

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. Вотяков — 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.

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ТЕНДЕНЦИИ ИССЛЕДОВАНИЙ
В ОБЛАСТИ СОЗДАНИЯ ТРОМБОЛИТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ
НА ОСНОВЕ ЭНЗИМОВ МИКРОБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

В.И.Вотяков, В.Н.Никандров, Н.Е.Савченко
(Минск)

Несмотря на достигнутые успехи, проблемы лечебного применения тромболитических препаратов (стрептокиназа, урокиназа, плазмин) решены не полностью. Дальнейшее развитие этой области клинической медицины во многом обусловлено совершенствованием методов диагностики, клинического и лабораторного контроля тромболитического действия, схем применения известных тромболитических препаратов /1/, а также самих препаратов. В связи с последним обстоятельством проводится широкий поиск новых тромболитиков.

В этом плане существуют два главных подхода: поиск новых субстанций и конструирование оригинальных лекарственных форм на основе перечисленных выше тромболитических ферментов /2/. В настоящее время бурно развиваются исследования по второму пути. Они нацелены на устранение нежелательных свойств, сохранение полезных и придание новых качеств тромболитическим энзимам /3, 4/. Использование липосом, разработка систем направленного транспорта препаратов будут, несомненно, способствовать совершенствованию лекарственных форм. Создание тромболитических препаратов на основе стрептокиназы, урокиназы, плазмина путем конструирования оригинальных производных даст возможность решить ряд проблем тромболитической терапии /5/.

Следует обратить внимание на то обстоятельство, что с позиций гемостазиологии стрептокиназа, урокиназа, плазмин в настоящее время наиболее полно отвечают основному требованию: органичности увязки механизма действия тромболитика с гемостазиологическими реакциями организма пациента /6/. Более того, проведенный анализ показывает, что и в своем обычном (неиммобилизованном) состоянии эти препараты чрезвычайно полезны при оказании экстренной медицинской помощи посредством зондового селективного и суперселективного введения /6/.

В этих условиях закономерен вопрос, нужно ли вообще изыскание новых субстанций. Такая необходимость обосновывается прежде всего рядом причин гемостазиологического характера, к

которым, исходя из путей развития тромбофилических состояний /6/, можно отнести следующие:

1. В случае высокой концентрации в кровотоке антиплазминов, в частности \mathcal{L}_2 , возникают препятствия действию плазмина. При значительном уровне антиплазминов для создания литического потенциала требуются весьма большие дозы плазмана. Эта же причина в ряде случаев, по-видимому, может уменьшить и силу конечного эффекта активаторов пламиногена.

2. Возможно образование фибрина, устойчивого к плазминовому гидролизу, например вследствие врожденных, генетически детерминированных, дефектов молекулы фибриногена или иных причин.

3. Нет полной ясности в отношении эффективности действия плазмина на так называемые "белые" тромбы, относительно бедные фибрином и богатые тромбоцитарными агрегатами. По данному вопросу высказаны разноречивые мнения /7,8/, в силу чего требуется проведение дополнительных углубленных исследований.

Существует и ряд других причин, подробно рассмотренных З.С. Баркаганом /9/. Все они диктуют необходимость разработки средств, способствующих блокаде действия антиплазминов, создания препаратов для лизиса тромбов из необычно устойчивого фибрина или тромбоцитарных агрегатов. Не исключаются также причины технологического характера: например, получение урокиназы, наработка тканевых активаторов пламиногена в опытах с культурами клеток до сих пор сопряжены с известными трудностями; для получения плазмана требуется дефицитное сырье. Стрептокиназа находится в более выгодном положении, однако высказываются соображения о замене ее белками из непатогенных микроорганизмов /10/. Следует заметить, что в этом, возможно, и есть некоторое преимущество, если предполагаемые продуценты будут лишены способности синтезировать токсические продукты. Что касается очищенного белка стрептокиназы, то он имеет минимальную токсичность /11/ и не является реактогенным, хотя и обладает антигенностью в силу чужеродной для человеческого организма природы.

Микроорганизмы как источники субстанций тромболитических ферментов привлекают особое внимание исследователей в течение последних десятилетий. В известной мере это закономерно. Именно микроорганизмы (стрептококки) продуцируют один из наиболее сильных и широко применяемых тромболитиков - стрептокиназу. Более того, микроорганизмы выделяют разнообразные по свойствам

протеолитические ферменты и их сочетания. Наконец, возможности получения требуемых компонентов при современном развитии биотехнологии представляются практически безграничными. Тем не менее многочисленные и разноплановые работы в указанном направлении имеют весьма скромные результаты. В этой связи примечательно высказывание о том, что до сих пор ни один из фибринолитических ферментов микроорганизмов прямого действия (и не только прямого) не заменил на практике стрептокиназу и урокиназу /8/. Действительно, микробные протеиназы, предложенные для клинического применения, оказались ограниченно пригодными или вовсе непригодными. Основная причина — недостаточный учет принципа органичности увязки механизма действия конкретного вещества с гемостазиологическими реакциями организма. Лишь при соблюдении этого условия препарат пригоден для клинического применения. Доказательством могут служить примеры довольно эффективного использования для тромболитического трипсиноподобной протеиназы — плазмина и в то же время проявления токсического действия трипсина /12/. Причины токсического влияния на организм протеолитических ферментов разнообразны.

1. Неспецифический протеолиз, приводящий к разрушению наряду с фибрином и фибриногеном других белков крови, необходимых для функций ряда систем и органов /13, 14/.

2. Накопление продуктов протеолиза вследствие интенсивного распада фибриногена и других белков, при котором образуются пептидные вещества, воздействующие на тонус сосудов, модулирующие действие нейромедиаторов, а также другой природы /14, 15/. Организм может буквально "наводняться" осколками белков — так называемыми "средними молекулами". Последние являются ответственными за развитие уремии, интоксикации, вторичной иммунодепрессии и других патологических состояний организма /16/.

3. Образование иных — по сравнению с плазминовым гидролизом — продуктов расщепления фибрина, обладающих измененным спектром биологического действия /17/. Продукты плазминового гидролиза, очевидно, играют двоякую роль. Накопление этих продуктов в большом количестве способно привести к появлению серьезных нарушений процессов жизнедеятельности, отмеченных выше. Что касается умеренных концентраций, то нельзя исключить своеобразного "регуляторного" эффекта их и возможности наличия в организме особо чувствительных к этим продуктам "рецепторов", способствующих включению ряда механизмов. В этой связи иначе

может рассматриваться и температурная реакция организма, возникающая в ответ на образование продуктов деградации фибрина тромботических масс после введения тромболитика. Эта температурная реакция принципиально отличается от реакции на введение чужеродного белка и свидетельствует о перестройке функций некоторых систем организма, имеющей, возможно, компенсаторное значение. Поэтому появление в кровотоке иных, чем при действии плазмина продуктов, может отрицательно влиять на состояние организма.

4. Активация реакций тромбогенеза с проявлением микроэмболиа и диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови.

5. Возможность связывания протеиназами ряда плазменных протеиназных ингибиторов и удаление их тем самым из участия в регуляции систем, примыкающих к гемостазиологическим реакциям.

6. Нельзя исключить и возможность повреждения клеток крови непосредственно вводимыми в кровоток протеиназами.

Таким образом, недооценка гемостазиологического звена может привести к весьма нежелательным последствиям. Однако основной гемостазиологический принцип не дает четких критериев для первичного отбора "кандидатов" в тромболитические препараты и тем более — для обоснования направленного поиска. По моему мнению, неполную информацию по этому вопросу получают и в экспериментах на животных. Это обусловлено видовой структурно-функциональной спецификой гемостазиологических механизмов и их компонентов, а также конкретным общепатологическим фоном при тромбозах, определяющим гемостазиологическую ситуацию в организме. Более того, последняя под действием тромболитиков меняется, что необходимо учитывать при проведении тромболизиса. Именно по этим причинам данные экспериментов на животных, тем более на интактных, в определенной мере имеют ограниченное значение. Кроме того, изучение тромболитика *in vivo* требует работы большого количества тромболитических субстанций высокой степени чистоты. Главная же задача заключается в том, чтобы с использованием малого количества вещества *in vitro* оценить перспективность его в качестве тромболитического препарата. Решить указанную задачу на основе анализа структурно-каталитических свойств известных тромболитических препаратов не представляется возможным, так как имеющиеся сведения не позволяют составить целостную картину.

Таким образом, в настоящее время отсутствует генеральная

теоретическая концепция, которая обосновала бы направленный поиск тромболитических ферментов. Возможно, одно из звеньев этой концепции заложено в ответе на вопрос: почему в организме для регуляции фибринолиза используются сериновые протеиназы — плазмин, тканевые активаторы, урокиназа? Нам представляется важным выяснение вопроса, являются ли протеиназы серинового типа более предпочтительными для тромболизиса, чем другие протеиназы. Чрезвычайно важен также вопрос о наличии узкоспецифичной протеиназы с высоким сродством к фибрину. В этой связи следует сказать, что, по мнению некоторых ученых, специфичность протеиназ проявляется главным образом к доменам белка, а не к аминокислотным остаткам /18/. Протеиназы с большой легкостью расщепляют участки между доменами, поэтому поиск специфичных по отношению к фибрину протеиназ требует детального изучения третичной и четвертичной специфичности.

В плане практических задач настоящего времени необходимо уяснить, что наиболее широкое распространение получили именно тромболитики непрямого (в отношении фибрина) активаторного действия — стрептокиназа и урокиназа. Это не случайно. Именно эти агенты способны органично влетаться в гемостазиологические реакции организма и при наличии достаточного уровня плазминогена в обычной ситуации вызывать лизис тромба. Дискуссия о предпочтительности каждого из этих тромболитиков продолжается. Хотелось бы отметить, что, несмотря на специфику своего действия, урокиназа близка сериновым протеиназам, в силу чего она чувствительна к некоторым плазменным (возможно, и тканевым) ингибиторам. Стрептокиназа лишена такого недостатка благодаря особенностям реализации каталитического акта, связанного с формированием активаторного комплекса. Именно поэтому мы считаем целесообразным поиск активаторов плазминогена, сходных по структурно-каталитической специфике со стрептокиназой, среди микробных белков. Возможно, имеет значение также и поиск плазминоподобных протеиназ, призванных заменить плазмин /19/. Эти протеиназы должны иметь функциональные свойства, практически идентичные плазмину, только тогда можно надеяться, что они будут пригодны, с точки зрения гемостазиологии. В противном случае поиск таких плазминоподобных протеиназ становится бессмысленным.

Что касается стрептокиназоподобных активаторов плазминогена, то этот вопрос представляется наиболее проблематичным. На наш взгляд, он может быть решен лишь на основе изучения эво-

люции протеиназ у микроорганизмов. Одной из точек зрения на происхождение стрептокиназы является мнение о "тушиковом" ее характере - боковой ветви эволюции протеиназ /20/. Согласно этой гипотезе, на определенном этапе эволюции произошли дупликация и слияние генов, в результате чего белок утратил обычную активность по отношению к ряду белковых субстратов. Если концепция о "тушиковой" ветви верна, в микробном царстве могут быть обнаружены подобные белки и у представителей других таксономических групп. Если же нет - вероятность наличия такого активатора у последних резко уменьшается.

С большей вероятностью можно вести поиск урокиназоподобных активаторов плазминогена - протеиназ узкой субстратной специфичности. Однако данные об исследованиях в этом направлении в литературе отсутствуют. В силу этих обстоятельств эффективность работ по изысканию тромболитиков среди микробных протеиназ пока еще невелика.

В настоящее время среди тромболитических препаратов стрептокиназа занимает довольно прочную позицию, что обусловлено громадными возможностями биосинтеза, своеобразным каталитическим механизмом (сама стрептокиназа не обладает выраженной протеолитической активностью), а также относительно небольшой реактогенностью. Следует заметить, что стрептокиназа синтезируется теми микроорганизмами - гемолитическими стрептококками, которые в процессе эволюции приспособились к обитанию в человеческом организме. При этом она может не вызывать каких-либо серьезных расстройств. Указанные моменты дают основание считать стрептокиназу достаточно "удобным" тромболитическим средством. Дальнейшее совершенствование ее препаратов предполагает разработку средств, позволяющих блокировать действие антиплазминов и избытка продуктов деградации фибрина. В то же время необходимо проведение работ по оптимизации схем введения препаратов стрептокиназы, усовершенствованию методов контроля за терапией, изучению показаний и противопоказаний к применению этих тромболитиков.

Кроме того, следует различать реактогенность на введение стрептокиназы "иммунологическую" (введение чужеродного белка) и "гемостазиологическую" (образование продуктов лизиса тромба и другие следствия специфического действия), для чего необходимо разработать методические подходы, позволяющие при лечебном применении стрептокиназы осуществлять такую дифференциацию. "Имму-

нологическая" реактогенность этого белка, как правило, проявляется у лиц с отягощенным анамнезом (перенесенные стрептококковые заболевания). Препараты стрептокиназы высокой степени чистоты мало реактогенны.

Л и т е р а т у р а

1. Люсов В.А., Белоусов Ю.Б. - Кардиология, 1981, т.11, № 8, с.5-17. - (2) Никандров В.Н., Савченко Н.Е., Вотяков В.И. - В кн.: Энзимология тромболизиса и стрептокиназа: Матер.Респ.симпоз. Мн., 1982, .9-II. - 3. Торчилин В.П. Новые физико-химические подходы к получению стабилизированных физиологически активных соединений: Автореф.дис. ... докт. М., 1980. - 4. Чазов Е.И., Мазаев А.В., Торчилин В.П., Смирнов В.Н. - В кн.: Актуальные проблемы гемостазиологии. М., 1981. - 5. Чазов Е.И., Мазаев А.В., Торчилин В.П. и др. - В кн.: Энзимология тромболизиса и стрептокиназа: Матер.Респ.симпоз. Мн., 1982, с.118-126. - 6. Вотяков В.И., Никандров В.Н., Савченко Н.Е. - Здрав.-охран.Белоруссии, 1984, № 8, с.14-19. - 7. Marbet G.A. et al. - Thromb. Haemost., 1982, 48, 2, 187-189. - 8. Хайдарова Н.В., Егоров Н.С. - В кн.: Функциональная активность ферментов и пути ее регуляции. М., 1981, с.155-166. - 9. Баркаган З.С. - В наст.сб., с. 35. - 10. Ландау Н.С., Егоров Н.С. - В кн.: Стрептокиназа и другие тромболитические ферменты: Матер.Респ.симпоз. Мн., 1979, с.26-33. - 11. Klöcking H.P. - Folia Haematol., 1976, 103, 3, 445. - 12. Чазов Е.И., Лакин К.М. Антикоагулянты и фибринолитические средства. М., 1977. - 13. Markwardt F. - Folia Haematol., 1976, 103, 3, 293-312. - 14. Buszko W. - Pol. tyg. Lek., 1981, 36, 24, 887-889. - 15. Larréou M.-J. et al. - Thromb. Haemost., 1975, 34, 3, 686-692. - 16. Тупикова З.Д. - Вопр.мед.химии, 1983, т.1, № 29, с.2-10. - 17. Iatallo Z.S. et al. - Folia Haematol., 1971, 95, 2, 158-165. - 18. Neurath H. - In: Protein Folding Proc. 28 th Conf. Ger. Biochem. Soc. Rodensburg, 1979. Amsterdam - N.Y., 1980, 501-523. - 19. Pulvereu G. et al. - Zbl. Bakteriол., 1980, Abt. IA, 248, 1, 99-109. - 20. Jackson K.W., Tang J. - Biochemistry, 1982, 21, 26, 6620-6625.

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 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 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., 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.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 гифеме	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