

В. А. БЕЛИЦЕР и Я. В. БЕЛИК

ОБ ОБРАЗОВАНИИ И ПОЛИМЕРИЗАЦИИ ФИБРИН-МОНОМЕРА

(Представлено академиком А. В. Палладиным 22 V 1953)

Основоположник ферментативной теории свертывания крови профессор Юрьевского университета А. А. Шмидт высказал взгляд, согласно которому процесс превращения фибриногена в фибрин складывается из двух фаз — ферментативной и неферментативной. По Шмидту, в ферментативной фазе под воздействием тромбина из фибриногена образуется «жидкий фибрин» (он же «коллоидный фибрин», «растворимый фибрин»), который неферментативным путем переходит в «свернутый фибрин» (он же «нерастворимый фибрин») (1, 2).

Подробно изучая механизм превращения фибриногена в фибрин, В. А. Белицер и Е. Л. Ходорова (3, 4) подтвердили взгляд Шмидта; они пришли к заключению, что данное превращение состоит из следующих реакций: 1) ферментативный, ведущей к образованию промежуточного продукта превращений фибриногена — «фибрин-мономера», не отличающегося от фибриногена по величине и форме частиц, но обладающего исключительной способностью к полимеризации, и 2) неферментативной ведущей к образованию фибрина путем полимеризации фибрин-мономера.

Разделить процесс превращения фибриногена в фибрин на две фазы можно при помощи солюбилизирующих веществ (мочевина, роданистый калий, салициловокислый натрий (3)), а также сдвигом реакции среды в кислую сторону до рН 5,1 (5) и в щелочную сторону до рН 10,0 (6). Ферментативный процесс, хотя и замедленный, проходит в присутствии 4% роданистого калия, 6,5% салициловокислого натрия, 20% мочевины, а также при рН 5,1 и 10,0. Неферментативная же фаза, приводящая к образованию фибрина, в этих условиях исключена, и накапливается лишь фибрин-мономер. Вторая фаза — фаза образования фибрина — может быть пущена в ход при устранении факторов, задерживающих полимеризацию, т. е. при резком понижении концентрации названных солюбилизирующих веществ (например, путем разбавления раствора в 20 раз) или, соответственно, при нейтрализации раствора.

Однако представление о двухфазности процесса превращения фибриногена в фибрин не является в настоящее время общепризнанным. Ряд авторов оспаривает это положение (7, 8). Данные, о которых сообщается ниже, позволяя отбросить всякое сомнение в вопросе о двухфазности превращения фибриногена в фибрин.

1. Выключение первой фазы превращения фибриногена в фибрин гепарином. Разделение двух фаз процесса образования фибрина до сих пор осуществлялось путем выключения полимеризационной фазы, которая является значительно более чувствительной, чем процесс образования фибрин-мономера из фибриногена под влиянием тромбина. Представлялось существенным дополнить эти данные и приме-

нить такой агент, который, не препятствуя полимеризации фибрин-мономера, парализовал бы действие тромбина. Это дало бы возможность воспроизвести полимеризационную фазу в условиях отсутствия ферментативной реакции и тем самым окончательно подтвердить то, что полимеризация, в отличие от первой фазы, протекает без участия тромбина.

В наших опытах был применен гепарин, и поскольку последний парализует тромбин только при наличии особого «комплемента», содержащегося в плазме, постольку вместо раствора фибриногена мы применили плазму бычьей крови, из которой предварительно был удален протромбин. Ферментативная фаза превращения проводилась при помощи тромбина в

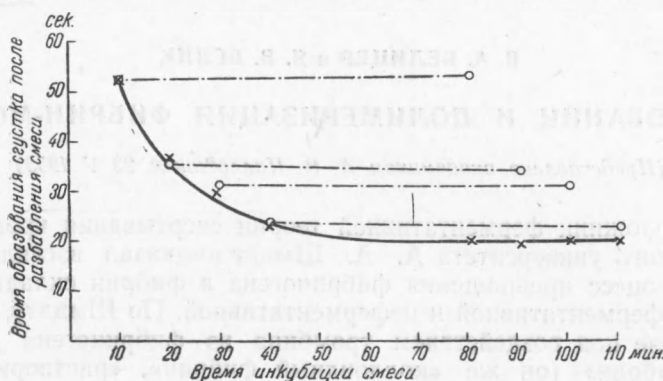


Рис. 1. Влияние гепарина на ферментативную фазу

плазме, содержащей 20% мочевины, т. е. в условиях, исключающих образование фибрина *. Препарат гепарина, полученный по методу В. Д. Янковского и З. А. Ярославцевой (9), был нам любезно предоставлен В. Д. Янковским. В условиях наших опытов полное прекращение действия тромбина гепарин давал в разбавлении 1 : 8000. Даже после длительной инкубации в смеси, содержащей такую концентрацию гепарина, образования фибрин-мономера не происходило: при разбавлении в 20 раз водой или раствором NaCl сгусток фибрина не возникал. Если гепарин вносился в смесь не с самого начала опыта, а спустя некоторое время (в течение которого шло образование фибрин-мономера), то после разбавления смеси образование сгустка происходило.

В опыте, представленном на рис. 1, разбавление смеси производилось 0,9% раствором NaCl. Сплошная кривая этого рисунка показывает постепенное уменьшение времени образования сгустка после разбавления смеси в зависимости от срока предшествующей инкубации. Крестиками отмечены результаты отдельных определений. Укорочение этого времени, очевидно, соответствует ходу превращения фибриногена в фибрин-мономер. При данных условиях процесс заканчивается примерно за 50 мин.— срок, за который достигается минимальное время образования сгустка. Кружками на рис. 1 отмечены результаты, полученные для отдельных проб, взятых из общей смеси и «отравленных» гепарином в различные моменты времени. Как видно из рис. 1, после внесения гепарина дальнейшая инкубация не сокращает времени образования сгустка.

Особенно важно подчеркнуть, что в этих опытах полимеризация фибрин-мономера наблюдалась при условии, если тромбин был полностью парализован до разбавления смеси, т. е. до начала полимеризации. Этим подтвержден неферментативный характер полимеризационной фазы образования фибрина.

* Детали препаративной работы и постановки опытов будут опубликованы в другом журнале.

2. Отношение фибриногена и фибрин-мономера к иодированию. Известно (12), что иодирование фибриногена ведет к потере способности свертываться тромбином. Мы сравнили влияние иодирования на фибриноген и фибрин-мономер.

Иодирование фибрин-мономера, полученного из фибриногена в присутствии 20% мочевины, проводилось при pH 6,5 (M/5 фосфатный буфер) и 123° путем медленного добавления к раствору фибрин-мономера N/100 иода в 0,24 M KCl до тех пор, пока желтая окраска смеси после добавления очередной капли раствора иода переставала исчезать. При снижении концентрации мочевины путем разбавления иодированный фибрин-мономер дает характерный фибриновый сгусток. Как оказалось, он имеет значительно более сильную тенденцию к образованию сгустка, чем исходный фибрин-мономер (см. табл. 1).

Таблица 1

Образование сгустка в иодированном и неиодированном фибрин-мономере (время образования сгустка)

	Разбавление фибрин-мономера в 20 раз			
	Водой	Раствором NaCl		
		0,9%	1,2%	1,8%
В опыте	Моментально	Моментально	Моментально	Моментально
В контроле	»	9—10 сек.	52—55 сек.	Сгусток не образовался через 1,5 часа

Иодированный в этих же условиях фибриноген при воздействии на него тромбином не образует сгустка (появляется лишь хлопьевидная муть). Таким образом, фибриноген при иодировании теряет присущую ему способность превращаться в фибрин-мономер. Последний же, наоборот, при иодировании не только не утрачивает, а усиливает свою специфическую способность к полимеризации.

Различное отношение к иодированию субстратов первой и второй фазы превращения фибриногена в фибрин можно рассматривать как дополнительное доказательство двухфазности процесса. Иодирование фибриногена так или иначе препятствует ферментативному воздействию тромбина, которое, как можно предполагать (4), заключается в «раскрытии» потенциальных реактивных центров в молекулах фибриногена. При наличии готового фибрин-мономера иодирование не разрушает специфических реактивных центров и даже усиливает взаимное сродство частиц.

3. Влияние изменения концентрации фибриногена на ферментативную (первую) фазу превращения фибриногена в фибрин. Все авторы, исследовавшие зависимость скорости превращения фибриногена в фибрин от концентрации фибриногена, отмечали, что оптимальная концентрация низка, 0,3% и более высокие концентрации субстрата задерживают процесс (10). Это явление обычно рассматривается как один из случаев торможения фермента избытком субстрата (11). После того как было показано тормозящее действие фибриногена на полимеризацию фибрин-мономера (4), возникла необходимость проверить, действительно ли тормозится повышенными концентрациями фибриногена также и ферментативная фаза процесса.

В наших опытах исследовалось влияние концентрации фибриногена на скорость превращения фибриногена в фибрин-мономер при выключении полимеризации при помощи 20% мочевины или смещения реакции среды

в кислую сторону до рН 5,1. О количестве образовавшегося фибрин-мономера мы судили по времени появления сгустка после разбавления раствора, содержащего мочевины, или, соответственно, после нейтрализации кислого раствора. Для того чтобы во время полимеризации все пробы имели одинаковую общую концентрацию фибриноген + фибрин-мономер перед разбавлением, соответственно, нейтрализацией, в пробы вносились рассчитанные количества фибриногена. Таким образом, только первая фаза протекала в различных пробах при неодинаковых концентрациях субстрата. Результаты одного из опытов приводятся ниже (табл. 2).

Таблица 2

Влияние концентрации фибриногена на ферментативную фазу

№ пробы	Концентр. фибриногена во время ферментативной фазы (%)	Концентр. фибриноген + фибрин-мономер во время второй фазы (%)	Среднее время образования сгустка в секундах после инкубации проб		
			35 мин.	60 мин.	120 мин.
1	0,89	0,89	21	17	10
2	0,67	0,89	34	24	17
3	0,45	0,89	56	40	26

В приводимом опыте, так же как и во всех остальных наших опытах, было констатировано не уменьшение, а увеличение ферментативного превращения с ростом концентрации фибриногена. Задержка, отмеченная для процесса образования фибрина из фибриногена в целом, очевидно, зависит только от торможения фибриногеном второй неферментативной реакции.

Игнорирование двухфазности процесса образования фибрина из фибриногена приводит исследователей к ошибкам, порой полностью обесценивающим их работу. Так, вся сложная, снабженная математическими выкладками интерпретация кинетики образования фибрина из фибриногена в качестве однофазной ферментативной реакции⁽¹⁾, как мы теперь должны констатировать, лишена смысла. При дальнейших исследованиях необходимо учитывать, что процесс образования фибрина из фибриногена состоит из двух фаз различной природы.

Институт биохимии
Академии наук УССР

Поступило
10 V 1953

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ A. Schmidt, Zur Blutlehre, Leipzig, 1892. ² A. Schmidt, Weitere Beiträge zur Blutlehre, Wiesbaden, 1895. ³ Е. Л. Ходорова, Укр. биох. журн., 23, в. 4, 439 (1951). ⁴ В. А. Белицер, Е. Л. Ходорова, Биохимия, 17, в. 6, 676 (1952). ⁵ W. F. Mommaerts, J. Gen. Physiol., 29, 113 (1945). ⁶ R. N. Lyons, Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci., 23, 131 (1945). ⁷ P. W. Boyles, J. H. Ferguson, P. H. Muehlke, J. Gen. Physiol., 34, 493 (1951). ⁸ W. H. Seligers, The Enzymes Chemistry and Mechanism of Action, 1, 2, 1106, N. Y., 1951. ⁹ В. Д. Янковский, З. А. Ярославцева. Первая сессия Моск. о-ва физиологов, биохимиков и фармакологов, М.—Л., 1941, стр. 312. ¹⁰ В. К. Подобанский, К вопросу о влиянии лимонной кислоты и пептона на свертывание крови. Диссертация, 1909. ¹¹ D. F. Waugh, B. J. Livingston, J. Phys. and Coll. Chem., 55, 7, 1206 (1951). ¹² K. Laki, E. Mihalyi, Nature, 163, 66 (1949).