



Е. А. Чернявский, Ю. А. Лесникович, И. С. Стреха,
И. Э. Адзериho, В. М. Шкуматов

ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ПРОКОАГУЛЯНТНОГО СОСТОЯНИЯ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА, ИНДУЦИРУЕМОГО ДЕЙСТВИЕМ НИЗКОЧАСТОТНОГО УЛЬТРАЗВУКА

Фармакологический тромболитический с использованием различных активаторов плазминогена и механическое воздействие являются широко используемыми подходами для лечения артериальных и венозных тромботических заболеваний. Однако эти методы не всегда приводят к восстановлению кровотока, и успех терапии ограничен реокклюзиями, а также побочными эффектами в виде таких осложнений, как кровотечения, инсульт, эмболизация сгустка и разрушение стенки сосудов [1, 2]. В последнее время исследованиями *in vitro* [3–8], в экспериментах на животных [9–11] и начальными клиническими испытаниями [12, 13] было показано, что применение ультразвука (УЗ) в тромболитической терапии приводило к повышению эффективности тромболитического действия и уменьшению вероятности возникновения различных осложнений. В настоящее время выделены два основных направления применения УЗ в тромболитической терапии: использование УЗ высокой интенсивности для механического разрушения тромбов и низкой интенсивности для усиления ферментативного фибринолиза [5]. УЗ высокой интенсивности разрушает сгусток без участия активаторов плазминогена [1, 13]. УЗ низкой интенсивности усиливает ферментативный тромболитический за счет возрастания скорости молекулярной диффузии к поверхности сгустка [8, 14], обратимых изменений структуры фибрина [1, 14] и увеличения связывания тканевого активатора плазминогена с фибрином [1]. Недавние исследования показывают, что низкочастотный УЗ в диапазоне 20–40 кГц обладает лучшей тканевой проницаемостью, меньшим температурным эффектом и является более эффективным для лизиса тромбов [1, 11, 15].

Известно, что тромболитическая терапия уже одной только стрептокиназой или тканевым активатором плазминогена вызывает предтромботическое состояние, связанное с увеличением активности тромбина [16, 17]. Этим объясняется возникновение реокклюзий у 3–6 % пациентов после успешного тромболитического действия [2, 17]. Предложен ряд механизмов для объяснения предтромботического состояния, индуцируемого тромболитической терапией. Один из них предполагает образование свободного плазмина в результате системного лизиса, который может быть триггером коагуляции, активируя факторы контактного пути свертывания, фактор V, и, возможно, протромбин [17, 18]. Другой возможный механизм заключается в том, что тромбин, связанный с фиб-

рином, защищен от инактивации ингибиторами плазмы и способен проводить локальную активацию тромбоцитов и ускорять коагуляцию [16]. Кроме того, причиной прокоагулянтного состояния может быть высвобождающийся из лизированного тромба свободный тромбин. При этом тромбин может связываться с растворимыми продуктами деградации фибрина, что защищает его от действия ингибиторов [18]. Ранее было показано, что воздействие УЗ в сочетании со стрептокиназой, способствуя ускорению разрушения тромбов за счет активации пламиногена, одновременно сопровождалось активацией и тромбиновой системы [19]. Этот эффект в значительной степени обусловлен тем, что режимы УЗ-обработки подбирались на основании данных по общему состоянию гемостаза, не всегда четко отражающих возможные тонкие структурно-функциональные нарушения белков систем коагуляции и фибринолиза.

В настоящей работе был использован высокоочищенный нативный ингибитор сериновых протеаз (серпин) – антитромбин III (АТ III) и смесь четырех неактивированных факторов свертывания крови в виде препарата PPSB (протромбин – проконвертин – фактор IX – фактор X) для выявления белкового компонента(ов), наиболее чувствительного(ных) к действию УЗ. Рентгеноструктурные и биохимические исследования позволили обосновать значение полимерных агрегатов, нативной и латентной форм серпина в возможном развитии ряда патологий [20–24]. Интерес к различного рода конформерам АТ III в последнее время возрос в связи с обнаружением противоангиогенных и противоопухолевых свойств модифицированных форм этого ингибитора [25]. Препарат для заместительной терапии гемофилии В – PPSB-концентрат, на наш взгляд, является удобной моделью для изучения возможности активации факторов свертывания под действием УЗ, исходя из предпосылки, что даже локальная активация этих факторов может служить пусковым механизмом развития прокоагулянтного состояния. В целом установление специфических структурно-функциональных изменений АТ III и ферментов коагуляции необходимо для определения пороговых режимов УЗ-разрушения тромбов, а также проведения соответствующей фармакотерапии, что позволит минимизировать побочные эффекты акусто-ферментативного тромболитика.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выделение АТ III. АТ III выделяли из свежезамороженной плазмы доноров, используя фракционирование полиэтиленгликолем 6000 (20 %, масса/объем), после чего супернатант разводили равным объемом уравнивающего буфера (0,05 М натрий-фосфатный буфер, рН 7,4, содержащий 0,15 М NaCl, 10 мМ цитрата натрия, 5 мМ ЭДТА). Эту смесь наносили на колонку с гепарин-сефарозой, которую последовательно промывали уравнивающим буфером, а затем этим же буфером с 0,4 М NaCl. АТ III элюировали, используя градиент концентрации NaCl в уравнивающем буфере от 0,4 до 2 М. Фракцию, элюируемую при концентрации NaCl 0,8–1,0 М, диализовали против 0,05 М натрий-фосфатного буфера (рН 7,4), содержащего 0,15 М NaCl и хроматографировали на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой DE 52 («Wathman») в режиме негативной адсорбции примесных белков. Белковый материал, элюируемый в свободном объеме колонки, концентрировали в центрифужных ультрафильтрационных картриджах с пределом

по молекулярной массе 30 кДа Centricon30 («Amicon»). Примесь полимерных агрегатов АТ III удаляли гель-хроматографией на колонке с сефадексом G-150 («Amersham Pharmacia Biotech»). С учетом возможного образования латентной формы, агрегатов и протеолитически модифицированного серпина процедуру выделения до стадии гель-хроматографии проводили в присутствии 0,1 мМ фенилметилсульфотрида при температуре 5–8 °С, исключая стадии лиофилизации. Чистота антитромбина подтверждалась ПААГ-электрофорезом в присутствии додецилсульфата натрия (DS-Na-ПААГ-электрофорез), а наличие агрегатов – гель-электрофорезом в неденатурирующих условиях с использованием прерывной буферной системы [26]. В качестве стандартов для электрофореза использовались фосфоорилаза b 94 кДа, альбумин из бычей сыворотки 67 кДа, овальбумин 43 кДа, карбоангидраза 30 кДа, соевый ингибитор трипсина 20 кДа, α -лактальбумин 14,4 кДа («Pharmacia Biotech»). Концентрацию АТ III определяли спектрофотометрически, используя значение коэффициента молярного поглощения ($\epsilon_{280 \text{ нм}}$) 37 700 М⁻¹·см⁻¹ [24].

Жидкостную хроматографию низкого давления проводили с использованием автоматической системы «GradiFrac», включающей программируемый коллектор фракций, проточный УФ-монитор ($\lambda = 280 \text{ нм}$), градиентный смеситель, перистальтический насос («Pharmacia Biotech»), в режимах градиентного или изократического элюирования. Аффинную хроматографию в аналитическом варианте для оценки нативной и латентной форм АТ III проводили на колонке (0,8×2,5 см) с гепарин-сефарозой при 5–8 °С.

Источник ультразвука. В качестве источника УЗ использовали аппарат для разрушения тромбов «Пульсар» АРТ-УН1, разработанный в Белорусской государственной политехнической академии (Минск, Беларусь). Аппарат включает УЗ-генератор с регулируемой мощностью и ультразвуковую колебательную систему, состоящую из пьезоэлектрического преобразователя ультразвуковых колебаний, гибкой волноводной системы переменного сечения длиной 560 мм для концентрирования УЗ-колебаний на рабочий инструмент. Диаметр конечной ступени волновода – 0,8 мм, диаметр излучающей поверхности рабочего инструмента – 1,8 мм, регулирование интенсивности УЗ-колебаний – от 1 до 30 Вт/см². В тех случаях, когда это дополнительно не оговаривалось, озвучивание проводили при частоте 26 кГц и интенсивности УЗ 26 Вт/см². Кювета, содержащая озвучиваемые растворы белков (0,5–1,0 мг в 1 мл) в 0,05 М натрий-фосфатном буфере (рН 7,4) с 0,15 М NaCl, термостатировалась при 37 °С (при УЗ-обработке температура повышалась не более чем на 0,5 °С). Непосредственно перед обработкой УЗ АТ III подвергали дополнительной хроматографии на колонке с гепарин-сефарозой для отделения спонтанно образующейся латентной формы и диализовали против буфера для озвучивания, а PPSB-концентрат диализовали против этого же буфера для удаления маннитола.

Содержание функционально активного АТ III после воздействия УЗ рассчитывали, используя очищенный АТ из плазмы человека в качестве стандарта. Калибровочную кривую получали в результате инкубации известного количества контрольного стандарта в диапазоне от 2 до 20 нмоль в присутствии 20-кратного молярного избытка полноразмерного нефракционированного гепарина (M_r 17 500 Да) с постоянным количеством тромбина (8 нмоль) в объеме 200 мкл в течение 40 мин при 37 °С в 0,05 М натрий-фосфатном буфе-

ре (рН 7,4), содержащем 0,1 М NaCl. После инкубации остаточную тромбинную активность определяли добавлением смеси к 1,8 мл этого же буфера, содержащего 100 мкМ субстрата S-2238 (H-D-Phe-Pip-Arg-pNA, «Chromogenix»). Начальную скорость гидролиза субстрата S-2238 со свободным тромбином [27] измеряли в двойном эксперименте по поглощению высвобождаемого *n*-нитроанилидного фрагмента при 405 нм на спектрофотометре «Shimadzu 1202» с использованием программы кинетических измерений.

Высокоэффективную жидкостную хроматографию высокого давления (ЖХВД) проводили на хроматографе «Shimadzu LC-10AD» с использованием UV/VIS фотодиодного детектора SPD-M10A. Для гель-проникающей хроматографии применяли колонку «SPHEROGEL TSK» (7,5 x 300 мм) («Beckman»), а для анионообменной хроматографии – колонку «ET NUCLEOSIL 4000-7 PEI» (4x125 мм) («Macherey-Nagel»). Голубой декстран ($2 \cdot 10^6$ Да) использовали для определения свободного объема колонки для гель-проникающей хроматографии, которую калибровали с использованием тироглобулина, γ -глобулина, овальбумина и цитохрома *c* с M_r , равными 670, 158, 45 и 12,5 кДа соответственно. Условия хроматографии и обработка хроматограмм (форма градиента, интегрирование площадей пиков, скорость подачи элюента) задавались программным обеспечением Shimadzu CLASS VP (Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние ультразвука на структурно-функциональные переходы: нативный – латентный – агрегатный АТ III. Использовали высокоаффинный к гепарину нативный серпин, полученный аффинной хроматографией непосредственно перед проведением экспериментов (время хранения при 5 °С не превышало 2 сут). Обработку УЗ проводили при 37 °С в 0,05 М натрий-фосфатном буфере (рН 7,4) при концентрации серпина 0,5–1 мг/мл и интенсивности УЗ 5–26 Вт/см² с частотой 26 кГц. В специальных опытах установлено, что при интенсивности УЗ в диапазоне 5–15 Вт/см² заметных отличий при оценке содержания АТ III по остаточной амидолитической активности тромбина по сравнению с инкубацией при 37 °С не наблюдалось. На рис. 1 приведены хроматограммы образцов АТ III, иллюстрирующие воздействие на белок УЗ более высокой мощности (26 Вт/см²) и температуры 37 °С. Инкубация при 37 °С в течение 1 ч сопровождалась некоторым увеличением содержания агрегатов (пик 1, $M_r > 400\,000$, 6,9 %) по сравнению с исходным образцом (1,2 %), а суммарное количество латентной и нативной форм в смеси составляло 93,2 % (M_r 65 000, пик 2), тогда как в озвученном образце при этой же температуре содержание агрегатных полимеров достигало 23,7 %, а смеси латентной и нативной форм уменьшалось до 76,3 %. На вставках на рис. 1 изображены электрофореграммы образцов АТ III после гель-электрофореза в неденатурирующих условиях, которые подтверждают образование полимерных форм АТ III (рис. 1, б и в) по сравнению с исходным образцом (рис. 1, а). Из полученных результатов следует, что высокоочищенный АТ III в отсутствие стабилизирующих добавок (маннитол, цитрат натрия, глицерин, альбумин) способен уже при температуре 37 °С к переходу в агрегатные формы. Действие УЗ значительно усиливает этот эффект. Интересно, что по данным ЖХВД образование полимерных агрегатов не происходило через димерную фор-

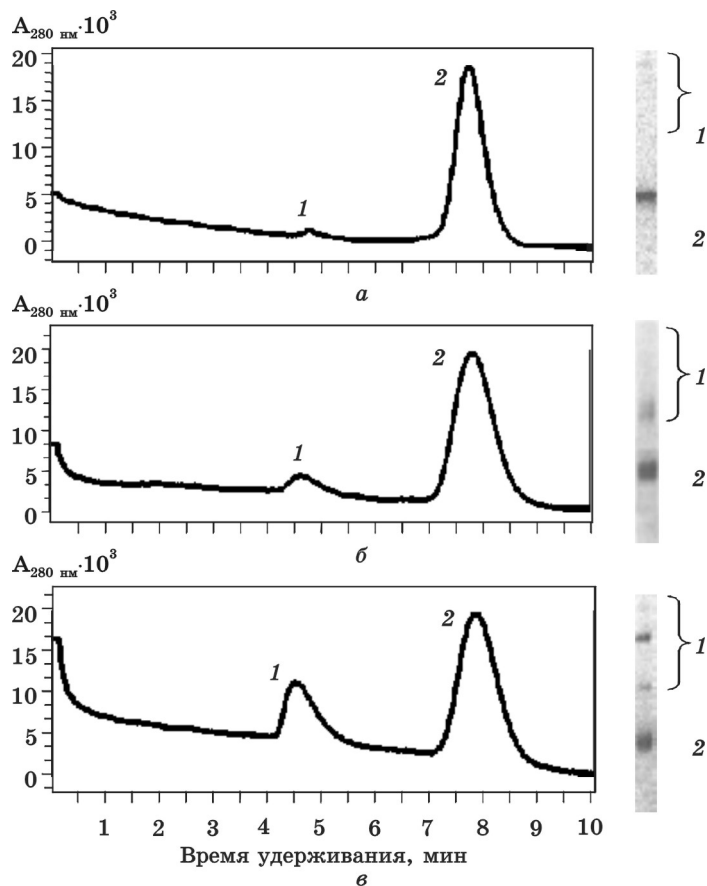


РИС. 1. Анализ методами гель-проникающей ЖХВД и гель-электрофореза образования агрегатов (1) и содержания мономерной формы (2) АТ III:

a – исходный АТ III, *б* – образец АТ III, инкубированный 1 ч при 37 °С, *в* – образец АТ III, подвергнутый воздействию УЗ (26 Вт/см², 26 кГц) при 37 °С в течение 1 ч. На вставках справа приведены электрофореграммы соответствующих образцов АТ III, полученные после гель-электрофореза в неденатурирующих условиях

му, которая являлась определяющей при проведении кристаллизации для рентгеноструктурных исследований этого серпина [28, 29]. Как правило, белковые агрегаты образуются за счет слабых нековалентных взаимодействий, таких как водородные связи, гидрофобные взаимодействия. Поскольку АТ III – одноцепочечный гликопротеид, а 6 остатков цистеина образуют три дисульфидные связи [30], то не исключена возможность ковалентных межмолекулярных сшивок дисульфидными мостиками. Проведение гель-электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия без предварительного восстановления белка 2-меркаптоэтанолом показало отсутствие межмолекулярных дисульфидных связей. Это подтверждает, что агрегация не является следствием реакций тиол-дисульфидного обмена в ходе процессов разворачивания – свертывания, индуцируемых воздействием УЗ.

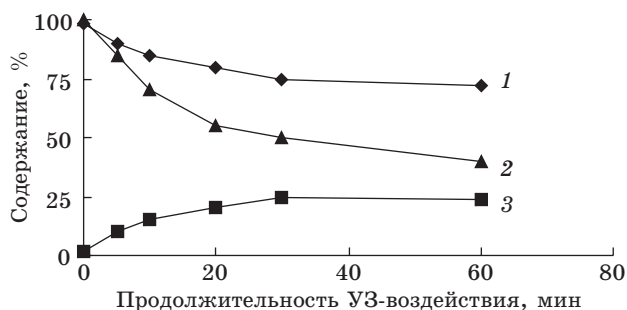


РИС 2. Зависимость содержания мономерной (1), агрегатной форм (2) и активного АТ III (3) от продолжительности непрерывного УЗ-воздействия

На рис. 2 приведено изменение содержания агрегатных форм ($M_r > 400\,000$ Да) и мономерного белка ($M_r\ 65\,000$ Да), а также АТ III, оцениваемого по остаточной активности тромбина с хромогенным субстратом S-2238, в зависимости от продолжительности воздействия УЗ. Общей закономерностью при различных временных интервалах УЗ-экспонирования являлось увеличение содержания агрегатов при пропорциональном уменьшении содержания исходного белка, что свидетельствовало о том, что другие агрегатные формы различной кратности (димеры, тримеры, тетрамеры) являлись интермедиатами при образовании агрегатов ($M_r > 400\,000$ Да). Из рис. 2 видно, что доля агрегатов от общего количества АТ III не превышает 25 %. Вместе с тем параллельно измеряемая остаточная амидолитическая активность тромбина (количество нативного АТ III) уменьшалась значительно существеннее, чем можно было объяснить, исходя из образования только функционально неактивных агрегатов. Такой формой могла являться латентная форма АТ III, обладающая пониженным сродством к гепарину, или протеолитически модифицированный конформер серпина [21, 22, 31]. Для проверки этого предположения была проведена аналитическая аффинная хроматография на колонке с гепарин-сефарозой озвученного образца АТ III (рис. 3). На профиле элюирования четко видны три пика: пик I (12 % от общего количества белка) содержал белковый материал, элюируемый в свободном объеме колонки, пик II (48 %) содержал белок, элюируемый при концентрации NaCl 0,35–0,4 М и, наконец, пик III (40 %) содержал высокоаффинный к иммобилизованному лиганду белок (элюирование достигалось при концентрации NaCl 0,9–1,0 М). DS-Na-ПААГ-электрофорез показал, что все три пика содержали одну мономерную форму белка с $M_r\ 65\,000$ Да, что говорило об отсутствии расщепления полипептидной цепи серпина или образования ковалентных межмолекулярных сшивок. Объединенные фракции были сконцентрированы примерно в 10 раз в центрифужных ультрафильтрационных картриджах, и с помощью гель-проникающей ЖХВД было установлено, что белок фракции I, не взаимодействующий с иммобилизованным гепарином, являлся исключительно нековалентным полимером (агрегатом), а низкоаффинная фракция II (латентная форма) состояла на 90 % из протомерной формы серпина и на 10 % из агрегатов. Фракция III представля-

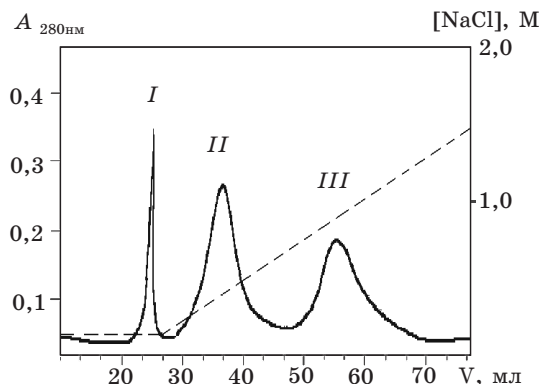


РИС. 3. Аффинная хроматография АТ III, подвергнутого действию УЗ (26 Вт/см^2 , 26 кГц , $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 1 ч), на колонке с гепарин-сефарозой: I, II и III – объединенные фракции для последующего концентрирования и анализа гелепроникающей ЖХВД

ла собой высокоаффинный к гепарину нативный серпин. Состав различных форм АТ III по данным гелепроникающей ЖХВД и аффинной хроматографии представлен в табл. 1.

Таблица 1

Содержание агрегатной, латентной и нативной форм АТ III по данным гелепроникающей ЖХВД и аффинной хроматографии на гепарин-сефарозе

Образец	Агрегаты, %	Латентная форма, %	Нативная форма, %
Исходный АТ III	1,2	–	98,8
АТ III (1ч, $37 \text{ }^\circ\text{C}$)	6,9	27,3	65,8
АТ III (УЗ, 1 ч, $37 \text{ }^\circ\text{C}$)	23,7	40,6	35,7

Из полученных результатов следовало, что действие УЗ сопровождалось увеличением образования как ингибиторно неактивной латентной формы, обладающей по отношению к гепарину пониженным сродством, так и агрегатов, не образующих комплексов с гепарином.

Исследовано также влияние различных добавок на процессы индуцированного УЗ образования агрегатных и латентной форм АТ III. Использовали как природный физиологический комплексообразующий эффектор гепарин [32–34], так и его полусинтетический аналог пентозанполисульфат, представляющий собой высокосульфатированную поликсилозу, статистически содержащую на каждой десятой единице одну глюкуроновую группу [35]. Кроме того, в качестве протектора образования агрегатов применили цитрат натрия [21]. Полученные результаты приведены в табл. 2.

Содержание агрегатов и мономерных форм оценивали гелепроникающей ЖХВД нативной формы – по остаточной амидолитической активности тромби-

на, используя для построения калибровочного графика нативный препарат АТ III (агрегаты не более 2 %). Количество латентной формы определяли как разность между общим содержанием исходного АТ III и суммой мономерной и агрегатной форм, поскольку проведение аналитической аффинной хроматографии на колонке с гепарин-сефарозой для оценки латентной формы было затруднено вследствие элюирования различных форм АТ III в свободном объеме колонки из-за наличия растворимых лигандов – гепарина или пентозанполисульфата. Содержание агрегатов, латентной и нативной форм для образцов АТ III, подвергнутых воздействию УЗ без введения протектирующих добавок, находилось на близком уровне как по определению сочетанием аффинной хроматографии и ЖХВД (табл.1), так и сочетанием ЖХВД и остаточной активности тромбина (табл.2). В присутствии гепарина содержание нативной формы было наивысшим (85,2 %), тогда как цитрат натрия и пентозанполисульфат оказывали примерно одинаковый стабилизирующий эффект (нативная форма составляла соответственно 69,7 и 63,6 %). При всех протектирующих добавках количество агрегатов составляло 6–12 % при пропорциональном уменьшении мономерных форм. Вместе с тем гепарин оказывал наиболее существенное влияние на образование латентной формы (ее содержание составляло 9,2 %), в то время как цитрат натрия и пентозанполисульфат существенно менее эффективно стабилизировали нативную форму – содержание латентной формы составляло соответственно 22,3 и 24,4 % (табл. 2).

Таблица 2

Содержание агрегатной, латентной и нативной форм АТ III при обработке образцов белка УЗ в присутствии различных эффекторов

Образец	Агрегаты, %	Латентная форма, %	Нативная форма, %
АТ III, УЗ, 37 °С, 1 ч	22,2	37,8	40,0
АТ III + гепарин (0,2 мМ)	5,6	9,2	85,2
АТ III + пентозанполисульфат (0,2 мМ)	12,0	24,4	63,6
АТ III + цитрат натрия (0,25 М)	8,0	22,3	69,7

Полученные результаты свидетельствовали о том, что воздействие УЗ дестабилизировало молекулу нативного АТ III за счет разрушения внутримолекулярных нековалентных связей, в результате чего происходило образование агрегатов и латентной формы. Латентная форма АТ III является наиболее устойчивой конформацией серпина [21]. Механизм образования полимерных агрегатов не известен, но по аналогии с образованием димеров [23] можно предположить, что они имеют линейный характер: центральная реактивная петля одной молекулы АТ III входит в другую молекулу с образованием неактивной формы, та в свою очередь отдает свою центральную реактивную петлю в следующую молекулу и т. д. Межмолекулярные ковалентные сшивки в результате модификации кислородсодержащими радикалами остатков цистеина или ароматических аминокислот исключены, или в данных условиях озвучивания их обнаружение находится за пределами чувствительности ЖХВД и гель-электрофореза. В присутствии гепарина АТ III более устойчив к действию

УЗ (по критериям образования агрегатов и латентной формы), чем в присутствии цитрата натрия или пентозанполисульфата. Комплекс АТ III и гепарина стабилизирован большим числом водородных связей между сульфатными и карбоксильными группировками пентасахаридной последовательности молекулы гепарина и остатками Arg и Lys молекулы ингибитора. При комплексообразовании центральная реактивная петля серпина располагается в более экспонированной ориентации в результате закрытия А-слоя и удлинения спирали D, на которой происходит смещение зарядов [32]. Очевидно, сульфатированные полисахариды, как достаточно большие полианионы, в различной степени блокируют конформационные изменения молекул АТ III, способствующие их слиянию в полимерные агрегаты. На основании полученных результатов нельзя исключить, что в условиях обработки тромбов *in vivo* действие УЗ может оказаться фактором, ускоряющим процесс локального образования конформационно неактивных форм серпина и, следовательно, повышенной активности факторов свертывания крови.

Влияние УЗ на комплексный препарат PPSB. Молекулярными мишенями АТ III являются прежде всего активированные факторы свертывания крови – тромбин (FIIa) и фактор Ха. В настоящее время благодаря биохимическим и рентгеноструктурным исследованиям хорошо обоснован механизм конформационной активации АТ III гепарином с последующим молекулярным «захватом» молекулами серпина соответствующих активированных факторов. Вначале необходимо было выявить возможность прямого действия УЗ на неактивированные факторы свертывания. Для этого был использован PPSB-концентрат, содержащий смесь IX, II, VII и X факторов свертывания крови. Для оценки изменения содержания неактивированных факторов под действием УЗ применяли ЖХВД для разделения белковых факторов PPSB-комплекса в неденатурирующих условиях.

Сильный катионообменник с привитыми остатками сульфоновой кислоты (Nucleogel SCX 1000-8/46) или гидрофобный носитель с фенильными остатками (TSK Phenyl-5PW) при ЖХВД в различных режимах хроматографии не позволили добиться удовлетворительных результатов разделения. Как и предполагалось на основании значений изоэлектрических точек отдельных факторов, наилучшие результаты были получены при использовании анионообменной ЖХВД на полиэтилениминосодержащем носителе (Nucleosil 4000-7 PEI). В качестве иллюстрации на рис. 4 представлены профили элюирования при ЖХВД контрольного (37 °С, 1 ч) и озвученного (26 Вт/см², 37 °С, 1 ч) образцов PPSB-концентрата. Интегрирование пиков позволило установить (с учетом поправок на коэффициенты молярного поглощения при 280 нм для индивидуальных факторов) относительное содержание факторов свертывания в озвученном образце: фактор VII – 15 %, фактор X – 22 %, фактор II – 28 % и фактор IX – 35 %. Эти значения соответствуют данным спецификации препарата по относительной активности и в пределах точности ЖХВД близки к контрольному образцу PPSB-комплекса. Необходимо отметить, что ЖХВД проводилась в неденатурирующих условиях, поэтому образование «легких» и «тяжелых» цепей как продуктов активации проферментов не фиксировалось из-за наличия межцепочечных дисульфидных связей. Близкий характер профилей элюирования позволил сделать заключение, что акустохимические реакции не вызывали значительных нару-

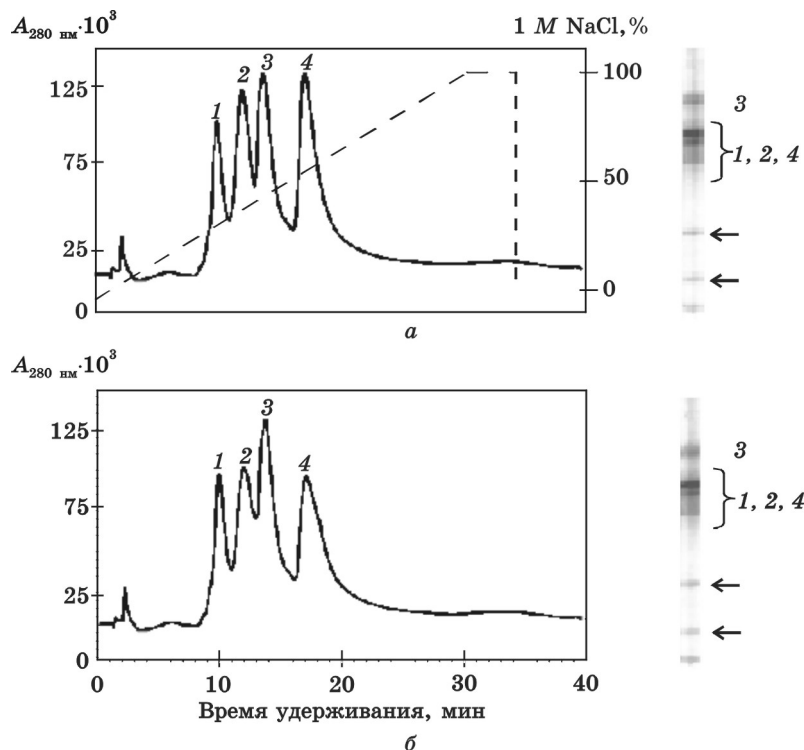


РИС. 4. Анализ методом анионообменной ЖХВД и DS-Na-ПААГ-электрофореза белков PPSB-комплекса после инкубации при 37 °С в течение 1 ч контрольного (а) и озвученного в течение 1 ч при 37 °С (б) образцов: 1 – фактор VII, 2 – фактор X, 3 – фактор II, 4 – фактор IX. Стрелками на электрофореграммах показаны «тяжелые» и «легкие» цепи факторов

шений структуры белков (модификация боковых радикалов аминокислот, ковалентная или нековалентная агрегация). При гель-электрофорезе как контрольный, так и озвученный образцы PPSB-комплекса характеризовались близким количественным и качественным распределением полипептидных цепей (вставки на рис. 4). Было обнаружено дополнительное незначительное накопление «тяжелых» и «легких» цепей по сравнению с исходным PPSB-комплексом, что свидетельствовало о минорной активации проферментов за счет следов эндогенных активированных протеиназ [36]. УЗ не промотировал эндогенный протеолиз и соответствующую активацию факторов свертывания в препарате PPSB. Устойчивость проферментов коагуляции к действию УЗ может быть обусловлена уникальной структурной организацией этих белков [37]. Они являются 4-доменными гликопротеидами, которые вследствие наличия углеводных компонентов устойчивы к повреждению за счет свободных радикалов, генерируемых кавитацией [38]. Кроме того, в молекулах этих белков имеются многочисленные внутрицепочечные дисульфидные связи, которые могут препятствовать разворачиванию и денатурации нативных белковых глобул под действием УЗ. Необходимо также

учитывать, что PPSB-концентрат содержит в своем составе гепарин, который может стабилизировать белки за счет комплексообразования, а также являться эффективной «ловушкой» свободных радикалов. В частности, сульфатированные полисахариды могут выступать как комплексообразующие лиганды и межмолекулярные нековалентно сшивающие реагенты для белков PPSB-концентрата [39]. Несмотря на отсутствие выраженного прямого действия, детальный анализ воздействия УЗ на полноту и кинетику активации проферментов коагуляции в различных условиях является предметом последующих исследований, так как функциональные модели могут быть более информативными при оценке акустохимических воздействий. В частности, ранее нами показано, что при превышении терапевтических доз УЗ-обработки белковый активатор плазминогена – стрептокиназа подвергалась необратимой агрегации, а также разворачиванию с повышением доступности для протеолитической атаки продуктом активации – плазмином [40], а структурно-функциональная модель активации эквиволярной смеси проферментов трипсиногена и химотрипсиногена показала, что наиболее чувствительным компонентом к воздействию УЗ являлся трипсин [41].

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (гранты Б00-259 и Б00М-027).

ЛИТЕРАТУРА

1. Francis C. W., Suchkova V. N. // *Vasc. Med.* 2001. Vol. 6. P. 181.
2. White H. D., Von de Werf F. // *Circulation.* 1998. Vol. 97. P. 1632.
3. Dhond M. R., Nguyen T. T., Dolan C. et al. // *J. Amer. Soc. Echocardiogr.* 2000. Vol. 13. P. 1025.
4. Francis C. W. // *Echocardiography.* 2001. Vol. 18. P. 239.
5. Gaul G. B. // *Thromb. Haemost.* 1999. Vol. 82. P. 157.
6. Luo H., Birnbaum Y., Fishbein M. C. et al. // *Thromb. Res.* 1998. Vol. 89. P. 171.
7. Pfaffenberger S., Devcic-Kuhar B., El-Rabadi K. et al. // *Thromb. Haemost.* 2003. Vol. 89. P. 583.
8. Sakharov D. V., Hekkenberg R. T., Rijken D. C. // *Thromb. Res.* 2000. Vol. 100. P. 333.
9. Riggs P. N., Francis C. W., Bartos S. R. et al. // *Cardiovasc. Surg.* 1997. Vol. 5. P. 201.
10. Siegel R. J., Atar S., Fishbein M. C. et al. // *Echocardiography.* 2001. Vol. 18. P. 247.
11. Suchkova V. N., Baggs R. B., Francis C. W. // *Circulation* 2000. Vol. 101. P. 2296.
12. Rhodes J. M., Cho J. S., Glociczki P. et al. // *J. Vasc. Surg.* 2000. Vol. 31. P. 1193.
13. Rosenschein U., Brosh D., Halkin A. // *Curr. Interv. Cardiol. Rep.* 2001. Vol. 3. P. 5.
14. Braaten J., Goss R. A., Francis C. W. // *Thromb. Haemost.* 1997. Vol. 78. P. 1063.
15. Nedelmann M., Eicke B. M., Lierke E. G. et al. // *J. Ultrasound. Med.* 2002. Vol. 21. P. 649.
16. Herault J. P., Bernat A., Pflieger A. M. et al. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1997. Vol. 283. P. 16.
17. Hoffmeister H. M., Szabo S., Kastner C. et al. // *Circulation.* 1998. Vol. 98. P. 2527.
18. Weitz J. I., Leslie B., Hudoba M. // *Circulation.* 1998. Vol. 97. P. 544.
19. Mrochek A. G., Adzerikho I. E., Dmitriev V. V. // *Hospitalis.* 1997. Vol. 67. P. 7.
20. Carrel R. W., Ewans D. L., Stein P. E. // *Nature.* 1991. Vol. 353. P. 576.
21. Wardell M. R., Chang W. S., Bruce D. et al. // *Biochemistry.* 1997. Vol. 36. P. 13133.
22. Beauchamp N. J., Pike R. N., Daly M. et al. // *Blood.* 1998. Vol. 92. P. 2696.
23. Huntington J. A., McCoy A., Belzar K. J. et al. // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275. P. 15377.
24. Desai U., Swanson R., Bock S. C. et al. // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275. P. 18976.

25. O'Reilly M. S., Pirie-Shepherd S., Lane W. S., Folkman J. // *Science*. 1999. Vol. 285. P. 1926.
26. Laemmli U. K. // *Nature*. 1970. Vol. 227. P. 680.
27. Desai U. R., Petitou M., Bjork I., Olson S. T. // *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273 P. 7478.
28. Schreuder H. A., de Boer B., Dijkema R. et al. // *Nat. Struct. Biol.* 1994. Vol. 1. P. 48.
29. Carrell R. W., Stein P. E., Fermi G., Wardell M. R. // *Structure*. 1994. Vol. 2. P. 257.
30. Kridel S. J., Knauer D. J. // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272. P. 7656.
31. Picard V., Marque P-E., Paolucci F. et al. // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274. P. 4586.
32. Jin L., Abrahams J.P., Skinner R. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. Vol. 94. P. 14683.
33. Ersdal-Badju E., Lu A., Zuo Y. et al. // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272. P. 19393.
34. Meagher J. L., Huntington J. A., Fan B., Gettins P. G. W. // *J. Biol. Chem.* 1996. Vol. 271. P. 29353.
35. Scully M. F., Kakkar V. V. // *Thromb. Res.* 1984. Vol. 36. P. 187.
36. Лесникович Ю. А., Шкуматов В. М. // *Вестн. Белорус. ун-та. Сер. 2.* 2000. № 1. С. 31.
37. Internet: www.expasy.org/sprot <<http://www.expasy.org/sprot>>.
38. Гринцевич Е. Э., Адзерихо И. Э., Мрочек А. Г., Метелица Д. И. // *Биохимия*. 2001. Т. 66. С. 913.
39. Шкуматов В. М., Лесникович Ю. А., Рудой А. Л. // *Изв. НАН Беларуси. Сер. хим. н.* 2000. № 2. С. 86.
40. Лесникович Ю. А., Адзерихо И. Э., Шкуматов В. М. // *Вопр. мед. химии*. 2003 (в печати).
41. Ovsianko S. L., Chernyavsky E. A., Minchenya V. T. et. al. // *Ultrason. Sonochem.* 2003 (в печати).