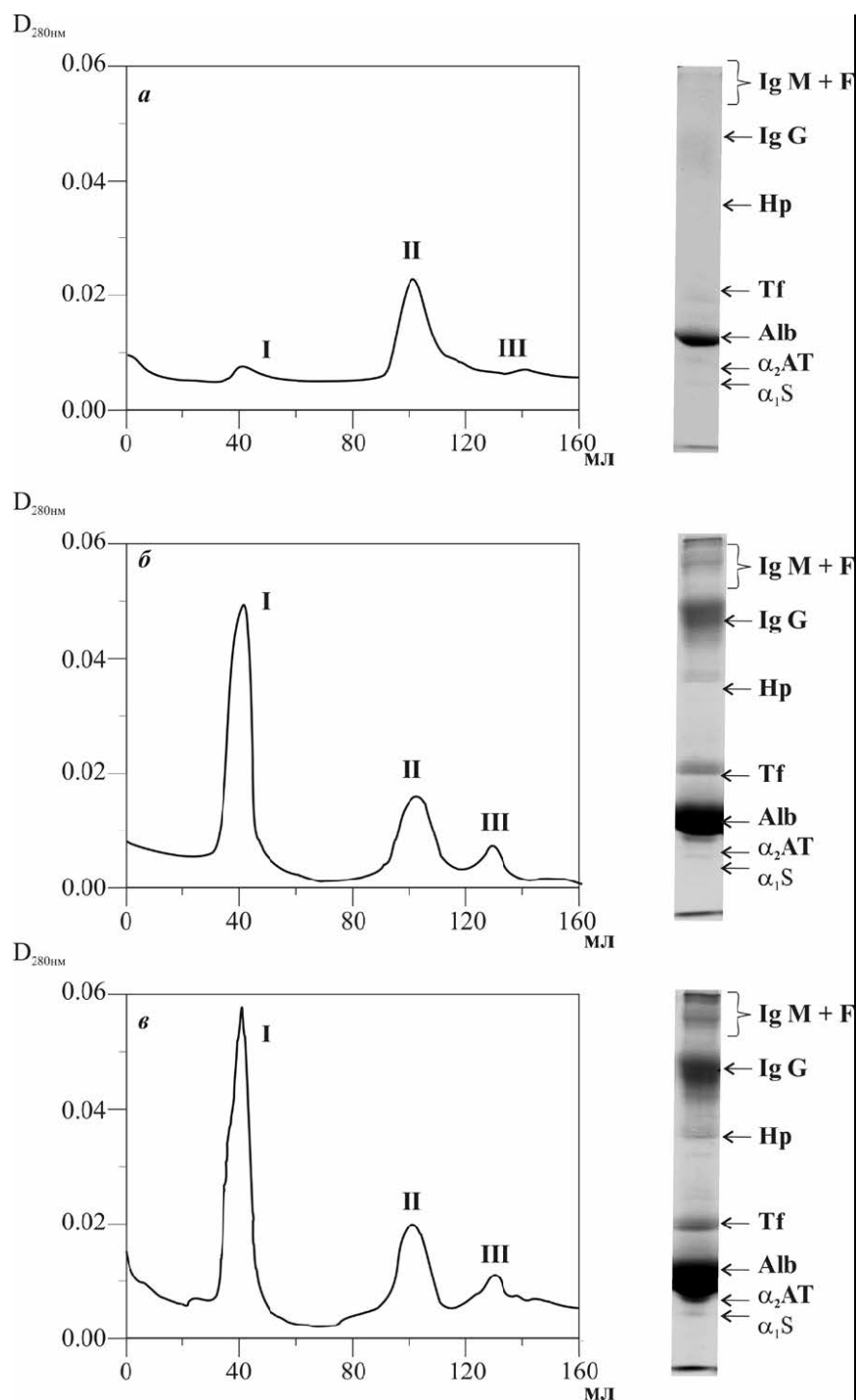


Рисунок 3.

Анализ образцов супернатанта, полученного после обработки плазменного сгустка ультразвуком ($51,2 \text{ Вт/см}^2$, 27 кГц) в течение 1(а); 5(б) и 10 мин (в) методом гель-проникающей хроматографии на колонке Сефароза 4В CL ($950 \times 16 \text{ мм}$). I, II, III – фракции, содержащие белки с молекулярными массами $> 1000 \text{ кДа}$, $500 - 12 \text{ кДа}$, и менее 10 кДа , соответственно. Сплошная линия - поглощение при 280 нм . На вставках справа приведены электрофореграммы соответствующих образцов.

Ig M - иммуноглобулин M, F – фибрин, Ig G - иммуноглобулин G, Hp - гаптоглобин, Tf - трансферрин, Alb - альбумин, α_2AT - α_2 -антитрипсин и α_1S - α_1 кислый гликопротеин.

Полученные нами данные по уменьшению эффективности разрушения плазменного сгустка при уменьшении интенсивности УЗ хорошо согласуются с кавитационным механизмом действия УЗ [18]. Резкое уменьшение эффективности разрушения сгустка при уменьшении интенсивности УЗ поля до 21,6 Вт/см² могло быть связано с тем, что при этой интенсивности не преодолевался порог инерционной кавитации, при которой схлопывание пузырьков обуславливает высокие значения локальной температуры и давления и преобразование энергии УЗ в энергию химических реакций.

SDS-ПААГ электрофорез остаточного сгустка после УЗ обработки в течение 20 мин показал, что с увеличением интенсивности УЗ происходит уменьшение содержания в сгустке плазменных белков (рис. 4). Интегрирование площадей пиков на денситограммах позволило установить, что для сгустка, обработанного УЗ с интенсивностью 21,6 Вт/см² относительное содержание фибрина составляет 45%. С увеличением интенсивности и времени УЗ обработки доля фибрина возрастает и при 20 мин обработки ультразвуком мощностью 51,2 Вт/см² достигает 85% (рис. 4.4). Параллельный анализ образующихся нерастворимых частиц (рис. 4.5) показал, что удельная доля фибрина составляет более 95%. Эти данные свидетельствуют о том, что УЗ способствует как экстракции белков плазмы из объема сгустка, так и переходу белков в растворимую фракцию в результате фрагментации сгустка до мелких частиц. Известно, что структурными элементами фибринового сгустка являются двухцепочечные протофибриллы, образующиеся при взаимодействии участка полимеризации "А" на NH₂-конце α -цепи с комплементарными участками "а" на γ -модулях соседних молекул. Образующийся за счет "А-а" связывания белковый комплекс механически прочный и выдерживает силу разрушения в несколько сотен пиконьютонов, что сравнимо с наиболее стабильным белковым комплексом стрептавидин-биотин [19]. При достижении длины 600-800 нм (около 15 мономеров), протофибриллы соединяются латерально за счет "В-в", " α С- α С" взаимодействий, образуя фибриллы, состоящие из 14-22 протофибрилл. Помимо этого, в образовании фибрилл участвует ряд неспецифических электростатических, водородных и гидрофобных взаимодействий [20]. В присутствии транслутаминазы (F XIIIa) и ионов кальция происходит поперечная ковалентная сшивка мономеров фибрина в результате образования изопептидных связей с участием остатков Gln и Lys между антипараллельными γ -цепями. Затем проходит межмолекулярная сшивка между α -цепями с образованием олигомеров и полимеров [19].

Ранее нами было показано, что акусто-химические реакции не сопровождались разрывом полипептидных цепей или опосредованным гидролизом пептидных связей в молекулах белков [7-9]. В связи с этим, в случае воздействия УЗ на фибриновый сгусток прямое разрушение протофибрилл, а также гидролиз ϵ -амино-лизин-(γ -глутамил) изопептидных связей являются маловероятными процессами. Скорее всего, при использовании низкочастотного УЗ интенсивностью менее 21,6 Вт/см² первоначально происходило высвобождение белков плазмы, находящихся в порах фибриновой сети. Кроме этого происходило существенное уменьшение объема самого сгустка и данный процесс можно сравнить с ретракцией сгустка. Дальнейшее увеличение интенсивности УЗ-воздействия приводило к дезагрегации протофибрилл и экстракции плазменных белков, содержащихся внутри фибриновых волокон. При этом доля фибрина в остаточном сгустке увеличивалась до 85% при УЗ-воздействии интенсивностью 51,2 Вт/см².

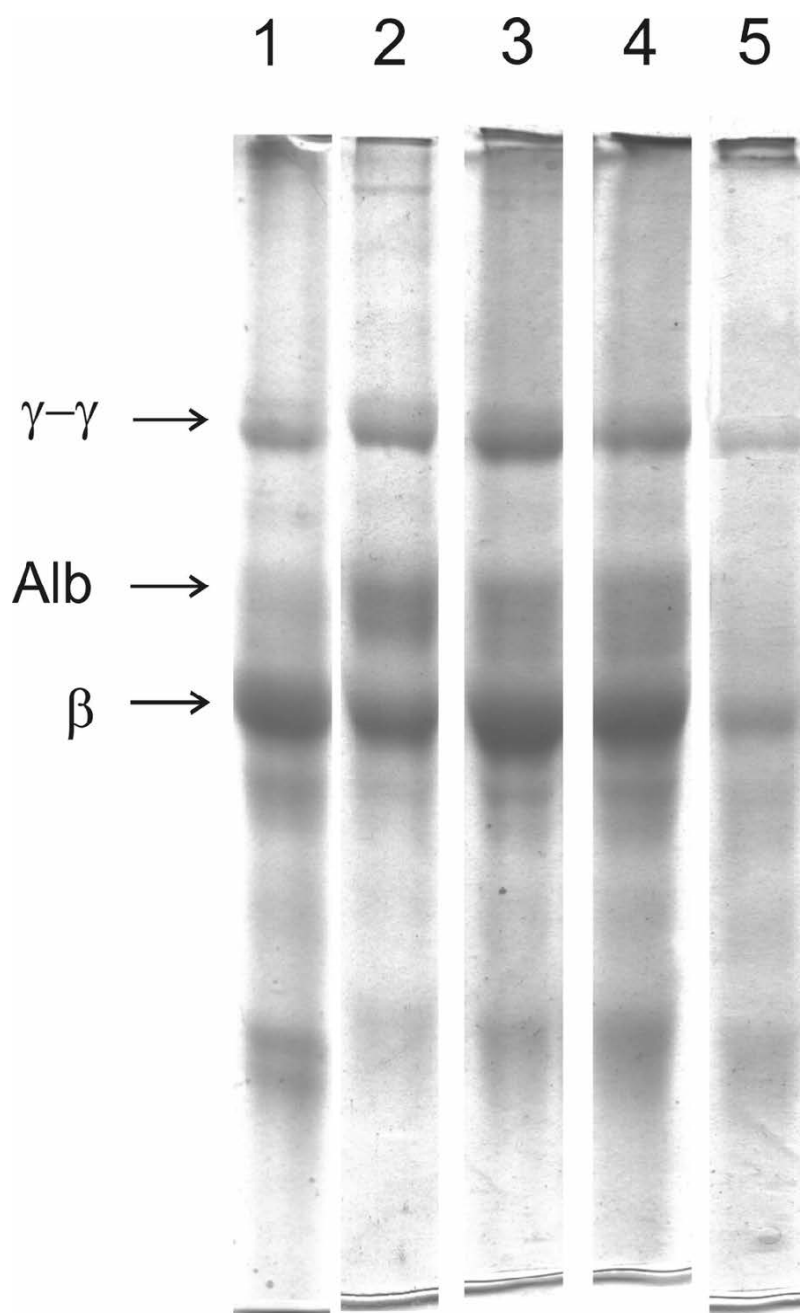


Рисунок 4.

Ds-Na-ПААГ электрофорез восстановленных фракций сгустка после 20 мин УЗ воздействия интенсивностью 51,2 (1), 42,4 (2), 30,2 (3) и 21,6 (4) Вт/см² и образующихся нерастворимых частиц (5).

Методом сканирующей электронной микроскопии исследованы изменения фибриновой сети в процессе ультразвуковой обработки. В качестве контроля использовали сгусток, на который в течение 3-х минут оказывалось механическое воздействие волноводом. В этом случае фибриновый сгусток представлял собой переплетение волокон, различных по длине и ширине. Фибриновая сеть имела мелкоячеистую структуру, при этом межволоконные пространства сети – поры распределены в структуре сети относительно равномерно. Параметры фибриновой сети: продольный размер – 5,31 мкм; поперечный - 0,22; размер пор - 0,28 мкм²

ДЕЙСТВИЕ УЛЬТРАЗВУКА ПРИ РАЗРУШЕНИИ ПЛАЗМЕННОГО СГУСТКА

(рис. 5а). После обработки УЗ продольный и поперечный размеры существенно уменьшались – 2,43 мкм и 0,15 мкм соответственно, а размер пор увеличивался до 0,33 мкм² (рис. 5б). Приведённые данные свидетельствовали о том, что действие ультразвука приводило к разрыхлению поверхности сгустка, за счет разрывов фибриновых волокон в поперечной плоскости, что сопровождалось уменьшением продольного размера волокон. Установлено, что продольный размер частиц после механического воздействия составлял 10,03 мкм, а поперечный 7,29 мкм (рис. 5в). В результате воздействия на фибриновый сгусток УЗ образовывались частицы, размер которых был значительно меньше: продольный - 2,06, поперечный - 1,63 мкм (рис. 5г). Таким образом, данные сканирующей электронной микроскопии позволили установить, что при обработке УЗ образующиеся частицы имели гораздо меньший размер и более правильную форму, чем при механическом воздействии. Кроме того, сам сгусток характеризовался меньшим диаметром волокна и большим размером пор. Форма и размеры образующихся частиц свидетельствовали о том, что при УЗ-воздействии частицы образовывались в результате агрегации протофибрилл, высвобождающихся из сгустка, а не являлись фрагментами фибриновой сети, как в случае механического разрушения.

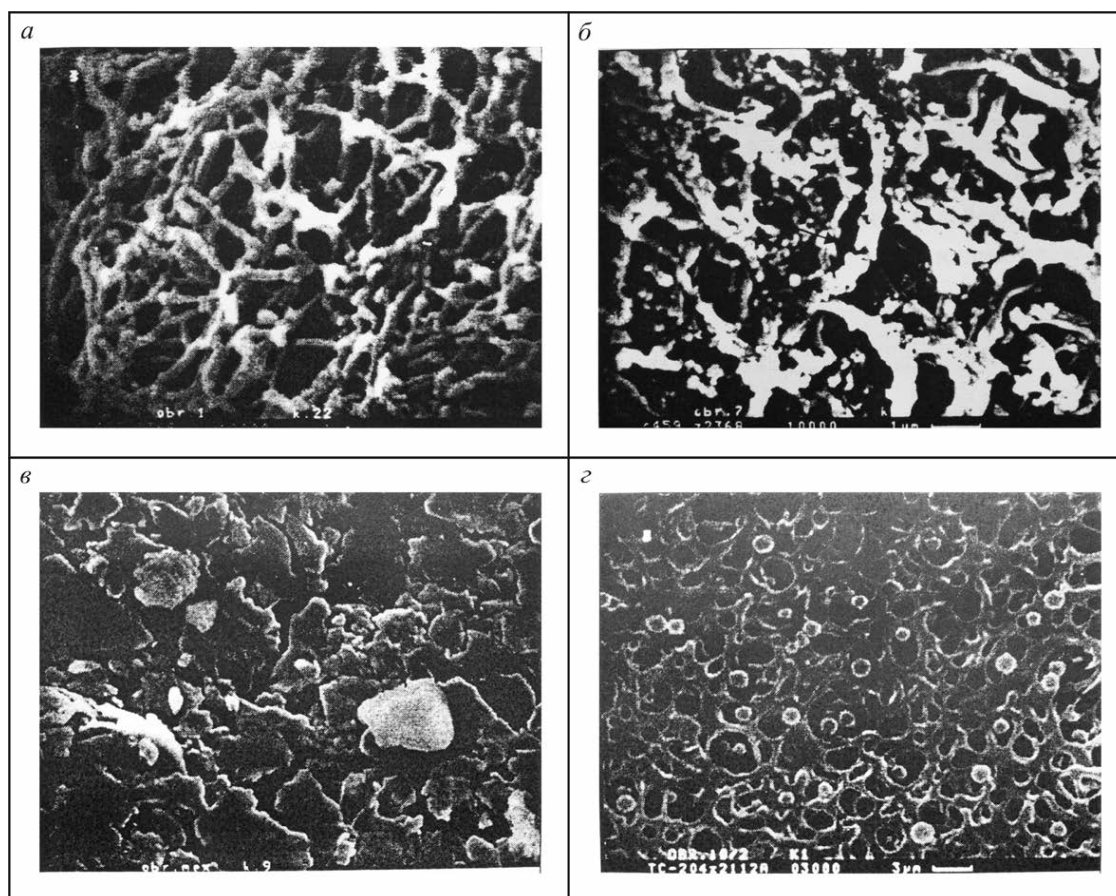


Рисунок 5.

Фибриновая сеть контрольного сгустка (а), сгустка после воздействия ультразвуком с интенсивностью 30,2 Вт/см² (б), частиц, образовавшихся в результате механического воздействия (в) и частиц, образовавшихся в результате воздействия на сгусток ультразвука интенсивностью 30,2 Вт/см² (г).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Проведен анализ продуктов разрушения плазменного сгустка низкочастотным УЗ (27 кГц). Установлено, что УЗ-воздействие не приводило к активации плазминовой системы и разрушению ковалентных связей в молекуле фибрина. При интенсивностях УЗ менее 21,6 Вт/см², в результате кавитации происходила экстракция белков сыворотки крови, находящихся в порах фибриновой сети. Увеличение интенсивности ультразвукового воздействия сопровождалось разрушением латеральных связей молекул фибрина, ответственных за образование фибрилл. Дезагрегация протофибрилл приводила к экстракции белков сыворотки крови, находящихся внутри фибриновых волокон. Высвобождающиеся из плазменного сгустка белки в поле УЗ кавитации подвергались агрегации, а протофибриллы взаимодействовали между собой, образуя нерастворимые частицы фибрина.

ЛИТЕРАТУРА

1. *ter Haar G.* (2007) *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, **93**, 111-129.
2. *Pfaffenberger S., Devcic-Kuhar B., Kastl S.P., Huber K., Maurer G., Wojta J., Gottsauner-Wolf M.* (2005) *Thromb. Haemost.*, **94**, 26-36.
3. *Atar S., Rosenschein U.* (2004) *J. Thromb. Thrombolysis*, **17**, 107-114.
4. *Nedelmann M., Eicke B.M., Lierke E.G., Heimann A., Kempfski O., Hopf H.C.* (2002) *J. Ultrasound Med.*, **21**, 649-656.
5. *Halkin A., Rosenschein U.* (2001) *Echocardiography*, **18**, 225-231.
6. *Adzerikho I.E., Mrochek A.G., Dmitriev V.V., Lukyanchenko O.A., Kulak A.I.* (2001) *Ultrason. Sonochem.*, **8**, 315-318.
7. *Лесникович Ю.А., Адзерихо И.Э., Шкуматов В.М.* (2003) *Биомед. химия*, **49**, 183-190.
8. *Шкуматов В.М., Адзерихо И.Э., Лесникович Ю.А., Чернявский Е.А.* (2004) *Биохимия*, **69**, 243-251.
9. *Ovsianko S.L., Chernyavsky E.A., Minchenya V.T., Adzerikho I.E., Shkumatov V.M.* (2005) *Ultrason. Sonochem.*, **12**, 219-223.
10. *Иванов Е.П.* (1991) *Руководство по гемостазиологии*, Мн.: "Беларусь".
11. *Laemmli U.K.* (1970) *Nature*, **227**, 680-685.
12. *Shlansky-Goldberg R.D., Cines D.B., Sehgal C.M.* (1996) *J. Vasc. Interv. Radiol.*, **7**, 313-320.
13. *Marshall T.* (1984) *Clin. Chem.*, **30**, 475-479.
14. *Francis C.W., Marder V.J.* (1982) *Semin. Thromb. Hemost.*, **8**, 25-35
15. <http://www.sigmaaldrich.com>
16. *Mosesson M.W., Galanakis D.R., Finlayson J.S.* (1974) *J. Biol. Chem.*, **249**, 4656-4664.
17. *Gülseren I., Güzey D., Bruce B.D., Weiss J.* (2007) *Ultrason. Sonochem.*, **14**, 178-183.
18. *Datta S., Coussios C.C., McAdory L.E., Tan J., Porter T., De Courten-Myers G., Holland C.K.* (2006) *Ultrasound. Med. Biol.*, **32**, 1257-1267.
19. *Litvinov R.I., Gorkun O.V., Shuman H., Weisel J.W.* (2005) *Blood*, **106**, 2944-2951.
20. *Guthold M., Liu W., Stephens B., Lord S.T., Hantgan R.R., Erie D.A., Taylor R.M., Superfine R.* (2004) *Biophys. J.* **87**, 4226-4236.

Поступила: 16. 05. 2008.

EXTRACTION EFFECT OF ULTRASOUND DURING PLASMA CLOT DISRUPTION

E.A. Cherniavsky¹, I.E. Adzerikho², V.M. Shkumatov¹

¹Research Institute for Physical Chemical Problems of the Belarusian State University,
Leningradskaya Str., 14, Minsk, 220030 Belarus; tel./fax: (+375 17) 209-5461; e-mail: biopharm@bsu.by

²Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Belarus

The products of plasma clot destruction by the low-frequency ultrasound (US) were analyzed by the combination of SDS gel-electrophoresis, gel filtration chromatography and scanning electron microscopy. It was found that US (27 kHz) did not cause activation of the plasmin system or covalent bonds cleavage in the fibrin molecules. With the US intensities less than 21.6 W/cm² the extraction of blood serum proteins, which are located in the pores of the fibrin network was occurred. An increase of the intensity of ultrasonic action led to protofibril dissociation, which was accompanied by further release into the solution of the blood serum proteins located inside the fibrin fibers. Being extracted from aggregated plasma clot proteins free protofibrils formed insoluble fibrin particles.

Key words: ultrasound, plasma clot, fibrin, thrombolysis.