

Введение Фибриноген - гликопротеин с молекулярной массой 340 кДа, состоящий из трех пар полипептидных цепей: A α , B β и γ [1]. Концентрация фибриногена в плазме крови лежит в пределах 2 - 3 мг/мл. Физико-химические свойства молекул фибриногена активно изучаются различными методами в том числе, описанными в работах [2, 3]. Фибриноген участвует в процессах гемостаза. При активации тромбином, от фибриногена отделяются два фибринопептида A. Фибриноген преобразуется в фибрин, который полимеризуется в протофибриллы толщиной в две молекулы фибриногена [4, 5]. Под действием Фактора XIII происходит кроссшивка протофибрилл и образование фибрилл [6, 7]. Из фибрилл формируется трехмерная сеть, являющейся основой для формирования тромба, закупоривающего поврежденную часть сосуда [8-11]. Из-за способности образовывать комплексы по принципу «гость-хозяин» с биологическими молекулами каликсарены (макроциклические чашеподобные соединения) способны оказывать влияние на многие биохимические процессы и могут выступать в качестве платформы для молекулярного дизайна лекарственных препаратов [12-14]. Антитромботическое действие производных каликсаренов было впервые показано в работе [15]. В работе [16] было показано, что под влиянием пара-сульфонатного производного каликс[8]арена существенно увеличивается тромбиновое время. Влияние метиленбисфосфоновых производных каликс[4]аренов на полимеризацию фибрина было впервые показано в работе [17]. Однако широкий ряд производных каликс[4]аренов до сих пор остается не изучен на предмет антикоагулянтных свойств. В данной работе были исследованы антикоагулянтные свойства производных каликс[4]резорцинаренов, содержащих сульфонатные и фосфоновые группы, в системе фибриноген + тромбин. Одно из соединений содержит четыре сульфонатные группы, другое содержит восемь фосфоновых групп (Рис. 1). Экспериментальная часть

Структурные формулы исследуемых производных каликс[4]резорцинаренов (КРА) приведены на Рис. 1. Названия этих соединений согласно номенклатуре ИЮПАК записываются следующим образом: 1) тетра-натриевая соль 4,6,10,12,16,18,22,24-октагидрокси-5,11,17,23тетрасульфо-2,8,14,20-тетрапентилпентацикло[19.3.1.13,7.19,13.115,19]октакоза-1(25),3,5,7(28),9,11,13(27),15,17,19(26),21,23-додекаена; (КРА-1) 2) 4,6,10,12,16,18,22,24-октафосфоацетометилокси-2,8,14,20тетраундецилпентацикло[19.3.1.13,7.19,13.115,19]октакоза-1(25),3,7(28), 9,1,13(27),15,17,19(26),21,23-додекаен; (КРА-2). а б Рис. 1 - Структурные формулы производных каликс[4]резорцинаренов: а) КРА-1; б) КРА-2

Соединение 1 было синтезировано согласно методике, описанной в работе [18], соединение 2 было получено аналогично методикам, описанной в работах [19, 20]. Для исследования полимеризации фибрина и получения фибрин-мономера в раствор фибриногена (EnzymeResearchLaboratories, США) в натрий фосфатном

буфере с $\text{pH}=7.4$ и концентрацией 100 ± 10 мкг/мл добавлялись 0,1 NIH единицы активности тромбина (Технология-Стандарт, Россия). Для изучения влияния КРА на полимеризацию фибрина соединения 1 и 2 добавлялись в раствор фибриногена перед добавлением тромбина. Концентрация КРА составляла $2\cdot 10^{-6}$ М. Измерения спектров поглощения в ультрафиолетовой и видимой областях (в диапазоне от 200 до 500 нм) проводилось на УФ-спектрометре Lambda 35 UV/IS (PerkinElmerInstruments) в 1 см кварцевой кювете с коррективкой оптического фона. Все фоновые растворы имели тот же состав, что и исследуемые растворы, но без добавления фибриногена и тромбина. Все измерения проводились при комнатной температуре (23 оС). Поверхности пластинок слюды 1×1 см² обновлялись непосредственно перед экспериментом. Слюда инкубировалась в растворе фибриногена, тромбина и каликсаренов в течение часа при комнатной температуре (23оС), после чего пластинки промывались в чистом натрий фосфатном буфере и деионизованной воде. Затем слюда сушилась в струе аргона. Концентрация фибриногена в растворе определялась с помощью УФ-спектроскопии по методике, описанной в работе [21]. Микроскопические исследования были реализованы на атомно-силовом микроскопе (АСМ) MultiMode V (VeecoinstrumentsInc., США) по методикам, описанным в работах [22-25]. Для сканирования поверхностей использовались кремниевые кантилеверы RTESP (VeecoinstrumentsInc., США) с коэффициентом упругости 40 Н/м и радиусом закругления иглы 10-13нм. Обработка микроскопических изображений производилось с помощью программного обеспечения NanoScope 7.30.

Результаты и обсуждения Для растворов фибриногена, тромбина и соединений 1 и 2, были получены зависимости изменения спектров поглощения от времени. Зависимости оптической плотности растворов на длине волны 350 нм представлены на Рис. 2. При добавлении тромбина в раствор фибриногена оптическая плотность раствора заметно растет с течением времени, данный факт свидетельствует о протекании процесса полимеризации фибрина и формировании фибрин-мономера. Как видно из Рис. 2, при наличии КРА-1 и -2 оптическая плотность растворов в течение получаса возрастает незначительно. Так, при концентрации КРА-1 $2\cdot 10^{-6}$ М в растворе фибриногена (100 ± 10 мкг/мл) и тромбина (0,1 NIH) максимальная скорость полимеризации фибрина уменьшается на 98,6 %. При той же концентрации КРА-2, содержащего четыре сульфонатные группы, максимальная скорость полимеризации фибрина уменьшается на 96,4 %. При таких концентрациях молярное соотношение КРА и фибриногена составляло 6,8 : 1. Слабый рост оптической плотности растворов фибрина, содержащих КРА-1 и -2, свидетельствует об отсутствии формирования фибрин-мономера в объеме растворов. Рис. 2 - Зависимость от времени оптической плотности на длине волны 350 нм растворов фибриногена, тромбина и КРА

Метод АСМ показал, что при инкубации слюды в растворе фибриногена и тромбина на ее поверхности образуются крупные протофибриллы высотой 12 -

14 нм и шириной 100 - 200 нм (Рис. 3 а). Однако в присутствии соединений 1 и 2 на поверхности слюды, находящейся в среде реакции, не происходит формирование крупных протофибрилл. Вместо этого на поверхности слюды образуется микрофибриллярная матрица. Наблюдаемые микрофибриллы имеют высоты в пределах 5 - 6 нм и ширины 40 - 80 нм (Рис. 3 б, в). Данный факт также свидетельствует об ингибировании производными каликс[4]резорцинаренов формирования поверхностно-индуцированного фибрин-мономера. Рис. 3 - АСМ изображение поверхности слюды, инкубированной в растворах: а) фибриноген + тромбин; б) фибриноген + тромбин + КРА-1; в) фибриноген + тромбин + КРА-2

Выводы Исходя из полученных результатов, можно заключить, что тетраметилсульфонатный тетрапептилкаликс[4]резорцинарен и октафосфоновая кислота тетраундецилкаликс[4]резорцинарена являются перспективными ингибиторами коагуляции фибрина и могут быть использованы для разработки новых антитромботических препаратов