

**НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ**



**ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЦЕНТР  
«ИНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГИИ И БИОХИМИИ  
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»**

## **БЕЛОРУССКИЕ ЛЕКАРСТВА**

Материалы  
международной научно-практической конференции

Минск, 2-3 ноября 2010 г.

Минск  
2010

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ

ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЦЕНТР  
«ИНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГИИ И БИОХИМИИ  
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»

## БЕЛОРУССКИЕ ЛЕКАРСТВА

Материалы  
международной научно-практической конференции

Минск, 2-3 ноября 2010 г.

Минск  
2010

**ВОЗМОЖНОСТИ НЕТРАДИЦИОННОГО ПРИМЕНЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ  
СТРЕПТОКИНАЗЫ: ИССЛЕДОВАНИЯ НА МОЛЕКУЛЯРНОМ И  
КЛЕТОЧНОМ УРОВНЯХ**

<sup>1,2</sup> Никандров В.Н., <sup>2</sup> Пыжова Н.С., <sup>1</sup> Жук О.Н.

<sup>1</sup> *Институт физиологии НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь;*

<sup>2</sup> *РНПЦ эпидемиологии и микробиологии Минздрава Республики Беларусь, г. Минск,  
Беларусь*

Традиционно до сих пор препараты стрептокиназы (СК) используются в клинической медицине для растворения тромбов, отложений фибрина.

В период 1975–1981 г. сотрудниками НИИ эпидемиологии и микробиологии Минздрава БССР был разработан отечественный лечебный препарат СК для внутрисосудистого введения – «целиаза» (А.с. СССР № 1249936). В 1983 г. Минздравом СССР утверждена документация на этот препарат и разрешен его серийный выпуск, который на протяжении ряда лет осуществлялся Предприятием по производству бакпрепаратов при НИИ эпидемиологии и микробиологии. В середине 80-х годов параллельно в Минске на заводе Медпрепаратов началось освоение технологии получения препарата СК по лицензии фирмы “Behringwerke AG”.

В 1987 – 1991 нами описаны супероксиддисмутазо-подобная активность СК, ингибирование ее плазминоген-активаторной способности перехватчиками супероксидного радикала (нитротетразолиевым синим, адреналином), нуклеотидами (АТФ, сАМР). В последствии изложены концепция кислородзависимого пути активации плазминогена и гипотеза кислородзависимого протеолиза [1].

В 1987 г. нами совместно с НИИ травматологии и ортопедии Минздрава Республики Беларусь был предложен СК-содержащий состав для лечения пациентов с длительно незаживающими ранами (Патент РФ № 2027432). Применение его местно по жизненным показаниям в хирургических клиниках Минска (клиника НИИ травматологии и ортопедии, отделение гнойной хирургии 9-ой ГКБ, НИИ кардиологии) дало хорошие результаты. Во всех случаях применения было достигнуто заживление ран. Ранее коллективом латвийских исследовате-

дей был также зафиксирован благотворный эффект внутривенного введения SK при хроническом простатите или хроническом гепатите (А.с. СССР № 1132951 и № 1232253).

В 1989 г. инстилляцией SK использованы для лечения экспериментального герпетического кератоконъюнктивита у кроликов (А.с. СССР № 1822790).

В период с 1999 г. на первичных культурах коры головного мозга, вегетативных и чувствительных ганглиев, а также на перевиваемых культурах клеток крысиной глиомы С6, человеческой нейробластомы IMR-32, крысиной феохромоцитомы PC12 получена совокупность оригинальных, ранее не описанных в литературе данных, иллюстрирующих нейротрофические и протекторные свойства SK при воздействии на клетки нервной ткани повреждающих факторов различной природы.

Так, перевод диссоциированных культур неокортекса новорожденных крыс на 14 сут на дефицитную по белкам сыворотки (0,5% эмбриональной телячьей сыворотки вместо 15%) питательную среду через 48 ч вызвал статистически значимое снижение доли жизнеспособных клеток [2, 3]. Внесение же SK сохраняло этот показатель на уровне обогащенной сывороткой питательной среды.

Как показали результаты электронной микроскопии, при переводе культуры на среду с дефицитом по белкам сыворотки уже через 24 ч в астроцитах отмечены конденсация хроматина, множественные глыбки гиперхромного материала с предпочтительной локализацией у внутренней мембраны ядра. Сама мембрана расслаивалась, образуя выпячивания в сторону цитоплазмы. Цитоплазматические органеллы теряли характерную морфологию и вакуолизировались. Реактивные изменения отмечены в ядрах нейронов. В нейропиле отростки теряли правильную форму, их мембрана расслаивалась, исчезали органеллы [2, 3]. Если культивирование на дефицитной по белкам среде сочетали с добавкой SK ( $10^{-5}$  М), эти деструктивные изменения не проявлялись. Организация эксплантата сохранена, клетки нервной ткани не несли признаков деструкции. Интересной особенностью являлось обилие в нейронах митохондрий с умеренно плотным веществом и выраженными кристами. Через 48 ч экспозиции в такой среде астроциты в поле зрения редки. По-видимому, именно они поражались в первую очередь. Появлялись клетки, содержащие многочисленные миелиновые тельца, лизосомы и вакуоли. Возможно, это результат поглощения обломков разрушившихся клеток. В то же время, нейроны к такому воздействию более устойчивы.

SK заметно стимулировала формирование зоны роста органотипических культур чувствительного (спинального) и симпатического (краниального шейного) ганглиев [2, 3]. На питательной среде, содержащей 10% сыворотки крови, влияние SK было более выражено. Зона роста культур в присутствии SK имела повышенную плотность за счет интенсивной пролиферации и миграции из эксплантата клеток различной природы. Особо выделялись многочисленные шванновские клетки вдоль радиально направленных отростков нервных клеток [2, 3]. Наблюдение за культурами свыше 14 сут *in vitro* показало способность SK в питательной среде, содержащей 10% сыворотки крови, значительно улучшать рост и развитие этих ганглиев новорожденной крысы.

SK способствовала также увеличению жизнеспособности клеток глиомы С6 и нейробластомы IMR-32, стимулировала их пролиферацию [4]. В концентрации  $10^{-7}$ – $10^{-11}$  М она оказывала явный митогенный эффект, что выражалось в увеличении индекса пролиферации уже через 24 ч культивирования: так, индекс пролиферации клеток глиомы С6 в этот период возрос на 125–147%, а на третьи сутки – на 230365% в сравнении с контролем. Увеличение этого индекса для нейробластомы при концентрации SK  $10^{-7}$  и  $10^{-9}$  М составило 26–42% и 45–130% соответственно. SK вызвала в этих клетках рост уровня ДНК, РНК и белка, начиная уже с первых суток культивирования [4]. Судя по результатам фазово-контрастной микроскопии, SK стимулировала развитие клеток этих линий.

Добавление SK к культуре феохромоцитомы PC12 вела к существенному угнетению АТР-активируемого протеолиза, сильному подавлению I-кальпаиновой активности вплоть до

полного ее отсутствия. Практически мы не наблюдали повышения уровня этого типа протеолиза, сложный характер зависимости «эффект-концентрация» в случае II-кальпаиновой активности [2, 3].

При экспозиции 24 ч SK (2000, 200 или 2 ME) вызывала в клетках глиомы C6 существенные изменения активности лактатдегидрогеназы, активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и сукцинатдегидрогеназы [5].

Защитное действие SK явственно проявлялось при воздействии холода, вызвавшем полную гибель органотипических культур спинального ганглия в среде, содержащей 0,5% сыворотки крови, и частичную гибель культур в среде, содержащей 10% сыворотки [2, 3]. Добавка SK в значительной степени защищала эти ганглии от холодового стресса, внешний вид культуры сохранялся, за исключением незначительных повреждений отдельных клеток зоны роста ганглиев.

Аденозинтрифосфат в анионной форме (АТФ,  $10^{-3}$  M) в такой же среде способствовал дальнейшему уменьшению доли жизнеспособных клеток до  $77,23 \pm 0,64\%$  против  $88,13 \pm 0,14\%$  в контроле и дезорганизации ультраструктуры нервных и глиальных клеток органотипической культуры неокортекса новорожденных крыс. Внесение АТФ совместно с SK вело к увеличению доли жизнеспособных клеток до  $86,53 \pm 0,97\%$ , позволило сохранить организацию клеток эксплантата, что сопоставимо с действием только одной SK и с контролем (обогащенной белками среда). Следовательно, SK способна полностью нивелировать деструкцию АТФ клеток нервной ткани. Более продолжительное влияние SK провоцировало развитие деструктивных изменений.

Защитное действие SK четко проявилось также при повреждающем воздействии на клетки нервной ткани гидропероксида, ионов аммония или эксайтотоксичного глутамата.

Все это свидетельствует о способности SK воздействовать на клетки и ткани непосредственно, минуя кровотоки и, принципиально, ставит на иную платформу изучение ее биологического действия, ибо с таких позиций эффекты SK являются чрезвычайно слабо изученными. Изложенные материалы показывают, что эффекты SK во многом зависят от типа клеточных элементов и их состояния их. Складывается впечатление, что в коре головного мозга наиболее чувствительны астроциты, тогда как нейроны более устойчивы. Это, разумеется, не означает их полной резистентности. Как показали электрофизиологические исследования, суперфузия понтобульбоспинального препарата мозга крысы раствором SK вела к обратному возрастанию частоты генерации респираторных залпов на 50–55%. Следовательно, изменения со стороны нейронов также могут иметь место. В ряде наших экспериментов SK брали в достаточно высокой концентрации –  $5 \cdot 10^{-6}$  M, а при избытке SK активный плазмин не образуется. Надо сказать, что в опытах со SK на культурах симпатобластов и спинальных ганглиев мы не фиксировали появления фибринолитической (плазминовой) активности, однако энзиматический анализ свидетельствовал о присутствии функционально активной SK (практически нерасщепленной) в таких культурах.

И еще один штрих. Важную проблему клинической медицины составляют патологические процессы, инициируемые патогенными штаммами *Pseudomonas aeruginosa*. В арсенал факторов патогенности входят высокоактивные протеиназы. Как показали наши исследования, SK на 20–100% подавляла фибринолитическую активность клеточных протеиназ госпитальных штаммов псевдомонад.

Представленные результаты позволяют считать, что потенциал клинического применения препаратов SK не исчерпан. Эти результаты обозначили направления дальнейших работ, реализация которых даст в перспективе конкретные решения для использования SK в лечебных целях по новому назначению.

Литература:

1. Nikandrov V.N., Pyzhova N.S. Some unusual manifestation of proteolysis // *Cellular and Molecular Biology*, 2006, vol. 52, № 4, p. 30–39.

2. Никандров В.Н., Жук О.Н., Гронская Р.И., Полукошко Е.Ф., Пыжова Н.С., Петрусенко Г.П., Романовская А.А. Проблемы биотехнологии клеток нервной ткани: исследования белковых факторов трофического характера // In: "Materials, methods and technology. Scientific articles 2007". Sci. Invest. LTD—branch Bourgas. Bulgaria, 2007, p. 48–66.

3. Никандров В.Н., Жук О.Н., Полукошко Е.Ф., Гронская Р.И., Романовская А.А. Действие плазминогена и стрептокиназы на жизнедеятельность клеток нервной ткани в культуре // *Биомед. химия*, 2008, т. 54, № 2, с. 192–200.

4. Романовская А.А., Никандров В.Н. Плазминоген и стрептокиназа в регуляции пролиферации клеток глиомы С6 и нейробластомы IMR-32 // *Доклады НАН Беларуси*, 2007, т. 51, № 2, с. 57–60.

5. Никандров В.Н., Лукашевич В.С., Гронская Р.И. Модуляция углеводно-энергетического метаболизма клеток нервной ткани при воздействии плазминогена и стрептокиназы // В кн.: «Актуальные теоретические и прикладные аспекты патофизиологии. Матер. респ. конф. с междунар. участием». Гродно, 2010, с. 165–169.

**POSSIBILITIES OF NONCONVENTIONAL APPLICATION OF STREPTOKINASE:  
STUDIES AT THE MOLECULAR AND CELLULAR LEVELS**

<sup>1,2</sup>Nikandrov V.N., <sup>2</sup>Pyzhova N.S., <sup>1</sup>Zhuk O.N.

<sup>1</sup>*Institute of Physiology of NAS of Belarus, Minsk, Belarus;*

<sup>2</sup>*Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Ministry of Public Health,  
Minsk, Belarus*

Results of own long-term researches are generalized. The obtained results allowed to discover the new functional properties of streptokinase (SK) molecule, to propose the conception of oxygen-dependent pathway of plasminogen activation and the hypothesis of oxygen-dependent proteolysis. On this basis SK was used for treatment of patients with long-nonhealing wounds, herpetic keratoconjunctivitis. On the cultures of nervous tissue cells the neurotrophic properties of SK, its protective effect during action of damaging factors of the various nature on cells were described for the first time. The cleavage of bovine fibrinogen by proteinases of *Pseudomonas aeruginosa* hospital strain was inhibited by SK additions on 20–100%.

Set of the results creates real preconditions of expansion of medical application sphere of SK preparations, first of all, for stimulation of tissues' regeneration and, rather probably, at a neurological pathology.