

## Дослідження властивостей згустків, сформованих із дезАА- та дезААВВ-фібрину з різною структурою поверхні

О. М. Савчук, В. І. Чернишов, Г. Л. Волков

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України  
Вул. Володимирська, 9, Київ, 01601, Україна

SANGbiochem.kiev.ua

---

*Показано, що на поверхні фібринових згустків, які формуються на межі поділу двох фаз за умови виключення взаємопроникнення однієї фази в іншу, утворюється структура (поверхневий шар), що відрізняється від структури згустка. За відсутності поверхні поділу двох фаз формування згаданого шару у фібриновому згустку не спостерігається. Зроблено припущення, що виникнення цієї структури пов'язано з порушенням процесу латеральної асоціації фібрилярних структур у фібриновому згустку, яке має місце на межі поділу фаз. Поверхневий шар утворюється протофібрилярними структурами, які розпластані на межі поділу і формують щільну неупорядковану структуру, що спостерігається на електронно-мікроскопічних фотографіях. Виявлені особливості структури фібринових згустків, обумовлені умовами їхнього формування (наявність або відсутність поверхневого шару), визначають характер протікання процесів взаємодії згустків з компонентами фібринолітичної системи, що може бути причиною розбіжностей у ступені резистентності фібринових згустків у кровоносному руслі.*

---

*Ключові слова:* фібриноген, фібриновий згусток, електронна мікроскопія.

---

Вступ. Відомо, що під дією тромбіну та анцистрону фібриноген перетворюється в мономерний фібрин, який далі полімеризується в дwonитчасті протофібрили [1—3]. З часом протофібрили латерально поєднуються і утворюють волокна тривимірного фібринового згустка. Механізм збирання протофібрил досить добре вивчено [4, 5], однак остаточно не з'ясовано процеси, які відбуваються на поверхні фібринового згустка під час формування полімерного фібрину.

В останні роки в клінічній практиці широко застосовують клеї на основі фібрину або композицій фібриногену, тромбіну та тромбіноподібних ферментів [6—9]. Також значно зросла кількість композитних матеріалів, вироблених із пластмас та металів, які використовують при різних хірур-

гічних втручаннях (стенти, пластикові протези тощо). Поверхня цих речовин може спровокувати процес контактної активації фібриногену, і структура утворених фібринових згустків відрізнятиметься від такої згустків, утворених у кровотоку. При дослідженні структури фібринових згустків вперше показано, що на поверхні згустків присутня структура, за своєю будовою відмінна від власне структури фібринового згустка, яка одержала назву «поверхневий шар». Присутність або відсутність її у фібриновому згустку, очевидно, обумовлює особливості взаємодії цих згустків з компонентами фібринолітичної системи, що, в свою чергу, може спричинити тромботичні ускладнення. Вивчення умов формування і взаємодії з компонентами фібринолітичної системи поверхневого шару фібринового згустка має як теоретичне, так і практичне значення для біохімії і практичної медицини.

**Матеріали і методи.** Фібриноген виділяли з оксалатної плазми донорської крові висоловлюванням сульфатом натрію [10]. Його звільняли від домішок плазміногену, обробляючи розчином лізину з наступним спиртовим переосадженням білка [11], або за допомогою афінної хроматографії на лізин-сефарозі. Вміст фібриногену, що згортався під дією тромбіну, становив 96—98 %. Згусток, утворений з фібриногену та звільнений від домішок плазміногену, не руйнується за присутності 20 міжнародних од. тканинного активатора плазміногену на 1 мг білка протягом 120 хв. Препарати фібриногену були гомогенними за даними 10 %-го Ds-Na-ПААГ електрофорезу [12].

Плазмін одержували, активуючи Glu-плазміноген на сефарозі, кон'югованій з урокіназою [13]. Отриманий препарат плазміну мав активність 10—15 каталітичних одиниць на 1 мг білка.

При формуванні згустків використано дві модельні системи: 1) блоки з агару, для заливання яких застосовували 1 %-й бактоагар і 2) пластикові пробірки. Електронно-мікроскопічними дослідженнями показано, що згустки, сформовані в першій системі, не мають поверхневого шару, а в згустках, одержаних у системі 2, такий шар є [14].

Вихідна концентрація фібриногену, необхідна для полімеризації, становила 20 мг/мл, тромбіну — 2 NIH/мл. Для одержання згустків різного ступеня стабільності підбирали відповідні умови полімеризації. Згустки без прошивання формувалися протягом 30 хв за кімнатної температури, прошиті за  $\gamma$ -ланцюгом — 60 хв при кімнатній температурі і  $\alpha$ -,  $\gamma$ -ланцюгам — 60 хв при температурі 37 °С. Стабілізація згустка відбувалася за рахунок домішок фактора XIII, які активували  $\text{CaCl}_2$  у концентрації 2 мМ.

По закінченні полімеризації згустки обережно видаляли з ємностей, у яких вони полімеризувалися, та переносили в ємності з 0,05 М фосфатним буфером, рН 7,4. До згустків додавали плазмін (10 мкг/мл), перемішували і інкубували за температури 37 °С. Зразки для електронно-мікроскопічних досліджень відбирали через визначені проміжки часу протягом 60 хв. Після вилучення зразка з ємності його вміщували у фосфатний буфер, який містив розчин пНФГБ ( $10^{-4}$  М), для запобігання подальшого гідролізу згустка плазміном.

Фібриновий гель після його формування через певні проміжки часу (залежно від поставлених задач) фіксували, використовуючи як перший фік-

сатор глутаровий альдегід (2,5 % в 0,1 М какодилатному буфері, рН 7,4). Далі гель промивали в 0,1 М какодилатному буфері, рН 7,4, фіксували в розчинах оксиду осмію (від 2 до 50 %). Згустки зневоднювали на поверхні 4 %-го розчину ацетону, а по досягненні його концентрації 50 % згустки повністю занурювали в розчин. Після цього їх полімеризували в смолі Епон-Аралдит (AGAR). Підготовлені таким чином зразки використовували для сканувальної і трансмісійної мікроскопії.

**Результати і обговорення.** Необхідною умовою для формування поверхневого шару у фібриновому згустку є наявність поверхні поділу фаз. Доказом такого припущення слугує експеримент, у якому фібриновий згусток формували всередині агар-агарового чи желатинового блоку, стінки якого просочені водою. В такому разі гель всередині є гомогенною фазовою поверхнею для розчину білка і тому поверхневий шар не формується [14].

Для зручності подальшої роботи із згустками, що мають різну структуру поверхні, а саме — наявність або відсутність на поверхні згустків поверхневого шару, обрано такі моделі: полімеризація згустків у пластикових пробірках або в блоках з агаро-агару (для заливання блоків використовували 1 %-й агар-агар).

Електронно-мікроскопічними дослідженнями показано, що згустки, сформовані в агарових блоках, позбавлені поверхневого шару, а в згустках, утворених у пробірках, такий шар присутній (рис. 1, А).

З використанням обох модельних систем проведено електронно-мікроскопічне вивчення згустків, що мають різну структуру поверхні. Час полімеризації згустків складав 30—40 хв за кімнатної температури, об'єм — 0,2 мл. Готували такі зразки: згустки дезААВВ-фібрину і дезАА-фібрину з поверхневим шаром і без нього. Аналіз згустків дезААВВ-фібрину з поверхневим шаром і без нього (рис. 1, А) показав, що товщина поверхневого шару становить 27,1 нм (після 15 вимірів).

Виявлено, що фібринові нитки поверхневого шару та нитки самого згустка, які лежать під шаром, структурно пов'язані. Видно, що поверхневий шар сформований з тонких фібринових ниток (скоріш за все, це протофібрилярні структури) порівняно з нитками згустка, який лежить під ним. Пучки цих тонких ниток поверхневого шару, латерально поєднуючись один з одним, переходять у товсті нитки гелю. У згустку з поверхневим шаром

переважають тонкі фібрили (можливо, присутня невелика кількість протофібрил, які не встигли сформуватися у фібрили); спостерігаються фібрили, вбудовані в поверхневий шар або, як уже зазначалося, виходять з нього. Згусток з поверхневим шаром містить менше фібрил, відстань між якими більша, ніж у згустку, сформованому в агаровому блоці. Діаметр фібрил складає для згустків з поверхневим шаром від 30 до 170 нм, для згустків, які не мають поверхневого шару, — від 230 до 400 нм.

Результати аналізу згустків дезАА-фібрину з поверхневим шаром та без нього (рис. 1, Б) виявилися аналогічними таким, отриманим при формуванні згустків з дезААВВ-фібрину, що мають різну структуру поверхні.

Товщина поверхневого шару складала 26,8 нм (здійснено 15 вимірів). Діаметр фібрил у згустках з поверхневим шаром і без нього дорівнював відповідно 85—114 і 120—200 нм; відстань між фібрилами у них була практично однаковою.

У фібриновому розчині і на межі поділу фаз спочатку формуються протофібрили, які внаслідок латеральної агрегації поєднуються у фібрили. На поверхні згустка процесові латерального об'єднання протофібрил перешкоджає їхня обмежена рухливість. Це може бути пов'язано з прикріпленням ниток до поверхні стінки пробірки, смоли або (на межі з повітрям) відбуватися через сили поверхневого натягу. Обмежені в русі нитки фібрину на поверхні згустка формують хаотично з'єднані тонкі нитки, які структурно переходять у підлеглі фібрилярні структури, наявність великих ступенів свободи для яких у глибині розчину білка призводить до формування фібрил. У поверхневому шарі процес утворення фібрил дуже повільний за рахунок обмеження рухливості протофібрилярних структур. За відсутності поверхні поділу фаз у фібриновому згустку немає і поверхневого шару, а фібрили рівномірно заповнюють об'єм гелю, через що у згустках, які не мають поверхневого шару, після певного часу полімеризації практично зникають протофібрилярні структури. Одним із можливих механізмів формування поверхневого шару може бути розпластання протофібрил на межі поділу двох фаз при їхньому латеральному рості всередину фібринового згустка у напрямку його поверхні. Підтвердженням того є електронно-мікроскопічні фотографії, на яких спостерігаються фібрили, вбудовані в поверхневий шар, при цьому помітне

розшарування їх на дрібніші нитки (протофібрили).

Різниця між товщиною поверхневого шару і фібрилами всередині згустків, обумовлена відщеплюваними від молекули фібриногену пептидами (дезАА- або дезААВВ-фібрин), може бути пов'язана з участю другої пари центрів полімеризації ( $D_2-E_2$ ). Відомо, що  $D_2-E_2$  центри полімеризації стабілізують ранні протофібрилярні структури і значно сприяють латеральній асоціації [15—17]. Це, в свою чергу, збільшує спорідненість протофібрил одна до одної, що призводить до потовщення утворюваних фібрил. Відсутність таких центрів у дезАА-фібрині спричинює потоншення фібрил, які утворюються за рахунок зменшення спорідненості протофібрил одна до одної, що підтверджується отриманими даними. У згустку спостерігається подовження протофібрил, які через зниження спорідненості погано латерально асоціюють одна з одною і це призводить до появи меншої кількості протофібрилярних структур, що вбудовуються в поверхневий шар. Наслідок цього — потоншення поверхневого шару в дезАА-згустках порівняно з дезААВВ-фібриновими згустками.

Одержані результати дозволяють зробити припущення, що така особливість структури фібринового згустка, як наявність або відсутність поверхневого шару, може вносити зміни у взаємодію фібринового згустка з компонентами фібринолітичної системи. Щоб перевірити таке припущення проведено електронно-мікроскопічні дослідження процесу руйнування плазміном фібринових згустків, які мають різну структуру поверхні. Аналіз даних з гідролізу плазміном згустків дезААВВ-фібрину, які містять поверхневий шар (рис. 2, А), показав, що спочатку структура згустка зазнає змін, аналогічних описаним вище. Через 30 хв гідролізу поверхневий шар зникає і структура фібринового згустка суттєво змінюється. Відбувається міграція фібрил у напрямку поверхні згустка.

У центрі згустка відстань між фібрилами максимальна, а на його поверхні фібрили практично злипаються і утворюють суцільний пояс. У згустку спостерігаються три структурні зони: перша —  $\approx 345$  нм (зона максимальної щільності фібрил); друга —  $\approx 400$  нм (проміжна) і третя — весь простір згустка, що залишився. Зменшується кількість тонких фібрил, вони стають товщими, а відстань між ними збільшується. Після 60 хв гідролізу (рис. 2, А, в) зони залишаються, але їхній розмір зміню-

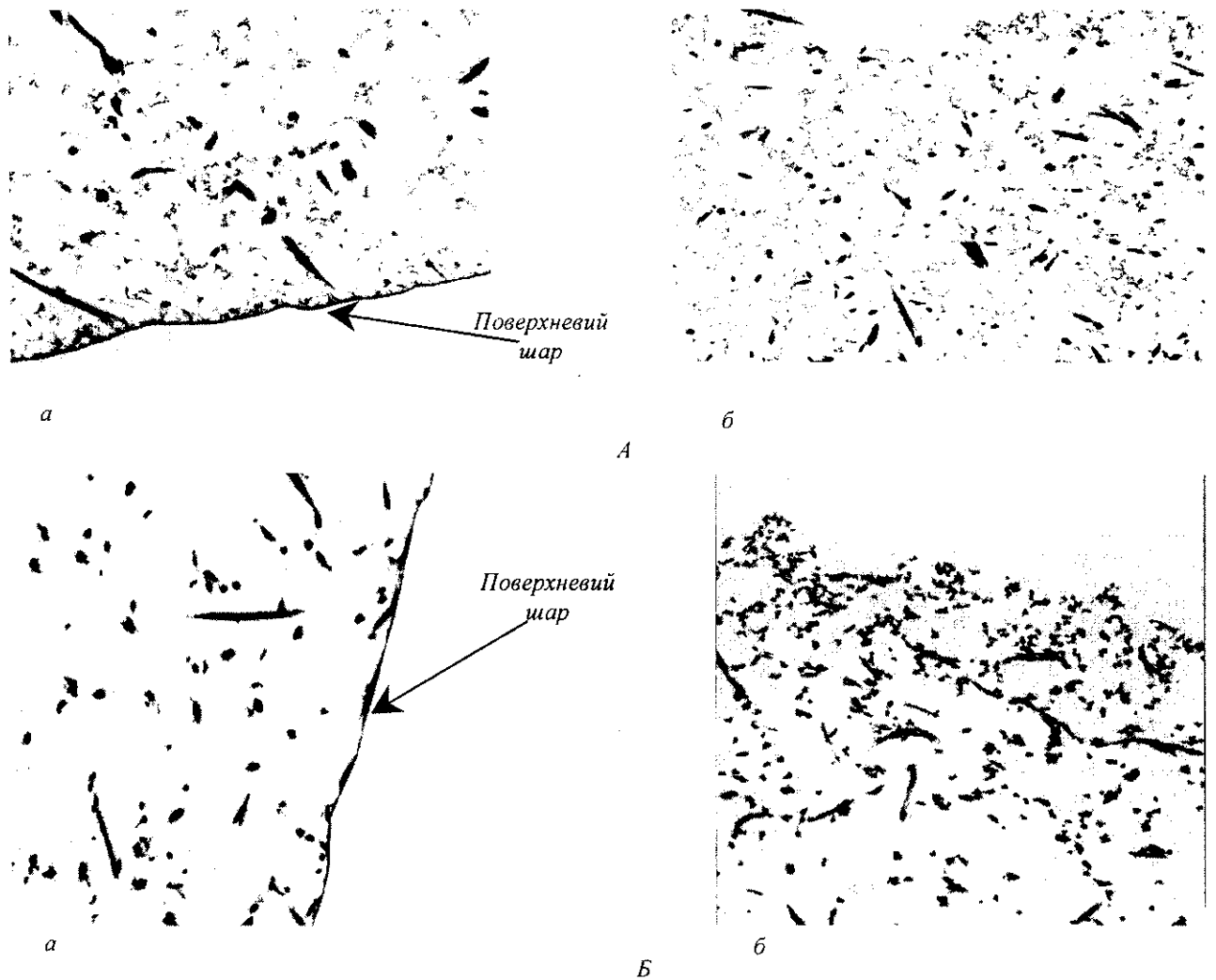


Рис. 1. Електронно-мікроскопічні фотографії згустків з дезААВВ-фібрину (А) та дезАА-фібрину (Б): а — полімеризація в пробірці; б — полімеризація в агар-агаровому блоці (збільшення в 35000 разів)

ється. Зона максимальної щільності фібрил дорівнює  $\approx 142$  нм, а проміжна зона —  $\approx 310$  нм. Тонкі фібрили практично зникають, залишаються товстіші. Відстань між ними значно зростає.

Поява зон всередині фібринового згустка, можливо, пов'язана з особливостями процесу полімеризації, при якому на поверхні фібринового згустка формується поверхневий шар. Протофібрили в процесі свого росту та наступної латеральної асоціації можуть витримувати значний тиск, обумовлений обмеженням об'єму згустка. Таким чином, вони перебувають в конформації, яка нагадує пружину, що упирається в поверхневий шар. Після руйнування шару під дією плазміну напруга зникає і фібрили починають мігрувати в напрямку поверхні

фібринового згустка. Даний процес може бути додатковою перешкодою повному лізису згустка, коли молекули плазміну не здатні глибоко проникати у фібриновий згусток. Тоді процес гідролізу відбувається з поверхні, що слугує ще одним захисним механізмом, який дозволяє тривалий час зберігати при ушкодженні кровоносних судин їхню цілісність за рахунок згустка, утвореного в місці пошкодження. Це в свою чергу сприяє запобіганню проникнення чужорідних агентів у кровоносне русло. Зроблене припущення добре узгоджується з даними літератури, де є дані щодо розбіжностей у ступені резистентності згустків до дії компонентів фібринолітичної системи на ушкоджених та інтактних судинах [6—9].

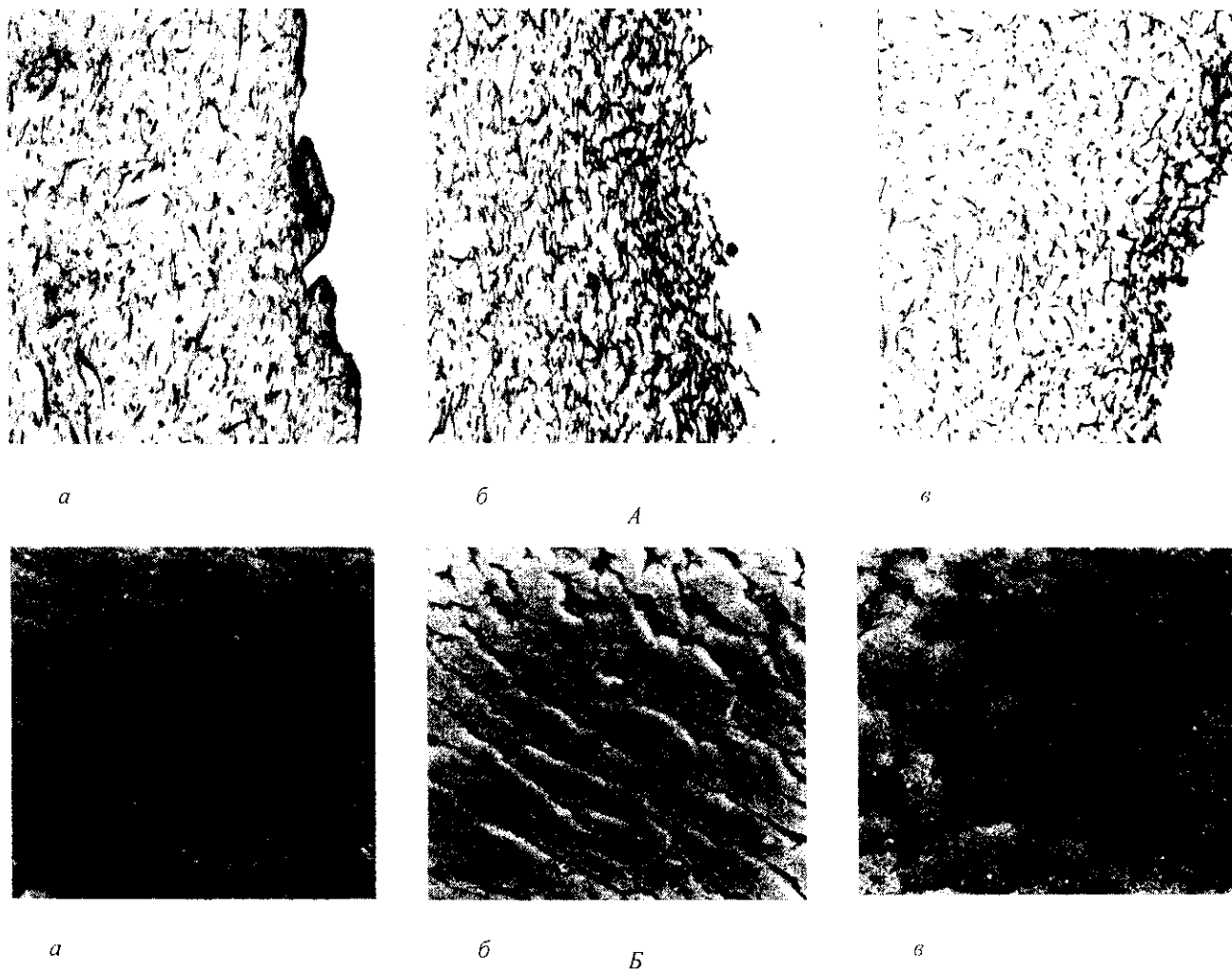


Рис. 2. Електронно-мікроскопічні фотографії гідролізу плазміном згустка з дезААВВ-фібрину з поверхневим шаром при збільшенні в 35000 (А) та 7000 (Б) разів: а — 0 хв гідролізу; б — 30 хв гідролізу; в — 60 хв гідролізу

На сканувальних електронних фотографіях видно, що протягом гідролізу на поверхні фібринового згустка з'являються поглиблення, які із зростання часу гідролізу стають виразнішими (рис. 3, Б). Через 60 хв гідролізу поверхня згустка являє собою хаотичну, чітко розкреслену поверхню. Результати гідролізу плазміном згустків дезААВВ-фібрину, які не мають на своїй поверхні шару, представлено на рис. 1, А, б, і рис. 3, А. У нульовий час гідролізу структура згустка (рис. 1, А, б) аналогічна описаній вище. Фібриновий згусток складається лише з фібрилярних структур. Зміни починаються з відліком часу гідролізу. Фібрил стає менше, відстань між ними зростає. Будь-які зони всередині згустка знайти дуже складно. Згодом відмічається невелике переміщення фібрил до поверхні згустка (30—60 хв

гідролізу), але це, скоріш за все, є вивільненням фрагментів, які відщеплюються плазміном від згустка, в оточуючий розчин. Не спостерігається помітного потовщення фібрил упродовж гідролізу, як це відбувається при гідролізі згустків, що містять поверхневий шар. Відсутність будь-яких зон у фібриновому згустку пов'язана з тим, що в процесі росту та латеральної асоціації протофібрили не мають обмежень для росту і формування фібрилярної структури, що характерно для згустка, який має поверхневий шар. Завдяки відсутності напруги, обумовленої поверхневим шаром, фібрилярні структури у згустку досить рівномірно розподілені і при гідролізі вони не мігрують у напрямку простору, який виник через руйнування плазміном поверхні фібринового згустка.

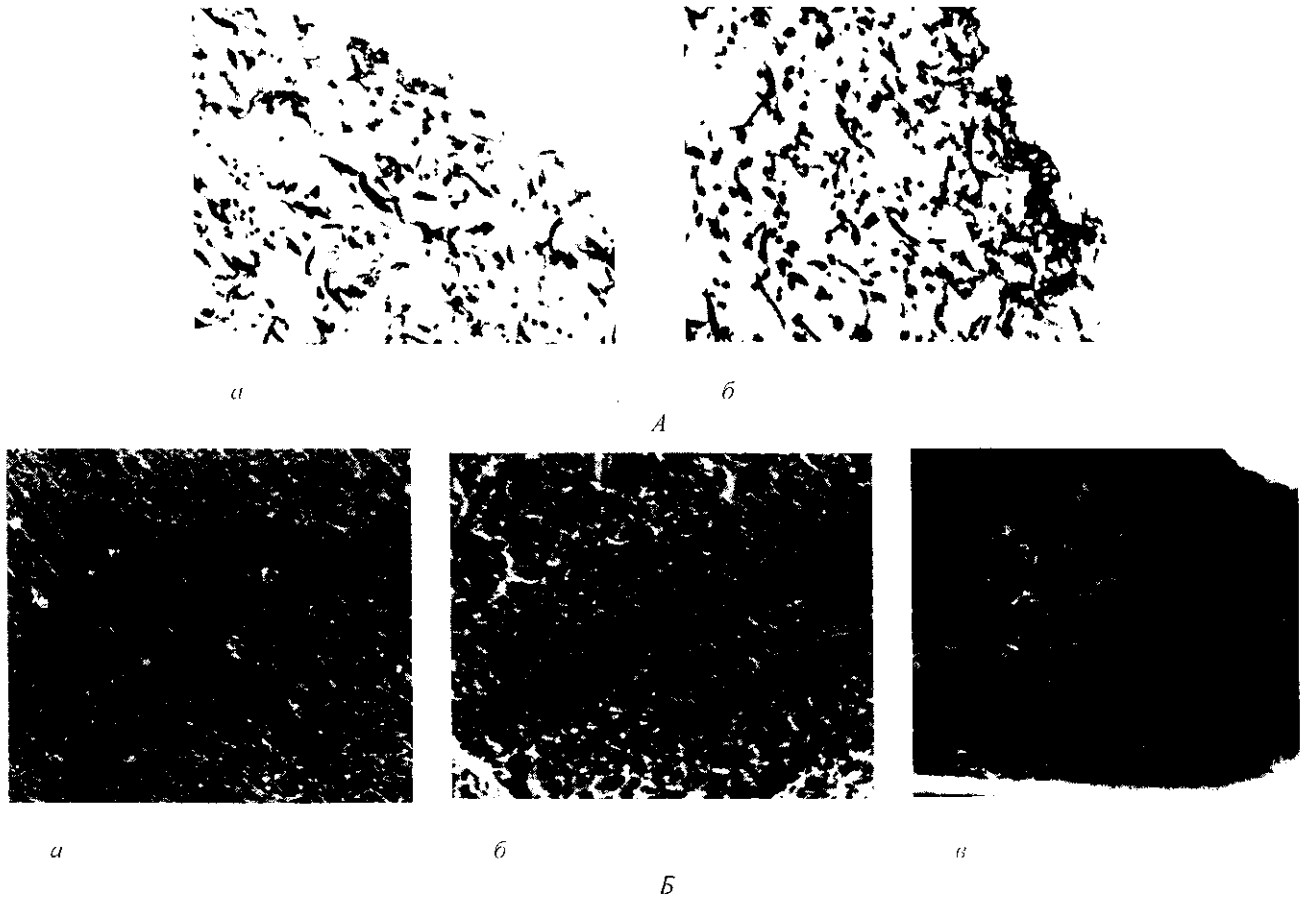


Рис. 3. Електронно-мікроскопічні фотографії гідролізу плазміном згустка з дезААВВ-фібрину без поверхневого шару при його збільшенні в 35000 (А: а — 30 і б — 60 хв гідролізу) і 7000 разів (Б: а — 0; б — 30 і в — 60 хв гідролізу)

У той же час відсутність стеричної перешкоди (поверхневий шар), можливо, призведе до швидшого вивільнення продуктів гідролізу плазміном фібринового згустка назовні, що, в свою чергу, сприятиме швидкій елімінації фібринових згустків з такою структурою з кровоносного русла. З одного боку, це важливо для запобігання закупорювання судин, а, з іншого, — фібринові згустки, що не містять поверхневого шару, мабуть, не зможуть брати участі у репаративних процесах, пов'язаних з ушкодженням внутрішньої поверхні судини, оскільки вони через особливості своєї структури не здатні тривалий час протидіяти проникненню у кровоток чужорідних агентів.

Фібринові згустки без поверхневого шару (рис. 3, Б) являють собою скупчення фібрилярних структур, кількість яких і розгалуження з часом гідролізу не зменшуються. Картина, що спостерігається, не відповідає змінам, які відбуваються з поверхнею фібринових згустків, що мають поверхневий шар.

**Висновки.** Таким чином, на основі представлених даних можна зробити висновок стосовно того, що при будь-якому способі формування фібринового гелю на його поверхні, яка контактує з поділом двох фаз, утворюється особлива структура, відмінна від такої самого згустка. Ця структура представлена у вигляді тонкого поверхневого шару. Вона формується з фібринових ниток, які розплітаються на тонші волокна і протофібрили. Можна припустити, що в кров'яному руслі на поверхні фібринового згустка, який утворився в неушкодженій судині, поверхневий шару відсутній, оскільки там немає гетерогенних поверхонь поділу фаз. При ушкодженні кровоносної судини кров, яка виходить за межі кровотоку, згортається. При зортанні крові на її межі з повітрям формується поверхневий шар, що перешкоджає подальшому крововиливу та проникненню в місце виходу крові різних мікроорганізмів і вірусів. Утворений лише з товстих фібринових ниток фібриновий гель не мо-

же забезпечити такого захисту через значну відстань між фібрилами у згустку. Поверхневий шар у фібриновому згустку є першою механічною перешкодою на шляху можливого інфікування організму і, отже, разом з нитками фібрину слугує першою ланкою в ланцюзі механізму подальшого захисту організму при ушкодженні кровоносних судин.

O. M. Savchuk, V. I. Chernyshov, G. L. Volkov

The research on properties of clots, formed out of desAA- and desAABB-fibrin with different surface structure

#### Summary

*It has been shown that on the surface of fibrin clots, which are formed at the interface between two phases excluding interpenetration of one phase into another one, the structure is being formed (a surface layer), which differs from the clot structure. At the absence of the interface, the formation of the layer on fibrin clot is not formed. There is an assumption that the creation of this structure is connected with the disturbance of the process of lateral association of fibrillar structures in fibrin clot, which takes place at the interface. The surface layer is formed by protofibrillar structures, which are spread flat on the interface and form compact unregulated structure which can be seen on electron microscope photographs. The revealed structure peculiarities of fibrin clots, caused by their formation conditions (presence or absence of the surface layer), determine the manner of the clots interaction with the components of fibrinolytic system, which can be the reason of differences in the degree of the fibrin clots resistance in blood circulation.*

*Key words: fibrinogen, fibrin clot, electron microscopy.*

A. H. Savchuk, V. I. Chernyshov, G. L. Volkov

Исследование свойств сгустков, сформированных с дезАА- и дезААВВ-фибрина, с различной структурой поверхности

#### Резюме

*Показано, что на поверхности фибриновых сгустков, формирующихся на границе раздела двух фаз при условии исключения взаимопроникновения одной фазы в другую, образуется структура (поверхностный слой), отличающаяся от таковой сгустка. При отсутствии границы раздела двух фаз формирования указанного слоя в фибриновом сгустке не наблюдается. Сделано предположение, что возникновение данной структуры связано с нарушением процесса латеральной ассоциации фибриллярных структур в фибриновом сгустке, происходящем на границе раздела фаз. Поверхностный слой образован протофибриллярными структурами, расплывающимися на границе раздела и формирующими плотную неупорядоченную структуру, которая и наблюдается на электронномикроскопических фотографиях. Обнаруженные особенности структуры фибриновых сгустков, связанные с условиями их формирования (наличие или отсутствие поверхностного слоя), определяют характер протекания процессов взаимодействия сгустков с компонентами фибринолитической системы, что может лежать в основе различий в степени устойчивости фибриновых сгустков в кровеносном русле.*

*Ключевые слова: фибриноген, фибриновый сгусток, электронная микроскопия.*

#### ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Mosseson M. W. Thrombin interactions with fibrinogen and fibrin // Seminar in Thromb. and Haemost.—1993.—19.—P. 361—367.
2. Belitser V. A., Varetskaya T. V. Molecular mechanisms of fibrin polymerization and anticoagulant action of fibrinogen and fibrin degradation product // Thrombosis and Thrombolysis / Eds E. I. Chazov, V. N. Smirnov.—New York; London, 1986.—P. 1—32.
3. Белицер В. А. Домены — крупные, функционально важные блоки молекул фибриногена и фибрина // Биохимия животных и человека.—1982.—6.—С. 38—63.
4. Muller M. F., Ris H., Ferry J. D. Electron microscopy of fine fibrin and fine and coarse fibrin films. Observation of fibers in cross-section and in denatured states // J. Mol. Biol.—1984.—174.—P. 369—384.
5. Medved L., Ugarova T., Veklich Y., Lukinova N., Weisel J. Electron microscope investigation of the early stages of fibrin assembly. Twisted protofibrils and fibers // J. Mol. Biol.—1990.—216.—P. 1—7.
6. Alving B. M., Weinsten M. J., Finlayson J. S., Menitove J. E., Fratantoni J. C. Fibrin sealant: summary of a conference on characteristics and clinical uses // Transfusion.—1995.—35.—P. 783—790.
7. Brennan M. Fibrin glue // Blood Rev.—1991.—5.—P. 240—244.
8. Goins K. M., Khadem J., Majimudar P. A., Eznest J. T. Protodynamic biological tissue glue to enhance corneal wound healing after radial keratotomy // J. Cataract. Refract. Surg.—1997.—23.—P. 1331—1338.
9. Overbeeke J. J., Cruysberg J. R., Menowsky T. Intracranial repair of a divided trochlear nerve. Case report // J. Neurosurgery.—1998.—88.—P. 336—339.
10. Варецька Т. В. Мікроретерогенність фібриногену. Кріо-фібриноген // Укр. біохім. журн.—1960.—32, № 2.—С. 13—24.
11. Mosseson M. The preparation of human fibrinogen free of plasminogen // Biochim. et biophys. acta.—1962.—52.—P. 204—213.
12. Laemmli K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature.—1970.—227.—P. 680—685.
13. Robbins K. C., Summaria L. Plasminogen and plasmin // Meth. Enzymol.—1976.—45.—P. 257—273.
14. Savchuk A., Makogonenko E., Chernyshov V., Cederholm-Williams S. Structure and resistance to plasminolysis of fibrin clots formed in tube or inside agar gel // XVth Int. Congr. on Fibrinolysis and Proteolysis.—Hamamatsu, 2000.—Abstr. 111.
15. Позднякова Т. М., Рыбачук В. Н., Вовк Е. В. Дослідження комплексоутворення фрагмента Д з мономерним фібрином методом фракційного висолювання // Біохімія.—1982.—47, № 6.—С. 971—976.
16. Carr M. E., Gabriel Don A., McDonagh J. Influence of Ca on the structure of reptilase-derived and thrombin-derived fibrin gels // Biochem. J.—1986.—239.—P. 513—516.
17. Hantgan R., Fowler W., Erickson H., Hermans J. Fibrin assembly: a comparison of electron microscopic and light scattering results // Thromb. Haemost.—1980.—44.—P. 119—124.

УДК 577.112.7 + 612.115  
Надійшла до редакції 17.05.04