

Министерство здравоохранения БССР  
Белорусский ордена Трудового Красного Знамени  
научно-исследовательский институт  
эпидемиологии и микробиологии

Белорусское научное медицинское общество  
микробиологов, эпидемиологов и паразитологов

СТРЕПТОКИНАЗА  
В РЕГУЛЯЦИИ СВЕРТЫВАЮЩЕЙ  
И ПРОТИВОСВЕРТЫВАЮЩЕЙ  
СИСТЕМ КРОВИ

(Сборник научных работ)

Минск 1985

УДК 576.851.214+615.779.94:616-005.6

СТРЕПТОКИНАЗА В РЕГУЛЯЦИИ СВЕРТЫВАЮЩЕЙ  
И ПРОТИВОСВЕРТЫВАЮЩЕЙ СИСТЕМ КРОВИ

Стрептокиназа в регуляции свертывающей  
и противосвертывающей систем крови  
(Сборник научных работ). — Мн., 1985, с.

Сборник содержит материалы, посвященные актуальным вопросам молекулярно-биологической и физиологической регуляции гемостаза и фибринолиза с помощью тромболитических ферментов, создания тромболитических препаратов. Представлены результаты исследований по применению в клинической медицине отечественного тромболитического препарата целлазы.

Сборник предназначен для биохимиков, физиологов, микробиологов, гемостазиологов, а также ряда специалистов клинического профиля.

Ил. 23. Табл. 33. Библиогр.: 323 назв.

Научный рецензент —  
доктор биологических наук  
профессор Г.В.Андреев

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Н.Е.Савченко, В.И.Вотьяков — главные редакторы,  
П.Г.Рытик, В.Н.Никандров — заместители главных  
редакторов, Г.В.Воробьева — ответственный се-  
ретарь, Г.С.Давыдова, Т.А.Завалишина, Н.С.Ми-  
куцкий, В.М.Ткач

С 2007020000-001 I-85  
М338-85

© БелНИИЭМ, 1985 г.

ИЗУЧЕНИЕ МОДИФИКАЦИИ СТРЕПТОКИНАЗЫ ПОЛИСАХАРИДАМИ  
II. КОНФОРМАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СТРЕПТОКИНАЗЫ  
В СОСТАВЕ КОМПЛЕКСОВ

В.И.Никандров, Г.В.Воробьева, Г.С.Янковская  
(Минск)

В предыдущей работе /1/ сделано сообщение о получении комплексов стрептокиназы с полисахаридами — декстраном, рондексом, реорондексом, диальдегиддекстраном. Несомненно, что описанные рядом авторов /2, 3/ изменения каталитических свойств и стабильности комплексов ферментов с полимерными матрицами обусловлены определенными перестройками структуры белковой макромолекулы. Возможно, исследование этой взаимосвязи позволило бы прогнозировать свойства получаемых комплексов. Однако до настоящего времени вопрос этот остается недостаточно изученным.

В данной работе приведены результаты сравнительного исследования спектральными методами особенностей пространственной структуры стрептокиназы при включении ее в состав комплексов с различными полисахаридами декстранового типа.

Материалы и методы

Используемые материалы, способы получения комплексов, методики определения активности стрептокиназы и принятые сокращения приведены в сообщении I. Спектры флуоресценции сняты на приборе Фиса-55 с монохроматическим возбуждением при длинах

волн 280 и 296 нм. Спектры поглощения получены на спектрофотометре Spereord M 40, спектры кругового дихроизма (КД) — на спектрополяриметре Jasco-20 в интервале длин волн 205–250 нм и 250–300 нм, в кюветах длиной 0,2 и 1,0 см при чувствительности прибора 0,005 °/см, скорости сканирования — 0,2 нм/сек. Полученные данные выражали в виде молярной эллиптичности в расчете на средний аминокислотный остаток  $[\theta]$ . Средняя мол. масса остатка рассчитана из аминокислотного состава СК и равна 116 /4/. Все исследования проведены в 3–5-кратной повторности.

### Результаты и обсуждение

Известно, что спектр КД белка в области 250–350 нм обусловлен точечной асимметрией триптофана и тирозина, в области 200–250 нм — асимметрией формы всего пептидного каркаса. В дальней УФ-области спектр КД СК (рис. I) характеризуется отрицательной полосой с экстремумом при 206 нм и плечом при 220 нм, что указывает на присутствие в белке  $\alpha$ -спиральных и  $\beta$ -структурных участков ( $\alpha$ -спиральных  $\approx 24\%$ ,  $\beta$ -структурных  $\approx 13\%$  /5/). В ближней УФ-области наблюдается широкая отрицательная полоса с центром при 282 нм.

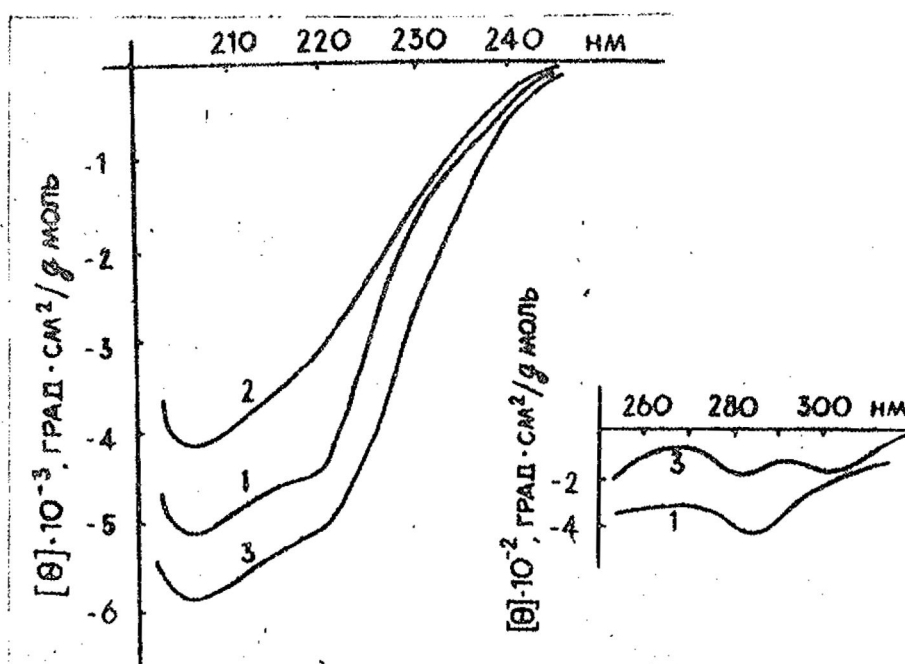


Рис. I. Спектры КД нативной СК (1), конъюгата СК-ДАД (2), комплекса СК-РПГ (3) в 0,1 М фосфатном буфере pH 8,2. Концентрация белка  $2 \cdot 10^{-5}$  М

При образовании комплексов со всеми использованными полисахаридами, судя по данным спектров КД в ближней УФ-области, наблюдается изменение микроокружения хромофорных групп белка, свидетельствующее о перестройках его третичной структуры (см. таблицу). Величина эллиптичности при 282 нм в зависимости от характера полисахарида изменяется по-разному, однако даже заметное уменьшение ее при взаимодействии СК с РПГ или РД не сопровождается изменениями каталитической активности /1/.

Параметры спектров флуоресценции и кругового дихроизма стрептокиназы и ее комплексов с полисахаридами

Соотношение СК/полисахарид в комплексах, моль/моль	Спектры флуоресценции, pH 8,04 $\lambda_{\text{возб.}} = 296 \text{ нм}$			Спектры КД, pH 8,04	
	$\lambda_{\text{max}}, \text{ нм}$	$\Delta \lambda, \text{ нм}$	$J_{\text{отн}}$	$[\theta]_{220} \cdot 10^{-3}$	$[\theta]_{282} \cdot 10^{-2}$
С РПГ, 1:15	338, 347 пл.	70	0,81	5,08	2,00
С РД, 1:15	342 346-352 пл.	66	0,51	4,94	1,70
С рео-РД, 1:15	346, 352 пл.	66	0,43	4,61	3,70
С ДАД, 1:2	336 пл., 344	65	0,96	2,70	-
СК (контроль)	346	64	1,00	4,47	4,68

Дополнительная информация об изменении третичной структуры получена с помощью метода флуоресценции. Ранее нами был описан /5/ спектр триптофановой флуоресценции нативной СК ( $\lambda_{\text{max}} = 344 \text{ нм}$ ,  $\Delta \lambda = 64 \text{ нм}$ , в нейтральной зоне pH). Можно полагать, что большая полуширина спектров флуоресценции обусловлена неоднородностью микроокружения содержащихся в СК 4 остатков триптофана, а также подвижностью структуры СК /5/. При взаимодействии СК с полисахаридами во всех случаях в спектрах флуоресценции наблюдается появление дополнительного максимума или плеча, уменьшение относительной интенсивности флуоресценции (см. таблицу и рис. 2).

Структурность спектров в данном случае, по-видимому, отражает ограничение подвижности триптофанилов молекулы СК в результате образования дополнительных связей с полисахаридами. Это согласуется с данными /6/ о появлении структуры в спектрах флуоресценции белков при исследовании их в кристаллическом

состоянии или при низких температурах. Кроме того, нами было установлено, что при образовании комплексов отсутствуют спонтанные колебания активности СК в водных растворах /1/.

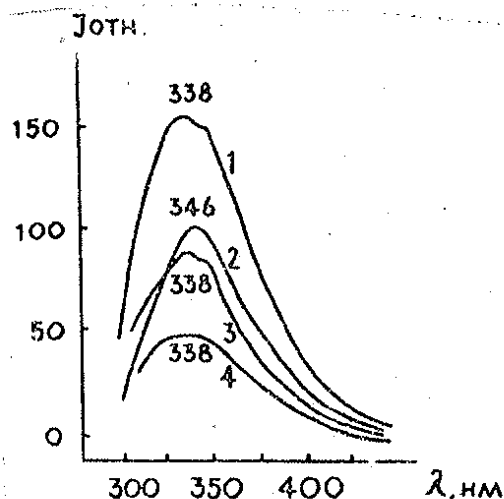


Рис.2. Спектры флуоресценции в 0,06 М фосфатном буфере рН 8,04 нативной СК: при  $\lambda_{\text{возб}} = 280 \text{ нм}$  (1) и при  $\lambda_{\text{возб}} = 296 \text{ нм}$  (2), комплекса СК-РПГ 1:10: при  $\lambda_{\text{возб}} = 296 \text{ нм}$  (3) и при  $\lambda_{\text{возб}} = 280 \text{ нм}$  (4). Концентрация белка  $5 \cdot 10^{-6} \text{ М}$ .

О характере изменений конформации СК при взаимодействии с полисахаридами позволяют судить также результаты исследования флуоресценции, возбуждаемой при 280 нм. Если для нативной СК при возбуждении 280 нм интенсивность люминесценции более высока, чем при возбуждении 296 нм, то в случае комплекса СК-РПГ картина противоположная. Очевидно, эти изменения обусловлены полным тушением остатков тирозина (которые в СК локализованы на поверхности макромолекулы /5/ при связывании белка с полисахаридами).

Важной особенностью комплексообразования СК с декстранами являются изменения вторичной структуры, регистрируемые по спектрам КД в дальней УФ-области. При образовании комплексов СК с РПГ, РД и рео-РД (невалентное взаимодействие) эллиптичность при 220 нм, соответствующая количеству  $\alpha$ -спиральных участков, несколько увеличивается. Это согласуется с мнением о том, что разрушение третичной структуры белка в ряде случаев может приводить к дополнительной спирализации /7/.

При ковалентном связывании СК с ДАД эллиптичность при 220 нм уменьшается, что свидетельствует о разрушении  $\alpha$ -спиралей, возможно, из-за связывания аминогрупп, существенных для спирализации молекул белка. Как мы уже отмечали /1/, образование конъюгатов с ДАД приводит к снижению активности СК, которое зависит от числа образующихся ковалентных связей. Причиной снижения каталитической активности могут быть не только стерические затруднения при контактах конъюгата с молекулой плазминогена, но и дезорганизация центров связывания с плазминогеном

вследствие нарушения взаимодействий аминокислотных остатков в молекуле СК.

Изложенные материалы позволяют считать, что при образовании комплексов с декстранами пространственная структура СК подвергается изменениям, зависящим от способа связывания и типа матрицы. Однако только при деспирализации СК происходит снижение ее каталитической активности.

#### Л и т е р а т у р а

1. Вотяков В.И., Воробьева Г.В., Никандров В.Н. и др. - В наст. сб., - 2. Heind M. Chr. et al. *Biochim. et biophys. Acta*, 1980, 624, I, 51-59. - 3. Кутузова Г.Д., Угарова Н.Н., Березин И.В. - *Биоорг. химия*, 1982, т.8, № II, с.1445-1461. -
4. Morgan F.L., Henschen A. - *Biochim. biophys. Acta*, 1969, 181, 93. - 5. Никандров В.Н., Воробьева Г.В., Демидчик Н.В. - В кн.: VI Всесоюзный симпозиум по химии белков и пептидов: Тез. докл. Рига, 1983, с.194-195. - 6. Баренбойм Г.М., Доманский А.Н., Туроверов К.К. Люминесценция биополимеров и клеток. М.-Л., 1966. - 7. Бреслер С.Е., Кушнер В.П., Френкель С.Я. - *Биохимия*, 1959, т.24, № 4, с.685-696.

# СОДЕРЖАНИЕ

Вотьяков В.И., Никандров В.Н., Савченко Н.Е. Актуальные вопросы и тенденции исследований в области создания тромболитических препаратов на основе энзимов микробного происхождения . . . . . 3

## Раздел I. Актуальные вопросы применения препаратов стрептокиназы в клинической медицине

Микуцкий Н.С., Савченко А.Н., Петров Ю.П., Ленсу С.М. Сравнительная оценка эффективности тромболитической терапии острого инфаркта миокарда при селективном внутривенном введении отечественного тромболитического препарата целиазы и авелизина (ГДР) . . . . . 10

Натрадзе Д.А. Первый опыт клинического применения целиазы . . . . . 12

Ильин В.Н., Леонтьев С.Г., Чиркова Л.Д., Данилова Л.М., Савельева С.И. Лечение массивной тромбоэмболии легочной артерии регионарной инфузией малых доз целиазы с комплексом антитромботических средств. . . . 14

Голиков А.П., Зверева Т.В., Платонова Т.К. Применение целиазы для лечения больных инфарктом миокарда . . . . . 19

Бокарев И.Н., Буторов В.Н. Опыт клинического применения целиазы и лабораторные методы контроля за терапией . . . . . 25

Лисов В.А., Савенков М.П., Скворцова М.В., Бувальцев В.И. Системный тромболизис у больных острым инфарктом миокарда с помощью целиазы . . . . . 26

Петров Ю.П., Костин Г.М., Бекренева С.А., Ленсу С.М., Микуцкий Н.С., Савченко А.Н. Динамика реологических свойств крови у больных острым инфарктом миокарда при тромболитической терапии . . . . . 32

Баркаган З.С. Альтернативные пути свертывания крови и патогенез тромбозов, обусловленных применением тромболитиков . . . . . 35

Иванов Е.П., Смолова Г.Б., Иванов В.Е., Большов В.В. Применение целиазы для коррекции гиперкоагуляционной и тромботической стадий острого и хронического ДВС . . . . . 39

## Раздел II. Теоретические и технологические аспекты получения препаратов стрептокиназы и других тромболитиков

Никандров В.Н. Значение исследований структурно-каталитической специфики стрептокиназы для технологии получения ее препаратов . . . . . 43

Давыдова Г.С., Рытик П.Г., Шатило Н.Л. Вопросы конструирования и оценки казеиновых питательных сред для культивирования стрептококка - продуцента стрептокиназы . . . . . 58



Давыдова Г.С., Шатило Н.Д. Закономерности синтеза стрептокиназы при многоциклическом культивировании продуцента . . . . .	64
Давыдова Г.С., Шатило Н.Д., Вишневецкая Л.В., Вотяков В.И. К характеристике штаммовых различий продуцента стрептокиназы . . . . .	59
Вотяков В.И., Воробьева Г.В., Никандров В.Н., Торчилин В.П., Скоростецкая Л.А., Дымонт Т.А., Цыманович С.Г., Наумович С.А., Лапковский М.А. Изучение модификации стрептокиназы полисахаридами. I. Получение производных стрептокиназы . . . . .	74
Никандров В.Н., Воробьева Г.В., Янковская Г.С. Изучение модификации стрептокиназы полисахаридами. II. Конформационные изменения стрептокиназы в составе комплексов . . . . .	83
Москвичев Б.В. Состояние научных исследований в области разработки модифицированных гидрофильными полимерами фибринолитиков белковой природы . . . . .	87
Алексеева В.Н., Лебедева В.В., Шашкова Н.М., Немирович-Данченко М.М. Получение стрептокиназы в различных условиях и характеристика фермента . . . . .	91
Бойко В.И., Ткач В.М., Бессчастнова А.П., Пленина Л.В., Шкуматова Л.Б., Карезо Н.В., Назаренко Е.Б., Соломенник И.Ю. Использование ферментативного казеиново-дрожжевого гидролизата как основы питательной среды для культивирования продуцента стрептокиназы . . . . .	96
Бойко В.И., Пленина Л.В., Ткач В.М., Карезо Н.В., Соломенник И.Ю., Назаренко Е.Б., Бессчастнова А.П., Шкуматова Л.Б. Влияние продолжительности культивирования гемолитического стрептококка на уровень энзимов в культуральной жидкости . . . . .	99
Пленина Л.В., Карезо Н.В. Применение анионообменной и аффинной хроматографии для очистки стрептокиназы . . . . .	102
Демидчик Н.В. Получение плазминогена кролика и крупного рогатого скота методом аффинной хроматографии на полимер-лизин-силохроме . . . . .	109
Веремеенко К.Н., Кизим А.Л. Действие комплексно-связанного с альфа <sub>2</sub> -макрोगлобулином плазмина на фибрин и фибриноген . . . . .	113
Кудинов С.А., Веревка С.В., Гриненко Т.В. Лигандная специфичность участков белок-белкового взаимодействия молекулы плазминогена человека . . . . .	116
<b>Раздел III. Регуляция гемостаза и фибринолиза, возможности использования различных ферментов активаторного и фибринолитического действия</b>	
Кудряшов Б.А., Ляпина Л.А. Физиологические растворители нестабилизированного фибрина . . . . .	121
Розенфельд Н.А. Влияние гепарина на процессы самосборки фибрина и лизиса его плазмином . . . . .	127

Андреевко Г.В. Тканевые активаторы плазминогена . . .	I32
Егоров Н.С., Ландау Н.С., Бунк Л.И. Интенсификация биосинтеза тромболитических ферментов микробного происхождения . . . . .	I69
Даниличев В.Ф., Гребенник А.В., Кольцова С.В., Кузнецова Н.П., Мишаева Р.Н., Самсонов Г.В. Экспериментальное изучение урокиназы и ее иммобилизованных форм при гипеме . . . . .	I43
Кузник Б.И., Цыбиков Н.Н., Морозов В.Г., Хавинсон В.Х., Степанова Т.Н., Хышова Д.Р., Писаревская Л.И., Малезик Л.П., Мамедов Я.З., Махакова Г.Ч., Арушанян Л.Г., Степанов А.В., Пинелис И.С. Влияние основных полипептидов на иммуногенез и гемостаз . . . . .	I46
Парадеева И.К., Осипов С.Н., Востриков В.В., Шабалин В.Н. Коррекция агрегатного состояния крови аллогенным активатором плазминогена . . . . .	I50
Черкашин Г.В., Момот А.П., Ласинская А.Б., Перегудова И.Г. Система гемостаза при экспериментальном инфекционно-токсическом состоянии, вызванном <i>Listeria monocytogenes</i> . . . . .	I53
Глазунова Г.А., Волкова И.А. Сравнительный анализ дефибрирующего действия ядов змей отечественной фауны . . . . .	I59