

УДК 612.115.12:612.115.3

# Рекомбинантный человеческий циклофилин А тормозит образование фибринового сгустка *in vitro*

Ю. А. Морозов<sup>1\*</sup>, Л. М. Хромых<sup>2</sup>, И. И. Дементьева<sup>1</sup>, М. А. Чарная<sup>1</sup>, Н. Л. Куликова<sup>3</sup>,  
Д. Б. Казанский<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Российский научный центр хирургии им. акад. Б.В. Петровского РАМН, 119991, Москва, Абрикосовский пер., 2

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт канцерогенеза Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина РАМН, 115478, Москва, Каширское ш., 24

<sup>3</sup>ОАО «Институт инженерной иммунологии», 142380, Московская обл., Чеховский район, пос. Любучаны

\*E-mail: moroz\_111@rambler.ru

Поступила в редакцию 27.03.2012 г.

**РЕФЕРАТ** Хемотаксические свойства циклофилина А хорошо изучены в отличие от его гемостатических эффектов. Показано, что рекомбинантный человеческий циклофилин А (ЦФА), в отличие от гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, способен тормозить образование фибринового сгустка *in vitro*, нарушая тем самым пространственную динамику роста сгустка крови. Этот эффект кратковременный и дозозависимый. Выдвинута гипотеза, согласно которой конформационные изменения тромбина в комплексе с ЦФА возможно опосредуют антикоагулянтное действие ЦФА на автоволновые процессы свертывания крови.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** рекомбинантный человеческий циклофилин А, пространственная динамика роста сгустка, антикоагулянтное действие.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ЦФА – рекомбинантный человеческий циклофилин А; ГКСФ – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор.

## ВВЕДЕНИЕ

Циклофилин А – белок с молекулярной массой около 20 кДа, который проявляет цис-транс-изомеразную активность и имеет широкий спектр разнообразных функций. Циклофилин А продуцируется клетками тимуса и обладает хемотаксическим действием, регулируя миграцию стволовых клеток из костного мозга на периферию [1]. Активированные макрофаги также секретируют ЦФА, который привлекает зрелые моноциты, нейтрофилы, эозинофилы и активированные Т-клетки к очагу воспаления [2].

Однако участие этого белка в функционировании системы гемостаза изучено недостаточно. Известно, что гладкомышечные клетки сосудистой стенки секретируют ЦФА при гипоксии и окислительном стрессе, а при повреждении сосудистой стенки активированные тромбоциты способны выделять ЦФА [3], который, в свою очередь, стимулирует пролиферацию эндотелиоцитов [4] и таким образом способствует развитию регенеративных процессов.

В представленной работе изучено влияние *in vitro* рекомбинантного человеческого циклофилина А на рост фибринового сгустка.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Рекомбинантный человеческий ЦФА получали, используя клетки *Escherichia coli* BL21, трансформированные плазмидой pCuPAwt/pGEX-2TK, кодирующей слитый белок GST-CuPA. Генетическая конструкция использована с любезного разрешения М. Bukrinsky (Albert Einstein College of Medicine of Yeshiva University, США). Синтез GST-CuPA индуцировали, добавляя 0.2 мМ изопропил-β-D-тиогалактопиранозид до конечной концентрации 100 мкМ. Клетки осаждали центрифугированием, суспендировали в Na-K-фосфатном буфере (pH 7.3) и разрушали ультразвуком. Лизат клеток центрифугировали, надсадок наносили на колонку GSTrap FF («GE Healthcare»). Слитый белок GST-CuPA элюировали 50 мМ Трис-HCl-буфером, pH 8.0, содержащим 10 мМ восстановленного глутатиона. Фракции, содержащие GST-CuPA, объединяли, переводили в раствор 10 мМ Трис-HCl (pH 8.0) на колонке HiTrap Desalting («GE Healthcare») и наносили на колонку MonoQ 5 × 50 («GE Healthcare»). Элюцию проводили градиентом 1 М хлорида натрия (0–1 М) в 10 мМ Трис-HCl, pH 8.0. Фракции, содержащие GST-CuPA, переводили диа-

Влияние инкубации в течение 30 мин и 3 ч богатой тромбоцитами плазмы с рекомбинантным человеческим циклофилином А на параметры пространственной динамики роста сгустка

Проба	ЗРС, мин	НСП, мин	ССР, мин	РС-30, мкм	ПС, усл. ед.
Инкубация в течение 30 мин					
Контроль	3.0 ± 1.6	53.3 ± 16.7	32.8 ± 13.1	868.0 ± 180.1	13679.0 ± 2395.0
Опыт	14.8 ± 5.7*	14.3 ± 6.2*	16.8 ± 7.2*	341.1 ± 114.3*	9116.0 ± 2086.0*
Инкубация в течение 3 ч					
Контроль	1.0 ± 0.3	59.7 ± 4.8	37.0 ± 9.0	1329.0 ± 244.7	16182.0 ± 2797.0
Опыт	1.4 ± 0.6	61.8 ± 6.7	33.5 ± 5.2	1258.0 ± 189.8	13971.5 ± 3294.5

Примечание. ЗРС – задержка роста сгустка, НСП – начальная скорость роста, ССР – стационарная скорость роста, РС-30 – размер сгустка на 30-й мин роста, ПС – плотность сгустка.

\*Значимость различий ( $p < 0.05$ ) по сравнению с контролем.

лизом в Na-K-фосфатный буфер (pH 7.3) и добавляли раствор тромбина («Sigma-Aldrich») из расчета 1 ед. акт. на 1 мг слитого белка. Расщепление вели в течение 10 ч при 4°C. Смесь белков СуРА и GST разделяли на колонке GSTrap FF. Раствор СуРА освобождали от тромбина на колонке HiTrap Benzamide FF («GE Healthcare»). Полноту реакции контролировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (SDS-ПААГ). Чистота используемого белка составила ~98%.

Влияние ЦФА *in vitro* на пространственную динамику роста сгустка изучали с использованием венозной крови здоровых доноров, полученную самотеком из периферической вены и стабилизированную 3.7% раствором цитрата натрия в соотношении цитрат : кровь = 1 : 9.

Пробы крови центрифугировали при 1500 об/мин в течение 7 мин. Плазму, богатую тромбоцитами, делили на две части. Первая часть служила контролем (К), во вторую часть (опыт – О) добавляли ЦФА в конечной концентрации 10 или 50 мкг/мл и инкубировали при 37°C в течение 30 мин и 3 ч при постоянном перемешивании для предотвращения оседания тромбоцитов. В качестве вещества сравнения использовали гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (ГКСФ) в конечной концентрации 20 мкг/мл.

По прошествии времени инкубации богатую тромбоцитами плазму центрифугировали при 13700 об/мин в течение 10 мин. Плазму без тромбоцитов использовали для изучения пространственной динамики роста сгустка в соответствии с инструкцией к прибору «Тромбоимиджер-2» (ООО «ГемаКор», Россия).

Регистрировали задержку роста сгустка, или лаг-фазу (мин), начальную (мин) и стационарную (мин)

скорости роста сгустка, размер сгустка на 30-й мин роста (мкм), плотность сгустка (усл. ед.), спонтанное тромбообразование в объеме камеры.

Статистическую обработку результатов эксперимента проводили с использованием критерия Манна-Уитни. Значимыми считали различия при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Параметры пространственной динамики роста сгустка при инкубации богатой тромбоцитами плазмы с ЦФА в течение 30 мин и 3 ч представлены в *таблице*.

Как видно из *таблицы*, 30-минутная инкубация богатой тромбоцитами плазмы с ЦФА в конечной концентрации 10 мкг/мл статистически значимо тормозила пространственную динамику роста сгустка, т.е. ЦФА обнаруживал свойства вещества с гипокоагуляционной активностью. При этом в двух образцах контрольной группы зарегистрировано спонтанное тромбообразование в объеме измерительной камеры. Инкубация с ЦФА предотвращала развитие спонтанного тромбообразования в системе. Однако этот эффект был кратковременным, и через 3 ч различия в параметрах пространственной динамики роста сгустка исчезали (*таблица*).

Не выявлено дозозависимого влияния препарата на рост сгустка при инкубации проб богатой тромбоцитами плазмы с ЦФА в конечной концентрации 50 мкг/мл. Параметры пространственной динамики образования сгустка были такими же, как при инкубации с ЦФА в конечной концентрации 10 мкг/мл. После 3 ч инкубации не наблюдали замедления роста сгустка.

ГКСФ не оказывал какого-либо влияния на величины определенных нами показателей, которые были сравнимы с величинами в контрольной группе.

**ОБСУЖДЕНИЕ**

В организме сгусток образуется не во всем объеме крови, а строго локально – только в небольшой зоне повреждения стенки кровеносного сосуда. При повреждении стенки сосуда в кровь экспонируется тканевый фактор – белок, иммобилизованный на мембране клеток сосудистой стенки, которые до повреждения закрыты слоем эндотелия. При этом диффузия факторов свертывания играет важную роль в процессе пространственного роста сгустка и его локализации. Отдельные патологии специфически влияют на активность компонентов системы свертывания, приводя к выраженным изменениям в различных фазах процесса. Нарушения в механизмах гемокоагуляции клинически проявляются либо кровотечением, либо тромбозом, либо их сочетанием.

Однако в значительной степени процесс тромбообразования происходит в организме в пространственно неоднородных условиях. Поэтому роль отдельных реакций свертывания может проявляться по-разному в *in vitro*-экспериментах при перемешивании и *in vivo* [5].

Метод регистрации пространственной динамики роста сгустка основан на контакте крови с тканевым фактором в измерительной кювете с иммобилизованным тромбопластином [6]. Появление и пространственный рост сгустка от активатора регистрируется по светорассеянию методом темного поля. При этом можно измерять такие важные характеристики процесса, как скорость роста, размер сгустка, образование спонтанных сгустков – информацию, которая недоступна гомогенным методам [7]. Это позволяет одновременно и независимо регистрировать нарушения на всех стадиях процесса.

Нами установлено также (неопубликованные данные), что *in vitro* ЦфА в дозе 10 мкг не влияет на внешний и внутренний пути свертывания крови. Однако уже через 10 мин инкубации с ЦфА наблюдалось увеличение уровня анти-Ха-активности плазмы в 8 раз относительно контрольных значений. После инкубации в течение 30 и 60 мин с белком уровень анти-Ха-активности хотя и снижался, но в 3 раза превышал уровень в контроле. Аналогичные данные получены в модельных опытах на животных. Введение ЦфА в дозе 100 мкг интактным мышам P815 сопровождалось статистически значимым повышением (в 3 раза) уровня ингибирования фактора Ха, а доза 200 мкг приводила к ингибированию фактора Ха, соответствующему 0.6 анти-Ха-Ед/мл. Представленные в данной статье результаты свидетельствуют о том, что ЦфА препятствует росту сгустка, замедляя скорость его образования через ингибирование

фактора Ха, а поскольку сгусток начинает расти не сразу и неравномерно, то возникновение тромба менее вероятно, поскольку в организме такой сгусток будет смываться током крови [8].

Система свертывания крови обладает пороговыми и автокаталитическими свойствами, поэтому ее поведение в пространстве может иметь много общего с активными средами. Атауллаханов и Гурия в 1994 г. выдвинули гипотезу, согласно которой пространственное (но не гомогенное) формирование сгустка происходит автоволновым образом [9]. Автоволновая фаза роста может быть нарушена при дефиците или ингибировании факторов внутреннего пути свертывания.

Автоволновое распространение тромбина не может тормозиться естественными ингибиторами, так как они не способны остановить автоволну в силу их однородного распределения в пространстве. Чтобы это произошло, нужно погасить автокаталитическое производство факторов свертывания. Гипотеза об автоволновом распространении процесса свертывания предполагает существование «двухавтоволнового» механизма остановки волны тромбина [10]. Считается, что в среде может запускаться вторая волна вещества, возникающего после появления тромбина и прекращающего его синтез. Если эта волна будет распространяться с большей скоростью, чем первая, то она сможет остановить движение первой волны.

К настоящему времени неизвестен ингибитор тромбина, который мог бы распространяться автокаталитическим образом. Предполагается, что тромбин может существовать в про- и антикоагулянтной формах [11]. В прокоагулянтном состоянии тромбин высокоактивен по отношению к фибриногену и слабо – к белку С; а в антикоагулянтной форме (вследствие изменения конформации тромбина в комплексе с некоторыми веществами) наоборот, высокоактивен в отношении белка С и малоактивен в отношении фибриногена [12]. Наши данные о влиянии ЦфА на пространственную динамику роста сгустка позволяют выдвинуть гипотезу о возможном воздействии ЦфА на механизм автоволнового процесса свертывания крови.

**ВЫВОДЫ**

Рекомбинантный человеческий циклофилин А обладает выраженным дозозависимым антикоагулянтным эффектом.

Рекомбинантный человеческий циклофилин А способен предотвращать спонтанное тромбообразование.

Антикоагулянтный эффект рекомбинантного человеческого циклофилина А сохраняется не более 2 ч. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Khromykh L.M., Kulikova N.L., Anfalova T.V., Muranova T.A., Abramov V.M., Vasiliev A.M., Khlebnikov V.S., Kazansky D.B. // *Cell Immunol.* 2007. V. 249. № 1. P. 46–53.
2. Xu Q., Leiva M.C., Fischkoff S.A., Handschumacher R.E., Lyttle C.R. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 1168–1171.
3. Coppinger J.A., Cagney G., Toomey S., Kislinger T., Belton O., McRedmond J.P., Cahill D.J., Emili A., Fitzgerald D.J., Maguire P.B. // *Blood.* 2004. V. 103. № 6. P. 2094–2104.
4. Lay A., Jiang X.M., Kisker O., Flynn E., Underwood A., Condron R., Hogg P.J. // *Nature.* 2000. V. 408. P. 869–873.
5. Tijburg P.N., Ryan J., Stern D.M., Wollitzky B., Rimon S., Rimon A., Handley D., Nawroth P., Sixma J.J., de Groot P.G. // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. № 18. P. 12067–12074.
6. Атауллаханов Ф.И., Гурия Г.Т. // *Биофизика.* 1994. Т. 39. № 1. С. 89–96.
7. Kondratovich A.Y., Pokhilko A.V., Ataulakhanov F.I. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2002. V. 1569. № 1–3. P. 86–104.
8. Ованесов М.В. Влияние факторов внутреннего пути свертывания крови на пространственную динамику роста сгустка. М.: ГУ ГНЦ РАМН, 2002.
9. Атауллаханов Ф.И., Гурия Г.Т., Сафрошкина А.Ю. // *Биофизика.* 1994. Т. 39. № 1. С. 97–106.
10. Атауллаханов Ф.И., Волкова Р.И., Похилко А.В., Синауридзе Е.И. // *Биофизика.* 1994. Т. 39. № 4. С. 713–720.
11. Атауллаханов Ф.И. // *Соросовский образовательный журн.* 2000. Т. 6. № 7. С. 2–10.
12. Griffin J.H. // *Nature.* 1995. V. 378. № 6555. P. 337–338.