

УДК 577.151.4; 577.151.57

Ю. Г. КЛИСЬ, наук. співр.,

С. В. ВЕРЬОВКА, д-р біол. наук, зав. лабораторії біохімії

ДУ «Інститут отоларингології імені проф. О. С. Коломійченка АМН України»,  
вул. Зоологічна, 3, Київ, 03680, Україна,

e-mail: verevka@biochem.kiev.ua

## ОСОБЛИВОСТІ АКТИВАЦІЙНОЇ ДІЇ СТРЕПТОКІНАЗИ В ПЛАЗМІ КРОВІ ЛЮДИНИ

Досліджено гідролітичну та активаційну дію білкових фракцій, отриманих за гель-фільтраційного розділення плазми крові з привнесеною стрептокіназою. Формування потрійного комплексу «плазміноген — стрептокіназа —  $\alpha_2$ -макроглобулін» може бути основною активаційною формою стрептокінази за умов *in vivo*. Водночас відмічено гідролітичну та активаційну активності у фракції, що за молекулярною масою відповідає  $\gamma$ -глобулінам.

**Ключові слова:** стрептокіназа, плазміноген, фібриноліз, плазма крові людини.

Існування істотних відмін між функціонуванням білків за умов *in vivo* та в очищеному вигляді є причиною хибного тлумачення експериментальних даних та формування на їх підставі неадекватних висновків. Для попередження можливих помилок було проведено дослідження взаємодій стрептокінази з білками плазми крові людини за умов, максимально наближених до нативних.

Подібно до більшості функціонально активних білків, ключовий фермент фібринолітичної системи крові плазміну (К. Ф. 3.4.21.7) зазнає низку структурних перетворень від препроформи до проформи та активаційного перетворення на активну форму [1]. Проформа плазміну — плазміноген (Пг) — циркулює в кровообізі та зазнає активації до плазміну внаслідок сорбції на фібриновій сітці та активаційного розщеплення, здійснюваного сорбованим же тканинним активатором плазміногену (К. Ф. 3.4.21.68). Сорбція на фібрині захищає плазмін від інактивації  $\alpha_2$ -антиплазміном, що миттєво інактивує вільний плазмін, що вивільнюється внаслідок фібринолізу [2]. Водночас плазміноген може бути проактивованій і в розчинному стані, зокрема — внаслідок взаємодії зі стрептокіназою (Ск) — невеликим за масою (47 кДа) білком, що продукується  $\beta$ -гемолітичними стрептококами групи С [3]. Формування Пг—Ск-комплексу ( $K_d$   $6,2 \cdot 10^{-7}$  М [4]) відбувається з великою швидкістю ( $5,4 \cdot 10^7$  М<sup>-1</sup>с<sup>-1</sup> [5]) і призводить до формування в молекулі плазміногену гідролітичного центру без розщеплення активаційного зв'язку Arg<sub>561</sub>—Val<sub>562</sub> [3]. Комплекс Пг—Ск ефективно активує вільний плазміноген, розщеплюючи в ньому активаційний зв'язок ( $K_m$  0,12 мкМ,  $k_{cat}$  0,15 с<sup>-1</sup>), тоді як вільний плазмін активаційної дії не виявляє [6]. За умов *in vitro* комплекс Пг—Ск трансформується в плазмін-стрептокіназний комплекс з наступною протеолітичною деградацією Ск-складової комплексу [7]. Однак лишається відкритим питання, чи відбуваються подібні перетворення в крові за присутності цілої низки білкових інгібіторів протеїназ. Відомо, що час циркуляції зворотньо інактивованого по активному центру Пг—Ск-комплексу в кров'яному руслі значно вище, ніж у Ск ( $T_{1/2}$  70—120 хв. проти 15—25 хв., відповідно) [8]. Тобто час циркуляції Ск в кровообізі визначається наявністю в утворених нею комплексах активного каталітичного центру. Ця обставина

змушує припустити можливість додаткових взаємодій з тими чи іншими білковими компонентами плазми крові. Вважається, що Пг—Ск-комплекс не чутливий по відношенню до основних складових інгібіторного антипротеїназного потенціалу крові [2, 9]. При цьому, однак, полишено поза увагою таку особливість дії  $\alpha_2$ -макроглобуліну ( $\alpha_2$ М), як зв'язування протеїназ поза гідролітичного центру. При цьому значною мірою обмежується їх здатність до гідролізу великих білків, однак активність по відношенню до низькомолекулярних субстратів залишається практично без змін [10]. Тобто дослідження взаємодій  $\alpha_2$ М з тією чи іншою протеїназою за розщепленням низькомолекулярних субстратів є апіорно неінформативним. Досить значна (725 кДа) молекулярна маса  $\alpha_2$ М [11] дає змогу виявляти гель-фільтраційними методами як сам  $\alpha_2$ М, так і утворені ним комплекси на фоні інших білків плазми крові. Раніше було показано, що за гель-фільтраційного розділення плазми крові, попередньо проактивованої Ск, протеолітична активність спостерігається лише у високомолекулярній, відповідній  $\alpha_2$ М та утвореним ним комплексам, фракції [12]. Однак чи лишається Ск у складі утворюваного комплексу і чим, власне, забезпечується її подальша активаційна дія за умов *in vivo*? З'ясування цього питання необхідне для розуміння механізмів активаційної дії Ск — важливого та широкоживаного клінічного фібринолітика. Метою даної роботи було з'ясування можливостей утворюваних Ск-, Пм- та  $\alpha_2$ М-комплексів до активації інтактного плазміногену.

### Матеріали і методи

Реактиви та матеріали вітчизняного виробництва використовували кваліфікації не нижче «ХЧ» або відповідної чистоти фірм Sigma (США) та Merck (Німеччина).

Плазму крові людини отримували центрифугуванням 15 хв, 1200 г отриманої в день досліду стабілізованої цитратом натрію крові. 3,8%-й розчин цитрату натрію вносили до крові здорових донорів у співвідношенні одного об'єму до дев'яти об'ємів крові.

Гель-фільтраційне фракціонування білків проводили на колонці з Superdex 200PG (Amersham Biosciences, США) діаметром 1,8 см, довжиною 26,6 см та загальним об'ємом 67,4 мл, урівноважену робочим буфером — 0,05 М трис-солянокислому буфері, рН 7,6 за різних концентрацій NaCl (0,1, 0,5 та 1,0 М). Наносили 0,4 мл вдвічі розведеної цитратної плазми крові. Швидкість протікання становила 20—25 мл/год, збирали фракції об'ємом 1,5 мл. Контроль за елюцією білка проводили спектрофотометрично за довжини хвилі 280 нм. Вибір даного типу гелю зумовлено його високими фільтраційними властивостями та діапазоном молекулярного розподілу білків (10—600 кДа) [13], що забезпечує швидке та селективне відокремлення високомолекулярних  $\alpha_2$ М- та  $\alpha_2$ М-вміщуючих комплексів від інших білків плазми крові. Водночас обмеження, зумовлені мінімальним об'ємом фракцій, придатним до вимірювання в 1-см кюветі, дещо зменшували селективність розподілу та робили інформативним визначення відповідних активностей лише у топових фракціях піків.

Протеолітичну активність досліджуваних зразків визначали за гідролізом протаміну з забарвленням продуктів гідролізу за Сакагуші [14].

Розчин Ск готували на фізіологічному розчині (0,15 М NaCl) відповідно до кількості одиниць, необхідних для кожного конкретного досліду.

Амідолітичну активність досліджуваних зразків визначали за гідролізом хромогенних субстратів S-2251 (H-D-Val-L-Leu-L-Lys-para-nitroanilide, Chromogenics, Швеція) за поглинанням при 405 нм утворюваного вільного пара-нітроаніліну [15].

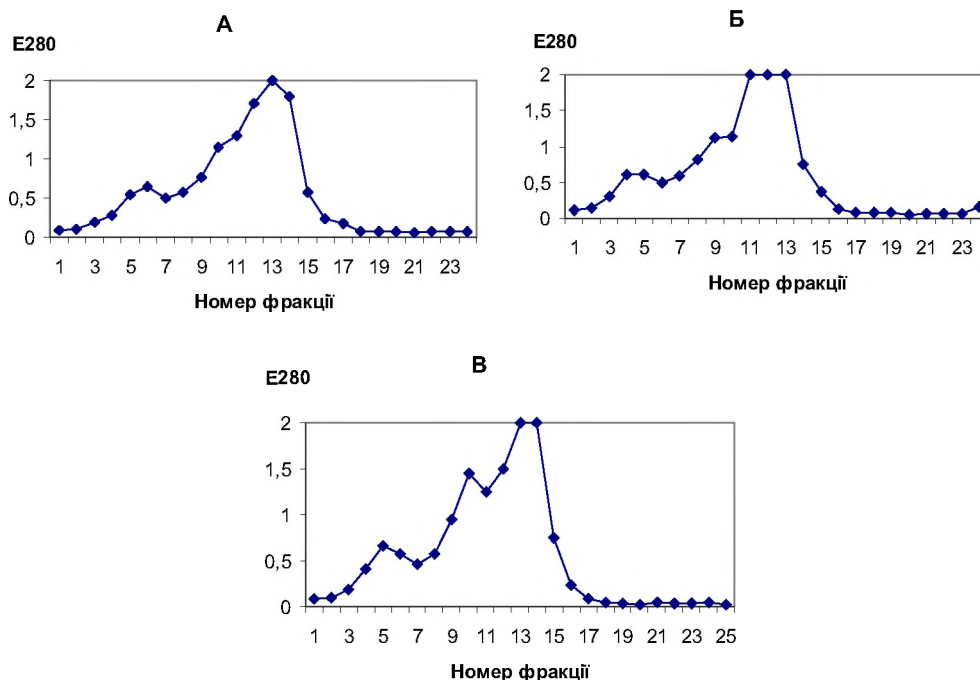
Препарати Глу-плазміногену людини отримували афінною хроматографією на лізин-сефарозі свіжої цитратної плазми крові в присутності основного панкреатичного інгібітора трипсину [16].

Активційну дію окремих фракцій плазми крові по відношенню до інтактного Глу-плазміногену людини визначали додаючи 0,3 мл досліджуваного зразка до 1,5 мл 0,5 М трис-солянокислого буфера, рН 7,5, що містив 5 мкг Глу-плазміногену. Після 5 хвилин інкубації при 37 °С додавали 0,1 мл розчину хромогенного субстрату S-2251 в диметилсульфоксиді (2 мг/мл), інкубували протягом 30 хвилин при 37 °С та зупиняли реакцію додаванням 0,1 мл льодяної оцтової кислоти. Наявність активційної дії визначали за поглинанням утвореного п-нітроаніліну при 405 нм.

### Результати та їх обговорення

Гель-фільтраційне розділення окремих білкових фракцій крові за молекулярною масою проводили на колонці з Superdex 200 PG. Даний гель обрано через його високі сепараційні властивості, зумовлені жорсткістю гранул та більшою швидкістю протікання порівняно до традиційного Сефадексу G-200. Водночас Superdex 200 PG дає змогу більш селективно відокремити  $\alpha_2$ М-вміщуючу фракцію, що виходить у вільному об'ємі. Для більш селективного розділення плазми крові за молекулярною масою застосовували розділення в буферних системах з різною йонною силою в присутності 0,1, 0,5 та 1М NaCl.

Як впливає з хроматограм, наведених на рисунку, збільшення іонної сили призводить до помітного зростання ступеню розподілу білкових фракцій, однак в цілому істотних змін не спостерігалось.



Профілі гель-хроматографічного розподілу білкових фракцій плазми крові в 0,05 М трис-солянокислому буфері рН 7,8, в присутності 0,1 М (А), 0,5 М (Б) та 1 М (В) хлориду натрію

Для визначення знаходження плазміногену серед трьох отриманих фракцій плазми крові застосовували екзогенний активатор — Ск, котру вносили в кількості 10 міжнародних одиниць до аліквот (0,5 мл) кожної з трьох отриманих фракцій. Подібне співвідношення забезпечує перетворення більшої частини наявного плазміногену на Пг—Ск-комплекс, що не інгібується  $\alpha_2$ -антиплазміном та може бути виявлений за гідролізом хромогенного субстрату S-2251 чи протаміну. Після 5 хвилин інкубації при 20 °С визначали наявність амідолітичної та протеолітичної активностей, що спостерігалися лише в третій фракції плазми крові. Такий розподіл добре узгоджується з попередніми даними, отриманими в нашій лабораторії при гель-фільтраційному розділенні плазми крові на Сефадексі G-200 [12].

Для з'ясування характеру міжмолекулярних взаємодій екзогенної Ск з білками плазми крові до аліквот (0,4 мл плазми) вносили 1600 міжнародних одиниць Ск, що забезпечувало її повне зв'язування з Пг зі збереженням 20% надлишку останнього [12]. Внаслідок швидкої активації утвореним Пг—Ск-комплексом остаточний Пг перетворюється на вільний плазмін, який миттєво інактивується  $\alpha_2$ -антиплазміном. Тим самим забезпечується присутність в системі активного Пг—Ск-комплексу за гарантованої відсутності вільних Пг, плазміну та Ск. Проактивовану у наведений спосіб плазму піддавали гель-фільтраційному фракціонуванню за різних значень концентрації NaCl. Загальна картина розподілу білків практично не відрізнялась від отриманих в попередніх дослідах, в розподілі ж гідролітичної та активаторної активностей спостерігались якісні відмінності (див. таблицю).

При дослідженні фракцій, отриманих за гель-фільтраційного розділення при високих значеннях іонної сили (1 М та 0,5 М NaCl) амідолітичну та протеолітичну активність виявлено лише в першому та другому піках. При цьому активаційну дію виявлено у всіх трьох піках. За гель-фільтраційного розподілу за низького значення іонної сили (0,1 М NaCl) амідолітичну, протеолітичну та активаційну дію виявлено лише в першому та другому піках. Подібну відмінність може бути пояснено розпадом частини Пг—Ск-комплексу під впливом високої іонної сили з вивільненням позбавленої власної гідролітичної дії та відносно низькомолекулярної (47 кДа) Ск, яка має знаходитись саме серед білків третього піку.

Розподіл амідолітичної, протеолітичної та активаційної активності серед проактивованих Ск фракцій плазми крові людини залежно від концентрації хлориду натрію \*

Концентрація NaCl та номер піку	Амідолітична активність за гідролізом хромогенного субстрату S-2251 (поглинання при 405 нм)	Протеолітична активність за гідролізом протаміну (поглинання при 508 нм)	Активаційна дія за гідролізом хромогенного субстрату S-2251 проактивованим інтактним плазміногеном (поглинання при 405 нм)
1 М — № 1	0,146±0,010	0,320±0,033	0,485±0,038
1 М — № 2	0,052±0,008	0,070±0,007	0,500±0,033
1 М — № 3	На рівні контролю	На рівні контролю	0,245±0,020
0,1 М — № 1	0,148±0,010	0,310±0,028	0,760±0,06
0,1 М — № 2	0,052±0,007	0,060±0,007	0,930±0,07
0,1 М — № 3	На рівні контролю	На рівні контролю	На рівні контролю

\* В таблиці наведено усереднені дані трьох дослідів.

\*\* Дані відображують відносні одиниці оптичної щільності.

Отримані дані змушують істотно скорегувати існуючі уявлення щодо дії в кровообізі Ск — важливого фібринолітика, дають змогу зробити певні попередні висновки та припущення щодо перетворень, які зазнає Пг—Ск-комплекс за присутності складної системи білків плазми крові, що зазнає дедалі ширшого клінічного вжитку.

### Висновки

1. Видається ймовірним формування потрійного комплексу Пг—Ск— $\alpha_2$ М, котрий й забезпечує подальшу активацію вільного Пг у плазмі. Це дає змогу пояснити залежність швидкості елімінації Ск з кровообігу від наявності гідролітичного центру в екзогенному Пг—Ск-комплексі [8]. Тобто саме потрійний комплекс Пг—Ск— $\alpha_2$ М забезпечує активацію вільного Пг в плазмі, шляхи ж елімінації потрійного комплексу з кровообігу навряд чи істотно відмінні від опосередкованих ендоцитозом шляхів вилучення інших комплексів протеїназ з  $\alpha_2$ -макроглобуліном.

2. Часткове руйнування потрійного комплексу за умов високої йонної сили призводить до вивільнення Ск, що зумовлює появу активаційної активності в третьому, відносно низькомолекулярному, піці.

3. Позбавлений за умов високої йонної сили Ск-складової комплекс Пг з  $\alpha_2$ М зберігає як активаторну, так і амідолітичну активність.

4. Виявлення як амідолітичної, так і активаторної активності в другому піці може бути наслідком додаткових комплексоутворень між Ск, Пг та відмінними від  $\alpha_2$ -макроглобуліну білками плазми крові. Відповідно до відомого розподілу білків плазми крові на гелі даного типу найімовірнішим компонентом даного типу комплексоутворень видаються імуноглобуліни.

5. Отримані дані свідчать, що за умов, наближених до фізіологічних, Пг—Ск-комплекс зазнає складних комплексоутворень з білками плазми крові, які є істотно відмінними від молекулярних перетворень Пг—Ск-комплексу в очищеній системі за умов *in vitro*.

### Література

1. *Активация* / В кн.: Антонов В. К. Химия протеолиза. — М.: Наука, 1991. — С. 265—266.
2. *Wiman B., Nilsson T., Collen D.* On the mechanism of the reaction between plasmin and  $\alpha_2$ -antiplasmin / In: *Protides of Biological Fluids*. Peeters H., Ed., Pergamon Press, Oxford. — 1980. — P. 379—382.
3. *Reddy K. H.* Streptokinase — biochemistry and clinical application // *Enzyme*. — 1988. — Vol. 40, № 1. — P. 79—89.
4. *Boxrud P. D., Block P. E.* Streptokinase binds preferentially to the extended conformation of plasminogen through lysine binding sites and catalytic domain interactions // *Biochemistry*. — 2000. — Vol. 39, № 45. — P. 13974—13981.
5. *Adams M. G., Fretto L. J., McKee P. A.* Fibrinolysis mediated by plasminogen with proteolytic activity // *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* — 1980. — Vol. 39, № 6. — P. 1756.
6. *Wohl R. C., Sinio L., Summaria L., Robbins K.* Comparative activation kinetics of mammalian plasminogen // *Biochem. Biophys. Acta*. — 1983. — Vol. 745, № 1. — P. 20—31.
7. *Welfle K., Misselwitz R., Schaup A.* Conformation and stability of streptokinase from nephritogenic and nonnephritogenic strains of streptococci // *Proteins*. — 1997. — Vol. 27, № 1. — P. 26—35.
8. *Сидоренко Б. А., Преображенский Д. В.* Клиническое применение антитромботических агентов. — М., 1998. — 176 с.

9. *Castellino F. J., Urano T., de Ceprano V.* Control of human plasminogen activation // *Haemostasis*. — 1988. — Vol. 18, № 1. — P. 15—23.
10. *Roberts R.* Alpha-2-macroglobulin // *J. Med.* — 1985. — Vol. 16, № 1—2—3. — P. 129—219.
11. *Feinman R. D.* The proteinase-binding reaction of  $\alpha_2$ -macroglobulin // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 1994. — Vol. 737. — P. 245—266.
12. *Веремеенко К. Н., Кизим А. И.* Определение плазминогена в плазме крови человека // *Вопр. мед. хим.* — 1974. — Т. 20, № 3. — С. 325—328.
13. *Superdex 220 prep grade* — unmatched resolution and speed / In: *GE Healthcare Bio-Science AB*. — Uppsala, Sweden. — 2007. — 05. — 18-1118-55AB. — P. 1—4.
14. *Определение суммарной протеолитической активности в сыворотке (плазме) крови* / в кн.: *К. Н. Веремеенко, О. П. Голобородько, А. И. Кизим. Протеолиз в норме и при патологии*. К.: Здоров'я, 1988. — С. 163—165.
15. *Chromogenic Substrates. Mechanism, occurrence and determination of serine proteases*. Chromogenics AB, Sweden. — 1996. — 59 p.
16. *Deutsch D., Mertz E.* Plasminogen: purification by affinity chromatography // *Science*. — 1970. — Vol. 170, № 3962. — P. 1095—1096.

**Ю. Г. Клысь, С. В. Вербовка**

Лаборатория биохимии ГУ «Институт отоларингологии имени проф. А. И. Коломийченко АМН Украины»,  
ул. Зоологическая, 3, Киев, 03680, Украина,  
e-mail: verevka@biochem.kiev.ua

**ОСОБЕННОСТИ АКТИВАЦИОННОГО ДЕЙСТВИЯ СТРЕПТОКИНАЗЫ  
В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА**

**Резюме**

Исследованы гидролитическое и активаторное действие белковых фракций, полученных при гель-фильтрационном разделении плазмы крови человека с привнесённой стрептокиназой. Формирование тройного комплекса «плазминоген — стрептокиназа —  $\alpha_2$ -макроглобулин» может быть основной активационной формой стрептокиназы в условиях *in vivo*. В то же время отмечена гидролитическая и активаторная активность во фракции, соответствующей по молекулярной массе  $\gamma$ -глобулинам.

**Ключевые слова:** стрептокиназа, плазминоген, фибринолиз, плазма крови человека.

**Yu. G. Klys', S. V. Verevka**

O. S. Kolomiychenko Institute of Otolaryngology, Ukrainian AMS,  
Zoologichna Str., 3, Kiev, 03680, Ukraine, e-mail: verevka@biochem.kiev.ua

**ON SOME PECULIARITIES OF ACTIVATING ACTION OF STREPTOKINASE  
IN HUMAN BLOOD PLASMA**

**Summary**

It was studied of protein fractions obtained by gel-filtration participation of human blood plasma with added streptokinase testifies about the formation of triple plasminogen — streptokinase —  $\alpha_2$ -macroglobulin complex that may be the main activating form of streptokinase *in vivo*. Some hydrolytic and activating activities were detected in  $\gamma$ -globulin fraction too.

**Key words:** streptokinase, plasminogen, fibrinolysis, human blood plasma.