



СТРЕПТОКИНАЗА И СТАФИЛОКИНАЗА: РАЗЛИЧИЯ КИНЕТИКИ И МЕХАНИЗМА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С ПЛАЗМИНОГЕНОМ, ИНГИБИТОРАМИ И ФИБРИНОМ

© 2015 г. Р. Б. Айсина*, #, Л. И. Мухаметова*, Д. А. Гулин**, К. Б. Гершкович**, С. Д. Варфоломеев*

*ФГБОУ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, 119992, Москва, Ленинские горы

**ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, 119991, Москва

Поступила в редакцию 19.12.2014 г. Принята к печати 08.04.2015 г.

Проведено сравнительное *in vitro*-исследование кинетики различных реакций, вовлекаемых в процесс тромбозиса, инициируемый стрептокиназой (SK) и рекомбинантной стафилокиназой (STA). При взаимодействии плазминогена (Pg) с SK или STA в эквимольных соотношениях скорость образования и удельная эстеразная активность комплекса плазмина (Pm) с SK (Pm • SK) была выше, чем комплекса Pm • STA. При этом каталитическая эффективность (k_{cat}/K_m) гидролиза хромогенных субстратов плазмина комплексом Pm • SK была в 2 раза выше, чем комплексом Pm • STA. В отсутствие фибрина каталитическая эффективность (k_{Pg}/K_{Pg}) активации гликоформы II Glu-плазминогена и Lys-плазминогена комплексом Pm • SK была выше, чем комплексом Pm • STA. Однако присутствие фибрина повысило k_{Pg}/K_{Pg} активации обоих плазминогенов гликоформы II комплексом Pm • STA более значительно, чем комплексом Pm • SK благодаря снижению K_{Pg} . Показано, что, в отличие от STA (15.5 кДа), молекула SK (47 кДа) создает значительные стерические затруднения для взаимодействия плазмина в комплексе Pm • SK с белковыми ингибиторами. Кроме того, SK вызывала большую деградацию фибриногена в плазме, чем STA. Комплексы Pm • SK и Pm • STA лизировали фибриновые сгустки в буфере с близкими скоростями, в то время как скорости лизиса плазменных сгустков, погруженных в плазму, комплексом Pm • STA была значительно выше, чем комплексом Pm • SK. Обнаружено, что видовая специфичность STA и SK определяется, в основном, скоростью образования и эффективностью комплексов Pm • SK и Pm • STA в активации аутологического плазминогена. Эффективность лизиса плазменных сгустков млекопитающих падала в ряду: человек > собака > кролик для SK и собака > человек > кролик для STA. Полученные результаты показывают, что в чистой системе SK является более эффективным активатором плазминогена, чем STA. В системе, содержащей фибрин и α_2AP , активаторная и фибринолитическая активности STA выше, чем SK, благодаря повышенной стабильности в плазме и фибрин-специфичности STA, быстрой реакции комплекса Pm • STA с α_2AP и способности STA к рециклизации в присутствии α_2AP .

Ключевые слова: стрептокиназа, стафилокиназа, активация плазминогена, ингибирование, стабильность, фибринолиз, фибринолиз.

DOI: 10.7868/S0132342315050036

ВВЕДЕНИЕ

Стрептокиназа (SK), секретируемая *Streptococcus equisimilis*, и рекомбинантная стафилокиназа

Сокращения: Pg – плазминоген, Glu-Pg и Lys-Pg – Glu-плазминоген и Lys-плазминоген, Glu-PgII и Lys-PgII – гликоформы II Glu-плазминогена и Lys-плазминогена, Pm – плазмин, SK – стрептокиназа, STA – стафилокиназа, Pg • SK, Pm • SK, Pg • STA и Pm • STA – эквимольные комплексы плазминоген-стрептокиназа, плазмин-стрептокиназа, плазминоген-стафилокиназа и плазмин-стафилокиназа, LBS – лизинсвязывающие центры, tPA – тканевый активатор плазминогена, uPA – двухцепочечная урокиназа, α_2AP – α_2 -антиплазмин, SIT – соевый ингибитор трипсина, FM – растворимый фибрин-номер, AFK-pNA – HCO-Ala-Phe-Lys-n-нитроанилид, Z-Lys-pNP – n-нитрофениловый эфир N-бензилоксикарбонил-L-лизина, 6-АНА – 6-аминогексановая кислота.

Автор для переписки (тел: +7 (495) 939-50-83, факс: +7(495) 939-54-17, e-mail: aisina2004@mail.ru).

(STA), продуцируемая *Staphylococcus aureus*, используются в качестве тромболитических агентов. В терапии тромбозов SK начала применяться с 1950 годов, а рекомбинантная STA – лишь в последние годы. Молекула SK (47 кДа) представляет собой одноцепочечный белок, имеющий подвижную многодоменную структуру [1] и не содержащий углеводные и липидные компоненты [2]. Рекомбинантная STA (15.5 кДа) – одноцепочечный белок, состоящий из 136 а.о. и не содержащий дисульфидных связей [3, 4]. В отличие от прямых активаторов плазминогена урокиназного (uPA, урокиназа, КФ 3.4.21.31) и тканевого типа (tPA, КФ 3.4.21.68), бактериальные SK и STA не обладают ферментативной активностью и относятся к активаторам плазминогена непрямого действия, т.к. приобретают активаторную актив-

ность после образования эквимольных комплексов с плазминогеном (Pg). Несмотря на это сходство, СТА тромболитически более эффективна в лизисе фибриновых сгустков и вызывает меньшее разрушение фибриногена в плазме крови человека, чем SK [5]. Терапевтические свойства активаторов плазминогена обусловлены механизмами их действия.

Скорость активации плазминогена определяется конформацией и типом гликозилирования его молекулы, а также специфичностью его кринглов к определенным лигандам. Нативный Glu-плазминоген является одноцепочечным гликопротеином (93 кДа, Glu-Pg), который содержит *N*-терминальный пептид (NTP), пять гомологичных крингл-доменов (K1–K5) и протеазный домен [7]. Кринглы плазминогена содержат лизинсвязывающие центры (LBS), играющие важную роль в его связывании с фибрином, α_2 -антиплазмином (α_2AP) и различными рецепторами. В присутствии следовых концентраций плазмينا (Pm, КФ 3.4.21.7) отщепляется NTP (остатки 1–77) и образуется Lys-плазминоген (85 кДа, Lys-Pg). Расщепление активационной связи Arg561-Val562 в молекуле плазминогена под действием его активаторов приводит к образованию двухцепочечной молекулы плазмينا.

В зависимости от условий молекула Glu-Pg может принимать разные конформации: компактную “закрытую” α -конформацию, которая поддерживается двумя внутримолекулярными взаимодействиями (между LBS на крингле 5 и *N*-терминальным пептидом, и между LBS на крингле 4 и лигандом на крингле 3), “полуоткрытую” β -конформацию, когда одно из двух взаимодействий еще сохраняется, и полностью “открытую” γ -конформацию при разрушении обоих внутримолекулярных взаимодействий [8]. Lys-Pg может иметь только β - или γ -конформацию и активируется быстрее, чем Glu-Pg [9]. В плазме крови плазминоген присутствует в виде двух гликоформ, имеющих одинаковую аминокислотную последовательность [10]. Гликоформа I содержит *O*- и *N*-связанные углеводные цепи, а гликоформа II – только *O*-связанную углеводную цепь. *N*-Связанный олигосахарид расположен на крингле 3 (на Asp289), а *O*-связанный олигосахарид – между кринглами 3 и 4 (на Thr346). Гликоформа I активируется под действием uPA, tPA и СТА медленнее, чем гликоформа II [11, 12].

SK и СТА активируют плазминоген через образование с ним эквимольного комплекса. Прочный комплекс Pg • SK ($K_d = 0.05$ нМ [13]) образуется за счет высокоаффинных взаимодействий SK с протеазным доменом плазминогена и *C*-терминального Lys414 SK с кринглом 4 плазминогена [14–16], а в комплексе Pg • СТА ($K_d = 10.75$ нМ [17]) в три раза меньшая молекула СТА связана только с протеазным доменом плазминогена [6]. За счет

быстрых конформационных изменений в молекуле плазминогена ($k = 9–23$ мс⁻¹) под действием SK формируется активный центр без протеолиза с образованием активного комплекса Pg • SK [18, 19]. Конформационно активированный комплекс Pg • SK катализирует начальный цикл внутримолекулярного превращения плазминогена в плазмин, который действует как триггер [20], и комплекс Pg • SK быстро ($k = 0.24$ мин⁻¹ [21]) превращается в комплекс Pm • SK. Как Pg • SK, так и Pm • SK способны активировать избыток свободного плазминогена, в то время как комплекс Pg • СТА неактивен в отношении плазминогена. Активация плазминогена стафилокиназой инициируется следовыми количествами плазмينا, при этом образуется активный комплекс Pm • СТА, который активирует свободный плазминоген, а также ускоряет медленную реакцию ($k_1 = 4 \times 10^{-7}$ с⁻¹ [3]) превращения Pg • СТА в Pm • СТА [6, 22]. Ранее разными группами ученых, специализирующимися на исследовании либо SK, либо СТА, было опубликовано большое число статей, описывающих отдельные свойства индивидуальных активаторов. Имеется ограниченное число публикаций, посвященных сравнению взаимодействия SK и СТА с плазминогеном, их тромболитических и иммунологических свойств и видовой специфичности [3, 5, 23, 24].

В данной работе представлены полученные нами результаты комплексного сравнительного кинетического исследования свойств SK и СТА *in vitro*, включая образование активаторных комплексов Pm • SK и Pm • СТА, их взаимодействие с плазминогеном человека и белковыми ингибиторами, стабильность в буфере и плазме человека, лизис фибриновых и плазменных сгустков и фибринолиз под действием двух активаторов, а также различия во взаимодействии SK и СТА с плазминогенами разных видов млекопитающих. На основании сравнительного анализа различных свойств SK и СТА будут продемонстрированы структурные и функциональные основы различия терапевтических свойств двух бактериальных активаторов плазминогена.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Процесс растворения фибрина сгустка под действием uPA и tPA инициируется прямым расщеплением ими активационной связи Arg561-Val562 в молекуле плазминогена человека. Образовавшийся фермент плазмин затем растворяет свой физиологический субстрат – фибрин. В случае бактериальных SK и СТА процесс фибринолиза инициируется связыванием их с плазминогеном с образованием каталитических количеств эквимольных комплексов Pg • SK(Pm • SK) и Pm • СТА, которые активируют избыток свободного плазминогена в плазмин. Для сравнения ниже представлены меха-

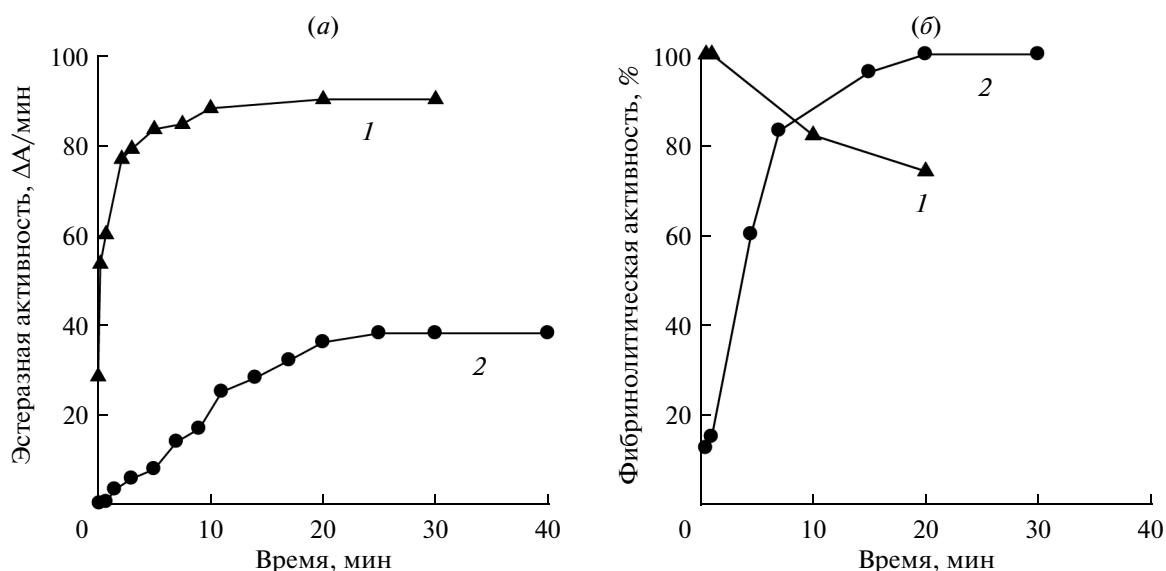
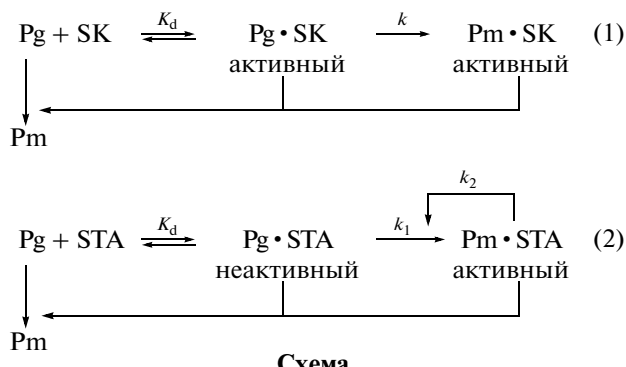


Рис. 1. Динамика эстеразной (а) и фибринолитической (б) активностей при взаимодействии 9.4 мкМ плазминогена со стрептокиназой (кривые 1) и стафилокиназой (кривые 2) в эквимольных концентрациях (0.1 М фосфатный буфер, рН 7.4, содержащий 0.15 М NaCl, (37°C)).

низмы активации плазминогена человека стрептокиназой [18] и стафилокиназой [6] (схема):



На тромболитические и фибринолитические свойства SK и STA помимо механизмов активации ими плазминогена влияют фибринспецифичность их действия, прочность, собственная активность и стабильность образующихся комплексов Pm · SK и Pm · STA и их взаимодействие с ингибиторами в плазме.

Кинетика образования активаторных комплексов Pm · SK и Pm · STA. Рост эстеразной активности при взаимодействии плазминогена с эквимольными концентрациями SK или STA (рис. 1а) показывает, что комплексы Pg · SK и Pg · STA превращаются в комплексы Pm · SK и Pm · STA, что было подтверждено SDS-ПААГ-электрофорезом проб в восстанавливающих условиях: уменьшением интенсивности полосы плазминогена (85 кДа) и появлением и ростом интенсивности полос тяжелой (60 кДа) и легкой (25 кДа) цепей плазмина

[25]. Как видно из рис. 1а, скорость образования и максимальная эстеразная активность комплекса Pm · SK значительно выше, чем комплекса Pm · STA. Комплекс Pg · SK, образующийся сразу после смешивания плазминогена со SK, обладает максимальной фибринолитической активностью, которая обеспечивается интактностью молекул плазминогена и SK (рис. 1б, кривая 1). Однако, как было сказано ранее, Pg · SK быстро превращается в комплекс Pm · SK [26], в котором под действием плазмина начинается деградация нативной молекулы SK, приводящая к снижению фибринолитической активности. В случае взаимодействия эквимольных концентраций плазминогена и STA фибринолитическая активность (рис. 1б, кривая 2) увеличивается синхронно с ростом эстеразной активности (рис. 1а, кривая 2) и достигает максимума через 20–25 мин, что иллюстрирует наличие активности обоих видов только у комплекса Pm · STA и их отсутствие у комплекса Pg · STA.

Полученные нами кинетические параметры гидролиза *n*-нитрофенилового эфира N^α-бензилоксикарбонил-*L*-лизина (Z-Lys-pNP) и HCO-Ala-Phe-Lys-*n*-нитроанилида (AFK-pNA) свежеприготовленными эквимольными комплексами Pm · SK и Pm · STA, показали, что каталитическая эффективность (k_{cat}/K_m) гидролиза эфирного (в 2 раза) и амидного (в 1.7 раз) субстратов плазмина комплексом Pm · SK выше, чем комплексом Pm · STA (табл. 1). Это согласуется с данными рис. 1а. Аналогичное соотношение значений k_{cat}/K_m сообщалось ранее для гидролиза этими комплексами H-DVal-Leu-Lys-*n*-нитроанилида [3].

Таблица 1. Кинетические параметры гидролиза низкомолекулярных субстратов плазмина эквимольными комплексами Pm • SK и Pm • STA

Комплекс	Субстрат	k_{cat} , с ⁻¹	K_m , мМ	k_{cat}/K_m , мМ ⁻¹ с ⁻¹
Pm • SK Pm • STA	Z-Lys-pNP (pH 6.2; 25°C)	20.1 13.5	0.04 0.055	502.4 245.5
Pm • SK Pm • STA	AFK-pNA (pH 7.4; 25°C)	13.5 3.4	0.130 0.055	103.8 61.8

Стабильность активаторных комплексов Pm • SK и Pm • STA в растворе. Была изучена кинетика падения фибринолитической активности преформированных комплексов Pm • SK и Pm • STA во время длительной инкубации в буфере pH 7.4 (37°C) (рис. 1б). В этих условиях фибринолитическая активность комплекса Pm • STA начинала медленно снижаться через 1.5 ч инкубации и сохранялась на уровне 80% от исходной активности через 6 ч инкубации, что указывает на высокую стабильность к протеолизу небольшой молекулы STA (15.5 кДа) в составе комплекса. Комплекс Pm • SK терял 50% фибринолитической активности за первые 1.5 ч инкубации, а через 6 ч он сохранял менее 40% от исходной активности. Быстрое падение фибринолитической активности комплекса Pm • SK связано с высокой лабильностью в нем молекулы SK к протеолитической деградации. Известно, что деградация нативной молекулы SK (47 кДа) с образованием фрагментов с молекулярными массами от 40 до 25 кДа приводит к значительному снижению плазмино-

генактиваторной и фибринолитической активностей комплекса Pm • SK. Полная потеря способности активировать плазминоген происходит после деградации SK до фрагмента с $M \leq 17$ кДа [26, 27].

Кинетика активации плазминогена стрептокиназой и стафилокиназой. По сравнению со SK, STA является более слабым активатором плазминогена в растворе. Ранее было показано, что в присутствии растворимого фибрина скорость активации плазминогена STA увеличивается в 2–3 раза [3]. Мы сравнили зависимости скоростей активации Glu-Pg, представляющего смесь гликоформ I и II, равными дозами SK или STA от концентрации растворимого фибрина (рис. 2). В отсутствие фибрина скорость активации Glu-Pg нативной SK (0.69 $\Delta A_{340}/ч^2$) была в 4.5 раза выше, чем нативной STA (0.155 $\Delta A_{340}/ч^2$), что связано с низкой скоростью превращения комплекса Pg • STA в Pm • STA. Однако с ростом концентрации фибрина скорости активации плазминогена обоими агентами увеличивались и достигали максимальных значений (2.1 и 3.0 $\Delta A_{340}/ч^2$, соответственно, для SK и STA) при концентрации фибрина 0.02 мг/мл. Следовательно, фибрин повышает скорость активации Glu-Pg нативной STA значительно сильнее, чем нативной SK. Этот эффект можно объяснить тем, что плазминоген связывается с фибрином через LBS крингла 5, в результате чего нарушается внутримолекулярное взаимодействие крингла 5 с N-терминальным пептидом и “закрывающаяся” α -конформация Glu-Pg превращается в легче активируемую “полуоткрытую” β -конформацию. Повышение скорости активации фибрин-связанного Glu-Pg за счет изменения его конформации приводит и к увеличению скорости превращения неактивного Pg • STA в активный комплекс Pm • STA на поверхности фибрина. В случае SK эффект фибрина ниже, т.к. оба образующиеся комплекса Pg • SK и Pm • SK активны и повышение скорости активации связано только с изменением конформации Glu-Pg.

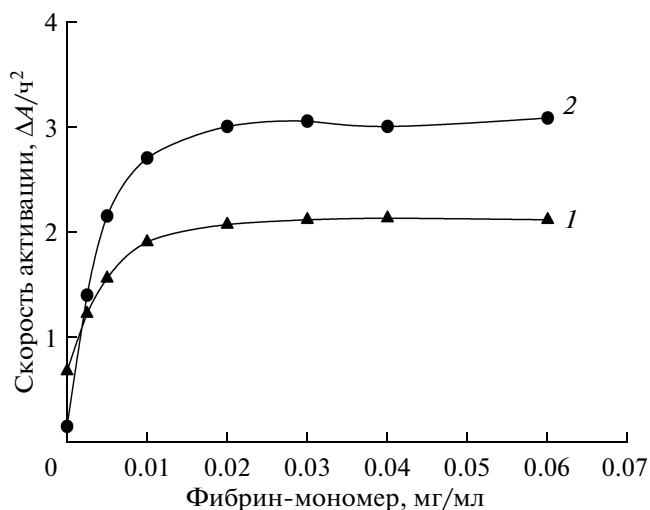


Рис. 2. Зависимость скорости активации 1 мкМ Glu-плазминогена человека 0.2 нМ стрептокиназой (кривая 1) и стафилокиназой (кривая 2) от концентрации фибрин-мономера в буфере, pH 7.4, содержащий 0.15 M NaCl (37°C).

Кинетические кривые активации плазминогена нативной STA в каталитических концентрациях характеризуются начальным лаг-периодом, который обусловлен скоростью-лимитирующей стадией превращения комплекса Pg • STA в комплекс

Таблица 2. Кинетические параметры активации Glu-PgII и Lys-Pg II 0.13 нМ комплексами Pm • SK и Pm • STA в отсутствие и в присутствии 0.02 мг/мл растворимого фибрин-мономера (FM) (0.1 М Трис-НСl буфер, рН 8.3, 0.01% Твин 80, 0.15 М NaCl, 37°C)

Активатор	Плазминоген	K_{Pg} , мкМ	k_{Pg} , с ⁻¹	$k_{Pg}/K_{Pg} \times 10^3$, мкМ ⁻¹ с ⁻¹	Отношение k_{Pg}/K_{Pg} с FM к k_{Pg}/K_{Pg} без FM
Pm • SK	Glu-PgII	4.5 ± 0.2	0.051 ± 0.005	11.3	
	Lys-PgII	2.2 ± 0.1	0.055 ± 0.004	25.0	
Pm • SK + FM	Glu-PgII	0.24 ± 0.05	0.054 ± 0.004	225.0	19.9
	Lys-PgII	0.15 ± 0.03	0.051 ± 0.004	340.0	13.6
Pm • STA	Glu-PgII	14.9 ± 0.4	0.094 ± 0.003	6.3	
	Lys-PgII	5.4 ± 0.4	0.098 ± 0.004	18.2	
Pm • STA + FM	Glu-PgII	0.37 ± 0.02	0.096 ± 0.001	259.5	41.2
	Lys-PgII	0.19 ± 0.02	0.096 ± 0.003	505.3	27.8

Pm • STA. Поэтому сравнивают активацию плазминогена под действием преформированных комплексов Pm • STA или Pm • SK (Pm • A), кинетика которой подчиняется уравнению Михаэлиса-Ментен.



Существует большой разброс значений кинетических параметров активации плазминогена (k_{Pg} и K_{Pg}) стрептокиназой или стафилокиназой, определенных в разных лабораториях с использованием Glu-Pg или Lys-Pg и комплекса Pm • SK [22, 28–30] или Pm • STA [3, 6, 22, 31, 32], а также различных методов и условий (рН, присутствие или отсутствие NaCl или температуры). Из анализа этих данных следует, что в растворе каталитическая эффективность (k_{Pg}/K_{Pg}) комплекса Pm • STA по отношению к плазминогену ниже, чем комплекса Pm • SK.

Мы провели сравнительное исследование кинетики активации гликоформы II Glu-Pg и Lys-Pg (Glu-PgII и Lys-PgII) комплексами Pm • SK и Pm • STA в отсутствие и в присутствии растворимого фибрина (фибрин-мономера, FM) в буфере рН 8.3, содержащем 0.15 М NaCl (табл. 2). В отличие от гликоформы I, гликоформа II плазминогена не содержит N-связанный олигосахарид на крингле 3, присутствие которого ухудшает связывание плазминогена с его активаторами [11, 12, 33]. С другой стороны, хлорид ионы, сдвигая конформационное равновесие Glu-Pg к закрытой конформации, ингибируют его активацию различными агентами [12, 14, 34].

Как видно из табл. 2, в отсутствие фибрина каталитическая эффективность (k_{Pg}/K_{Pg}) активации Glu-PgII и Lys-PgII комплексом Pm • SK выше, чем комплексом Pm • STA. При этом, по сравнению с Glu-PgII, скорость активации Lys-PgII,

имеющего более открытую конформацию, была выше в основном за счет меньшего значения K_{Pg} . Добавление фибрина повышало k_{Pg}/K_{Pg} активации обоими комплексами благодаря снижению K_{Pg} (значения k_{Pg} не меняются для данной формы плазминогена). Следовательно, связывание Glu-PgII и Lys-PgII с фибрином, в отличие от действия хлорид ионов [12, 14], приводит к сдвигу их конформации к открытой форме. Однако эффект повышения фибрином k_{Pg}/K_{Pg} активации обоих плазминогенов комплексом Pm • STA значительно выше, чем комплексом Pm • SK. Представленные результаты показывают, что STA обладает большей фибринспецифичностью действия по отношению к плазминогену, чем SK.

Взаимодействие комплексов Pm • SK и Pm • STA с белковыми ингибиторами. Активность комплексов Pm • SK и Pm • STA, образующихся в плазме после введения в кровотоки терапевтических доз SK и STA, регулируется основным ингибитором плазмина α_2 -антиплазмином (α_2AP). Терапия высокими дозами тромболитических агентов сопровождается не останавливаемыми кровотечениями, которые связаны с избыточным образованием плазмина и истощением уровней α_2AP и фибриногена в плазме. Для остановки кровотечений в кровотоки вводят апротинин (панкреатический ингибитор трипсина, PIT) или антифибринолитические ω -аминокислоты. Мы определили константы ингибирования (k_i) плазмина, комплексов Pm • STA и Pm • SK тремя белковыми ингибиторами различного размера, из которых α_2AP высоко специфичен, а PIT и соевый ингибитор трипсина (SIT) менее специфичны по отношению к плазмину (табл. 3).

Более низкие значения k_i комплексов Pm • STA и Pm • SK, в сравнении с ингибированием плазмина для всех ингибиторов свидетельствуют о

Таблица 3. Константы ингибирования второго порядка (k_i) плазмينا и комплексов Pm • STA и Pm • SK белковыми ингибиторами (рН 7.4; 37°C)

Ингибитор (M, кДа)	$k_i \times 10^{-5}, \text{M}^{-1} \text{c}^{-1}$		
	Pm	Pm • STA	Pm • SK
PIГ (6.5)	3.3	0.85	2.8×10^{-2}
SIT (23.5)	2.5	0.80	0.21×10^{-2}
$\alpha_2\text{AP}$ (70)	200	27.0	0.14×10^{-2}

Таблица 4. Времена полуистощения фибриногена ($\tau_{1/2}$) в плазме человека в присутствии различных концентраций SK и STA (37°C)

Концентрация SK/STA, нМ	$\tau_{1/2}$, мин	
	SK	STA
10	108	>300
25	96	>300
35	75	>300
50	45	>300
75	30	180
100	24	60

том, что молекулы STA и SK в составе комплексов создают стерические затруднения для взаимодействия плазмينا с белковыми ингибиторами. При этом k_i плазмينا и комплексов зависят от специфичности ингибиторов к плазмину и, в меньшей степени, от их размеров (табл. 3). Специфичный $\alpha_2\text{AP}$ ингибирует плазмин с самой высокой k_i , т.к. образование прочного фермент-ингибиторного комплекса осуществляется через связывание $\alpha_2\text{AP}$ и с протеазным доменом, и с LBS крингла 1 тяжелой цепи плазмينا [13, 35, 36]. Значение k_i на 5 порядков ниже для Pm • SK, в то время как для комплекса Pm • STA только в 7.4 раза. Это можно объяснить тем, что в прочном комплексе Pm • SK большая многодоменная молекула SK (47 кДа), связанная с протеазным доменом и тяжелой цепью плазмينا [14, 15] в значительной степени экранирует $\alpha_2\text{AP}$ -связывающие центры плазмينا. В комплексе Pm • STA небольшая однодоменная молекула STA (15.5 кДа), связанная только с протеазным доменом плазмينا [6], создает существенно меньшие стерические затруднения для взаимодействия плазмينا с $\alpha_2\text{AP}$. Поэтому комплекс Pm • SK очень медленно реагирует с $\alpha_2\text{AP}$, в то время как комплекс Pm • STA достаточно быстро нейтрализуется этим основным ингибитором плазмينا.

Стабильность SK и STA при инкубации в плазме человека. SK и STA, введенные в кровотоки, взаимодействуют с циркулирующим плазминогеном,

концентрация которого в плазме человека и животных составляет 1.5–2 мкМ [37]. В отличие от стабильности в растворе, сохранение активности образующихся в плазме комплексов Pm • SK и Pm • STA определяется не только их устойчивостью к протеолитической деградации, но и их сопротивляемостью к нейтрализации α_2 -антиплазмином (его концентрация в плазме 1 мкМ [38]). Стабильность фибринолитической активности SK и STA, добавленных в плазму человека в концентрациях, близких к терапевтическим концентрациям агентов в крови, представлена на рис. 3. Несмотря на очень низкую константу ингибирования α_2 -антиплазмином (табл. 3) образующийся в плазме комплекс Pm • SK быстро теряет фибринолитическую активность, вероятно, в результате деградации его SK-части высокими концентрациями плазмينا, образующегося из плазминогена в плазме. Через 4 ч инкубации 25, 50 и 100 нМ SK в плазме она теряет 62, 75 и 92% активности, в то время как STA – 27, 35 и 52% активности, соответственно. Следовательно, STA значительно более стабильна в плазме, чем SK, несмотря на то, что константа ингибирования комплекса Pm • STA α_2 -антиплазмином на 4 порядка выше, чем комплекса Pm • SK. Этот парадокс объясняется различием прочности комплексов Pm • SK ($K_d = 0.05$ нМ [13]) и Pm • STA ($K_d = 10.75$ нМ [17]) и лабильностью молекул SK и STA в них к протеолитической деградации. В отличие от SK, молекула STA способна диссоциировать из комплекса Pm • STA после его ингибирования α_2 -антиплазмином (т.е. из $\alpha_2\text{AP}$ -Pm • STA) и связываться с новыми молекулами плазминогена в плазме с образованием неактивного комплекса Pg • STA, который медленно превращается в комплекс Pm • STA [39]. Такая рециклизация STA в присутствии $\alpha_2\text{AP}$ приводит к более длительному сохранению его активности в плазме.

Деградация фибриногена в плазме под действием SK и STA. Помимо тромболитической эффективности важной клинической характеристикой активаторов плазминогена является уровень их побочных эффектов на важные белки плазмы. Для поддержания терапевтического эффекта высокие дозы активаторов плазминогена вводят в кровотоки инфузией, что сопровождается избыточной активацией плазменного плазминогена в плазмине, который истощает уровень $\alpha_2\text{AP}$ и деградирует фибриноген. Показателем уровня побочных эффектов при терапии тромболитическими агентами является степень фибриногенолиза, с которым ассоциируются не останавливаемые кровотечения.

Рис. 4 иллюстрирует кинетику падения уровня фибриногена в плазме человека под действием SK и STA в различных концентрациях, а табл. 4 – вычисленные из кинетических кривых времена полуистощения

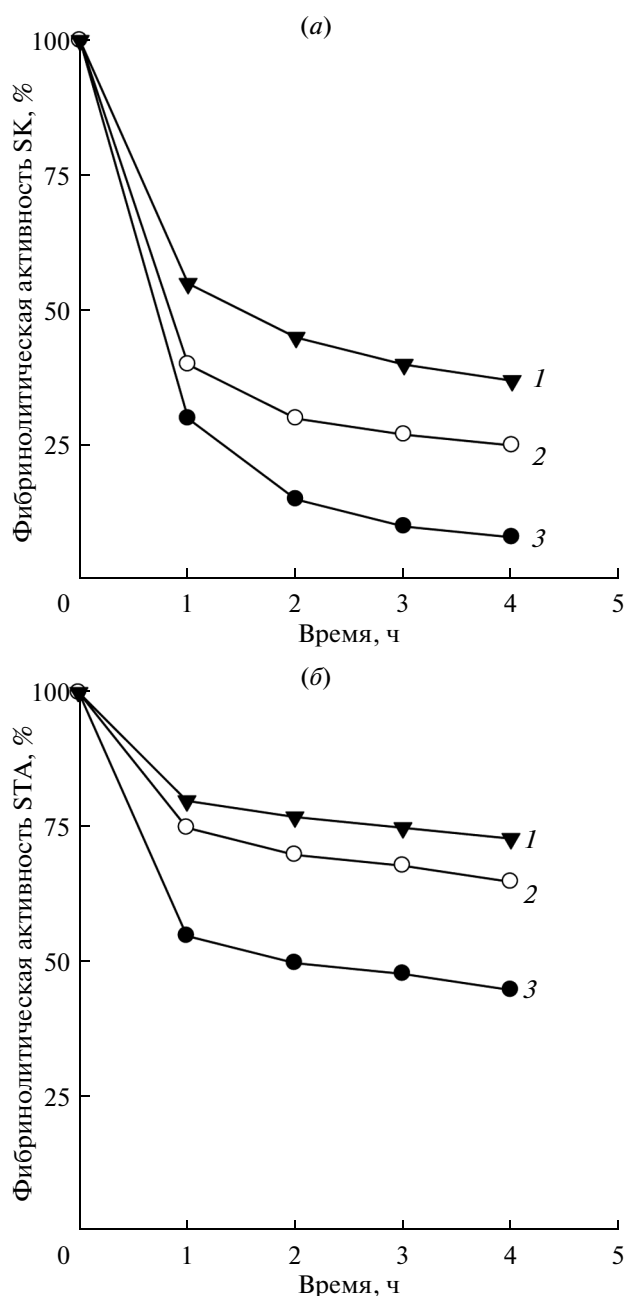


Рис. 3. Падение фибринолитических активностей SK (а) и STA (б), добавленных к плазме человека в концентрациях 25 (1); 50 (2) и 100 нМ (3), в ходе инкубации плазмы при 37°C.

шения ($\tau_{1/2}$) фибриногена в плазме. Полученные данные показывают, что SK вызывает значительный фибринолиз: при всех концентрациях SK остаточный уровень фибриногена в плазме через 4 ч $\leq 25\%$. STA вызывает в тех же концентрациях значительно меньший фибринолиз, чем SK. Это можно объяснить тем, что, в отличие от SK, STA образует с плазменным плазминогеном неактивный комплекс P_g • STA, который медлен-

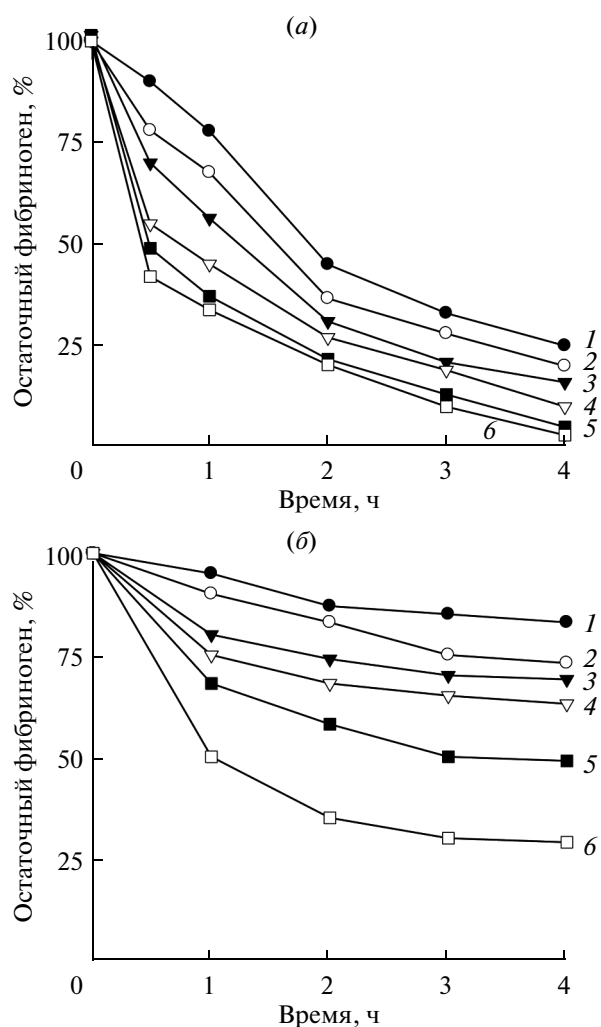


Рис. 4. Истощение уровня фибриногена в плазме в отсутствие фибрина под действием SK (а) и STA (б) в концентрациях 10 (1); 25 (2); 35 (3); 50 (4); 75 (5) и 100 нМ (6) (37°C).

но превращается в активный комплекс P_m • STA. Кроме того, образовавшийся активный комплекс P_m • STA очень быстро нейтрализуется α_2 -антиплазмином, что снижает возможность активации им плазминогена в плазмин. При введении SK в плазму образуются активные комплексы P_g • SK и P_m • SK, которые из-за их медленного ингибирования α_2 -антиплазмином успевают существенно активировать плазминоген в плазмин, вызывающий деградацию фибриногена в плазме.

Кинетика лизиса фибриновых и плазменных сгустков под действием P_m • SK и P_m • STA. Для сравнения фибринолитических свойств SK и STA мы изучили кинетику фибринолиза преформированными комплексами P_m • SK и P_m • STA (с целью элиминирования лаг-периода в случае STA) в двух системах: 1) сгусток из фибрина человека, погруженный в буфер pH 7.4 и 2) сгусток из плаз-

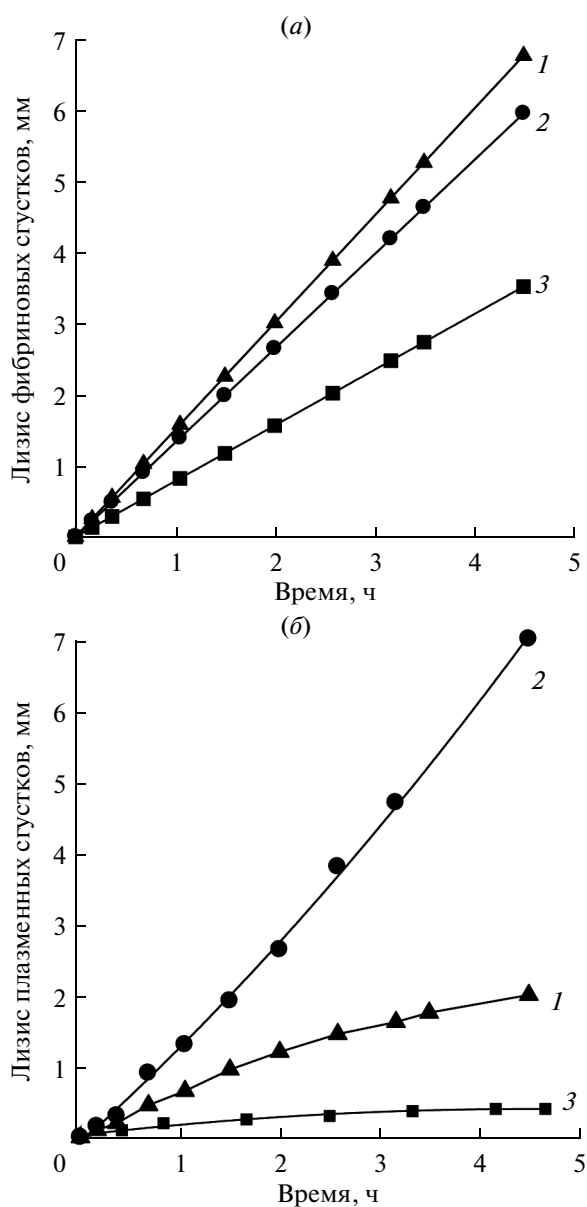


Рис. 5. Кинетика лизиса фибриновых сгустков в буфере, pH 7.4 (а) и плазменных сгустков, погруженных в плазму, (б) под действием 0.1 мкМ комплекса Pm·SK (кривая 1), комплекса Pm·STA (кривая 2) и плазмينا (кривая 3).

мы человека, погруженный в плазму. В первой системе отсутствует $\alpha_2\text{AP}$, а плазминоген присутствует в виде примеси только в фибриновом сгустке. Во второй системе и сгусток, и окружающая плазма содержат плазминоген и $\alpha_2\text{AP}$. Кинетические кривые лизиса фибриновых сгустков в буфере (а) и плазменных сгустков в плазме (б) под действием 0.1 мкМ свободного плазмина и комплексов Pm·SK и Pm·STA приведены на рис. 5, а рис. 6 иллюстрирует зависимости начальных скоростей лизиса фибриновых сгустков (а) и плазменных сгуст-

ков (б) от концентрации плазмина и комплексов Pm·SK и Pm·STA.

Кинетические кривые (рис. 5а, кривые 1 и 2) и доза-зависимости скоростей лизиса фибриновых сгустков (рис. 6а, кривые 1 и 2) обоими комплексами в отсутствие $\alpha_2\text{AP}$ очень близки, хотя каталитическая эффективность комплекса Pm·SK по отношению к низкомолекулярным субстратам (табл. 1) и к плазминогену в растворе (табл. 2) были значительно выше, чем комплекса Pm·STA. Подобие скоростей лизиса фибриновых сгустков комплексами Pm·SK и Pm·STA связано с тем, что их фибринолитическая активность (в отсутствие плазминогена в окружающем буфере) определяется способностью обоих комплексов активировать плазминоген, включенный в сгусток. Фибрин, с которым оба комплекса связываются через LBS кринглов их плазминоген, сглаживает это различие, повышая скорость активации фибринсвязанного плазминогена комплексом Pm·STA значительно сильнее, чем комплексом Pm·SK [22, 29] и (табл. 2). Образующийся фибринсвязанный плазмин эффективно растворяет фибрин.

Меньшая скорость лизиса фибриновых сгустков свободным плазмином (рис. 5 и 6а, кривая 3) по сравнению с обоими комплексами (кривые 1 и 2) обусловлена отсутствием у него плазминогенактиваторной активности и наличием только собственной литической активности. Более значительное снижение эффективности лизиса плазменных сгустков плазмином (рис. 5б и 6б, кривая 3) объясняется тем, что k_i плазмина α_2 -антиплазмином в плазме значительно выше, чем комплексов Pm·STA и Pm·SK (табл. 3).

Существенные различия были обнаружены нами в кинетике лизиса двумя комплексами плазменных сгустков, содержащих плазминоген и $\alpha_2\text{AP}$ в твердой и жидкой фазах. Скорость лизиса плазменного сгустка комплексом Pm·SK замедлялась со временем (рис. 5б, кривая 1), что связано с внутри- и межмолекулярной деградацией обоих белковых компонентов комплекса Pm·SK и, в меньшей степени, медленной необратимой нейтрализацией его α_2 -антиплазмином ($k_i = 1.4 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, табл. 3) в плазме. Однако из-за низкой скорости ингибирования комплекс Pm·SK успевал активировать плазменный плазминоген (1.5–2 мкМ) в плазмин. При этом плазмин быстро нейтрализуется α_2 -антиплазмином в плазме, избыточное его образование ($>1 \text{ мкМ}$) приводит к побочным эффектам. При активации фибринсвязанного плазминогена комплексом Pm·SK образуется фибринсвязанный плазмин, который, инактивируясь α_2 -антиплазмином ($k_i = 1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ [13]) в 100 раз медленнее, чем свободный плазмин ($k_i = 2 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, табл. 3), осуществляет лизис плазменного сгустка.

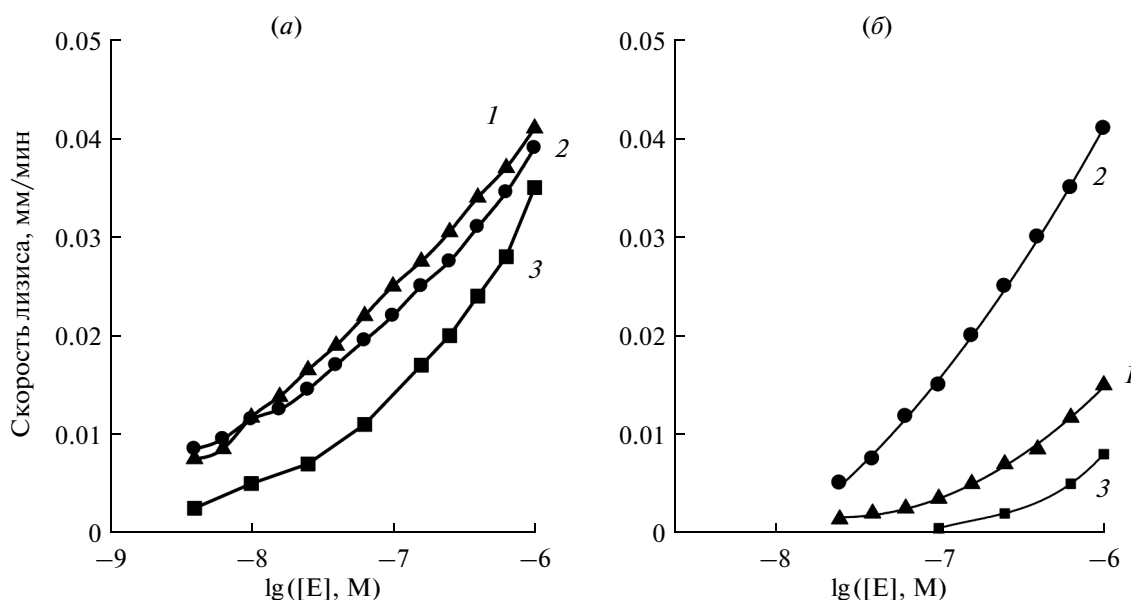


Рис. 6. Зависимости начальных скоростей лизиса в системе фибриновый сгусток/буфер (а) и плазменный сгусток/плазма человека (б) от концентрации комплекса Pm • SK (кривая 1), комплекса Pm • STA (кривая 2) и пламина (кривая 3) (37°C).

Кинетика лизиса плазменного сгустка комплексом Pm • STA оставалась линейной в течение 4 ч (рис. 5б, кривая 2). В отличие от лизиса фибриновых сгустков, скорость лизиса плазменных сгустков комплексом Pm • STA (рис. 6б, кривая 2) была значительно выше, чем комплексом Pm • SK (рис. 6б, кривая 1) во всем изученном диапазоне концентраций двух комплексов. Следовательно, комплекс Pm • STA приобретает большую фибринолитическую эффективность, по сравнению с комплексом Pm • SK, только в присутствии α_2AP , хотя k_i комплекса Pm • STA α_2 -антиплазмином на 4 порядка выше, чем комплекса Pm • SK (табл. 3). Причины линейной кинетики и большей скорости лизиса плазменных сгустков комплексом Pm • STA, в сравнении с комплексом Pm • SK, заключаются в более длительном сохранении интактности молекулы STA в составе комплекса и ее способности высвобождаться из тройного комплекса α_2AP -Pm • STA после ингибирования последнего α_2 -антиплазмином в плазме и образовывать со свободными молекулами пламиногена комплекс Pg • STA. Связывание комплекса Pg • STA с фибрином через LBS кринглов пламиногена приводит к ускорению его превращения в активный комплекс Pm • STA и, как следствие, к увеличению скорости активации фибринсвязанного пламиногена и скорости лизиса плазменного сгустка.

Видовая специфичность STA и SK. Тромболитические свойства активаторов пламиногена определяются различной реактивностью к ним фибринолитической системы разных видов млекопитающих. Ранее сообщалось, что пламиногены

человека, кошки, собаки и кролика имеют различную чувствительность к активации стрептокиназой и скорость деградации SK в образующихся эквимольных комплексах Pm • SK различна для каждого вида [40, 41]. Позже было проведено сравнение фибринолитических и фибринолитических свойств SK и STA в плазме различных видов млекопитающих *in vitro* [5]. Анализ эквипотенциальных концентраций SK и STA, вызывающих 50% лизис сгустков из плазмы разных видов, погруженных в аутологическую плазму, показал, что, по сравнению со SK, STA является в 4–12 раз более сильным тромболитиком в системах человека, бабуина, кролика и хомяка (при низком уровне фибринолиза). Система собаки была высоко чувствительна к STA и в *in vivo*-испытаниях на собаках эффективный тромболитический эффект STA сопровождался серьезными кровотечениями, которые отсутствовали у человека [24]. Для выявления причин, лежащих в основе различий видовой специфичности STA и SK, мы изучили кинетику образования и эстеразные активности комплексов Pm • STA и Pm • SK при взаимодействии STA и SK с пламиногенами человека, собаки и кролика в эквимольных соотношениях, активацию этими комплексами аутологических пламиногенов и лизис плазменных сгустков млекопитающих, погруженных в аутологическую плазму, под действием STA и SK (табл. 5). Нами было выявлено, что пламиногены лошади, крысы и быка не образуют активные эквимольные комплексы со STA и SK, с чем связано отсутствие лизиса сгустков из плазмы этих животных бактериальными активаторами.

Таблица 5. Образование эквимольных комплексов плазминов человека, собаки и кролика со STA и SK, активация аутологического плазминогена аутологическими комплексами Pm • SK и Pm • STA и лизис сгустков из плазмы разных видов под действием SK и STA ($p < 0.05$)

Реакция	Вид млекопитающего		
	человек	собака	кролик
1. Время образования эквимольного 2 мкМ комплекса (мин):			
Pm • SK	10	8	>100
Pm • STA	20	5	55
2. Эстеразная активность комплекса (%)*:			
Pm • SK	90	85	65
Pm • STA	81	100	90
3. Скорость активации 2 мкМ плазминогена 40 нМ комплексом ($\Delta A_{405}/t^2$ мг):			
Pm • SK	1.5	0.38	0.02
Pm • STA	1.25	1.6	0.165
4. Лизис сгустков из плазмы млекопитающих**:			
100 нМ SK	++++	+++	++
100 нМ STA	+++	++++	++

* За 100% принята эстеразная активность комплекса Pm • STA.

** +++++ Высокая, +++ средняя, ++ умеренная.

Скорость образования и эстеразная активность комплекса Pm • STA значительно выше при взаимодействии STA с плазминогеном собаки, чем с плазминогеном человека (табл. 5). Поэтому скорость активации плазминогена собаки аутологическим комплексом Pm • STA была выше, чем скорость активации плазминогена человека аутологическим комплексом Pm • STA. Напротив, SK была более эффективна по отношению к плазминогену человека, чем к плазминогену собаки. При этом скорость образования и удельная эстеразная активность комплекса Pm • SK в системе человека были немного ниже, чем комплекса Pm • STA в системе собаки. Поэтому скорость активации плазминогена собаки аутологическим комплексом Pm • STA была выше, чем скорость активации плазминогена человека аутологическим комплексом Pm • STA. Эффективность лизиса плазменных сгустков млекопитающих падала в ряду: человек > собака > кролик для SK и собака > человек > кролик для STA. Из полученных данных следует, что видовая специфичность STA и SK определяется, в основном, скоростью образования и каталитической эффективностью эквимольных комплексов Pm • SK и Pm • STA в активации плазминогенов каждого вида млекопитающего. Возможен также менее значительный вклад и скорости ингибирования комплексов аутологичными α_2 -антиплазминами.

Таким образом, рекомбинантная STA обладает более высокой тромболитической эффективностью и вызывает меньший фибринолиз по сравнению со SK, благодаря повышенной стабильности молекулы STA к протеолитической деградации в комплексе Pm • STA и фибринспецифичности этого комплекса в активации плазминогена, быстрой нейтрализации комплекса α_2 -антиплазмином в плазме и способности молекулы STA к рециклизации из ингибированного тройного комплекса α_2 AP-Pm • STA в плазме. Различия в специфичности тромболитического действия STA и SK в плазме различных видов млекопитающих определяются, в основном, скоростью образования и каталитической эффективностью эквимольных комплексов Pm • SK и Pm • STA в активации плазминогенов каждого вида.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы стрептокиназа (КФ 3.4.99.0) с активностью 6300 МЕ/мг сухой массы (M 47 кДа, Reyon Pharmaceutical Co. Ltd., Корея), высокоочищенная рекомбинантная стафилокиназа (SAKSTAR), 15.5 кД, 0.98 мг/мл (Center for Molecular and Vascular Biology, University of Leuven, Бельгия), фибриноген (M 340 кДа), тромбин человека (КФ 3.4.21.5) и HCO-Ala-Phe-Lys-pNA (AFK-pNA) (Технология-Стандарт, Россия),

рептилаза (КФ 3.4.21.29) из яда змеи *Bothrops atrox* (Diagnostica Stago, Франция), *n*-нитрофениловый эфир *N*^α-бензилоксикарбонил-*L*-лизина (*Z*-Lys-pNP) (синтезированный в нашей лаборатории), 6-аминогексановая кислота (6-АНА) (Merck, Германия), замороженная цитратная плазма крови человека (пул трех доноров) (Гематологический научный центр МЗ России, Москва), лиофилизованная стандартная плазма крови человека (Diagnostica Stago, Франция), сефадекс G-25 и Lys-сефароза 4В (Alliance Healthcare, Швеция), α₂-антиплазмин (Protogen AG, Laufelfingen, Швейцария), апротинин Gordox (Gedeon Richter, Венгрия), соевый ингибитор трипсина (Reanal, Венгрия). Остальные реактивы отечественного производства марки “ос.ч.” или “х.ч.”

Оборудование. Спектрофотометр Biochrom WPA Lightwave II, шейкер-инкубатор для планшет (ST-3, Elmi, Эстония), планшетный фотометр Antos-2020 (Австрия), коллектор фракций (Biorad 2110).

Статистический анализ результатов был проведен с помощью программы Sigma Plot 9.0. Данные считались достоверными при $p < 0.05$.

Получение Lys-Pg и Glu-Pg. Исходным материалом для получения Lys-Pg и его гликоформы II был пул плазмы человека. При получении Glu-Pg и его гликоформы II к 300 мл свежей плазмы немедленно добавляли 6000 МЕ апротинина.

Lys-Pg и *Glu-Pg* выделяли из плазмы аффинной хроматографией на Lys-сефарозе 4В при 4°C по методу, описанному в работе [42]. Белковые пики Lys-Pg или Glu-Pg, элюированные с колонки 0.2 М 6-АНА, осаждали сульфатом аммония (0.31 г/мл), диализовали против воды при 4°C и лиофилизовали.

Гликоформу II Lys-Pg или Glu-Pg получали из соответствующей плазмы аффинной хроматографией на Lys-сефарозе 4В при 4°C по методу, описанному в работе [12]. Белковые пики 1 (гликоформа I) и 2 (гликоформа II) плазминогенов, элюированные с колонки элюцией в линейном градиенте концентраций 6-АНА (0–0.012 М), осаждали сульфатом аммония (0.31 г/мл), диализовали против воды при 4°C и лиофилизовали. В работе использовали Lys-PgII или Glu-PgII.

Фибрин-мономер (desAA-фибрин) получали обработкой фибриногена человека тромбиноподобным ферментом рептилазой так, как описано в работе [44].

Эквимольярные комплексы Pm • SK и Pm • STA получали непосредственно перед применением. Сначала готовили комплексы Pg • SK и Pg • STA смешением равных объемов 18.8 мкМ растворов плазминогена и SK (или STA) в 0.1 М фосфатном буфере pH 7.4, содержащем 0.15 М NaCl. Раствор комплекса Pg • SK инкубировали в буфере в течение 10–15 мин, а комплекса Pg • STA в течение 25 мин, контролируя полноту их превращения в

комплексы Pm • SK или Pm • STA по увеличению эстеразной активности растворов до максимального значения.

Стабильность эквимольярных комплексов Pm • SK и Pm • STA в растворе изучали, инкубируя 9.4 мкМ растворы свежеприготовленных комплексов Pm • SK или Pm • STA в 0.1 М фосфатном буфере pH 7.4, содержащем 0.15 М NaCl, в течение 6 ч при 37°C. В ходе инкубации отбирали пробы и измеряли в них остаточные фибринолитические и эстеразные активности.

Фибринолитическую активность комплексов Pm • SK и Pm • STA в ходе их инкубации в буфере, pH 7.4 определяли методом Кристенсена [43], который основан на измерении времени полного лизиса фибринового сгустка под действием включенного в него активатора. Остаточные фибринолитические активности комплексов Pm • SK или Pm • STA в отобранных пробах определяли с помощью калибровочной зависимости активности нативной SK или STA (50–500 МЕ/мл) от времени полного лизиса сгустков. Измерение активности каждой пробы дублировали.

Эстеразную активность комплексов Pm • SK и Pm • STA измеряли по начальным скоростям гидролиза ими 0.2 мМ *Z*-Lys-pNP в 0.1 М фосфатном буфере, pH 6.2, содержащем 0.15 М NaCl, при 25°C. Скорость гидролиза регистрировали по накоплению *n*-нитрофенола при 340 нм ($\epsilon_M^{340} = 6860 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, pH 6.2). Концентрация эквимольярных комплексов в кювете составляла 100 нМ. Удельную эстеразную активность выражали как изменение оптического поглощения раствора субстрата при λ 340 нм за 1 мин, вызываемое 1 мг фермента ($\Delta A_{340}/\text{мин мг}$).

Определение кинетических параметров гидролиза эфирного и амидного субстратов комплексами Pm • SK и Pm • STA. Кинетические параметры гидролиза *Z*-Lys-pNP (k_{cat} и K_m), катализируемого 50 нМ комплексом Pm • SK (или Pm • STA), определяли из зависимостей начальных скоростей реакций ($\Delta A_{340}/\text{мин}$) от концентрации субстрата (0.03–0.5 мМ) в 0.1 М фосфатном буфере, pH 6.2, содержащем 0.15 М NaCl, при 25°C в координатах Лайнуивера-Берка. Скорость гидролиза регистрировали по накоплению *n*-нитрофенола при 340 нм. Каждое измерение активности дублировали.

Кинетические параметры гидролиза AFK-pNA (k_{cat} и K_m), катализируемого 100 нМ комплексом Pm • SK (или Pm • STA), определяли из зависимостей начальных скоростей реакций ($\Delta A_{405}/\text{мин}$) от концентрации субстрата (0.02–0.2 мМ) в 0.1 М фосфатном буфере, pH 7.4, содержащем 0.15 М NaCl, при 25°C в координатах Лайнуивера-Берка. Скорость гидролиза регистрировали по накоплению *n*-нитроанилина при 405 нм ($\epsilon_M^{405} = 10000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, pH 7.4). Каждое измерение активности дублировали.

Кинетику активации плазминогена каталитическими концентрациями SK и STA изучали с помощью сопряженного метода, описанного в работе [44], с некоторыми модификациями. Метод основан на сопряжении реакции активации плазминогена его активатором и гидролиза хромогенного субстрата образующимся плазмином. Реакцию активации проводили в 0.1 М Трис-НСI-буфере, рН 7.4, содержащем 0.15 М NaCl и 0.01% Triton X-100, при 37°C в лунках микропланшеты (объем реакционной смеси 200 мкл). За кинетикой активации плазминогена следили по высвобождению *n*-нитроанилина через 3–5-минутные интервалы с помощью планшетного фотометра Antos-2020, соединенного с компьютером и установленного для измерения поглощения при 405 нм. Результаты обсчитывались с учетом контроля (фоновый гидролиз в отсутствие активатора). Параболические кривые образования *n*-нитроанилина в сопряженной реакции (A_{405} от t) спрямляли в координатах A_{405} от t^2 , из тангенсов углов которых вычисляли начальные скорости активации для каждой концентрации плазминогена (v_0) (расчеты проводили в программе Sigma Plot, коэффициент $r > 0.99$).

Влияние растворимого фибрина на скорость активации плазминогена нативными SK и STA. Рабочие лунки микропланшеты содержали 0.6 мМ АФК-рNA, 1 мкМ Glu-Pg, 0.2 нМ SK (или STA) и фибрин-мономер в различных концентрациях (0–0.06 мг/мл) в указанном выше буфере, а контрольные лунки содержали реакционную смесь без активатора. Начальные скорости активации (v_0) при каждой концентрации фибрин-мономера фиксировали, как описано выше. Каждый эксперимент выполняли по 2 раза.

Определение кинетических параметров активации Glu-PgII и Lys-PgII комплексами Pm • SK и Pm • STA. Активацию Glu-PgII и Lys-PgII комплексами Pm • SK и Pm • STA изучали в отсутствие и в присутствии растворимого фибрин-мономера (FM) при 37°C. Реакционный раствор в рабочих лунках содержал 0.6 мМ АФК-рNA, 0.13 нМ комплекс Pm • SK (или Pm • STA), FM (0 или 0.02 мг/мл) и Glu-PgII или Lys-PgII в различных концентрациях в указанном выше буфере. В отсутствие FM концентрации плазминогена варьировали в интервале 1.0–20 мкМ для Glu-PgII и 0.64–12.5 мкМ для Lys-PgII, а в присутствии FM – в интервале 0.07–5.0 мкМ для Glu-PgII и 0.07–2.0 мкМ для Lys-PgII. При всех концентрациях плазминогена в контрольные лунки вместо активатора вносили равный объем буфера для измерения фонового гидролиза (A_{405}^0). Кинетические параметры активации плазминогена (k_{Pg} и K_{Pg}) в отсутствие и в присутствии FM определяли из зависимостей $1/v_0$ от $1/[Pg]$ как описано в работах [12, 44]. Каждый эксперимент выполняли по 2 раза.

Стабильность SK и STA в плазме крови человека определяли по падению фибринолитической активности образцов по методу, описанному в работе [45]. В ходе инкубации 25, 50 или 100 нМ нативной SK (или STA) в плазме крови человека при 37°C отбирали пробы плазмы (100 мкл) и выделяли их эуглобулиновые фракции. На фибриновые пластины стандартной толщины наносили по 10 мкл растворов эуглобулиновых фракций исследуемых проб плазмы и через 16 ч инкубации при 37°C измеряли площади зон лизиса фибриновой пластины (в мм²), которые пропорциональны фибринолитической активности активаторов. Строили зависимость остаточной фибринолитической активности SK (или STA) от времени инкубации.

Влияние SK и STA на уровень фибриногена в плазме крови человека определяли с помощью метода, описанного в работе [45]. Метод основан на изменении мутности исследуемого образца при превращении фибриногена в фибрин под действием тромбина. Различные концентрации SK или STA (от 10 до 100 нМ) инкубировали в плазме в течение 4 ч при 37°C. Отобранные в ходе инкубации пробы плазмы разбавляли в 5 раз. В ячейки планшеты вносили по 250 мкл разбавленных проб плазмы, 50 мкл раствора тромбина (конечная концентрация 0.06 Ед/мл) и измеряли увеличение мутности раствора при 405 нм на планшетном фотометре каждые 2 мин. Скорость образования фибрина определяли как тангенс угла наклона линейного участка кривой. Уровень остаточного фибриногена в исследуемых образцах плазмы определяли по калибровочной зависимости скорости увеличения мутности от концентрации фибриногена в стандартной плазме (содержащей 2.4 мг/мл), разбавленной в 5–80 раз. Эксперимент с каждым образцом плазмы выполняли трижды.

Кинетику фибринолиза изучали по скорости расходования твердофазного субстрата (фибринового или плазменного сгустка) под действием плазмينا и комплексов Pm • SK и Pm • STA, внесенных в жидкую фазу над сгустком. Столбы фибринового геля формировали, так как описано в работе [42], а столбы плазменного геля – так как описано в работе [45]. Над полученными фибриновыми или плазменными сгустками помещали 0.45 мл 0.1 М фосфатного буфера, рН 7.4, содержащего 0.15 М NaCl, или плазмы человека, соответственно. После инкубации пробирок с гелями в шейкере-инкубаторе при 37°C в течение 15 мин инициировали реакцию фибринолиза добавлением 50 мкл раствора плазмينا, комплекса Pm • SK или комплекса Pm • STA в надгелевую жидкость. Конечные концентрации агентов варьировались в интервале 10 нМ–1 мкМ. За кинетикой фибринолиза следили по уменьшению высоты столба геля (Δl) во времени при 37°C с помощью катетометра [46]. Каждое измерение дублировали.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Radek J.T., Castellino F.J. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 9915–9922.
2. De Renzo E.C., Siiteri P.K., Hutchings B.L., Bell P.H. // J. Biol. Chem. 1967. V. 242. P. 533–542.
3. Lijnen H.R., Van Hoef B., De Cock F., Okada K., Ueshima S., Matsuo O., Collen D. // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 11826–11832.
4. Vanderschueren S.M.F., Lijnen H.R., Collen D. // Fibrinolysis. 1995. V. 9. Suppl. 1. P. 87–90.
5. Lijnen H.R., De Cock F., Matsuo O., Collen D. // Fibrinolysis. 1992. V. 6. P. 33–37.
6. Lijnen H.R., Collen D. // Fibrinolysis. 1996. V. 10. Suppl. 3. P. 119–126.
7. Soff G.A. // Cancer Metastasis Rev. 2000. V. 19. P. 97–107.
8. Rijken D.C., Sakharov D.V. // Thromb. Res. 2001. V. 103. P. S41–49.
9. Castellino F.J., Ploplis V.A. // Thromb. Haemost. 2005. V. 93. P. 647–654.
10. Ponting C.P., Marshall J.M., Cederholm-Williams S.A. // Blood Coagul. Fibrinolysis. 1992. V. 3. P. 605–614.
11. Davidson D.D., Castellino F.J. // J. Clin. Invest. 1993. V. 92. P. 249–254.
12. Aisina R., Moukhametova L., Gershkovich K., Varfolomeyev S. // Biochim. Biophys. Acta. 2005. V. 1725. P. 370–376.
13. Collen D. // Thromb. Haemost. 1980. V. 43. P. 77–89.
14. Boxtrud P.D., Bock P.E. // Biochemistry. 2000. V. 39. P. 13974–13981.
15. Bean R.R., Verhamme I.M., Bock P.E. // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. P. 7504–7510.
16. Verhamme I.M., Bock P.E. // J. Biol. Chem. 2014. V. 289. P. 28006–28018.
17. Lijnen H.R., de Cock F., van Hoef B., Schlott B., Collen D. // Eur. J. Biochem. 1994. V. 224. P. 143–149.
18. Reddy K.N.N., Markus G. // J. Biol. Chem. 1972. V. 247. P. 1683–1691.
19. Chibber B.A.K., Radek J.T., Morris J.P., Castellino F.J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 1237–1241.
20. Nolan M., Bouldin S.D., Bock P.E. // J. Biol. Chem. 2013. V. 288. P. 29482–29493.
21. Buck F.F., Hummel B.C.W., De Renzo E.C. // J. Biol. Chem. 1968. V. 243. P. 3648–3654.
22. Collen D., Schlott B., Engelborghs Y., Hoef B., Hartmann M., Lijnen H.R., Behnke D. // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 8284–8289.
23. Rodrigues P., Collen D., Lijnen H.R. // Fibrinolysis. 1995. V. 9. P. 298–303.
24. Collen D., De Cock F., Vanlinthout I., Declerck P.J., Lijnen H.R., Stassen J.M. // Fibrinolysis. 1992. V. 6. P. 232–242.
25. Сазонова И.Ю., Айсина Р.Б., Мухаметова Л.И., Варфоломеев С.Д. // Биохимия. 1999. Т. 64. С. 83–93.
26. Siefring G.E., Castellino F.J. // J. Biol. Chem. 1976. V. 251. P. 3913–3920.
27. Никандров В.Н. // Биоорг. химия. 1994. Т. 20. С. 169–181.
28. Wohl R.C., Summaria L., Robbins K.C. // J. Biol. Chem. 1980. V. 255. P. 2005–2013.
29. Strickland D.K., Morris J.P., Castellino F.J. // Biochemistry. 1982. V. 21. P. 721–728.
30. Айсина Р.Б., Гайсарян Е.С., Снитко Я.Э., Варфоломеев С.Д. // Биоорг. химия. 1994. Т. 20. С. 182–189. [Aisina R.B., Gaisarian E.S., Snitko Y.E., Varfolomeyev S.D. // Russ. J. Bioorg. Chem. 1994. V. 20. P. 99–105.]
31. Lijnen H.R., Van Hoef B., Collen D. // Eur. J. Biochem. 1993. V. 211. P. 91–97.
32. Silence K., Hartmann M., Guhrs K.-H., Gase A., Schlott B., Collen D., Lijnen H.R. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 27192–27198.
33. Mori K., Dwek R., Downing A.K., Opdenakker C., Rudd P. // J. Biol. Chem. 1955. V. 270. P. 3261–3267.
34. Urano T., de Serrano V.S., Gaffney P.J., Castellino F.J. // Biochemistry. 1988. V. 27. P. 6522–6528.
35. Wiman B., Lijnen H.R., Collen D. // Biochim. Biophys. Acta. 1979. V. 579. P. 142–154.
36. Cederholm-Williams S.A., De Cock F., Lijnen H.R., Collen D. // Eur. J. Biochem. 1979. V. 100. P. 125–132.
37. Verstraete M., Collen D. // Blood. 1986. V. 67. P. 1529–1541.
38. Booth N.A. // Fibrinolysis and Proteolysis. 2000. V. 14. P. 206–213.
39. Silence K., Collen D., Lijnen H.R. // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 9811–9816.
40. Summaria L., Arzadon L., Bernabe P., Robbins K.C. // J. Biol. Chem. 1974. V. 249. P. 4760–4769.
41. Wohl R.C., Sinio L., Robbins K.C. // Biochem. Biophys. Acta. 1983. V. 745. P. 20–31.
42. Левашов М.Ю., Айсина Р.Б., Гершкович К.Б., Варфоломеев С.Д. // Биохимия. 2007. Т. 72. С. 872–882.
43. Christensen L.R. // Proc. Soc. Biol. Med. 1941. V. 46. P. 674–679.
44. Айсина Р.Б., Мухаметова Л.И., Присяжная Н.В., Гулин Д.А., Левашов М.Ю., К.Б. Гершкович К.Б. // Биоорг. химия. 2011. Т. 37. С. 319–326. [Aisina R.B., Mukhametova L.I., Prisiazhnaia N.V., Gulin D.A., Levashov M.Iu., Gershkovich K.B. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2011. V. 37. P. 285–291.]
45. Айсина Р.Б., Мухаметова Л.И., Тюна Д.В., Гершкович К.Б., Гулин Д.А., Варфоломеев С.Д. // Биоорг. химия. 2014. Т. 40. С. 560–570. [Aisina R.B., Mukhametova L.I., Tyuna D.V., Gershkovich K.B., Gulin D.A., Varfolomeyev S.D. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2014. V. 40. P. 516–525.]
46. Попова Г.Ю., Еремеев Н.Л., Айсина Р.Б., Казанская Н.Ф. // Бюлл. эксперим. биол. мед. 1989. № 5. С. 561–564.

Streptokinase and Staphylokinase: Differences in the Kinetics and Mechanism of Their Interaction with Plasminogen, Inhibitors and Fibrin

R. B. Aisina^{*, #}, L. I. Mukhametova^{*}, D. A. Gulin^{**}, K. B. Gershkovich^{**}, S. D. Varfolomeyev^{*}

[#]Phone: +7 (495) 939-50-83; e-mail: aisina2004@mail.ru

^{*}Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University,
Leninskie Gory, Moscow, 119992 Russia

^{**}Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences,
Moscow, 119991 Russia

Comparative in vitro study of the kinetics of various reactions involved in the process of thrombolysis initiated by streptokinase (SK) and staphylokinase (STA) was carried out. It was shown that at the interaction of an equimolar ratio of plasminogen (Pg) with SK or STA the rate of formation and the specific esterase activity of the complex plasmin (Pm) • SK are higher than those of the complex Pm • STA. The catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) of hydrolysis of the chromogenic plasmin substrates by Pm • SK complex was 2 times higher than by Pm • STA complex. In the absence of fibrin catalytic efficiency ($k_{\text{Pg}}/K_{\text{Pg}}$) of activation of Glu-plasminogen and Lys-plasminogen glycoform II by Pm • SK complex was higher than by Pm • STA complex, but the presence of fibrin increased $k_{\text{Pg}}/K_{\text{Pg}}$ activation of both plasminogens by Pm • STA complex significantly stronger than by Pm • SK complex due to the decrease in K_{Pg} . In contrast to STA (15.5 kDa), SK molecule (47 kDa) creates significant steric hindrances for the interaction of plasmin in Pm • SK complex with protein inhibitors. In addition, SK caused greater fibrinogen degradation than STA. It is shown that Pm • SK and Pm • STA complexes lyse fibrin clots in buffer with similar rates, while the rate of lysis of plasma clots, immersed in plasma, by Pm • STA complex are significantly higher than those by Pm • SK complex. It was revealed that the species specificity of STA and SK is determined mainly by the rate of formation and the efficiency of Pm • SK and Pm • STA complexes in the activation of autologous plasminogen. The lysis efficiency of plasma clots of mammals fell in the series: human > dog > rabbit for SK and the dog > human > rabbit for STA. The results show that in the purified system SK is a more effective activator of plasminogen than STA. In the system containing fibrin and α_2 -AP, the activator and fibrinolytic activities of STA are higher than those of SK, due to the increased stability in plasma and fibrin specificity of STA, the fast reaction of the complex Pm • STA with α_2 AP and the ability of the STA to recyclization in the presence of α_2 AP.

Keywords: streptokinase, staphylokinase, plasminogen activation, inhibition, stability, fibrinolysis, fibrinogenolysis