

С. П. Гаврилюк^{1,2}, О. М. Савчук², к.б.н., Л. І. Остапенко¹, проф.

ВПЛИВ НЕТОКСИЧНОГО 7 кДа ФРАГМЕНТУ СТРЕПТОКИНАЗИ НА ПАРАМЕТРИ СИСТЕМИ ГЕМОСТАЗУ

¹ Київський національний університет ім. Тараса Шевченка, м. Київ

² Шижир Інтернешнл ХХК, Долина дождів, Улаанбаатар, Монголія

Стрептокіназа (Ск) — білок бактеріального походження, що є фактично стрептококовим токсином, лікарські препарати якого застосовують для проведення тромболітичної терапії у випадках гострого інфаркту міокарду (ГІМ), легеневих емболій та інших порушеннях кровообігу, пов'язаних з тромбоутворенням [1, 2]. Медичне використання Ск знайшла завдяки її здатності неферментативним шляхом активувати плазміноген у плазмін, який відповідає за фібринолітичну функцію крові ссавців. Перетворення плазміноген-Ск комплексу, який утворюється на першому етапі, в плазмін-Ск комплекс може відбуватися шляхом внутрішньо молекулярного розщеплення активаційного пептидного зв'язку [3, 4]. Але крім позитивного ефекту на розщеплення тромбу за допомогою плазміну, Ск опосередковано викликає каскад негативних, в тому числі імунотоксичних явищ у кровотоці хворого: від тривалої гіперімунізації до появи вільного фібрину, що підвищує ризик утворення повторного тромбозу [2]. Крім того, раніше проведені нами дослідження плазми людей з гострим інфарктом міокарду, яким проводили тромболітичну терапію препаратами Ск, виявили значні імунотоксичні зміни в фібринолітичній системі крові, зокрема активності і кількості тканинного активатора плазміногену [6], пов'язаних з його викидом із ендотеліальних клітин. Такий хаотичний, нерегульований вплив Ск на систему гемостазу тварин і людини є токсичним, що саме і викликає стрептококова інфекція.

Маючи на увазі, що деякі фрагменти Ск (ФСк), зокрема фрагмент з молекулярною масою 7 кДа (7-ФСк), отримані нами при α -хімот-

риптичному гідролізі нативної Ск, зберігали її позитивну активність у перетворенні плазміногену в плазмін, та можливу втрату при гідролізі деяких сайтів, що відповідають за імуногенність та імунотоксичність для системи гемостазу, ми поставили за мету нашої роботи виявити механізм взаємодії Ск з ендотелієм судин у фібринолітичній системі кроля за допомогою більш простого за структурою інструменту 7-ФСк в умовах *in vivo* та *in vitro* і дослідити наслідки видалення значної частки молекули Ск на можливу токсичність 7-ФСк.

Матеріали і методи дослідження

На модельній системі *in vivo* (кролі, $n=7$) було досліджено вплив 7 кДа фрагменту стрептокінази на основні параметри системи гемостазу. В системі фібринолізу вивчали: активність плазміногену (Пг), активність та концентрацію тканинного активатора плазміногену (ТАП). Стан системи згортання крові оцінювали за наявністю чи відсутністю в кровотоці розчинного фібрину (РФ) [7-9].

7-ФСк отримували шляхом обмеженого гідролізу Ск α -хімотрипсином та очищенням з використанням методу хроматографії, що поділяє за розміром, на Superdex 75. Наявність 7-ФСк у фракції, елюйованій з колонки, доведено диск-електрофорезом в поліакриламідному гелі (ПААГ) та Вестерн-блотингом з використанням поліклональних антитіл проти Ск. Отриманий 7-ФСк був гомогенним за даними електрофорезу, не активував плазміноген та протромбін *in vitro*, що було показано з використанням специфічних хромогенних субстратів S₂₂₅₁ і S₂₂₃₈, але при введенні кролю зберігав активність нативної Ск стимулювати

перетворення плазміногену в плазмін.

7-ФСк вводили у дозі 0,381 мг/кг маси тіла внутрішньовенно відповідно до схеми лікування людей при захворюванні на гострий інфаркт міокарду.

Кров для аналітичних досліджень відбирали перед введенням 7-ФСк та через 1 і 4 години, 3 і 7 діб після ін'єкції.

Метод визначення активності ТАП [10] був вперше запропонований Д. Хмелівською та іншими авторами [12, 13] ще наприкінці вісімдесятих років минулого століття. Використований нами метод [6] ґрунтується на властивості плазміну, утвореного з екзогенного плазміногену під дією ТАП, що знаходиться в плазмі, розщеплювати специфічний для плазміну хромогенний субстрат — S₂₂₅₁. У цьому випадку реєструється зміна поглинання середовища, що викликана розщепленням субстрату при 405-492 нм на приладі Titertek Multiskan MC через визначені проміжки часу. Визначення активності ТАП проводили в еуглобуліновій фракції. В експериментах використано стандарт ТАП (20000 МО/мг білка) фірми "Genentech". Визначення активності ТАП і загальної фібринолітичної активності проводили в еуглобуліновій фракції [6].

Фракцію тромбоцитів отримували шляхом центрифугування цільної крові з додаванням розчину лимоннокислого натрію (38 г/л) у співвідношенні 9:1 протягом 20 хв при 150g і температурі 20 °С. Тромбоцити відмивали два рази 0,05 М трис-НСІ буфером, рН 7,4, який містив 0,13 М NaCl. Вивчали вплив 7-ФСк на тромбоцити через 1 год інкубації при 37 °С.

Активацію та агрегацію тромбоцитів досліджували на протоковому цитофлуориметрі COULTER® EPICS XL™ Flow Cytometer, який є системою для якісного і кількісного визначення біологічних та фізичних властивостей клітин та інших часток. Ці властивості вимірюються під час проходження клітин крізь промінь лазера. За допомогою приладу можна одночасно визначати 6 параметрів: пряме, бічне розсіювання та інтенсивність флуоресценції часток на 4 довжинах хвиль (FL1, FL2, FL3, FL4), використовуючи 1 лазер, що випромінює на довжині хвилі 488 нм. У ході експерименту

використовували два типи світлорозсіювання: бічне та пряме. Пряме світлорозсіювання застосовується для оцінки розміру клітини та наявності клітинних агрегатів. Бічне характеризує щільність цитоплазми тромбоцитів та може бути використане для визначення факту активації. На основі співставлення відповідних графіків контролю та досліді робили висновок стосовно проведеного експерименту. При ак-

тивації тромбоцитів секретується вміст їх гранул та змінюється форма клітин. Внаслідок цього відбувається зміна графіку, характерного для інтактних клітин. Крива, що утворюється при агрегації тромбоцитів, також значно відрізняється від кривої контрольного експерименту.

Результати та їх обговорення

Для визначення впливу 7-ФСк на фібринолітичний потенціал нами

була використана система гемостаза кроля (система *in vivo*). Після введення кролю внутрішньовенно 0,381 мг 7-ФСк кров тварини збирали, отримували плазму і аналізували її на вміст і активність тканинного активатора плазміногену.

На рис. 1 представлені результати вивчення впливу 7-ФСк на активність ТАП. Видно, що максимальна активність ТАП спостерігалася через 1 год після ін'єкції. Через 4 год активність ТАП починала знижуватись і досягала свого мінімального значення через 1 добу після ін'єкції. Через 4 доби активність ТАП починала підвищувалася і досягала рівня норми на 7 добу.

На рис. 2 представлені результати вивчення впливу 7-ФСк на кількість ТАП в плазмі крові кроля методом імуноферментного аналізу. З даних видно, що максимальний вміст ТАП в плазмі крові спостерігався через 1 год після введення 7-ФСк. Через 4 год кількість ТАП починає знижуватись і досягає мінімальних значень через 1 добу після ін'єкції. Протягом 4 та 7 днів після введення відбувалося відновлення кількості ТАП до рівня норми.

Порівняння результатів по кількісному аналізу і активності ТАП в плазмі кроля в даних експериментах свідчить про взаємозалежність приросту кількості активатора та приросту його активності. Можна не зважати на те, що знайдена кількість ТАП дещо перевищує активність, яку повинен проявляти фермент. Адже відомо, що дуже швидко після появи в плазмі ТАП зв'язується його інгібітором. Таким чином, в експерименті вимірюється загальна кількість вільного і зв'язаного з інгібітором ТАП, а вимірювана активність відповідає тільки кількості вільного ТАП, тобто підвищення активності супроводжується відповідним приростом кількості ферменту у крові тварин. Отже, можна стверджувати, що приріст активності ТАП в плазмі під впливом 7-ФСк є наслідком вивільнення з ендотеліальних клітин додаткової кількості ТАП.

Нещодавно було встановлено вплив Ск на вивільнення ТАП з ендотеліальних клітин судин [5]. Автори знайшли докази прямого впливу Ск на стінку клітин, тобто на зв'язування цього ефектору з мембраною ендотелію. Враховуючи той факт,

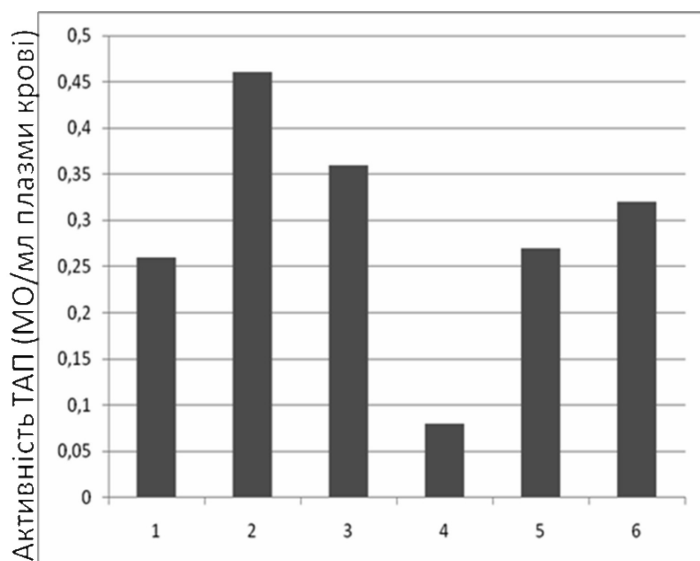


Рис. 1. Залежність активності ТАП у плазмі крові кролів від часу після внутрішньосудинної ін'єкції 7-ФСк у дозі 0,381 мг/кг (наведено результати стандартного експерименту)

Примітки: на цьому та рис. 2

- | | |
|----------------------------|----------------------------|
| 1 – до ін'єкції (норма); | 2 – 1 год після ін'єкції; |
| 3 – 4 год після ін'єкції; | 4 – 1 доба після ін'єкції; |
| 5 – 4 доби після ін'єкції; | 6 – 7 днів після ін'єкції |

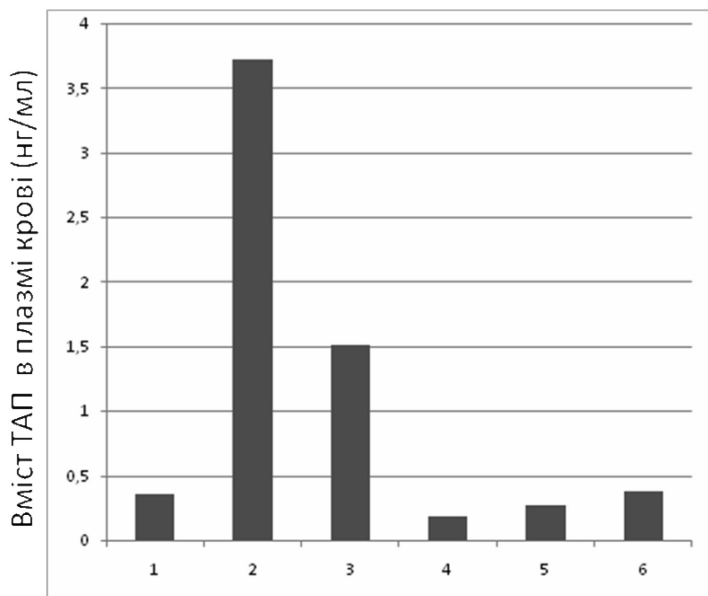


Рис. 2. Залежність вмісту тканинного активатора плазміногену (ТАП) у плазмі крові кролів від часу після внутрішньосудинної ін'єкції 7-ФСк у дозі 0,381 мг/кг (наведено результати стандартного експерименту)

що *in vivo* 7-ФСк стимулює перетворення плазміногену в плазмін, в той час як *in vitro* прямої дії 7-ФСк на цю реакцію не спостерігається, можна вважати, що в цих експериментах 7-ФСк, який походить з Ск, впливає само на вивільнення ТАП з клітин стінки судин. Причому, скоріше за все, 7-ФСк може бути саме тим сайтом, яким стрептокіназа взаємодіє з мембраною ендотеліальних клітин.

Зважаючи на те, що розчинний фібрин є ключовим діагностичним маркером, який показує розвиток тромбофілії з можливою загрозою тромбоутворення, а Ск у своєму токсичному впливі на систему гемостазу стимулює накопичення розчинного фібрину у кровотоці [8, 9], в крові дослідних кролів при введенні 7-ФСк вимірювали наявність розчинного фібрину. Дослідження показали відсутність розчинного фібрину в плазмі крові на всіх етапах забору її для аналізів. Це свідчить про те, що 7-ФСк, на відміну від нативної Ск, не впливає на активацію каскаду згортання

крові з подальшою появою тромбів. Фактично компонент Ск, що відповідає за токсичний вплив на систему гемостазу, відшлеплюється від 7-ФСк у процесі α -хімотриптичного гідролізу.

Раніше було встановлено, що Ск підвищує вміст інгібітору активаторів плазміногена 1 типу (PAI-1) у плазмі крові кроля, збагаченій тромбоцитами [7]. Також відомо, що Ск за присутності плазміногену викликає активацію тромбоцитів [11]. З огляду на це, перед нами постала задача вивчити безпосередню дію 7-ФСк на тромбоцитарну ланку системи гемостазу. Для проведення досліджень отримували плазму крові кроля, збагачену тромбоцитами та позбавлену плазміногену.

Як видно з даних рис. 3, внесення 7-ФСк в плазму кроля без плазміногену, але збагачену тромбоцитами, не спричиняє зміни форми тромбоцитів (графіки досліду і контролю співпадають), що свідчить про відсутність активації клітин. Тобто, інкубація 7-ФСк з тромбоцитами кроля протягом 5 хв

(рис. 3Б) та 1 год (рис. 3В) не призводить до зміщення дослідних графіків відносно контрольного (рис. 3А), а оскільки пряме світлорозсіювання застосовується для оцінки розміру клітини та клітинних агрегатів, то це свідчить про відсутність агрегації тромбоцитів.

При цьому, на відміну від Ск (рис. 4), також не спостерігали агрегації тромбоцитів у жодному з досліджуваних випадків з 7-ФСк (графіки контролів та дослідів співпадали). Як видно з рис. 4, інкубація 7-ФСк з тромбоцитами кроля протягом 5 хв (рис. 4Б) та 1 год (рис. 4В) не призводить до зміщення дослідних графіків відносно контрольного (рис. 4А). Цей факт показує відсутність активації тромбоцитів, оскільки бокове світлорозсіювання характеризує щільність цитоплазми тромбоцитів та може бути використане для визначення акту активації. Ці результати додатково свідчать, що, на відміну від нативної Ск, її 7-ФСк не включає молекулярні структури, які відповідають за токсичний вплив на систему гемостазу.

Таким чином, в результаті проведеної роботи показано, що молекула стрептокінази є поліфункціональною структурою, розподіленою на специфічні домени, які відповідають за різні впливи на систему гемостазу. В результаті обмеженого α -хімотриптичного гідролізу нативної стрептокінази отримано її нетоксичний фрагмент з молекулярною масою 7 кДа, який є можливим кандидатом на сайт взаємодії стрептокінази з клітинами стінки судин, оскільки він при введенні в кров'яне русло *in vivo* стимулює викид тканинного активатора плазміногена. Це, в свою чергу, обумовлює виконання позитивної дії стрептокінази — неферментативного розщеплення плазміногену до плазміну і наступного тромболізісу. Тобто, 7-ФСк при наявності позитивного ефекту не має негативних, імунотоксичних ефектів стрептокінази і, таким чином, може бути основою для розробки тромболітичних агентів нового покоління і ефективним інструментом при вивченні системи гемостазу.

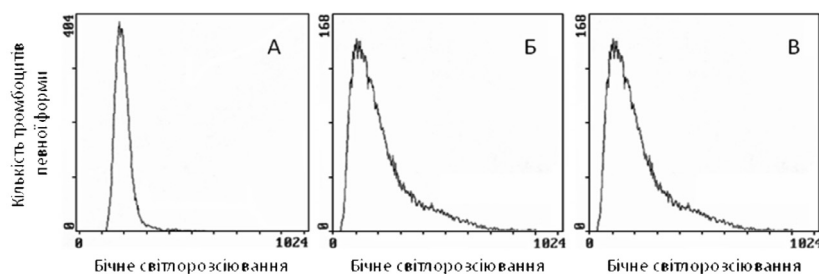


Рис. 3. Вплив 7-ФСк на фракцію тромбоцитів кроля в дослідях *in vitro*:

- А - контрольна фракція тромбоцитів;
- Б - 5 хв інкубації 7-ФСк з фракцією тромбоцитів;
- В - 1 год інкубації 7-ФСк з фракцією тромбоцитів

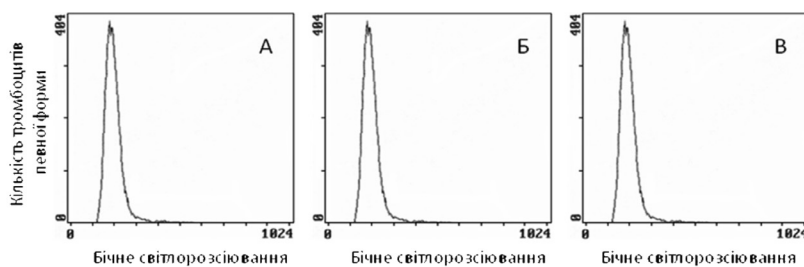


Рис. 4. Вплив стрептокінази на фракцію тромбоцитів кроля в дослідях *in vitro*:

- А - контрольна фракція тромбоцитів;
- Б - 5 хв інкубації стрептокінази з фракцією тромбоцитів;
- В - 1 год інкубації стрептокінази з фракцією тромбоцитів

ЛИТЕРАТУРА

1. Дикун Я. В. 40 років клінічного досвіду тромболітичної терапії гострого інфаркту міокарда // Укр. мед. часоп. — 1998. — Т. 5. — С. 49-53.
2. Зубаиров Д. М. Молекулярные основы свёртывания крови и тромбообразования. — Казань: ФЭН, 2000. — 366 с.
3. Reddy K. N. N., Marcus G. An evaluation of streptokinase therapy in early coronary reperfusion in a primate model // J. Biol. Chem. — 1972. — V. 1330. — P. 1683-1691.
4. Reddy K. N. N. Plasminogen-dependent fibrinolytic activity in normal human lymphocytes: Diminished lymphocyte plasminogen activator in chronic lymphocytic leukemia // Fibrinolysis. — 1980. -V. 1. — P. 71-94.
5. Краснобрига Є. М. Вплив стрептокінази на активаційну ланку системи фібринолізу // Дис. канд. біол. наук: 03.00.04. — К., 2004. — 118 с.
6. Савчук О. М., Краснобрига Є. М., Макогоненко Є. М. Визначення активності тканинного активатора плазміногена у хворих на гострий інфаркт міокарда // Експерим. клін. фізіол. біохім. — 2002. — № 3. — С. 87-92.
7. Сучасні методи лабораторної діагностики внутрішньосудинного мікрозсідання крові (методичні рекомендації). — Київ, 1994. — 23 с.
8. Panyim S., Chalkley R. High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones // Arch. Biochem. Biophys. — 1969. — V. 130. — P. 337-346.
9. Burnette W. N. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A.P. // Anal. Biochem. — 1981. — V. 112. — P. 195-203.
10. Chmielewska J., Ranby M., Wiman B. Evidence for a rapid inhibitor to tissue plasminogen activator in plasma // Thromb. Res. — 1983. — V. 31. — P. 427-436.
11. Eriksson E., Ranby M., Gyzander E., Risberg B. Determination of plasminogen activator inhibitor in plasma using t-PA and a chromogenic single-point poly-D-lysine stimulated assay // Ibid. — 1988. — V. 50. — P. 91-101.
12. Koh Stephen C. L., Yuen R., Veigas O. A. C. et al. A plasmin generation method for the determination t-PA activity in blood // Immunol. Cell. Biol. — 1989. — V. 67. — P. 197-203.
13. Ивванов Е. П. Диагностика нарушенный гемостаза. — Минск: Беларусь. — 1983. — 221 с.

С. П. Гаврилюк, А. Н. Савчук, Л. И. Остапченко

ВЛИЯНИЕ НЕТОКСИЧНОГО 7 КДА ФРАГМЕНТА СРЕПТОКИНАЗЫ НА ПАРАМЕТРЫ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА

В экспериментальных системах изучали влияние нетоксичного 7 кДа фрагмента стрептокиназы на параметры фибринолитической системы (кроли) и на тромбоциты в плазме крови без плазминогена (*in vitro*). Показано, что 7 кДа фрагмент вызывает значительное повышение как концентрации, так и активности тканевого активатора плазминогена, которое не сопровождается появлением растворимого фибрина, а также не влияет на активацию и агрегацию тромбоцитов, что указывает на отсутствие, по сравнению со стрептокиназой, токсического воздействия на систему гемостаза. На основании полученных экспериментальных результатов, а также анализа данных литературы сделан вывод, что возможный механизм действия 7 кДа фрагмента стрептокиназы состоит в физическом или, возможно, физиологическом взаимодействии с эндотелием сосудов, что стимулирует синтез де novo и выброс эндотелиальными клетками тканевого активатора плазминогена.

S. P. Gavrylyuk, O. M. Savchuk, L. I. Ostapchenko

THE INFLUENCE OF NONTOXIC 7 KDA STREPTOKINASE FRAGMENT ON HAEMOSTASIS SYSTEM PARAMETERS

On the experimental model systems the influence of nontoxic 7 kDa streptokinase fragment on the fibrinolytic system (rabbits, *in vivo*) parameters and on platelets in blood plasma without plasminogen (*in vitro*) was studied. It was shown that 7 kDa fragment caused the considerable increasing both the concentration and activity of tissue plasminogen activator, which is not accompanied by accumulation of soluble fibrin, and also did not influence on activating and aggregation of platelets, that specifies the absence of the toxic affects on homeostasis system compared to streptokinase. On the basis of the experimental results and simultaneous analysis of literature dates we concluded that the possible mechanism of streptokinase's 7 kDa fragment action is consists in physical or, possibly, physiological interaction with vessels endothelia that stimulates the de novo synthesis and releasing into the blood of tissue plasminogen activator by endothelial cells.