

## Экспериментальное исследование пространственной динамики фибринолиза *in-vitro* в присутствии урокиназы и стрептокиназы

А. С. Жалялов\*

Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова,  
физический факультет, кафедра медицинской физики. Россия,  
119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 2.

М. А. Пантелеев†

Гематологический научный центр. 125167, Москва, Новый Зыковский проезд, д.4а.

(Статья поступила 07.05.2012; Подписана в печать 26.12.2012)

Проведено экспериментальное исследование пространственной динамики лизиса фибринового сгустка *in vitro*. Исследовано влияние активаторов плазминогена (стрептокиназа и урокиназа) на рост и лизис фибринового сгустка в реакционно-диффузной системе. Обнаружено, что при добавлении активаторов плазминогена в терапевтических концентрациях волна фибринолиза стартует от активатора свертывания и запускается как система фибринолиза, так и система свертывания.

PACS: 87.14.ej.

УДК:577.3.

Ключевые слова: фибринолиз, свертывание крови, пространственная динамика, урокиназа, стрептокиназа

### ВВЕДЕНИЕ

Среды, в которых источники энергии существуют в каждой точке пространства, демонстрируют удивительное разнообразие типов динамического поведения и самоорганизации. В наибольшей степени это относится к биологическим системам, которые по своей сути всегда далеки от равновесия, и источники энергии в которых, как правило, распределены по всей среде. Изучение явлений в таких средах, часто называемых активными, важно для многих областей естествознания. Известно, что при изучении процессов свертывания и фибринолиза, кровь может рассматриваться как активная среда [1–3]. Система фибринолиза представляет собой сложный набор биохимических реакций, разделенных в пространстве, результатом работы которых является разрушение фибринового тромба. Основным белком системы фибринолиза — плазминоген, сериновая протеиназа, циркулирующая в крови неактивной форме. Плазминоген активируется в результате взаимодействия со специальными ферментами — урокиназой и тканевым активатором плазминогена [4]. Эти молекулы также синтезируются в организме как проферменты. Существуют и «внешние» активаторы плазминогена, например, стрептокиназа, синтезируемая  $\beta$ -гемолитическим стрептококком, которая применяется в тромболитической терапии [5]. Активной формой плазминогена является плазмин, который способен садится на волокна фибрина и про-

изводит гидролиз нитей, тем самым разрушая сгусток. При отсутствии фибрина, плазмин быстро ингибируется специальными белками-ингибиторами —  $\alpha 2$ -антиплазмином, макроглобулином и другими веществами.

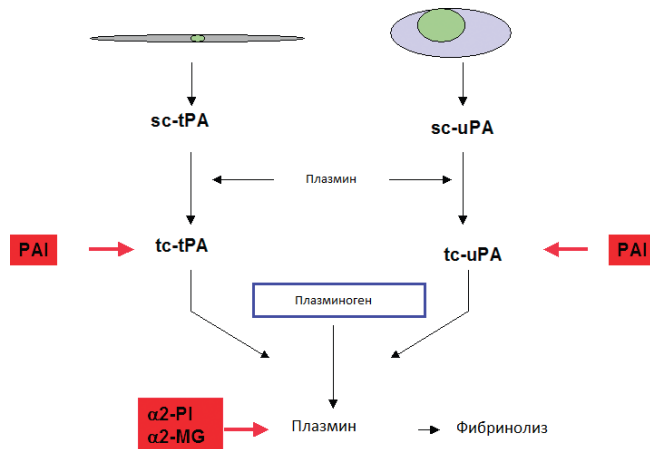


Рис. 1: Упрощенная схема фибринолиза [4]. Красным цветом представлены ингибиторы. PAI — ингибитор активаторов плазминогена, PI — антиплазмин, MG — макроглобулин, tPA — тканевый активатор плазминогена, uPA — урокиназный активатор плазминогена

Данная работа посвящена экспериментальному исследованию пространственной динамики лизиса фибринового сгустка *in vitro*. Результаты работы позволят в дальнейшем создать экспериментальный базис для теоретической модели фибринолиза, что поможет разобраться в механизмах регуляции данной системы.

\*E-mail: aansaril3g@gmail.com.

†E-mail: bmapanteleev@yandex.ru

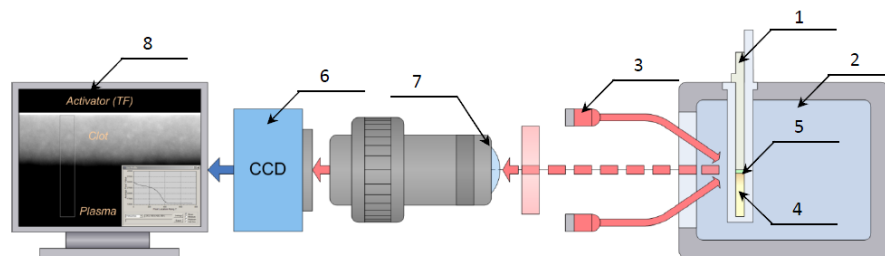


Рис. 2: Схема установки: Установка состоит из исследовательской кюветы (1), которая помещается в воду, находящуюся в прозрачном термостатируемом отсеке при 37 °С (2), и освещается сбоку светодиодами красного цвета свечения (3). Изображение области контакта плазмы (4) с активатором (5) фокусируется на ПЗС матрице фотокамеры (6) с помощью фотообъектива (7). Оцифрованное ПЗС камерой изображение передается в компьютер (8)

## 1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Урокиназа.** Урокиназа является сериновой протеиназой, которая способна активировать плазминоген, в норме циркулирует в крови в концентрации 70 нМ [6]. В экспериментах использовалась высокомолекулярная урокиназа (HMW-uPA, производитель american diagnostica),  $M = 52$  кДа. Белок находился в буфере 50 mM TRIS-HCl, 100 mM NaCl, 0.1 % PEG, 200 mM Mannitol, pH 7.4.

**Стрептокиназа.** Белок, выделяемый  $\beta$ -гемолитическим стрептококком, способный образовывать с плазминогеном автокаталитический комплекс [7]. В экспериментах использовался лиофилизированный порошок стрептокиназы для приготовления раствора инъекций (производитель Белмедпрепараты). 750 тыс. МЕ препарата растворялось в 400 мкл раствора Рингера.

**Подготовка плазмы.** Человеческая кровь здоровых доноров была предоставлена Гематологическим научным центром РАМН. В кровь был добавлен 3.8 % цитрат натрия (pH 5.5) в объемном отношении кровь/антикоагулянт 9:1, а также добавлен трипсиновый ингибитор контактной активации в конечной концентрации 0.4 г/литр для ингибирования контактного пути активации свертывания. После предварительного отделения эритроцитов центрифугированием в течение 15 минут при 1600 g, плазму центрифугируют 5 минут при 10000 g для удаления тромбоцитов. Полученная таким образом свободная от тромбоцитов плазма содержит 15 – 70 мкМ ионов свободного кальция, а концентрация тромбоцитов в ней не превышает  $10^9$  клеток/литр.

**Исследование пространственной динамики лизиса.** Эксперименты проводились на системе по видеомикроскопии [8, 9], схема которой представлена на рис. 2. Подготовленная плазма инкубируется 10 мин при 37 °С для предотвращения холодной активации свертывания. Затем производится рекальцифицикация плазмы и добавляется тромболитический препарат. Конечная концентрация стрептокиназы достигала 20, 200, 400, 2 000 и 40 000 МЕ/мл, а концентрация

урокиназы 60 и 600 МЕ/мл, а также проводились контрольные эксперименты, без добавления тромболитических препаратов. Полученный раствор заливается в кювету, в которую вставляется активатор свертывания, с иммобилизованным тканевым фактором. Кювета с растущим сгустком освещается красным светом ( $\lambda = 660$  нм) и в течение 90 мин регистрируется изменение интенсивности светорассеяния сгустка. При образовании сгустка плазма крови переходит из жидкого в гелеобразное состояние, и вследствие этого процесса происходит изменение интенсивности светорассеяния плазмы.

## 2. РЕЗУЛЬТАТЫ

**Иницированный урокиназой лизис фибринового сгустка.** На рис. 3Б показан лизис фибринового сгустка, индуцированный урокиназой. Концентрация урокиназы в растворе составляет 60 МЕ/мл. Рост фибрина начинается на активаторе. Изначально, лизиса не происходит. Лизис начинает фиксироваться к 30-й минуте. Сгусток начинает разрушаться изнутри. Затем происходит спонтанная активация свертывания по всему объему плазмы. Скорость распространения волны коагуляции в течение первых 10 минут составляет 65 мкм/мин, а в контрольном случае (рис. 3А; рис. 4) 50 мкм/мин. На рис. 3В и рис. 5 представлены результаты аналогичного эксперимента лизиса фибринового сгустка при концентрации урокиназы 600 МЕ/мл. В данном случае волна лизиса начинает бежать от активатора вслед за волной коагуляции уже с первых минут. На 20-х минутах фиксируется спонтанная активация свертывания по всему объему плазмы, после чего происходит лизис всего фибрина, и к концу первого часа фибрина в кювете почти не остается.

**Иницированный стрептокиназой лизис фибринового сгустка.** На рис. 4А показан лизис фибринового сгустка, индуцированный стрептокиназой. Концентрация стрептокиназы в растворе составляет 20 МЕ/мл. Рост фибрина начинается на активаторе.

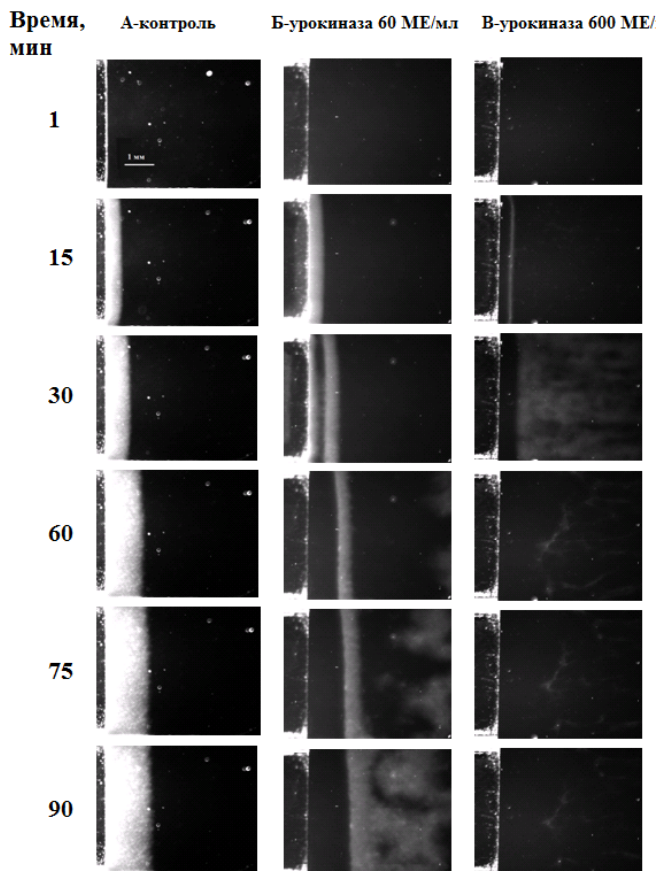


Рис. 3: Лизис фибрина индуцированный урокиназой с концентрацией 60 МЕ/мл (Б) и 600 МЕ/мл (В), а так же контрольный эксперимент без добавления тромболитических препаратов (А). Рост фибрина (светлая область) во всех экспериментах стартует от активатора (слева). Темная область характеризует отсутствие фибрина, вызванное одной из двух причин — фибрин там еще не образовался, или фибрин образовался и был разрушен системой фибринолиза. Полоса масштаба: 1 мм

Ситуация аналогична той, что происходит в опыте с урокиназой при концентрации 600 МЕ/мл. Волна лизиса так же начинает бежать от активатора вслед за волной коагуляции уже с первых минут (рис. 5). В данном случае спонтанная активация свертывания происходит ближе к 60-й минуте. К 75-й минуте сгусток сильно разрушен. Интересно, что при концентрации стрептокиназы равной 200 МЕ/мл фибриновый сгусток остается стабильным на протяжении всего времени эксперимента (рис. 4Б). Возможно, в данном случае, при активации системы коагуляции, образуется достаточное количество фактора XIIIa, который имеет способность связывать  $\alpha$ 2-антиплазмин с  $\alpha$ -цепями фибрина, что предотвращает фибринолиз данных цепей [10, 11]. В данном случае, в течение нескольких минут волна лизиса движется в направлении от активатора и затем останавливается.

При концентрациях стрептокиназы 2000 МЕ/мл и выше (рис. 4В), волна фибринолиза стартует не от активатора, а на расстоянии 500 – 600 мкм от него (как и в случае с урокиназой рис. 3Б). Вероятно, это вызвано тем, что сгусток около активатора более плотный [12], чем вдали от него.

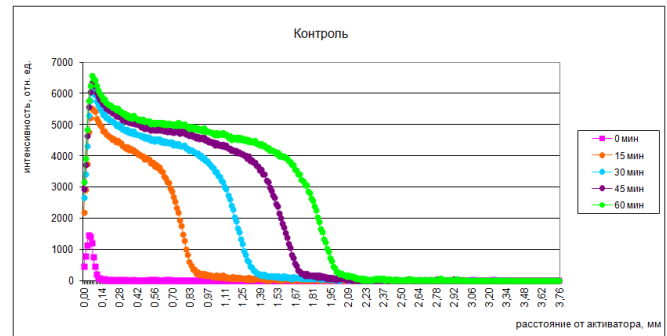


Рис. 4: Рост фибринового сгустка в контрольном эксперименте (без тромболитических препаратов). Интенсивность характеризует наличие фибрина в локальной области

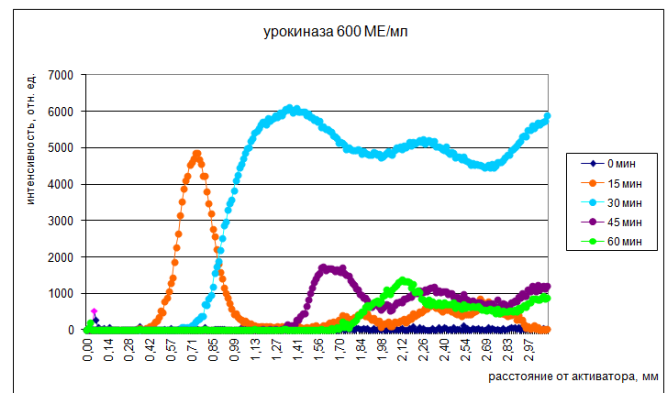


Рис. 5: Рост и лизис фибринового сгустка в при наличии в плазме урокиназы в концентрации 600 МЕ/мл. Интенсивность характеризует наличие фибрина в локальной области

### 3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты данных экспериментов показывают, что терапевтические концентрации стрептокиназы и урокиназы вызывают в плазме значительную активацию системы коагуляции. Во всех экспериментах с добавлением тромболитических препаратов происходит спонтанная активация свертывания в объеме. В экспериментах с урокиназой видна дозозависимость времени активации всего объема плазмы (80 мин при концентрации урокиназы 60 МЕ/мл и 30 мин при концентрации 600 МЕ/мл). Не ясен биохимический механизм активации системы коагуляции ферментами системы фибринолиза, хотя белки обеих систем во мно-

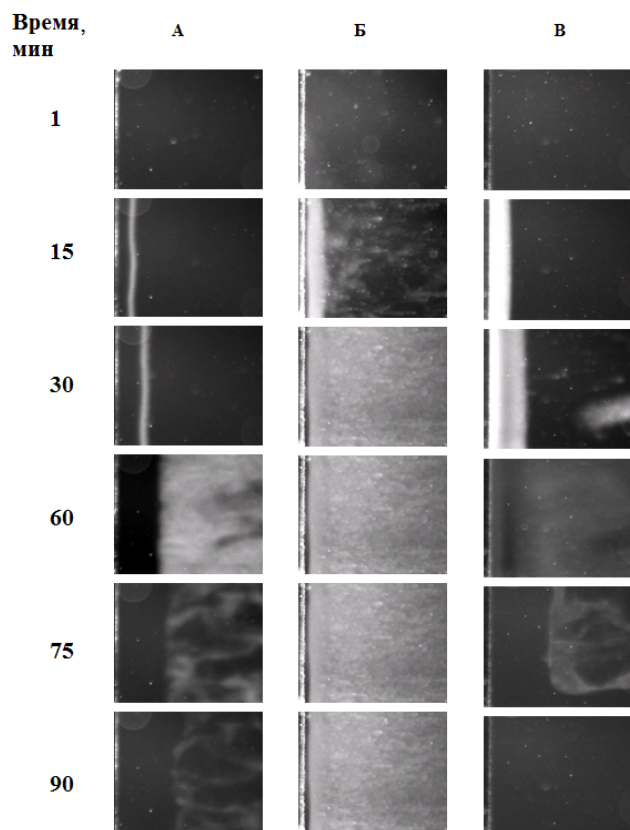


Рис. 6: Лизис фибрина индуцированный стрептокиназой с концентрацией 20 МЕ/мл (А), 400 МЕ/мл (Б), 2000 МЕ/мл (В). Рост фибрина (светлая область) во всех экспериментах стартует от активатора (слева). Темная область характеризует отсутствие фибрина, вызванное одной из двух причин — фибрин там еще не образовался, или фибрин образовался и был разрушен системой фибринолиза

гом схожи, большинство из них относятся к группе сериновых протеиназ. Так же интересен тот факт, что волна фибринолиза стартует от активатора свертывания, хотя у активатора фибриновый сгусток наиболее плотный, что согласуется с результатами исследований [12]. Более плотная структура сгустка у активатора вызвана, по всей видимости, более высокой концентрацией тромбина в данной области. В поставленной экспериментальной модели проявляются типичные режимы активной среды (автоволны и волны переключения), которой является плазма крови. Авто-

волновой режим, проявляется пространственно локализованными импульсами распространения тромбина (активирует образование фибриновой сети) и плазмينا (разрушает фибриновую сеть) с постоянной скоростью без изменения своей формы. Под волнами переключения подразумеваются волны, которые распространяясь с постоянной скоростью без изменения своей формы, переключают среду из одного пространственного однородного устойчивого положения в другое. Волны переключения, которые в конце концов переводят среду из начального (тривиального) пространственно однородного устойчивого состояние в другое (нетривиальное), также пространственно однородное и устойчивое, называемые волнами включения, проявляются в виде волн распространения тромбина. Тривиальным состоянием в данной постановке является жидкая фаза плазмы, нетривиальным — гелеобразное состояние. Волны, которые возвращают среду в начальное положение, называемые волнами выключения, проявляются в виде волн распространения плазмина, который производит гидролиз фибриновых нитей. Эксперименты со стрептокиназой показали, что при различных концентрациях тромболитического препарата, система может приходить к разным конечным состояниям (рис. 4) — при концентрации стрептокиназы 400 МЕ/мл (рис. 4Б), плазма остается свернувшейся, т. е. волна выключения в данном случае не зафиксирована. В других же случаях (рис. 4А,В), волна выключения разрушила сгусток, и плазма осталась в жидком состоянии.

### ВЫВОДЫ

В настоящее время наблюдается стремительный прогресс в понимании молекулярных механизмов работы ферментативных систем крови, пространственное распределение компонент в которой играет существенную роль. В работе была рассмотрена пространственная динамика работы системы фибринолиза в реакционно-диффузионной системе и был выявлен ряд эффектов, таких как активация тромболитическими препаратами системы свертывания, а так же динамика распространения волн фибринолиза в зависимости от начальных условий. Данные эффекты необходимо учитывать в тромболитической терапии, применении антикоагулянтов совместно с тромболитическими препаратами, а так же при дозировке данных препаратов.

[1] *Ataullakhanov F. I., Guriya G. T.* Biophysics. **39**. P. 91. (1994).  
 [2] *Ataullakhanov F. I., Lobanova E. S., Morozova O. L.* УФН. **177**, № 1. С. 1. (2007).  
 [3] *Zarnitsina V. I., Pokhilko A. V., Ataullakhanov F. I.* Thrombosys Res. **24**. P. 225. (1996).

[4] *Cesarman-Maus G., Hajjar K. A.* Br. J. Haematol. **129**. P. 307. (2005).  
 [5] *Tillett W. S., Garner R. L.* J. Exp. Med. **68**. P. 485. (1933).  
 [6] *Boose J. A., Kuismann E., Gerard R., Sambrook J., Gething M. J.* Biochemistry. **28**. P. 635. (1989).



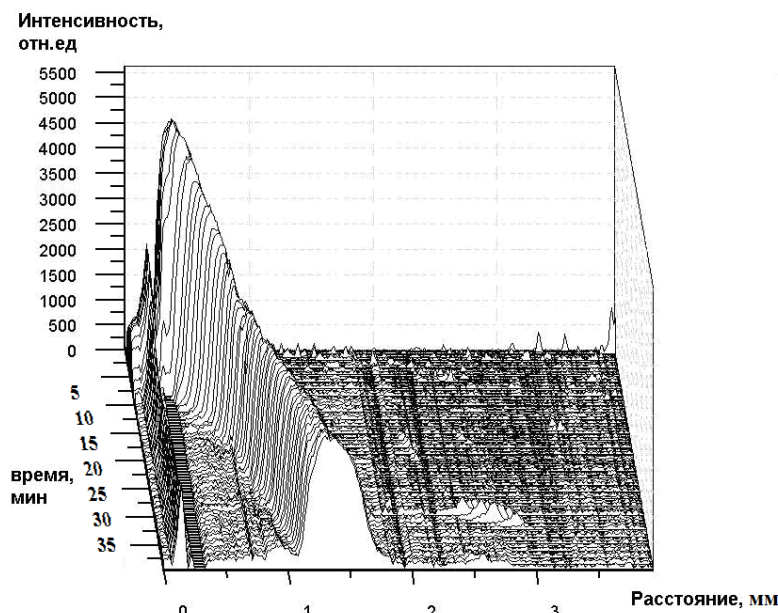


Рис. 7: Распространение волны коагуляции и фибринолиза при активации системы стрептокиназой с концентрацией 20 МЕ/мл

- |   |  |
|---|--|
| [7] Takada A, Takada Y, Sugawara Y. <i>Thromb Res.</i> <b>37</b> . P. 465. (1985).  | [10] Schwartz M. L., Pizzo S. V., Hill R. L., et al. <i>J. Biol. Chem.</i> <b>248</b> . P. 1395. (1973). |
| [8] Panteleev M. A., Balandina A. N., Lipets E. N., Ovanesov M. V., Ataullakhanov F. I. <i>Biophys. J.</i> <b>98</b> . P. 1751. (2010). | [11] Kimura S., Aoki N. <i>J. Biol. Chem.</i> <b>261</b> . P. 15591. (1986).                             |
| [9] Parunov L. A., Fadeeva O. A., Balandina A. N., et al. <i>J. Thromb. Haemost.</i> P. 1538. (2011).                                   | [12] Wolberg A. S., Campbell R. A. <i>Transfus. Apher. Sci.</i> <b>38</b> . P. 15. (2008).               |

## Experimental investigation spatial dynamics of fibrinolysis in-vitro in the presence of urokinase and streptokinase

A. S. Zhalyalov<sup>1a</sup>, M. A. Panteleev<sup>2b</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical Physics, Faculty of Physics, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow 119991, Russia.

<sup>2</sup>National Research Center for Hematology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia.

E-mail: <sup>a</sup>aansaril3g@gmail.com, <sup>b</sup>bmapanteleev@yandex.ru.

Was experimentally investigation spatial dynamics of fibrin clot lysis in vitro. The effect of plasminogen activators (streptokinase and urokinase) on growth and lysis of fibrin clot in a reaction-diffusive system. Discovered the phenomena that the addition of plasminogen activators in therapeutic concentrations in addition fibrinolysis system actuates coagulation system, and wave of fibrinolysis starts from place of coagulation activation.

PACS:87.14.ej.

**Keywords:** fibrinolysis, blood coagulation, spatial dynamics, urokinase, streptokinase.

Received 7 May 2012.

### Сведения об авторах

1. Жалялов Ансар Сайярович — студент кафедры медицинской физики, физический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова, 5-й курс; тел.: (495) 706-18-38. e-mail: ansaril3g@gmail.com.
2. Пантелеев Михаил Александрович — докт. физ.-мат. наук, канд. биол. наук, профессор МГУ им. М. В. Ломоносова, заведующий лабораторией молекулярных механизмов гемостаза центра теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН; тел.: (495) 612-35-22. e-mail: mapanteleev@yandex.ru.