

УДК 577.152.3+534.29-7/-8

© Коллектив авторов

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СРЕПТОКИНАЗЫ ПОД ДЕЙСТВИЕМ УЛЬТРАЗВУКА

Ю.А. Лесникович¹, И.Э. Адзерохо², В.М. Шкуматов¹

¹Учреждение Белорусского государственного университета "Научно-исследовательский институт физико-химических проблем",
ул. Ленинградская 14, Минск, 220050 Беларусь;
тел./факс: (375-17) 209-5461, эл. почта: biopharm@bsu.by

²Белорусская медицинская академия последипломного образования, ул. Петра Бровки 30, г. Минск, 220714, Беларусь.

С целью оптимизации условий акусто-ферментативного тромболизиса исследовано влияние низкочастотного УЗ на изолированный препарат стрептокиназы. Непрерывное воздействие УЗ с интенсивностью 26 Вт/см² при 37°C в течение 5-10 минут не сопровождалось изменением структурно-функциональных свойств молекулы стрептокиназы. Увеличение времени УЗ-обработки (10-60 минут) приводило к нековалентной гидрофобной агрегации части белка. В отличие от нативного белка, модифицированная ультразвуком стрептокиназа подвержена выраженной протеолитической деградации плазмином с образованием полипептидных фрагментов с молекулярными массами в диапазоне от 43 до 14 кДа. Процессы агрегации и повышенной протеолитической деградации приводили к более низкой эффективности автоактивации плазминогена под действием озвученной стрептокиназы.

Ключевые слова: ультразвук, стрептокиназа, протеолиз, активация плазминогена, ВЭЖХ, гель-электрофорез

ВВЕДЕНИЕ. Стрептокиназа (СК) более 20 лет используется как тромболитический агент при тромбозмембранной блокаде кровеносных сосудов и до сих пор интенсивно исследуется на молекулярном уровне [1-3], однако многие аспекты механизма ее функционирования как активатора плазминогена окончательно не выяснены. Сочетание инвазивного или чрезкожного воздействия ультразвука (УЗ) с различными активаторами плазминогена является перспективным подходом для реканализации сосудов [4-10] и позволяет снизить терапевтические дозы белковых активаторов без проигрыша во времени и эффективности лечения. Вместе с тем, режимы УЗ разрушения тромбов в сочетании, в частности, со СК носят характер описания общих параметров гемостаза, не учитывающий возможных структурно-функциональных изменений этого белка под действием УЗ. Выяснение этих изменений позволит установить пороговые режимы УЗ-обработки, а также последовательность и дозы введения белкового препарата, которые бы не сопровождалась побочными эффектами акусто-ферментативного тромболизиса. В настоящей работе мы исследовали влияние УЗ обработки на изолированную СК, а также использовали структурно-функциональную модель активации перехода плазминогена в плазмин под действием нативной и УЗ-модифицированной СК.

ИЗМЕНЕНИЯ СРЕПТОКИНАЗЫ ПОД ДЕЙСТВИЕМ УЛЬТРАЗВУКА

МЕТОДИКА. В работе использовали лиофилизированный препарат Glu1-плазминогена, выделенный из объединенного пула плазмы доноров (Институт гематологии и переливания крови, Минск, Беларусь). Непосредственно перед использованием, белок дополнительно очищали аффинной хроматографией на колонке с лизинсефарозой. Концентрацию Glu1-плазминогена определяли спектрофотометрически, исходя из коэффициента поглощения при 280 нм 17,0 для 1% раствора в 1 см кювете и молекулярной массы 94 кДа. Препарат стрептокиназы производства ОАО "Белмедпрепараты" (Минск, Беларусь) по лицензии "Behringwerke AG" (Германия) использовали без дополнительной очистки. Концентрацию СК оценивали спектрофотометрически (коэффициент поглощения при 280 нм 9,5 для 1% раствора и молекулярной массы 47 кДа).

Источник ультразвука - УЗ аппарат разрушения тромбов "Пульсар" АРТ-УН1, разработанный в Белорусской государственной политехнической академии (Минск, Беларусь). В состав аппарата входит УЗ генератор с регулируемой мощностью от 30 до 80 Вт, частота 26 кГц и УЗ колебательная система, состоящая из пьезоэлектрического преобразователя УЗ колебаний, гибкой волноводной системы переменного сечения длиной 560 мм для концентрирования УЗ колебаний на рабочую часть. Диаметр конечной ступени волновода 0,8 мм, диаметр излучающей поверхности рабочей части 1,8 мм. Регулирование интенсивности УЗ колебаний от 1 до 26 Вт/см². В тех случаях, когда это дополнительно не оговаривалось, озвучивание проводили при интенсивности УЗ 26 Вт/см². Кювета, содержащая озвучиваемый раствор белка в 0,05М калий-фосфатном буфере (рН 7,4), термостатировалась при 37°C; при УЗ-обработке температура повышалась не более чем на 0,5°C.

Жидкостную хроматографию высокого давления (ЖХВД) проводили на хроматографе фирмы "Shimadzu" (Япония) с использованием UV/VIS фотодиодного детектора SPD-M10A. Применяли колонку (7,5 x 75 мм), содержащую силикагель с привитыми фенильными остатками "TSK Phenyl-5PW" ("Pharmacia-Biotech", Швеция). Хроматография проводилась при следующих условиях: раствор А - 0,02 М калий-фосфатный буфер (рН 6,0) и 1,75 М (NH₄)₂SO₄ и раствор Б - 0,02 М калий-фосфатный буфер (рН 6,0). Обратный, экспоненциальный градиент раствора Б в течение 23 мин, скорость потока 1 мл/мин, объем пробы - 20 мкл, λ - 280 нм. Условия хроматографии и обработку хроматограмм (форма градиента, интегрирование площадей пиков, скорость подачи элюента) задавали программным обеспечением Shimadzu CLASS VP (Япония).

Протеолиз стрептокиназы плазминогеном/плазмином. Раствор СК (16 мкМ) в 2 мл 0,1М калий-фосфатного буфера (рН 7,4) с 0,15 М NaCl подвергали воздействию УЗ мощностью 26 Вт/см² в течение 45 мин при 37°C, контролем служил аналогичный раствор СК, инкубируемый в тех же условиях. Затем к опытному и контрольному образцам добавляли плазминоген до соотношения плазминоген: СК 1:40 (по молярной концентрации) и далее инкубировали при 37°C, отбирая аликвоты для электрофоретического анализа через 1, 5, 15, 45, 90 и 180 мин.

Glu1-Плазминоген активировали нативным и УЗ-обработанными образцами СК, используя для оценки амидолитической активности образующегося плазмина хромогенный субстрат S 2251 (NH₂-D-Val-Leu-Lys-*n*-нитроанилид, "Sigma" США). Активацию начинали добавлением образцов СК и регистрировали изменение поглощения при 405 нм на спектрофотометре "Shimadzu 1202" (Япония) с использованием программы кинетических измерений. Увеличение поглощения между 10 и 300 с использовали для определения начальной скорости. Реакцию проводили в дубликаты при 37°C в 0,01 М калий-фосфатном буфере (рН 7,2); конечные концентрации плазминогена и СК составляли 10⁻⁸ М. Активацию перехода плазминогена в плазмин под действием озвученной и нативной СК контролировали также по скорости исчезновения полосы 94 кДа (Glu1-Плазминоген) по данным Ds-Na-ПААГ-электрофореза. В этом случае использовали эквимоллярный комплекс СК и плазминогена в концентрации 10⁻⁵ М.

Ds-Na-ПААГ-электрофорез проводили по методу [11] в 10%-ном полиакриламидном геле. После проведения электрофореза гели помещали на 30 мин в 10%-ную трихлоруксусную кислоту, затем отмывали смесью изопропанол : уксусная кислота : вода (1 : 2,5 : 7,5, по объему) и окрашивали 0,1%-ным раствором кумасси голубого G-250 в 3,5%-ном растворе HClO_4 . Белки-стандарты для электрофореза (фосфоорилаза b 94 кДа, альбумин из бычьей сыворотки 67 кДа, овальбумин 43 кДа, карбоангидраза 30 кДа, соевый ингибитор трипсина 20 кДа, α -лактальбумин 14,4 кДа) были производства "Pharmacia Biotech". Сканирование гелей проводили на спектрофотометре Specord UV-vis при длине волны 620 нм с использованием специально изготовленной приставки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Влияние ультразвука на изолированную стрептокиназу. Исследована устойчивость препарата СК к терапевтическим дозам ультразвуковых волн низкой частоты. Время УЗ-воздействия было выбрано в диапазоне от 1 до 60 мин. В специальных экспериментах установлено, что при интенсивности УЗ-обработки 5,0 и 10,2 Вт/см² и времени обработки 60 мин не наблюдалось изменений процесса активации плазминогена, контролируемого по гидролизу субстрата S 2251, в присутствии озвученных препаратов СК по сравнению с контрольным образцом. В режиме 26 Вт/см² предварительной УЗ-обработки, через определенные промежутки времени отбирались пробы для анализа методом ВЭЖХ гидрофобных взаимодействий в нативных условиях и для оценки активации плазминогена. На рис.1 в качестве примера приведены хроматограммы, иллюстрирующие эффект действия УЗ на СК. Постепенное уменьшение площади основного пика (время удержания 20,5 мин) и появление дополнительных диффузных пиков незначительной интенсивности со временами удержания в районе 15 и 26 минут позволили предположить, что уменьшение содержания нативной СК под действием УЗ происходит прежде всего в результате необратимой агрегации белка. Не исключена также возможность разрушения незначительной части (до 3%) белка по механизму исчерпывающего протеолиза следовыми количествами бактериальных протеиназ, на что указывает появление низкомолекулярных пептидов, фиксируемых в районе 3-5 минут. После интегрирования пиков построена зависимость содержания СК от продолжительности УЗ-воздействия (рис.1 б, кривая 1). Установлено, что содержание нативного белка в течение первых 5-10 минут УЗ-обработки практически не изменялось, а затем происходило постепенное уменьшение до

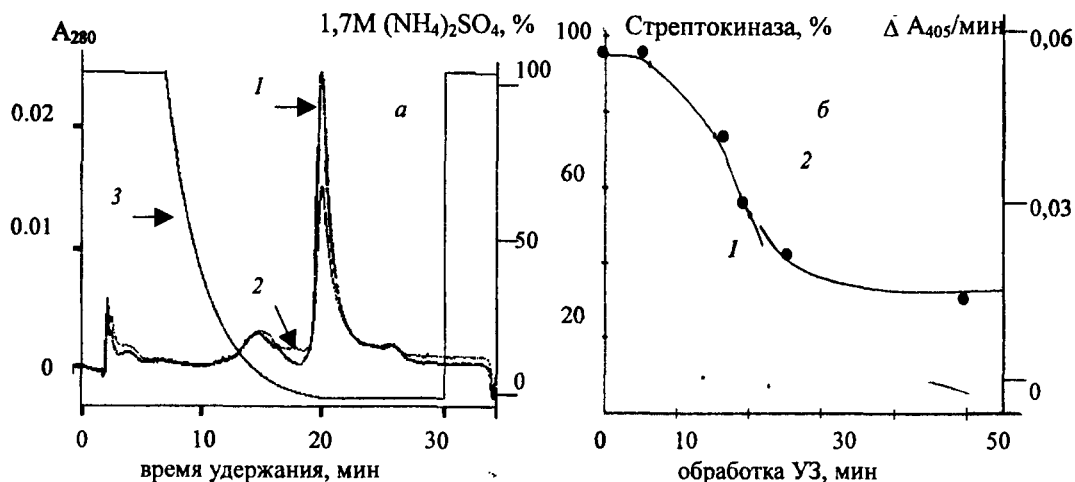


Рисунок 1.

Влияние УЗ на препарат СК: а - профили элюции СК при ВЭЖХ гидрофобных взаимодействий после УЗ-обработки в течение 5 (1) и 45 мин. (2); б - изменение содержания стрептокиназы (1) и зависимость начальной скорости гидролиза S2251 (2) от продолжительности УЗ-обработки.

ИЗМЕНЕНИЯ СТРЕПТОКИНАЗЫ ПОД ДЕЙСТВИЕМ УЛЬТРАЗВУКА

величины, составляющей около 30% от исходного образца. Изменение начальных скоростей, характеризующих гидролиз хромогенного субстрата S 2251 образующимся плазмином, носило двухфазный характер: незначительное уменьшение вплоть до 10 минут и выраженное падение в диапазоне УЗ-обработки от 10 до 60 минут (рис. 1 б, кривая 2). Поскольку в молекуле белка отсутствуют остатки цистеина [12,13], это исключает возможность агрегации за счет реакций тиол-дисульфидного обмена. По данным Ds-Na-ПААГ-электрофореза образцов озвученной СК не обнаружено расщепления полипептидной цепи под действием УЗ. Необратимое разворачивание этого белка с дестабилизацией нативной доменной структуры наблюдается в диапазоне температур 58-63°C и при значениях pH среды ниже 4,4 и выше 10,4 [14-16]. Локальное повышение температуры или изменение pH, образование кислород-содержащих радикалов, инактивирующих ферменты в условиях протекания акусто-химических реакций [17,18], могут инициировать процесс разворачивания, нековалентной полимеризации и последующей агрегации части полипептидных цепей. Потенциальными интермедиатами такого рода процессов могут являться молекулярные субформы/агрегаты СК (диффузный пик со временем удержания 26 мин, рис. 1 а) с экспонированием гидрофобных участков большей протяженности, чем расчетный профиль гидрофильности/гидрофобности для нативной молекулы СК, приведенный в работе [14].

Углубленный протеолиз УЗ-модифицированной СК под действием плазминогена/плазмина. Ранее установлено, что после активации плазминогена при длительной инкубации молекула СК протеолитически гидролизовалась под действием плазмина до низкомолекулярных полипептидов. Этот процесс наблюдался при стехиометрическом соотношении плазминоген: СК (1:1, по молярной концентрации) [19,20]. Информативным подходом для исследования процессов рефолдинга является метод ограниченного протеолиза. С помощью Ds-Na-ПААГ-электрофореза нами исследована динамика изменения полипептидных фрагментов при соотношении плазминоген: СК 1:40 (по молярной концентрации), для нативной СК и белка, подвергнутого непрерывной обработке УЗ в течение 45 минут. Принципиальные отличия процессов ограниченного протеолиза двух образцов стрептокиназы иллюстрирует рис.2. Образец нативной СК относительно стабилен при ограниченном протеолизе: интенсивность белковой полосы с молекулярной массой 47 кДа остается практически без изменений, несмотря на процесс активации плазминогена (полосы "тяжелой" и "легкой" цепей плазмина с молекулярными массами 66 и 26 кДа, указаны на рис.2 б стрелками). На приведенной денситограмме наблюдались также только минорные полипептидные фрагменты деградации СК. Характер процесса протеолиза СК, модифицированной действием УЗ (рис. 2 в), отличался от приведенного выше: обнаруживалась выраженная протеолитическая деградация СК до полипептидных фрагментов с молекулярными массами 43, 38, 30, 26, 21, 18, 16 и 14 кДа, что свидетельствует о "многоочечной" атаке плазмином полипептидных связей собственного белкового активатора. Кинетика описанного процесса представлена на рис.3, где показано изменение молярных количеств СК в ходе ограниченного протеолиза плазмином нативной СК и образца белка, подвергнутого предварительной УЗ-обработке. Необходимо отметить, что в ходе протеолиза не было обнаружено перераспределения полипептидных фрагментов, характерного для процессов ограниченного протеолиза, а относительное молярное количество нативной СК составляло около 50%. Это свидетельствовало о том, что протеолитическому действию была подвергнута преимущественно часть белка в развернутом состоянии, в котором экспонированы дополнительные, ранее недоступные для действия плазмина пептидные связи. Обращает внимание отсутствие углубленного протеолиза на начальных этапах (рис.3, кривая 2). Очевидно, в течение первых 15 минут происходило формирование первоначального комплекса СК-плазминоген, который, хотя и обладает амидолитической активностью по

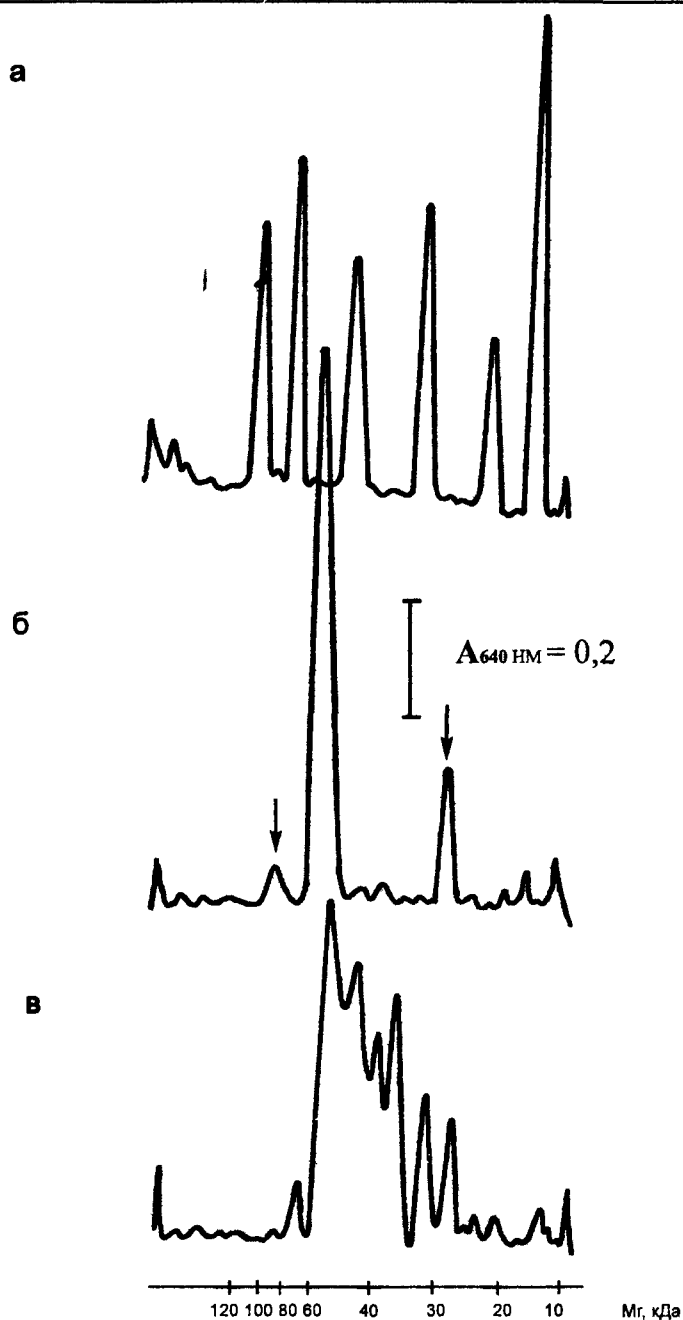


Рисунок 2.

Денситограммы гелей при протеолизе СК: а - стандарты белков, кДа (фосфоорилаза b - 94, бычий сывороточный альбумин - 67, овальбумин - 43, карбоангидраза - 30, соевый ингибитор трипсина - 20,1, α-лактальбумин - 14,4); б - СК через 45 мин после добавления плазминогена; в - СК, обработанная УЗ (45 мин), через 45 мин после добавления плазминогена.

отношению к синтетическому субстрату S 2251, но не способен осуществлять углубленную деградацию СК, инактивированной УЗ. После этого индукционного периода, связанного с образованием плазмина, происходит протеолитическое расщепление СК, пропорциональное процессу разворачивания нативного белка под действием УЗ.

ИЗМЕНЕНИЯ СРЕПТОКИНАЗЫ ПОД ДЕЙСТВИЕМ УЛЬТРАЗВУКА

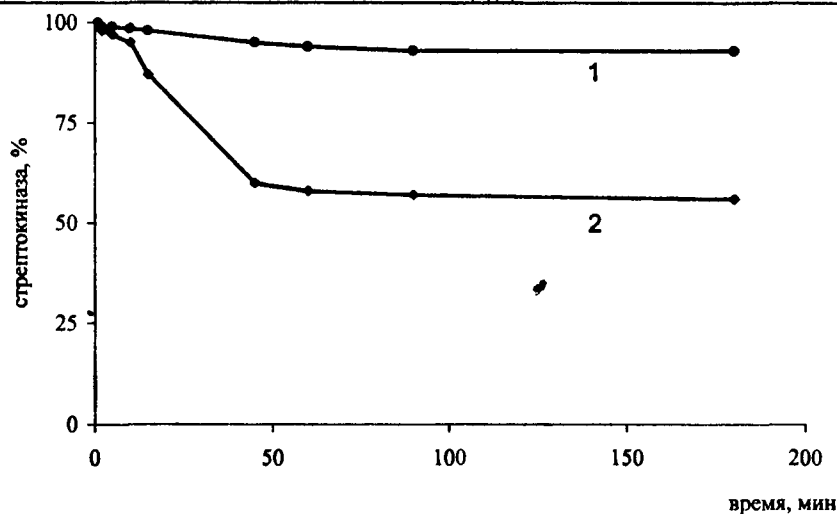


Рисунок 3.

Кинетика протеолиза контрольного образца СК (1) и озвученной СК (2) под действием плазмينا, контролируемая по изменению содержания полипептидной цепи с M_r 47 000 по данным денситометрического сканирования гелей после Ds-Na-ПААГ-электрофореза. Соотношение СК : плазминоген 1:40 (по молярной концентрации).

Активация превращения плазминогена в плазмин под действием УЗ-модифицированной СК. Функция СК, белка без собственной протеолитической активности, заключается в конформационной активации плазминогена с экспонированием каталитического центра, содержащего триаду аминокислотных остатков (H603, D646 и S741), характерную для сериновых протеаз типа трипсина и эластазы, и последующего автокаталитического превращения плазминогена в плазмин [21]. На рис.4 приведена кинетика активации плазминогена нативной и УЗ-обработанной СК, контролируемая Ds-Na-ПААГ-электрофорезом. Уменьшение интенсивности полосы этого белка по данным денситометрического

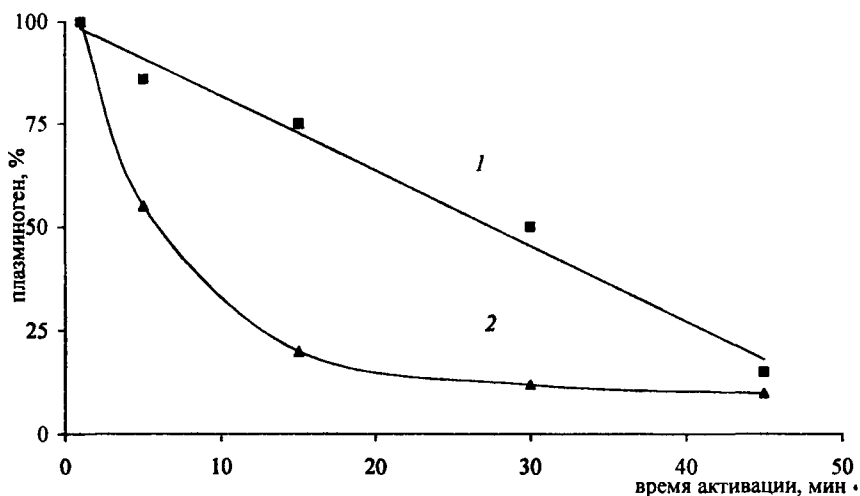


Рисунок 4.

Активация плазминогена под действием контрольного образца СК (1) и озвученной СК (2), контролируемая по изменению содержания полипептидной цепи с M_r 94 000 по данным денситометрического сканирования гелей после Ds-Na-ПААГ-электрофореза. Соотношение СК : плазминоген 1:1 (по молярной концентрации).

сканирования гелей свидетельствовало о расщеплении активационной пептидной связи R561-V562 с образованием "тяжелой" и "легкой" цепей плазмина. Из приведенного рисунка следует, что время полупревращения плазминогена в плазмин составляло 5-6 мин в присутствии нативной СК и 25 мин для УЗ-модифицированной. Несмотря на кинетические отличия, оба образца СК приводили к полной активации плазминогена. Сохранение способности к активации плазминогена УЗ-модифицированной СК можно объяснить следующим образом. Первоначальный комплекс СК с плазминогеном быстро преобразуется в более аффинный комплекс СК-плазмин за счет автокаталитического расщепления пептидной связи R561-V562. Исходя из возможности межмолекулярного обмена и замещения в комплексах различной аффинности [3], каталитических количеств нативной стрептокиназы достаточно для полной активации плазминогена. Ранее установлено, что протеолитически модифицированные формы СК (36 и 25,7 кДа), полученные в результате протеолиза плазмином, могут активировать плазминоген человека [22,23]. Фрагмент СК с молекулярной массой 17 кДа (V143 - R289), полученный в реакции с иммобилизованным на сефарозе плазминогеном (плазмином), является наименьшим фрагментом СК, способным связываться с плазминогеном [24]. Фрагмент СК (S60 - K333) существенен для проявления минимальной активаторной активности, а NH₂-концевой 59-членный пептид важен для придания молекуле белка конформации, необходимой для проявления полной активаторной функции [25]. Генно-инженерными методами были получены различные полипептидные фрагменты СК, важные для стабилизации конформации молекулы СК, индукции конформационных переходов плазминогена с экспонированием каталитического центра, автоактивации плазминогена. Структурно-функциональная координация этих участков обеспечивает наиболее эффективное проявление активаторной функции СК [2,26].

Полученные в настоящей работе результаты позволяют более четко выявить взаимоотношения между белковым активатором бактериального происхождения СК и протеолитическим ферментом плазмином человека: продукт активации протеолитически деградирует и инактивирует активатор; действие УЗ прототирует этот процесс. Обнаруженные структурно-функциональные изменения СК имеют важное значение для оптимизации условий УЗ разрушения тромбов и одновременной активации плазминовой системы этим белком. Установлено, что потенциально УЗ может уменьшать время "полужизни" СК за счет ее агрегации и протеолитической инактивации плазмином. Это позволило предложить предварительное введение стрептокиназы, время экспонирования УЗ до 10 мин и интенсивность ниже 26 Вт/см² для проведения акусто-ферментативного тромболизиса *in vivo*.

Авторы выражают благодарность директору Института гематологии и переливания крови МЗ Беларуси Гапановичу В.Н. за предоставление исходного Glu1-плазминогена человека.

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (гранты БОО-259 и БООМ-027).

ЛИТЕРАТУРА

1. Wang X., Lin X., Loy J.A., Tang J. et al. (1998) Science, **281**, 1662-1665.
2. Young K.C., Shi G.Y., Wu D.H., Chang L.C. et al. (1998) J.Biol.Chem., **273**, 3110-3116.
3. Boxrud P.D., Bock P.E. (2000) Biochemistry, **39**, 13974-13981
4. Nilsson A.M., Odselius R., Roijer A., Olsson S.B. (1995) Ultrasound Med.Biol., **21**, 833-840.
5. Gaul G.B. (1999) Thromb. Haemost., **82**, 157-159.

ИЗМЕНЕНИЯ СТРЕПТОКИНАЗЫ ПОД ДЕЙСТВИЕМ УЛЬТРАЗВУКА

6. *Sakharov D.V., Barrertt-Bershoeff M., Hekkenberg R.T., Rijken D.S.* (1999) *Thromb. Haemost.*, **81**, 605-612.
7. *Suchkova V.N., Baggs R.B., Francis C.W.* (2000) *Circulation*, **101**, 2296-2301.
8. *Rosenschein U., Furman V., Kerner E., Fabian I. et al.* (2000) *Circulation*, **102**, 238-245.
9. *Адзерихо И.Э., Мрочек А.Г., Дмитриев В.В., Кулак А.И.* (1999) Докл. НАН Беларуси, **43**, 14-19.
10. *Adzerikho I.E., Mrochek A.G., Dmitriev V.V., Kulak A.I.* (2001) *Ultrasonics Sonochemistry*, **8**, 315-318.
11. *Laemmli U.K.* (1970) *Nature*, **227**, 680-685.
12. *Jackson K.W., Tang J.* (1982) *Biochemistry*, **21**, 6620-6625.
13. *Malke H., Roe B., Ferretty J.J.* (1985) *Gene (Amst.)*, **34**, 357-362.
14. *Radek J.T., Castellino F.J.* (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 9915-9922.
15. *Welfle K., Pfeil W., Misselwitz R., Welfle H. et al.* (1992) *Int. J. Biol. Macromol.*, **14**, 19-22.
16. *Medved L.V., Solovjov D.A., Ingham K.C.* (1996) *Eur. J. Biochem.*, **239**, 333-339.
17. *Клибанов А.М., Мартинек К., Березин И.В.* (1974) *Биохимия*, **39**, 878-887.
18. *Гринцевич Е.Э., Адзерихо И.Э., Мрочек А.Г., Метелица Д.И.* (2001) *Биохимия*, **66**, 913-921.
19. *Grella D.K., Castellino F.J.* (1997) *Blood*, **89**, 1585-1589.
20. *Сазонова И.Ю., Айсуна Р.Б., Мухаметова Л.И., Варфоломеев С.Д.* (1999) *Биохимия*, **64**, 83-93.
21. *Davidson D.J., Higgins D.L., Castellino F.J.* (1990) *Biochemistry*, **29**, 3585-3590.
22. *Siefring C.E., Jr., Castellino F.J.* (1976) *J. Biol. Chem.*, **251**, 3913-3920.
23. *Reddy K.N., Kline D.L.* (1976) *Thromb. Res.*, **9**, 407-411.
24. *Rodrigues P., Fuentes D., Munoz E.* (1994) *Fibrinolysis*, **8**, 276-285.
25. *Shi G.Y., Chang B.I., Chen S.M., Wu D.H. et al.* (1994) *Biochem. J.*, **304**, 235-241.
26. *Young K.C., Shi G.Y., Chang Y.F., Chang B.I. et al.* (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 29601-29606.

Поступила 26.02.02

STRUCTURE-FUNCTIONAL CHANGES OF STREPTOKINASE UNDER ULTRASOUND EXPOSURE

J.A. Lesnikovich¹, I.E. Adzerikho², V.M. Shkumatov¹

¹Research Institute for Physical Chemical Problems, Belarussian State University,
14 Leningradskaya str, Minsk 220050, Belarus; fax: (375-17) 209-5461, E-mail: biopharm@bsu.by

²Belarusian Academy of Medical Postgraduate Training,
30 Petra Brovkiy st, Minsk 220714, Belarus.

To optimize conditions of acousto-enzymatic thrombolysis the influence of low-frequency ultrasound on the isolated preparation of streptokinase was investigated. The ultrasound treatment with intensity 26 W/cm² at 37° C within 5-10 minutes was not accompanied by changes of structure-functional properties of the streptokinase molecule. Increase of ultrasound-processing time (10-60 minutes) resulted in non-covalent hydrophobic aggregation of some part of the protein. In contrast to native protein ultrasound modified streptokinase is readily degraded by plasmin with formation of polypeptide fragments with molecular weights ranged from 43 up to 14 kD. The processes of aggregation and increased proteolytic degradation resulted in lower efficiency of plasmin autoactivation under the action of sounded streptokinase.

Key words: ultrasound, streptokinase, proteolysis, plasminogen activation, HPLC, gel-electrophoresis.