

УДК 612.115.1:544.182.644

БИОХИМИЯ

Академик АН УССР В. А. БЕЛИЦЕР, Е. Л. ХОДОРОВА, Н. Е. ФЕДОРОВА

УСТОЙЧИВОСТЬ («ПАМЯТЬ») СТРУКТУРНЫХ МОДИФИКАЦИЙ ГЕЛЕЙ ФИБРИНА

Гели, образующиеся из фибрин-мономера путем полимеризации (самосборки), сильно варьируют в зависимости от условий среды: они могут быть «грубыми» (мутными, пластичными, склонными к синерезису), «тонкими» (прозрачными, ломкими, эластичными) или занимать промежуточное положение между двумя крайними вариантами (^{1, 2}).

При специальных условиях фибрин обратимо распадается до состояния мономера. Принимается, что он всегда образует равновесную систему: полимер — продукты частичной диссоциации (³). Поэтому следовало ожидать, что указанные модификации неустойчивы, и при изменении среды легко переходят одна в другую. Оказалось, однако, что в отсутствие особых диссоциирующих факторов структурные модификации стабильны; наши определения светорассеяния показали, что грубые гели в основном остаются мутными даже после введения в них такого раствора, в котором мономерный фибрин образует предельно тонкий прозрачный гель. Тонкие

гели также упорно сохраняют свои свойства при изменениях их внутренней среды (^{4, 5}). Налицо явление «памяти» высокополимерных структур.

Одно из существенных различий структурных модификаций фибрина состоит в том, что только грубые гели способны к синерезису (спонтанному сжатию). Ниже сообщается, что закрепление сформировавшейся модификации можно обнаружить по явлению синерезиса так же четко, как и по светорассеянию.

Исследовались гели, полученные из чистого мономерного фибрина (^{6, 7}). Изменение внутренней среды геля происходил путем диффузии

после насаживания на гель соответствующих растворов. Для учета степени синерезиса гель, отделенный от стенок силиконированной пробирки, перемещался путем свободного скольжения (вместе с жидкостью) в весовой стаканчик; перед взвешиванием жидкость отсасывалась фильтровальной бумагой. Такой способ сводит к минимуму механические воздействия на гель и дает наиболее воспроизводимые результаты. Предельная степень синерезиса геля, освобожденного от стенок, во всех случаях достигалась быстро, специального выдерживания перед взвешиванием не требовалось. Хорошая воспроизводимость результатов позволяет ограничиться приведением лишь нескольких из наших опытов.

Известно, что чем ниже ионная сила (и pH), тем грубее структура геля. На рис. 1 показана зависимость синерезиса от ионной силы (μ) для геля фибрина с содержанием белка 0,8 мг/мл в фосфатном буфере 0,05 М pH 6,8 с добавлением NaCl до различных концентраций. Синерезис ли-

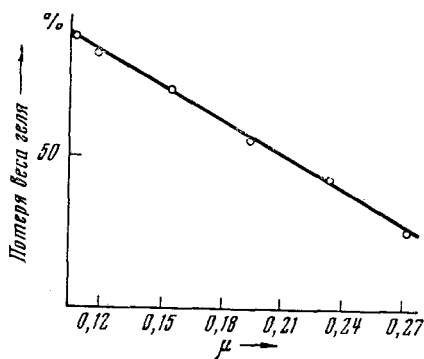


Рис. 1. Зависимость синерезиса гелей фибрина от ионной силы μ

нейно уменьшается с повышением ионной силы; определения практически невозможны при ионной силе выше 0,28 из-за ломкости гелей.

В опытах табл. 1 грубые гели получались при pH 7,6 в 0,05 *M* трис-буфере с NaCl, ионная сила 0,14. Опыты показали, что синерезис грубых гелей не уменьшается после перехода к ионной силе до 0,30. (При ионной силе 0,30, pH 7,6 фибрин-мономер образует типичный тонкий гель.)

Таблица 1

Синерезис грубых гелей фибрина

	Ионная сила после настраи- вания смеси буфер — NaCl	Время после настаивания смеси, час.	Вес гелей * после синере- зиса, мг	Степень синерезиса (потеря веса геля), %
Контроль	0,14	18	451 ± 12	54,9 ± 1,2
Опыт	0,30	18	456 ± 12	54,4 ± 1,2
Контроль	0,14	72	512 ± 5	48,2 ± 0,5
Опыт	0,30	72	510 ± 10	49,0 ± 1,0

* Вес гелей до синерезиса 1 г.

Данные показывают, что с повышением температуры синерезис геля увеличивается:

Температура, °C	4	21	37	45
Степень синерезиса, %	43 *	55	66	69 **

Если гель, сильно сжавшийся при 45°, выдержать при 4°, то происходит процесс обратный синерезису — набухание. Следовательно, температура определяет равновесное состояние системы. Изменения температуры, однако, не вызывают перехода одного типа геля в другой (⁴), а влияют лишь на степень сжатия грубого геля.

В нашей работе (⁸), ионная сила раствора полимеризующегося фибрина повышалась при помощи NaCl в различные моменты времени. Оказалось, что внесение соли даже перед самым моментом свертывания приводит к тому, что гель появляется с полностью измененной (тонкой) необратимой структурой. Следовательно, необратимость возникает лишь в процессе самой желатинизации, т. е. на заключительном этапе самосборки. Необратимость структур фибрина подтверждена электронномикроскопическим исследованием (⁹).

Сведения о структурных модификациях фибрина, известные из литературы и полученные нами, позволяют сделать некоторые заключения об их природе. Возникновение различных форм волокон нетрудно понять, учитывая, что специфические контактные зоны фибрина велики и образуют нековалентные связи разного характера (¹⁰). Молекулы фибрина или определенные промежуточные продукты их самосборки (см. (⁸)), стремясь создать совокупность энергетически выгодных межмолекулярных связей, соединяются между собой различным образом в зависимости от условий среды, при этом предпочтительно используются то одни, то другие виды взаимодействующих групп. Повышение ионной силы от 0,15 до 0,30 (pH 7,6), как мы знаем, переключает самосборку с грубых гелей на тонкие, при этом изменяется и электронномикроскопическое строение волокон (⁹). Указанное, сравнительно небольшое изменение среды существенно ослабляет электростатические связи, но не может сильно влиять

* У геля, выдержанного при 4°, после дополнительной инкубации при 45° степень синерезиса повысилась до 72%.

** У геля, выдержанного при 45°, после дополнительной инкубации при 4° степень синерезиса снизилась до 50%.

на другие виды нековалентных связей. Ослабление электростатических связей оказывается достаточным для изменения характера полимеризации и относительной роли отдельных видов взаимодействий. При низкой ионной силе, когда электростатические взаимодействия сильны и образуются грубые гели, большую роль должны играть ионные группы белка, а при высокой ионной силе, когда электростатические взаимодействия ослаблены и образуются тонкие гели, — другие взаимодействующие группы. Распределение групп внутри и на поверхности, по крайней мере для части волокон фибрина, должно соответственно меняться, что схематически показано на рис. 2. Грубый гель богат участками, где внутри волокон имеются сильные солевые связи, на поверхности волокон много неполярных групп (рис. 2а). Последнее делает гель нестабильным; в случае отделения геля от стенок сосуда из-за латерального соединения волокон происходит сжатие. Если контакт со стенками сосуда не нарушен, то возможно лишь локальное слияние волокон, т. е. их утолщение. В тонком геле неполярные группы распределены преимущественно внутри волокон, ионные группы — на поверхности (рис. 2б). В этом случае нити фибриновой сети должны оставаться тонкими, гидрофильными, условий для синерезиса нет. Понятна необратимость грубых гелей: система ионных связей, будучи вскрыта внутри волокон, при повышении ионной силы не разрушается. Однако схема рис. 2б не вполне удовлетворительна, так как не объясняет отсутствие синерезиса после снижения ионной силы. Можно думать, что образование тонких гелей сопровождается конформационным изменением, при котором комплементарность ионных групп нарушается. С таким дополнением схема приемлема. Обе структуры — тонкая и грубая, изображенные на схеме, вероятно

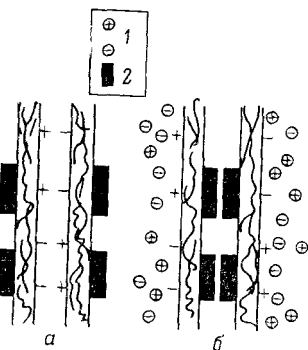


Рис. 2. Схема распределения групп в волокнах фибрина. а — при низкой μ — грубый гель, б — при высокой μ — тонкий гель; 1 — ионные группы, 2 — неполярные группы

имеются во всех гелях фибрина, но, разумеется, в разных количественных соотношениях ⁽⁸⁾.

Существует модель, согласно которой различие между гелями — грубыми и тонкими — сводится к тому, что в грубых гелях значительные участки полипептидных цепей фиксированы электростатическими связями, в тонких — свободны ⁽²⁾. Такая модель не объясняет факта устойчивости структурных модификаций по отношению к изменениям ионной силы, в частности, сохранение синерезиса грубых гелей, несмотря на повышение ионной силы содержащегося в них солевого раствора.

Распространенное мнение о легкой обратимости процесса образования геля основано на высокой чувствительности фибрина к таким диссоциирующим факторам как 1 M NaBr в слабокислой среде ⁽¹⁰⁾ или высокое гидростатическое давление ⁽¹¹⁾. После диссоциации гель нетрудно получить снова, причем в желаемой модификации ⁽¹²⁾. Но если специальные факторы, разрушающие гель, отсутствуют, сформировавшаяся модификация оказывается стабильной. Очевидно, энергия активации перехода фибрина из одной модификации в другую при обычных условиях очень велика. Структура закрепляется (без образования ковалентных связей) на заключительном этапе самосборки.

Устойчивость структурных модификаций не является исключительным свойством фибрина. Она описана для коллагена. Здесь путь в той или иной структурной модификации становится необратимым уже на ранней стадии самосборки ⁽¹³⁾. Явление самозакрепления можно ожидать также для других белков с полиморфизмом продуктов самосборки ^(14, 15).

Сущность рассматриваемого явления такова: процесс самосборки приводит (в зависимости от условий) к тому или иному варианту надмолекулярной структуры; достигая зрелости, все варианты приобретают устойчивость и как бы запечатлевают условия, существовавшие в период самосборки. Принцип «памяти» надмолекулярных структур, может быть, имеет отношение к механизму запоминания в нервной системе. Подобные надмолекулярные структуры могли бы способствовать организации многочисленных синапсов ряда клеток в функциональные системы. Роль факторов, определяющих варианты надмолекулярных структур, возможно, играют пептиды, специфические для запоминания.

Институт биохимии
Академии наук УССР
Киев

Поступило
19 VII 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ J. D. Ferry, P. Morrison, J. Am. Chem. Soc., 69, 388 (1947). ² J. D. Ferry, Adv. Prot. Chem., 4, 1 (1948). ³ H. A. Scheraga, A. Laskowski, Adv. Prot. Chem., 12, 1 (1957).
- ⁴ В. А. Белицер, Е. Л. Ходорова, Т. А. Свечникова, Биохимия, 38 (1973). ⁵ Е. Л. Ходорова, Тезисы допов. II-го Укр. біохім. з'їзду, 1971, Київ, стор. 35. ⁶ І. М. Радзевич, Е. Л. Ходорова, Укр. біохім. журн., 41, 367 (1969). ⁷ Т. В. Варепька, Укр. біохім. журн., 37, 665 (1965). ⁸ В. А. Белицер, Е. Л. Ходорова, Бюлл. эксп. биол. и мед., 76 (1973).
- ⁹ V. A. Belitser, V. Ph. Manjakov, T. V. Varetskaja, Biochim. et biophys. acta, 236, 546 (1971). ¹⁰ V. A. Belitser, T. V. Varetskaja, G. V. Malnewa, Biochim. et biophys. acta, 154, 367 (1968). ¹¹ T. H. Donnelly, N. Laskowski et al., Arch. Biochem. and Biophys., 56, 369 (1955). ¹² D. Collen, G. Vandereycken, L. De Maeyer, Nature, 228, 669 (1970). ¹³ E. Mihalyi, Acta chem. scand., 4, 344 (1950).
- ¹⁴ G. C. Wood, M. K. Keech, Biochem. J., 75, 588 (1960). ¹⁵ D. L. Caspar, C. Cohen, W. Longley, J. Mol. Biol., 41, 87 (1969). ¹⁶ M. Kawamura, K. Maruyama, J. Biochem., 68, 885 (1970).