

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.Андреевко

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Н.Е.Савченко, В.И.Вотьяков — главные редакторы,
П.Г.Рытик, В.Н.Никандров — заместители главных редакторов,
Г.В.Воробьева — ответственный секретарь,
Г.С.Давыдова, Т.А.Завалишина, Н.С.Микунский, В.М.Ткач

С 2007020000-001 I-85
М338-85

© БелНИИЭМ, 1985 г.

ИЗУЧЕНИЕ МОДИФИКАЦИИ СТРЕПТОКИНАЗЫ ПОЛИСАХАРИДАМИ
I. ПОЛУЧЕНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ СТРЕПТОКИНАЗЫ

В.И.Вотяков, Г.В.Воробьева, В.Н.Никандров, В.П.Торчилин,
Л.А.Скоростецкая, Т.А.Дымонт, С.Г.Цыманович,
С.А.Наумович, М.А.Лапковский
(Минск, Москва)

Одним из путей разработки тромболитических препаратов является конструирование новых лекарственных форм на основе уже известных ферментов /1/. Перспективность этого направления доказана созданием препарата иммобилизованной на диальдегиддекстрани стрептазы, названной стрептодеказой /2/. Использование в качестве матриц для такого рода препаратов полисахаридов-декстранов обусловлено не только биосовместимостью этих полимеров, но также их антиагрегационным действием, а в ряде случаев - способностью усиливать вызванный тромболитиками фибринолиз /3/.

Известно, что различные штаммы стрептококков группы А продуцируют стрептокиназы с несколько разными физико-химическими свойствами /4/. Возможно, это имеет место и среди штаммов стрептококков группы С. Тем не менее можно полагать, что различия в физико-химических свойствах не столь велики, чтобы это могло в сильной степени влиять на результаты иммобилизации.

В этой связи были изучены особенности иммобилизации стрептокиназы штамма Н46А на диальдегиддекстрани (окисленном декстрани). Кроме того, исследовано образование комплексов стрептокиназы с нативными декстрановыми препаратами, не несущими заряда, с учетом некоторой "агрессивности" альдегидных групп диальдегиддекстрани по отношению к связываемому белку.

В экспериментах использованы образцы стрептокиназы штамма Н46А, очищенные по методике, разработанной в Белорусском НИИ эпидемиологии и микробиологии, перед проведением иммобилизации они были подвергнуты дополнительной очистке, как описано ранее /5/. Удельная активность стрептокиназы (СК) в образцах соответствовала 50000 МЕ/мг белка, мол.масса 54000 /5/. Рондекс (РД) — кровезаменитель реологического типа на основе радиационно модифицированного декстрана с мол.массой 60000 (ВФС, 4I-1072-8I). Реорондекс (рео-РД) — кровезаменитель, аналогичный по свойствам РД, с мол.массой 35000. Реополиглюкин (РПГ) — производства Минского завода медпрепаратов с мол.массой 35000-50000. Использовали бычий фибриноген и тромбин Литовского НИИ эпидемиологии, микробиологии и гигиены. Человеческий фибриноген и тромбин изготовлены Белорусским НИИ переливания крови.

Для получения диальдегиддекстрана (ДАД) реополиглюкин окисляли с помощью NaSO_4 в течение 20 мин при 22°C . Освобождение от йодат- и периодат-ионов проводили одновременно с определением степени окисления /6/. Иммобилизацию СК на ДАД осуществляли, инкубируя смесь их в фосфатном буфере при слабом перемешивании. Восстановление азотистых связей и карбонильных групп вели NaNH_4 . Продукт иммобилизации подвергали гель-хроматографии на колонке с сефадексом $\text{G}-100$ или диализу против дистиллированной воды или фосфатного буфера.

Ассоциаты СК с нативными декстрановыми препаратами получали при перемешивании ее с РПГ, РД или рео-РД в фосфатном буфере при 4°C в течение 15 ч. Об образовании ассоциатов судили по изменению подвижности при тонкоослойной гель-хроматографии на сефадексе $\text{G}-200$. Термостабильность модифицированной полисахаридами СК исследовали при 50°C или 37°C в $0,06 \text{ M}$ фосфатном буфере pH 7,4 и концентрации СК 10^{-4} M .

Дифференциальные спектры поглощения снимали на спектрофотометре Spereord M-40. Кинетику лизиса фибриновых гелей исследовали турбидиметрически /7/. Содержание белка определяли по Лоури, а также спектрофотометрически, используя $E_{280}^{1\%} = 9,0$ /8/. Активность СК определяли по методу Коникова /9/, на фибриновых пластинах /10/, а также по лизису образующимся плазмином этилового эфира N -ацетил-L-тирозина на pH-стате TTTid (Radiometer).

Для исследования активаторного действия *in vivo* СК и иммобилизованные производные вводили кроликам однократно внутривенно в дозе 60000 ME/кг. До введения и в динамике после него учитывали тромбиновое время по Сирмаи /11/, фибриноген и фибринолитическую активность плазмы — по Лазару, время лизиса сгустка — по Ферили, проводили тромбоэластографию /10/.

Результаты и обсуждение

В процессе периодатного окисления полисахаридов часть α -гликольных группировок расщепляется с образованием альдегидных групп, которые с аминокруппами белка образуют прочные ковалентные связи /12/. Нами исследовано влияние pH, времени взаимодействия, соотношения СК и декстранов на степень связывания и активность получаемых производных. Судя по данным тонкослойной гель-хроматографии (рис.1), через 0,5 и 1,2 ч

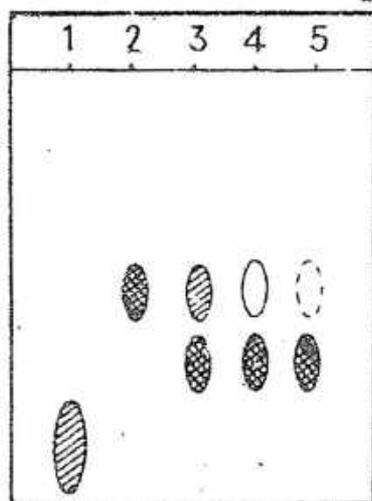


Рис.1. Тонкослойная хроматография смеси СК с ДАД в 0,1 М фосфатном буфере pH 8,2, соотношение 1:2: 1 — голубой декстран; 2 — нативная СК; 3 — смесь СК-ДАД через 30 мин; 4 — то же через 1,2 ч; 5 — то же через 3 ч.

после начала реакции еще остается заметное количество свободной СК, а следы присутствуют в смеси и после 3 ч инкубирования с ДАД. Однако увеличение продолжительности взаимодействия более 1,2 ч снижает фибринолитическую активность СК в тестах лизиса фибриновых пластин и фибриновых сгустков вплоть до полной инактивации (табл.1).

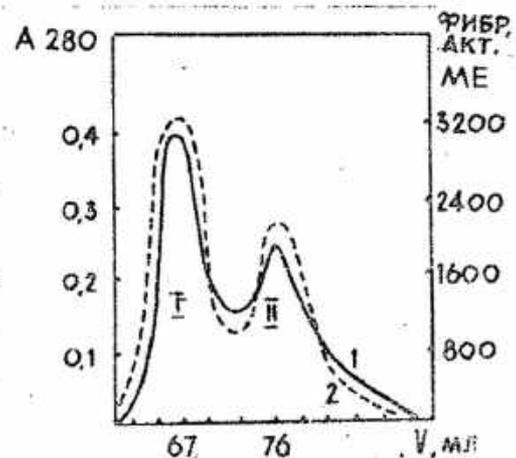
Снижение фибринолитической активности наблюдается также при уменьшении соотношения СК:ДАД. При 10-15-кратном избытке ДАД происходит почти полная инактивация СК. Поэтому в дальнейшем для иммобилизации были избраны следующие условия: время взаимодействия 1,2 ч, соотношение СК:ДАД — 1:2-1:1,5, pH 8,2. Исследование распределения белка после иммобилизации при этом режиме на колонке с сефадексом G -100 показало, что на

Таблица I

Влияние условий модификации СК на активность образующихся комплексов (степень окисления ДАД 22-24 %)

№ варианта	Соотношение СК:ДАД	Концентрация белка, мг/мл	Время взаимодействия, ч	pH	Активность (% от исходной)
1	1:1	5	1,5	8,3	80
2	1:2	5	5,0	8,0	0
3	1:10	5	3,0	8,0	0
4	1:5	5	1,5	8,3	48
5	1:2	15	1,2	8,5	58
6	1:2	15	1,2	9,5	68
7	1:2	3	1,2	8,2	90

Рис.2. Гель-хроматография смеси СК-ДАД через 1,2 ч после начала взаимодействия (сефадекс G-100, колонка 1,7x80 см): I - A_{280} ; 2 - активность по [6]



долю фракции иммобилизованной СК приходится 60-70%, на долю остатка нативной - 30-40 % (рис.2).

Можно предположить, что снижение фибринолитической активности с увеличением времени взаимодействия или относительной доли ДАД обусловлено стерическими затруднениями при катализе, вызванными конформационными изменениями СК при росте числа ковалентных связей. В какой-то степени это подтверждается результатами опытов по иммобилизации с введением в реакционную смесь сывороточного альбумина человека (САЧ) и глутаминовой кислоты, что замедляет инактивацию СК при увеличении времени взаимодействия с ДАД (табл.2).

Следует отметить, что при 50° С стабильность иммобилизованной на ДАД СК и нативного белка, выделенного из лекарственной формы целиазы с помощью гель-хроматографии на сефадексе G-100, была практически одинакова (рис.3).

Таблица 2

Влияние САЧ и глутаминовой кислоты на динамику активности СК при взаимодействии ее с ДАД (соотношение СК:ДАД - 1:10, на 1 мг белка СК добавлено 0,07 мг САЧ или 1,5 мг глутаминовой кислоты)

Продолжительность взаимодействия, мин	Относительная активность (A/A_0), %		
	СК	СК+САЧ	СК+глутаминовая кислота
0	100	100	100
30	95	95	95
60	65	70	80
120*	40	60	80
180	0	н/д	50
300	0	н/д	0

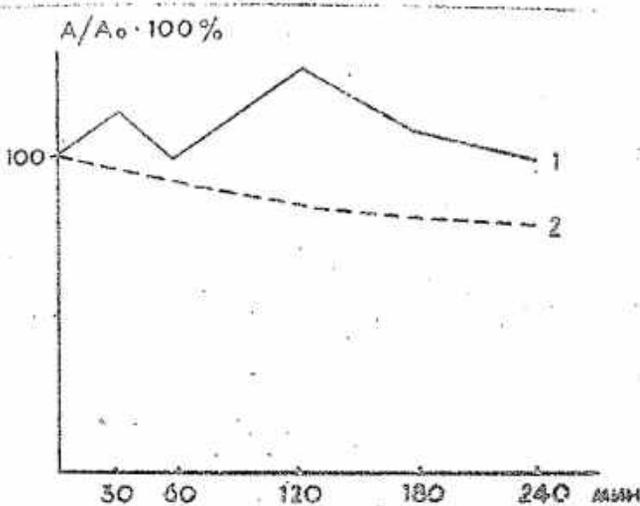


Рис. 3. Термоинактивация нативной СК (1) и конъюгата СК-ДАД (2) в водных растворах при 50° С

С нативными препаратами декстранового типа (РПГ, РД, рео-РД) образование ассоциатов СК происходит за счет невалентных взаимодействий. В диапазоне соотношений СК:декстран от 1:1 до 1:20 при рН 7,0, 8,0, 9,0, температуре 5° С и 25° С с помощью тонкослойной гель-хроматографии (рис. 4) и дифференциальной спектроскопии (рис. 5) подтверждено образование ассоциатов. Изменения подвижности белка в составе ассоциатов зависели от молярного соотношения СК:декстран. При этом ассоциаты, имеющие соотношение 1:10-1:15, обладали минимальной подвижностью.

Исходя из специфики образования ассоциатов, не следует ожидать значительных изменений их каталитических свойств в сравнении с нативной СК. Действительно, на примере комплекса

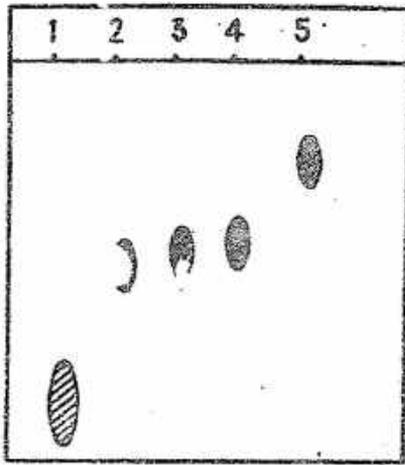


Рис.4. Тонкослойная гель-хроматография ассоциатов СК-РПГ в 0,1 М фосфатном буфере pH 9,0: 1 - голубой декстран; 2 - нативная СК; 3 - СК-РПГ при соотношении 1:1; 4 - то же при 1:3; 5 - то же при 1:20

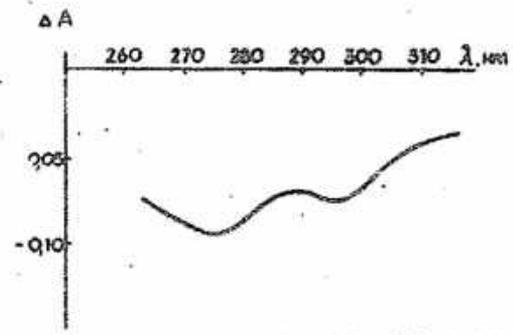
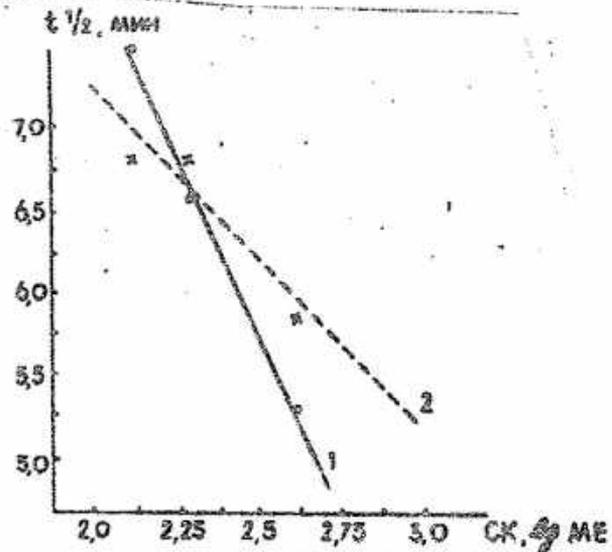


Рис.5. Разностный спектр поглощения комплекса СК:РПГ (1:15) относительно СК и РПГ в 0,1 М фосфатном буфере pH 8,2. Концентрация СК $0,5 \cdot 10^{-5}$ М

СК-РПГ установлено, что кинетика инициированного нативной СК и СК-РПГ лизиса фибриновых гелей практически однотипна. Вместе с тем зависимость величины времени полураспада гелей от концентрации СК или СК-РПГ (рис.6) позволяет предположить некоторое защитное действие декстрана при фибринолизе при низких концентрациях СК-РПГ.

Рис.6. Зависимость времени полураспада фибриновых гелей от концентрации нативной СК (1) или комплекса СК-РПГ (2)



Исследование стабильности ассоциата СК-РПГ при 37° С показало, что в сравнении с нативной СК колебания активности в динамике инкубации менее значительны.

Введение кроликам конъюгата СК-ДАД вызывало сдвиги гемостазиологических показателей, характеризующиеся двухфазностью (табл.3). В первые 10 мин увеличивалась фибринолитическая активность плазмы, нарастала литическая активность цельной крови, что приводило к некоторому снижению уровня фибриногена. По-видимому, такое действие в указанный период обусловлено влиянием остатка нативной СК в конъюгате СК-ДАД. Затем, начиная с 60 мин, отмечено увеличение тромбинового времени, постепенное снижение уровня фибриногена. Устойчивое нарастание фибринолитической активности плазмы обнаруживалось даже через 3 ч после введения. При этом действие конъюгата СК-ДАД было более "мягким" в сравнении с нативной СК (целиазой), так как не вызывало изменения лизиса сгустка крови и антиплазминов, что характерно для действия нативной СК (табл.4). В то же время при введении комплекса СК-РПГ не наблюдалось пролонгации эффекта. Влияние этого комплекса на гемостаз принципиально не отличалось от такового нативной СК.

Итак, на основе СК штамма Н46А получены различные по свойствам конъюгаты с декстранами в зависимости от характера взаимодействия. Судя по материалам исследований, иммобилизация СК названного штамма на ДАД принципиально не отличается от таковой "стрептазы". Это позволяет предположить, что указанный белок, а также отечественный препарат СК целиаза могут служить основой для получения препарата "стрептодеказа". Образованные комплексы СК с электронейтральными полисахаридами не обладают новыми качествами в плане фибринолитической активности *in vitro* и *in vivo* однако подтверждают целесообразность использования при введении препаратов нативной СК растворителей декстранового типа.

Л и т е р а т у р а

1. Никандров В.Н., Савченко Н.Е., Вотяков В.И. - В кн.: Энзимология тромболизиса и стрептокиназа: Матер.Респ.симпоз. Мн., 1982, с.3-11. - 2. Чазов Е.И., Мазаев А.В., Торчилин В.П., Смирнов В.Н. - Клин.медицина, 1980, т.58, № 8, с.51-55. - 3. Takada Y., Takada A. - Thromb. Res., 1979, 16, 865-869. - 4. Gerlach D., Köhler W. - Zbl. Bakt. Hyg., 1 Abt. Orig. A., 1977, 238, 336-349. - 5. Никандров В.Н., Воробьева Г.В., Демидчик Н.В., Казючиц О.А. - В кн.: Энзимология тромболизиса и стрептокиназа: Матер.Респ.симпоз. Мн., 1982, с.47-53. -

Таблица 3

Динамика гемостазиологических показателей крови кроликов
после введения конъюгата целлюлозы и диальдегиддекстрана (n = 6)

Исследуемые показатели	До введения	Время после введения, мин					
		10	30	60	120	180	240
Тромбиновое время, сек	27,0 \pm 3,5	31,0 \pm 2,3	37,0 \pm 6,2	41,0 \pm 3,1*	40,0 \pm 3,5*	46,0 \pm 2,8*	26,0 \pm 2,0
Концентрация фибриногена, мг%	453,0 \pm 40,1	418,0 \pm 39,0	320,0 \pm 18,3	300,0 \pm 19,8*	245,0 \pm 22,0*	310,0 \pm 17,6*	285,0 \pm 16,0*
Время лизиса сгустка раз- бавленной крови, ч	24	Частичный лизис	24	24	24	24	24
ФА плазмы, %	29,4 \pm 10,2	45,0 \pm 8,5*	28,1 \pm 6,6	33,3 \pm 9,1	10,2 \pm 5,3	35,5 \pm 5,9*	40,1 \pm 3,7*
Антиплазмины, сек	162,7 \pm 7,3	164,0 \pm 14,9	163,0 \pm 9,4	165,0 \pm 13,5	170,0 \pm 8,7	157,0 \pm 11,2	135,0 \pm 6,4

* Изменения статистически достоверны при $P \leq 0,05$.

Таблица 4

Динамика гемостазиологических показателей крови у кроликов
после введения целиазы в дозе 60000 ME/кг

Исследуемые показатели	До введения	Время после введения, мин			
		10	30	60	120
Тромбиновое время, сек	30,0 \pm 2,2	54,3 \pm 5,5 ^ж	40,0 \pm 3,9	47,3 \pm 2,7 ^ж	31,2 \pm 3,2
Концентрация фибриногена, мг%	449,0 \pm 72,8	216,0 \pm 38,0	196,7 \pm 29,1 ^ж	238,8 \pm 48,5	366,7 \pm 48,5
ФА плазмы крови, %	18,8 \pm 3,5	41,6 \pm 8,2 ^ж	32,1 \pm 3,2 ^ж	31,1 \pm 6,4	22,6 \pm 5,0
Время лизиса сгустка разбавленной крови	24 ч	83,3 \pm 1,0 ^{жс}	101,3 \pm 1,5 ^{жс}	140,0 \pm 2,2 ^{жс}	24 ч
Антицелиазаны, сек	91,5 \pm 1,0	150,0 \pm 3,4 ^ж	167,0 \pm 12,9	122,0 \pm 8,9	126,5 \pm 12,2

^ж Изменения статистически достоверны при $P \leq 0,05$.

6. Whistler R.L., Vesiller J.M. Методы исследования углеводов / Перевод с англ. Под ред. А.Я.Хорлина. М., 1975, с.73-76. - 7. Никандров В.Н., Денисевич В.А., Ефимов А.В. - В кн.: Стрептокиназа и другие тромболитические ферменты. Мн., 1979, с.95-101. - 8. Kirschenbaum D.M. - Anal. Biochem., 1975, 68, 465-484. - 9. Каневская М.И., Конилов А.П. - В кн.: Детские капельные инфекции. Л., 1953, с.47. - 10. Методы исследования фибринолитической системы крови / Под ред. Г.В.Андреевко. М.: МГУ, 1981. - 11. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования / Под ред. Е.А.Кост. М., 1968, с.130. - 12. Кочетков Н.К., Бочков А.Ф., Дмитриев Б.А. Химия углеводов. М., Химия, 1967, с.86.

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 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.Л. Закономерности синтеза стрептокиназы при многоциклическом культивировании продуцента	64
Давыдова Г.С., Шатило Н.Л., 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., Шашкова 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., 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 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 Е.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