

ТРОМБОЛИТИЧЕСКИЕ И АНТИКОАГУЛЯНТНЫЕ СВОЙСТВА ТИОЛЗАВИСИМОЙ СЕРИНОВОЙ ПРОТЕИНАЗЫ *BACILLUS INTERMEDIUS* 3-19

Е.Л. ИЦКОВИЧ¹, Л.И. ЛЮТОВА², Н.П. БАЛАБАН¹, А.М. МАРДАНОВА¹, Е.В. ШАКИРОВ¹,
М.Р. ШАРИПОВА¹, И.Б. ЛЕЩИНСКАЯ¹, Г.Н. РУДЕНСКАЯ^{2*}

¹ Кафедра микробиологии Биологического факультета Казанского государственного университета, 420008 Казань, ул. Ленина, 18; факс: (8432) 38-09-94,
Эл.-адрес: Nelly.Balaban@ksu.ru

² Кафедра химии природных соединений Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, 119899 Москва, МГУ; факс: (095) 939-31-81; Эл.-адрес: rudenskaya@biorg.chem.msu.su

В работе приводятся результаты исследований по изучению влияния в условиях *in vitro* препарата сериновой тиолзависимой протеиназы *B. intermedius* на время образования и растворения кровяных сгустков.

Ключевые слова: сериновые протеиназы, субстратная специфичность, антикоагуляционная и фибролитическое действие (*B. intermedius*)

ВВЕДЕНИЕ. Протеиназы играют ключевую роль в регуляторных механизмах обмена у человека, животных и растений. Протеиназы, выделенные из различных источников, нашли широкое применение во многих областях медицины. В настоящее время в лечебных целях применяются препараты протеиназ животного происхождения: трипсин, химотрипсин, химопсин, панкреатин и растительного: папаин, лекозим, ранидаза. Протеолитические ферменты используются в ортопедии при лечении поясничных остеохондрозов, грыж поясничных дисков, контрактуры сгибательных мышц пальцев, при пролежнях, гнойных ранах, и в косметологии при лечении рубцов. Протеиназы, обладающие более узкой субстратной специфичностью, из различных микроорганизмов (фибринолизин, террилитин, стрептокиназа), применяются в тромболитической терапии. Ранее нами были изучены тромболитические и фибринолитические свойства тиолзависимой протеиназы из *Thermoactinomyces vulgaris* [1,2]. Было показано, что в условиях *in vivo* и *in vitro* она обладает высокой дозозависимой фибринолитической и тромболитической активностью. В настоящей работе приведены результаты изучения *in vivo* фибринолитических и тромболитических свойств другой сериновой тиолзависимой протеиназы из *Bacillus intermedius* 3-19.[3,4].

Внеклеточная сериновая тиолзависимая протеиназа *Bacillus intermedius* была выделена из культуральной жидкости *B. intermedius* 3-19 в гомогенном состоянии с использованием ионообменной и афинной хроматографии [3,4]. Изучение субстратной специфичности фермента на природных и синтетических субстратах показало, что фермент активно гидролизует пептидные субстраты по связям гидрофобных аминокислот, а также белки, такие, как гемоглобин, казеин, овальбумин из сыворотки крови человека. Протеиназа

B. intermedius обладает высокой фибринолитической активностью [3], сравнимой с тиазависимой сериновой протеиназой из *T. vulgaris* [1].

МЕТОДИКА. Изучение антикоагуляционного и тромболитического действия протеиназы проводили в условиях *in vitro* на крови белых беспородных крыс. Кровь брали из яремной вены, в пробы добавляли 3,8% цитрата натрия в соотношении 9:1. Было проведено три серии экспериментов. В первой серии оценивали антикоагулянтные свойства протеиназы, для чего 0,3 мл цитратной крови инкубировали с 0,1 мл фермента в концентрациях 50, 100, 150, 250, 350, 500 и 1000 мкг/мл в течение 10 минут при температуре 15-20°, затем добавляли 0,1 мл тромбина (2 мг/мл) в физиологическом растворе, пробы помещали в водяную баню и отмечали время образования и последующего растворения сгустка. Во второй серии для определения тромболитической активности протеиназы 0,3 мл крови смешивали с 0,1 мл тромбина (2 мг/мл), пробы инкубировали 10 минут при 37°C. Затем к образовавшемуся сгустку добавляли 0,1 мл фермента в вышеуказанных концентрациях. В третьей серии эксперимента к смеси крови с разными концентрациями протеиназы вместо тромбина добавляли 0,025 М хлористого кальция. В дальнейшем исследования проводили как в первой серии. Динамику образования сгустка крови, инкубированной с разными концентрациями фермента, регистрировали на тромбозластографе фирмы "Hellige" (Австрия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. В первой серии экспериментов было показано, что при инкубации крови с концентрациями фермента 50, 100 и 150 мкг/мл фермент не оказывал заметного антикоагулянтного действия. Время свертывания крови после добавления тромбина было соответственно 4 мин против 3 мин в контроле, где вместо протеиназы добавляли тот же объем физиологического раствора. С увеличением концентрации фермента до 250 и 350 мкг/мл, сгусток образовывался через 10 мин.

При использовании высоких концентраций фермента (500 и 1000 мкг/мл) сгусток не образовывался в течение суток. Время растворения полученных сгустков также менялось в зависимости от используемой концентрации фермента: при концентрации 250-350 мкг/мл оно равнялось 15-20 часам, при 100-150 мкг/мл - 24 часам. В контроле и при дозе фермента 50 мкг/мл сгусток не растворялся в течение суток, однако, вес сгустка после 24 -часовой инкубации в присутствии низкой концентрации фермента составил 80% от веса контрольного, что свидетельствует о частичном лизисе.

Результаты второй серии экспериментов представлены в таблице. Видно, что протеиназа обладает выраженной дозозависимой тромболитической активностью. 100% лизис происходил при использовании концентраций 350-1000 мкг/мл. Время лизиса находилось в обратной зависимости от концентрации фермента.

Интересно отметить, что фермент в концентрации 50 мкг/мл в первой серии за 24 часа инкубации уменьшает тромб на 20%, за то же время в той же концентрации во второй серии лизирует преобразованный тромб только на 15%, следовательно, высокий тромболитический эффект низкой дозы фермента проявляется только после предварительной инкубации с кровью. Это связано с тем, что фермент, добавленный к крови, очевидно, разрушает компоненты гемостаза, в результате чего образуется менее плотный сгусток, чем без предварительной инкубации. Полученные результаты подтверждаются данными тромбозластографии.

В третьей серии с целью выяснения влияния фермента на процесс тромбинообразования, мы провели эксперименты аналогичные первой серии с использованием в реакционной смеси вместо экзогенного тромбина 0,025 М CaCl_2 , возмещаая таким образом связанные цитратом ионы Ca^{2+} и активируя эндогенный тромбин. В этом случае сгусток должен образовываться под действием эндогенного тромбина. В новых условиях после предварительной инкубации плазмы с ферментом в концентрации 500 и

Таблица. Зависимость времени лизиса преобразованного сгустка крови от концентрации тиолзависимой сериновой протеиназы *B.intermedius* 3-19.

Концентрация фермента мкг/мл	Время лизиса тромба час	Вес тромба мг	Лизис тромба %
0	-	12,8	0
50	24	10,9	15
150	24	8,6	33
250	24	1,6	88
350	18	0	100
500	10	0	100
1000	4,5	0	100

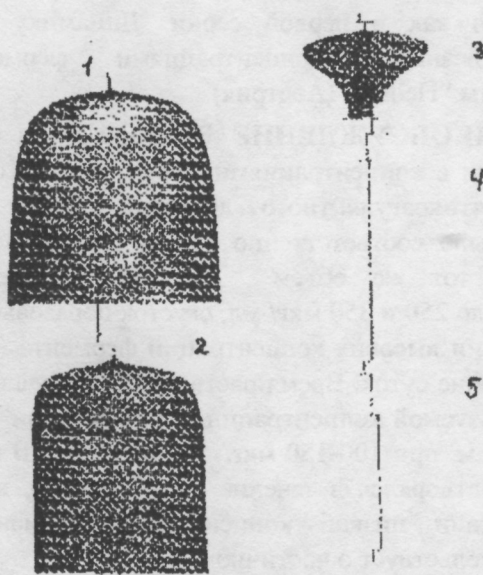


Рисунок.

Тромбоэластограммы крови крыс после инкубации ее с ферментом в различных концентрациях

1 - контроль 2 - 125 мкг протеиназы
3 - 250 мкг 4 - 500 мкг 5 - 1000 мкг

1000 мкг/мл сгусток также не образовывался в течение всего времени наблюдения. С уменьшением концентрации фермента до 350 мкг/мл тромб образовывался через 7 минут после образования его в контроле, был более рыхлым и полностью растворялся через 3-4 часа. В контрольном эксперименте тромб не растворялся через 24 часа - за весь период наблюдения. При записи тромбоэластограммы было подтверждено уменьшение плотности сгустка (ϵ) с увеличением концентрации фермента (рис.).

Так, если в контроле плотность сгустка (ϵ) была равна 163,15, то после инкубации крови с ферментом в концентрации 125 мкг и 250 мкг/мл она стала 100 и 56,25 соответственно, а при дальнейшем повышении концентрации фермента до 500 и 1000 мкг/мл сгусток не образовывался. По-видимому, полученные в данной серии опытов сгустки формировались медленнее, были менее плотными, в результате чего растворились почти в 5

раз быстрее, чем сгустки, полученные при добавлении тромбина. Результаты, полученные при действии протеиназы на предобразованный сгусток с использованием CaCl_2 , сопоставимы с результатами с использованием тромбина: протеиназа в концентрации 1000 мкг/мл растворяла тромб за 4,5 часа, а в концентрации 500 мкг/мл - за 11-12 часов.

Таким образом, показано, что в условиях *in vitro* протеиназа *B.intermedius* обладает тромболитической и антикоагулянтной активностью, но эффективна, в отличие от действия на чистый фибрин, в достаточно высоких концентрациях. Вероятно, что присутствующие в крови α -антиплазмин, α_2 -макроглобулины α_1 -антитрипсин и другие ингибиторы оказывают инактивирующее действие на протеолитический фермент. В дальнейшем предполагается изучение взаимодействия этих ингибиторов с ферментом *in vitro*, а также исследование тромболитического действия протеиназы в условиях *in vivo*, с целью выяснения реакции организма на введение препарата и возможность локального применения с целью лизиса гематом или лечения воспаления суставов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Руденская Г.Н., Лютова Л.В., Андреев Г.В., Карабасова М.А., Цаплина И.А., Степанов В.М. (1987) Прикл. биохимия и микробиология, **23**, 754-761.
2. Лютова Л. В., Андреев Г.В., Карабасова М.А., Цаплина И.А., Руденская Г.Н. (1990) Прикл. биохимия и микробиология, **26**, 623-628.
3. Балабан Н.П., Шарипова М.Р., Ицкович Е.Л., Лещинская И.Б., Руденская Г.Н. (1994) Биохимия **59**, 1393-1399.
4. Шарипова М.Р., Балабан Н.П., Нехотяева Н.В., Ицкович Е.Л., Шакиров Е.В., Лещинская И.Б., Руденская Г.Н. (1996) Биохимия **61**, 110-118.

THROMBOLYTIC AND ANTICOAGULANT PROPERTIES OF THIOL-DEPENDENT SERINE PROTEINASE *BACILLUS INTERMEDIUS* 3-19.

E.L.ITSKOVICH, L.I.LUTOVA, N.P.BALABAN, M.R.SHARIPOVA, I.B.LESHCHINSKAYA,
G.N.RUDENSKAYA

School of biology Kazan State University, 420008, Kazan, Lenin st. 18. Fax(8432)380994, E-mail Nelly Balaban@ksu.ru

School of Chemistry of Moscow State University,
E-mail rudenskaya@biorgchem.msu.su

The results on research of affection "in vitro" of preparate of thiol-dependent serine proteinase from *B.intermedius* on time of formation and dissolvation of the clots formed from plasma rat blood.

Key words: serine proteinase, substrate specificity, anticoagulan and thrombolytic action, (*B. Intermedius*)