

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.ЗАВАЛИЩИНА, 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 577.15.07+577.15:5'6.851.214

Н.Л.Шатило, В.Н.Никандров, А.И.Кузина, Т.А.Дымонт, А.И.Погудо  
ОСОБЕННОСТИ БИОСИНТЕЗА ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНЫХ ЭНЗИМОВ  
КЛОНАМИ  $\beta$ -ГЕМОЛИТИЧЕСКОГО СТРЕПТОКОККА ШТАММА 921\*  
(Минск)

В биосинтезе энзимов микроорганизмами при создании препа-

---

\* В работе принимала участие Л.Б.Шкуматова.

ратов для внутривенного введения важная роль отводится изысканию штамма-продуцента, сочетающего высокую биосинтетическую активность по основному компоненту с минимальным синтезом сопутствующих протеинов. В связи с этим штамм должен быть либо дефектным по синтезу последних, либо обладать значительной пластичностью метаболизма, что позволит направленно регулировать биосинтез отдельных внеклеточных энзимов.

В целях предварительной оценки пластичности биосинтетических процессов у продуцентов стрептокиназы (СК) нами изучена в зависимости от состава питательной среды способность к образованию СК стрептолизинов S и O (СЛ-S и СЛ-O), нейтральных протеаз (НП) клонами  $\beta$ -гемолитического стрептококка штамма 92I, выделенными при многократном пассировании на гидролизате казеина с мясным экстрактом. В одном случае отобраны колонии с наибольшей скоростью роста на указанной среде (клон М-I), а в другом - колонии большого размера при росте на плотных средах (клон I3).

Материал и методы. Микроорганизмы выращивали в периодической культуре при температуре  $+37^{\circ}\text{C}$  в течение 16 часов во флаконах емкостью 2 л. Для культивирования использовали гидролизат казеина (К), гидролизат казеина с мясным или кукурузным экстрактом (К+МЭ; К+КЭ), бульон Коникова (БК). Среда инокулировалась из расчета 200 млн. м.т./мл. Через 30-минутные интервалы в процессе культивирования осуществляли коррекцию pH до 7,2 с помощью 25%-ного раствора NaOH.

В динамике роста учитывали биомассу турбидиметрически и выражали в единицах оптической плотности /D/. В фильтратах культур определяли уровень белка /I/, активность СК /2/, СЛ-S и СЛ-O (по лизису взвеси эритроцитов барана), неспецифических НП /3/. Активность СК выражали в единицах Коникова, СЛ-S и СЛ-O - в мг освобождающегося при лизисе гемоглобина (Hb), НП - в мкМ тирозина в пересчете на 1 мл фильтрата культуры.

Все исследования выполнены 4-кратно.

Результаты и обсуждение. Установлено, что клон М-I отличается более быстрым ростом в течение первых 10-12 часов по сравнению с клоном I3 (рис.1). Особенно четко это проявилось при культивировании на К+МЭ, К+КЭ и БК. Не обнаружено принципиальных различий между клонами в максимально возможном уровне СК, но при культивировании на К+КЭ клон I3 все же продуцировал больше энзима, чем на остальных средах. У клона М-I разница

усматривается при культивировании на К и средах, содержащих экстракты: при отсутствии последних проявлялась тенденция к замедлению биосинтеза СК и снижению максимального уровня ее активности.

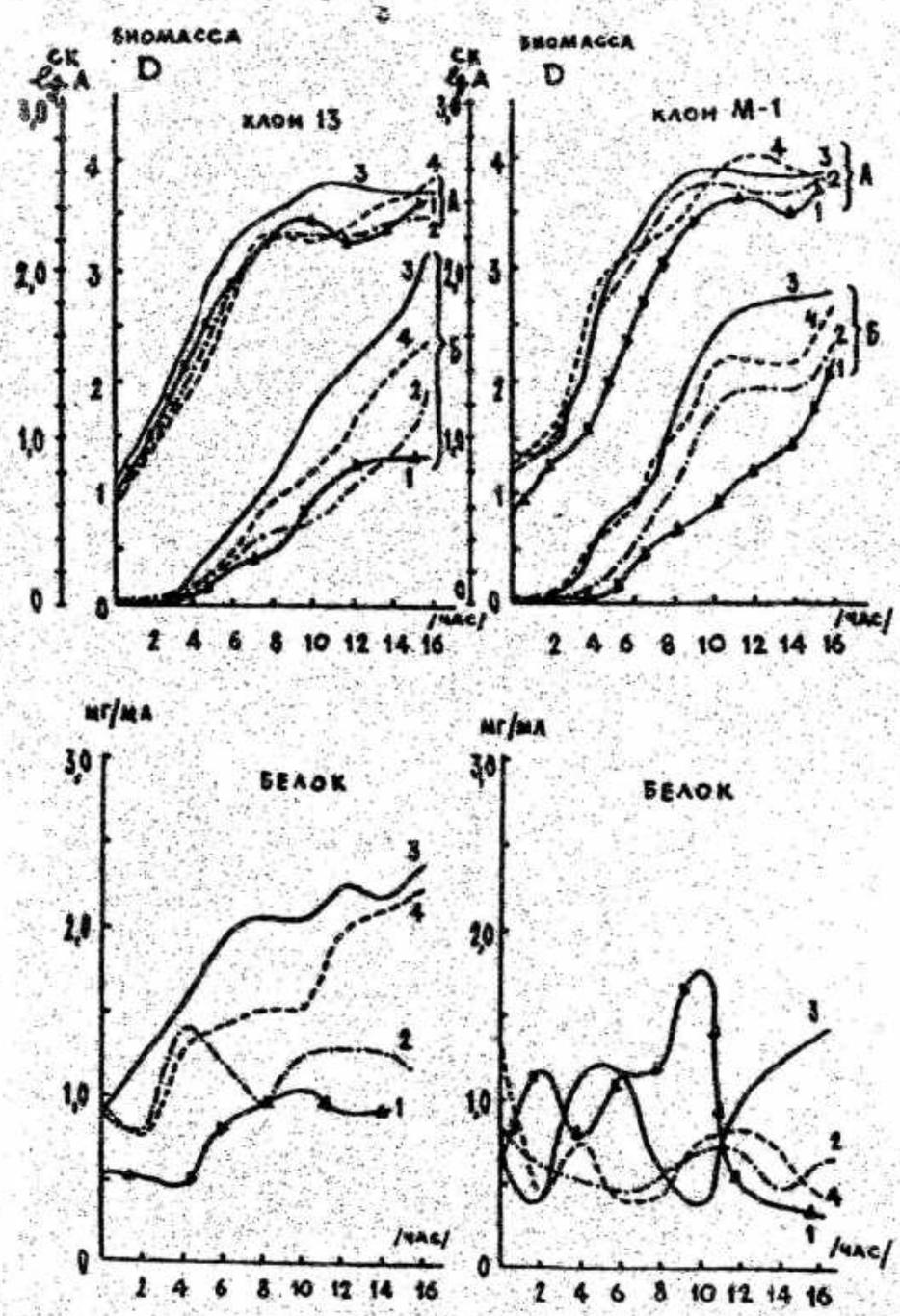


Рис. I. Динамика стрептокиназы (А), биомассы (Б) и внеклеточного белка при росте клонов гемолитического стрептококка на К (1), К+МЭ (2), К+КЭ (3), БК (4).

Рост стрептококков клонов 13 и М-1 сопровождался принципиально различной динамикой уровня внеклеточного белка.

Для клона 13 характерно нарастание последнего, особенно на К+КЭ и БК, а выращивание клона М-1 на К+МЭ и БК приводило в основном к уменьшению содержания протеинов в фильтратах культуры. В ходе культивирования указанного клона на К и К+КЭ нами обнаружен сложный колебательный характер сдвигов концентрации внеклеточного белка.

Оба клона синтезировали примерно одинаковое количество СЛ-8 на К+КЭ (рис.2). При росте на других питательных средах картина менялась. На всех средах, кроме К, клон М-1 продуцировал

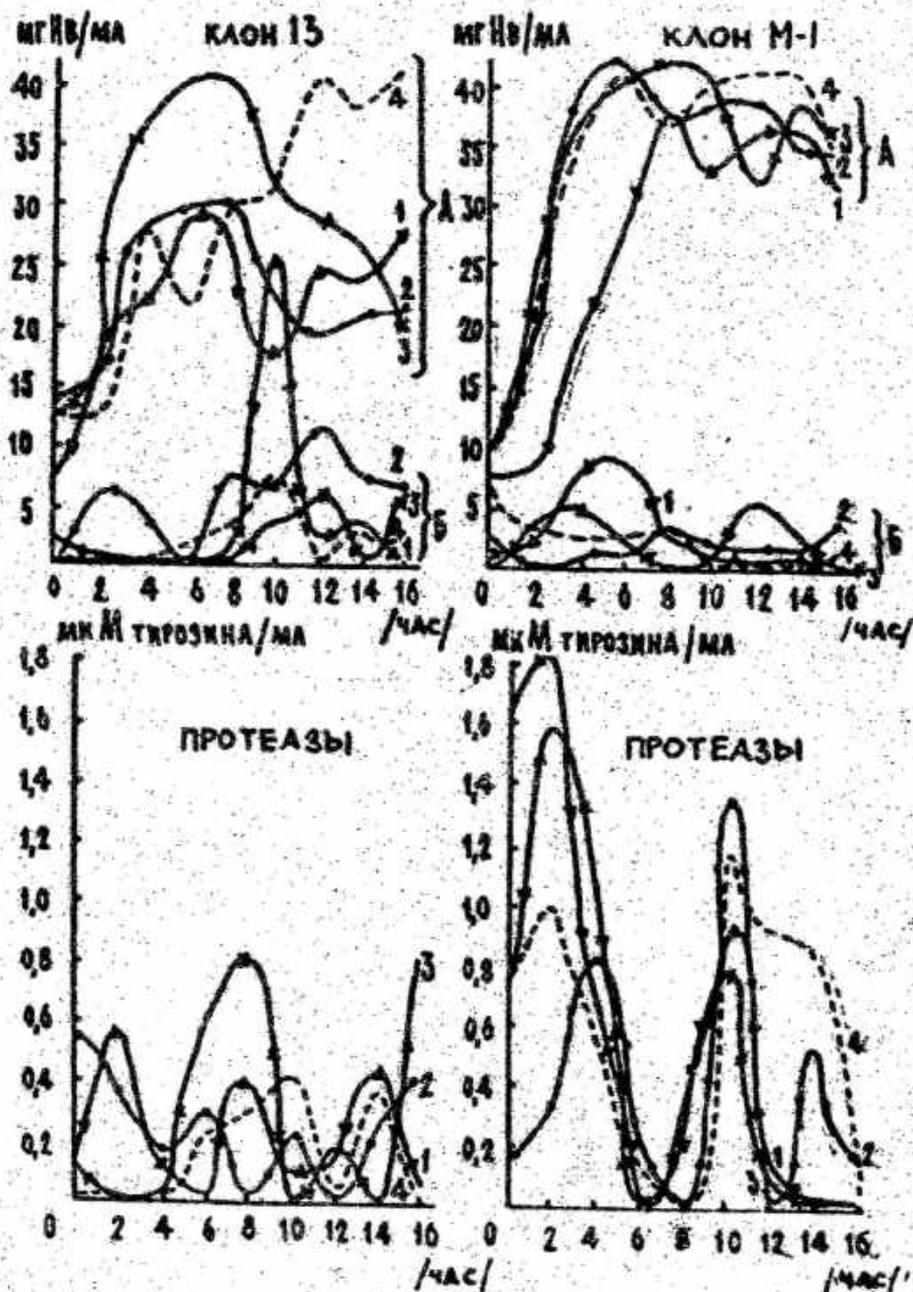


Рис.2. Динамика стрептолизина S (А), О (Б) и нейтральных протеаз при росте клонов гемолитического стрептококка на К (1), К+МЭ (2), К+КЭ (3), БК (4).

примерно одинаковое количество этого гемолизина. Исключение из состава питательных сред экстрактов (рост на К) привело к значительному замедлению образования СЛ-S и снижению его максимального уровня. Культивирование стрептококка клона I3 на разных средах сопровождалось более разнообразными изменениями синтеза СЛ-S. Наибольший уровень СЛ-0 наблюдался при культивировании клонов на К. Вместе с тем клон I3 синтезировал этот токсин в значительных количествах на К+МЭ, а рост клона М-I на этой среде сопровождался минимальным образованием СЛ-0.

Полученные результаты свидетельствуют о сложном характере накопления НП в динамике роста: наблюдалось несколько максимумов протеолитической активности (см. рис. 2). При культивировании клона М-I кривые сдвигов протеолитической активности на всех средах фактически однотипны, чего не отмечалось при росте клона I3. Кроме того, клон М-I синтезировал большее количество НП, чем клон I3. Сопоставление динамики активности НП и внеклеточного белка не позволяет установить какую-либо взаимосвязь между этими показателями при росте клона I3. У стрептококка М-I, как правило, увеличение протеолитической активности на всех средах, кроме К+КЭ, ассоциировано с ростом уровня внеклеточных протеинов.

Анализируя полученные материалы, можно отметить, что замена казеинового гидролизата в К+МЭ на мясной гидролизат БК у обоих клонов существенно не отразилась на уровне СК, но увеличила прирост биомассы. Подобная замена гидролизатов при культивировании клона I3 обуславливала изменение динамики СЛ-S и СЛ-0. Внесение в питательную среду экстрактов изменяло биосинтетическую способность исследованных клонов, однако отыскать закономерность в сдвигах не всегда удавалось из-за разного состава МЭ и КЭ. Переход на среду без МЭ (К) вызывал однотипную реакцию клонов по биосинтезу СЛ-S, СЛ-0 и НП, но не по биосинтезу СК и биомассе.

Итак, в ходе многоступенчатого рассева на К+МЭ штамма 92I выделены два клона, обладающие различной метаболической спецификой. Учитывая, что одним из проявлений адаптации является ускорение роста /4/, клон М-I, видимо, следует считать более адаптированным к К+МЭ. Вместе с тем сдвиги энзиматической активности при росте клона I3 все же более разнообразны (особенно по СЛ-S, СЛ-0 и НП), что в какой-то степени можно рас-

сма́тривать как свидетельство большей пластичности биосинтетических процессов у этого клона.

Отмеченный нами колебательный характер динамики НП в настоящее время трудно объяснить. В литературе имеются указания, что подобный сложный характер динамики активности внеклеточных нуклеаз может обуславливаться гетерогенностью энзимов, выходом в среду внутриклеточных деполимераз вследствие изменения проницаемости клеточных мембран /5/. В то же время в свете сообщений об образовании микроорганизмами ингибиторов протеолитических энзимов /6/ представляется возможным изменение отношений протеазы-ингибитора в динамике роста микробов, в результате чего в определенные периоды протеолитическая активность может не определяться.

#### Л и т е р а т у р а

1. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall J.R. - J. Biol. Chem., 1951, 193, 265-272.
2. Каневская М.И., Кони́ков А.П. - В кн.: Детские каплевые инфекции. Л., 1953, 47-58.
3. Kunitz M. - J. gen. Physiol., 1947, 30, 291.
4. Карасевич Ю.Н. Экспериментальная адаптация микроорганизмов. М., 1975.
5. Беляева М.И., Лешинская И.Б., Юсупова Д.В. - В кн.: Биосинтез микроорганизмами нуклеаз и протеаз. М., 1979, 5-32.
6. Безбородов А.М. - Прикл. биохим. и микробиол., 1978, 14, 1, 5-10.

#### PECULIARITIES OF EXTRACELLULAR ENZYME BIOSYNTHESIS BY STREPTOCOCCUS $\beta$ -HEMOLYTICUS STRAIN 921 CLONS

N.L. Shatilo, V.N. Nikandrov, T.A. Dymont, A.I. Pogudo

Biosynthesis of streptokinase, streptolysins S and O, neutral protease by streptococcus strain 921 clons cultivated in various culture media was studied. Clon M-1 was found to grow more rapidly and possess higher ability to synthesize neutral protease. Levels of extracellular protein in biosynthesis of streptokinase and streptolysins were shown to differ when clons 13 and M-1 were cultivated in different culture media.

## 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  $\beta$ -гемолитических стрептококков группы С . . . . . 43

Шкуматова Л.Б. Изучение естественной изменчивости  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -hemolyticus strain in 921 clons . . . . . 58

Кузина А.И., Шатило Н.Л., Погудо А.И., Буденная Г.Н. Усовершенствование питательной среды для культивирования $\beta$ -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 $\beta$ -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 . . .

116

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

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 Белсовинтфо.

Минск, пл.Свободы, 23.

