

ТОМ XXXIII

ВЫПУСК 2

МАРТ — АПРЕЛЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.



МОСКВА · МЕДИЦИНА · 1987

ВОПРОСЫ
МЕДИЦИНСКОЙ
ХИМИИ



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. С. ДЕБОВ

В. И. МАЗУРОВ (зам. главного редактора), И. П. АШМАРИН, Т. Т. БЕРЕЗОВ,
Е. Н. ГЕРАСИМОВА, В. З. ГОРКИН, И. Б. ЗБАРСКИЙ, В. Л. КОЗЕЛЬЦЕВ,
А. Н. КЛИМОВ, Б. Ф. КОРОВКИН, Л. А. ЛОКШИНА, В. Н. ОРЕХОВИЧ, Л. Ф. ПАН-
ЧЕНКО, М. Ш. ПРОМЫСЛОВ, Е. Л. РОЗЕНФЕЛЬД, Ю. А. РОМАКОВ (ответствен-
ный секретарь), В. А. САКС, С. Е. СЕВЕРИН, В. Б. СПИРИЧЕВ, В. Я. ТУТЕЛЬЯН

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

БАЕВ А. А. (Москва)	ТРОИЦКИЙ Г. В. (Симферополь)
БЕЛИЦЕР В. А. (Киев)	ТУРАКУЛОВ Я. Х. (Ташкент)
БЫЧКОВ С. М. (Москва)	ТЯХЕПЫЛЬД Л. Я. (Тарту)
КОНСТАНТИНОВ А. А. (Хабаровск)	УТЕВСКИЙ А. М. (Харьков)
КУДРЯШОВ Б. А. (Москва)	ШАПОТ В. С. (Москва)
ЛЯХОВИЧ В. В. (Новосибирск)	ЯКОВЛЕВ П. Н. (Ленинград)
ПАСХИНА Т. С. (Москва)	ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)

Адрес редакции журнала:

Москва, 109801, Солянка, 14

АМН СССР

Тел. 297-16-44

Зав. редакцией Л. А. Фирсова

*В. Н. Никандров, В. И. Вотяков, С. А. Паумович, Г. В. Воробьева,
С. Г. Цыманович, Г. С. Янковская*

ИССЛЕДОВАНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ КОМПЛЕКСОВ СТРЕПТОКИНАЗЫ И ГЕПАРИНА И ИХ СВОЙСТВ

Белорусский НИИ эпидемиологии и микробиологии

Одним из важных механизмов регуляции жидкого состояния крови является реализация функции противосвертывающей системы [4]. Важным компонентом этой системы является гетерополисахарид гепарин — естественный антикоагулянт. Многочисленными исследованиями [4, 5] установлено, что гепарин способен образовывать комплексы с Ca^{2+} , катехоламинами, тромбогенными белками, а также с плазминогеном и плазмином [6], при этом образующиеся комплексы приобретают свойство дезагрегации растворимого (нестабилизованного) фибрина. Это явление получило на-

звание неферментативного фибринолиза.

Не менее важным в этом отношении является вопрос о возможности формирования таких комплексов и их свойствах с экзогенными белками, например с вводимыми в организм тромболитическими ферментами. Этот вопрос остается малоизученным. Одним из наиболее широко применяемых в клинической медицине тромболитиков является стрептокиназа (СК) [9].

Цель настоящей работы — выяснение взаимодействия СК с гепарином, изучение свойств полученных комплексов.

Методика

В работе использовали гепарин — натриевую соль фирм «Fluka» (Швейцария) и «Снофа» (ЧССР), а также раствор гепарина для инъекций фирмы «Рихтер» (ВНР) и отечественного производства. СК выделяли из культуральной жидкости методом ионообменной хроматографии, как описано ранее [7]. В отдельных опытах использовали коммерческий препарат СК «целназу» отечественного производства, балластные белки удаляли методом ионообменной хроматографии.

Активность СК определяли по лизису фибринового сгустка [3] и площади зон лизиса фибриновых пластин [12] с последующей коррекцией по международному стандарту стрептокиназы — стрептодориаза (Лондон, ВОЗ). Белок определяли по методу Лоури [15]. Удельная активность образцов СК, использованных в экспериментах, составляла 30 000 МЕ на 1 мг белка.

Для образования комплексов СК и гепарин смешивали в 0,06 М фосфатном буфере pH 7,4 в соотношении 30 000 МЕ и 150 ЕД соответственно при температуре 4 и 24 °С в течение 1—17 ч.

Образование комплексов регистрировали методами тонкослойной гель-хроматографии на сефадексе G-200, инфракрасной спектроскопии в таблетках с КВг и дифференциальной УФ-спектроскопии. Инфракрасные спектры снимали на спектрофотометре UR-20, дифференциальные ультрафиолетовые — на спектрофотометре Spereord M40 в 4-кюветной системе. Спектры кругового дихроизма снимали на спектрополяриметре Jasco-20 в диапазонах длин волн 205—240 нм в кюветках с толщиной слоя 2 мм, при концентрации белка 0,32 мг/мл. Результаты выражали через молярную эллиптичность на аминокислотный остаток — [θ]. Средний вес остатка принят равным 133. Прибор откалиброван по D-пенталактону.

После гель-хроматографии на сефадексе готовили отпечатки на хроматографической бумаге, которые затем высушивали и фиксировали. Для выявления локализации компонентов полученные отпечатки окрашивали 1 % раствором амидо черного (белки) или 0,03 % раствором азуря II (гепарин).

Термостабильность нативной СК и комплекса ее с гепарином оценивали при температурах 25, 37, 50 и 70 °С. Колебания температуры во времени не превышали 0,2 °С.

Исследования влияния СК, гепарина и их комплекса на гемостазиологические показатели выполняли на кроликах массой 2—2,5 кг. СК (60 000 МЕ/кг), гепарин (300 ед/кг) и комплексе СК — гепарин (60 000/300 МЕ/ед/кг) вводили

а	1	в	б	2	в
0		0	0		0

Рис. 1. Гель-хроматография стрептокиназы (а), гепарина (б) и комплекса стрептокиназа — гепарин (в) в тонком слое сефадекса G-200.

1 — окраска амидо черным 10 В, 2 — окраска азуром II.

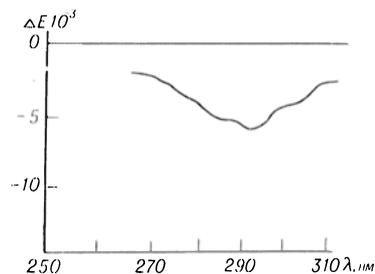


Рис. 2. Дифференциальный УФ-спектр стрептокиназы при взаимодействии с гепарином. Концентрация стрептокиназы $7 \cdot 10^{-6}$ М.

внутривенно однократно. До введения, через 10, 30, 60, 120 мин, 3 и 4 ч после него в крови определяли тромбиновое время по Сирмаи [10], время лизиса сгустка разбавленной крови по Ферили [13], концентрацию фибриногена и фибринолитическую активность плазмы [14], общие антиплазмины [1] и антитромбин III [11]. В период исследования животные находились под внутривенным тиопенталовым наркозом (30 мг/кг), после окончания экспериментов их умерщвляли путем введения воздуха в яремную вену.

Результаты исследований обрабатывали статистически [8].

Результаты и обсуждение

Смешивание растворов СК и гепарина в весовом соотношении 3,2 : 1 (на 30 000 МЕ СК 150 ЕД гепарина) при pH 7,4 приводит к изменению подвижности СК и полисахарида, регистрируемой тонкослойной гель-хроматографией на сефадексе G-200, по сравнению с подвижностью отдельно взятых компонентов (рис. 1). При окраске хроматограмм амидо черным или азуром II отмечено отсутствие следового количества исходных компонентов вне

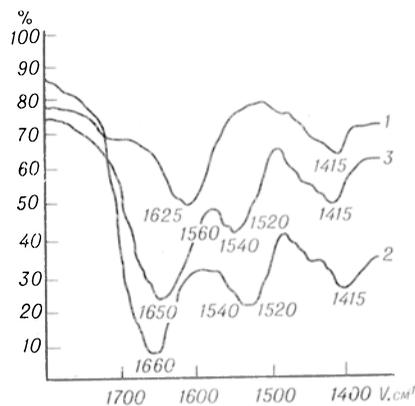


Рис. 3. ИК-спектры гепарина (1), стрептокиназы (2) и комплекса стрептокиназа — гепарин (3).

По оси ординат — пропускание (%).

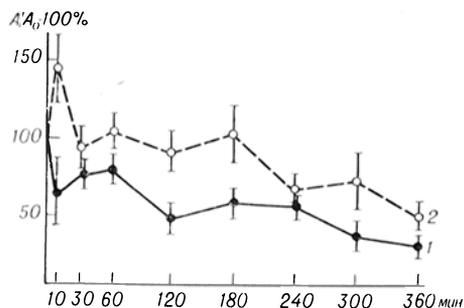


Рис. 4. Динамика активности стрептокиназы (1) и ее комплекса с гепарином (2) при 50°C.

образовавшегося нового пятна с измененной подвижностью. Это позволяет полагать, что при взаимодействии СК и гепарина образуется комплекс с измененными свойствами, причем оба исходных компонента включаются в состав комплекса практически полностью.

Образование комплекса подтверждается также появлением разностного УФ-спектра в области 250—300 нм (рис. 2). Кроме того, это свидетельствует, по-видимому, о конформацион-

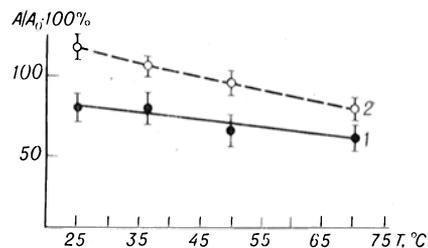


Рис. 5. Температурная стабильность стрептокиназы (1) и комплекса стрептокиназы — гепарин (2).

Остаточная активность определена через 2 ч инкубации при соответствующей температуре.

ных изменениях молекулы СК в составе комплексов. Эти изменения проявляются в сдвиге состояния ароматических хромофоров белка.

О структурных изменениях молекулы СК свидетельствует также смещение полосы амид I и амид II в ИК-спектре комплекса (рис. 3), а также уменьшение величины молярной эллиптичности в дальней УФ-области спектра кругового дихроизма: значение $[0]_{220}$ для СК и комплекса СК — гепарин составляет $7,2 \pm 0,5$ и $5,1 \pm 0,3$

Таблица 1
Динамика показателей фибринолиза и гемостаза при введении кроликам гепарина (300 ЕД/кг), ($n = 6$)

Исследуемый показатель	Исходные данные	Время от начала инфузии, мин			
		10	30	60	120
Тромбиновое время, с	$38,0 \pm 1,3$	>300	>300	>300	$28,0 \pm 2,3$
Время лизиса сгустка крови, ч	24	24	24	24	24
Антиплазмины, с	$154,0 \pm 2,5$	$162,0 \pm 17,0$	$162,0 \pm 18,0$	$156,0 \pm 21,0$	$152,0 \pm 18,0$
Антитромбин III, %	$98,7 \pm 5,2$	$84,0 \pm 5,2$	$79,1 \pm 3,9^*$	$72,0 \pm 5,1^*$	$85,6 \pm 4,1$
Концентрация фибриногена, мг%	$530,0 \pm 28,6$	$478,0 \pm 38,0$	$420,0 \pm 26,0^*$	$480,0 \pm 13,0$	$500,0 \pm 40,0$
Фибринолитическая активность плазмы, %	$19,3 \pm 2,8$	$21,5 \pm 7,3$	$17,3 \pm 2,6$	$18,5 \pm 3,1$	$21,4 \pm 3,0$

* $P \leq 0,05$.

Таблица 2
Динамика показателей фибринолиза и гемостаза при введении кроликам стрептокиназы в дозе 60 000 МЕ/кг ($n = 6$)

Исследуемый показатель	Исходные данные	Время от начала инфузии, мин			
		10	30	60	120
Тромбиновое время, с	$30,0 \pm 2,2$	$54,3 \pm 5,5^*$	$40,0 \pm 3,9$	$47,3 \pm 2,7^*$	$31,2 \pm 3,2$
Время лизиса сгустка крови, с	24 ч	$83,3 \pm 1,0^*$	$101,3 \pm 1,5^*$	$140,0 \pm 2,2^*$	24 ч
Антиплазмины, с	$91,5 \pm 1,0$	$150,0 \pm 3,4^*$	$167,0 \pm 12,9$	$122,0 \pm 8,9$	$126,5 \pm 12,2$
Концентрация фибриногена, мг%	$449,0 \pm 72,8$	$216,0 \pm 38,0$	$196,7 \pm 29,1^*$	$238,8 \pm 48,5$	$366,7 \pm 48,5$
Фибринолитическая активность плазмы, %	$18,8 \pm 3,5$	$41,6 \pm 8,2^*$	$32,1 \pm 3,2^*$	$31,1 \pm 6,4$	$22,6 \pm 5,0$

* Изменения статистически достоверны при $P \leq 0,05$.

соответственно. Эти данные позволяют считать, что комплексобразование приводит к изменениям вторичной и, по-видимому, третичной структуры молекулы СК. Судя по данным тонкослойной гель-хроматографии, комплекс СК — гепарин отличается меньшей подвижностью, чем исходные компоненты ($R_{ст}$ комплекса по отношению к СК равен 0,88). Такое изменение подвижности при ожидаемом изменении молекулярной массы ассоциатов по сравнению с исходными компонентами может быть обусловлено изменением формы комплекса, например отклонением от шарообразной. Подобные явления наблюдались нами при образовании комплексов СК с нативными декстрановыми препаратами [2].

Исследование термостабильности показало, что по сравнению с нативной СК комплекс отличается большей термостабильностью, особенно в температурном диапазоне 25—50°C (рис. 4 и 5). При экспозиции при 50°C в течение 6 ч активность комплекса СК — гепарин остается более высокой, чем нативной СК.

Полученные комплексы СК — гепарин отличались не только по молекулярным свойствам, но и по действию на систему фибринолиза в организме животных.

Введение кроликам гепарина практически не изменяло исследуемые показатели фибринолиза (табл. 1). После введения антикоагулянта лишь нарастал антикоагулянтный потенциал крови, выразившийся в резком удлинении тромбинового времени, некотором снижении уровня антитромбина III. Эти изменения отмечались на протяжении 1 ч после введения.

Для действия нативной СК (целиаза) характерна активация фибринолиза: резкое ускорение лизиса сгустка цельной крови, повышение фибринолитической активности плазмы, снижение концентрации фибриногена — эффект, наблюдавшийся в период до 2 ч после введения СК (табл. 2). К 2 ч исследуемые показатели не отличались от исходного уровня.

В отличие от действия гепарина или СК, влияние на гемостаз у кроликов комплекса СК — гепарин было длительным. Так, в тесте лизиса сгустка цельной крови изменения отмечены и через 2 ч, а фибринолитическая ак-

Таблица 3
Динамика показателей фибринолиза и гемостаза при введении кроликам комплекса стрептскиназа — гепарин (60 000/30 МЕ ЕД/кг) ($n = 6$)

Исследуемые показатели	Время от начала инфузии, мин						
	10	30	60	120	180	240	300
Тромбиновое время, с	>300	>300	>390	>300	35,0±5,7	28,0±1,5	35,0±5,1
Время лизиса сгустка крови, с	75,5±10,9	111,6±18,8	185,0±10,9	250,0±15,4	24 ч	24 ч	24 ч
Антиплазмины, с	162,5±13,3	216,0±28,8	221,5±30,9	185,0±28,1	193,0±25,4	155,0±20,8	260,0±15,0
Антитромбин III, %	44,7±4,2	124,8±14,2	114,4±9,8	367,3±9,8	235,3±3,2	82,3±6,7	62,6±3,3
Концентрация фибриногена, мг%	536,0±61,7	518,6±53,7	509,6±45,2	481,5±47,2	366,6±54,3	335,0±34,0	313,3±40,4
Фибринолитическая активность плазмы, %	35,0±2,6	43,6±3,5	51,6±4,0	40,8±6,9	36,0±4,0	26,5±8,2	18,3±4,5

тивность плазмы сохранялась на повышенном уровне вплоть до 3 ч (табл. 3). Концентрация фибриногена при этом постепенно снижалась вплоть до 4 ч (на 44 %) с момента введения животным комплекса.

Таким образом, СК способна взаимодействовать с гепарином с образованием комплекса. В составе последнего белковая часть подвергается конформационным перестройкам, что, по-видимому, может способствовать повышению устойчивости СК, включенной в комплекс, к температурным воздействиям. Комплекс СК — гепарин обладает особенностями действия на гемостазиологические показатели в организме. Это необходимо учитывать при проведении тромболитической терапии препаратами СК в сочетании с гепарином, а также при получении комплексных препаратов СК с гепарином.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андреевко Г. В. // Лаб. дело. — 1969. — № 8. — С. 477—479.
2. Вотяков В. И., Воробьева Г. В., Никандров В. И. и др. // Стрептокиназа в регуляции свертывающей и противосвертывающей систем крови. — Минск, 1985. — С. 74—83.
3. Каневская М. П., Конииков А. П. // Детские капиллярные инфекции. — Л., 1953. — С. 47—59.
4. Кудряшов Б. А. Биологические проблемы регуляции жидкого состояния крови и ее свертывания. — М., 1975.
5. Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А. // Стрептокиназа в регуляции свертывающей и противосвертывающей систем крови. — Минск, 1985. — С. 121—127.
6. Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А. // Вопр. мед. химии. — 1973. — № 2. — С. 136—140.

7. Никандров В. И. // Изв. АН БССР: Сер. биол. наук. — 1985. — № 3. — С. 64—67.
8. Рокцкий П. Ф. Биологическая статистика. — Минск, 1973.
9. Савченко Н. Е., Вотяков В. И., Никандров В. И. // Стрептокиназа и другие тромболитические ферменты. — Минск, 1979. — С. 3—9.
10. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования / Под ред. Е. А. Кост. — М., 1968. — С. 130.
11. Abildgaard U., Graven I., Godal H. C. // Thrombos. Diathes. haemorrh. (Stuttg.). — 1970. — Bd 24. — S. 224—229.
12. Astrup T., Müllertz S. // Arch. Biochem. — 1952. — Vol. 40. — P. 346—351.
13. Fearnley G., Balmforth G., Fearnley E. // Clin. Sci. — 1957. — Vol. 16. — P. 645.
14. Lazar G. // Thrombos. Diathes. haemorrh. (Stuttg.). — 1967. — Bd 17. — S. 401.
15. Lowry O. H., Rosebrough N. I., Farr A. L., Bandall R. I. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol 193. — P. 265.

Поступила 21.05.86

FORMATION OF STREPTOKINASE-HEPARIN COMPLEXES AND THEIR PROPERTIES

V. N. Nikandrov, V. I. Votyakov,
S. A. Naumovich, G. V. Vorob'yeva,
S. G. Tsymanovich, G. S. Yankovskaya

Byelorussian Institute of Epidemiology and Microbiology, Minsk

Streptokinase and heparin developed complex at the ratio 3.2:1, w/w, respectively, and neutral values of pH, which was registered by means of thin-layer chromatography and differential UV-spectroscopy. IR-, differential UV- and CD-spectroscopic methods showed that secondary and tertiary structures of streptokinase were altered in the complex. Streptokinase containing in the complex exhibited the higher thermostability at 50° as compared with native protein. After intravenous administration of the complex into rabbits more distinct alterations were observed in thrombin time, blood clot lysis and in blood plasma fibrinolytic activity as compared with native streptokinase effect.