

Е. А. ЧЕРНЯВСКИЙ, В. М. ШКУМАТОВ

ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАЗВУКА НА СЕРИНОВЫЕ ПРОТЕАЗЫ, БЕЛКИ ФИБРИНОЛИТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ И ПРОЦЕССЫ ИХ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ

НИИ физико-химических проблем Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь

Одним из перспективных подходов к лечению тромботических заболеваний является применение внутрисосудистого ультразвука (УЗ). Вместе с тем, прямое акусто-химическое воздействие на белки крови, при использовании УЗ в тромболитической терапии, может стать причиной развития предтромботического состояния. Несмотря на широкое применение, до настоящего времени выбор оптимальных параметров УЗ носит эмпирический характер.

В настоящей работе с целью оптимизации режимов акусто-ферментативного лизиса тромбов было изучено влияние УЗ обработки на структурно-функциональную организацию сериновых протеаз и их неактивных предшественников, а также на фибриноген, фибрин и процессы их протеолитической модификации плазмином.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В работе использовали трипсиноген, трипсин, химотрипсиноген и химотрипсин, выделенные из поджелудочной железы, а также фибриноген (ФГ) и плазминоген (ПГ) из крови крупного рогатого скота; препарат урокиназы – Alphakinase-250.000 (Alpha Therapeutic, США), рекомбинантный

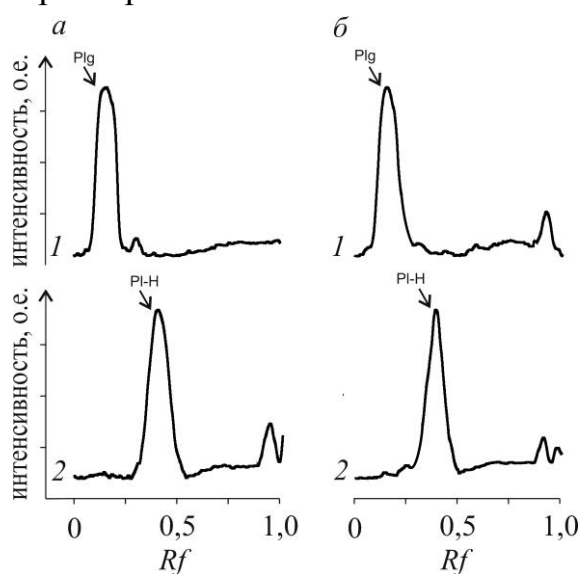


Рис. 1. Денситограммы SDS геле-электрофореза восстановленных контрольного (а) и УЗ-обработанного в течение 30 мин (б) образцов плазминогена:

1 – плазминоген, 2 – продукты активации урокиназой. Plg – плазминоген, Pl-H – «тяжелая» цепь плазмина. УЗ: 25,1 кГц, 48,4 Вт/см², 50 % скважность

Alphakinase-250.000 (Alpha Therapeutic, США), рекомбинантный

тканевый активатор плазминогена (т-АП) – «Aktylise» (Boehringer Ingelheim, США); PPSB-концентрат для заместительной терапии гемофилии В, содержащий смесь факторов свертывания крови IX, II, VII и X с общими активностями 640, 580, 600 МЕ соответственно («Intersero», Германия). Применялась ультразвуковая система «Пульсар», разработанная в Белорусском национальном техническом университете (г. Минск). Выходная мощность генератора 80 Вт. Генератор обеспечивает импульсный режим работы с регулируемой скважностью. Были использованы волноводы длиной 245 мм, диаметром 0,6 мм. Резонансная частота подбиралась для каждого волновода и находилась в диапазоне 25 – 27,5 кГц. Интенсивность регулировалась ступенчато в диапазоне 0 – 55 Вт/см². В качестве методов анализа были использованы: высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) (хроматограф фирмы «Shimadzu» (Япония) со спектрофотометрическим детектором на диодной матрице SPD-M10Avp); гель-электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS гель-электрофорез); адсорбционная спектроскопия в УФ-области спектра (спектрофотометр Shimadzu UV-1202 (Япония));

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние УЗ на сериновые протеазы и их предшественники. Нами исследовано влияние низкочастотного импульсного (27,4 кГц, 51,2 Вт/см², 50% скважность) УЗ на ряд предшественников сериновых протеаз: трипсиноген, химотрипсиноген, плазминоген, протромбин, одноцепочечные формы тканевого активатора плазминогена (т-АП) и урокиназы, их активные формы, смесь витамин К-зависимых факторов свертывания крови (PPSB-комплекс). Установлено, что УЗ-обработка в течение 30 мин не приводила к разрыву пептидных связей, образованию межмолекулярных или межцепочечных ковалентных сшивок в исследованных белках. Не наблюдалось экспонирования новых, чувствительных к действию различных протеаз, пептидных связей в молекулах проферментов. На рис. 1 представлены денситограммы SDS гель-электрофореза восстановленных образцов исходного (рис. 1, а, денситограмма 1) и УЗ-обработанного (рис. 1, б, денситограмма 1) плазминогена. Видно, что оба образца характеризовались наличием одной полипептидной цепи, соответствующей Glu-плазминогену.

В случае химотрипсиногена, химотрипсина, трипсиногена и трипсина методами УФ-спектроскопии первой и второй производных, гель-проникающей (рис. 2, а) и обратно-фазовой (рис. 2, б) хроматографии установлено, что в процессе УЗ-обработки часть молекул

исходных белков подвергалась денатурации с последующей протеолитической деградацией.

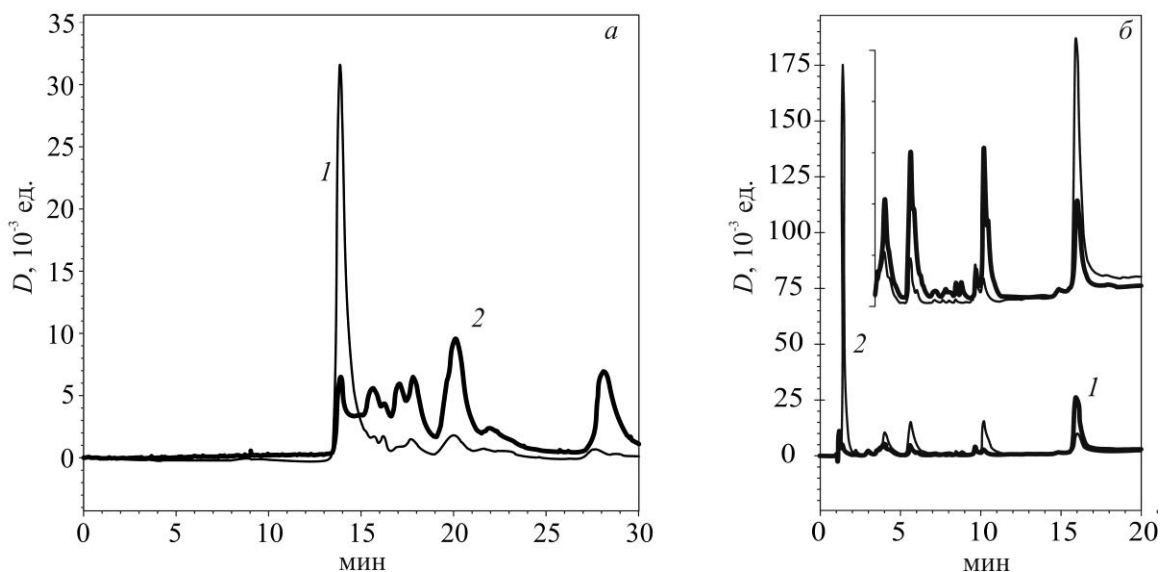


Рис. 2. Анализ образцов термостатированного при 37 °С в течение 15 мин (1) и обработанного УЗ в течение 15 мин (2) химотрипсина методом ВЭЖХ:

а – Гель-проникающая хроматография. Колонка «Zorbax GF-250» (250 x 4,6 мм) («Agilent», США), элюент 0,08М NaФБ (рН 7,4), содержащий 0,5 М КСl. Скорость протока – 0,2 см³/мин;
б – Обратнo-фазовая хроматография. Колонка «NUCLEOSIL 500-5 C18 PPN» (125 x 4 мм) («Macherey – Nagel», Германия). Элюент А – 0,1 % ТФУ в воде и элюент Б – 0,08 % раствор ТФУ в ацетонитриле. Градиент от 10 % Б до 100 % Б в течение 25 мин. Скорость протока – 1 см³/мин.

На рис. 2 представлены результаты анализа исходных и УЗ-обработанных образцов химотрипсина. Из рисунка видно, что УЗ-обработка приводила к уменьшению количества нативного белка и накоплению продуктов с низкой молекулярной массой. При этом профили элюирования исходных (рис. 2, *а*, кривая 1) и УЗ-обработанных образцов схожи и отличались только относительными площадями пиков. Это могло свидетельствовать об образовании в процессе УЗ-обработки полипептидов, идентичных продуктам автолиза данных белков. Для проверки этого предположения был проведен анализ образцов методом обратно-фазовой хроматографии (рис. 2, *б*). Как и в случае гель-проникающей хроматографии, при анализе образцов химотрипсина методом обратно-фазовой хроматографии наблюдалось существенное уменьшение пика, соответствующего исходному белку и идентичность профилей элюирования обработанных и контрольных образцов (рис. 2, *б*).

Следует отметить, что в случае УЗ-обработки химотрипсиногена происходило накопление продуктов с временами удерживания, идентичными продуктам, образующимся при УЗ-обработке химотрипсина и присутствующим в качестве примесей в исходных

препаратах белка. Аналогичные результаты были получены для пары трипсиноген/трипсин.

Полученные результаты позволили сделать вывод, что УЗ вызывал денатурацию части белков, после чего они подвергались быстрой протеолитической деградации следовыми количествами ферментов в случае проферментов, и автолизу, в случае активных протеаз. Данный механизм был подтвержден отсутствием низкомолекулярных продуктов при УЗ-обработке данных белков в присутствии ингибитора сериновых протеиназ (PMSF). Об УЗ-денатурации белков свидетельствовало изменение спектров флуоресценции комплексов белков с зондами на основе производных индолкарбазолов [1], а также повышение интенсивности в спектрах УФ-поглощения и ярко выраженный коротковолновый сдвиг первой и второй производных спектров поглощения (рис. 3). При этом, более четко выраженные эффекты характерны для химотрипсина, а не его неактивного предшественника – химотрипсиногена, что хорошо согласуется с данными анализа методами гель-проникающей и обратно-фазовой хроматографии. При изучении эквимольной смеси химотрипсиногена и трипсиногена показано, что в условиях автоактивации проферментов в УЗ-поле наблюдалось уменьшение скорости образования активных форм трипсина и химотрипсина, в основном за счет деградации трипсина [2]. Отсутствие значительных нарушений структуры белков (модификация боковых радикалов аминокислот, ковалентная или нековалентная агрегация) и дополнительное накопление «тяжелых» и «легких» цепей в УЗ-поле было показано и в случае смеси факторов свертывания крови IX, II, VII и X (PPSB-концентрат) [3].

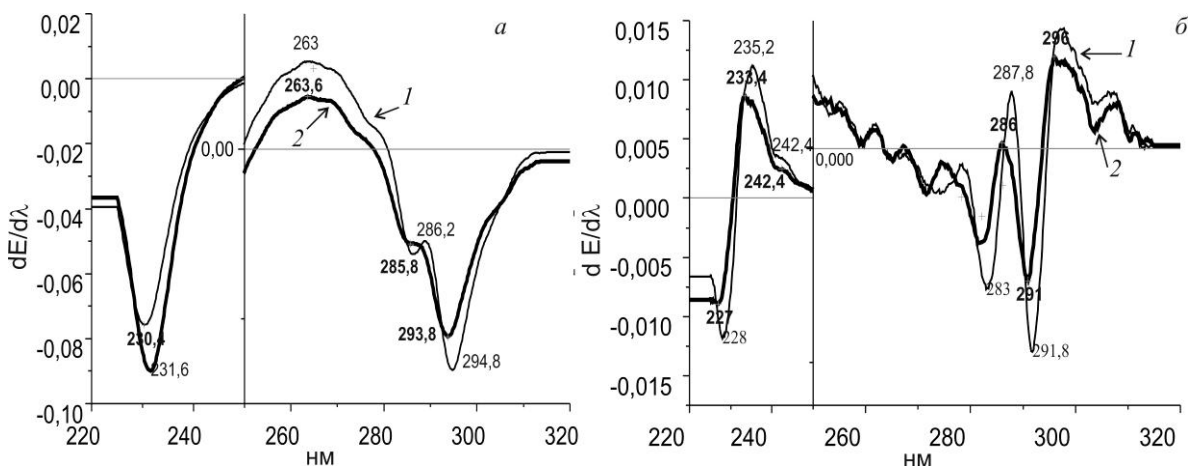


Рис. 3. Первая (а) и вторая производная (б) спектра поглощения термостатированного при 37 °С (1) и УЗ-обработанного в течение 15 мин (2) раствора химотрипсиногена в 0,05М Трис-НCl, 0,15М NaCl буфере с рН 7,4

Предварительная УЗ-обработка плазминогена приводила к уменьшению удельной активности продукта его активации. При этом продукт активации, характеризовался наличием полипептидных цепей, идентичных плазмину. Аналогичные изменения были установлены для свободнорадикального окисления плазминогена и плазмина гидроксильными радикалами, генерируемыми в системе Cu(III)/аскорбат. При этом авторами было сделано предположение относительно окисления остатка гистидина активного центра фермента [4]. В случае УЗ также возможно окисление боковых радикалов аминокислот (в частности, гистидина активного центра плазмина) гидроксильными радикалами, генерируемыми в поле УЗ-кавитации. Действие УЗ на плазмин сопровождалось снижением амидолитической активности (гидролиз синтетического субстрата S-2251), а также протеолитической активности плазмина по отношению к казеинату натрия, фибриногену и фибрину. В свою очередь, УЗ обработка рекомбинантного тканевого активатора плазминогена (т-АП) приводила к уменьшению скорости гидролиза фибриногена смесью плазминогена с т-АП, причем в большей степени, чем в случае предварительной УЗ-обработки плазминогена и урокиназы. Большая чувствительность т-АП к УЗ-воздействию объясняется уникальной структурой данного белка. По сравнению с другими проферментами, одноцепочечный т-АП обладает собственной каталитической активностью за счет взаимодействий, стабилизирующих активную конформацию одноцепочечного фермента [5].

Влияние УЗ на фибриноген. Методом SDS-гель электрофореза установлено, что УЗ не вызывал разрыва полипептидных и межцепочечных дисульфидных связей, а также образования ковалентных сшивок. Как для УЗ-обработанного, так и контрольного образцов фибриногена было характерно идентичное распределение полипептидных полос на электрофореграммах продуктов ограниченного протеолиза плазмином. Полученные результаты свидетельствовали о том, что УЗ не индуцировал конформационных изменений, приводящих к экспонированию новых участков гидролиза плазмином.

Анализ кинетических кривых образования фибрина показал, что УЗ приводил к уменьшению начальной скорости образования и максимальной концентрации фибрина при увеличении времени обработки (рис. 4). Ранее было показано, что γ -облучение и свободнорадикальное окисление реактивом Фентона приводило к потере свертывающей активности и увеличению чувствительности к протеолитической деградации в результате образования агрегатов фибриногена [6]. Гель-проникающая хроматография фибриногена до и

после УЗ-обработки, показала увеличение молекулярной массы белка от 340 кДа, соответствующей протомерной форме белка, до агрегатов с $M_r \geq 1000$ кДа.

Таким образом установлено, что УЗ-обработка фибриногена приводила к образованию агрегатов, характеризующихся потерей тромбин-индуцируемой свертываемости. Скорость гидролиза агрегатов комплексами [плазминоген – урокиназа] или [плазминоген-т-АП] была выше по сравнению с нативным фибриногеном. Предполагается, что агрегация, по аналогии с образованием фибрина, сопровождалась конформационными изменениями, приводящими к экспонированию плазминоген-связывающих участков в молекуле фибриногена.

Влияние УЗ на протеолитическую деградацию фибриногена. Следующий этап работы заключался в исследовании эффектов низкочастотного УЗ, на фибринолиз в системе фибрин(оген)-плазминоген-активатор плазминогена. В качестве активаторов плазминогена были использованы стрептокиназа (СК), урокиназа (УК) и тканевый активатор плазминогена (т-АП).

При совместной УЗ-обработке фибриногена с плазминогеном, фибриногена с т-АП и смеси фибриногена, плазминогена и т-АП, как и в случае предварительной обработки фибриногена, происходило увеличение скорости фибринолиза. Статистический анализ показал отсутствие различий в кинетических кривых фибринолиза во всех трех случаях. Полученные результаты свидетельствовали о стабилизирующем действии фибриногена на инактивацию т-АП в поле УЗ-кавитации. В свою очередь, при использовании в качестве активатора урокиназы или стрептокиназы УЗ практически не влиял на скорость плазминолиза. Отсутствие эффекта на скорость фибринолиза могло быть связано с нивелированием эффектов УЗ на фибриноген и урокиназу.

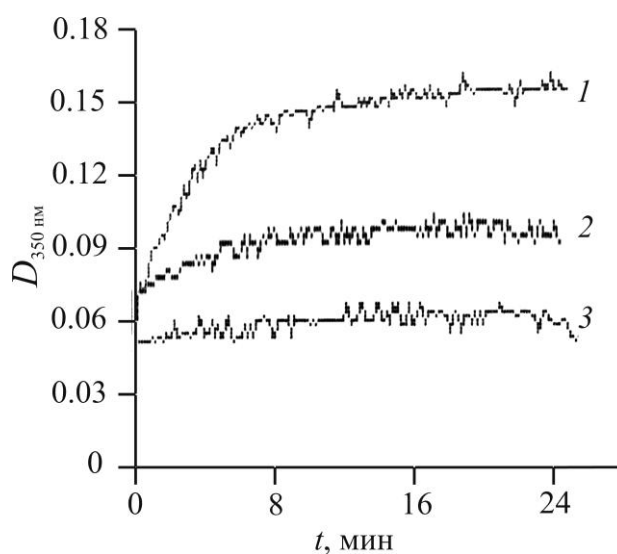


Рис. 4 – Кинетика тромбин-индуцируемого свертывания исходного (1), обработанного УЗ (25,1 кГц, 48,4 Вт/см², скважность 50 в течение 5 мин (2) и 30 мин (3) фибриногена

Следует отметить, что урокиназа, в отличие от т-АП, не образует комплексов с фибрином.

Смесь фибриногена, плазминогена и активатора плазминогена обрабатывали низкочастотным УЗ в течение 10 мин, после чего оставляли для дальнейшего гидролиза при 37 °С в течение 4 ч.

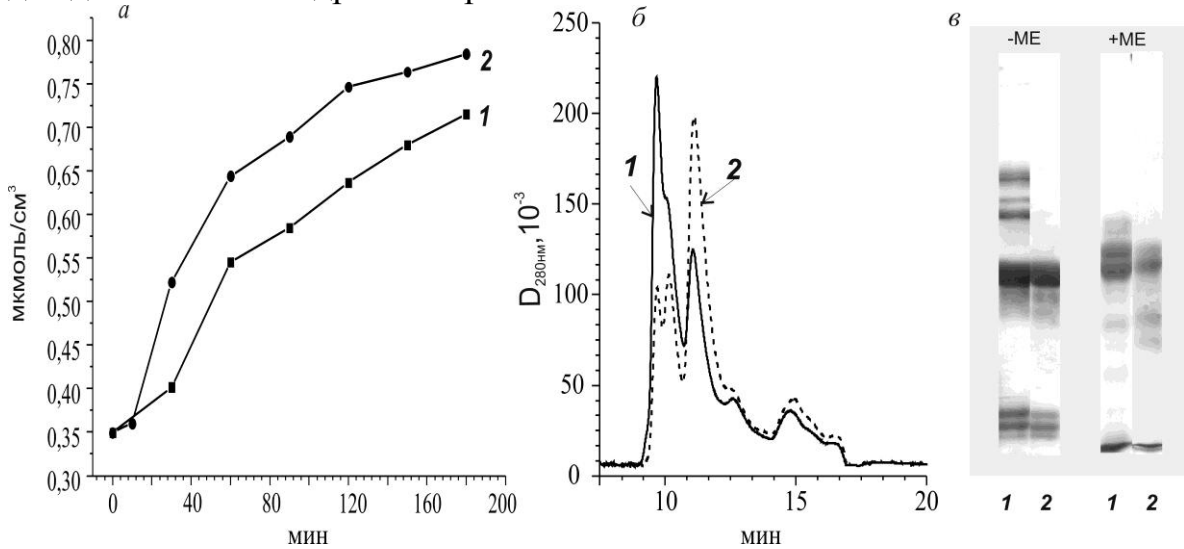


Рис. 5. Кинетика накопления пептидов в процессе гидролиза смеси фибриноген : плазминоген : т-АП (а) и результаты анализа проб, полученных через 30 мин гидролиза, методами гель-проникающей хроматографии (б) и SDS гель-электрофореза (в):

1 – контроль; 2 – смесь обработанная УЗ в течение 10 мин. ME – 2-меркаптоэтанол

Установлено, что в течение 10 мин как в контрольном (рис 5, а, кривая 1), так и УЗ-обработанном (рис 5, б, кривая 2) образце скорость накопления пептидов была одинаковой. Однако сразу после прекращения УЗ-обработки скорость накопления пептидов резко возрастала. Анализ методами ВЭЖХ (рис. 5, б) и SDS гель-электрофореза (рис. 5, в) показал, что после УЗ-обработки происходил быстрый гидролиз фибриногена, о чем свидетельствовало резкое уменьшение относительного содержания пика на хроматограмме и отсутствие полос, соответствующих нативным цепям фибриногена на электрофореграммах. На основании полученных результатов были рассчитаны начальные скорости накопления пептидов для каждого активатора плазминогена в случаях УЗ-обработки до и после добавления активатора (табл. 1). Видно, что во всех случаях УЗ-обработка приводила к увеличению скорости гидролиза фибриногена.

Отсутствие значительных изменений скорости реакций протеолиза в зависимости от режима УЗ-обработки свидетельствовало, что основной молекулярной мишенью для действия УЗ являлся фибриноген. Наибольшее увеличение в скорости гидролиза в случае использования УЗ с т-АП объясняется возможностью образования комплексов

активатора с фибриногеном за счет экспонирования сайтов полимеризации при действии УЗ (табл. 1).

Таблица 1

Начальные скорости накопления пептидов при гидролизе фибриногена смесью плазминогена с активатором плазминогена

№	Активатор	Начальная скорость протеолиза, 10^{-3} мкмоль/см ³ ·мин		
		Контроль	Режим УЗ-обработки	
			До добавления активатора	После добавления активатора
1	ртАП	0,67	3,1	3,1
2	УК	0,67	2,0	1,8
3	СТК	0,53	0,73	1,1

Известно, что в присутствии фибриногена, фибрина и продуктов их деградации происходит образования тройного комплекса: фибрин(оген)–плазминоген-тканевый активатор. При этом для фибрина характерна большая степень увеличения скорости активации за счет экспонирования скрытых в молекуле фибриногена сайтов связывания плазминогена и т-АП [5]. Ранее было установлено, что обработка фибриногена УЗ приводила к образованию ассоциатов с большей молекулярной массой. Можно предположить, что УЗ вызывал конформационные изменения в молекуле фибриногена, приводящие к экспонированию полимеризационных сайтов и, как следствие, сайтов связывания плазминогена и т-АП. Образование комплексов плазминогена и т-АП с фибриногеном препятствовало их инактивации в поле УЗ-кавитации.

Исследовано влияние мощности, скважности и времени УЗ-обработки на скорость фибриногенолиза. Установлено, что обработка УЗ мощностью до 5 Вт/см^2 не влияла на скорость протеолитической деградации фибриногена. Наибольшее увеличение скорости фибриногенолиза наблюдалось в диапазоне мощности $5 - 15 \text{ Вт/см}^2$, при скважности более 20 % и времени воздействия до 15 мин. Дальнейшее увеличение продолжительности воздействия (более 15 мин) и мощности выше 15 Вт/см^2 лишь в незначительной степени увеличивало скорость гидролиза фибриногена.

Влияние УЗ на протеолитическую деградацию фибрина. Исследовано влияние УЗ на плазменный сгусток. Установлено, что УЗ не приводил к активации плазминовой системы и разрушению ковалентных связей в молекулах фибрина. Основное действие УЗ заключалось

экстракции белков сыворотки крови, находящихся в порах и внутри фибриновых волокон [7]. Для детального изучения механизмов воздействия УЗ на фибринолиз нами была использована модель фибринового сгустка, полученного путем свертывания очищенного препарата ФГ тромбином в присутствии ионов кальция. Исходный препарат ФГ содержал достаточное количество фактора XIII для исчерпывающей ковалентной сшивки мономеров фибрина. Иницирование плазминолиза осуществляли, помещая сгусток в раствор, содержащий ПГ и т-АП. Смесь инкубировали при 37 °С. Анализ восстановленных образцов продуктов гидролиза предварительно обработанного УЗ и контрольного фибриновых сгустков методом SDS гель-электрофореза показал, что в первые 30 мин инкубирования в раствор высвобождались достаточно большие X и Y фрагменты фибрина и, возможно, их полимерные формы, о чем свидетельствовало наличие на денситограммах пика, соответствующего интактной β -цепи. После 1 ч инкубирования их количество существенно уменьшалось и уже после 2 ч на денситограммах присутствовали только пики, соответствующие γ' - γ' и β'' - цепям фибрина, что говорит о наличии в растворе исключительно D-димеров. В свою очередь гель-электрофорез восстановленных образцов супернатантов, полученных при гидролизе УЗ-обработанного фибрина в присутствии плазминогена и плазминогена с т-АП показал, что в течение всего времени инкубирования в раствор выделялись не только D-димеры, но и ранние продукты протеолитической деградации - X и Y фрагменты, что подтверждается присутствием на денситограммах проб пика, соответствующего интактной β -цепи фибрина. Полученные данные хорошо согласуются с послонной моделью ферментативного лизиса сгустка, в случае проникновения активатора плазминогена внутрь сгустка за счет диффузии [8]. Так, в контрольном эксперименте происходил последовательный гидролиз фибрина, и в раствор не высвобождались большие фрагменты фибриновой сети. При УЗ-обработке фибрина, ранее было показано изменение структуры сети, приводящее к более глубокому проникновению активатора внутрь сгустка. Можно предположить, что в данном случае протеолиз шел во всем объеме сгустка, и соответственно в раствор высвобождались большие фрагменты полимерной сети. Данные отличия наблюдались и при сравнении лизиса сгустка, индуцированного активатором фибриногена, присутствующим в окружающем буфере с лизисом сгустка, содержащего активатор [9]. Полученные результаты свидетельствовали об увеличении проницаемости активатора плазминогена внутрь сгустка.

Параллельно с анализом проб методом SDS гель-электрофореза процесс фибринолиза контролировали по образованию растворимых пептидов. Как видно из рис. 6, УЗ-обработка увеличивала скорость фибринолиза. При этом предварительная обработка фибрина и фибрина с плазминогеном увеличивала скорость фибринолиза в одинаковой мере. Полученные результаты свидетельствовали о стабилизирующем действии фибрина на инактивацию плазминогена в поле УЗ-кавитации. Аналогичные результаты были получены при изучении влияния УЗ на фибринолиз.

В свою очередь УЗ-обработка фибрина в присутствии плазминогена и т-АП увеличивала скорость фибринолиза в большей степени. Известно, что в присутствии фибриногена, фибрина и продуктов их деградации скорость активации плазминогена т-АП увеличивается за счет образования тройного комплекса: фибрин(оген) – плазминоген – тканевый активатор. При этом для фибрина характерна большая степень увеличения скорости активации за счет экспонирования скрытых в молекуле фибриногена сайтов связывания плазминогена и т-АП [5].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследовано влияние низкочастотного, импульсного УЗ на ряд предшественников сериновых протеаз: трипсиноген, химотрипсиноген, плазминоген, протромбин и одноцепочечные формы тканевого активатора плазминогена (т-АП) и урокиназы и их активные формы. Установлено, что УЗ не вызывал разрыва или образования ковалентных связей в белках, а также экспонирования новых, чувствительных к действию различных протеаз, пептидных связей в молекулах проферментов. УЗ-обработка фибриногена приводила к образованию

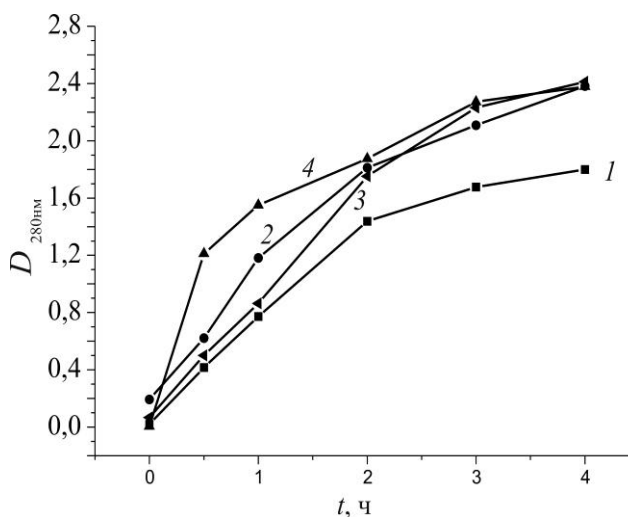


Рис. 6. Кинетика протеолитической деградации фибрина смесью плазминогена с т-АП при различных режимах:

- 1 – контроль;
- 2 – предварительное озвучивание фибрина в течение 30 мин;
- 3 – предварительное озвучивание фибрина с плазминогеном в течение 30 мин;
- 4 – озвучивание смеси фибрина, плазминогена и т-АП в течение 30 мин.

агрегатов, характеризующихся потерей тромбин-индуцируемой свертываемости и увеличению скорости плазминолиза.

Исследовано влияние УЗ-обработки на процесс протеолитической деградации фибриногена и фибрина в системах фибрин(оген) : плазминоген : активатор плазминогена. Установлено, что УЗ-обработка сопровождается увеличением скорости гидролиза фибриногена и фибрина при различных режимах добавления активаторов. В условиях совместной УЗ-обработки фибрин(оген)а с плазминогеном, т-АП, а также их смесей, показано стабилизирующее действие фибриногена на молекулы данных белков. Максимальная скорость фибринолиза достигалась при УЗ-обработке фибрина в присутствии плазминогена и т-АП.

Таким образом, в настоящей работе оптимизированы режимы УЗ-воздействия и последовательность введения тромболитических ферментов, что позволило минимизировать побочные эффекты акусто-ферментативного лизиса тромбов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Немкович Н. А., Крученюк Ю. В., Собчук А. Н. и др. // Оптика и спектроскопия. 2009. Т. 107, № 2. С. 292–299.
2. Ovsianko S. L., Chernyavsky E. A., Minchenya V. T. et al. // Ultrason. Sonochem. 2005. Vol. 12. P. 219–223.
3. Шкуматов В. М., Адзерихо И. Э., Лесникович Ю. А., Чернявский Е. А. // Биохимия. 2004. Т. 69, № 2. С. 243–250.
4. Lind S. E., McDolagh J. R., Smith C. J. // Blood. 1993. V. 82, № 5. P. 1522–1531.
5. Tachias K., Madison E. L. // J. Biol. Chem. 1997. V. 272, № 1. P. 28–31.
6. Shacter E., Williams J. A., Levine R. L. // Free Rad. Biol. Med. 1995. V. 18. P. 815–821.
1. Cherniavsky E. A., Adzerikho I. E., Shkumatov V. M. // Biochemistry (Moscow) Suppl. B: Biomed. Chem. 2009. V. 3, № 2. P. 164–171.
7. Collet J. P., Park D., Lesty C. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2000. V. 20, № 6. P. 1354–1361.
8. Komorowicz E., Kolev K., Lerant I. // Circ. Res. 1998. V. 82. P. 1102–1108.

Поступила в редакцию 03.02.2011.

УДК 577.152.3+534.29-7/-8

Чернявский Е. А., Шкуматов В. М., Влияние ультразвука на сериновые протеазы, белки фибринолитической системы и процессы их протеолитической модификации // Свиридовские чтения: Сб. ст. Вып. 7. Минск, 2011. С.

Исследованы эффекты низкочастотного, импульсного ультразвука (УЗ) на ряд предшественников сериновых протеаз: трипсиноген, химотрипсиноген, плазминоген, одноцепочечные формы тканевого активатора плазминогена и урокиназы, их активные формы. Изучено влияние различных режимов УЗ-воздействия на скорость гидролиза фибриногена и фибринового сгустка на модельных системах, содержащих фибрин(оген), плазминоген и активаторы плазминогена.

Библиогр. 8 назв., 6 ил., 1 табл.

Cherniavsky E. A., Shkumatov V. M. Effect of ultrasound on serine protease, protein of fibrinolytic systems and processes of their proteolytic modification. // Sviridov Readings: Iss. 7. Minsk, 2011. P.

The effects of low-frequency pulse US on the number of the serine protease precursors: trypsinogen, chymotrypsinogen, plasminogen, single-chain forms of the tissue-type plasminogen activator and urokinase and their active forms have been investigated. The influence of different US treatment modes on the rate of fibrinogen and fibrin clot hydrolysis in the model systems, containing fibrin(ogen), plasminogen and various plasminogen activators was studied.