

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 целиазы.

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.

Раздел II. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ СТРЕПТОКИНАЗЫ И ДРУГИХ ТРОМБОЛИТИКОВ

УДК 576.351.214:577.15.07

ЗНАЧЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ СТРУКТУРНО-КАТАЛИТИЧЕСКОЙ СПЕЦИФИКИ СТРЕПТОКИНАЗЫ ДЛЯ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ЕЕ ПРЕПАРАТОВ

В.Н.Никандров
(Минск)

Широкое и многоплановое использование препаратов стрептокиназы (СК) в клинической медицине диктует необходимость интенсификации технологии их получения, а также более жесткие требования к чистоте конечного продукта. Это заставляет искать новые подходы к оптимизации технологии, к очистке препаратов. Последний момент особенно сложен, поскольку в отношении переработки сырья имеющиеся теоретические концепции касаются лишь отдельных процессов выделения ферментов (например, ионнообменной хроматографии), но мало внимания обращается на свойства самой макромолекулы. Даже в монографиях последних лет, посвященных технологии ферментных препаратов /1,2/, связь структурно-каталитической специфики целевого продукта с технологическим процессом его выделения не рассматривается. По-видимому, это объясняется недостаточной информацией по данному вопросу. Ранее, подчеркивая сложность и многогранность проблемы конструирования тромболитических препаратов, мы уже отмечали значение структурно-каталитического аспекта /3/, который, по существу, определяет технологию получения этих препаратов.

В настоящей статье проанализированы существующие подходы к выделению препаратов СК на основе установленных нами особенностей структурно-каталитических свойств СК, имеющих в литературе сведений по данному вопросу и опыта разработки отечественного препарата СК, приобретенного институтом на протяжении ряда лет.

С позиций технологии наиболее существенными сторонами структурно-каталитической специфики СК являются физико-химические особенности ее молекулы, структурная лабильность и механизмы инактивации. На всех трех этапах технологии (приготовление сырья, выделение и очистка СК, сохранение активности очищенного продукта) эти стороны играют важную роль. Значение структурно-каталитического аспекта в подготовке сырья сводится к путям воздействия на молекулы уже синтезированного продуцента во внешнюю среду белка, т.е. к регуляции активности СК в культуральной жидкости. К таким путям относятся /4/: модификации первичной структуры, в том числе в ходе протеолиза, конформационные перестройки, возможные изменения гетерогенности СК, взаимодействия ее с рядом присутствующих в культуральной жидкости небелковых компонентов.

Молекула СК может подвергаться в культуральной жидкости различной степени деградации присутствующими неспецифическими протеиназами. Судя по зонам оптимума pH лизиса белковых субстратов, воздействию эффекторов, в культуральной жидкости возможно присутствие нескольких энзимов протеолитического действия /5/. Особенности этих энзимов практически не изучены. Известно лишь, что гемолитические стрептококки могут синтезировать тиоловую протеиназу, активную при pH 7,4-7,7. Этот энзим лизирует эфирные и пептидные субстраты с довольно низкой скоростью, но активен в отношении белковых субстратов /6/.

Известно, что при частичном протеолизе молекула СК может сохранять каталитическую активность, хотя молекулярная масса снижается на 20-30 % /7/. Такие модифицированные молекулы обладают повышенной лабильностью: в отличие от нативной, СК, подвергнутая протеолитической деградации, неустойчива в кислой зоне pH /8/. Это в какой-то мере напоминает образование метастабильных продуктов при протеолитической или аутолитической активации зимогенов протеиназ и гормонов /9/. Изложенное позволяет предположить, что высокая устойчивая активность СК в культуральной жидкости может быть достигнута при низкой протеолитической активности или при полном ее отсутствии. Проведенные в нашей лаборатории исследования Н.С.Пыжовой на 63 образцах культуральной жидкости в определенной степени свидетельствуют в пользу такого мнения (рис. I). Однако, по-видимому, отношения стрептокиназной и протеолитической активностей более сложны, поскольку коэффициент корреляции их очень мал.

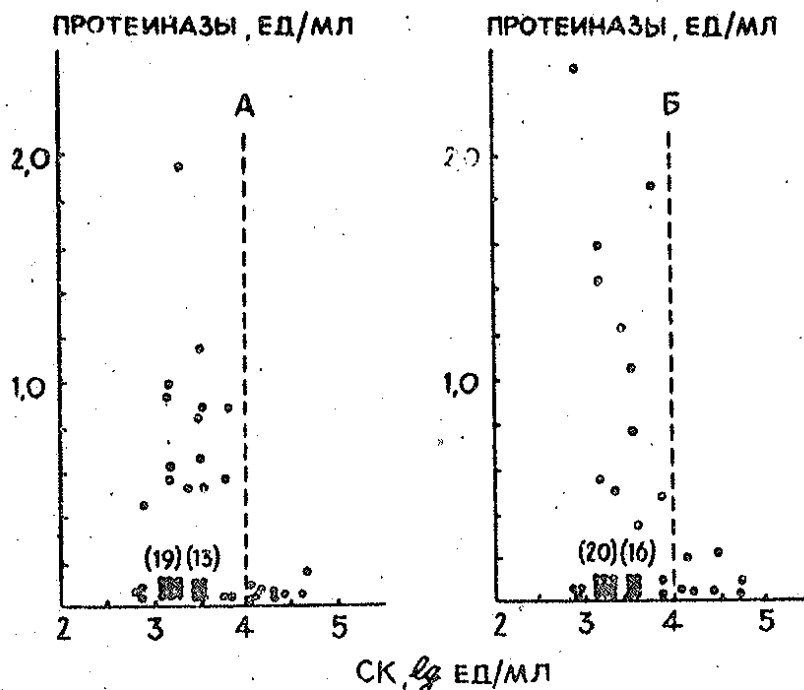


Рис. I. Соотношение активностей стрептокиназы и протеиназ (А - "кислые", Б - "нейтральные") в культуральной жидкости

Из других типов модификаций белковой структуры в культуральной жидкости может иметь значение модификация отдельных аминокислотных остатков, существенных для каталитической функции СК. На основе результатов изучения химической модификации СК, полученных нами совместно с О.А. Казючич, возникло предположение о важном значении в каталитическом действии СК аминогрупп лизина, остатков триптофана и гистидина. В культуральной жидкости существует возможность функционирования компонентов оксидоредуктазных систем стрептококка, в том числе тех, которые способны к генерированию $O_2^{\cdot -}$ и OH^{\cdot} . Эти радикалы, по мнению некоторых исследователей /10/, могут модифицировать остатки триптофана в белковых молекулах. Полученные в нашей лаборатории материалы свидетельствуют как раз о том, что остатки триптофана локализованы в карманах поверхности молекулы СК и в целом доступны окружающему раствору /11/, а значит, могут быть достаточно уязвимы.

Находясь в культуральной жидкости, молекула СК может подвергаться и конформационным перестройкам, не связанным с изменениями первичной структуры. Особенно важно следующее. Ранее нами /12/ было высказано предположение о возможности существования каталитически активной СК в двух конформационных состояниях: компактном стабильном и разрыхленном лабильном. Сходных воззрений на состояния белковых глобул придерживаются

О.Б.Птицын и соавт. /13/, развивающие представления о промежуточном состоянии белковой глобулы. Для технологии белковых и ферментных препаратов этот вопрос является, по-видимому, одним из наиболее важных.

Разрыхленное (промежуточное) состояние отличается нарушениями третичной структуры: разбуханием молекулы, изменениями микроокружения хромофорных групп /13/. Каталитическая активность СК, видимо, сохраняется. Казалось бы, это противоречит значению уникальности пространственной структуры белка в катализе. Однако, если учесть существующую концепцию о неэнзиматическом характере действия СК, связанном с перестройкой конформации молекулы плазминогена, можно допустить, что в промежуточном состоянии СК сохраняет способность к проявлению каталитической активности. Так, совместно с Г.В.Воробьевой нами установлено /14/, что при взаимодействии СК с полисахаридами изменения третичной структуры, выявляемые по спектрам КД в ароматической области, могут не отражаться на активности образующихся комплексов. Однако, по нашему мнению, на молекулу СК, пребывающую в промежуточном состоянии, оказывают денатурирующее действие факторы такой интенсивности, к которой индифферентна нативная молекула.

Более того, необходимо отметить, что в результате локальных среднемасштабных конформационных переходов нативный белок может стать уязвимым к протеолитической деградации /15/.

Немаловажное значение для решения технологических вопросов имеет гетерогенность СК. Множественные формы СК практически идентичны по молекулярной массе /4,16/, но отличаются по величине изоэлектрической точки /17/ и другим структурно-каталитическим свойствам /4,18/. Наличие молекул белка с различиями в характере заряда поверхности неизбежно сказывается на результатах очистки. Причины гетерогенности СК требуют дальнейшего изучения. По-видимому, большую роль играет посттрансляционная модификация типа дезамидирования остатков аспарагина и глутамина. Однако гетерогенность может быть обусловлена и заменами аминокислотных остатков в полипептидной цепи. На такую возможность указывают Jackson и Tang /19/, сообщающие о структурной гетерогенности СК в области I69 и I81 аминокислотных остатков, где Leu заменяется Asp, а свойства радикалов Leu и Asp различны. Гидрофобность первого или ионогенность второго могут оказать влияние на тип формирующейся вторичной, а

особенно — третичной структуры определенных областей молекулы СК. Рассмотрение природы такой гетерогенности выходит за рамки настоящей статьи, так как в этом случае значение будут иметь уже не факторы культуральной жидкости, а состояние белоксинтезирующего аппарата продуцента.

Выше мы уже отмечали, что на молекулы СК в культуральной жидкости могут влиять протеиназы и образующиеся кислородные радикалы. Этим не исчерпывается многообразие повреждающих факторов культуральной жидкости. Можно упомянуть об установленном нами /20/ факте подавления иницированного СК фибринолиза ионами Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , однако оно проявляется лишь при относительно высоких концентрациях катионов (10^{-6} – 10^{-3} М), поэтому значение его для культуральной жидкости не ясно. С другой стороны, наблюдалось увеличение активности СК под действием некоторых аминокислот — глутамата и β -аланина /21, 22/. Учитывая, что в питательной среде и в культуральной жидкости концентрация глутамата достигает $5 \cdot 10^{-3}$ М, а в расчете на 1 мг белка — 1,26 мг, можно полагать, что содержание некоторых аминокислот в определенных условиях играет какую-то роль в регуляции активности СК. Более того, в культуральной жидкости, вероятно, присутствует фракция "модулятора" СК /4/, которая в реакционной смеси способна резко изменять кинетику иницированного СК фибринолиза. Свойства этого "модулятора" нами изучаются.

Наконец, не исключается возможность взаимодействия СК с компонентами стенок разрушенных клеток стрептококка, что, несомненно, вызывает изменения структурно-каталитических характеристик СК и создает серьезные трудности при ее очистке. Взаимодействие СК с углеводными компонентами клеточной стенки может обусловить проявление гетерогенности этого белка, однако гетерогенность присуща молекулам СК и независимо от наличия углеводных остатков, поскольку очищенные препараты СК углеводов не содержат /23/.

Именно эти обстоятельства послужили логической основой для двух решений технологического плана: перехода на "молодое" сырье при очистке СК и отказа от использования поджелудочной железы и дрожжевых клеток при приготовлении питательных сред. В этом плане были сокращены сроки ферментации /24, 25/ и предложена питательная среда на основе кислотного гидролизата казеина /26/. Такие исследования в нашей лаборатории развивают-

ся Г.С. Давыдовой и сотрудниками.

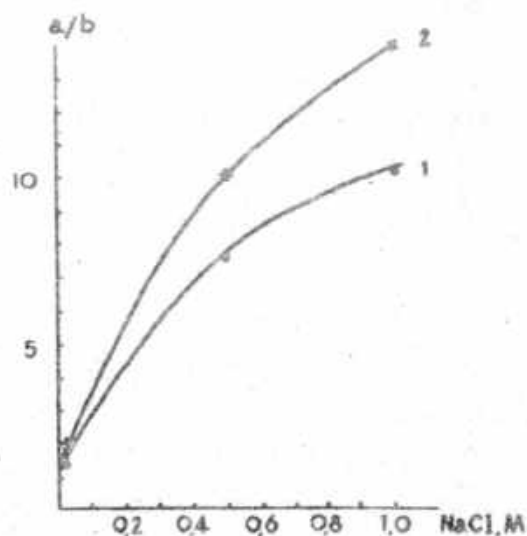
Изложенные материалы свидетельствуют о том, что уже в культуральной жидкости молекулы СК подвергаются разнообразным воздействиям. Последние не всегда приводят к инактивации СК, но практически всегда обуславливают изменения структуры белка, что является одним из основных механизмов влияния сырья на ход технологического процесса.

Чрезвычайно большую роль структурно-каталитические особенности СК играют при выборе тактики очистки: как в предсказании степени индифферентности структуры молекулы к технологическим воздействиям, так и в выявлении специфичности тех или иных приемов для селективного извлечения целевого продукта. Вопрос об индифферентности молекулы СК к технологическим воздействиям тесно смыкается с ее стабилизацией, поэтому мы проанализируем их несколько ниже.

При рассмотрении значения структурно-каталитического аспекта для очистки затронем лишь некоторые частные вопросы, иллюстрирующие своеобразие подходов при очистке СК. В этом отношении на первый план выступают физико-химические свойства белка (размер молекулы, общий заряд, степень гидрофобности белка, характер и распределение заряда, а также зависящий от этого дипольный момент), зоны возможного аффинитета и их топография. Эти особенности белка имеют значение как при хроматографическом разделении, так и при других способах фракционирования, основанных на изменении взаимодействия белков с растворителем — водой.

Поведение СК в водных растворах изучено пока еще недостаточно. Можно полагать, что свойства растворителя играют в этом случае важную роль, хотя для других белков они могут иметь меньшее значение. Так, при гель-хроматографии, характеризующейся молекулярно-ситовым распределением, роль растворителя велика вследствие изменения пространственной структуры молекулы СК. Разделение по молекулярной массе рассматривает зависимость коэффициента распределения от величины молекулы для сферических частиц. Однако форма СК приближается к шарообразной лишь в бидистиллированной воде /17/. С увеличением концентрации солей она заметно изменяется. Так, расчеты для продолговатого эллипсоида показали, что соотношение осей a/b СК при увеличении концентрации $NaCl$ от 0 до 1 М возрастало от I,2 до II (рис. 2). Это может менять характер поведения белка при

Рис. 2. Влияние концентрации хлорида натрия на величину отношения осей a/b молекулы стрептокиназы, рассчитанную при допущении максимальной асимметрии для продолговатого эллипсоида (1) и при компромиссной сольватации ($\delta = 0,2$) для сплюсненного эллипсоида (2)



гель-хроматографии. Полное же исключение солей из раствора при технологической обработке не всегда целесообразно, поскольку в этом случае может происходить агрегация молекул. Вероятно, именно перестройками структуры молекулы при изменении характера элюента обусловлены весьма скромные результаты, полученные при очистке СК на сефадексе G-100 /27/. Указанное влияние растворителя на структуру СК налагает ограничения на общепринятые представления о факторах, определяющих ультрафильтрацию макромолекул через ацетилацеллюлозную мембрану. Считается, что из-за реализации в данном случае молекулярно-ситового эффекта существенное значение имеет лишь размер молекулы, но не ее заряд, pH и ионная сила раствора /28/. Однако, по-видимому, это соблюдается не во всех случаях, поскольку, как показано нашими исследованиями /17/, свойства растворителя (ионная сила, pH) заметно меняют форму и (или) размер молекулы СК.

При разделении белков методами адсорбционной, ионообменной хроматографии или с помощью кислот, нейтральных солей или органических растворителей весьма ценна информация о поверхности белка. В этом отношении следует отметить поверхностное расположение 21 остатка тирозина и локализацию в несущих положительный заряд "карманах" молекулы СК 4 остатков триптофана /11,29/. Поверхностная локализация тирозилов представляет интерес в том плане, что при взаимодействии СК с рядом сорбентов типа гидроксипатита, силикагелей, алюмогелей возможно формирование весьма прочных водородных связей. Это заставляет применять для элюции соединения, разрушающие водородную связь (ацетон), или создавать в элюенте избыток ионов гидроксила. Последнее не всегда эффективно и чревато инактивацией, проис-

ходящей, по-видимому, вследствие возможного дезамидирования или поврежденная индолных колец триптофана. Нужно отметить, что "верхней" границей интактного состояния триптофансодержащих областей молекулы, по-видимому, являются значения рН, равные 9,0 /30/.

СК, несомненно, достаточно сильно заряженный белок. Рассчитанное нами на основании данных по аминокислотному составу /19,23/ отношение гидрофобных аминокислотных остатков к заряженным составляет 1,62. Учитывая преимущественную локализацию заряженных остатков на поверхности белковой глобулы /31/, можно предположить, что СК представляет достаточно удобный объект для ионообменной хроматографии. Обычно для очистки СК использовали иониты на основе целлюлозы или декстрана. Однако катиониты такого типа имеют малую емкость по отношению к белкам, вследствие чего не обеспечивают их значительной концентрации /32/, а также небольшую разницу между константами ионизации основных функциональных групп сорбента и радикалами аспарагиновой и глутаминовой кислот СК. Это в целом ограничивает применение упомянутых катионитов для очистки СК. Основные работы по ионообменной хроматографии СК выполнены на анионообменных целлюлозах или декстранах. В то же время синтетические ионообменники позволяют использовать специфику локального расположения зарядов в молекуле белка /32,33/. В отношении СК такая мысль была высказана нами априори /34/ и в последующем подтверждена работами сотрудников лаборатории /35,36/.

В силу структурной подвижности молекулы СК, по-видимому, при ионообменной хроматографии ее большое значение будут иметь гидратационные эффекты, некулоновские взаимодействия (дисперсионные ван-дерваальсовы силы, водородные связи, гидрофобные взаимодействия). Как известно, взаимодействие белковой молекулы с ионитом полифункционально и характеризуется многоцентровостью - набором геометрических точек связывания и неоднородностью - набором энергетических уровней для каждой такой связи /32/. Считается, что при таком взаимодействии деформация молекулы белка невелика. Однако можно полагать, что структурная подвижность молекулы СК в некоторых условиях создаст дополнительные возможности для более значительных деформаций молекулы при связывании. Более того, небольшие изменения характера растворителя, по-видимому, могут оказывать весьма су-

щественное влияние на взаимодействия с ионитами и вследствие изменения конформации СК. Остается также недостаточно ясным вопрос о возможности изменений структуры СК, сорбированной на ионитах, под действием элюентов и значение этих изменений для десорбции СК.

При фракционировании нейтральными солями отмечалось увеличение активности СК в случае осаждения ацетатом цинка в кислой среде /37/. По-видимому, высаливающее действие оказывает прежде всего анион ацетата. Факт повышения активности СК требует, конечно, изучения, но он не связан с эффектом цинка. Проведенные нами исследования влияния сульфата цинка на иницируемый СК лизис фибриновых гелей показали зависящее от концентрации ингибирование процесса /20/.

Чрезвычайно важным по-прежнему остается вопрос об аффинной хроматографии СК. Для решения его необходимо изучать характер и топографию участков связывания СК с плазминогеном. В результате совместных наших исследований с О.А.Казючиц показано, что каталитическая активность СК и взаимодействие ее с плазминогеном обеспечиваются, по-видимому, различными группами.

Изложенное позволяет заключить, что трудности в выборе большинства приемов очистки СК обусловлены, по-видимому, структурной подвижностью молекулы, изменениями формы, размера, возможно — электрохимических свойств ее даже при относительно небольших изменениях состава растворителя.

Анализируя факторы, влияющие на устойчивость (инактивацию) СК, нужно заметить, что процесс выделения и очистки СК предоставляет наибольшую возможность для образования лабильного (промежуточного) состояния молекулы, однако предугадать это не всегда возможно. Отсюда вытекает чисто практический вопрос о контроле состояния белка в производственных условиях и о том, какими методами его осуществлять. ЯМР- и КД-спектроскопия для этих целей просто недоступны, вискозиметрия требует больших затрат времени и белка и не дает достаточной информации.

Теперь собственно об устойчивости молекулы. Полученные в нашей лаборатории результаты свидетельствуют о значительной термостабильности СК. Даже 2-часовое прогревание этого белка при 100°C не уничтожает полностью ее активность. Учитывая, что термоинактивация часто применяется при освобождении СК от белковых примесей, нужно еще раз обратить внимание на, по-ви-

димому, повышенную чувствительность к денатурирующим воздействиям частично протеолизированной СК, а также, возможно, и тех ее молекул, которые находятся в промежуточном состоянии. Наши материалы о термостабильности СК несколько отличаются от данных литературы. Так, сообщалось о полной утрате активности СК при прогреве при 50°C в течение 2 ч /38/ или падении ее на 80 % при 60°C /39/. Возможно, СК штамма Н46А имеет отличия от белков, изучаемых другими исследователями. Так, СК штамма Н46А имеет, по нашим данным, несколько большую молекулярную массу /17/, 4 остатка триптофана вместо 1-2 /11,29/, отличается более высоким содержанием α -спиралей во вторичной структуре /29/. Эти различия могут обусловить относительно небольшие вариации в третичной структуре белков и в принципе могут быть достаточны для значительного повышения термостабильности. Известно, что такое повышение может быть достигнуто минимальными изменениями структуры, приводящими, например, к появлению нескольких дополнительных связей /40/.

От инактивации СК следует отличать те изменения каталитических свойств, которые обусловлены подвижностью ее молекулы. Мы уже отмечали /41/, что в водно-солевых растворах наблюдаются колебания активности СК. В нашей лаборатории исследованиями О.А.Казючид и С.Г.Цыманович показано, что такие колебания проявляются в диапазоне $20-50^{\circ}\text{C}$. Все это находит в известной мере удовлетворительное объяснение с позиций возможности переходов между конформационными подсостояниями. При очень низких температурах эти подсостояния "заморожены", а при высоких — переходы происходят очень быстро /42/, поэтому колебания активности не улавливаются при ее измерении. Такое явление может определять и иное отношение к тому разбросу показателей активности СК, который довольно часто имеет место при определении в динамике. Основная причина кроется, по-видимому, в подвижности молекулы СК. Очевидно, более стабильные результаты могут быть получены при ограничении подвижности молекул СК путем, например, введения в раствор относительно "инертного" полимера. Известно использование для этих целей желатина /43/. Значительное уменьшение колебаний отмечено нами и в опытах с декстрановыми препаратами /44/.

Что касается собственно инактивации СК, то очищенные ее препараты могут инактивироваться вследствие агрегации молекул,

модификации аминокислотных остатков или конформационных перестроек. Причем, как указано в некоторых работах /10/, инактивация вследствие модификации аминокислотных остатков практически полностью необратима.

Образование агрегатов по типу ди-, три- и тетрамеров отмечено при длительном хранении растворов СК без стабилизирующих добавок /45/. В зависимости от величины агрегата происходит снижение каталитической активности (рис.3). Эти агрегаты

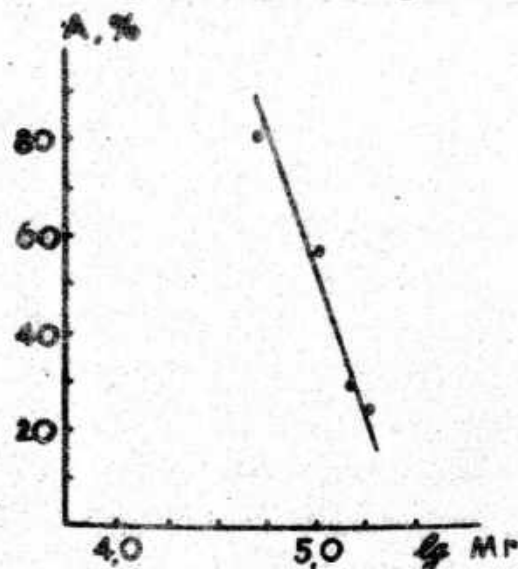


Рис.3. Зависимость остаточной активности стрептокиназы от степени агрегации ее молекул. График построен по данным /45/

не разрушаются под действием среды pH 10,0, мочевины и 0,1 % додецилсульфата натрия /45/. Поэтому можно полагать, что причиной их образования является взаимодействие гидрофобных участков молекул СК в условиях, препятствующих электростатическому отталкиванию молекул. Как было показано ранее, действие хлористого натрия обуславливает рост характеристической вязкости и увеличение гидратации молекулы /17,29/. Следствием этого может быть такое изменение объема молекулы, которое приводит к обнажению гидрофобных областей и "склеиванию" молекул. Вместе с тем, по-видимому, агрегация происходит и по другим причинам.

Важную роль в инактивации СК могут играть конформационные перестройки. Таковы, например, образования "неправильных" внутримолекулярных связей из-за первоначального развертывания молекулы, а затем невозпроизведения первоначальной укладки полипептидной цепи /10/. Роль этого пути в инактивации СК также нуждается в дополнительном изучении.

Можно полагать, что основными условиями сохранения интактности молекул СК (в соответствии с общими путями стабилизации ферментов /46/) являются:

- создание условий, препятствующих критическому обнажению

гидрофобных областей молекулы и обеспечение электростатического отталкивания молекул, т.е. предотвращение ассоциации;

- ограничение структурной подвижности молекулы;

- "закрепление стратегических связей" на поверхности молекулы.

С этими целями нами были предложены стабилизирующие составы, включающие небольшое количество желатина, хлориды натрия, калия, кальция, а также глутамат натрия (или β -аланин) /21,22/. Концентрация глутамата натрия при этом достигала 750 моль/моль СК. Возможно, стабилизирующее действие указанных составов выражается в ограничении подвижности молекулы СК, значительном экранировании ее поверхности и усилении внутримолекулярных гидрофобных взаимодействий. Не исключен также (в случае глутамата натрия) общий механизм защитного действия солей - перевод белковых глобул в более компактное состояние /47/.

При рассмотрении путей инактивации и стабилизации становится ясно, что эффект последней в определенной степени зависит от того состояния структуры молекулы, которое белок будет иметь после предыдущей обработки. В настоящее время мы также не располагаем данными о том, могут ли и каким образом переводиться молекулы белка в нативное состояние из лабильзованного (промежуточного).

В плане уяснения структурных особенностей СК представляет интерес использование обнаруженной /28/ гомологии первичной структуры ее с сериновыми протеиназами. В связи с этим высказывается предположение об эволюционном происхождении СК из сериновых протеиназ. Однако сопоставление сигнатуры СК с известной /48/ сигнатурой сериновых протеиназ позволило обнаружить у СК ряд дипептидов, не характерных для таких протеиназ (рис.4). В то же время некоторые присущие сериновым протеиназам дипептиды в структуре СК отсутствуют, что не соответствует предположениям о близости СК сериновым протеиназам /19/.

Изложенные материалы наглядно демонстрируют значение структурно-каталитической специфики белка для решения технологических вопросов, а также трудности, возникающие из-за малой информации по рассматриваемому вопросу. Особо важное значение, с точки зрения технологии, приобретают 3 момента: роль сырья для интактности молекулы белка; значение лабильзованного (промежуточного) состояния, факторы, позволяющие им "управлять", и методы регистрации; оценка методов выделения и очист-

1

2

	J	L	V	A	G	F	M	C	P	W	H	R	K	Y	T	S	Q	N	E	D	
J	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
W	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Q	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

	J	L	V	A	G	F	M	C	P	W	H	R	K	Y	T	S	Q	N	E	D	
J	1	2	1	2	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	3	2	2	2	0	2
L	2	8	1	3	0	1	0	0	2	0	0	1	7	2	4	2	0	3	2	3	
V	1	1	1	1	0	0	0	0	1	2	1	3	2	1	2	1	3	3			
A	2	0	0	0	2	1	1	0	0	1	2	2	2	3	2	1	0	2			
G	1	3	0	1	1	0	0	1	0	1	0	4	1	3	1	0	0	2			
F	0	1	0	3	1	1	0	0	0	0	3	0	3	0	0	0	2	1			
M	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2			
C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
P	2	1	1	1	2	2	1	0	0	0	0	1	1	2	1	1	0	0	2		
W	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
H	0	2	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0			
R	2	0	2	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	2	1	1	0	2	2		
K	0	5	2	3	1	1	0	0	3	0	0	1	2	2	2	4	0	2	1	3	
Y	0	1	2	0	0	2	1	0	0	1	2	2	0	5	1	0	1	1	3		
T	5	3	3	1	2	0	0	2	0	1	0	2	2	0	2	1	3	2	3		
S	2	2	4	0	3	0	0	0	1	0	2	1	1	2	0	1	2	1	2	1	
Q	0	3	0	3	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	4	1	
N	0	2	1	1	1	0	0	0	2	0	2	2	2	0	1	1	2	3	2	2	
E	2	2	2	0	2	2	0	0	0	1	0	3	3	2	0	4	1	3	1		
D	2	4	2	2	1	3	0	0	2	0	0	4	4	2	4	2	1	4	0	5	

Рис. 4. Матрица сигнатуры сериновых протеинов (1) по /48/ и построенная сигнатура СК (2) на основании данных о ее первичной структуре /19/

ки с позиций сохранения интактной структуры белка.

Дальнейшее развитие работ в этих направлениях будет способствовать интенсификации технологических процессов получения как препаратов СК, так и других белковых препаратов.

Л и т е р а т у р а

1. Калунянц К.А., Голгер Л.И. Микробные ферментные препараты. М., 1979. - 2. Ферментация и технология ферментов / Перевод с английского. Под редакцией К.А. Калунянца. - М., 1983. - 3. Савченко Н.Е., Вотяков В.И., Никандров В.Н. - Здравоохр. Белоруссии, 1981, № 7, с.8-12. - 4. Никандров В.Н., Казючиц О.А. - В кн.: Микроорганизмы - продуценты биологически активных веществ: Тез.докл. Рига, 1984, с.87. - 5. Никандров В.Н., Дымонт Т.А. - В кн.: Микроорганизмы - продуценты биологически активных веществ: Тез.докл. Рига, 1981, с.97-98. - 6. Gerwin V.J. et al. - J. Biol. Chem., 1966, 241, 14, 3331-3339. - 7. Losse G., Laube F. - Acta biol. Med. Germ., 1978, 37, 1629-1632. - 8. Buck F.F. et al. - J. Biol. Chem., 1968, 243, 13, 3648. - 9. Pain R.H. - Biochem. Soc. Trans., 1983, 11, 1, 15-16. - 10. Можаяев В.В., Мартинек К. - Мол.биол., 1982, т.16, № 4, с.676-694. - 11. Никандров В.Н., Воробьева Г.В. - Весці АН БССР, сер.біял.навук, 1984, № 5, с.74-78. - 12. Никандров В.Н. - В кн.: Энзимология тромболиза и стрептокиназа: Матер.Респ. симпоз. Мн., 1982, с.23-34. - 13. Птицын О.Б., Долгих Д.А., Гильманшин Р.И. и др. - Мол.биол., 1983, т.17, № 3, с.569-576. - 14. Никандров В.Н., Воробьева Г.В., Янковская Г.С. - В наст. сб., с. 83. - 15. Абатуров Л.В., Лебедев Ю.О., Носова Н.Г. - Мол.биол., 1983, т.17, № 3, с.543-568. - 16. Никандров В.Н., Ткач В.М., Карезо Н.В. и др. - В кн.: VI конференция биохимиков Прибалтийских республик, Белорусской ССР и Ленинграда: Тез.докл. Рига, 1981, с.454-455. - 17. Никандров В.Н., Воробьева Г.В., Демидчик Н.В., Казючиц О.А. - В кн.: Энзимология тромболиза и стрептокиназа: Матер.Респ.симпоз. Мн., 1982, с.47-53. - 18. Никандров В.Н., Вотяков В.И. - В кн.: Ферменты, металлы и металлоферменты в диагностике и лечении: Тез.докл. Ивано-Франковск, 1982, с.154-155. - 19. Jackson K.W., Tang J. - Biochemistry, 1982, 21, 26, 6620-6625. - 20. Никандров В.Н. - Весці АН БССР, сер.біял.навук, 1985, № 3, с.64-67. - 21. Никандров В.Н., Пнжова Н.С., Дымонт Т.А., Рубинштейн М.С. А.с. № 897247. - БИ, 1982, № 2, с.21. - 22. - Никандров В.Н., Ды-

монт Т.А., Пыжова Н.С. А.с. № 933095. — Би, 1982, № 21, с.16.—
 23. De Renzo E.C. et al. — J. Biol. Chem., 242, 3, 533-542,
 1967. — 24. Давыдова Г.С., Шатило Н.Л., Никандров В.Н. — В кн.:
 УП съезд гигиенистов и санитарных врачей, УП съезд микробиоло-
 гов, эпидемиологов и паразитологов, П съезд инфекционистов Бе-
 лоруссии: Матер.обл.с.съезда науч. об-в. Мн, 1984, с.212. —
 25. Давыдова Г.С., Шикова Л.В., Погудо А.И., Шатило Н.Л. — В
 кн.: Энзимология тромболизиса и стрептокиназа. Матер.Респ.сим-
 поз. Мн., 1982, с.58-63. — 26. Давыдова Г.С., Рытик П.Г., Шатило
 Н.Л. — В наст.сб., с. 58. — 27. Ткач В.М., Пieniina Л.В., Каре-
 зо Н.В., Пыжова Н.С. — В кн.: Стрептокиназа и другие тромболи-
 тические ферменты. Мн., 1979, с.79-85. — 28. Рожанская Т.И.,
 Марголина Н.А., Возная Э.Е., Селезнева А.А. — Хим.-фарм.журн.,
 1981, № 2, с.75-79. — 29. Никандров В.Н., Воробьева Г.В., Де-
 мидчик Н.В. — В кн.: У1 Всесоюзный симпозиум по химии белков и
 пептидов: Тез.докл. Рига, 1983, с.194-195. — 30. Nikandrov V.N.,
 Votyakov V.I., Vorobyova G.V. — In: 3rd Symp. Soc. Countries
 on Biotechnology. Abstracts. Bratislava, 1983, A2-36. —
 31. Шульц Г., Ширмер М. Принципы структурной организации бел-
 ков. М., 1982. — 32. Шатаева Л.К., Кузнецова Н.Н., Елькин Г.Э.
 Карбоксильные катиониты в биологии. Л., 1979. — 33. Самсонов
 Г.В. — В кн.: Ферменты микроорганизмов. М., 1973, с.39-55. —
 34. Лопатина Л.А., Никандров В.Н., Ткач В.М., Пieniina Л.В. —
 В кн.: Стрептокиназа и другие тромболитические ферменты. Мн.,
 1979, с.70-78. — 35. Пieniina Л.В., Карезо Н.В. — В кн.: Энзи-
 мология тромболизиса и стрептокиназа: Матер.Респ.симпоз. Мн.,
 1982, с.98-101. — 36. Пieniina Л.В., Карезо Н.В. — В наст.сб.,
 с.102. — 37. Пieniina Л.В., Карезо Н.В., Пыжова Н.С. — В кн.:
 Стрептокиназа и другие тромболитические ферменты. Мн., 1979,
 с.85-88. — 38. Торчилин В.П., Бобкова А.С., Лебедев Б.С. и др.
 — Хим.-фарм.журн., 1976, № 3, с.10-13. — 39. Савельвольф Г.Б.—
 В кн.: Острая и хроническая стрептококковая инфекция. Л., 1967,
 с.103-106. — 40. Кутузова Г.Д., Угарова Н.Н., Березин И.В. —
 Биоорг.химия, 1982, т.8, № II, с.1445-1461. — 41. Никандров
 В.Н., Дымонт Т.А., Пыжова Н.С. — В кн.: Стрептокиназа и другие
 тромболитические ферменты. Мн., 1979, с.101-107. — 42. Голь-
 данский В.И., Крупянский Ю.Ф., Фролов Е.Н. — Мол.биол., 1983,
 т.17, № 3, с.532-542. — 43. Mozen M.M. — In: Thrombosis and
 Bleeding Disorders Theory and Methods. Stuttgart. New York.

London, 1971, 376-379.-44. Вотяков В.И., Воробьева Г.В., Никандров В.Н. и др. - В наст. сб., с. 74. - 45. Gerlach D., Kähler W. - Zbl. Bakt. Hyg. I Abt., 1979, 244, 222. - 46. Угарова Н.Н. - В кн.: Введение в прикладную энзимологию. М., 1982, с. 156-159. - 47. Мартинек К., Торчилин В.П., Шкшнис В.А. и др. - Докл. АН СССР, 1980, т. 251, № 5, с. 1169-1172. - 48. Erhan S. - Int. J. Bio-Med. Comput., 1980, II, 295-304.

СО Д Е Р Ж А Н И Е

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 внутрикoronарном 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 модификаций 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., Шаткова Н.М., Немирович-Данченко И.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., Соломеник 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., Соломеник 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.А. Действие комплексно-связанного с альфа ₂ -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
Раздел III. Регуляция гемостаза и фибринолиза, возможности использования различных ферментов активаторного и фибринолитического действия	
Кудряшов Б.А., Ляпина Л.А. Физиологические растворители нестабилизированного фибрина	121
Розенфельд М.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., Буйк 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., Ласинскайте 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