

## СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФИБРИНОЛИЗА: КАК РАЗОБРАТЬ СГУСТОК

*Джон В. Вайзел (John W. Weisel)*

*Пенсильванский университет, Филадельфия, США  
(University of Pennsylvania)*

Известно, что фибринолитическая система действует через плазмин-активную протеазу, которая образуется из связанного с фибрином плазминогена под действием его активаторов, к числу которых относятся тканевый (тПА) и урокиназный (уПА) типы. Плазмин в определенных местах расщепляет фибрин, образуя растворимые фрагменты. Благодаря достаточно серьезному их изучению была создана молекулярная модель расщепления полипептидной цепи [4, 23, 25]. Растворимые продукты деградации фибрина были исследованы в том числе и методом трансмиссионной электронной микроскопии, позволявшей судить об их строении [31]. Трехмерные изображения некоторых фрагментов фибриногена, полученные с высокой степенью разрешения, дали богатую информацию о процессах связывания с фибрином различных белков и о некоторых механизмах фибринолиза [26, 36].

Как скорость распада фибрина, так и структура его растворимых фрагментов частично определяются строением самой фибриновой сети. При превращении фибриногена в фибрин активация плазминогена под действием тПА идет быстрее, и скорость этой реакции существенно зависит от особенностей структуры фибрина. Например, в сгустках, образованных из толстых нитей, превращение плазминогена в плазмин под влиянием тПА и распад этих сгустков происходят быстрее, чем когда они состоят из тонких нитей [1, 16, 35]. Однако при других условиях сгустки из толстых волокон могут растворяться медленнее [6], так что экспериментальные условия и методы измерения скорости лизиса нужно выбирать очень осторожно [21]. Вдобавок ко всему сгустки фибрина из патологически тонких волокон, образуемых некоторыми аномальными фибриногенами, обнаруживают пониженную способность связывать плазминоген и низкую скорость фибринолиза [14, 20, 29]. Чтобы объяснить эти разнообразные наблюдения и понять молекулярные основы фибрино-

лиза, нужно больше знать о физических изменениях в фибриновом матриксе, которые предшествуют его растворению.

В настоящей работе обобщены результаты недавних экспериментов с использованием трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии, а также конфокальной световой микроскопии, которые дают важную информацию о структурных изменениях фибринового полимера в ходе его дезорганизации. Многие из этих результатов оказались неожиданными и навели на мысль о некоторых новых возможных молекулярных механизмах фибринолиза.

Общепринятая макроскопическая модель физических изменений в нерастворимом фибрине по ходу его плазминовой деградации основана на том, что фибриновый сгусток расщепляется снаружи внутрь с послойным высвобождением продуктов распада [7, 25]. Такое представление сложилось из характеристики белков, полученных путем расщепления предварительно лиофилизированных и измельченных частиц фибрина. При изучении динамики фибринолиза с помощью конфокальной лазерной сканирующей флуоресцентной микроскопии было также обнаружено, что плазминовая деградация сгустка проявляется последовательным послойным уменьшением его размера [11, 12]. Наблюдаемое в процессе лизиса сгустка резкое усиление связывания плазминогена и тПА ограничивается тонкой каймой около фронта лизиса, а изменения, сопровождающие деградацию, сосредотачиваются в еще более узкой смежной полосе.

Были разграничены две последовательные фазы лизиса [11]. В ходе первой фазы, прелизиса, плазминоген накапливается на поверхности сгустка в результате увеличения его сродства, обусловленного открытием С-концевых лизинозных центров связывания в местах образования первых плазминовых "насечек". При этом почти не видно никаких физических изменений. Во второй фазе, фазе окончательного лизиса, фибриновая сеть становится подвижной,

разрушается и быстро исчезает. Исследование лизиса фибрино-тромбоцитарных тромбов, проведенное с использованием ультраструктурного подхода, в основном было посвящено регуляции процесса под действием ингибитора активатора плазминогена [15].

На уровне отдельных фибриновых волокон, как тонких, так и толстых, для объяснения результатов экспериментов была предложена модель расщепления сгустка снаружи внутрь [1]. Иными словами, было предположено, что плазмин сначала удаляет поверхностный слой волокна, образуя по ходу переваривания все более тонкие нити. Эта же идея легла в основу модели фибринолиза, разработанной с целью предсказания способности сгустка пропускать через себя жидкость, в том числе содержащую тромболитические препараты [21, 22].

**Исследование поверхности расщепляемого сгустка методом сканирующей электронной микроскопии.** При сравнении с контролем (рис. 1А) наиболее очевидным было появление множества свободных концов фибрина (рис. 1В). По всей поверхности сгустка как длинные, так и короткие волокна имели ровно

усеченные концы. Целых волокон почти не было, большинство из них имело один слепой конец, а другим они прикрепились к сгустку.

Вопреки ожиданиям того, что по мере переваривания фибриновые нити должны постепенно уменьшаться в диаметре, они, наоборот, после действия плазмина становились толще (рис. 1 С, D) [28]. Это происходило потому, что пучки фибрина состояли из оставшихся неразрушенными волокнистых сегментов, претерпевших латеральную агрегацию. Такой эффект можно объяснить только поперечным рассечением волокна, поскольку именно латеральная агрегация, в норме происходящая в процессе полимеризации, ведет к образованию толстых нитей фибрина [30]. Гистограммы распределения фибриновых пучков по диаметру на разных стадиях переваривания показали, что по мере расщепления пик сдвигался в сторону увеличения диаметра. При этом гетерогенность пучков по диаметру также возрастала, что в совокупности объясняется латеральной агрегацией поперечно расщепленных фибриновых нитей [28]. Иногда пучки фибрина были по-

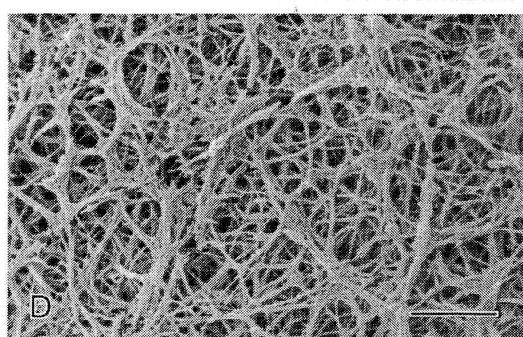
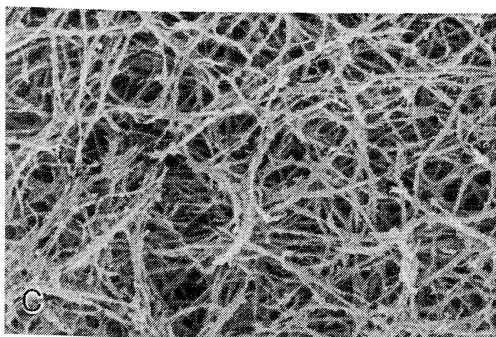
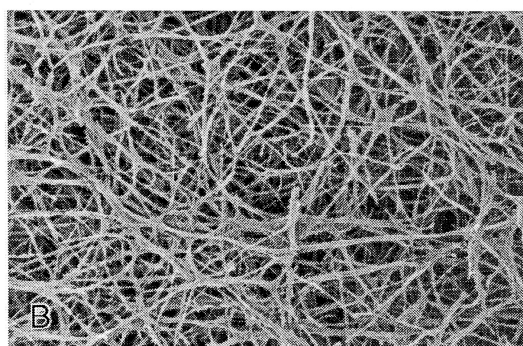
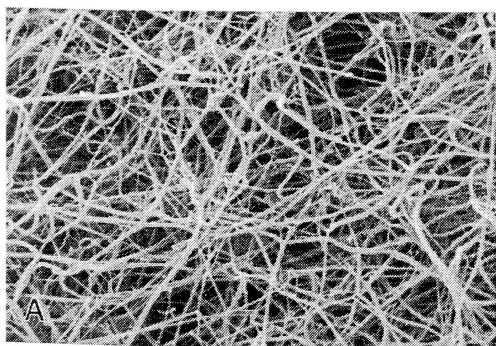


Рис. 1. Сканирующая электронная микроскопия поверхностей расщепляемого сгустка. Образцы исследовались на разных сроках после нанесения плазмина на поверхность сгустка. Сгустки, в которых переваривание вызывалось добавлением тПА, выглядели точно так же.

А — контрольный сгусток до переваривания, В — ранняя стадия переваривания (0,2 Ед/мл плазмина, 30 минут), С — промежуточная стадия (0,2 Ед/мл плазмина, 1 час), D — поздняя стадия (0,2 Ед/мл плазмина, 3,5 часа).

крыты “фолликулами” различных размеров, которые представляли собой агрегированные обрезки волокон (рис. 1С). Фрагментация и удаление целых сегментов фибрина, а также связывание отдельных волокон в агрегаты ведет к формированию сети с большим размером пор по сравнению с контролем. Общий вид и последовательность изменений были такими же и при расщеплении сгустка смесью тПА и плазминогена.

Эти наблюдения согласуются с данными, полученными другими способами. Например, по ходу полимеризации фибрина и его одновременного расщепления в присутствии плазминогена и тПА мутность сначала возрастает и только затем, по мере растворения сгустка, уменьшается. Всплеск мутности иногда наблюдается и в самом начале процесса расщепления сгустка, что совпадает с преходящим появлением в этот момент очень толстых волокон. К аналогичному выводу приводят измерения жесткости сгустка во время фибринолиза с кратковременной фазой гиперригидности, предшествующей его растворению [13].

**Изучение продуктов, удаляемых при расщеплении.** Структуру растворимых продуктов переваривания фибрина изучали методом трансмиссионной электронной микроскопии с негативным контрастированием [28]. Фрагменты, отличающиеся по размеру и форме, были очень разнообразны, однако их набор был одинаковым после прямого переваривания плазмином или расщепления смесью плазминогена и тПА. Самым удивительным было наличие очень больших частиц, высвобождаемых из сгустка. Наиболее крупные продукты состоят, по-видимому, из множества разных фрагментов фибриновых пучков, образуя структуры размером несколько микрон и более (рис. 2А). Концы этих образований часто ровно обрублены, что указывает на перпендикулярный характер разреза по отношению к оси волокон (рис. 2С). В ранних переварах при низкой концентрации плазмينا фибриновые пучки иногда сохраняют свою общую форму. Можно даже различить отдельные волокна и поперечную исчерченность с периодом 22,5 нм (рис. 2В), хотя в большинстве случаев обычный для фибрина узор не определяется. После более продолжительного переваривания появляются рыхлые аморфные агрегаты, состоящие из более мелких частиц и образующие замысловатые

ажурные сети (рис. 2В). В этих агрегатах почти не обнаруживаются отдельные волокна, хотя размер агрегатов и их порозность свидетельствуют о том, что они состоят из нескольких слившихся недорасщепленных волокон или протофибрилл.

В индивидуальных волокнах, которые обнаруживались во всех образцах растворимого перевара, нередко удавалось различить детали их структуры [28]. Обычно эти волокна имели компактную латеральную упаковку в центре, но разветвлялись на тонкие волоконца по краям и на концах. При негативном контрастировании биологических структур распределение контраста обычно отражает картину плотности белка. Более темные области, соответствующие меньшей плотности белка, в некоторых участках этих волокон объясняются формированием брешей на месте белка, удаленного при расщеплении (рис. 2В). Есть и более яркие участки с высоким содержанием белка, представляющие собой, возможно, места связывания плазмина [33] (рис. 2В). Свободные концы пересеченных волокон выявлялись во всех образцах изучаемых сгустков, что свидетельствует о значительном преобладании перерезки волокон в поперечном направлении (рис. 2А, С). В большинстве образцов определялись также небольшие образования, которые можно идентифицировать как комплексы, образующиеся на поздних стадиях фибринолиза (рис. 2D). В них можно различить глобулярные элементы, соответствующие доменам фибрин(оген)а, что позволяет идентифицировать эти комплексы как DD/E, DY/YD и DXD/YD [31]. Эти небольшие фрагменты преобладают на самых поздних сроках переваривания.

**Наблюдение за физическим процессом растворения сгустка в реальном масштабе времени с помощью конфокальной световой микроскопии.** Лизис сгустка мы изучали методом лазерной сканирующей конфокальной микроскопии, преимущество которой состоит в отсутствии фиксации, высушивания или окрашивания сгустка. Процесс растворения гидратированного сгустка в таких условиях можно наблюдать в реальном масштабе времени, хотя разрешающая способность этого метода, конечно, уступает электронной микроскопии [18]. В световой микроскопии биологические объекты часто метятся флюоресцентным зон-

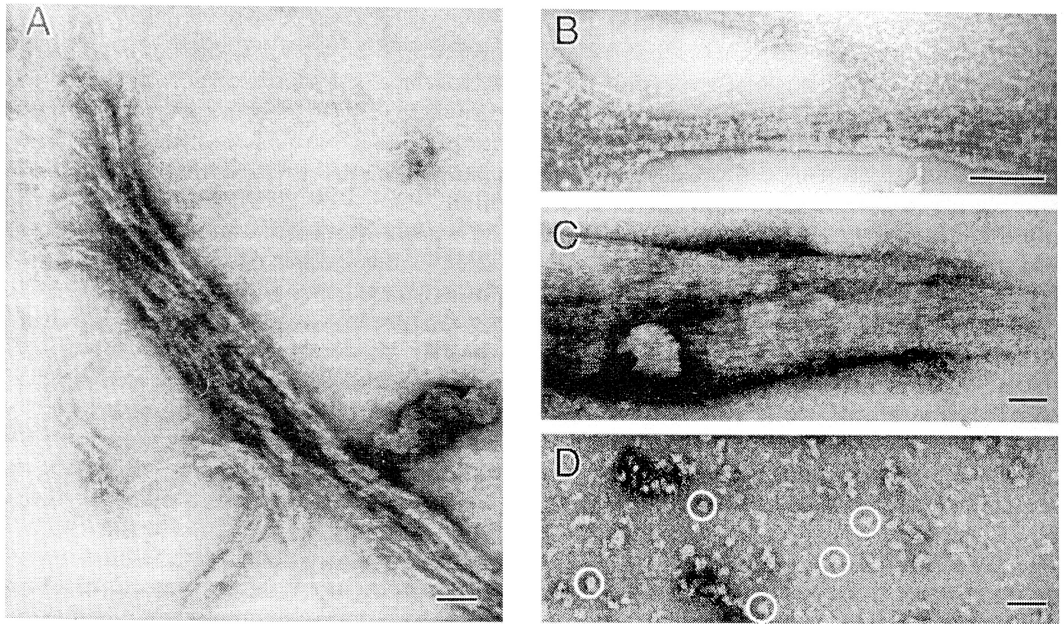


Рис. 2. Трансмиссионная электронная микроскопия с негативным контрастированием продуктов переваривания фибрина. А — пучки волокон с разветвленными концами, В — фибрин, окруженный ажурной сетью частично расщепленных протофибрилл, С — волокно с отчетливым обрезанным концом: справа виден зазубренный край обрезанного волокна, слева внизу — частично отсеченный кусок волокна, D — маленькие частицы на поздних стадиях переваривания. Кружками обведены примеры комплексов DD/E.

дом, который помогает адекватно контрастировать и визуализировать небольшие структуры, однако флюоресценция по мере сканирования постепенно гаснет, поэтому количественно оценить результаты достаточно трудно. По этой причине в наших опытах сгустки помечались коллоидным золотом и сканировались в режиме отражения [18]. Исследованию подвергались сгустки плазмы крови, так как, они, во-первых, ближе по составу и строению к сгусткам *in vivo* и, во-вторых, они состоят из более толстых волокон, которые лучше видны под световым микроскопом.

После добавления раствора тПА с одной стороны сгустка мы наблюдали движение фронта лизиса с периодическим сканированием образцов [18]. В этих опытах было отчетливо видно, что по мере удаления крупных кусков волокна разрезались поперек. Отщепленные сегменты волокон или исчезали, или вступали в процесс латеральной агрегации. Как и в опытах с электронной микроскопией, волокна не уменьшались в диаметре, а либо быстро исчезали, либо, наоборот, утолщались за счет того, что недорасщепленные сегменты волокон латерально агрегировали с другими волокнами. Тонкие фибриллы отсекались и затем быстро исчезали, тогда как

толстые волокна перед тем как лизироваться, обычно сначала подвергались частичному разрежению с формированием нарастающей щели между сохранившейся частью волокна и остальным сгустком.

Опыты проводились со сгустками различного строения и сформированными под действием разных концентраций тромбина. Строение этих сгустков характеризовалось количественно путем анализа изображений, полученных при конфокальной микроскопии [18]. Скорость продвижения лизирующего фронта была выше в сгустках, образованных толстыми волокнами, по сравнению с тонкими. Однако отдельно взятые тонкие волокна исчезали быстрее, чем толстые. Это противоречие может быть обусловлено несколькими обстоятельствами. В частности, большое значение имеет плотность волокон в сгустке. Так, нежный сгусток, образованный тонкими волокнами, содержит гораздо больше таких волокон, чем грубый сгусток, состоящий из толстых волокон. Именно поэтому суммарная скорость расщепления первого сгустка меньше, хотя одиночные тонкие волокна расщепляются быстрее толстых. Кроме того, наблюдение за движением фронта связывания меченого тПА показало, что скорость переме-



жения этого фронта в грубых сгустках также выше, чем в нежных. Таким образом, можно заключить, что скорость лизиса зависит от структуры фибрина и общей архитектоники фибриновой сети.

Представленные данные позволяют более детально рассмотреть физический процесс фибринолиза. Они показывают, что в ходе фибринолиза происходит крупномасштабное изменение трехмерной целостности и механической стабильности фибрина, совпадающее с высвобождением растворимых продуктов деградации. Мы располагаем результатами прямого наблюдения за фибринолитическими изменениями индивидуальных волокон. На этом уровне следствием локальной активности плазмина являются поперечная перерезка волокон и образование ряда больших растворимых продуктов. То обстоятельство, что местное действие плазмина осуществляется поперек волокна, представляется очень важным. По мере расщепления у волокон увеличивается число свободных концов, тогда как их диаметр меняется мало. Эти изменения увеличивают проницаемость сгустка для жидкости, что является исключительно важным для транспорта ферментов [14, 22]. Таким образом, поперечно-боковое расщепление плазмином отдельных волокон фибрина с образованием больших пор может приводить к прогрессивному ускорению фибринолиза за счет повышения проницаемости сгустка. Это облегчает доступ фермента к более глубоким слоям сгустка и способствует его расщеплению.

Обнаруженные нами наиболее крупные продукты переваривания, которые высвобождались до полного растворения сгустка, оказались крупнее и разнообразнее, чем можно было ожидать. Среди них были агрегаты нескольких фибриновых волокон, а также сегменты отдельных волокон. Самые большие растворимые производные, внутренняя структура которых почти отсутствует, по своему общему виду соответствовали большим агрегатам фибрина, наблюдаемым при сканирующей электронной микроскопии поверхности сгустка перед его растворением. Их четкие поперечно усеченные концы указывают на то, что они образовались вследствие бокового разреза. Отсутствие структурной упорядоченности указывает на то, что перед отщеплением они претерпели глубокую внутреннюю деградацию. Были обнару-

жены и более мелкие продукты расщепления, аналогичные описанным ранее [31]. Растворимые фрагменты, состоящие из обрывков целых волокон или их пучков, могут появиться в результате локального протеолитического пересечения волокна, а не вследствие равномерного действия плазмина, которое проявлялось бы прогрессивным уменьшением диаметра волокон.

Скорость фибринолиза существенно зависит от размера фибриновых волокон и строения сети. Скорость растворения сгустков, состоящих из толстых волокон, больше, чем из тонких, хотя индивидуальные толстые волокна разрушаются медленнее. В некоторых случаях неэффективный тромболит может быть связан с формированием медленно расщепляемых сгустков, образованных тонкими волокнами.

**Предположительные молекулярные механизмы. Почему сгустки, образованные толстыми волокнами, расщепляются быстрее, чем сгустки, состоящие из тонких волокон?** Представленные результаты позволяют предположительно объяснить это явление [18, 20, 1, 35]. Когда плазмин в определенных местах пересекает волокна, то фибрин, состоящий из толстых волокон, расщепляется быстрее, потому что число разрезаемых волокон в нем меньше. Кроме того, мы предполагаем, что прогрессирующая агрегация волокон в ходе плазминовой деградации может представлять собой дополнительный механизм усиления и ускорения фибринолитического процесса, так как расщепление происходит латерально. Наконец, скорость перемещения фронта связывания тПА в расщепляемом фибрине больше в грубых сгустках, образованных толстыми волокнами, чем в рыхлых сгустках из тонких волокон.

**Почему волокна разветвляются на концах по мере переваривания?** В процессе переваривания фибрина чаще всего наблюдаются волокна с компактным строением в середине и расслоением в виде веточек на концах. Разветвление и расслоение частично расщепленных волокон можно объяснить, исходя из наших представлений об образовании и строении фибрина. В процессе формирования сгустка фибриновые протофибриллы начинают агрегировать латерально только после достижения полимером определенной критической длины [3, 5, 33]. Когда этот процесс обращается вспять при плазминовой деградации, то

дезагрегация, или “разборка”, протофибрилл может произойти при условии, что их пересечение ведет к образованию фрагментов, которые по размеру меньше, чем критическая длина, необходимая для боковой агрегации. Вызываемая этим дезагрегация может зависеть от степени поперечного сшивания альфа-цепей, которое стабилизирует латеральную агрегацию [23].

**“Переползание” плазмина поперек фибрина.** Наблюдаемый ход расщепления согласуется с тем, что плазминоген связывается с фибрином в том месте, где две молекулы фибринмономера соединены конец-в-конец в составе протофибриллы [33], хотя сами участки связывания в молекуле пока точно не локализованы. Отсюда плазмин способен достигать точки расщепления на смежных протофибриллах, образуя дополнительные С-концевые остатки лизина для связывания плазмينا в процессе расщепления [27] (рис. 3А). Представленные результаты указывают на то, что далее молекулы плазмينا передвигаются латерально, то есть поперек волокна, расщепляя новые участки и образуя вырезанные сегменты.

Для обоснования этой концепции следует отметить, что одинаковые участки связывания плазминогена по длине протофибриллы расположены на расстоянии 22,5 нм друг от друга, тогда как точно такие же участки на соседней боковой протофибрилле удалены всего на 5–10 нм (рис. 3А). Движение плазмينا поперек фибрина может происходить в результате связывания второго крингла со следующим участком на другой протофибрилле, прежде чем высвобождается первый крингл (рис. 3В, D). Одна молекула плазмينا образует мостик между двумя соседними цепями фибрина. “Переползание” плазмينا поперек волокна согласуется с присутствием более чем одного связывающего крингла в каждой молекуле плазмينا [17], а также с возможностью изменения его конформации (рис. 3С) [8, 10].

Дополнительным свидетельством в пользу этого механизма служит наблюдение, согласно которому плазминоген может осаждать продукты деградации фибрина, образуя комплексы *плазминоген—продукты деградации фибрина* в соотношении 1:2 [2]. Кроме того, будучи добавленным к полимеризующемуся фибрину, плазминоген усиливает латеральную агрегацию протофибрилл, спо-

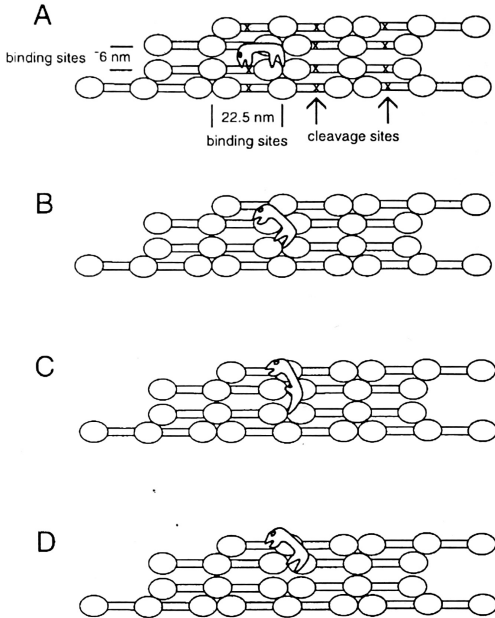


Рис. 3. Схема расщепления фибрина плазмином и его “переползание” поперек волокна. Трехузловые структуры представляют собой отдельные молекулы фибрина, которые связываются между собой со сдвигом на 1/2 длины и образуют двухцепевые протофибриллы. Показан фрагмент двух протофибрилл, агрегированных латерально. U-образные молекулы плазмينا показаны в виде существа с жующей головой (протеолитический домен) и конечностями (два фибринсвязывающих участка). Конформационные изменения плазмينا позволяют последовательно связываться с соседними участками фибрина по мере перемещения конечностей поперек волокна.

А — плазмин прикрепляется в месте соединения конец-в-конец двух молекул фибрина. При этом не важно, где именно расположены участки связывания плазмينا, так как упаковка молекул и симметрия фибрина обуславливают формирование одинаковых участков через каждые 22,5 нм по оси и гораздо ближе — поперек волокна. Стрелками показаны главные точки расщепления, расположенные посередине цепочки, соединяющей домены D и E. В — плазмин связан с фибрином одним кринглом — это стартовая позиция для латерального перемещения плазмينا. С — конформационное изменение позволяет плазмину связаться со вторым участком фибрина. D — изменение конформации возвращает молекулу в исходное состояние, так что она готова к расщеплению новых участков или к дальнейшему “переползанию”.

собствуя образованию сгустков с более толстыми волокнами [9]. Наконец, когда плазминоген ковалентно сшивался с фибрином, обнаруживались образцы, в которых молекула плазминогена была связана с концами трех или четырех цепей фибрина [33], которые, наверняка, принадлежат смежным протофибриллам.

Итак, предлагаемый нами “ползучий” механизм работает благодаря тому, что участки связывания плазмин(оген)а ближе между собой в поперечном направлении, чем вдоль волокна. “Переполизация” требует наличия двух или более фибринсвязывающих участков в молекуле плазмина и как минимум двух разных конформационных состояний плазмина. Протеолитическое действие плазмина само по себе ведет к появлению новых плазминсвязывающих центров на фибрине.

Большая часть этих исследований была обеспечена грантами Национальных Институтов Здравоохранения США. Я благодарен моим коллегам и сотрудникам, которые участвовали в этой работе: это Юрий Веклич (Yuri Veklich), Жан-Филипп Коллет (Jean-Philippe Collet), Чандрашекаран Нагасвами (Chandrasekaran Nagaswami) и Чарльз Франсис (Charles W. Francis).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Gabriel D.A., Muga K., Boothroyd E.M.// J. Biol. Chem. — 1992. — Vol. 267. — P. 24259—24263.
2. Garman A.J., Smith R.A.G. //Thromb. Res. — 1982. — Vol. 27. — P. 311—320.
3. Hantgan R., Fowle W., Erickson H., Hermans J.// Thromb Haemost. — 1980. — Vol. 44. — P. 119—124.
4. Hantgan R.R., Francis C.W., Marder V.J. In Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice 3-rd edit. (Colman R.W., Hirsh J., Marder V.J., Salzman E.W. eds.).— P. 277—300. — J.B.Lippincott, Philadelphia.
5. Hantgan R.R., Hermans J.// J. Biol. Chem. — 1979. — Vol. 254. — P. 11272—11281.
6. Kolev K., Tenekedjiev K., Komorowicz E., Machovich R.// J. Biol. Chem. — 1997. — Vol. 272. — P. 13666—13675.
7. Marder V.J., Francis C.W.// Ann. N.Y. Acad. Sci. — 1982. — Vol. 408. — P. 397—406.
8. Marshall J.M., Brown A.J., Ponting C.P.// Biochem. — 1994. — Vol. 33. — P. 3599—3606.
9. Petersen L.C., Suenson E.// Fibrinolysis. — 1991. — Vol. 5. — P. 51—59.
10. Ponting C.P., Marshall J.M., Cederholm-Williams S.A.// Blood Coagul. Fibrinolysis. — 1992. — Vol. 3. — P. 605—614.
11. Sakharov D.V., Nagelkerke J.F., Rijken D.C.// J. Biol. Chem. — 1996. — Vol. 271. — P. 2133—2138.
12. Sakharov D.V., Rijken D.C.// Circ. — 1995. — Vol. 92. — P. 1883—1890.
13. Shen L.L., McDonagh R.P., McDonagh J., Hermans J.// J. Biol. Chem. — 1977. — Vol. 252. — P. 6184—6189.
14. Blinc A., Planinsic G. et al.// Thromb. Haemost. — 1991. — Vol. 65. — P. 549—552.
15. Braaten J.V., Handt S. et al.// Blood. — 1993. — Vol. 81. — P. 1290—1299.
16. Carr M.E., Alving B.M.// Blood Coagul. Fibrinolysis. — 1995. — Vol. 6. — P. 567—573.
17. Christensen U., Molgaard L.// Biochem. J. — 1992. — Vol. 285. — P. 419—425.
18. Collet J.-P., Park D. et al.// Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. — 2000. — Vol. 20. — P. 1354—1361.
19. Collet J.-P., Woodhead J.L. et al.// Biophys. J. — 1996. — Vol. 70. — P. 500—510.
20. Collet J.-P., Soria J. et al.// Blood. — 1993. — Vol. 82. — P. 2462—2469.
21. Diamond S.J.//Annu. Rev. Biomed. Engr. — 1999. — Vol. 1. — P. 427—461.
22. Diamond S.L., Anand,S.// Biophys. J. — 1993. — Vol. 65. — P. 2622—2643.

23. Francis C.W., Marder V.J.// J. Semin. Thromb. Haemost. — 1982. — Vol. 8. — P. 25—35.
24. Francis C.W., Marder V.J.// J. Clin. Invest. — 1987. — Vol. 80. — P. 1459—1465.
25. Francis C.W., Marder V.J., Barlow G.H.//J. Clin. Invest. — 1980. — Vol. 66. — P. 1033—1043.
26. Spraggon G., Everse S.J., Doolittle R.F.//Nature. — 1997. — Vol. 389. — P. 455—462.
27. Suenson E., Lützen O., Thorsen S.// Eur. J. Biochem. — 1984. — Vol. 149. — P. 193—200.
28. Veklich Y., Francis C.W., White J., Weisel J.W.// Blood. — 1998. — Vol. 92. — P. 4721—4729.
29. Wada Y., Lord S.T.// Blood. — 1994. — Vol. 84. — P. 3709—3714.
30. Weisel J.W.// Biophys. J. — 1986. — Vol. 50. — P. 1079—1093.
31. Weisel J.W., Francis C.W., Nagaswami C., Marder V.J.// J. Biol. Chem. — 1993. — Vol. 268. — P. 26618—26624.
32. Weisel J.W., Nagaswami C.// Biophys. J.— 1992. — Vol. 63. — P. 111—128.
33. Weisel J.W., Nagaswami C. et al.// J. Mol. Biol. — 1994. — Vol. 235. — P. 1117—1135.
34. Weisel J.W., Veklich Y., Collet J.-P., Francis C.W.// Thromb. Haemost. — 1999. — Vol. 82. — P. 277—282.
35. Williams S., Fatah K., Ivert T., Blomäck M.// Blood Coagul. Fibrinolysis. — 1995. — Vol. 6. — P. 718—725.
36. Yee V.C., Pratt K.P. et al.// Structure. — 1997. — Vol. 5. — P. 125—138.

Поступила 02.09.00.

#### STRUCTURAL STUDIES OF FIBRINOLYSIS: HOW TO DISASSEMBLE THE CLOT

John W. Weisel

#### S u m m a r y

Fibrin is degraded by the fibrinolytic system with a plasminogen activator converts plasminogen to plasmin, a serine protease that cleaves specific bonds in fibrin leading to solubilization. To elucidate the biophysical processes involved in conversion of insoluble fibers to soluble fragments, fibrin was treated with either plasmin or the combination of plasminogen and its activator, and morphologic changes were observed using scanning electron microscopy. Initial changes in the fibrin matrix included creation of many free fiber ends and gaps in the continuity of fibers. With more extensive digestion, free fiber segments associated laterally, resulting in formation of thick fiber handles. Supernatants of digesting clots, containing soluble derivatives, were negatively contrasted and examined by transmission electron microscopy large complex fragments containing portions of multiple fibers were observed, as were pieces of individual fibers and smaller fragments. Some large fragments had sharply defined ends, indicating that they had been cleaved perpendicularly to the fiber direction. Other fibers showed splayed ends or a lacy meshwork of surrounding protofibrils. Fibrinolysis was also followed by confocal microscopy of plasma clots labeled with colloidal gold, so that changes at the lysis front of hydrated clots could be examined in real time. Clots made up of thin fibers were cleaved more slowly than clots made up of thick fibers, even though individual thin fibers were cleaved more rapidly. These results indicate that fibrinolytic degradation results in larger pieces than previously identified, and that plasmin digestion proceeds locally by transverse cutting across fibers rather than by progressive cleavage uniformly around the fiber. A model is proposed for the crawling of plasmin across fibrin fibers.