

УДК 577.3

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ЛИЗИСА ФИБРИНОВОГО СГУСТКА *IN VITRO* В ПРИСУТСТВИИ α 2-АНТИПЛАЗМИНА И α 2-МАКРОГЛОБУЛИНА

И.С. Голомысов

(Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, физический факультет, кафедра биофизики; e-mail: golm@mail.ru.com)

Проведено экспериментальное исследование лизиса фибринового сгустка *in vitro*. Было учтено взаимодействие следующих белковых компонентов: фибрина, плазмينا, пламиногена, урокиназы. Исследовано влияние ингибиторов плазмина (α 2-антиплазмина и α 2-макроглобулина) на индуцированный плазмином фибринолиз и индуцированный урокиназой фибринолиз.

В настоящее время существует ряд гипотез по поводу того, каким образом осуществляется разрушение фибрина плазмином. Например, по одной из гипотез плазмину доступна только внешняя поверхность фибринового волокна [1], по другой – плазмин может свободно проникать внутрь волокна, и тогда ему доступен весь фибрин [2], по третьей – плазмин может перемещаться по своему субстрату, не проникая в раствор [3].

Данная работа посвящена экспериментальному исследованию лизиса фибринового сгустка *in vitro* и влиянию на него ингибиторов плазмина – α 2-антиплазмина и α 2-макроглобулина. Результаты работы позволят в дальнейшем создать экспериментальный базис для теоретической модели фибринолиза, что поможет разобраться в различных гипотезах лизиса фибрина.

Экспериментальные методы

Получение меченного биотином фибриногена [4]. К 1 мл раствора 6 мг/мл фибриногена (*Sigma*, USA) в ФСБР* (рН 8,2) добавляли 60 мкг N-гидроксисукцинимидного эфира. Смесь инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре. Затем проводили диализ смеси против 10-кратного объема ФСБР при комнатной температуре с 3-кратной его заменой. Каждый этап диализа длился по 1 ч. В конечном итоге на каждую молекулу фибриногена пришлось в среднем по 6 молекул биотина.

Приготовление фибриновых сгустков. Фибриновые сгустки были приготовлены в 96-луночных планшетах *Dynatech*. Для этого к раствору фибриногена с концентрацией 3 мг/мл в ФСБР был добавлен раствор меченного биотином фибриногена (3 мг/мл) до 2 об.%, раствор тромбина (Каунас, Литва) 1 мг/мл (0,05 мл на 1 мл раствора) и глицерин (до 4 об.%). Затем полученный

раствор был аккуратно размещен в лунках планшета по 40 мкл на лунку (в лунках при этом находилось по 100 мкл ФСБР) так, чтобы раствор фибриногена оказался под слоем ФСБР. Планшет был помещен в инкубатор на 30 мин при 37°. Затем слой ФСБР был удален. При этом высота образовавшегося сгустка составляла 1 мм. Для удаления тромбина из полученных сгустков в лунки добавляли по 300 мкл ФСБР, планшет инкубировали в течение 6 ч при 4°. Затем эта же процедура повторялась еще 2 раза с заменой ФСБР так, чтобы концентрация тромбина в сгустке не превышала 0,01 мкМ. Контроль остаточного тромбина проводили с помощью хромогенного субстрата S-2238 (*Serva*, Germany) [5].

Получение пламиногена. Пламиноген был выделен из свежей плазмы крови человека, полученной в Институте клинической кардиологии РКНПК с помощью лизин-сефарозы [6]. Активность препарата проверяли с помощью хромогенного субстрата S-2251 (*Serva*, Germany) [7].

Получение плазмина. Плазмин был получен из пламиногена активацией его урокиназой [8]. Активность плазмина проверяли с помощью хромогенного субстрата S-2251 [7].

Получение α 2-макроглобулина. По методу, описанному в [9], α 2-макроглобулин был выделен из свежей плазмы крови человека с помощью осаждения плазмы в ПЕГ-6000 (5 и 12%) и гель-фильтрации на *Sepharose CL6B*. Активность препарата проверяли с помощью трипсина [9].

Получение α 2-антиплазмина. С помощью аффинной хроматографии [10] α 2-антиплазмин был выделен из свежей плазмы крови человека. Активность препарата проверяли с помощью плазмина [10].

Определение концентрации продуктов лизиса фибрина. В лунки 96-луночного планшета добавляли

* ФСБР – фосфатный солевой буферный раствор (NaCl 140 мМ, Na₂HPO₄ 10 мМ, рН 7,4).

100 мкл раствора авидина в КБР* (0,01 мг/мл). Затем планшет инкубировали при 37° в течение 2 ч, после чего лунки промывали ФСБР. Затем в лунки добавляли раствор ФСБР (по 150 мкл) с твином-20 (0,05%) и проводили инкубацию в течение 1 ч. Потом исследуемые образцы с известной и неизвестной концентрацией продуктов распада фибрина в ФСБР были добавлены в лунки (после удаления предыдущего раствора) по 100 мкл на лунку в концентрации 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 от исходной. Планшет инкубировали в течение 30 мин при 37°, лунки промывали ФСБР с твином. Затем в лунки добавляли по 150 мкл стрептавидина в ФСБР (0,04 мг/мл), конъюгированного пероксидазой хрена. Планшет инкубировали в течение 30 мин при 37° и промывали ФСБР с твином. После этого во все лунки добавили по 100 мкл раствора цитрата Na 40 мМ; 0,01% ОФД; 0,01% H₂O₂ (pH 4,7). Через несколько минут, как только в одной из лунок появилась яркая окраска, во все лунки добавили по 50 мкл 10%-й серной кислоты. Затем в лунках измеряли оптическую плотность раствора ($\lambda = 495$ нм). Концентрацию продуктов распада фибрина определяли так же, как и в [11].

Лизис фибрина плазмином. Эксперименты проводили в 96-луночных планшетах *Dynatech*. В лунки с приготовленными фибриновыми сгустками добавляли раствор плазмينا (по 40 мкл) в ФСБР в разной концентрации (0,05; 0,1; 0,2 мкМ). Затем планшет помещали в инкубатор (37°). Через определенные промежутки времени (20, 30, 40, 60, 80, 120 мин) измеряли концентрацию продуктов распада фибрина в растворе над сгустком.

Лизис фибрина плазмином в присутствии ингибиторов плазмينا – α 2-антиплазмينا и α 2-макроглобулина. В лунки с фибриновыми сгустками добавляли раствор одного из ингибиторов (по 40 мкл) в ФСБР в разных концентрациях: 0; 0,1; 0,25 мкМ. Планшет инкубировали в течение 6 ч при 4°. Затем раствор из лунок удаляли, измеряли концентрацию ингибиторов в этом растворе и определяли значение концентрации ингибитора в сгустке. В лунки добавляли раствор плазмينا (по 40 мкл) в ФСБР в различных концентрациях (0,05; 0,1; 0,2 мкМ). Планшет помещали в инкубатор (37°). Через определенные промежутки времени (20, 30, 40, 60, 80, 120 мин) измеряли концентрацию продуктов распада фибрина в растворе над сгустком.

Лизис фибрина с помощью пламиногена в присутствии ингибиторов плазмينا – α 2-антиплазмينا и α 2-макроглобулина. В лунки с фибриновыми сгустками добавляли по 40 мкл смеси раствора одного из ингибиторов в ФСБР в разных концентрациях (0; 0,2; 0,4 мкМ) и пламиногена в концентрациях: 0,1; 0,2;

0,4 мкМ. Затем планшет инкубировали в течение 6 ч при 4°. Раствор из лунок удаляли. Измеряли концентрацию ингибиторов и пламиногена в этом растворе. По разности определяли значение концентрации ингибитора и пламиногена в сгустке. В лунки добавляли раствор урокиназы (по 40 мкл) в ФСБР в концентрации 0,002 мг/мл, планшет помещали в инкубатор (37°). Через определенные промежутки времени (20, 30, 40, 60, 80, 120 мин) измеряли концентрацию продуктов распада фибрина в растворе над сгустком.

Результаты

Иницированный плазмином лизис фибринового сгустка. На рис. 1, а показано влияние α 2-антиплазмينا на лизис фибрина, индуцированный плазмином. Исходная концентрация плазмينا в растворе при этом равна 0,1 мкМ, а α 2-антиплазмينا в сгустке – 0; 0,05; 0,12 мкМ. На всех последующих рисунках изображена зависимость концентрации продуктов распада фибрина (в процентах от максимально возможной концентрации в условиях эксперимента) от времени (в минутах).

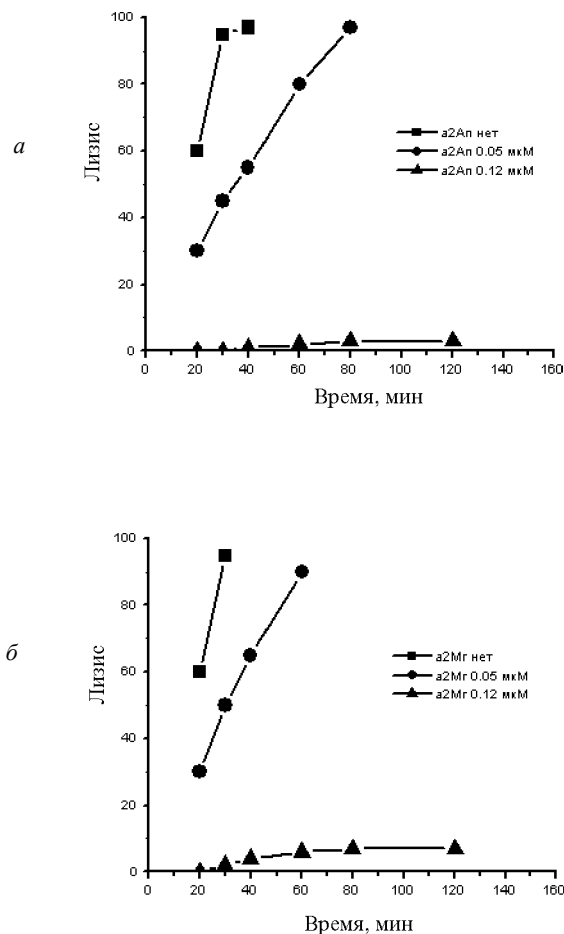


Рис. 1. Лизис фибрина, инициированный плазмином при влиянии: а – α 2-антиплазмينا; б – α 2-макроглобулина

*КБР – карбонатный буферный раствор (Na₂CO₃, 10 мМ, pH 9,6).

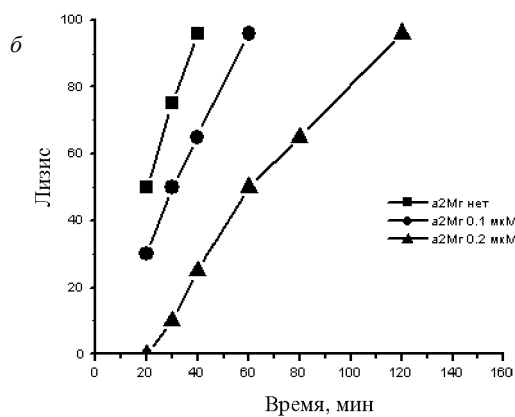
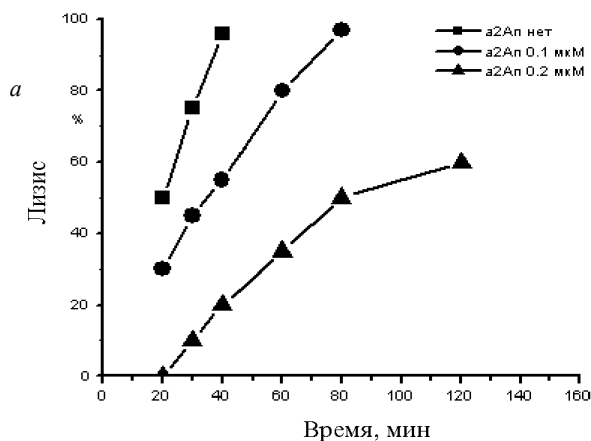


Рис. 2. Лизис фибрина инициированный урокиназой при влиянии: а – $\alpha 2$ -антиплазмина; б – $\alpha 2$ -макроглобулина

На рис. 1, б показано влияние $\alpha 2$ -макроглобулина на лизис фибрина, индуцированный плазмином. Исходная концентрация плазмينا в растворе при этом составляет 0,1 мкМ, а $\alpha 2$ -макроглобулина в сгустке – 0; 0,05; 0,12 мкМ.

Результаты этих двух групп экспериментов оказались похожими. Лизис фибрина блокируется, если концентрация ингибиторов плазмينا превышает концентрацию плазмينا.

Иницированный урокиназой лизис фибринового сгустка. На рис. 2, а показано влияние $\alpha 2$ -антиплазмينا на лизис фибрина, индуцированный урокиназой. Исходная концентрация плазминогена в сгустке составляла 0,1 мкМ, $\alpha 2$ -антиплазмينا – 0; 0,05; 0,12 мкМ, а концентрация урокиназы в растворе – 0,002 мг/мл.

На рис. 2, б представлены результаты аналогичного эксперимента по влиянию $\alpha 2$ -макроглобулина на лизис фибринового сгустка, индуцированный урокиназой.

Результаты данной группы экспериментов показывают, что даже при превышении концентрации ингибитора над концентрацией плазминогена лизис сгустка не останавливается. Для $\alpha 2$ -антиплазмينا лизис останавливается только при концентрации данного ингибитора около 0,15–0,2 мкМ, т.е. в 1,5 раза большей, чем концентрация плазминогена. При концентрации $\alpha 2$ -макроглобулина в 2 раза большей, чем концентрация плазминогена в сгустке, лизис еще продолжается.

Обсуждение

Рассмотрим характерные времена реакций ингибирования плазмينا и реакции связывания плазмينا с фибрином [12]. Характерное время связывания плазмينا с фибрином составляет около 10 мин при концентрации фибрина 10 мкМ; для реакции ингибирования плазмينا $\alpha 2$ -антиплазмином (0,1 мкМ) – 0,01 мин, $\alpha 2$ -макроглобулином (0,1 мкМ) – 1 мин. Таким образом, реакции ингибирования плазмينا протекают гораздо быстрее, чем процесс его связывания с фибрином. Поэтому, как и показал эксперимент, лизис фибрина, индуцированный плазмином, блокируется при превышении концентрации ингибиторов над концентрацией плазмينا в сгустке. Но если рассматривать лизис фибрина с помощью урокиназы – активатора плазминогена, то, как показывает эксперимент, плазмин, образующийся при активации плазминогена и уже связанный с фибрином, скорее всего не высвобождается в раствор, иначе бы он был блокирован ингибиторами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gabriel D.A., Muga K., Boothroyd E.M. // J. Biol. Chem. 1992. **267**. P. 24259.
- Anand S., Diamond S.L. // Circulation. 1996. **94**. P. 763.
- Weisel J.W., Veklich Y., Collet J.-P., Francis C.W. // Thrombosis and Haemostasis. 1999. **82**. P. 277.
- Amir-Zaltsman Y., Gubbay J., Strasburger C.J., Bayer E.A. et al. // Clinical Chemistry. 1987. **33**. P. 44.
- Axelsson G., Korsan-Bengtson K., Waldenstrom J. // Thrombosis and Haemostasis. 1976. **36**. P. 517.
- Deutsch D.G., Mertz E.T. // Science. 1970. **170**. P. 1095.
- Friberger P. // Haemostasis. 1975. **7**. P. 138.
- Collen D., Zamarron C., Lijnen H.R., Hoylaerts M. // J. Biol. Chem. 1986. **261**. P. 1253.
- Barrett A.J. // Methods Enzymol. 1981. **80**. P. 737.
- Wiman B. // Biochemical. Journal. 1980. **191**. P. 229.
- Engvall E. // Methods Enzymol. 1980. **70**. P. 419.
- Anand S., Diamond S.L. // Circulation. 1996. **94**. P. 763.