

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ  
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ им. А.В. ПАЛЛАДИНА

---

На правах рукописи

АНДРИАНОВ Сергей Иванович

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ КРИНГЛОВЫХ СТРУКТУР МОЛЕКУЛЫ ПЛАЗМИНА В  
ПРОЦЕССЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОГО РАЗРУШЕНИЯ ФИБРИНОВОГО СГУСТКА

03.00.04. - биохимия

А в т о р е ф е р а т  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Киев - 1992

544.1

ЛНБ України ім.В.Стефаніка



00344068 (P)

Работа выполнена в Институте

Научный руководитель: доктор профессор КУДИНОВ С.А.

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор СТРУКОВА С.М.  
доктор медицинских наук  
ПАПАЯН Л.П.

Ведущая организация: Киевский НИИ отоларингологии  
им.А.С.Коломийченко МЗ Украины

Защита состоится " 28 " декабря 1992 г. в 14<sup>30</sup> час  
на заседании специализированного ученого совета Д 016.07.01 в  
Институте биохимии им.А.В.Палладина АН Украины по адресу:  
252601, Киев-30, ул.Леонтовича, 9

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке института.  
Автореферат разослан " 27 " ноября 1992 г.

Ученый секретарь  
специализированного совета

*Кирсенко* КИРСЕНКО О.В.



## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Как следует из названия, функция фибринолитической системы в организме заключается в ферментативном лизисе фибриновых сгустков в кровяном русле. Основным компонентом фибринолитической системы является плазминоген - неактивный предшественник активного фермента - плазмина. Нативный плазминоген практически не взаимодействует в кровяном русле с фибриногеном, однако, как только под действием тромбина фибриноген превращается в фибрин, плазминоген сорбируется на сгустках и включается в тромб.

Взаимодействие плазминогена с белками фибринолитической системы регулируется структурными образованиями молекулы плазминогена, которые получили название - лизинсвязывающие участки. Эти участки играют центральную роль в регуляции механизма фибринолиза, модель которого была в общем виде сформулирована в 1978 году (Wiman, Collen). Установлено, что лизинсвязывающие участки расположены в N-концевой части молекулы плазминогена, которая представлена пятью гомологичными повторами, образующими своеобразные трехпетлевые структуры (Castellino et al., 1981; Novokhatny et al., 1984). Подобные трехпетлевые образования, именуемые кринглами, были обнаружены у целого ряда белков систем гемостаза и фибринолиза. Во всех этих белках кринглы выполняют специализированные функции белок-белкового и белок-липидного взаимодействия.

Если роль лизинсвязывающих участков плазминогена в процессах сорбции на полимерном фибрине и в последующей его активации t-PA (Nuylaerts et al., 1982), так же как и в процессе первичного взаимодействия с  $\alpha_2$ -антиплазмином (Wiman et al., 1979) сомнений не вызывает (более того установлены конкретные участки связывания, несущие основную функциональную нагрузку в них), то сведения о роли лизинсвязывающих участков в осуществлении фибринолитической функции плазмина носят противоречивый характер. С одной стороны, установлено, что  $\omega$ -карбоновые кислоты являются мощными антифибринолитиками и их ингибиторный эффект связан с нарушением специфических взаимодействий плазмина с полимерным фибрином, обусловленных лизинсвязывающими участками фермента (Suozza et al., 1986). С другой стороны, не было обнаружено существенных различий в скорости гидролиза и в продуктах деградации фибрина (Neu, Pizzo, 1982) при

протеолитическом воздействии плазмина и миниплазмина (низкомолекулярной формой плазмина, в структуре которого отсутствуют лизинсвязывающие участки первых четырех кринглов нативного фермента) на фибриновый сгусток.

Целью работы явилось исследование роли участков связывания, расположенных в кринглах тяжелой цепи молекулы плазмина, в разрушении структуры фибринового сгустка. Для решения этой проблемы ставились следующие задачи:

1. Получить, очистить и охарактеризовать плазмин и его активные формы - Вал<sub>354</sub>-плазмин, Вал<sub>442</sub>-плазмин и Лиз<sub>530</sub>-плазмин, содержащие различный набор кринглов тяжелой цепи нативного фермента.
2. Сравнить эффективность действия плазмина, Вал<sub>354</sub>-плазмина, Вал<sub>442</sub>-плазмина, Лиз<sub>530</sub>-плазмина и трипсина при разрушении структуры фибринового сгустка.
3. Изучить влияние 6-аминогексановой кислоты, конкурирующей с фибрин(оген)ом за лизинсвязывающие участки плазмин(оген)а на процесс растворения полимерного фибрина исследуемыми ферментами.
4. Установить характерные особенности гидролиза фибринового сгустка плазмином, его протеолитическими формами и трипсином.

Научная новизна работы. Установлено, что эффективность фибринолитического действия плазмина при разрушении фибриллярной основы фибринового сгустка определяется участками взаимодействия, локализованными в кринглах 4 и 5 тяжелой цепи молекулы фермента. Эта закономерность проявлялась как в опытах *in vitro*, так и на модели гифемы в системе *in vivo*. Если роль участка К5 в процессе протеолитической деградации полимерного фибрина плазмином отмечалась и другими исследователями (Neu, Pizzo, 1982), то полученные нами результаты о гораздо более эффективном разрушении фибриллярной основы фибринового сгустка плазмином по сравнению с миниплазмином и о важной роли в этом процессе участка крингла 4 являются принципиально новыми.

Состав продуктов деградации, присутствующих в плазминовом гидролизате полимерного фибрина в момент времени, соответствующий времени полулизиса сгустка, указывает на то, что разрушение фибринового сгустка плазмином представляет собой направленный процесс, суть которого заключается в расщеплении фибринового волокна на

крупные надмолекулярные частицы фибрилл.

Теоретическое и практическое значение работы. Полученные результаты позволяют функционально оценить и топографически локализовать участки связывания плазмина, определяющие эффективность процесса протеолитической деградации фибриллярной основы фибринового сгустка, и объясняют механизм эффективного фибринолитического действия плазмина по сравнению с другими протеолитическими ферментами. Совокупность полученных данных способствует целенаправленному, теоретически обоснованному поиску ферментных препаратов, обладающих мощным фибринолитическим потенциалом пролонгированного действия в условиях *in vivo*.

Апробация работы. Основные результаты и отдельные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на VII Всесоюзном симпозиуме по химии белков и пептидов (Таллин, 1987), на научном семинаре Совета молодых исследователей Института биохимии им. А.В. Палладина АН Украины (Киев, 1989), на VI Украинском биохимическом съезде (Киев, 1992), на совместном семинаре отделов химии и биохимии ферментов, структуры и функции белка и молекулярной иммунологии Института биохимии им. А.В. Палладина АН Украины (Киев, 1992).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 6 печатных работ.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 123 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, изложенных в 4 главах, заключения, выводов, списка основной использованной литературы (186 источников). Работа иллюстрирована 14 рисунками и 6 таблицами.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Лиз-плазминоген человека выделяли из фракции плазмы крови III<sub>2,3</sub> по Кону методом аффинной хроматографии на лизин-сефарозе 4Б (Castellino, Powel, 1981).

Аффиннохроматографическую форму II плазминогена выделяли из препарата Лиз-плазминогена по методу, предложенному (Brookway, Castellino, 1972), с небольшими модификациями.

Вал<sub>442</sub>-плазминоген (миниплазминоген) получали протеолизом Лиз-плазминогена свиной панкреатической эластазой фирмы "Sigma"

(США) (Sottrup-Jensen et al., 1978) в присутствии контрикала (Германия), с последующей гель-фильтрацией гидролизата на сефадексе Г-75 и аффинной хроматографией на лизин-сефарозе.

Вал<sup>354</sup>-плазминоген получали ограниченным протеолизом аффинно-хроматографической формы II Лиз-плазминогена свиной панкреатической эластазой фирмы "Sigma" (США) в присутствии контрикала (Германия). Гидролизат последовательно фракционировали на Лиз-сефарозе градиентом 6-аминогексановой кислоты (6-АГК), с последующей гель-фильтрацией на сефакириле С-200 (Powell, Castellino, 1981).

Лиз-плазмин, Вал<sup>354</sup>-плазмин и миниплазмин получали активацией соответствующих форм плазминогена стрептокиназой (Швейцария) (Wiman, 1977).

Лиз<sup>530</sup>-плазмин (микроплазмин) получали автолизом плазмينا с последующей аффинной хроматографией на лизин-сефарозе и соевый ингибитор трипсина сефарозе (Wu et al., 1987).

Трипсин - был использован коммерческий препарат фирмы "Spofha" (Чехословакия).

Фибриноген выделяли из оксалатной крови быка высаливанием сульфатом натрия (Белицер и соавт., 1972).

Мономерный фибрин получали из обработанного  $\alpha$ -тромбином фирмы "Calbiochem" (США) фибриногена в присутствии контрикала и п-хлор-меркурий бензойной кислоты, после растворения образовавшегося сгустка в 20 мМ уксусной кислоте (Pozdnjakowa et al., 1979).

<sup>125</sup>I-меченный мономерный фибрин получали добавлением <sup>125</sup>I-меченного фибриногена в исходный раствор фибриногена перед его обработкой  $\alpha$ -тромбином. Фибриноген иодировали Na<sup>125</sup>I с помощью хлор-амин Т (Mc Gonachey, Dixon, 1980).

Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) проводили в триацетатной системе в присутствии 0,1% ДС-натрия. Электрофоретическую подвижность активных ферментов определяли с помощью ДС-натрия электрофореза в ПААГ, содержащего 0,1% желатину фирмы "Serva" (Германия) (Heussen, Dowble, 1980).

Протеолитическую активность ферментов оценивали по их способности гидролизовать казеин (по Гаммерстону) (Robbins, Summaria, 1979).

Время полулизиса сгустка определяли спектрофотометрически,

измеряя уменьшение поглощения при 350 нм (Bouvier et al., 1975, Макогоненко и сотр., 1987).

Денситометрирование гелей проводили с помощью Ultroscan laser densitometer ЛКВ. Перерасчет данных денситометра производили на Integrator 2221-001 ЛКВ.

Радиоактивность электрофоретических зон измеряли на счетчике "Gamma 5500" (США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Сравнение фибринолитических потенциалов плазмينا, его производных форм и трипсина в процессе разрушения фибриллярной структуры сгустка.

Роль участков связывания плазмина в процессе протеолитического разрушения фибриллярной основы фибринового сгустка оценивали, используя нативный фермент, ряд его низкомолекулярных форм, содержащих различный набор кринглов тяжелой цепи плазмина (Рис.1), и трипсин.

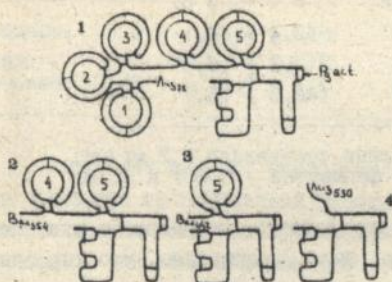


Рис.1. Схематическое изображение молекулы плазминогена и его протеолитически производных низкомолекулярных форм:

1. Лиз<sub>77</sub>-плазмин (плазмин);
2. Вал<sub>354</sub>-плазмин;
3. Вал<sub>442</sub>-плазмин (миниплазмин);
4. Лиз<sub>530</sub>-плазмин (микроплазмин).

Для достижения поставленной цели наиболее информативным, с нашей точки зрения, является метод определения времени полулизиса фибринового сгустка ( $t_{1/2}$ ), основанный на изменении мутности среды в ходе образования и протеолитического разрушения фибринового сгустка. Использование данного методического подхода позволило исследовать эффективность тромболитического действия различных форм плазмина и трипсина в ходе осуществления наиболее важного в физиологическом отношении процесса - разрушение фибриллярной основы сгустка.

Обнаружено, что при одинаковой протеолитической активности (по казеину) скорости растворения фибринового сгустка плазмином, Вал<sub>354</sub>-плазмином, миниплазмином и микроплазмином соотносятся как 40,3:38,0:4,6:1,0 (таблица 1). На основании анализа состава кринглов в исследованных формах плазмينا было заключено, что участки кринглов 4 и 5 плазмينا играют основную роль в процессе разрушения структуры фибринового сгустка. Результаты о более эффективном фибринолитическом действии плазмينا по сравнению с миниплазмином и о роли участка K4 в этом процессе являются принципиально новыми и находятся в противоречии с данными литературы.

Таблица 1.

Время полулизиса фибринового сгустка плазмином, его протеолитическими производными и трипсином

ФЕРМЕНТ	$t_{1/2}$ , мин
Плазмин	5,3 ± 0,4
Вал <sub>354</sub> -плазмин	5,6 ± 0,3
Миниплазмин	48,4 ± 4,1
Микроплазмин	212,2 ± 16,2
Трипсин	146,8 ± 15,7

Концентрация мономерного фибрина составляла 0,2 мг/мл, казеинолитическая активность ферментов - 0,007 к.е./мл

При сравнении тромболитического действия плазмينا и миниплазмينا на модели гифемы (у кроликов) было установлено, что терапевтический эффект плазмينا в два раза более выражен, чем у миниплазмينا (таблица 2). Суммарная доза препарата миниплазмينا необходимая для полного рассасывания тромбов оказалась на 15-20% выше, чем для плазмينا. Этот результат указывает на важную роль участк(ов)а фермента K1-4 плазмينا в тромболитическом процессе в системе *in vivo*. Наблюдаемое сближение тромболитических потенциалов плазмينا и миниплазмينا на модели гифемы по сравнению с их фибринолитическими потенциалами в системе *in vitro*, обусловлено наличием в системе *in vivo* факторов, отсутствующий в "чистой" системе. Одним из наиболее мощных таких факторов является  $\alpha_2$ -антиплазмин, который

ингибирует плазмин со значительно более высокой скоростью, чем миниплазмин (Robbins et al., 1981). Если бы плазмин и миниплазмин с одинаковой скоростью растворяли полимерный фибрин, то присутствие дополнительных агентов, которые угнетали бы в большей степени один из ферментов, отразилось бы на разности их фибринолитических потенциалов в пользу другого, но не наоборот. Поскольку даже в присутствии ингибиторов плазмин является более мощным фибринолитиком, чем миниплазмин, то это свойство плазмина (что мы и наблюдали в "чистой" системе) должно в еще большей степени проявиться при отсутствии ингибирующих агентов.

Таблица 2.

Динамика рассасывания экспериментальной гифемы при тромболитическом воздействии препаратов плазмина и миниплазмина.

Тромболитический агент	Контрольный глаз		Леченный глаз		Суммарная доза необходимая для полного рассасывания сгустка (к.е.)
	количество опытов	время рассасывания гифемы (сутки)	количество опытов	время рассасывания гифемы (сутки)	
Плазмин	5	18,6 ± 2,6	5	12,0 ± 1,4	416
Мини-плазмин	5	18,6 ± 1,6	5	15,0 ± 1,7	497

Возникает вопрос, насколько специфично гидролитическое действие плазмина на полимерный фибрин, важны ли ЛСУ при гидролизе плазмином других белковых субстратов и, в частности, фибриногена. Обнаружено, что по образованию ТХУ-неосажаемых тирозинсодержащих пептидов фибриногенолитические активности плазмина, Val<sup>354</sup>-, Val<sup>442</sup>-, Lys<sup>530</sup>-плазмина и трипсина соотносились как 0,9 : 1 : 1 : 0,5 : 0,6, соответственно. Разница фибринолитических потенциалов для данных ферментов по сравнению с фибриногенолитическими является очень существенной. Т.е. участки кринглов 1-4 не определяют скорость гидролиза фибриногена плазмином, а высокая эффективность фибринолитического действия плазмина и Val<sup>354</sup>-плазмина, по сравнению с микроплазмином и миниплазмином реализуется только в процессе разрушения природного субстрата - полимерного фибрина.

2. Влияние 6-аминогексановой кислоты на скорость разрушения полимерного фибрина плазмином, его производными формами и трипсином.

Изучая влияние 6-АГК на процесс разрушения структуры полимерного фибрина плазмином, его производными и трипсином, установлено, что 1 мМ 6-АГК (таблица 3) угнетает скорость гидролиза фибрина плазмином в 8,5, а миниплазмином в 3 раза. Следовательно, нарушение специфических взаимодействий ферментов с субстратом, опосредованных лизинсвязывающими участками плазмана, приводит к снижению его способности эффективно разрушать макроструктуру фибринового сгустка. Как и ожидалось, время гидролиза фибрина микроплазмином и трипсином практически не изменилось, что указывает на отсутствие ингибирующего действия антифибринолитика, в данной концентрации, по активному центру исследованных ферментов.

Таблица 3.

Влияние 6-аминогексановой кислоты на скорость гидролиза полимерного фибрина плазмином, миниплазмином, микроплазмином и трипсином.

ФЕРМЕНТ	$t_{1/2}$ , мин в	отношение
	присутствии 1 мМ 6-АГК	$t_{1/2}$ с 1 мМ 6-АГК к $t_{1/2}$ без 6-АГК
Плазмин	45,3 ± 3,8	8,54
Миниплазмин	144,6 ± 13,8	2,98
Микроплазмин	208,6 ± 18,4	0,98
Трипсин	153,2 ± 16,1	1,04

Условия эксперимента аналогичны приведенным в таблице 1.

Характер зависимости  $t_{1/2}$  сгустка плазмином от концентрации 6-АГК (рис. 2) указывает на участие в процессе разрушения фибринового сгустка аффинных центров фермента, обладающих различным сродством к 6-АГК. Экспоненциальный характер зависимости времени гидролиза сгустка является своего рода предпосылкой, указывающей на то, что определяющие скорость фибринолитического процесса специфич-

ческие взаимодействия фермента с твердофазным субстратом осуществляются более чем по одному участку связывания. Для миниплазмينا, сродство которого к фибрину определяется участком крингла 5, наблюдается линейное увеличение времени гидролиза полимерного субстрата. В области концентраций антифибринолитика до (100 мкМ), насыщающих высокоаффинный участок связывания, локализованный в K1-3 плазмина, наблюдается слабое ингибирование фибринолитического процесса. Концентрации 6-АГК, насыщающие участки плазмина промежуточного и низкого сродства к антифибринолитику, заметно увеличивали время полулизиса.

Полученные результаты позволяют заключить, что взаимодействия плазмина с фибрином, определяющие эффективность фибринолитического процесса, опосредованы участками, которые расположены в K4 и K5 молекулы фермента.

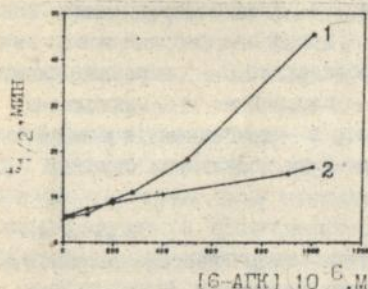


Рис. 2. Зависимость времени полулизиса фибринового сгустка плазмином (1) и миниплазмином (2) от концентрации 6-аминогексановой кислоты. Казеинолитическая активность плазмина составляла 0,007 к.е./мл, миниплазмина - 0,07 к.е./мл.

### 3. Особенности протеолитического разрушения структуры полимерного фибрина плазмином, миниплазмином, микроплазмином и трипсином.

Для выяснения механизма протеолитического действия Лиз<sub>77</sub>-, Вал<sub>442</sub>-, Лиз<sub>530</sub>-плазмина и трипсина при разрушении фибриллярной структуры сгустка был изучен количественный состав фракций гидролизатов фибрина (рис. 3) в момент времени, соответствующий времени полулизиса сгустка для каждого из ферментов.

В плазминовом и миниплазминовом гидролизатах фибрина на долю фракции, содержащей  $\Gamma_0$  и  $X_1$ -фрагмент фибрина, приходилось соответственно 63% и 58% радиоактивности от нанесенной на электрофоретический трек (таблица 4). Переход в раствор индивидуальных молекул

нативного фибрина и его  $X_1$ -фрагмента в ходе протеолитической деградации сгустка представляется маловероятным процессом. На стадии образования  $X_1$ - и даже  $X_2$ -фрагментов фибрина при гидролизе плазмином (Shen et al., 1977) не было обнаружено признаков разрушения и изменения эластичности (жесткости) сгустка. Столь высокое содержание в момент времени полулизиса молекул нативного фибрина и его фрагментов, потенциально способных (с учетом количества  $X_2$ -фрагмента на их долю приходится около 80 % радиоактивности) сохранять фибриллярную структуру сгустка, свидетельствует о том, что разрушение полимерного фибрина плазмином осуществляется за счет вычленения из структуры фибринового волокна крупных надмолекулярных фибриллярных частиц.

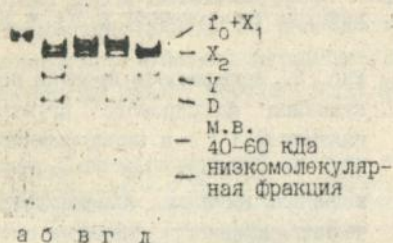


Рис. 3. Электрофореграммы: а - исходного фибрина и его гидролизатов; б - микроплазмином, в - плазмином, г - миниплазмином, д - трипсином, в момент времени полулизиса сгустка.

Таблица 4.

Радиоактивность электрофоретических зон гидролизатов фибриновых сгустков, полученных с помощью различных ферментов ( в % по отношению к общей радиоактивности электрофоретического трека )

ФЕРМЕНТ	$I_0 + X_1$	$X_2$	$Y$	$D$	М.В. 40-60 кДа	НИЗКОМОЛ. ФРАКЦИЯ
ПЛАЗМИН	$62.7 \pm 4.8$	$16.0 \pm 2.1$	$6.8 \pm 0.5$	$4.7 \pm 0.5$	$6.3 \pm 0.4$	$5.5 \pm 0.7$
МИНИ- ПЛАЗМИН	$57.6 \pm 6.1$	$21.7 \pm 1.9$	$4.7 \pm 0.6$	$4.9 \pm 0.7$	$5.8 \pm 0.7$	$6.3 \pm 0.6$
МИКРО- ПЛАЗМИН	$39.7 \pm 4.2$	$29.0 \pm 3.3$	$10.5 \pm 1.2$	$5.3 \pm 0.4$	$7.2 \pm 0.6$	$8.2 \pm 1.0$
ТРИПСИН	$30.2 \pm 2.9$	$33.6 \pm 3.4$	$12.6 \pm 1.1$	$7.8 \pm 0.9$	$4.3 \pm 0.5$	$11.5 \pm 1.2$

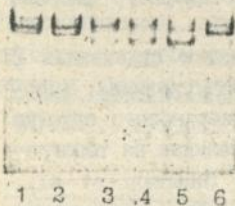
В трипсиновом и микроплазминовом гидролизатах сгустка мы обнаружили относительно низкое содержание фракций нативного фибрина и  $X_1$ -фрагмента и относительно высокое содержание более низкомолекулярных фрагментов фибрина. Вероятно, процесс растворения сгустка этими ферментами состоит в преимущественном удалении с поверхности фибриллы периферических молекул фибрина путем их протеолитической деградации. Такой путь разрушения сгустка является, без сомнения, более трудоемким и длительным. Полученный нами результат о "крупноблочном" характере гидролиза полимерного фибрина плазмином находит подтверждение и в работах других авторов (Gladner, Nowal, 1983, Weisel, 1987), которые обнаружили, что радиус частиц, высвобождающихся с поверхности перевариваемой плазмином фибриллы, в несколько раз превышает диаметр молекул мономерного фибрина и составляет величину приблизительно равную  $1 \cdot 10^4$  Å. Причем, степень поперечной прошивки сгустка фактором XIIIa не оказывала заметного влияния на скорость образования и размер частиц, сбрасываемых с поверхности фибриллы, если гидролиз сгустка осуществляли плазмином.

Однако, механизм процесса фибринолиза - с точки зрения разрушения структуры сгустка - не был достаточно подробно исследован при протеолитическом воздействии других ферментов (в том числе и низкомолекулярных форм плазмина). Поэтому вопрос о каком-то особенном характере протеолитической деградации полимерного фибрина плазмином ранее не поднимался и не обсуждался.

Полученные результаты показывают, что участки связывания с фибрином, локализованные в кринглах 4 и 5 молекулы плазмина, выполняют важную функцию при разрушении структуры фибринового сгустка плазмином. Они принимают участие в адсорбции плазмина на топографически разобщенных участках молекулы фибрина (Suenson et al., 1990), что и определяет характер процесса гидролиза - расщепление волокон фибрина на крупные растворимые надмолекулярные блоки и скорость разрушения фибриновой сети. Вероятно, участок крингла 5 может обеспечивать "крупноблочный" механизм гидролиза фибринового сгустка миниплазмином, но не обеспечивает максимально высокую скорость фибринолиза. Дополнительное взаимодействие по участку крингла 4, возможно, придает необходимую аффинность плазмину и определяет высокую скорость гидролиза полимерного фибрина.

Однако, способность эффективно расщеплять полимерный фибрин определяется, возможно, и другими особенностями ферментов, которые в настоящее время не выяснены. На долю высокомолекулярной фракции в фибриновом гидролизате микроплазмина приходится 40% радиоактивности, а в трипсиновом гидролизате - только 30%, что из приведенных выше соображений должно давать преимущество в скорости микроплазмину. Однако, фактически трипсин разрушает структуру фибринового сгустка в два раза быстрее. Анализируя электрофореграммы восстановленных в присутствии 4% 2-меркаптоэтанола образцов гидролизатов фибрина (рис. 4), мы не обнаружили заметных различий в качественном составе белковых зон для плазмина, микроплазмина и микроплазмина. Наблюдаемые отклонения относятся к количественному содержанию той или иной белковой фракции в плазминовых гидролизатах. Трипсин гидролизует фибрин на несколько отличные фрагменты чем плазмин и его протеолитические производные формы. В трипсиновом гидролизате присутствует белковая зона с м.в. около 29 кДа, которую мы не наблюдаем в плазминовых гидролизатах. Для последних, однако, характерно наличие белковой фракции с м.в. около 10-12 кДа, а в гидролизате трипсина она отсутствует.

Рис. 4. Электрофорез в 10% ПААГ с 0,1% ДС-натрия в присутствии 4% 2-меркаптоэтанола: 1 - исходный фибрин, 2 - фибрин, инкубированный 190 минут в условиях эксперимента; гидролизаты полимерного фибрина в момент времени полулизиса сгустка 3 - плазмином, 4 - микроплазмином, 5 - микроплазмином, 6 - трипсином.



Чем определяются данные различия в ходе протеолитического расщепления фибрина плазмином и трипсином сказать сложно. С большой долей уверенности можно предположить, что они не определяются участками связывания, локализованными в крингловых структурах молекулы плазмина, поскольку микроплазмин, лишенный этих участков гидролизует в фибрине аналогичные пептидные связи. Вполне вероятно, что различия могут реализовываться на уровне активных центров этих фе-

рментов и/или из-за наличия в легкой цепи плазмина бензамидинсвязывающего участка, функциональная роль которого в фибринолитическом процессе пока не определена.

4. Исследование процесса разрушения фибриновых сгустков, сформированных при различных концентрациях мономерного фибрина.

Как установлено ранее (Blombak et al., 1989), одним из основных факторов, определяющих макроструктурную организацию фибринового сгустка, является концентрация фибриногена и/или тромбина. Для изучения гидролитического действия плазмина в процессе разрушения фибриновых сгустков различной макроструктурной организации мы исследовали протеолиз фибриновых сгустков, формирование которых проходило в интервале концентраций фибрин-мономера 0,2-1,0 мг/мл, плазмином, его производными и трипсином. При этом соотношение фермент : субстрат оставалось величиной постоянной и составляло 0,035 к.е. : 1,0 мг.

Установлено, что сгустки, сформированные при концентрации  $t_0$  1,0 мг/мл, разрушаются плазмином в 2,3 раза медленнее, чем сгустки, формирование которых проходило при концентрации субстрата 0,2 мг/мл (таблица 5). Для трипсина, миниплазмина и микроплазмина наблюдалась противоположная закономерность. Время полулизиса для этих ферментов сокращалось в 1,2, 1,3 и 1,9 раз соответственно.

Таблица 5.

Время полулизиса фибриновых сгустков, формирование которых проходило при различных концентрациях мономерного фибрина, плазмином, миниплазмином, микроплазмином и трипсином.

Фермент	концентрация мономерного фибрина	
	0,2 мг/мл $t_{1/2}$ , мин	1,0 мг/мл $t_{1/2}$ , мин
Плазмин	5,3 ± 0,4	12,4 ± 1,4
Миниплазмин	48,4 ± 4,1	40,0 ± 4,1
Микроплазмин	212,2 ± 16,2	164,1 ± 14,8
Трипсин	146,8 ± 15,7	78,1 ± 9,6

Одним из факторов, способным в определенной степени оказывать ингибирующее влияние на фибринолитическое действие плазмина, являются конечные продукты (D- и E-фрагменты) деградации фибрина (оген)а (Розенфельд и сотр. 1983), концентрация которых будет возрастать с увеличением концентрации субстрата. Мы изучили влияние продуктов деградации фибриногена и непрошитого фибрина (ПДФ) на процесс разрушения структуры фибринового сгустка плазмином и миниплазмином. Использованная концентрация ПДФ более чем в четыре раза (на основании данных представленных в таблице 5) превышала их максимально возможную концентрацию в момент времени полулизиса сгустка. Очевидно, что фактическая концентрация ПДФ, которая образуется в ходе лизиса сгустка, будет еще ниже.

При данной постановке эксперимента нами не было обнаружено достоверного влияния ПДФ на процесс разрушения структуры фибринового сгустка миниплазмином. Время полулизиса сгустка плазмином возрастало с  $5,3 \pm 0,4$  минут до  $6,6 \pm 0,7$  минуты. Это значение почти в два раза ниже величины  $t_{1/2} = 12,4$  мин, которую мы наблюдали при увеличении концентрации мономерного фибрина до 1 мг/мл. Полученный результат свидетельствует о том, что ПДФ, образующиеся в ходе протеолитической деградации сгустка плазмином, не определяют скорость разрушения структуры фибринового сгустка.

Наличие дополнительных факторов, влияющих на гидролиз полимерного фибрина, предполагает и характер зависимости скорости разрушения фибринового сгустка плазмином от концентрации мономерного фибрина (рис. 5). На оси ординат представлена величина  $(1/t_{1/2})$  пропорциональная скорости разрушения фибринового сгустка, а по оси абсцисс - концентрация фибрина, при которой происходит формирование сгустка. Скорость гидролиза сгустка миниплазмином замедлялась пропорционально увеличению концентрации мономерного фибрина. Линейный характер уменьшения скорости разрушения структуры полимерного фибрина миниплазмином связан в основном с фактическим изменением числа пептидных связей, которые необходимо расщепить ферменту для двукратного уменьшения величины мутности, регистрируемой при длине волны 350 нм. Как и в случае пропорционального увеличения концентраций фермента и субстрата (таблица 5), миниплазмин казался нечувствительным к изменению макроструктурной орга-

низации фибринового сгустка.

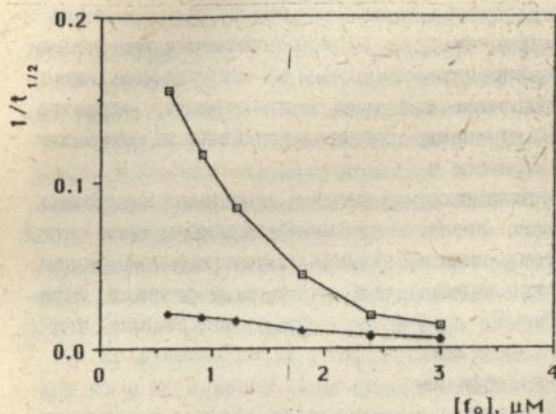


Рис.5. Зависимость скорости гидролиза фибринового сгустка плазмином (□) и миниплазмином (◊) от концентрации мономерного фибрина. Активность ферментов составляла 0,007 к.е./мл.

Зависимость скорости разрушения полимерного фибрина плазмином от концентрации мономерного фибрина носила экспоненциальный характер. В интервале концентраций субстрата 0,2–0,6 мг/мл наблюдается наиболее значительное падение скорости гидролиза, которое заметно нивелируется при дальнейшем увеличении концентрации фибрин-мономера. Кроме фактического увеличения числа обязательно расщепляемых пептидных связей, наиболее вероятным фактором, имеющим место при данном процессе и способным оказывать существенное влияние на ход протеолитического разрушения полимерного фибрина плазмином, является изменение макроструктурной организации фибринового сгустка.

На основании полученных нами результатов и данных других авторов (de Fonw et al., 1988, Nair et al., 1989) можно заключить, что одним из основных факторов, способным оказывать заметное влияние на процесс разрушения полимерного фибрина плазмином, является изменение макроструктурной организации сгустка.

Механизм, регулирующий направление (ускорение или замедление) процесса гидролиза для различных протеаз, обусловленного изменением макроструктурной организации сгустка, вероятно, связан со спецификой фибринолитического действия ферментов. Плазмин расщепляет полимерный фибрин в связанном со сгустком состоянии. Поэтому один

раз сорбированная молекула плазмина может подвергнуть расщеплению большое количество молекул субстрата при гидролизе более толстых и длинных фибриновых волокон. Трипсин и микроплазмин осуществляют гидролиз хаотично, контактируя с субстратом за счет своего активного центра. Фибринолитическое действие миниплазмина, вероятно, носит промежуточный характер между действием плазмина и микроплазмينا.

Совокупность представленных результатов позволяет заключить, что разрушение фибринового сгустка плазмином представляет собой направленный процесс, суть которого заключается в расщеплении фибринового сгустка на крупные надмолекулярные частицы фибрилл. Определяющая роль в этом процессе принадлежит участкам кринглов 4 и 5 молекулы плазмина.

#### ВЫВОДЫ

1. Установлено, что время полулизиса фибринового сгустка плазмином и Вал<sub>354</sub>-плазмином практически одинаковое и приблизительно в 9, 28 и 40 раз меньше, чем - миниплазмином, трипсином и микроплазмином, соответственно. Наличие участков кринглов 4 и 5 тяжелой цепи является необходимым и достаточным условием, определяющим эффективность протеолитического разрушения структуры фибринового сгустка плазмином.

2. Обнаружено, что высокая эффективность действия плазмина и Вал<sub>354</sub>-плазмина, по сравнению с миниплазмином и микроплазмином, проявляется только по отношению к природному субстрату - полимерному фибрину.

3. При сравнении фибринолитических активностей плазмина, миниплазмина и микроплазмина установлено, что участок связывания крингла 5 определяет скорость гидролиза фибриногена плазмином.

4. Эффективность фибринолитического действия плазмина обеспечивается преимущественным разрушением сгустка с образованием надмолекулярных частиц фибринового волокна.

5. Скорость протеолитической деградации полимерного фибрина в высокой степени зависит от макроструктурной организации сгустка.

6. Продукты деградации фибрина (оген) не оказывают существенного ингибирующего эффекта на процесс разрушения структуры фибринового сгустка плазмином.

Список работ, опубликованных по материалам диссертации:

1. Андрианов С.И., Макогоненко Е.М., Лежен Т.И., Кудинов С.А. Функция кринглов 1-4 и 5 плазмина в разрушении структуры фибринового сгустка // VII Всесоюзный симпозиум по химии белков и пептидов: тезисы докладов / Таллин, октябрь, 1987. / -С.21.
2. Андрианов С.И., Макогоненко Е.М., Лежен Т.И., Кудинов С.А. Роль крингловых структур молекулы плазминогена в осуществлении фибринолитической функции // Доклады АН УССР. -1988. -N 12. -с.44-47.
3. Заявка N 4837619/14 от 30. 06. 1990 г. "Способ определения параметров свертывания и фибринолиза крови" / Лежен Т.И., Макогоненко Е.М., Колесник Л.А., Кремарев С.А., Мартынюк Т.В., Андрианов С.И. / ; Решение о выдаче патента от 13. 05. 1991 г.
4. Андрианов С.И., Макогоненко Е.М., Кудинов С.А. Роль кринглов K4 и K5 тяжелой цепи плазмина в разрушении структуры фибринового сгустка // Укр. биохим. журн. -1992. -64, N 2. -С.31-38.
5. Андрианов С.И., Макогоненко Е.М., Кудинов С.А. Особенности гидролиза полимерного фибрина плазмином, миниплазмином, микроплазмином и трипсином // Укр. биохим. журн. -1992. -64, N 3. -С.14-20.
6. Андрианов С.И., Кудинов С.О. Особенности гидролиза полимерного фибрина плазмином I Вал<sup>442</sup>-плазмином / VI Укр. биохим. з'їзд: тез. доп. - Київ, 1992. - Ч. I. - (С. 108.

Подп. к печ. 18.11.92.

Формат 60\*84/16 Бумага Тшш 6'2

Печ. офс. Усл. печ. л. 0 93

Уч.-изд. л. 0 16 Тираж 120

Зак. 2-3608 - Бесплатно.

Киевская книжная типография научной книги. Киев, Релина, 4.

Л. С. И. М. Стефанко  
АН УРСР

AB 26.288

**AB 26.288**