

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ БССР

**Белорусский ордена Трудового Красного Знамени
научно-исследовательский институт эпидемиологии
и микробиологии**

**Белорусское научное медицинское общество микробиологов,
эпидемиологов и паразитологов**

**ЭНЗИМОЛОГИЯ
ТРОМБОЛИЗИСА
И СТРЕПТОКИНАЗА**

Минск 1982

Министерство здравоохранения БССР

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

Белорусское научное медицинское общество
микробиологов, эпидемиологов и паразитологов

ЭНЗИМОЛОГИЯ
ТРОМБОЛИЗИСА
И СТРЕПТОКИНАЗА

Материалы
Республиканского
симпозиума

Минск 1982

ЭНЗИМОЛОГИЯ ТРОМБОЛИЗИСА И СТРЕПТОКИНАЗА

Энзимология тромболизиса и стрептокиназы
(Материалы Республиканского симпозиума). -
Мн., 1982, с.156.

В сборнике опубликованы материалы, посвященные молекулярно-биологическим и физиологическим аспектам тромболизиса и его регуляции, свойствам стрептокиназы и других тромболитических ферментов. Освещены отдельные биохимические, микробиологические и технологические вопросы получения ферментов тромболитического действия и экспериментально-клинические аспекты их применения.

Сборник предназначен для биохимиков, физиологов, микробиологов, фармакологов, а также специалистов других профессий, интересующихся вопросами тромболизиса.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

И.Е.Савченко, В.И.Вотяков - главные редакторы,
П.Г.Рытик, В.Н.Никандров - заместители главных редакторов
Е.Н.Ковчур - ответственный секретарь,
Г.В.Воробьева, Г.С.Дзвидова, Т.А.Завалишина,
А.И.Кузина, В.М.Ткач

УДК 576.851,214:615.779.94

В.И.Никандров, Г.В.Воробьева, Н.В.Демидчик, О.А.Казючиц

ИССЛЕДОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ

СТРЕПТОКИНАЗЫ СТРЕПТОКОККА ШТАММА Н46А

(Минск)

Сведения литературы о физико-химических свойствах СК довольно разноречивы, что, по-видимому, является следствием пропускания различными штаммами энзимов с неодинаковыми свойствами /1/. Правомерность такого утверждения достаточно хорошо подтверждена при сравнительном изучении аминокислотного состава, молекулярной массы и изоэлектрических точек стрептокиназ, полученных из различных штаммов стрептококков группы А /2/. Подобных детальных исследований энзима стрептококков группы С не проводилось, между тем при разработке рациональных приемов получения белка в больших количествах требуется тщательное изу-

чение его основных физико-химических параметров. Сообщения о форме молекулы единичны /4/, а данных о ее изменении под влиянием различных факторов крайне мало.

В силу изложенных обстоятельств было предпринято изучение некоторых физико-химических характеристик СК, продуцируемой β -гемолитическими стрептококками группы С, в частности штаммом Н46А.

Материалы и методы

В работе использованы образцы очищенной СК, предоставленные лабораторией технологии ферментных препаратов БелНИИЭМ, с удельной активностью 100000 ME/мг. Фермент дополнительно в ряде случаев подвергали гель-хроматографии на сефадексе G-100 и диализу против дистиллированной воды.

Содержание белка и активность СК в образцах определяли, как описано ранее /5/, молекулярную массу - методами электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия /6/ и гель-фильтрации на сефадексе G-100. В качестве свидетелей использовали цитохром С (13000), миоглобин (17800), пепсин (35000), бычий сывороточный альбумин (68000), овальбумин (45000), человеческий сывороточный альбумин (67000). Электрофорез проводили в 12,5%-ном полиакриламидном геле при 40вх (10-20)ма, температуре +4°C в течение 16 часов. Белки окрашивали кумасси бриллиантовым голубым G-250. На гель наносили образцы, содержащие 20 мкг белка. Относительную подвижность рассчитывали по соотношению:

$$\frac{d \text{ белка}}{d \text{ пластины}}$$

где d белка - расстояние от верха геля до зоны белка, d пластины - длина пластины геля.

Гель-хроматографию на сефадексе G-100 проводили с использованием колонки Pharmacia (Швеция), 32x2 см. В качестве уравновешивающего раствора использовали 0,06 М фосфатный буфер pH 7,4 с добавлением 0,1 М NaCl. Образцы СК наносили в количестве 6 мг (по белку). Вязкость измеряли при 25±0,1°C в вискозиметре Усбелодэ-Рафикова /7/. Разбавление вели дистиллированной водой. Индекс вязкости η_{sp}/c путем экстраполяции к нулевой концентрации зависимости η_{sp}/c от c . Парциальный удельный объем определяли пикнометрически /8/, изоэлектрическую точку - методом изоэлектрофокусирования в колонке /9/, используя систему "обратный буфер-глицерин" в диапазоне pH 4,8-7,8. Спектр поглощения в ультрафиолетовой области растворов СК (0,06 М фос-

фитный буфер pH 7,0, $C = 1,2$ мг/мл) записывали на спектрофотометре Spesord UV-Viv в кювете с толщиной слоя 0,5 см. ИК спектры снимали на спектрофотометре UR -20 в таблетках с KBr и в парафиновом масле, причем в обоих случаях спектры были идентичны.

Результаты и обсуждение

Молекулярная масса СК стрептококка штамма H46A, определенная методом гель-фильтрации на сефадексе G-100, составила 54000-1000 (рис.1). При этом СК выходила с колонки симметричным и очень узким пиком. Практически идентичное значение молекулярной массы, равное 54000-1500, получено при определении ее методом электрофореза в полиакриламидном геле (рис.2).

Индекс вязкости СК ($[\eta]$) в бидистиллированной воде довольно низок - $0,02 \frac{дл}{г}$, что, по-видимому, свидетельствует о компактности и симметричной форме молекулы. В этих же условиях парциальный удельный объем (\bar{v}) составил 0,672 и оказался несколько ниже приведенного в литературе - $0,73-0,75 /10,11/$. Эти данные позволяют приблизительно оценить размеры молекулы СК в водном растворе /12/. Если допустить, что молекула СК имеет форму шара, в дистиллированной воде радиус ее будет равен 25 \AA - близкое значение приводится в литературе /4/. В этом случае степень гидратации составит 0,128 г растворителя на 1 г сухого вещества.

Исследование влияния ионной силы раствора и pH в изученных диапазонах на величину индекса вязкости показало противоположные изменения его. Повышение концентрации NaCl до 1 M (при pH 7,0) вызывало возрастание величины $[\eta]$ (рис.3, а). Согласно данным литературы, соли оказывают стабилизирующее влияние на молекулы ряда энзимов /13,14/. Авторы объясняют это более свернутой конформацией белка в их растворах. В нашем случае наблюдается некоторый рост величины индекса вязкости, что может быть связано с увеличением асимметрии молекулы или ее объема вследствие повышения гидратации. Приближенный расчет /12/ степени гидратации СК в растворе NaCl дал величину 1,1 г растворителя на 1 г сухого вещества. Если же принять произвольную компромиссную величину сольватации СК 0,2 г/г, то в дистиллированной воде соотношение осей a/b молекулы будет равно 1,2 (форма молекулы - продолговатый эллипсоид), а в растворе NaCl оно равно $\sim 7,5$.

Увеличение pH 0,5 M раствора NaCl от 6,0 до 9,0 знамва-

ло снижение $[\eta]$ СК (рис.3,б). По-видимому, в этих условиях увеличение pH приводит к уменьшению радиуса молекулы, она становится более компактной.

Спектроскопия СК в УФ области показала (рис.4), что спектр поглощения обусловлен вкладом остатков тирозина и триптофана. В области выше 250 нм спектр представляет собой полосу поглощения с максимумом при 278 нм и плечом около 284 нм. В спектре СК, денатурированной 8 М мочевиной, наблюдается смещение максимума поглощения в коротковолновую область (до 276 нм). ИК спектр СК (рис.5) характеризуется полосами при 3430 см^{-1} (свободная NH-группа), 3300 (амид А), 3070 (слабая, амид В), 1660-1642 (сильная, амид I), 1550 (амид II), 1380, 1250 (слабая, амид III), 1169, 1080, 955, 865 см^{-1} (колебания скелета молекулы), 552, 535 см^{-1} . По-видимому, в белке возможно заметное количество α -спиралей и неупорядоченного клубка, так

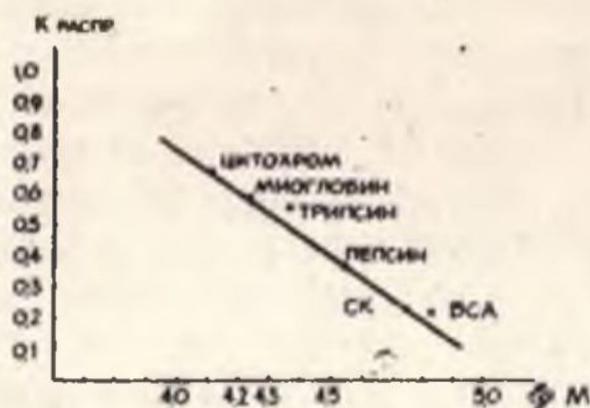


Рис.1. Определение молекулярной массы СК методом гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-100.

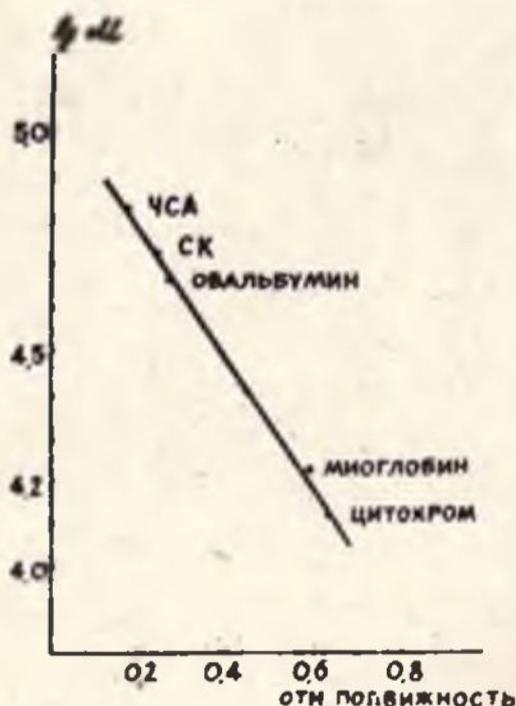


Рис.2. Определение молекулярной массы СК методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия.

как в спектре наблюдаются полосы около 1660 и 1642 см^{-1} , близкие тем, которые соответствуют α -спиралам и неупорядоченному клубку при 1650 и 1658 см^{-1} /15/.

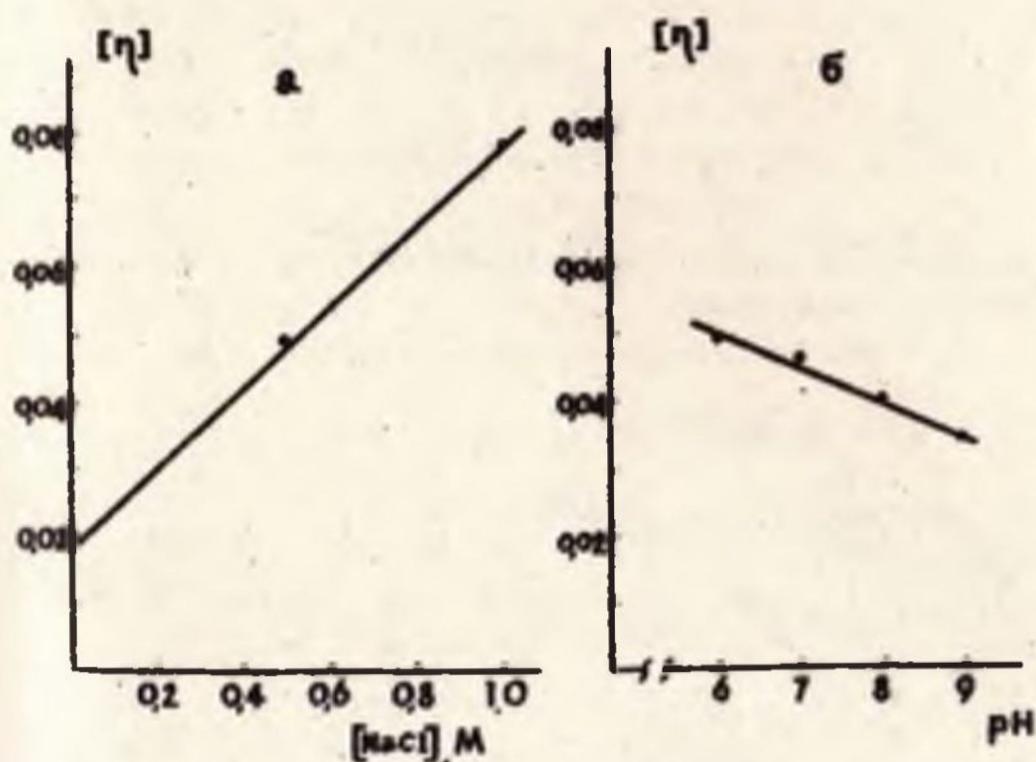


Рис. 3. Зависимость индекса вязкости СК от концентрации NaCl (а) и pH раствора (б).

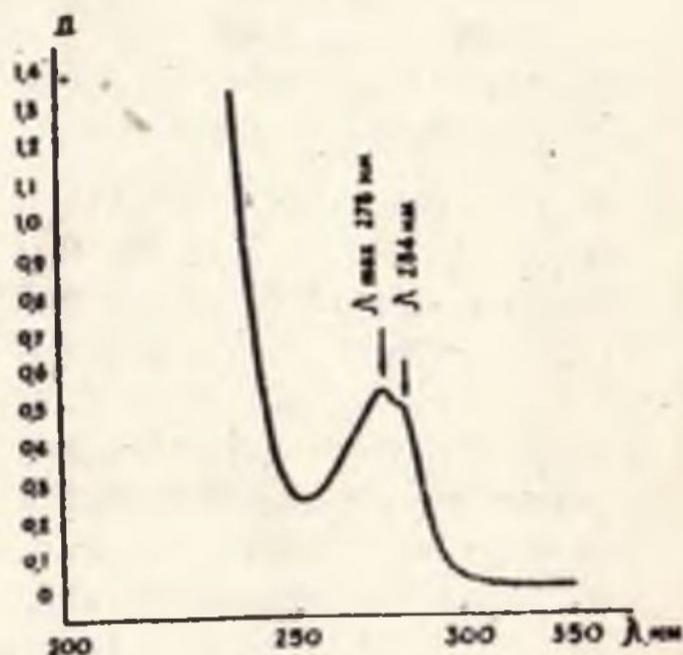


Рис. 4. Спектр поглощения СК в $0,06 \text{ M}$ фосфатном буфере pH 7,0, с $1,2 \text{ мкг/мл}$, 1 0,5 см .

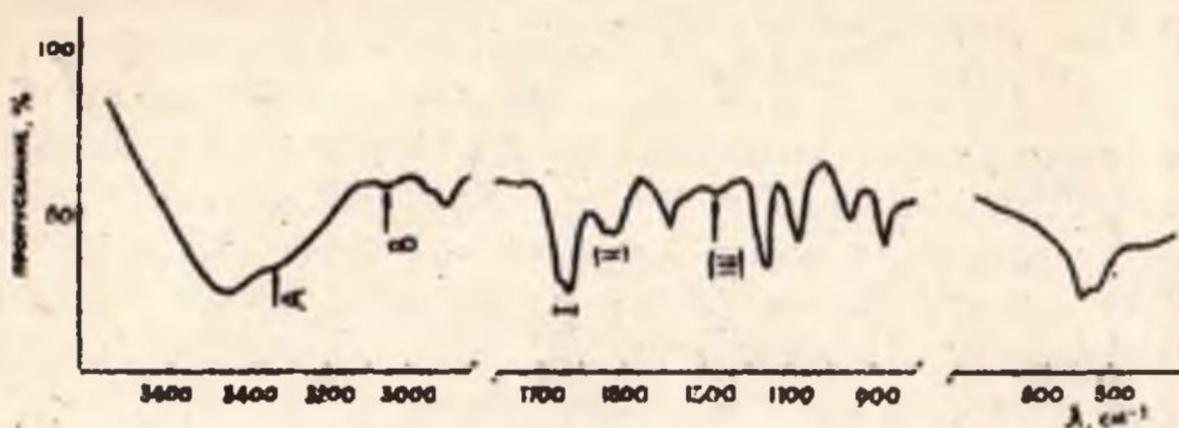


Рис. 5. ИК спектр СК.

Как свидетельствуют результаты изоэлектрофокусирования, электрофоретически гомогенные препараты СК неоднородны и содержат, по крайней мере, три подфракции с величиной pI 5,3-5,4, 5,05 и 4,85-4,90.

Полученные материалы позволяют считать, что гемолитический стрептококк Н46А продуцирует СК, которая является, судя по молекулярной массе, гомогенным белком с компактной симметричной формы молекулой, содержащей достаточно большую долю α -спиралей и неупорядоченного клубка. Увеличение ионной силы раствора приводит к нарастанию асимметрии молекулы либо увеличению объема. Вместе с тем в гомогенных препаратах СК отмечено существование нескольких компонентов, различающихся по величине изоэлектрической точки. Причины этого явления и свойства компонентов изучаются.

Л и т е р а т у р а: 1. Dillon H.C., Wannamaker L.W. - J. Exp. Med., 1965, 121, 351-371. - 2. Gerlach D., Kohler W. - Zbl. Bakt. Hyg., I Abt. Orig. A, 1977, 238, 336-349. - 3. Gerlach D., Kohler W. - Zbl. Bakt. Hyg., I Abt. Orig. A, 1979, 244, 210-221. - 4. Einarsson M. et al. - Biochim. Biophys. Acta, 1979, 568, 1, 19-29. - 5. Никандров В.Н., Денисевич В., Ефимов А.В. - В кн.: Стрептокиназа и другие тромболитические ферменты. М., 1979, 95-101. - 6. Такач Б. - В кн.: Методы и следования в иммунологии. М., 1981, 95-119. - 7. Рафиков С.Р.

Будтов В.П., Монаков Ю.Б. Введение в физико-химию растворов полимеров. М., 1978. - 8. Кабот Е., Мейер М. Экспериментальная иммунохимия. М., 1968. - 9. Троицкий Г.В., Ажицкий Г.Ю., Мялый К.Д. - *Вопр.мед.химии*, 1976, 22, 2, 282-285. - 10. Taylor F.V., Botts J. - *Biochemistry*, 1968, 7, 1, 232-242. - 11. De Renzo E.C. et al. - *J. Biol. Chem.*, 1967, 242, 3, 533-542. - 12. Тенфорд Ч. Физическая химия полимеров. М., 1965. - 13. Jirgensons V. et al. - *Macromol. Chem.*, 1966, 97, 216. - 14. Слонимский С.В. и др. Молекулярная биология, 1980, 14, 3, 484-495. - 15. Чиргадзе Ю.Н. - В кн.: Молекулярная биология. М., 1978, т.1, 5-60. (Итоги науки и техники/ВИНИТИ).

A STUDY OF SOME PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES
OF STREPTOKINASE OF H46A STRAIN STREPTOCOCCUS

V.N.Nikandrov, G.V.Vorobyova, N.V.Demidchik, O.A.Kazvuchits

Physico-chemical properties of purified streptokinase of H46A strain such as molecular mass (54,000 dal), a viscosity index in bidistilled water (0.02), partial specific volume have been studied. Increasing ionic strength of the solution induced rising viscosity values and increasing pH from 6 to 9 led to lowering this index value. The calculation is made of the molecule axes and the degree of its hydration, their changes are evaluated in increasing ionic strength of the solution. In isoelectrofocusing the localization of specific activity was found at pH values 5.3-5.4; 5.05 and 4.05-4.90.

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

- Никандров В.Н., Савченко Н.Е.,
Вотьяков В.И. Состояние иссле-
дований в области создания
тромболитических ферментных пре-
паратов и пути дальнейшей раз-
работки тромболитиков на осно-
ве стрептокиназы 3
- Розенфельд М.А. Термодинами-
ка образования и лизиса фиб-
рина II
- Кудряшов Б.А. Естественный не-
ферментативный фибринолиз,
его молекулярная природа, фи-
зиологическое и патофизиоло-
гическое значение 17
- Никандров В.Н. Дискуссионные
вопросы структурных и катали-
тических свойств стрептокина-
зы 23
- Кудинов С.А., Гриненко Т.В.
Активация плазминогена стреп-
токиназой 34
- Кудинов С.А., Пилявская А.С.
 α_2 -антиплазмин в регуляции
фибринолиза 41
- Никандров В.Н., Воробьева Г.В.,
Демидчик Н.В., Казючич О.А.
Исследование некоторых физи-
ко-химических свойств стреп-
токиназы стрептококка штамм
H46A 47
- Веремеенко К.Н., Кизим А.И.
Субстратная специфичность
плазмина, связанного с
 α_2 -макроглобулином 53
- Давыдова Г.С., Шикова Л.В.,
Погудо А.И., Шатило Н.Л. Изу-
чение биосинтеза стрептоки-
назы при различных условиях
культивирования штамма-про-
дукента 58
- Егоров Н.С., Ландау Н.С. Неко-
торые особенности и перспекти-
вы биосинтеза тромболитиче-
ских ферментов ассоциативны-
ми культурами микроорганиз-
мов 63
- Nikandrov V.N., Savchenko N.E.,
Votyakov V.I. The present
state of research on desig-
ning thrombolytic fermental
preparations and ways of
their further development
on the basis of streptokinase
- Rosenfeld M.A. Thermodynamics
of fibrin formation and ly-
sis
- Kudryashov B.A. Natural non-
enzymatic fibrinolysis, its
molecular properties, phy-
siological and pathophysio-
logical significance
- Nikandrov V.N. Debatable
problems of structural and
catalytic properties of
streptokinase
- Kudinov S.A., Grinenko T.V.
Activation of plasminogen
by streptokinase
- Kudinov S.A., Pilyavskaya A.S.
 α_2 -antiplasmin in the re-
gulation of fibrinolysis
- Nikandrov V.N., Vorobyova G.,
Demidchik N.V., Kazyuchits O.
A study of some physico-
chemical properties of strep-
tokinase of H46A strain
streptococcus
- Veremeenko K.N., Kizim A.I.
Substrate specificity of
macroglubulin-bound plas-
min
- Davydova G.S., Shikova L.V.,
Pogudo A.I., Shatilo N.L.
The study of streptokinase
biosynthesis under diffe-
rent cultivation conditions
of strain-producer
- Egorov N.S., Landau N.S. So-
me peculiarities and pers-
pectives of thrombolytic
enzyme biosynthesis by mi-
xed cultures of microorga-
nisms

- Давыдова Г.С., Рытик П.Г.,
Бессчастнова А.П., Шатило Н.Л.,
Шикова Л.В., Погуло А.И. Опыт
разработки питательных сред
для культивирования стрепто-
кокка - продуцента стрептоки-
назы 68
- Шкуматова Л.Б., Вотяков В.И.,
Колесниченко Т.Г., Голубков
В.И., Тотолян А.А. Перекрест-
ный фаголизис между штамма-
ми стрептококков групп А и С 74
- Голубков В.И., Вотяков В.И.,
Шкуматова Л.Б., Кныш Л.С.,
Тотолян А.А. Клонирование
штамма Н46А по продукции
стрептокиназы 78
- Голубков В.И., Колесниченко
Т.Г., Ионтова И.М., Шкумато-
ва Л.Б., Кныш Л.С. Генетиче-
ское маркирование штаммов -
продуцентов стрептокиназы в
экспериментах межгрупповой
трансдукции 80
- Цвигун В.И., Рухманов Ю.П.,
Брель Г.Ф. Лабораторный фер-
ментационный стенд 82
- Ткач В.М., Пленина Л.В., Каре-
зо Н.В., Постоянова Н.И., Сিনি-
цына Р.М., Пыжова Н.С., Ковале-
ва Е.Б., Ястребова Т.И. Кон-
центрирование и предваритель-
ные этапы очистки стрептоки-
назы 86
- Пленина Л.В., Ткач В.М., Каре-
зо Н.В., Пыжова Н.С. Примене-
ние адсорбционной хроматогра-
фии на силикагеле для очист-
ки стрептокиназы 89
- Ковалева Е.Б., Ткач В.М., Пыжо-
ва Н.С. Хроматографическая
очистка стрептокиназы на бен-
зилхитиновом сорбенте 94
- Пленина Л.В., Карезо Н.В. Ис-
пользование сульфокатионитов
при получении очищенных пре-
паратов стрептокиназы 98
- Шашкова Н.А., Лебедева В.В.,
Самойлова Л.И., Кузнецов В.И.,
Немирович-Данченко М.М. Опыт
- Davydova G.S., Rytic P.G.,
Beschastnova A.P., Shatilo N.,
Shikova L.V., Pogudo A.P. The
experience of developing
culture media for cultivati-
on of streptococcus, a strep-
tokinase producer
- Shkumatova L.B., Votyakov V.I.,
Kolesnichenko T.G., Golubkov
V.I., Totolyan A.A. Group A
and C streptococcus strain
cross phagolysin
- Golubkov V.I., Votyakov V.I.,
Shkumatova L.B., Knysh L.S.,
Totolyan A.A. The cloning
of H46A strain according
to streptokinase production
- Golubkov V.I., Kolesnichenko T.I.,
Iontova I.M., Shkumatova L.B.,
Knysh L.S. Genetic marking
of streptokinase strain-pro-
ducers in the experiments of
interspecific transduction
- Tavigun V.I., Rukhmanov Yu.P.,
Brel G.F. Laboratory ferment-
er stand
- Tkach V.M., Plenina L.V., Ka-
reso N.V., Poscoyanova N.I.,
Sinitcina R.M., Pyzhova N.S.,
Kovaleva E.B., Yastrebova T.I.
Concentration and initial
stages of streptokinase pu-
rification
- Plenina L.V., Tkach V.M., Ka-
reso N.V., Pyzhova N.S. The
use of adsorbtion chromatog-
raphy on silicagele for
streptokinase purification
- Kovaleva E.B., Tkach V.M.,
Pyzhova N.S. Chromatography
purification of streptoki-
nase on benzylchitin sorbent
- Plenina L.V., Karazo N.V. The
use of sulfocationite in
obtaining purified strepto-
kinase preparations
- Shashkova N.M., Lebedeva V.V.,
Samoilova L.I., Kuznetzov V.,
Nemirovich-Danchenko M.M.

применения полиядерных пленок для стерилизующей фильтрации раствора стрептокиназы . . .	101	The use of polynuclear films for sterilizing filtration of streptokinase solution
Березов Т.Т., Левин Ф.Б., Сорокина Л.В. Иммуобилизация некоторых протеолитических ферментов на тромбоцитах. .	104	Beresov T.T., Levin F.B., Sorokina L.V. Immobilization of some proteolytic enzymes on thrombocytes
Самсонов Г.В., Кольцова С.В., Шельх Г.И., Даниличев В.Ф. Получение и биологическое исследование урокиназы и ее иммобилизованных форм . . .	107	Samsonov G.V., Koltsova S.V., Shelykh G.I., Danilichev V.F. Isolation and biological investigation of urokinase and its immobilized forms
Кастрикина Т.Ф., Таран Л.Д., Кудинов С.А. Определение активности плазмина по нарастанию свободных аминогрупп	113	Kastrikina T.F., Teran L.D., Kudinov S.A. The determination of plasmin activity based on the rise of free amino groups
Чазов Е.И., Мазаяв А.В., Торчилин В.П., Смирнов В.Н., Суворова Л.А., Воронков Ю.И. Клиническая эффективность иммобилизованной стрептокиназы (стрептодеказы)	118	Chazov E.I., Mazayav A.V., Torchilin V.P., Smirnov V.N., Suvorova L.A., Voronkov Yu.I. Clinical efficacy of the immobilized streptokinase (streptodekase)
Андреевко Г.В. О тромболитических свойствах стрептокиназы	127	Andreenko G.V. Concerning thrombolytic properties of streptokinase
Микуцкий Н.С., Шевчук А.П., Савченко А.Н., Вотяков В.И., Никандров В.Н., Рытик П.Г. Предварительные результаты о клинической апробации целиазы	134	Mikutsky N.S., Shevchuk A.P., Savchenko A.N., Votyakov V.I., Nikandrov V.N. Preliminary data on the clinical trial of "celyase"
Терешин И.М. Создание иммобилизованной стрептокиназы и ее тромболитические свойства. .	139	Tereshin I.M. Immobilized streptokinase and its thrombolytic properties