

Министерство здравоохранения БССР
Белорусский ордена Трудового Красного Знамени
научно-исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии
Белорусское научное медицинское общество
микробиологов, эпидемиологов и паразитологов

СТРЕПТОКИНАЗА
И ДРУГИЕ
ТРОМБОЛИТИЧЕСКИЕ
ФЕРМЕНТЫ

(Биосинтез, очистка,
экспериментальные
и клинические испытания)

- / АВГ 2007

Минск 1979

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Н.Е.САВЧЕНКО, В.И.ВОТЯКОВ – главные редакторы,
П.Г.РЫТИК, В.Н.НИКАНДРОВ – зам.главных редакторов,
В.Н.КОВЧУР – ответственный секретарь,
Т.А.ЗАВАЛИШИНА, А.И.КУЗИНА, В.М.ТКАЧ, Ю.Т.ШАРАБЧИЕВ

В сборнике опубликованы материалы по вопросам биосинтеза, очистки стрептокиназы и других тромболитических ферментов микроорганизмов. Изложены сведения о некоторых свойствах тромболитических ферментов.

Сборник предназначен для микробиологов, биохимиков, фармакологов, а также специалистов, интересующихся вопросами тромболитизиса.

С $\frac{51000 - 004}{M338 - 79}$ 3 - 79 4107000000

В.Н.Никандров, В.А.Денисевич, А.В.Ефимов

ИЗУЧЕНИЕ ЛИЗИСА ФИБРИНОВОГО СГУСТКА
ПОД ДЕЙСТВИЕМ СТРЕПТОКИНАЗЫ С ПОМОЩЬЮ ТУРБИДИМЕТРИИ

(Минск)

Для исследования активности стрептокиназы (СК) предложен ряд методов, сущность которых сводится к активации с помощью СК плазминогена (Пг) и регистрации в последующем энзиматической активности плазмина (П). В целях такой регистрации используются разжижение фибриновых сгустков /1/, гидролиз казеина /2/ или синтетических субстратов /3/. Последние очень удобны в работе, но не всегда доступны. Кроме того, эстеразная активность П при активации СК порой не совпадает с протеолитической.

По-видимому, лизис фибриновых сгустков все же более объективно отражает сущность активации. Предложено несколько методов регистрации активности СК по лизису фибриновых сгустков /1/. Однако некоторые из них не совсем удобны в работе, так как требуют визуального наблюдения за процессом фибринолиза под действием нескольких концентраций СК /4/. Между тем измерение фибринолиза по времени распада сгустков считается недостаточно обоснованным теоретически /5/. Следует также заметить, что способы, основанные на "титровании" СК, по нашим наблюдениям, дают нестабильные результаты. Исследование же динамики фибринолиза в тонком слое /6/ требует продолжительного времени. Эти ограничения вызывают необходимость искать иные методические подходы к количественному определению активности СК.

Нами сделана попытка использовать динамику изменения мутности среды при переходах золь \rightleftharpoons гель для регистрации лизиса фибринового сгустка и количественной оценки активности СК.

Материалы и методы. Изучение кинетики распада фибриновых сгустков по изменению мутности среды проводили при температуре 37°C на ФЭК-56М, снабженном термостатирующим устройством. Динамику переходов золь \rightleftharpoons гель регистрировали по изменению оптической плотности инкубационной смеси через 30-60 секунд. Мутность среды (τ) рассчитывали по величине оптической плотности (D), используя формулу

$$\ln \frac{I_0}{I} = \tau x, \text{ где } \ln \frac{I_0}{I} = D,$$

x - расстояние, проходимое лучом света в среде /7/.

Для удобства результаты выражали величиной уменьшения мутности среды ($\Delta\tau$), приняв максимальную величину мутности за 100%.

Исследования выполнены на двух системах /4,8/:

1) человеческий фибриноген, 0,1%-ный раствор, человеческий тромбин, 0,2%-ный раствор, буфер фосфатный pH 7,4, 0,06 М, СК;

2) бычий фибриноген, 0,25%-ный раствор, бычий тромбин, 0,4%-ный раствор, концентрат Пг, 0,25%-ный раствор, буфер боратный pH 7,4, 0,08 М, СК.

В работе использованы фибриноген М и тромбин из человеческой крови (Белорусский НИИ гематологии и переливания крови), фибриноген и тромбин из бычьей крови (НИИЭМиГ Минздрава Литовской ССР); в качестве источника Пг - богатая β -глобулинами фракция человеческой крови (отходы гамма-глобулинового производства БелНИИЭМ); KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NaCl , $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ и H_3BO_4 были отечественного производства квалификации х.ч. Препараты СК высокой степени чистоты предоставлены сотрудниками лаборатории технологии ферментных препаратов отдела биохимии БелНИИЭМ. Белок в препаратах определяли по методу Лоури. Все исследования выполнены 4-5-кратно.

Результаты и обсуждение. Кривая изменения оптической плотности (D) среды при образовании и разжижении фибринового геля состоит из двух ветвей (рис.1): восходящей - условно соответствующей образованию фибринового геля, и нисходящей - характеризующей распад последнего. Поскольку для действия СК в первую очередь представляет интерес именно разрушение фибринового сгустка, мы рассматривали только нисходящую ветвь кривой.

Динамика лизиса фибринового сгустка существенно менялась при внесении в инкубационную смесь различных количеств СК (рис.2): при относительно больших количествах кинетическая кривая приближается к сигмоиде, с уменьшением концентрации СК до 14 мкг скорость изменения мутности среды постоянна. Дальнейшее уменьшение концентрации СК приводит к отклонению от линейной зависимости. Результаты исследований показали, что величина убыли мутности среды изменяется линейно в относительно узком диапазоне концентраций СК (рис.3). В целом вид кривой типичен для случаев с избытком энзима при лимите субстрата: с увеличением

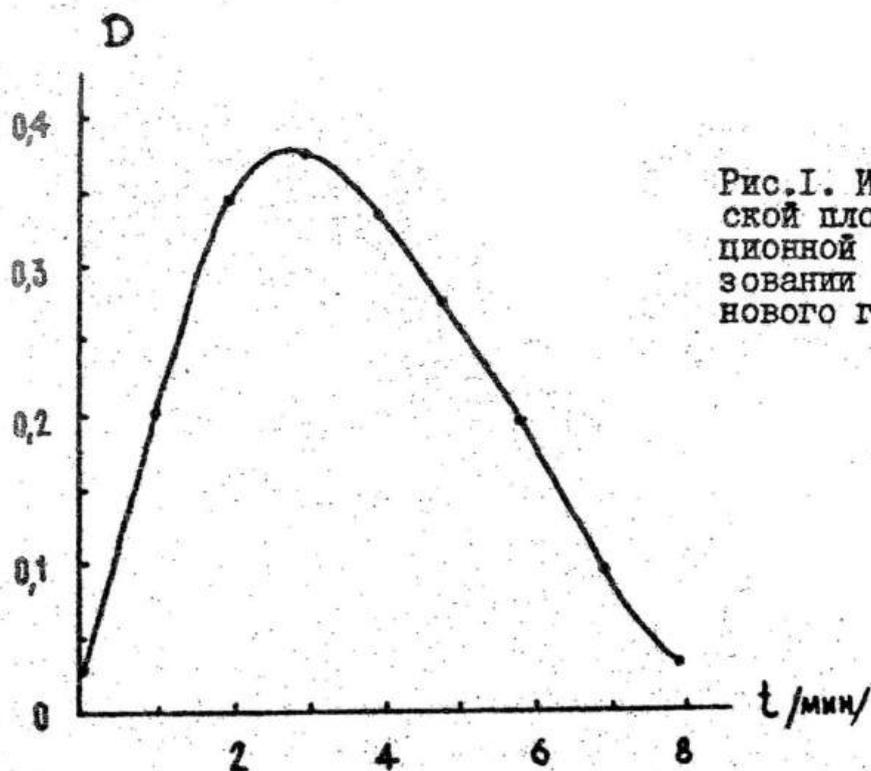


Рис. I. Изменение оптической плотности инкубационной смеси при образовании и распаде фибринового геля.

концентрации СК скорость изменения мутности среды возрастает. Однако по достижении определенной концентрации СК (10 мкг для препарата А и 8 мкг для препарата Б) наблюдается резкое замедление процесса изменения мутности. В литературе описан феномен подавления фибринолитической активности при очень высоких концентрациях СК, который заключается в затруднении доступа высокомолекулярного субстрата к активному центру при насыщении Пг молекулами СК с образованием комплексов типа Пг·СК·Пг /9/.

Вместе с тем данные, представленные на рис. 3, дают возможность оценить различия между двумя использованными препаратами СК. Максимум активности при добавлении препарата Б в инкубационную смесь наблюдается при более низкой его концентрации по сравнению с препаратом А. Однако величина падения мутности среды при использовании этого препарата меньшая, чем в случае с препаратом А. Можно полагать, что эти различия объясняются присутствием в препаратах СК каких-либо эффекторов, действующих на образующийся плазмин.

Все описанные исследования выполнены в системе I, характеризующейся присутствием в инкубационной смеси малых количеств Пг, обычных для коммерческих препаратов человеческого фибриногена. В дальнейшем динамика лизиса в этой системе была сопоставлена с характером распада фибринового сгустка в условиях

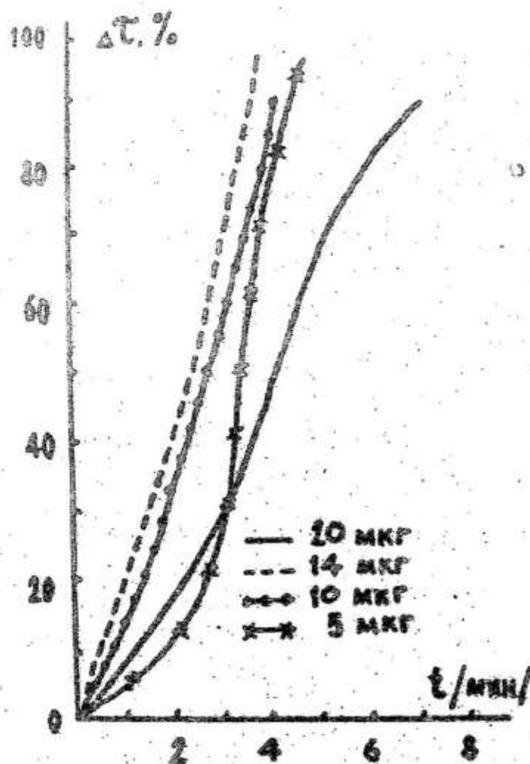


Рис.2.

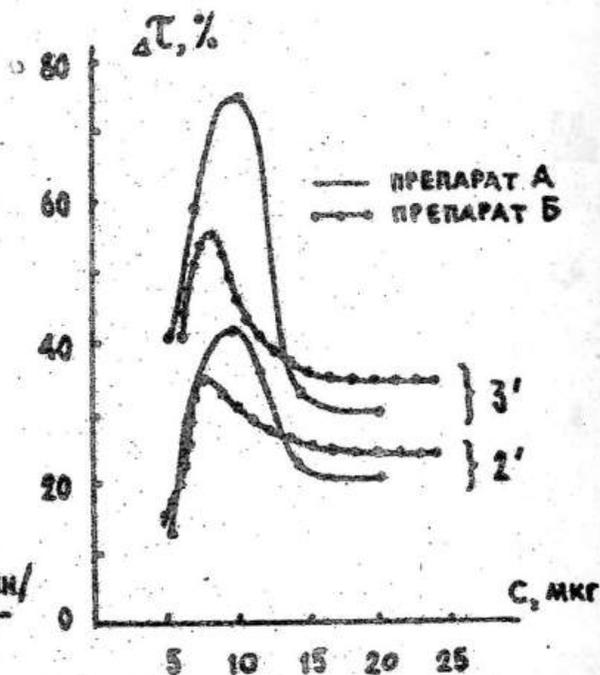


Рис.3.

Рис.2. Динамика растворения фибринового сгустка при внесении разных количеств СК в реакцию смесь.

Рис.3. Скорость изменения мутности среды при разрушении фибринового геля в зависимости от концентрации СК.

относительно большой концентрации Пг (система 2). Оказалось, что увеличение уровня зимогена резко изменяет динамику лизиса (рис.4). Под действием различных концентраций СК наблюдается большая разница в характере кинетических кривых. Однако существует диапазон концентраций СК, при которых скорость лизиса является постоянной, независимо от концентрации Пг. Отклонения от линейной зависимости при большом количестве Пг носят не только сигмоидный характер, но и приближающийся по форме к гиперболе.

Результаты расчета начальной скорости уменьшения мутности ($tg\alpha$) и изучения зависимости ее от концентрации СК в системе 2 показали, что график функции $tg\alpha$ от C представляет прямую, не проходящую через начало координат (рис.5). Экстраполяция к оси абсцисс дает некую концентрацию СК, при которой скорость равна нулю. Это означает, что существует "пороговая" концентра-

ция СК, необходимая для запуска активации Пг. Подобное явление, видимо, можно объяснить наличием в препарате Пг антиплазминов, поскольку нами использован препарат Пг недостаточной чистоты.

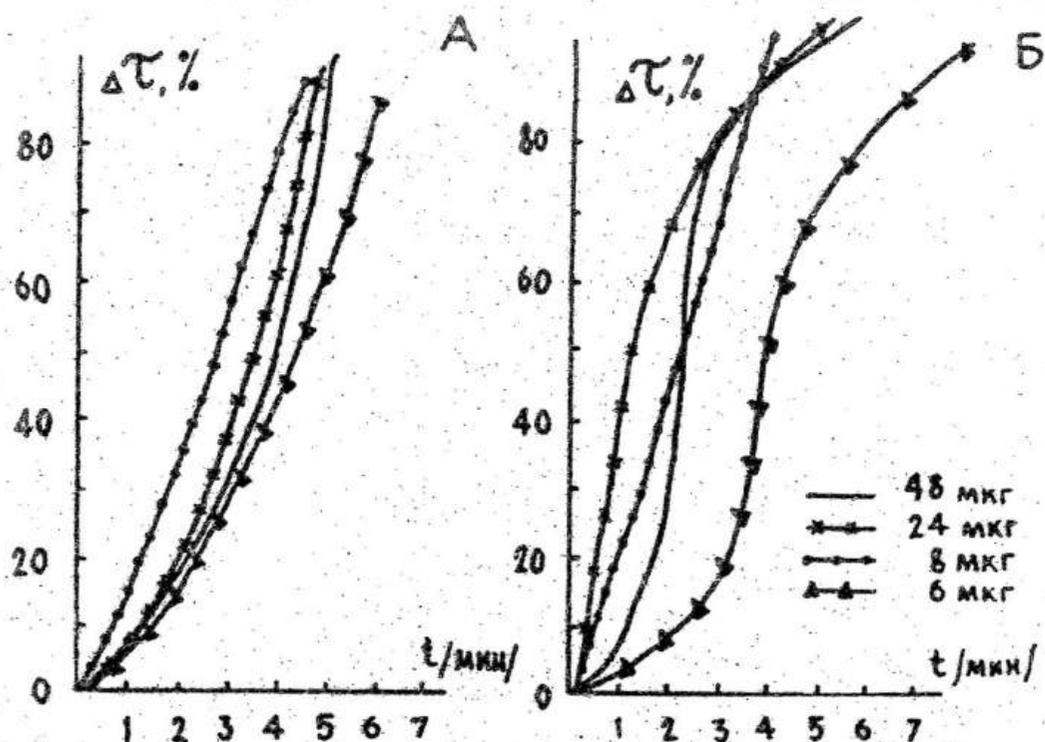


Рис.4. Кинетика изменения мутности среды при распаде фибринового геля под действием разных концентраций СК в условиях низких (А) и высоких (Б) концентраций Пг.

При фиксированной концентрации СК и Пг скорость распада фибринового геля будет всецело зависеть от их реакционной способности, т.е. определяться свойствами молекул. Это продемонстрировано на системе I в опыте по изучению динамики изменения мутности среды при использовании препарата СК, подвергнутого воздействию физического фактора (рис.6).

Полученные материалы позволяют сделать следующее заключение. Изучение инициируемого СК лизиса фибринового геля методом турбидиметрии, по-видимому, представляет определенный интерес. Было показано, что кинетика лизиса зависит от концентрации СК, Пг, а также свойств молекул СК. Применение способа в представленном варианте для количественного определения активности СК ограничено и требует его дальнейшей доработки. Трудность интерпретации результатов состоит в том, что еще не установлено, какие изменения мутности происходят при различной

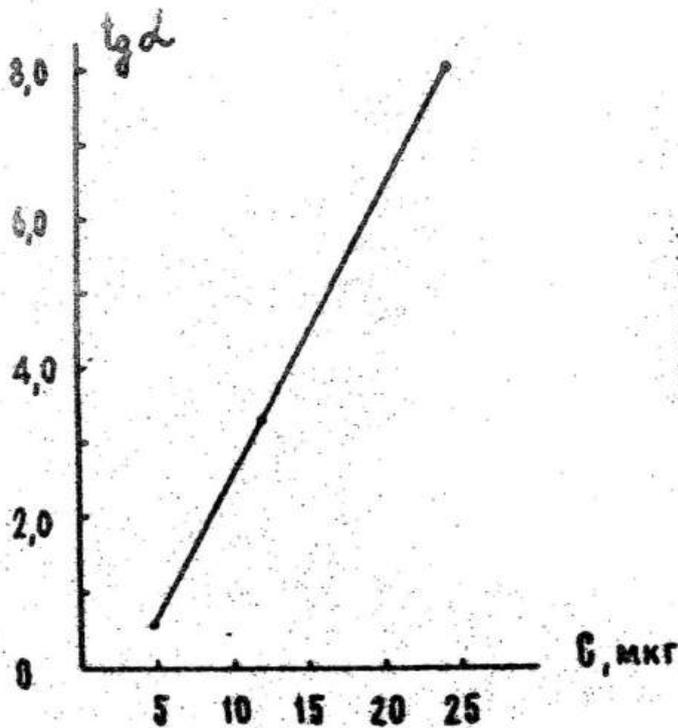


Рис.5. Зависимость начальной скорости изменения мутности ($tg\alpha$) от концентрации СК в инкубационной пробе.

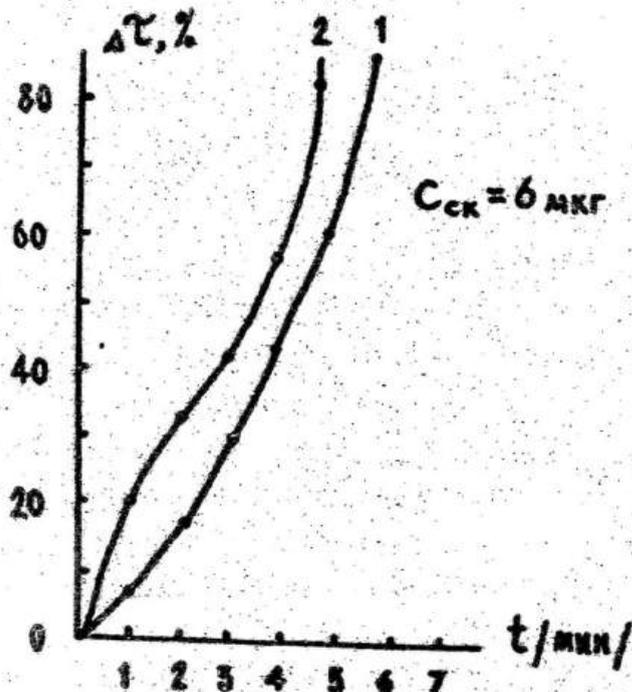


Рис.6. Характер растворения фибринового сгустка под действием intactного белка СК (1) и СК, подвергнутой воздействию физического фактора (2).

степени деградации фибрина под действием П. Предполагается, что процесс равномерен, а образующиеся продукты одинаковы. В действительности при фибринолизе происходит образование пептидов разной степени полимеризации и, по-видимому, стадии их

образования сопровождаются неодинаковыми изменениями мутности среды.

Л и т е р а т у р а

1. Савельвольф Г.Б., Сисенко В.И. - В кн.: Острая и хроническая стрептококковая инфекция. Л., 1967, 106-115. - 2. Vaughan D.R., Walton P.L. - Бюлл. ВОЗ, 1965, 33, 2, 236-243. - 3. Bell P.H., Dziobkowski G.T., Englert M.E. - *Analyt. Biochem.*, 1974, 61, 1, 200-208. - 4. Mozen M.M. - In: *Thrombosis and Bleeding Disorders. Theory and Methods.* Stutt.-N.Y.-London, 1971, 376-379. - 5. Surgenor D.M. - *Fed. Proc.*, 1960, 19, 1, 60. - 6. Ефимов В.С., Котов Ю.Б., Рачицкая Н.Г. и др. - *Фармакол. и токсикол.*, 1975, 4, 436-441. - 7. Уильямс В., Уильямс Х. *Физическая химия для биологов.* М., 1976. - 8. Каневская М.И., Коников А.П. - В кн.: *Детские капельные инфекции.* Л., 1953, 47-59. - 9. Sugie I., Ikai M., Ozio M., Nitta N. - *Nagoya Med. J.*, 1969, 18, 2, 103-112.

A STUDY OF LYSIS OF A FIBRINOUS CLOT
UNDER THE ACTION OF STREPTOKINASE BY TURBIDIMETRY
V.N.Nikandrov, V.A.Denisevich, A.V.Efimov

The changes of turbidity of the medium containing fibrinogen, trombin, plasminogen and streptokinase have been observed in formation and lysis of fibrinous clot. Differences in the dynamics of fibrinous gel lysis are shown when changing concentration of streptokinase and plasminogen.

СОДЕРЖАНИЕ

Раздел I. Стрептокиназа и проблемы создания тромболитических препаратов

Савченко Н.Е., Вотяков В.И., Никандров В.Н. Проблема тромболитической терапии и конструирование отечественного стрептококкового фибринолитического препарата 3

Андреевко Г.В. Регуляция фибринолиза в экспериментальных условиях 10

Ландау Н.С., Егоров Н.С. Фибринолитические ферменты непатогенных микроорганизмов 26

Вотяков В.И., Рытик П.Г., Лопатина Л.А., Ткач В.М. Опыт разработки технологии получения микробного фибринолитического препарата целиазы 33

Раздел II. Вопросы биосинтеза фибринолитических ферментов микроорганизмами

Рытик П.Г., Кузина А.И., Шарабчиев Ю.Т., Шатило Н.Л., Погудо А.И. Микробиологические аспекты получения препарата стрептокиназы (целиазы) 38

Шарабчиев Ю.Т., Шкуматова Л.Б. Опыт создания музея стрептокиназоактивных культур и идентификация β -гемолитических стрептококков группы С 43

Шкуматова Л.Б. Изучение естественной изменчивости β -гемолитического стрептококка, адаптированного к питательной среде 48

Егоров Н.С., Ландау Н.С. Биосинтез протеаз фибринолитического действия некоторыми микроорганизмами 52

Шатило Н.Л., Никандров В.Н., Кузина А.И., Дымонт Т.А., Погудо А.И. Особенности биосинтеза экстрацеллюлярных энзимов клонами β -гемолитического стрептококка штамма 921 58

CONTENTS

Section I. Streptokinase and problems of creating thrombolytic preparations

Savchenko N.E., Votyakov V.I., Nikandrov V.N. The problem of thrombolytic therapy and designing streptococcal fibrinolytic preparation in the USSR 3

Andreevko G.V. Regulation of experimental fibrinolysis 10

Landau N.S., Egorov N.S. Fibrinolytic enzymes of non-pathogenic microorganisms 26

Votyakov V.I., Rytik P.G., Lopatina L.A., Tkach V.M. Experience in working out the technology of microbial fibrinolytic preparation produc. 33

Section II. Questions of fibrinolytic enzyme biosynthesis by microorganisms

Rytik P.G., Kuzina A.I., Sharabchiev Yu.T., Shatilo N.L., Pogudo A.I. Microbiological aspects of streptokinase preparation production 38

Sharabchiev Yu.T., Shkumatova L.B. Experience of making streptokinase active culture stock identification of streptococcus β -hemolyticus group C 43

Shkumatova L.B. Study of natural variability of Streptococcus hemolyticus adapted to the cultural medium 48

Egorov N.S., Landau N.S. Biosynthesis of fibrinolytic proteases by some microorganisms 52

Shatilo N.L., Nikandrov V.N., Dymont T.A., Pogudo A.I. Peculiarities of extracellular enzyme biosynthesis by streptococcus β -hemolyticus strain in 921 clons 58

Кузина А.И., Шатило Н.Л., Погудо А.И., Буденная Г.Н. Усовершенствование питательной среды для культивирования β -гемолитического стрептококка группы С	64	Kuzina A.I., Shatilo N.L., Pogudo A.I., Budenaya G.N. Improvement of culture medium for cultivation of streptococcus β -hemolyticus group C	
Шарабчиев Ю.Т., Базыльчик Е.А. Применение метода диализа питательных сред для культивирования стрептококка и получения стрептокиназы	65	Sharabchiev Yu.T., Bazylchik E.A. Application of the method of culture medium dialysis for streptococcus cultivation and streptokinase production	
Раздел III. Очистка и свойства препаратов стрептокиназы		Section III. Purification and properties of the streptokinase preparations	
Лопатина Л.А., Никандров В.Н., Ткач В.М., Пленина Л.В. Актуальные аспекты получения очищенного препарата целлиазы	70	Lopatina L.A., Nikandrov V.N., Tkach V.M., Plenina L.V. Actual aspects of obtaining the purified preparation cellulase	
Ткач В.М., Пленина Л.В., Карезо Н.В., Пыжова Н.С. Разработка схемы очистки стрептокиназы С	79	Tkach V.M., Plenina L.V., Karezo N.V., Pyzhova N.S. Working out a scheme of streptokinase purification	
Пленина Л.В., Карезо Н.В., Пыжова Н.С. Использование некоторых сорбентов в схеме очистки стрептокиназы	85	Plenina L.V., Karezo N.V., Pyzhova N.S. Usage of some sorbents in the scheme of streptokinase purification	
Смирнова Е.М., Алексеева В.Н., Немирович-Данченко М.М., Шапкова Н.М. Использование методов гель-фильтрации и ионообменной хроматографии для очистки стрептокиназы	89	Smirnova E.M., Alexeeva V.N., Nemirovich-Danchenko M.M., Shashkova N.M. Usage of gel-filtration and ion exchange chromatography methods for streptokinase purification	
Никандров В.Н., Денисевич В.А., Ефимов А.В. Изучение лизиса фибринового сгустка под действием стрептокиназы с помощью турбидиметрии	95	Nikandrov V.N., Denisevich V.A., Efimov A.V. A study of lysis of a fibrinous clot under the action of streptokinase by turbidimetry	
Никандров В.Н., Дымонт Т.А., Пыжова Н.С. Активность стрептокиназы при инкубации в растворах различных соединений	101	Nikandrov V.N., Dymont T.A., Pyzhova N.S. Activity of streptokinase incubated in solutions of different compounds	
Ткач В.М., Карезо Н.В. Использование ионообменников в очистке стрептокиназы	108	Tkach V.M., Karezo N.V. Use of ion exchangers for streptokinase purification	
Шкуматова Л.Б., Шимкевич Р.Л., Бируля И.П., Кузина А.И. Применение гамма-лучей для стерилизации стрептокиназы	112	Shkumatova L.B., Shimkevich R.L., Birulya I.P., Kuzina A.I. Use of gamma-rays for sterilization of streptokinase	

Клейнер Г.И., Дендзе Б.Б.
Освобождение ферментных пре-
паратов от пирогенного липо-
полисахарида на примере L-
аспарагиназы E.coli . . .

Kleiner G.I., Dendze B.B. Pro-
duction of lipopolysaccharide
(LPS) pyrogen-free L-aspara-
ginase (L-asp) preparation

116

Раздел IV. Экспериментальные
и клинические испытания
тромболитических ферментов

Section IV. Experimental and
clinical trials of the
thrombolytic enzymes

Натрадзе Д.А., Николаевич
И.А., Масленников С.Г. Фибри-
нолитическая терапия тром-
боэмболии легочной артерии

124

Natradze D.A., Nikolaevich
I.A., Maslenikov S.G. Fibri-
nolytic therapy of pulmonary
artery thromboembolism

Савченко А.Н., Шевчук А.П.,
Ленсу С.М., Красовская Т.П.
Влияние стрептокиназы на
фибринолитическую активность
крови в эксперименте

128

Savchenko A.N., Shevchuk A.P.,
Lensu S.M., Krasovskaya T.P.
The influence of streptokina-
se on blood fibrinolytic ac-
tivity in the experiment

Терешин И.М., Вавилин Г.И.
О фибринолитической активнос-
ти некоторых ферментов мик-
робного происхождения . . .

130

Tereshin I.M., Vavilin G.I.
On fibrinolytic activity of
some microbial enzymes

УДК 577.15:616.151.5+576.8.06

О фибринолитической активности некоторых ферментов микробного происхождения. Терещин И.М., Вавилин Г.И. Стрептокиназа и другие тромболитические ферменты. Мн., 1979, с.130-133.

Изучена фибринолитическая активность ферментов микробного происхождения в зависимости от механизма их действия, способа иммобилизации, доз препарата и метода введения. Иммобилизация приводила к пролонгации специфического действия препарата в два-три раза.

Библиография: 19 названий.

Перевод рефератов на английский язык подготовлен сотрудниками Белорусского НИИ эпидемиологии и микробиологии Е.Г.Басалаевой, Л.Н.Вариводской, М.Е.Сергиевской. Рисунки И.Скалабова.

Стрептокиназа и другие
тромболитические ферменты
(Биосинтез, очистка, экспериментальные
и клинические испытания)

Подписано к печати 28.12.79. АТ 07009. Формат 60 x 84 1/16.
Бумага типографская № 1. Усл.печ.л. 8,37, уч.-изд.л. 8,0.
Тираж 500 экз. Заказ 50. Цена 1 р. 20 к.

Белорусский НИИ эпидемиологии и микробиологии. Минск, Ногина, 3.
Отпечатано на ротационной типографии Белсовтшофа.
Минск, пл.Свободы, 23.

