



УДК 577.112:612.115

© 2010

П. Г. Гриценко, член-кореспондент НАН України **Е. В. Луговської**,
Т. А. Кошель, **С. О. Черенок**, **О. А. Ющенко**, **В. І. Чернишов**,
член-кореспондент НАН України **В. І. Кальченко**,
академік НАН України **С. В. Комісаренко**

Вплив каліксарен-метиленбісфосфонових кислот на полімеризацію фібрину

Досліджено вплив каліксарен-диметиленбісфосфонової (С-98) та каліксарен-тетраметиленбісфосфонової (С-192) кислот на полімеризацію фібрину. Дані каліксарени специфічно інгібують полімеризацію фібрину в системі фібриноген + тромбін, а також полімеризацію мономерного фібрину дезААВВ. Максимальна швидкість полімеризації фібрину зменшується на 50% при концентрації каліксарену С-98 $1,3 \cdot 10^{-4}$ моль/л у середовищі полімеризації, а каліксарену С-192 — $0,5 \cdot 10^{-6}$ моль/л. За допомогою електронної мікроскопії показано, що каліксарен С-192 інгібує першу стадію полімеризації фібрину — формування протофібрил. Було також знайдено, що каліксарен С-192 при концентрації $7,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л у плазмі крові здорових донорів збільшує у два рази протромбіновий час, а при концентрації $1,7 \cdot 10^{-5}$ моль/л — активований частковий тромбoplastиновий час. Отже, показано, що каліксарен-метиленбісфосфорова кислота С-192 є специфічним інгібітором полімеризації фібрину та зсідання плазми крові людини. Дана сполука може бути використана для створення нового класу антитромботичних препаратів.

При активації системи зсідання крові утворюється фермент тромбін, який відщеплює від фібриногену два фібринопептиди А та перетворює його в фібрин дезАА, здатний до спонтанної полімеризації. Полімеризація фібрину є багата стадійним процесом, кінцевим продуктом якого є тривимірна сітка — каркас будь-якого тромбу. На першій стадії мономерні молекули фібрину взаємодіють за типом “кінець з серединою” з утворенням протофібрил. На рівні протофібрил збільшується швидкість відщеплення тромбіном фібринопептидів В, що призводить до перетворення фібрину дезАА в фібрин дезААВВ та збільшення полімеризаційної активності. Після досягнення критичної довжини протофібрили асоціюють латерально, формуючи фібрили, які галузяться і утворюють тривимірну сітку фібрину [1].

Полімеризація фібрину здійснюється за рахунок функціонування центрів полімеризації, які забезпечують міжмолекулярні нековалентні взаємодії мономерних молекул або олігомерів фібрину. Центр полімеризації складається з амінокислотних залишків, які розташовані

послідовно або рознесені, але зближені в просторі в одному поліпептидному ланцюзі молекули.

Біохімічними дослідженнями та рентгеноструктурним аналізом встановлено, що перша стадія полімеризації фібрину — побудова протофібрил — здійснюється шляхом міжмолекулярної взаємодії центру “А” ($A\alpha 17\text{Gly-Pro-Arg}$) у центральному домені Е фібрину з комплементарним йому центром “а” (γGln329 , γAsp330 , γHis340 та γAsp364) у периферичному домені D [2]. Використовуючи моноклональні антитіла та синтетичні пептиди нами показано, що у фрагменті В/12–46 фібрину знаходиться центр полімеризації, який також бере участь у процесі побудови протофібрил фібрину [3]. Механізми латеральної асоціації протофібрил фібрину на сьогодні повністю ще не з'ясовані, однак існують дані, які свідчать про те, що цей процес здійснюється за рахунок міжмолекулярної взаємодії доменів D фібрину [4].

В останні роки збільшується інтерес до вивчення впливу каліксаренів на біохімічні процеси. Каліксарени є нанорозмірними макроциклічними сполуками, які отримують циклоконденсацією паразаміщених фенолів і формальдегіду [5]. Завдяки здатності утворювати супрамолекулярні комплекси з біологічно важливими молекулами, каліксарени здатні впливати на перебіг біохімічних процесів і розглядаються як перспективні молекулярні платформи для дизайну фізіологічно активних сполук, які можуть знайти практичне застосування в медицині [6].

Метою нашої роботи було дослідити вплив каліксарен-фосфонових кислот, здатних утворювати супрамолекулярні комплекси з амінокислотами та пептидами [7], на полімеризацію фібрину, а також зсідання плазми крові людини. Вивчено вплив каліксаренів С-98 та С-192, які містять відповідно два та чотири залишки метиленбісфосфонові кислоти, на полімеризацію фібрину дезААВВ та фібрину в системі фібриноген + тромбін за допомогою турбідиметричного аналізу.

Каліксарен-метиленбісфосфонові кислоти синтезували методом, описаним у статті [8]. Фібриноген виділяли з плазми крові людини [9]. Препарат фібрину дезААВВ у 0,02 моль/л оцтовій кислоті отримували за раніше наведеною методикою [10]. Для турбідиметричного аналізу полімеризації фібрину дезААВВ у кварцові кювети ($L = 1$ см) вносили по 0,975 мл 0,05 моль/л амоніацетатного буферу рН 7,4 з 0,1 М NaCl та 10^{-4} М CaCl₂, в якому був розчинений каліксарен у досліджуваній концентрації. Кювети витримували 7 хв при 37 °С, після чого до їх вмісту додавали по 0,025 мл 0,4% розчину мономерного фібрину дезААВВ у 0,02 моль/л оцтовій кислоті. Для дослідження полімеризації фібрину в системі фібриноген + тромбін у кварцові кювети ($L = 1$ см) вносили по 0,975 мл 0,05 моль/л амоніацетатного буферу рН 7,4 з 0,1 моль/л NaCl та 10^{-4} М CaCl₂, в якому був розчинений фібриноген (0,0975 мг/мл) та каліксарен у досліджуваних концентраціях. Після термостатування кювет при 37 °С до них додавали 0,025 мл розчину тромбіну (“Sigma”) з концентрацією 7 НН/мл. Зміни світлорозсіювання розчинів визначали при довжині хвилі 350 нм на спектрофотометрі СФ-26 (“ЛОМО”, СРСР) і реєстрували за допомогою самописця “Pharmacia” (Швеція). На кривих, які відображали зміни світлорозсіювання в часі, визначали такі параметри: τ — лаг-період, який відповідає часу утворення протофібрил; V_{max} — максимальна швидкість полімеризації фібрину, що визначається за тангенсом кута нахилу дотичної до початкової найбільш крутої ділянки кривої світлорозсіювання; Δh — максимальна мутність розчину, в якому відбувалась полімеризація фібрину.

За допомогою турбідиметричного аналізу було встановлено, що синтезовані каліксарени різною мірою гальмують полімеризацію фібрину в системі фібриноген + тромбін. При концентрації каліксарену С-192 $0,5 \cdot 10^{-6}$ моль/л максимальна швидкість полімеризації фі-

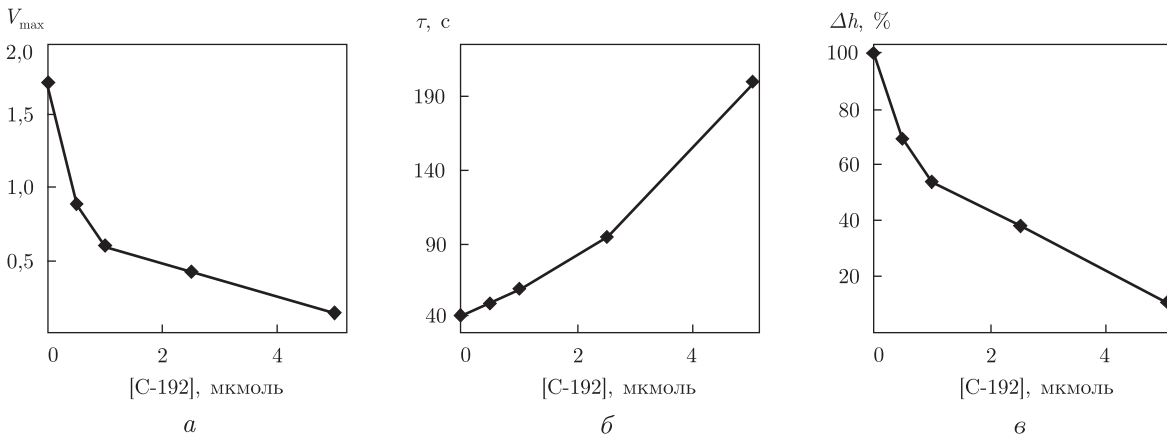


Рис. 1. Залежність значення максимальної швидкості полімеризації фібрину (а), лаг-періоду (б) та кінцевої мутності згустків (в) від молярної концентрації каліксарену С-192

брину зменшувалась на 50% (IC_{50}) (рис. 1). За даної концентрації каліксарену його молярне співвідношення до фібриногену становить близько 1,7 до 1,0, що свідчить про високу специфічність інгібування полімеризації фібрину. Для каліксарену С-98 IC_{50} дорівнює $1,3 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Для порівняння: IC_{50} для відомого інгібітора полімеризації фібрину пептиду Gly-Pro-Arg-Pro (який імітує центр полімеризації “А”) у наших експериментах дорівнює $0,5 \cdot 10^{-4}$ моль/л. За даними інших авторів, IC_{50} для пептиду Gly-Pro-Arg-Pro дорівнює $0,85 \cdot 10^{-4}$ моль/л [11]. Каліксарен С-192 гальмував також і полімеризацію фібрину дезААВВ з $IC_{50} = 1,0 \cdot 10^{-6}$ моль/л. Це дозволяє зробити висновок про те, що цей каліксарен гальмує зсідання фібриногену не за рахунок інгібування активного центру тромбіну або його зв’язування з фібриногеном, а за рахунок гальмування процесу полімеризації фібрину. В присутності каліксарену С-192 у середовищі полімеризації фібрину значно збільшувався лаг-період τ і зменшувалася максимальна мутність фібринового згустку.

За допомогою трансмісійної електронної мікроскопії, яку проводили на мікроскопі Н-600 (“Hitachi”, Япон) при збільшенні 50000, нами було встановлено, що каліксарен С-192 інгібує першу стадію полімеризації фібрину — побудову протофібрил з мономерних молекул. Можна припустити, що даний каліксарен гальмує процес формування протофібрил фібрину шляхом блокування центру полімеризації “А”. Останній утворений трьома NH_2 -кінцевими амінокислотними залишками — $A\alpha 17$ Gly-Pro-Arg, які мають сумарний позитивний заряд. Аніон каліксарен-метиленбісфосфонові кислоти С-192, імовірно, зв’язується з амінокислотою послідовністю Gly-Pro-Arg за рахунок електростатичних та гідрофобних взаємодій. Ми плануємо дослідити комплексоутворення між каліксареном С-192 та синтетичним пептидом Gly-Pro-Arg-Pro, який імітує центр полімеризації “А”.

Було досліджено також вплив каліксарену С-192 на зсідання плазми крові людини за допомогою коагулометра СТ 2410 (“Solar”, Білорусь). У цих дослідах використовували реактиви “НПО Ренам”, Росія: контрольна плазма крові з нормальним рівнем системи гемостазу; “Ренампластин” — стандартизований за міжнародним індексом чутливості реагент для визначення ПЧ (протромбіновий час), який характеризує активацію зовнішнього шляху системи зсідання крові; АЧТЧ-тест (активований частковий тромбoplastиновий час) — для визначення АЧТЧ, який характеризує активацію внутрішнього шляху системи зсідання крові. Протромбінове відношення (ПВ) розраховували за формулою: $PB = PC_{\text{д}}/PC_{\text{к}}$,

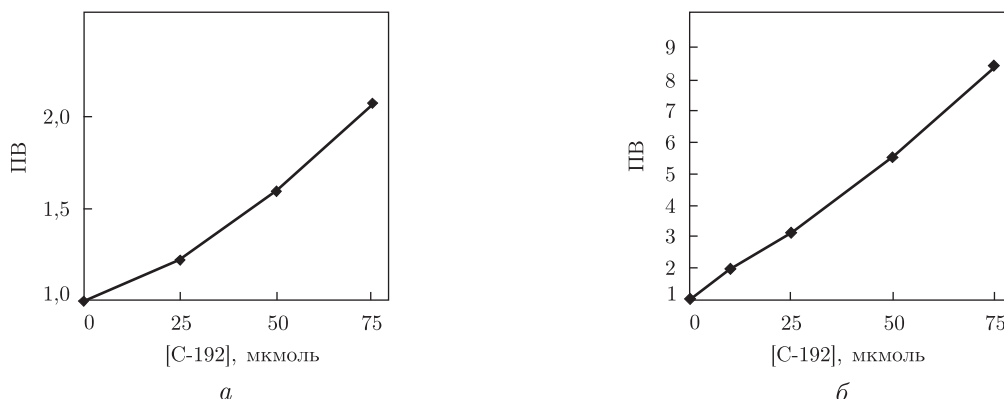


Рис. 2. Залежність ПВ від концентрації каліксарену С-192 у ПЧ-тесті (а) та АЧТЧ-тесті (б)

де ПЧ_д — протромбіновий час в плазмі крові, що досліджується, ПЧ_к — протромбіновий час в контрольній плазмі. Було знайдено, що додавання каліксарену С-192 до контрольної плазми крові призводило до збільшення як ПЧ, так і АЧТЧ. Концентрація каліксарену, при якій ПВ збільшувалося вдвічі у протромбіновому тесті, дорівнювало $7,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л, у АЧТЧ тесті — $1,7 \cdot 10^{-5}$ моль/л (рис. 2). Збільшення ПЧ у двох різних тестах під впливом каліксарену С-192, імовірно, відбувається за рахунок гальмування полімеризації фібрину, який утворюється з фібриногену після активації системи зсідання крові.

На сьогодні не описана жодна низькомолекулярна сполука непептидної природи з такою великою інгібіторною активністю, яку виявляє каліксарен С-192 на полімеризацію фібрину. Однак іншими авторами виділено пептидні фрагменти фібриногену людини, які специфічно інгібують полімеризацію фібрину. Наприклад, фрагменти фібрину Вβ15–42 ($M_r = 3039$ Да) та γ373–410 ($M_r = 4300$ Да) гальмують полімеризацію фібрину дезААВВ з IC_{50} , що дорівнюють $22,5 \cdot 10^{-6}$ та $0,22 \cdot 10^{-6}$ моль/л відповідно [11, 12].

Таким чином, показано, що каліксарен-метиленбісфосфонова кислота С-192 є специфічним інгібітором полімеризації фібрину та зсідання плазми крові людини і може бути використана для створення нового класу антитромботичних препаратів.

1. Ryan E. A., Mockros L. F., Weisel J. W., Lorand L. Structural origins of fibrin clot rheology // *Biophys. J.* – 1999. – **77**. – P. 2813–2826.
2. Everse S. J., Spraggon G., Veerapandin L. et al. Crystal structure of fragment double-D from human fibrin with two different bound ligands // *Biochemistry*. – 1998. – **37**, No 24. – P. 8637–8642.
3. Lugovskoy E. V., Gritsenko P. G., Kapustianenko L. G. et al. Functional role of Bbeta-chain N-terminal fragment in the fibrin polymerization process // *FEBS J.* – 2007. – **274**, No 17. – P. 4540–4549.
4. Yang Z., Mochalkin I., Doolittle R. F. A model of fibrin formation based on crystal structures of fibrinogen and fibrin fragments complexed with synthetic peptides // *PNAS of USA*. – 2000. – **97**. – P. 14156–14161.
5. Gutsche C. D. *Calixarenes Revisited*. – Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1998. – 233 p.
6. Кальченко В. І., Родік П. В., Бойко В. І. Каліксарени. Перспективи медико-біологічного застосування // *Журн. орган. та фармацевт. хімії*. – 2005. – **3**. – С. 13–29.
7. Zielenkiewicz W., Marciniowicz A., Cherenok S. et al. Phosphorylated calixarenes as receptors of L-amino acids and dipeptides: calorimetric determination of Gibbs energy, enthalpy and entropy of complexation // *Supramolec. Chem.* – 2006. – **18**. – P. 167–176.
8. Vovk A. I., Kalchenko V. I., Cherenok S. A. et al. Calix[4]arene methylenebisphosphonic acids as calf intestine alkaline phosphatase inhibitors // *Org. Biomol. Chem.* – 2004. – **2**. – P. 3162–3166.
9. Varetskaya T. V. Microheterogeneity of fibrinogen. Cryofibrinogen // *Укр. біохім. журн.* – 1960. – **32**. – С. 13–24.

10. Belitser V. A., Varetskaja T. V., Malneva G. V. Fibrinogen-fibrin interaction // Biochim. Biophys. Acta. – 1968. – **154**. – P. 376–380.
11. Pandya B. V., Gabriel J. L., O'Brien J., Budzynski A. Z. Polymerization site in the beta chain of fibrin: mapping of the B beta 1–55 sequence // Biochemistry. – 1991. – **30**, No 1. – P. 162–168.
12. Olexa S. A., Budzynski A. Z. Localization of a fibrin polymerization site // J. Biol. Chem. – 1981. – **256**, No 7. – P. 3544–3549.

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна
НАН України, Київ

Надійшло до редакції 14.04.2009

P. G. Gritsenko, Corresponding Member of the NAS of Ukraine **E. V. Lugovskoy**,
T. A. Koshel, **S. O. Cherenok**, **O. A. Yuschenko**, **V. I. Chernishov**,
Corresponding Member of the NAS of Ukraine **V. I. Kalchenko**,
Academician of the NAS of Ukraine **S. V. Komisarenko**

The effect of calixarene-methylenbisphosphonic acids on fibrin polymerization

The effect of calixarene-dimethylenbisphosphonic (C-98) and calixarene-tetramethylenbisphosphonic (C-192) acids on the fibrin polymerization is studied. These calixarenes inhibited specifically the fibrin polymerization in the fibrinogen + thrombin reaction, as well as monomeric fibrin desAABB polymerization. The maximum rate of fibrin polymerization was decreased by 50% at the calixarene C-98 concentration equal to $1.3 \cdot 10^{-4}$ M in the polymerization medium and the calixarene C-192 concentration equal to $0.5 \cdot 10^{-6}$ M. Experiments with electron microscopy analysis showed that calixarene C-192 inhibited the first stage of the fibrin polymerization – protofibril formation. Calixarene C-192 increased also twice the prothrombin time and the activated partial thromboplastin time in normal human blood plasma at concentrations of $7.0 \cdot 10^{-5}$ M and $1.7 \cdot 10^{-5}$ M, respectively. Thus, calixarene-bisphosphonic acid C-192 is a specific inhibitor of fibrin polymerization and blood plasma coagulation. This compound may be used for the drug design of a new class of anti-thrombotic agents.