



УДК 577.152.342*17.02

КИНЕТИКА ЛИЗИСА ФИБРИНА ПЛАЗМИНОМ: ИНГИБИРОВАНИЕ ПРОДУКТАМИ ДЕГРАДАЦИИ ФИБРИНА

© 1996 г. Ю. В. Житкова, Р. Б. Айсина[#], С. Д. Варфоломеев*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет,
119899, Москва, Воробьевы горы*

Поступила в редакцию 28.03.96 г.

Исследована кинетика лизиса ^{125}I -меченых фибриновых сгустков плазмином. Обнаружено сильное конкурентное ингибирование фибринолиза продуктами деградации фибрина. Интегральным анализом полных кинетических кривых накопления продуктов деградации фибрина определены константа Михаэлиса и каталитическая константа реакции фибринолиза плазмином, а также константа ингибирования продуктами реакции: K_m 1.3 мкМ, k_{cat} 1.36 мин $^{-1}$, K_i 0.12 мкМ. Из полученных результатов следует, что эффективность ингибирования плазмينا продуктами реакции превышает эффективность его взаимодействия с субстратом. Процесс фибринолиза плазмином регулируется по механизму отрицательной обратной связи.

Ключевые слова: плазмин, кинетика фибринолиза, продукты деградации фибрина, ингибирование.

Растворение фибрина под действием плазмина (КФ 3.4.21.7) – ключевая реакция тромболитического активатора плазминогена [1]. На скорость и глубину фибринолиза влияют свойства как активаторов плазминогена, так и некоторых компонентов плазмы. Образование плазмина происходит в результате расщепления пептидной связи Arg⁵⁶⁰-Val⁵⁶¹ в одноцепочечной молекуле плазминогена под действием активаторов плазминогена. Активный центр плазмина находится в С-концевой легкой В-цепи, в то время как пять кринглов, расположенных в N-концевой тяжелой А-цепи молекулы и содержащих лизин-связывающие участки, обеспечивают взаимодействие фермента (и профермента) с фибрином, фибриногеном и α_2 -антиплазмином. Плазминоген, плазмин и активатор плазминогена тканевого типа связываются со специфическими центрами на поверхности фибрина [2–4]. Фибрин ускоряет активацию плазминогена тканевым активатором [5, 6], а плазмин, связанный с фибрином, защищен от ингибирующего действия α_2 -антиплазмина, находящегося в плазме [7].

Исследования последних лет показали, что скорость фибринолиза значительно увеличивается в результате проникновения плазмина или активатора плазминогена внутрь сгустка с потоком жидкости [8, 9]. К настоящему времени охарактеризованы продукты деградации, образующиеся в процессе лизиса фибрина плазмином [10, 11]. Ки-

нетических данных, касающихся непосредственного действия плазмина на трехмерную структуру фибрина, очень мало. В большинстве работ исследована общая скорость солиubilизации фибрина без определения констант скоростей реакции [12–14], что обусловлено большим числом связей, расщепляемых плазмином в фибрине, и множественностью образующихся продуктов деградации [13]. Кинетика фибринолиза осложняется и тем, что в процессе деградации появляются новые центры связывания плазмина на С-концевых остатках лизина расщепленных цепей фибрина [15, 16]. Таким образом, активный центр плазмина, расщепляя специфические связи на фибрине, улучшает связывание тяжелой цепи фермента с субстратом.

В настоящей работе представлены результаты исследования кинетики действия плазмина на твердофазный субстрат фибрин и влияния растворимых продуктов деградации (ПДФ) на скорость фибринолиза.

Кинетика лизиса поперечно-сшитого фибрина плазмином, не содержащим примеси активатора плазминогена, была исследована по скорости накопления растворимых радиоактивных ПДФ. Из рис. 1 видно, что в присутствии 30 нМ (а) и 60 нМ плазмина (б) реакция лизиса различных концентраций фибрина постепенно замедляется и полностью прекращается, хотя степень лизиса сгустков не превышает 60–80%. Аналогичные результаты наблюдаются во всем изученном диапазоне концентраций плазмина (5–60 нМ). Этот эффект может быть вызван либо термодинамической плазмией в жидкой фазе в ходе фибринолиза при 37°C,

Сокращение: ПДФ – продукты деградации фибрина.

[#] Автор для переписки (факс: (095) 939-09-97, e-mail:arb@enzyme.chem.msu.su).

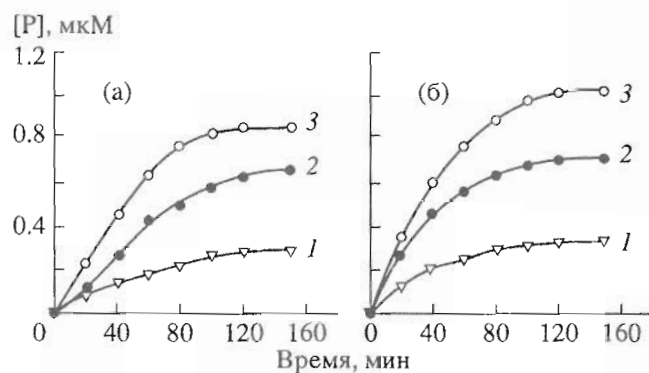


Рис. 1. Кинетика лизиса ^{125}I -меченых фибриновых сгустков 30 нМ (а) и 60 нМ (б) плазмином при рН 7.4 (37°C). Начальные концентрации фибрина (мкМ): 0.44 (1), 1.1 (2) и 1.54 (3).

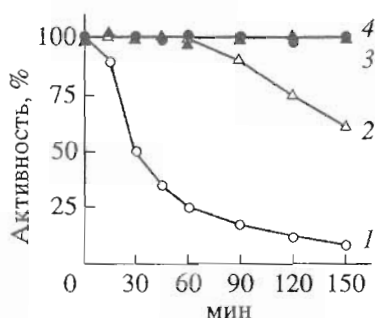


Рис. 2. Изменения фибринолитической (1, 3) и амидазной (2, 4) активностей 30 нМ плазмина в ходе лизиса 1.54 мкМ фибрина. Активности фермента измеряли в неразбавленных (светлые символы) и разбавленных в 20 раз пробах (темные символы). Условия определения см. в "Экспер. части".

либо ингибированием фибринолиза накапливающимися продуктами реакции.

Возможность термоинактивации плазмина в ходе фибринолиза была проверена определением амидазной и фибринолитической активностей в пробах, отобранных из жидкой фазы и разбавленных в 20 раз для элиминирования влияния ПДФ. При этом фибринолитическую активность проб контролировали по степени лизиса свежих стандартных ^{125}I -меченых фибриновых сгустков, а амидазную – по скорости гидролиза пептидного субстрата S-2251. Было найдено, что обе активности плазмина, измеренные после разбавления проб, стабильны в течение 2.5–3 ч при 37°C (рис. 2, 3 и 4). Следовательно, эффект торможения фибринолиза (рис. 1) не обусловлен термоинактивацией плазмина. С другой стороны, когда активности в тех же пробах были измерены без предварительного разбавления, в ходе фибринолиза наблюдалось резкое падение фибринолитической активности (рис. 2, 1) и постепенное уменьшение амидазной активности плазмина (рис. 2, 2). Таким образом, причиной замедления и прекращения

деградации фибрина (рис. 1) является ингибирование фибринолиза накапливающимися ПДФ, которые в отличие от фибрина содержат большее число С-концевых остатков лизина для связывания плазмина. Поэтому тип ингибирования реакции продуктами, обладающими большим сродством к ферменту по сравнению с исходным субстратом, должен быть конкурентным.

Для определения кинетических параметров реакции полные кинетические кривые фибринолиза плазмином, представленные на рис. 1, анализировали по интегральному уравнению Уокера-Шмидта [17]:

$$\frac{[P]}{t} = \frac{V}{1 - K_m/K_i} - \frac{K_m(1 + [F]_0/K_i)}{1 - K_m/K_i} \frac{1}{t} \ln \frac{[F]_0}{[F]_0 - [P]} \quad (1)$$

где $[P]$ – концентрация продуктов в момент времени t ; $[F]_0$ – начальная концентрация фибрина; $V = k_{\text{cat}}[Pm]_0$ – максимальная скорость лизиса фибрина плазмином (Pm); K_m – константа Михаэлиса для процесса деградации фибрина плазмином; K_i – константа ингибирования фибринолиза продуктами реакции.

Линейные зависимости $[P]/t$ от $1/t \ln\{[F]_0/([F]_0 - [P])\}$, полученные из данных рис. 1 (а, б), представлены на рис. 3 (а, б). Положительный наклон этих зависимостей и отрицательное значение отрезков, отсекаемых ими на оси ординат, свидетельствуют о наличии значительного конкурентного ингибирования фибринолиза продуктами реакции [17, 18]. Величина отрезка, отсекаемого на оси абсцисс (b), уменьшается с увеличением начальной концентрации фибрина. Согласно уравнению (1), зависимость обратной величины этого отрезка ($1/b$) от начальной концентрации фибрина $[F]_0$ описывается уравнением

$$\frac{1}{b} = \frac{K_m}{V} + \frac{K_m}{K_i V [F]_0} \quad (2)$$

Линейные зависимости величины $1/b$ от $[F]_0$ при двух концентрациях плазмина (рис. 3в) отсекают на оси абсцисс отрезок, который, согласно уравнению (2), равен $-K_i$. Найденное значение K_i (0.12 мкМ) подтверждает, что ПДФ оказывают достаточно сильное ингибирующее действие на реакцию фибринолиза плазмином. Наблюдаемое ингибирование может быть объяснено тем, что фибрин и ПДФ конкурируют друг с другом за одни и те же лизинсвязывающие центры плазмина. В процессе лизиса плазмин специфически расщепляет пептидные связи фибрина, образованные карбоксильными группами лизина и аргинина. Вероятно, растворимые ПДФ, имеющие по сравнению с фибрином большее число экспонированных лизиновых центров, сильнее связывают плазмин, снижая его сорбцию на фибрине и ингибируя тем самым фибринолиз. Следует отметить, что

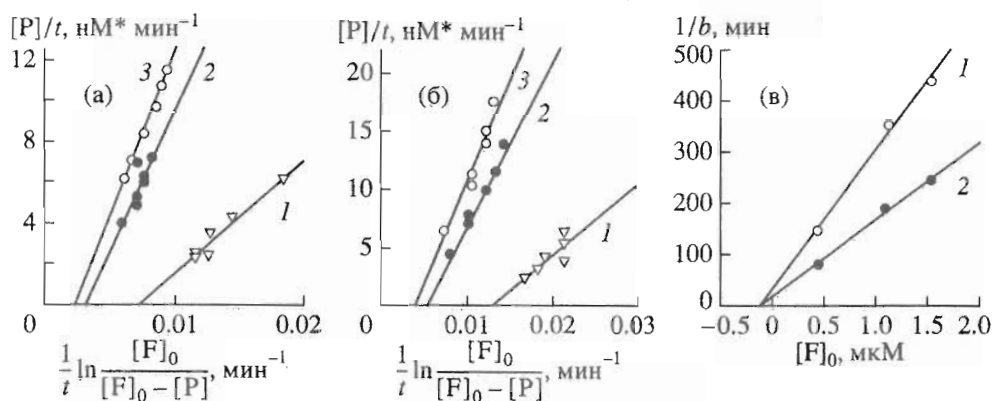


Рис. 3. Представление данных рис. 1 в координатах Уокера-Шмидта (а, б) и графическое определение K_i лизиса фибрина в присутствии 30 нМ (светлые символы) и 60 нМ плазима (темные символы) (в).

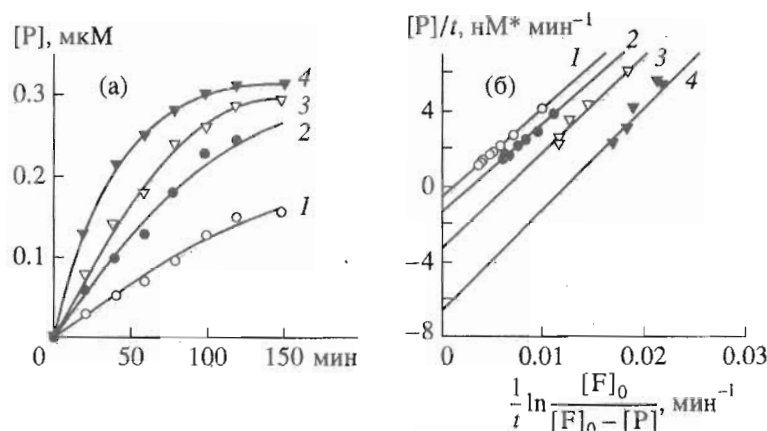


Рис. 4. Кинетика лизиса ^{125}I -меченого фибринового сгустка (0.44 мкМ) в присутствии 5 (1), 10 (2), 30 (3) и 60 нМ (4) плазима (а) и линейная анаморфоза кинетических кривых, представленных на рис. 4а, в координатах Уокера-Шмидта (б).

растворимый фибриноген вызывает меньший ингибирующий эффект при фибринолизе плазмином (K_i 12 мкМ [12]), чем ПДФ. Недоступность плазмину части лизиновых центров и меньшее по сравнению с ПДФ число С-концевых лизиновых центров в интактной молекуле фибриногена [19] могут быть причиной более слабого связывания растворимого фибриногена с плазмином и ингибирования им фибринолиза. Это подтверждается значительным различием констант диссоциации для взаимодействия Lys-плазминогена с фибриногеном (K_d 1 мМ) и с его фрагментом Е (K_d 8.3 мкМ) [3].

Константа Михаэлиса (K_m) реакции лизиса фибрина плазмином, вычисленная, согласно уравнению (1), из тангенсов углов наклонов линейных зависимостей Уокера-Шмидта при различных концентрациях фибрина (рис. 3а, б), оказалась равной 1.3 мкМ. Несколько меньшая величина константы Михаэлиса (0.42 мкМ) была ранее найдена для реакции лизиса плазмином суспензии микрогранул фибрина диаметром 3 мкм [12], что, вероятно, связано с повышенной концентрацией

доступных для плазима сорбционных и расщепляемых центров на значительно большей площади поверхности микрочастиц фибрина. Найденная величина K_m для реакции лизиса фибринового сгустка плазмином на два порядка ниже, чем K_m 200–300 мкМ для реакции гидролиза ферментом низкомолекулярных специфических пептидных субстратов [20]. Более низкое значение K_m реакции фибринолиза обусловлено существенным вкладом в связывание фермента с фибрином взаимодействия лизинсвязывающих участков тяжелой цепи плазима с лизиновыми центрами на поверхности фибрина. Известно, что константы диссоциации Lys-плазминогена и инактивированного по активному центру Glu-плазима с фибрином равны 0.32 и 0.5 мкМ [2] соответственно.

Для оценки кажущейся каталитической константы фибринолиза плазмином (k_{cat}) ^{125}I -меченые фибриновые сгустки постоянной концентрации лизировали в присутствии различных концентраций фермента. Оказалось, что начальная скорость фибринолиза (рис. 4а) и величина отрезка, отсекаемого на оси ординат линейными зависимостями

Уокера–Шмидта (рис. 4б), пропорциональны концентрации плазмينا. Из величин отрезков (с), отсекаемых прямыми на оси ординат (рис. 4б) при разных концентрациях плазмина, было вычислено среднее значение кажущейся k_{cat} по уравнению

$$k_{cat} = \frac{c(1 - K_m/K_i)}{[Pm]_0} \quad (3)$$

Найденное значение кажущейся каталитической константы фибринолиза (k_{cat} 1.36 мин⁻¹) на три порядка ниже констант скоростей гидролиза плазмином специфических пептидных хромогенных субстратов (k_{cat} 25 с⁻¹) [20]. Значительное различие в значениях k_{cat} гидролиза плазмином двух типов субстратов можно объяснить тем, что для сольобилизации одной молекулы фибрин-мономера плазмин должен расщепить около 10 пептидных связей [21], в то время как при гидролизе ферментом синтетических пептидных субстратов расщепляется одна легкодоступная амидная связь.

Таким образом, обнаружено сильное конкурентное ингибирование реакции фибринолиза растворимыми ПДФ с K_i 0.12 мкМ. Это значение на порядок ниже найденного значения константы Михаэлиса (K_m 1.3 мкМ) для рассматриваемой реакции и в 4 раза ниже константы диссоциации инактивированного по активному центру Glu-плазмина с фибрином [2]. Причиной ингибирования является конкуренция между фибрином и ПДФ за лизинсвязывающие центры плазмина. Вероятно, плазмин связывается сильнее с ПДФ, которые сольобилизованы и содержат по сравнению с фибрином большее число экспонированных лизино-вых центров. Низкое значение кажущейся константы скорости лизиса твердофазного фибрина плазмином (k_{cat} 1.36 мин⁻¹) может быть обусловлено различной доступностью для фермента расщепляемых центров на поверхности фибрина и тем фактом, что около 10 пептидных расщеплений требуется для того, чтобы растворилась одна молекула фибрин-мономера. Возможно, что разрыв одной или двух связей в фибрине является критическим для сольобилизации продукта и лимитирует скорость фибринолиза. Полученные данные позволяют предположить, что фибринолиз под действием плазмина регулируется по механизму отрицательной обратной связи. Это может играть важную роль в локальном регулировании физиологического тромболитического.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы урокиназа (Seigono, Германия); фибриноген человека, Test fibrinogen (Behring AG, Германия); бычий тромбин (Каунасское предприятие бакпрепаратов, Литва); казеин (Fluka, Германия); *n*-нитроанилид *N*,*D*-Val-Leu-Lys, S-2251 (Serva, США); Na¹²⁵I ("Изотоп",

Россия); *N*-хлортолуолсульфамид натрия, хлорамин Т (Merck, Германия); Lys-сефароза и BrCN-сефароза 4В (Pharmacia, Швеция) и трис-HCl (Sigma, США). Другие реактивы были отечественного производства марки ос. ч. и х. ч.

Урокиназу иммобилизовали на BrCN-активированной сефарозе 4В [22]. Активность иммобилизованной урокиназы составляла 3000 МЕ/мг геля.

Lys-Плазминоген выделяли из плазмы крови человека с помощью аффинной хроматографии на Lys-сефарозе 4В [23]. Молекулярная масса плазминогена, по данным электрофореза в 7% ПААГ в восстанавливающих условиях, составляла 85 кДа. Концентрацию белка в препарате определяли по поглощению его растворов при 280 нм, используя коэффициент $E^{1\%} = 17$.

Плазмин получали активацией плазминогена иммобилизованной урокиназой в 0.05 М трис-HCl-буфере, pH 7.4 (буфер А), содержащем 0.15 М NaCl и 20% (по объему) глицерин (37°C). Контроль за процессом осуществляли по возрастанию скорости гидролиза 0.6 мМ S-2251. После окончания активации плазмин отделяли от иммобилизованной урокиназы центрифугированием и хранили 3–4 ч при 4°C. Казеинолитическая активность полученного плазмина составляла 10 КЕ на 1 мг белка [24]. Содержание активного плазмина, определенное титрованием панкреатическим ингибитором трипсина, было равно 32–34% по белку.

¹²⁵I-Меченый фибриноген человека получали включением радиоактивного иода в остатки тирозина молекулы белка в присутствии окислителя хлорамина Т [25]. Полученный препарат фибриногена содержал 86% коагулируемого белка и имел удельную радиоактивность 1.78 × 10⁸ имп./(мин мг белка).

Изучение кинетики фибринолиза. Для получения ¹²⁵I-меченых фибриновых сгустков к раствору фибриногена человека (8.8 мкМ) в буфере А с 0.15 М NaCl, 5 мМ CaCl₂ и ¹²⁵I-меченым фибриногеном (700 тыс. имп./(мин мл)) добавляли бычий тромбин до конечной концентрации 2 МЕ/мл. Различные объемы смеси (0.1, 0.25 и 0.35 мкл) отбирали в силиконовые трубки диаметром 4 мм и выдерживали 1 ч при 25°C. Затем сгустки удаляли из трубок, промывали три раза буфером А с 0.15 М NaCl и измеряли их начальную радиоактивность. Промытые ¹²⁵I-меченые сгустки различного объема с радиоактивностью 60, 150 и 210 тыс. имп./мин на сгусток погружали в 2 мл буфера А с 0.15 М NaCl (37°C) и инициировали фибринолиз введением плазмина до конечной концентрации 5–60 нМ. В процессе инкубации при постоянном перемешивании на качалке при 37°C отбирали аликвоты раствора, окружающего сгусток, для измерения радиоактивности растворимых ПДФ и анализа амидазной и фибринолитической активностей

плазмина. Радиоактивность измеряли с помощью сцинтилляционного колодезного счетчика "Гамма-2" (Россия). Представленные результаты – средние значения трех независимых экспериментов. Начальная концентрация фибрина $[F]_0$ была вычислена на основании общей концентрации ПДФ, образовавшихся после полного лизиса сгустка в присутствии высокой концентрации плазмينا. Общую концентрацию ПДФ в каждый момент времени рассчитывали с учетом того, что концентрация радиоактивных ПДФ составляет 0.15% концентрации немеченых продуктов реакции.

Амидазную активность неразбавленных и предварительно разбавленных (в 20 раз) проб измеряли по скорости гидролиза 0.6 мМ S-2251 в буфере А с 0.15 М NaCl на спектрофотометре Philips PU 8630 (Голландия) при 25°C и λ 405 нм (для *n*-нитроанилина ϵ_M^{405} 10000 М⁻¹ см⁻¹).

Для определения фибринолитической активности плазмина 0.2 мл неразбавленной или разбавленной (в 20 раз) пробы добавляли к свежим стандартным ¹²⁵I-меченым фибриновым сгусткам (45 мкл, 100 тыс. имп./мин на сгусток), выдерживали при 37°C в течение 30 или 10 мин соответственно. После отмывания измеряли остаточную радиоактивность сгустков и вычисляли фибринолитическую активность проб по уменьшению радиоактивности стандартных фибриновых сгустков (в процентах к исходной).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Collen D. // *Lancet*. 1993. V. 342. P. 34–36.
2. Suenson E., Thorsen S. // *Biochem. J.* 1981. V. 197. P. 619–628.
3. Lukas M.A., Fretto L.J., McKee P.A. // *J. Biol. Chem.* 1983. V. 258. P. 4249–4256.
4. Husain S.S., Hasan A.A.K., Budzynski A.Z. // *Blood*. 1989. V. 74. P. 999–1006.

5. Fears R., Hibbs M.J., Smith R.A.G. // *Biochem. J.* 1985. V. 229. P. 555–558.
6. Hoylaerts M., Rijken D.C., Lijnen H.R., Collen D. // *J. Biol. Chem.* 1982. V. 257. P. 2912–2919.
7. Wiman B., Collen D. // *Nature*. 1978. V. 272. P. 549–550.
8. Blinc A., Kennedy S.D., Bryant R.G., Marder V.J., Francis C.W. // *Thromb. Haemost.* 1994. V. 71. P. 230–235.
9. Wu J.-H., Siddiqui K., Diamond S.L. // *Thromb. Haemost.* 1994. V. 72. P. 105–112.
10. Whitaker A.N., Rowe E.A., Masci P.P., Joe F., Gaffney P.J. // *Thromb. Res.* 1980. V. 19. P. 381–391.
11. Gaffney P.J. // *Fibrinolysis. Current Fundamental and Clinical Concepts* / Eds P.J. Gaffney, S. Balkuv-Ulutin. London; New York; San Francisco: Acad. Press, 1978. P. 115–135.
12. Kanai S., Okamoto H., Tamaura Yu., Yamazaki S., Inada Yu. // *Thromb. Haemost.* 1979. V. 42. P. 1153–1158.
13. Pizzo S.V., Schwartz M.L., Hill R.L., McKee P.A. // *J. Biol. Chem.* 1973. V. 248. P. 4574–4583.
14. Gaffney P.J., Whitaker A.N. // *Thromb. Res.* 1979. V. 14. P. 85–94.
15. Fleury V., Agles-Cano E. // *Biochemistry*. 1991. V. 30. P. 7630–7638.
16. Tran-Thang C., Kruthof E.K.O., Atkinson J., Bachmann F. // *Eur. J. Biochem.* 1986. V. 160. P. 599–604.
17. Walker A.C., Schmidt C.L.A. // *Arch. Biochem.* 1944. V. 5. P. 445–451.
18. Березин И.В., Клесов А.А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1976. С. 166–180.
19. Varadi A., Patthy L. // *Biochemistry*. 1983. V. 22. P. 2440–2446.
20. Lottenberg R., Christensen U., Jackson C.N., Coleman P.L. // *Methods Enzymol.* 1981. V. 80. P. 341–361.
21. Ranby M., Brandstrom A. // *Tissue-type Plasminogen Activator (t-PA)* / Ed. C. Kluff. Boca Caton: CRC Press, 1988. P. 211–214.
22. Wiman B., Wallen P. // *Eur. J. Biochem.* 1973. V. 36. P. 25–31.
23. Deutsch D.G., Mertz E.T. // *Science*. 1970. V. 170. P. 1095–1096.
24. Методы исследования фибринолитической системы крови / Ред. Г.В. Андреев. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1981. С. 46.
25. Davison P.E. // *Anal. Biochem.* 1976. V. 75. P. 129–141.

Kinetics of Fibrinolysis by Plasmin: Inhibition by the Products of Fibrin Degradation

Yu. V. Zhitkova, R. B. Aisina, and S. D. Varfolomeev

Moscow State University, Department of Chemistry, Vorob'evy gory, Moscow, 119899 Russia

Abstract—A kinetics of lysis of ¹²⁵I-labeled fibrin coagulates by plasmin was studied. The strong competitive inhibition of fibrinolysis by the products of fibrin degradation was found. On the basis of the integral analysis of the complete kinetic curves of the fibrinolysis products accumulation, the Michaelis constant K_m , the catalytic constant of the reaction of fibrinolysis by plasmin k_{cat} , and the constant of inhibition by the reaction products K_i were determined to be 1.3 μ M, 1.36 min⁻¹, and 0.12 μ M, respectively. The results obtained showed that the efficiency of plasmin inhibition by the reaction products exceeds that of plasmin interaction with the substrate. Thus, the process of fibrinolysis is regulated by a negative feedback mechanism.

Key words: plasmin, kinetics of fibrinolysis, products of fibrin degradation, inhibition.