

мент травмы, что и определило цель научных разработок П. О. Ромодановского [10]. Им было проведено комплексное клинико-морфологическое исследование 200 случаев летальной черепно-мозговой травмы с количественной оценкой тяжести состояния пострадавших в остром периоде травмы и морфологических субстратов церебральных повреждений с учетом обстоятельств нанесения травмы головы. Автором было установлено, что трансляционное ускорение определяет поступательное смещение головного мозга в полости черепа, когда все его структурные элементы движутся в одном направлении, приводя к развитию «ударной и противоударной» кавитации и образованию корковых контузионных фокусов, формирующихся по типу «удар — противоудар».

Ротационное ускорение обуславливает вращательное движение головного мозга вокруг нижних шейных позвонков. Структурные элементы мозга при этом смещаются относительно друг друга в различные (чаще противоположные) стороны на неодинаковые расстояния, что приводит к формированию «тензионных и срезающих напряжений», наиболее выраженных по ходу протяженных проводящих трактов центральной нервной системы, с образованием диффузных аксональных повреждений.

Полученные данные позволили не только уточнить некоторые представления о механизмах черепно-мозговой травмы, но и детализировать определенные критерии (с патоморфологической точки зрения) классификационных построений повреждений головного мозга.

Медицина катастроф как определенная система организации медико-социальных мероприятий по ликвидации последствий происшествий в нашей стране получила свое развитие в последние 5 лет. Медицинская служба при оказании помощи пострадавшим в таких ситуациях использует хорошо разработанные, апробированные и получившие дальнейшее совершенствование организационные формы и методы. Однако они оказались неприемлемыми для целей судебно-медицинской экспертизы при работе в очаге массовой гибели людей. На основе анализа работы экспертных групп в районах крупномасштабных катастроф Е. С. Тучику [12, 13] удалось определить место судебно-медицинской экспертизы среди других медицинских служб. Он обосновал цель и задачи экспертной службы, объем и

рациональное использование экспертных исследований в зависимости от масштаба катастрофы, показал целесообразность применения на практике в реальных условиях приемов и методов идентификации процессов и объектов, предложенных и отработанных на кафедре.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Алимова Р. Г. Актуальные аспекты судебной медицины — Ижевск, 1992. — Вып. 2. — С. 34 — 36.
2. Аюб Ф. Исследование состояния зубов и рисунка спинки языка с целью установления индивидуальных особенностей личности: Автореф. дисс. ...канд. мед. наук. — М., 1993.
3. Баринев Е. Х. Акт. аспекты суд. мед. — Ижевск, 1992. — Вып. 2. — С. 44 — 46.
4. Беляева Е. В. Идентификация личности по особенностям строения рельефа твердого неба в процессе гнилой трансформации трупа: Автореф. дисс. ...канд. мед. наук. — М., 1993.
5. Пашиян Г. А., Аюб Ф. // Суд.-мед. эксперт. — 1992. — № 4. — С. 23 — 24.
6. Пашиян Г. А., Баринев Е. Х. Современные вопросы судебной медицины и экспертной практики. — Ижевск, 1993. — Вып. 6. — С. 138 — 141.
7. Пашиян Г. А., Беляева Е. В., Ромодановский П. О. // Суд.-мед. эксперт. — 1993. — № 3. — С. 17 — 21.
8. Пашиян Г. А., Добровольский Г. Ф., Алимова Р. Г., Ромодановский П. О. // Суд.-мед. эксперт. — 1992. — № 4. — С. 9 — 13.
9. Пашиян Г. А., Мельникова Г. М. и др. Проблемы теории и практики судебной медицины — Томск, 1991.
10. Ромодановский П. О., Спиру М. А. // Суд.-мед. эксперт. — 1992. — № 3. — С. 19 — 22.
11. Саакян Е. С. Параметры электропроводности, морфологические и гистохимические изменения скелетных мышц в динамике посттравматического периода: Автореф. дисс. ...канд. мед. наук. — М., 1992.
12. Тучик Е. С. Организационные принципы деятельности судебно-медицинской службы в условиях катастрофы: Автореф. дисс. ...канд. мед. наук. — М., 1993.
13. Тучик Е. С. // Суд.-мед. эксперт. — 1993. — № 3. — С. 37 — 40.

Поступила 04.02.94.

## ЛЕКЦИЯ

УДК 612.115

## ФИБРИНОЛИЗ

Д. М. Зубаиров

Кафедра биохимии (зав. — академик АН Татарстана, проф. Д. М. Зубаиров)  
Казанского медицинского университета

Фибринолитическая система обладает рядом физиологических функций, среди которых наиболее очевидной и, видимо, важной является растворение фибриновых сгустков. Различные ферменты и ингибиторы, входящие в фибринолитическую систему, представлены в табл. 1.

**Плазминоген** — неактивный предшественник фибринолитического фермента плазмина (К. Ф. 3.4.21.7). Человеческий плазминоген является одноцепочечным гликопротеином с молекулярной массой около 92 кДа и состоит из 790 аминокислотных остатков. Два олигосахарид-

## Ферменты и ингибиторы фибринолитической системы

Компоненты	Молекулярная масса, кДа	Концентрация в плазме, мкМ	Функция
Плазминоген	92	1,3	Предшественник плазмина
Плазмин	85		Сериновая протеаза. Гидролиз фибрина
Тканевой активатор плазминогена	67	0,00006	Фермент, находящийся в клетках и освобождающийся в кровь. Превращение плазминогена в плазмин путем ограниченного протеолиза
Проурокиназа	54	0,00015	Однопочечная форма активатора плазминогена типа урокиназы, присутствующая в крови и моче
Урокиназа	30	—	Двупочечная форма активатора плазминогена, находящаяся в моче
Фактор XII, калликреин, высокомолекулярный кининоген			Компоненты контактной фазы свертывания крови, превращающие плазминоген в плазмин (см. предыдущую лекцию в «Казанском мед. ж.», № 2, 1994 г.)
$\alpha_2$ -антиплазмин	67	1,0	Специфический ингибитор плазмина
Ингибитор активатора плазминогена-1	52	0,2—0,0004	Специфический ингибитор тканевого активатора плазминогена и урокиназы. Находится в эндотелии, тромбоцитах и освобождается в кровь
Ингибитор активатора плазминогена-2	48	—	Специфический ингибитор тканевого активатора в плаценте и нейтрофилах. Освобождается в кровь во время беременности
Ингибитор активатора плазминогена-3	57	0,1	Ингибитор урокиназы. Присутствует в моче. Обнаружен в плазме крови. Идентичен ингибитору протеина С.
Стрептокиназа	48	—	Белок, продуцируемый стрептококками, косвенно активирует плазминоген

ных радикала присоединены к Асн 288 и Тре 345. Количество остатков нейраминовой кислоты варьирует в обоих радикалах, что обуславливает микрогетерогенность плазминогена.

Н-концевая часть молекулы плазминогена в значительной мере гомологична трехпетлевым складчатым модулям, называемым кринглами, имеющимся и в протромбине. Стабильность каждого из них поддерживается тремя дисульфидными мостиками. В пяти кринглах содержится лизинсвязывающие участки, ответственные за нековалентное взаимодействие с субстратом [4]. На С-конце молекулы находится модуль, типичный для сериновых протеиназ (см. рис. 1).

В нативном плазминогене, содержащемся в крови, на N-конце находится глутаминовая кислота, и такой профермент обозначается как Глу-плазминоген в противоположность Лиз-77-плазминогену, у которого путем аутокаталитической деградации отщеплен N-концевой пептид протяженностью в 76 аминокислотных остатков. Возможное физиологическое значение этой реакции не вполне ясно, хотя известно, что такой деградированный продукт легче активируется.

Для превращения плазминогена в активный фермент плазмин необходимо расщепление единственной Арг 560-Вал 561 пептидной связи, находящейся между пятым кринглом и протеиназным модулем. В результате образуются тяжелая (60 кДа) и легкая (25 кДа)

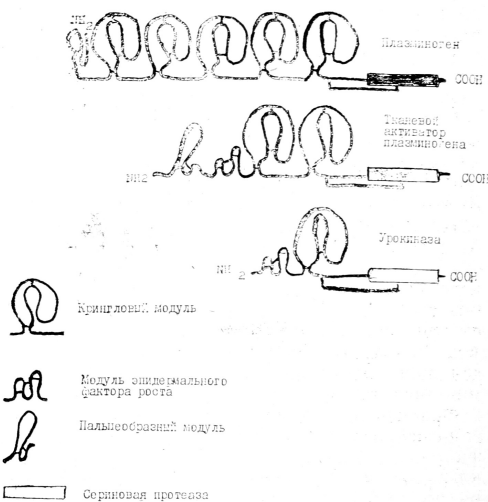


Рис. 1. Модульная структура плазминогена, тканевого активатора плазминогена и урокиназы.

цепи плазмина, соединенные двумя дисульфидными мостиками [9].

В тяжелой цепи остаются пять кринглов, а в легкой — активный центр плазмина, образованный серилом 740, гистидилом 602 и аспарагилом 734.

Действие плазмина является весьма специфическим. В крови он расщепляет только фибрин, не действуя на другие белки, включая и предшественник фибрина фибриноген.

Т. В. Гриненко и С. А. Кудинов [4] развили модель Вимана и Коллена, объясняющую избирательность действия плазмينا. Активация пламиногена до плазмина осуществляется не в растворе, а на поверхности фибрина. При образовании нитей фибрина пламиноген, как и его активаторы, сорбируется на них посредством специфических центров связывания, находящихся в кринглах и в области, соответствующей легкой цепи.

Из многолетней препаративной практики известно, что выделяемые образцы фибриногена всегда содержат примесь пламиногена, для отделения которой требуются дополнительные воздействия, обеспечивающие диссоциацию межбелковых комплексов. Наличие примеси пламиногена в препаратах фибриногена использовалось для лабораторного выявления активаторов фибринолиза (Astrup, 1952). Эти наблюдения свидетельствуют о связывании пламиногена фибриногеном. Использование метода аффинной хроматографии позволило выявить различие в строении Глу- и Лиз-пламиногена к фибриногену. Лиз-пламиноген специфически связывался с иммобилизованным фибриногеном, взаимодействие было обратимым и нарушалось в присутствии 6-аминогексановой кислоты. Константа диссоциации равна 5,6 мкмоль, а число центров связывания близко к единице. Глу-пламиноген не связывался с фибриноген-агарозой. Поэтому некоторые фармацевтические фирмы выпускают с лечебной целью препараты Лиз-пламиногена, обработанные паром для инактивации вирусов.

При использовании для иммобилизации частично гидролизованного пламиногеном фибриногена выявлено специфическое связывание с ним Глу-пламиногена. Из этого можно заключить, что в процессе гидролиза фибриногена в нем экспонируются пламиногенсвязывающие места, при взаимодействии которых с Глу-пламиногеном конформация последнего становится подобна таковой Лиз-пламиногена.

В молекуле фибриногена имеется несколько центров для связывания Лиз-пламиногена. Они располагаются в центральной и периферических доменах и комплементарны как лизил-, так и аргинилсвязывающим участкам, профермента. Оба типа центров домена D в нативной молекуле скрыты и выявляются в процессе гидролиза фибриногена. Соответственно взаимодействию с фибриногеном центры связывания пламиногена сохраняются при образовании волокнистого фибрина так, что каждая фибрин-мономерная единица содержит место для присоединения Лиз-пламиногена почти с таким же средством.

Фрагменты пламиногена, аффинные к лизин-сефарозе, взаимодействуют с фибрином и фибриногеном. Из этого было сделано заключение, что пламиноген соединяется с фибрином и фибриногеном посредством лизинсвязывающих мест, находящихся в кринглах. В частности, методом  $^1\text{H}$ -ЯМР в крингле 4 были обнаружены лизинсвязывающие сайты, способные обеспечивать плазмин(оген)-фибрин(оген)овое взаимодействие, причем после протеолитической модификации фибриногена с образованием фрагмента X происходит более тесное связывание. Однако в целом средство Лиз-пламиногена к фибрину значи-

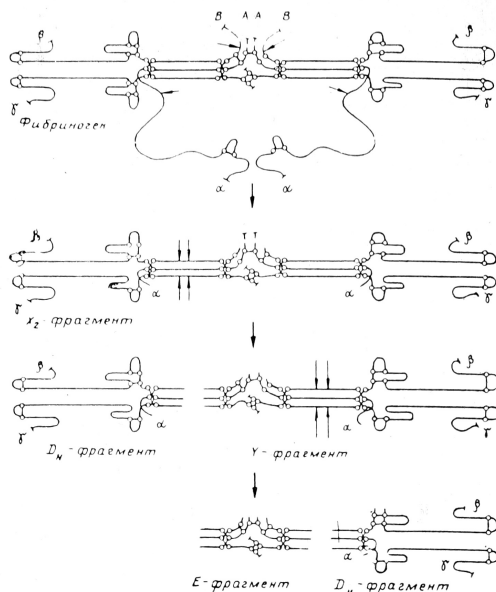


Рис. 2. Схема протеолиза фибриногена плазмином (Л. В. Медведь, С. В. Литвинович). Стрелками отмечены места преимущественного расщепления: светлыми кружочками — дисульфидные связи, альфа, бета, гамма — COOH-концевые участки полипептидных цепей; A, B — NH<sub>2</sub>-концевые фибрин-пептиды.

тельно выше, чем у каждого крингла по отдельности.

Высокая аффинность взаимодействия между фибрином и пламиногеном распространяется и на взаимодействие фибрина с тканевым активатором пламиногена, ввиду этого на поверхности кровяного сгустка образуется плазмин, вызывающий фибринолиз путем расщепления ряда пептидных связей. Таким образом, фибрин вначале служит концентратором пламиногена и тканевого активатора, а затем субстратом для плазмينا.

Гидролиз нестабилизированного фибрина под действием плазмينا идет по тому же механизму, что и фибриногена [2]. Вначале отщепляются C-фрагменты с массой 45 кДа и образуется ранний X-фрагмент, затем с N-конца 42- и 11-членные пептиды от B-цепи (из фибрина вместо B 1-42—B 15-42) и возникает поздний X-фрагмент. На этом этапе фибрин сохраняет волокнистую структуру. Далее X-фрагменты расщепляются до D и Y-фрагментов с массой 92 и 145 кДа. Последний гидролизует до D и E-фрагментов с массой 50 кДа [8]. На рис. 2 представлена схема расщепления фибриногена плазмином по Л. В. Медведю, С. В. Литвиновичу (1989).

После образования  $\epsilon$ -( $\gamma$ -глутамил)лизин-мостиков в фибрине под действием фактора XIIIa при плазминовом гидролизе образуются D-димеры и E-фрагмент. Расщепление плазмином 42 пептидных связей приводит к глубокому распаду структуры как фибриногена, так и фибрина.

**Тканевой активатор пламиногена.** Наиболее важным физиологическим активатором пламиногена является тканевый активатор, который синтезируется в виде молекулы, состоящей из одной гликозилированной полипептидной цепи с массой около 67 кДа.

Он образуется в клетках эндотелия кровеносных сосудов и секретируется в кровь. Продолжительность его полужизни в циркулирующей крови составляет около 5 минут, так как он быстро улавливается печенью.

В отличие от многих других сериновых протеаз, тканевый активатор плазминогена активен и в своей одноцепочечной форме, особенно в присутствии фибрина. Расщепление Arg 278—Илей 279 пептидной связи плазмином дает типичную структуру двуцепочечной «активной» протеазы. У двуцепочечной формы ферментативная активность по отношению к низкомолекулярным субстратам увеличивается больше чем на порядок. В то же время активность по отношению к плазминогену в присутствии фибрина едва ли изменяется при подобной «активации».

Цепь А, образующаяся из N-концевой части молекулы, содержит несколько типов модулей: два крингла, один «палец» и один модуль фактора роста (рис. 1). Крингл 2 и пальцеобразный модуль, очевидно, вовлекаются в связывание тканевого активатора плазминогена фибрином. Что касается модуля фактора роста, наиболее вероятно, что он вовлечен в сорбцию тканевого активатора печеночными клетками и по крайней мере частично обеспечивает быстрый клиренс этого белка в организме. Цепь В, образующаяся из С-концевой части молекулы, гомологична другим сериновым протеиназам и содержит активный центр фермента.

Скорость образования плазмина из плазминогена под действием тканевого активатора в присутствии фибрина в 1000 раз больше, чем в растворе. В расчете на связанный с фибрином плазминоген Км активации Глу-плазминогена тканевым активатором меньше Км активации Лиз-плазминогена, что может свидетельствовать о большем сродстве тканевого активатора к Глу-плазминогену в комплексе с фибрином [8]. Не исключено, что преактивационный пептид плазминогена взаимодействует с кринглом 2 тканевого активатора и улучшает ориентацию активного центра последнего по отношению к гидролизуемой связи Arg 560—Вал 561 плазминогена.

Разрушение фибринового сгустка плазмином сопровождается превращением Глу-плазминогена в Лиз-плазминоген и одноцепочечной формы тканевого активатора в двуцепочечную. Поскольку Лиз-плазмин(оген) и двуцепочечная форма тканевого активатора обладают высоким сродством к  $\alpha_2$ -антиплазмину, можно полагать, что образование этих деградированных форм ферментов служит сигналом для их инактивации после завершения фибринолиза.

Высокое сродство тканевого активатора плазминогена к фибрину обеспечивает избирательность действия на тромбы. Например, отпадает необходимость при лечебном применении препаратов тканевого активатора плазминогена, полученных генноинженерным методом, вводить их непосредственно катетером в коронарные сосуды сердца. Достаточно обычного внутривенного введения для достижения целенаправленного лизиса сгустков в коронарных сосудах сердца.

Синтез и секрция тканевого активатора плазминогена эндотелиальными клетками стимулируются катехоламинами, вазопрессорином, брадикинином. Отмечены циркадные изменения активности тканевого активатора. В утренние часы активность наименьшая, а после

полудня — наибольшая.

**Урокиназа** (КФ. 3.4.99. 26) синтезируется главным образом в почках в виде одноцепочечного гликопротеина с молекулярной массой около 54 кДа. Продолжается дискуссия о том, может ли одноцепочечная форма рассматриваться как истинный профермент (проурокиназа) или она обладает собственной каталитической активностью. Урокиназа, подобно тканевому активатору плазминогена, состоит из нескольких модулей. С N-конца молекула начинается с модуля фактора роста, затем следует один крингл и заканчивается С-концевой сериновой протеазой (рис. 1). Расщепление одной пептидной связи Лиз 158—Илей 159 между кринглом и модулем сериновой протеазы под действием плазмина или калликреина приводит к образованию классической двуцепочечной структуры, которая обладает возросшей на 2 порядка активностью по отношению к низкомолекулярным субстратам и к плазминогену. В противоположность тканевому активатору плазминогена урокиназа не проявляет особого сродства к фибрину.

Инкубирование урокиназы в 2,4 и 6 М мочеvine в течение 16 часов не влияет на способность фермента активировать плазминоген [6]. Мочевина в физиологической концентрации (2%) не влияет на лизис фибринплазминогенового субстрата под действием урокиназы. Физиологической функцией двуцепочечной формы урокиназы, вероятно, являются превращение плазминогена в плазмин в мочевыводящих путях и растворение в них сгустков крови в случае их образования. Что касается физиологической роли обнаруживаемой в крови одноцепочечной формы проурокиназы, то она остается еще неясной.

Свойства и пути активации контактной фазы свертывания крови (фактор XII, прекалликреин, высокомолекулярный кининоген) рассмотрены в предыдущей лекции («Казанский мед. ж.», № 2, 1994 г.). Калликреин, кроме реципрокной активации фактора XII, как уже указывалось, может расщеплять Arg 560—Вал 561 пептидную связь в плазминогене с выходом активного фермента. Поэтому пациенты, у которых имеется дефицит этих факторов контактной фазы свертывания крови, за исключением фактора XI, не обнаруживая тенденции к геморрагиям, могут страдать от тромбозов вследствие недостаточной активации фибринолитической системы.

**Стрептокиназа.** Кроме физиологических активаторов плазминогена ряд продуктов микробного происхождения может вызывать увеличение фибринолитической активности крови. Наиболее известным и применяемым агентом такого рода является стрептокиназа, продуцируемая  $\beta$ -гемолитическим стрептококком. Этот белок с молекулярной массой около 48 кДа выделяют из культуральной жидкости стрептококков-продуцентов и довольно широко используют в медицинской практике для тромболитической терапии ввиду того, что он относительно дешевле, чем препарат тканевого активатора плазминогена.

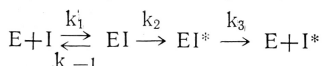
Стрептокиназа активирует фибринолиз несколькими способами. Она образует экзимогенные комплексы с плазмином и плазминогеном. Комплекс Глу-плазминогена со стрептокиназой обладает свойствами активатора плазминогена [1]. Сродство стрептокиназы и комплексов стрептокиназы с плазмином и плазминогеном к фибрину ниже, чем у тка-



невого активатора плазминогена, по выше, чем у урокиназы. Связывание стрептокиназы с плазминогеном происходит в С-концевой области цепи В с доменом Вал 560—Асп 790. Лечение препаратами этого активатора фибринолиза следует проводить с учетом наличия в популяциях у людей как различного уровня естественного иммунитета к стрептококкам, так и неодинаковой концентрации антител к стрептокиназе.

**Альфа<sub>2</sub>-антиплазмин** принадлежит к семейству серпинов (серпиновых протеаз ингибитор) и по своей природе является одноцепочечным гликопротеином с молекулярной массой около 670 кДа. Инактивация плазмина под его воздействием происходит очень быстро, хотя включает в себя несколько этапов [3]. Вначале происходит обратимое стехиометрическое взаимодействие путем использования лизин-связывающих мест (см. выше) и кармана активного центра в плазмине и комплементарных им участков в  $\alpha_2$ -антиплазмине. Далее образуется эфирная связь с медленно обратимым переходом, и одновременно происходит расщепление Арг 354—Мет 355 пептидной связи в  $\alpha_2$ -антиплазмине. Это нормальный промежуточный продукт протеолитической атаки пептидной связи серпиновыми протеазами. Однако в данном случае субстрат функционирует как ингибитор, так как образовавшийся промежуточный продукт, ацил-ферментный комплекс, весьма стабилен и очень медленно распадается на свободный фермент и расщепленный ингибитор. Участок, комплементарный лизинсвязывающему центру плазмина, находится на самом С-конце  $\alpha_2$ -антиплазмينا.

Иными словами, ингибитор вначале образует обратимый комплекс ( $K_d = k_1/k_{-1}$ ), а затем расщепляется (константа скорости  $k_2$ ). Большие конформационные изменения молекулы ингибитора под воздействием расщепления препятствуют обратимости реакций:



Константа  $k_3$  так низка, что освобождения активного фермента не происходит. В соответствии со своим механизмом действия серпины должны рассматриваться как псевдосубстраты. Этот ингибитор подавляет фибринолитическую и эстеролитическую активность плазмина практически мгновенно даже при 0°C в отличие от  $\alpha_2$ -макроглобулина, инактивирующего действие которого усиливается с течением времени. Находящийся на N-конце полипептидной цепи  $\alpha_2$ -антиплазмينا Гли 2 может под действием фактора XIII в результате  $\epsilon$ -лизил- $\gamma$ -глутамил-аминоацил-трансферной реакции ковалентно присоединяться к С-домену полимерного фибрина. Небольшие количества  $\alpha_2$ -антиплазмينا, связанные с нитями фибрина во время свертывания крови, предохраняют сгусток от преждевременного лизиса.

**Ингибитор активатора плазминогена-1** является вторым наиболее важным ингибитором фибринолиза и также принадлежит к семейству серпинов. Освобождение ингибитора активатора плазминогена-1 из тромбоцитов заметно увеличивает его местную концентрацию и обеспечивает тем самым локальное торможение фибринолиза. Таким образом, функция этого ингибитора состоит в стабилизации первичной гемостатической пробки. Ингибитор активатора плазминогена-1 был обнаружен не только в тромбоцитах, но и в

эндотелиальных и гладкомышечных клетках и гепатоцитах [11].

Молекулярная масса ингибитора составляет около 52 кДа. Он тормозит активность не только тканевого активатора плазминогена (одно- и двухцепочечной форм), но и урокиназы (только двухцепочечной формы). Расщепленная пептидная связь в С-концевой части молекулы, подобно  $\alpha_2$ -антиплазмину, представлена парой Арг 346—Мет 347.

**Ингибитор активатора плазминогена-2** был впервые идентифицирован в экстрактах плаценты человека. Выявлены две формы этого ингибитора: низкомолекулярные (43 и 48 кДа) и высокомолекулярная (70 кДа). Кроме того, он обнаружен в моноцитах и макрофагах и секретируется ими. По специфичности он рассматривается главным образом как ингибитор урокиназы, ибо с тканевым активатором взаимодействует довольно медленно. Повышенная концентрация ингибитора активатора плазминогена (до 0,3 мг/л или 6 нМ) была установлена пока примерно у половины беременных. В нормальной плазме обнаружить его не удается.

**Дисплазминогемии**, сопровождающие тромбозомболические заболевания, имели место у 12 пациентов. Среди них были как лица со сниженной функциональной активностью при нормальном уровне в плазме крови антигена этого профермента, так и лица с семейной гипоплазминогемией, при которой содержание антигена плазминогена в плазме понижено, а его функциональная активность в норме.

Выявление молекулярных дефектов плазминогена начинается с изучения кинетики его активации под действием тканевого активатора плазминогена, урокиназы и стрептокиназы и далее — с клонирования его гена. Предварительная классификация показала, что дисплазминогемии могут быть вызваны как дефектами активного центра и кинетическими дефектами, так и дефектами активного центра, нарушенным связыванием стрептокиназы и нарушенным образованием активного центра в эквимольном комплексе плазминоген — стрептокиназа.

Врожденные случаи **недостаточности  $\alpha_2$ -антиплазмينا** были описаны в качестве причины тяжелых и умеренных кровотечений. Как правило, первые наблюдались у гомозигот, вторые — у гетерозигот. Недавно в одной датской семье был описан вариант  $\alpha_2$ -антиплазмينا. Молекулярное клонирование геномной ДНК этого белка выявило вставку трех пар оснований, кодирующих излишний остаток аланина вблизи реактивного центра белка. Такая модификация делает ингибитор не только бездейственным, но и особо подходящим субстратом для деградации под действием плазмина. В других случаях наблюдалось сниженное сродство  $\alpha_2$ -антиплазмينا к фибрину.

В обзоре Stump и др. (1990) обобщены два наблюдения избыточной циркуляции в кровотоке тканевого активатора плазминогена у лиц, страдающих кровотоочивостью. Там же упоминается о кровотоочивости у пациента с функционально дефективной молекулой ингибитора активатора плазминогена-1. Это наблюдение позволяет предполагать участие ингибитора активатора плазминогена-1 не только в формировании предрасположенности к тромбозам, но и в поддержании нормального гемостаза. Фибринолиз в таких случаях выражен слабо. Значителен лишь лизис фиб-

рина в сгустках крови. Тактика лечения семейного гиперфибринолиза пока мало разработана.

### **Влияние подпродуктов плазминовой деградации фибриногена и фибрина на полимеризацию фибрина**

В результате реактивного усиления фибринолиза при синдроме диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови в циркулирующей крови обнаруживаются продукты деградации фибрина. Не свертываемые тромбином растворимые комплексы фибрин-мономера с продуктами протеолитического расщепления фибриногена и фибрина (РКФМ) имеют важное патофизиологическое значение в практической медицине.

Глубокий анализ механизмов солибилизирующего действия фрагмента D на фибрин произведен в лаборатории В. А. Белицера, Т. М. Поздняковой [2, 10]. Как известно, полимеризация фибринмономера в фибрин осуществляется путем межблочного D—E-связывания. Поскольку D-блоки занимают периферическое положение, а E-блоки находятся в центре, нековалентное D—E-связывание создает упаковку молекул по типу концев — середина. Образующиеся при гиперфибринолизе продукты плазминовой деградации фибрина путем конкуренции могут вмешиваться в названный механизм и нарушать полимеризацию. При крайней выраженности патологического процесса дело может доходить до полной несвертываемости крови. В таких случаях, несмотря на выявление фибриногена физико-химическими и иммунологическими методами, под действием тромбина не происходит выпадения нитей фибрина из-за антикоагуляционного действия продуктов расщепления фибрина и фибриногена.

Выделенные из фибриногена и фибрина под действием плазмина продукты деградации в основном сохраняют структурную организацию и, следовательно, сайты, присущие исходным молекулам. Например, фрагменты X, Y, D сохраняют способность к взаимодействию с фибринмономером, ингибируя полимеризацию [5]. Такое взаимодействие оказывается возможным благодаря сохранению в них центра полимеризации (центра D), локализованного в C-концевом участке  $\gamma$ -цепи.

Продукты деградации фибриногена и фибрина представляют собой смесь различных компонентов. Среди них, как отмечалось выше, есть как достаточно высокомолекулярные соединения с массой 1 млн и выше, образующиеся путем ковалентной сшивки фактором XIIIa, так и фрагменты фибриногена. Первые могут стимулировать свертывание крови, а вторые обладают антикоагуляционным действием. Особенно эффективны в качестве антикоагулянтов ранние продукты деградации с молекулярной массой 240—300 кДа. Они включаются в состав сгустка наряду с фибрин-мономером, поэтому в сыворотке крови не обнаруживаются. Там сохраняются относительно более слабые ингибиторы полимеризации с молекулярной массой около 100 кДа.

В роли ингибитора полимеризации может выступать и негидролизанный фибриноген, потому что в нем имеется доступный для взаимодействия домен D.

Биологическая роль низкомолекулярных пептидов, образующихся при деградации фибриногена и фибрина, мало известна, за исключением их способности задерживать агрегацию

тромбоцитов, индуцируемую тромбином, АДФ или адреналином.

Помимо торможения полимеризации, фрагмент D и некоторые другие продукты расщепления фибриногена и фибрина способны вызывать агрегацию тромбоцитов, хемотаксис лейкоцитов, влиять на проницаемость эндотелия.

В настоящее время разработаны как функциональные, так и иммунологические методы выявления продуктов расщепления фибрина/фибриногена в крови человека. И если вначале считали, что эти продукты отсутствуют в крови и моче здоровых людей, то с внедрением этих высокочувствительных способов найдено, что в сыворотке крови их содержание составляет от 1 до 6 мкг/мл. После тяжелых физических упражнений этот уровень возрастает и продукты деградации обнаруживаются и в моче, что обусловлено, по-видимому, повышением выделения тканевого активатора плазминогена из сосудистой стенки.

Весьма обширна литература, посвященная определению продуктов расщепления фибриногена и фибрина при различных физических состояниях, особенно при разных заболеваниях. Обобщая эти материалы, мы можем заключить, что усиление интенсивности процесса физиологического непрерывного внутрисосудистого свертывания крови, тем более развитие патологического синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови, вызывая интенсификацию реактивного фибринолиза, увеличивает выработку продуктов деградации фибриногена и фибрина. При этом синдроме происходит также снижение уровня  $\alpha_2$ -антиплазмينا, что, видимо, объясняется выведением комплекса плазмин- $\alpha_2$ -антиплазмин из крови клетками ретикулоэндотелиальной системы.

По данным наших исследований, альвеолярные макрофаги осуществляют  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимый пиноцитоз ФИТЦ-меченого фибриногена и лизис ФИТЦ-фибрина. Однако выделить при этом роль неспецифических протеаз не представляется возможным, так как эти клетки синтезируют и секретируют тканевой активатор плазминогена. Тем не менее Б. И. Кузник, Н. В. Васильев, Н. Н. Цыбиков [7] придают существенное значение не только специфической системе ферментов, осуществляющих фибринолиз, но и лейкоцитарному фибринолитическому звену — выбросу моноцитами и лимфоцитами неспецифических протеиназ, способных расщеплять фибриновый сгусток.

### **Фибринолитически активные полимеры**

Прогресс сердечно-сосудистой хирургии и применение экстракорпорального кровообращения в заметной степени сдерживаются образованием сгустков крови на поверхности искусственных изделий, созданных по большей части из синтетических полимеров. Эти изделия (протезы сердца, его клапанов, кровеносных сосудов, диализационные мембраны, гемосорбенты и пр.) предназначаются либо для временного контактирования с кровью, либо для постоянного вживления в организм. Несмотря на многолетние поиски, среди синтетических полимеров пока не удалось найти материал, который бы удовлетворял медицинским требованиям атромбогенности. Атромбогенность составляет одну из сторон биосовместимости контактирующих с кровью материалов, которые не должны оказывать некротического влияния на ткани, травмиро-

Таблица 2

Гемокоагуляционные свойства протеаз, иммобилизованных на полиаминоэтироловой смоле

Ферменты	Исследованные показатели				
	активация протромбина, с	свертывание фибриногена, с	активация плазминогена, мм/ч	лизис фибрина, мм/ч	гидролиз БАЭЭ и ТЭЭ, кат/м <sup>2</sup>
Трипсин	—	—	0,6	0,3	$5,07 \cdot 10^{-4}$
Тромбин	5	25	—	—	$5,07 \cdot 10^{-4}$
Плазмин	—	—	0,3	0,2	$0,49 \cdot 10^{-4}$
Папаин	—	—	0,3	—	$0,82 \cdot 10^{-4}$
Химотрипсин	—	—	0,4	—	$3,1 \cdot 10^{-4}$
Урокиназа	—	—	0,5	—	—
Контроль	—	—	—	—	—

вать их механически, обладать канцерогенным, аллергическим и антигенным действиями, вызывать гемолиз, денатурацию белков и изменения электролитного баланса при большом объеме ионного обмена, вести к активации системы комплемента. Разлагаясь в организме, эти материалы не должны также образовывать токсических продуктов. Среди всех перечисленных качеств атромбогенность наиболее трудно достижима. Причина этого заключается в том, что в организме человека система гемокоагуляции в общем кровотоке постоянно функционирует на уровне, который регулируется, в частности, катехоламинами в соответствии с сиоминутной опасностью возникновения кровопотери. При этом происходят перманентная активация и потребление компонентов системы гемостаза.

Гиперадгезивные тромбоциты, как и конечные продукты микроактивации системы гемостаза — растворимые комплексы фибрин-мономера и фибрин, образовавшиеся в результате физиологических повреждений сосудистой стенки и активации контактной фазы свертывания крови катехоламинами, могут отлагаться и адсорбироваться на поверхности полимеров даже в том случае, если они сами не будут инициировать свертывание крови. На поверхности нормальных эндотелиальных клеток фибрин и растворимые комплексы фибрин-мономера подвергаются экстрацеллюлярному лизису под действием вырабатываемого этими клетками активатора плазминогена и интрацеллюлярному протеолиту лизосомальными ферментами.

Таким образом, для максимального уменьшения образования кровяных сгустков на поверхности синтетических материалов недостаточно использовать полимеры, минимально активирующие контактную фазу свертывания крови (фактор Хагемана, прекалликреин, высокомолекулярный кининоген и фактор XI) и вызывающие минимальную адгезию тромбоцитов. Для этой цели необходимы, кроме того, чрезвычайно гладкая поверхность (высокий класс механической обработки) и придание ей фибринолитических свойств. Следовательно, создание искусственной самоочищающейся от фибрина поверхности, которое нам кажется достижимым путем иммобилизации на этой поверхности протеолитических ферментов, является одним из перспективных путей решения современных проблем сердечно-сосудистой хирургии, экстракорпорального кровообращения, длительной инфузии через сосудистые катетеры и т. д. При этом используемые ферменты должны обладать только плазминоген-активирующим и фибринолитическим действиями и не должны превращать прекалликреин в калликреин, активировать факторы XII и фактор XI системы свертывания крови, а также компоненты системы комплемента. С учетом таких жестких условий использовать ферменты с широкой специфичностью, например трипсин, химотрипсин, папаин, для придания фибринолитических свойств, очевидно, не следует, за исключением модельных опытов с целью изучения поведения ферментов на поверхности модифицируемого полимера.

Нашими исследованиями было показано, что иммобилизованные на полиаминоэтироловой смоле ферменты (трипсин, тромбин, плазмин, химотрипсин, урокиназа) сохраняют свою специфичность (табл. 2).

Фибринолитическая и аутокаталитическая активность была обнаружена у иммобилизо-

ванного плазмина. Прямое фибринолитическое действие достигается лишь при непосредственном контакте поверхности, несущей иммобилизованные ферменты, с фибрином. Отсутствие диффузии фермента в нижележащие слои фибрина указывает на прочность ковалентного связывания исследуемых протеаз с носителем. Два других фермента — папаин и химотрипсин — после ковалентного связывания с поверхностью полимера утрачивали способность вызывать непосредственный протеолиз фибрина. У них сохранялось лишь опосредованное через активацию плазминогена фибринолитическое действие. Такое же плазминогенактивирующее действие было обнаружено и у иммобилизованной урокиназы, но для этого фермента оно является специфическим.

Иммобилизацию плазмина, папаина, трипсина, стрептокиназы и химотрипсина на капроне проводили через бифункциональный реагент — глутаровый альдегид. Протезы обрабатывали 3,65 М соляной кислотой при 40°C в течение 30 минут, тщательно отмывали от следов соляной кислоты дистиллированной водой и натрий-боратым буфером (0,1 М, pH 8,0). Реакция между матрицей и глутаровым альдегидом протекала в том же буфере. От избытка глутарового альдегида протезы отмывали последовательно дистиллированной водой, 0,2 М натрий-боратым буфером и вновь дистиллированной водой. Реакцию иммобилизации ферментов проводили из 1% раствора ферментов по белку в 0,05 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  с pH 7,0. От нековалентно связанных белков протезы отмывали 1 М раствором хлористого натрия в 0,1 М натрий-боратном буфере с pH 8,0 до нулевой экстинкции при длине волны 280 нм. Приготовленные протезы промывали стерильным физиологическим раствором, помещали в полиэтиленовые контейнеры, заливали кровью донора, герметично упаковывали и после образования обтурирующего сгустка инкубировали в термостате при 37°C. Через 24 ч контейнеры вскрывали и на основании весового анализа рассчитывали процент лизирования сгустка относительно контрольных протезов без иммобилизованных ферментов. Исследованные протезы из капрона обладали способностью лизировать сгустки крови человека при иммобилизации на них папаина на  $60 \pm 0,6\%$  ( $P < 0,01$ ), стрептокиназы на  $77 \pm 1,3\%$  ( $P < 0,001$ ), плазмина на  $57,5 \pm 4,1\%$  ( $P < 0,001$ ), трипсина на  $39,4 \pm$

$\pm 6,7\%$  ( $P < 0,01$ ), химотрипсина на  $12,0 \pm 2,6\%$  ( $P < 0,05$ ).

Помимо иммобилизации фибринолитических ферментов на поверхности капрона нами была осуществлена иммобилизация фибринолитических ферментов на поверхности полиэтиленовых катетеров (катетер подключичный промышленного изготовления). Эти катетеры после иммобилизации на их поверхности специфической протеазы приобретают фибринолитические свойства. При их погружении в фибрин-плазминоген-агаровый гель происходит лизис фибрина вокруг его поверхности. Были изучены факторы, влияющие на фибринолитическую активность этих катетеров. Результаты исследований влияния длительности хранения на воздухе при комнатной температуре на фибринолитическую активность иммобилизованных протеаз на поверхности катетера представлены в табл. 3.

Таблица 3

**Лизис фибрин-плазминоген-агарового геля катетерами**

Срок хранения, дни	0	7	15	25
Фибринолиз при 37° через 16 ч, мм	22	20	16	11

Наибольшую фибринолитическую активность катетеры проявляют при непродолжительном хранении, около недели. Однако спустя и более длительные сроки фибринолитическая активность сохраняется на довольно высоком уровне, то есть ферменты, иммобилизованные на поверхности полиэтилена и находящиеся при свободном доступе воздуха в сухом виде при комнатной температуре, не теряют своих фибринолитических свойств. Из этого вытекает, что катетеры после иммобилизации на их поверхности фибринолитических ферментов можно доставлять в лечебные учреждения без особых предосторожностей, как и обычные катетеры.

Поскольку катетеры могут находиться в рабочем состоянии, будучи введенными в кровеносное русло человека, иногда на протяжении нескольких дней, была изучена фибринолитическая активность иммобилизованных на их поверхности ферментов при взаимодействии с сывороткой крови человека (табл. 3).

Фибринолитическая активность иммобилизованных протеаз, как и при хранении на воздухе, постепенно уменьшается, причем интенсивность данного процесса при нахождении в сыворотке крови выше, чем в высушенном состоянии. Это обусловлено воздействием на иммобилизованный фермент естественных ингибиторов протеиназ (антиплазмина,  $\alpha_2$ -макроглобулина,  $\alpha_1$ -антитрипсина,  $\alpha_1$ -антихимотрипсина, С1-инактиватора), содержащихся в сыворотке человека.

Однако, как видно из табл. 3, даже в сыворотке крови фибринолитическая активность катетера сохраняется достаточно продолжи-

Таблица 3

**Влияние деятельности воздействия человеческой сыворотки на фибринолитическую активность модифицированных катетеров**

Время нахождения в человеческой сыворотке	Фибринолитическая активность за 16 ч, 37°C, в мм
0,5 ч	20
2 ч	20
12 ч	20
24 ч	20
2 сут	18
4 сут	17
6 сут	15
8 сут	12
10 сут	10
11 сут	7
12 сут	4
13 сут	2
14 сут	0

тельное время, соизмеримое с обычным сроком нахождения катетеров в кровеносных сосудах человеческого организма.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Андреев Г. В. Фибринолиз (биохимия, физиология, патология).— М., 1979.
2. Белицер В. А.//Биохимия животных и человека.— Киев, 1982.— Вып. 6.— С. 38 — 57.
3. Веремеенко К. Н., Голобородько О. П., Кизим А. И. Протеолиз в норме и при патологии.— Киев, 1988.
4. Гриненко Т. В., Кудинов С. А.//Биохимия животных и человека.— Киев, 1989.— Вып. 13.— С. 46 — 55.
5. Дранкин Г. Н., Ена Я. М., Варецкая Т. В. Продукты расщепления фибрина-фибриногена при патологических процессах.— Киев, 1987.
6. Зубаиров Д. М., Асадуллин М. Г., Зинкевич О. Д.//Биохимия.— 1974.— № 2.— С. 378 — 383.
7. Кузник Б. И., Васильев Н. В., Цыбиков Н. Н. Иммуногенез, гемостаз и неспецифическая резистентность организма.— М., 1989.
8. Макагоненко Е. М., Колесник Л. А.//Биохимия животных и человека.— Киев, 1989.— Вып. 13.— С. 55 — 64.
9. Новохатный В. В., Мацука Ю. В.//Биохимия животных и человека.— Киев, 1989.— Вып. 13.— С. 36 — 45.
10. Позднякова Т. М.//Биохимия животных и человека.— Киев, 1989.— Вып. 13.— С. 27 — 36.
11. Wiman B., Hamsten A.//Sem Thromb. Hemost.— 1990.— Vol. 16.— P. 207—216.

Поступила 23.12.93.