

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

УДК 577.15:542.978

В.Н.Никандров, Т.А.Дымонт, Н.С.Пыжова
АКТИВНОСТЬ СТРЕПТОКИНАЗЫ ПРИ ИНКУБАЦИИ
В РАСТВОРАХ РАЗЛИЧНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

(Минск)

В получении белковых препаратов высокой степени чистоты велико значение стабилизации макромолекул, т.е. сохранение их уникальной структуры и биологической активности. С повышением степени чистоты белков устойчивость их, как правило, снижается. Последнее характерно для стрептокиназы-СК /1/. Практика

нашей работы с высокоочищенными препаратами СК показала, что активность этого протеина способна быстро снижаться в условиях комнатной температуры. Это вызвало необходимость изыскания соединений, могущих предотвратить столь нежелательное явление.

В литературе имеются сообщения о протекционирующем действии на СК растворов сывороточного альбумина и желатина в условиях комнатной температуры /2,3/. Однако авторами были использованы препараты не нативного желатина, а Наемассел - патентованный кровезаменитель. Желатин в составе этого препарата подвергнут химической модификации, что ограничивает применение Наемассел в качестве стабилизатора. В случае изготовления препаратов для внутривенного введения использование при стабилизации бычьего сывороточного альбумина, с которым проведены эксперименты в упомянутых работах, нежелательно. Кроме того, исследования проводились в основном на сильно разведенных препаратах СК. Практика работы требует создания условий для сохранения активности и концентрированных препаратов СК, обладающих высокой активностью. В связи с этим целью настоящего исследования явилось изучение действия некоторых соединений на инактивацию СК в водных растворах при температуре 25°C.

Материалы и методы. Исследования проведены на высокоочищенных препаратах СК, предоставленных сотрудниками лаборатории технологии ферментных препаратов отдела биохимии БелНИИЭМ. Содержание белка составило в среднем 15 мг/мл, активность - от 102000 до 13107000 ед/мл. Белок в образцах определяли по методу Лоури /4/, активность СК - по лизису фибринового сгустка /5/.

В условиях постоянной температуры +25°C изучалась динамика активности СК при длительной инкубации в водных растворах β -аланина, серина, желатина, альбумина и гамма-глобулина из человеческой крови, экспериментального состава Н-1. Активность СК исследовали непосредственно после добавления водных растворов (0,2 мл на 1 мл СК) изучаемых соединений (нулевое время) и через 1,3,4,5,24 часа инкубации.

В работе использованы плазминоген (Пг), фибриноген, тромбин из человеческой крови (Белорусский НИИ гематологии и переливания крови), β -аланин - х.ч. (Reanal); DL-серин, DL- α -аланин - ч.д.а., ϵ -аминокапроновая кислота (ϵ -АКК) - фармакопейный препарат (отечественного производства); сывороточный

человеческий альбумин и гамма-глобулин (Белорусский НИИ эпидемиологии и микробиологии), желатин (пищевой и для внутривенных инъекций). Все опыты выполнены не менее чем 4-кратно.

Результаты и обсуждение. Для инактивации энзимов в растворах большое значение имеет природа растворителя. Известно, что присутствие следовых количеств тяжелых металлов в дистиллированной воде может в ряде случаев значительно ускорить инактивацию. Поэтому предварительно нами изучено поведение СК при растворении ее в дистиллированной, тридистиллированной воде и в фосфатном буфере pH 7,4.

Инкубация при температуре 25°C СК, растворенной в дистиллированной или тридистиллированной воде, сопровождалась отчетливым снижением фибринолитической активности (рис. I, А). Наблюдавшиеся в интервале 3-4 часа "перепады" активности СК, возможно, обуславливались какими-то конформационными изменениями молекул. Введение в среду инкубации ионов неорганического фосфата (фосфатный буфер 0,06 М) значительно усиливало падение активности СК. Поэтому в дальнейшей работе использовали растворы СК, приготовленные на дистиллированной воде.

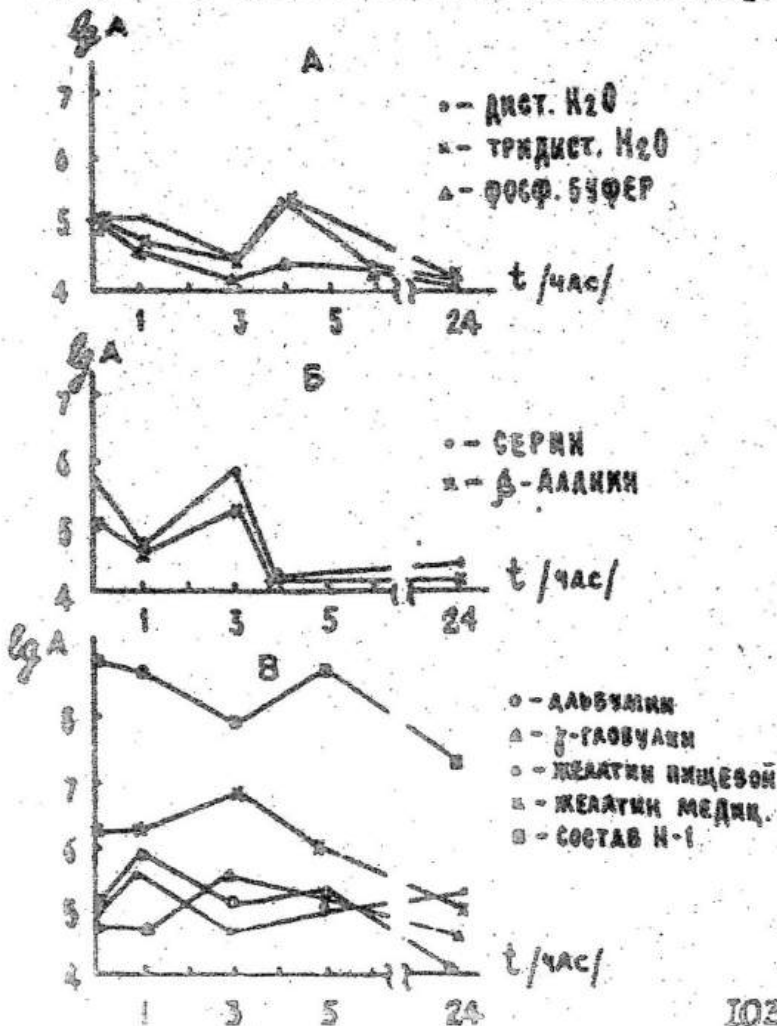


Рис. I. Влияние растворителя (А), аминокислот (Б), белков и экспериментального стабилизатора (В) на активность СК в растворе при 25°C.

Добавление к препаратам СК β -аланина или серина в концентрации 0,25 мМ (рис. I, Б) практически не вызывало изменения активности в нулевое время ($\lg A_{\text{исх.}} = 5,31$). В первые 3 часа отмечались некоторые колебания фибринолитической активности СК, затем — резкое снижение. Использование в наших опытах поли-электролитов — белков: человеческого сывороточного альбумина или гамма-глобулина в концентрации 10 мг на 1 мл препарата СК, а также пищевого желатина в концентрации 3,5 мг привело к значительному снижению активности уже в нулевое время ($\lg A_{\text{исх.}} = 6,51$), особенно заметному в опытах с гамма-глобулином (рис. I, В). В целом в указанных концентрациях эти белки оказались неэффективными для обеспечения высокого уровня активности СК. Замена пищевого желатина более очищенным белком (желатин для внутривенных инъекций) в такой же концентрации в первые 3 часа обусловила "поддержание" активности СК в пределах исходной ($\lg A_{\text{исх.}} = 6,51$), но затем фибринолитическая активность падала. Изложенные материалы свидетельствуют об отсутствии заметного стабилизирующего действия альбумина и относительно слабого — желатина на активность препаратов СК.

На основе данных литературы об особенностях свойств СК нами разработан состав, условно названный Н-Г. Оказалось, что добавление его к препарату СК резко увеличивало активность ($\lg A_{\text{исх.}} = 6,51$), а инкубация в течение 5 часов сопровождалась сдвигами последней в пределах одного порядка (см. рис. I, В). Затем наступало отчетливое снижение, но даже к 24 часам уровень активности оставался более высоким, чем в исходном препарате.

Весьма важным моментом в действии СК является образование комплексов с Пг, которые в случае сдвига соотношения концентраций СК и Пг в сторону преобладания первой характеризуются пониженной протеолитической активностью /6/. В этом случае СК, очевидно, частично предохраняется от расщепления плазмином, что имеет место при наличии свободной протеазы. В связи с этим нами изучена возможность использования подобного явления для сохранения активности СК. В опытах молярное соотношение СК:Пг составляло около 10:1.

Как и следовало ожидать, формирование такого комплекса заметно уменьшало фибринолитическую активность ($\lg A_{\text{исх.}} = 6,52$) в течение всего периода инкубации (рис. 2, А). Предварительная обработка Пг β -аланином в концентрации 0,25 мМ обусловила

менее заметное снижение исходной активности. Но в этом случае с I-го часа проявилось постепенное падение лизирующей способности инкубационной смеси. По-видимому, β -аланин обладает специфическим влиянием на взаимодействие СК и Пг, поскольку изменение положения аминогруппы в молекуле аминокислоты (обработка Пг α -аланином) резко снижало активность сразу же после смешивания всех компонентов (СК и Пг+ α -аланин). Увеличение концентрации Пг в смеси в 3 раза при неизменной концентрации β -аланина создавало в начальный период высокую фибринолитическую активность, которая в дальнейшем резко падала. Следует отметить, что при комбинированной обработке Пг β -аланином и ε -АКК в концентрациях 0,25 и 0,2 мМ соответственно и последующем смешивании с СК фибринолитическая активность смеси была меньшей, чем в отсутствие ε -АКК.

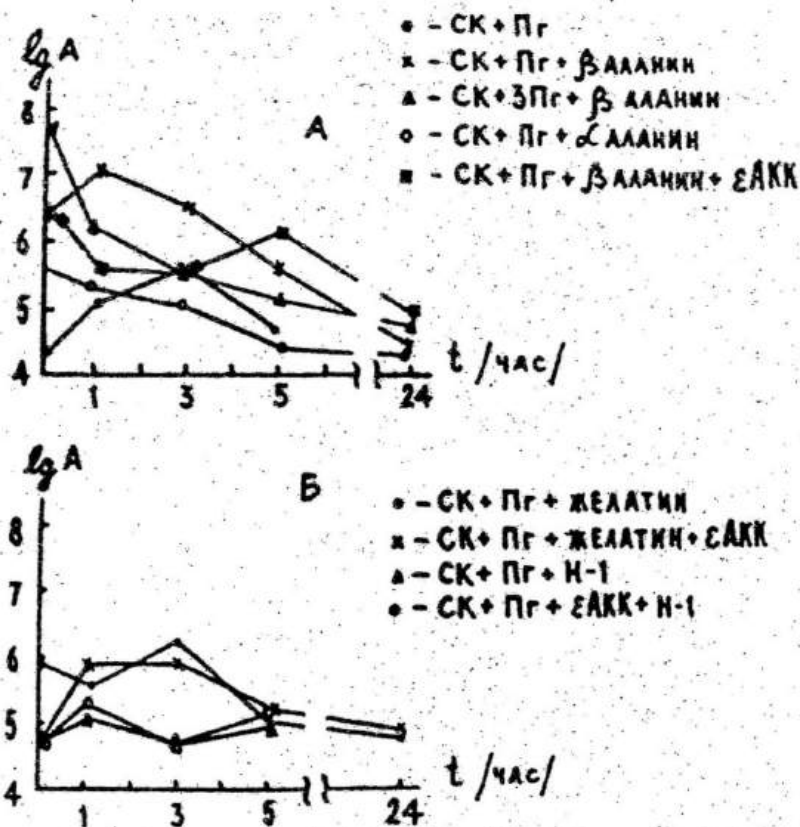


Рис. 2. Фибринолитическая активность смеси СК + Пг, инкубируемой при 25°C, в условиях предварительной обработки Пг некоторыми соединениями.

В процессе опытов было также выявлено, что состав Н-1 не только не повысил литическую активность смеси СК + Пг, но и

вызвал ее снижение по сравнению с исходной активностью СК ($\lg A_{\text{исх.}} = 6,82$). Небольшое стабилизирующее действие на активность смеси СК + Пг оказал желатин в концентрации 3,5 мг. Действие ϵ -АКК в комплексе с желатином было более резким в течение I-го часа, а затем менее заметным, чем в комплексе с β -аланином.

Изложенные материалы свидетельствуют о том, что сохранение и повышение активности СК в течение длительного периода зависит от присутствия в инкубационной среде различных соединений. В наших опытах наиболее выраженный эффект получен при использовании состава Н-I. Однако он оказался совершенно неэффективным в случае наличия в инкубационной среде Пг. На наш взгляд, возможны две альтернативы в объяснении этого явления: 1) при обработке Пг составом Н-I и последующем добавлении СК образуется сложный энзиматически неактивный комплекс; 2) Н-I не образует комплекса с СК: вследствие очень высокого сродства СК и Пг молекулы их взаимодействуют и становятся недоступными влиянию стабилизирующего состава.

Данные экспериментов, интерпретация которых требует все же известной осторожности, свидетельствуют в пользу какого-то специфического воздействия β -аланина на молекулы Пг, причем это действие обусловлено положением аминогруппы и частично снимается ϵ -АКК. Используемая нами концентрация ингибитора ниже концентрация, подавляющей активность плазмينا /7,8/, но близка вызывающей ингибирование процесса активации зимогена. Однако в настоящее время мы не располагаем фактами, разъясняющими указанное явление.

В наших опытах не проявилось высокое стабилизирующее действие инертных белков, описанное некоторыми исследователями /2,3,9/. Причем использованная в работе концентрация альбумина близка к примененной Martin. Отчасти такое несоответствие может быть обусловлено тем, что автор проводил работы с коммерческими препаратами СК (производства Behringwerke AG), которые уже могли содержать стабилизатор. Что касается желатина, то нами использована концентрация на порядок ниже, чем в опытах упомянутого исследователя (содержание этого белка в Naemassel составляет 3,5%).

Выяснение причин, обуславливающих различия в действии отдельных соединений на СК и СК + Пг, требует проведения дальнейших исследований.

Л и т е р а т у р а

1. Савельвольф Г.Б. - В кн.: Острая и хроническая стрептококковая инфекция. Л., 1967, 103-106. - 2. Martin M. - Thromb. et Diath. Haemorrh., 1975, 33, 586-596. - 3. Martin M., Auel H. - Anaesthetist, 1977, 26, 564-568. - 4. Lowry O.H., Rosenbrough N.Y. - J. Biol. Chem., 1951, 193-5. Каневская М.И., Конииков А.П. - В кн.: Детские капельные инфекции. Л., 1953, 47-58. - 6. Markus G., Werkheiser W.C. - J. Biol. Chem., 1964, 239, 8, 2637-2643. - 7. Веремеенко К.Н. Ферменты протеолиза и их ингибиторы в медицинской практике. Киев, 1971. - 8. Андрееенко Г.В. Фибринолиз. Химия и физиология процесса. М., 1967. - 9. Березин И.В., Кершенгольц Б.М., Угарова Н.Н. - Докл. АН СССР, 1975, 223, 5, 1256-1259.

ACTIVITY OF STREPTOKINASE INCUBATED IN SOLUTIONS OF DIFFERENT COMPOUNDS

V.N.Nikandrov, T.A.Dymont, N.S.Pyzhova

The influence of some amino acids and proteins on streptokinase activity in aqueous solutions incubated at temperature + 25°C has been studied. A weak protective action of gelatin and the full absence of the one in albumin, γ -globulin, β -alanine, and serine is shown. Considerable efficacy of the composition H-I is established. Differences in the action of some from the above-said compounds on streptokinase activity in the absence and presence of plasminogen in the incubation medium are revealed.

СО Д Е Р Ж А Н И Е

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

C O N T E N T S

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 Белсовинфо.
Минск, пл.Свободы, 23.

