

С. П. Гаврилюк^{1,2}, О. М. Савчук², к.б.н.,
Л. І. Остапченко¹, проф. д.б.н.

МЕТОД ОТРИМАННЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА НЕТОКСИЧНОГО НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНОГО ФРАГМЕНТУ СТРЕПТОКИНАЗИ

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ;

²Шижир Інтернешнл ХХК, Монголія, Улаанбаатар, Долина дощів

Вивчення механізмів взаємодії компонентів системи гемостазу та регуляції їх активності є необхідною передумовою для розробки методів фармакологічної корекції численних патологічних станів серцево-судинної системи, пов'язаних з дисбалансом фібринолітичної системи та системи згортання крові. Одним із таких методів, широко розповсюджених на сьогоднішній день, є застосування тромболітичних препаратів, серед яких центральне місце за ефективністю займає стрептокіназа (Ск).

Ск — білок, що продукується різними видами β -гемолітичних стрептококів, сприяє неферментативному активуванню плазміногену (основного проферменту системи фібринолізу) до плазміну. Завдяки цьому Ск використовується для лікування інфаркту міокарду, легневих емболій та інших порушень кровообігу, пов'язаних з тромбоутворенням. Але при її застосуванні за можливої стрептококової інфекції або при наявності анти-стрептокіназних антитіл у крові хворого може виникнути ряд ускладнень, що пояснюються неконтрольованим імунотоксичним впливом Ск на систему гемостазу.

Раніше було показано, що при гідролізі Ск утворюється фрагменти (ФСк), які зберігають деяку активність нативної Ск. Але неоднозначних результатів щодо їх можливої токсичності одержано не було [1]. Причому, зрозуміло, що чим менший за молекулярною масою ФСк буде зберігати фармакологічну активність нативної Ск, тим нижча бу-

де його імуногенність, а тому і імунотоксичність [2]. Виходячи з вищезгаданого, ми вирішили шляхом гідролітичного розщеплення нативної Ск одержати нетоксичний ФСк з низькою молекулярною масою, перевірити його біологічну та імуногенну (імунотоксичну) активність.

Матеріали і методи дослідження

Ск отримували із комерційного препарату ("Белмедпрепарати", Білорусь) хроматографією на Blue-Sepharose [3] в 0,05 М Трис-НСІ буфері, рН 7,4. ФСк отримували протеолізом з панкреатичним бичачим α -хімотрипсином у ТБС, рН 7,4, при 10–36 °С за різного співвідношення фермент-субстрат на протязі 3–20 хвилин. Об'єм інкубаційного середовища складав 1,5 мл. Реакцію зупиняли додаванням PMSF до кінцевої концентрації 3 мМ. Активність Ск визначали за її здатністю активувати плазміноген за допомогою хромогенного субстрату S₂₂₅₁ [4]. Чистоту Ск, ФСк контролювали за методом електрофорезу [5] з наступним аналізом електрофореграми за допомогою Total Lab Software. Походження ФСк ідентифікували за методом вестерн-блотингу [6] проти анти-Ск антитіл.

Низькомолекулярні ФСк виділяли хроматографічним методом (колонка 1x75 см, наповнена Superdex 75 з оптимальною зоною розділення білків від 3 до 70 кДа, врівноважена 50 мМ Трис-НСІ буфером, рН 7,4). Нанесення зразку та елюцію проводили в тому ж буфері зі швидкістю 0,75 мл/хв. Отримані фракції концентрували системою тангенсального фільтрування MidJet,

картридж 30 см з розміром пор 1 кДа. Кількість білка визначали спектрофотометрично [7].

Використане обладнання, а також програмне забезпечення і хроматографічні сорбенти одержані від "GE Healthcare AB" (Швеція). Всі реагенти виробництва "Sigma" (Німеччина).

Результати та їх обговорення

Ск з комерційного препарату виділяли і доочищали на колонці з Blue-Sepharose НР. Результати електрофоретичного аналізу та аналізу біологічної активності свідчать, що використана в експериментах Ск є нативною і не містить домішок інших білків.

З серії ферментів, що використовуються для гідролізу Ск [8], ми вибрали α -хімотрипсин, який розщеплював Ск на декілька ФСк молекулярною масою від 3 до 42 кДа [8]. Нами було проведено серію аналітичних гідролізів для визначення оптимальних умов отримання низькомолекулярних ФСк, і за даними електрофоретичного аналізу було встановлено, що найбільше накопичення низькомолекулярних ФСк відбувалось за 97 хв при 37 °С і рН інкубаційного середовища 7,4; вагове співвідношення фермент-субстрат складало 1:100. За дотримання цих умов основними фрагментами в інкубаційному середовищі є ФСк з молекулярною масою 17; 7 і >3 кДа. Попереднє тестування виявило, що тільки 7 кДа фрагмент (7-ФСк) зберігав активність нативної Ск за неферментативним активуванням плазміногену до плазміну *in vivo*. Тому в подальшому увагу було зосереджено на отриманні, виділенні та очищенні 7-ФСк.

Для очищення ФСк використовують різні методи: препаративний електрофорез в ПААГ з наступною екстракцією білків з гелю, хроматографію на зворотних фазах чи гідрофобну хроматографію [2]. Наприклад, очистити до гомогенного стану 36 кДа ФСк нам вдалося за допомогою іонообмінної хроматографії на DEAE-Сепфарозі у 0,02 М Na₂HPO₄-цитратному буфері з використанням ступінчатого градієнту NaCl (дані не показані).

Для очищення 7-ФСк ми використовували високоефективну хроматографію, яка поділяє частки за розміром, виходячи з двох причин. По-перше, різні молекулярні маси отриманих нами після гідролізу

фрагментів теоретично дозволяли їх поділити за допомогою цього методу, і, по-друге, метод хроматографії, що поділяє частки за розміром, не включає ніяких пошкоджуючих факторів, наприклад, високої/низької іонної сили або рН буферів, сильного зв'язування з матрицею, спейсером або лігандом сорбенту, чи інших.

На рис. 1 представлено профіль елюції ФСК з упакованої Superdex 75 колонки (1 x 75 см), в 50 мМ Трис-НСІ буфері, рН 7,4, зі швидкістю елюції буфера 0,75 мл/хв, який свідчить, що розділення фрагментів відбувається достатньо ефективно. Це підтверджується також даними електрофорезу (рис. 2). Електрофоретичний аналіз фракцій 1-6 з Superdex 75 показав наявність у фракціях 1-3 ФСК з молекулярною масою від 30 до 42 кДа, у фракції 4 — збагаченого на 85-89% ФСК з молекулярною масою 17 кДа (17-ФСК), у фракції 5 — практично гомогенного 7-ФСК і у фракції 6 — ФСК з молекулярною масою меншою 3 кДа. Для гарантованого отримання чистих 7- і 17-ФСК збирали центральні частини фракцій 4 і 5 об'ємом 5 мл кожну, як це показано темними зонами на рисунку.

На рис. 3 представлені дані ідентифікації отриманих нами фрагментів стрептокінази — 7-ФСК і 17-ФСК — за методом вестерн-блотин-

гу. Як видно з даних рисунку, нативна СК і отримані після хроматографічної очистки ФСК (показано треки для 7-ФСК і 17-ФСК) "впізнаються" антистрептокіназними антитілами. Така взаємодія антитіл і ФСК свідчить про їх походження із СК, а також про чистоту виділених фрагментів — ніяких інших комплексів із антитілами на треках фрагментів не виявлено. Інші низькомолекулярні ФСК не взаємодіяли з антитілами проти СК, тобто не мали у своєму складі антигенних детермінант до СК. Щодо біологічної активності нативної СК, то тільки 7-ФСК зберігав можливість впливати на активування плазміногену до плазміну неферментативним шляхом *in vivo*.

Таким чином, в роботі одержано α -хімотриптичний гідролізат СК з високим вмістом низькомолекулярних ФСК, а з гідролізату за допомогою методу хроматографії виділено і очищено низькомолекулярні фрагменти стрептокінази з молекулярною масою 7 і 17 кДа. Фрагменти отримані в гомогенному вигляді і нативному стані, що підтверджено методом вестерн-блотингу. Нативну активність СК (стимуляція перетворення плазміногену до плазміну неферментативним шляхом) *in vivo* зберігав лише 7 кДа фрагмент стрептокінази. Причому, встановлено, що

кількість антитіл проти 7-ФСК у крові кроля після декількох повторних ін'єкцій знаходиться на слідовому рівні, що однозначно свідчить про різке зниження імунотоксичного впливу 7-ФСК у порівнянні з стрептокіназою.

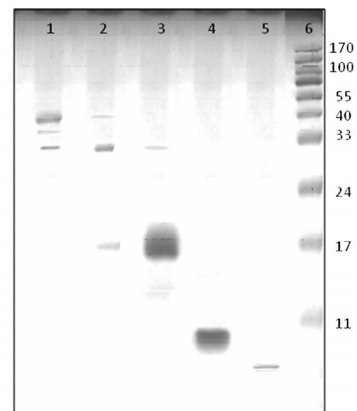


Рис. 2. Електрофореграма фракцій, що вміщують фрагменти СК, що були елюйовані з наповненої Superdex 75 колонки (1,0 x 75 см), в 50 мМ Трис-НСІ буфері, рН 7,4, швидкість буфера 0,75 мл/хв. 1. Фракції 1 і 2 сумарно, 2. Фракція 3, 3. Фракція 4, 4. Фракція 5, 5. Фракція 6, 6. Набір стандартів молекулярної маси білків

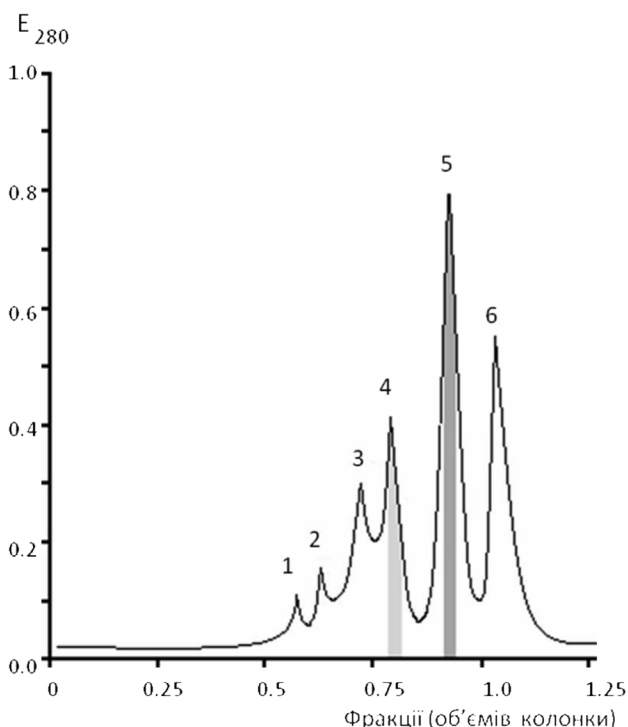


Рис. 1. Профіль елюції низькомолекулярних ФСК з колонки, наповненої Superdex 75 (1,0 x 75 см), в 0,05 М трис-НСІ буфері, рН 7,4, зі швидкістю 0,75 мл/хв

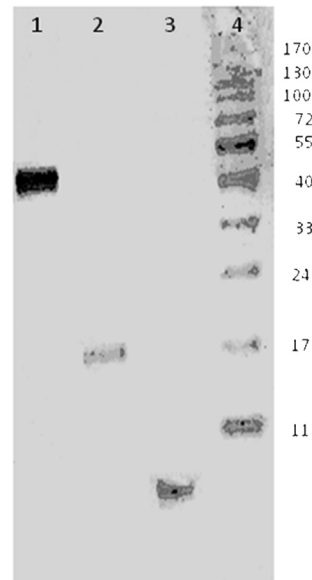


Рис. 3. Вестерн-блот низькомолекулярних фрагментів стрептокінази, що були елюйовані у фракціях 4 і 5 з наповненої Superdex 75 колонки у 50 мМ Трис-НСІ буфері, рН 7,4, проти антистрептокіназних антитіл. 1. Нативна стрептокіназа, 2. Низькомолекулярний 17-ФСК (фракція 4), 3. Низькомолекулярний 7-ФСК (фракція 5), 4. Набір стандартів молекулярної маси білків

ЛІТЕРАТУРА

1. Damaschun G., Damaschun H., Cast K. et al. Streptokinase is a flexible multi-domain protein // Eur. Biophys. J. — 1992. — V. 2. — P. 355-361.
2. Корольчук В.І. Локалізація ділянок зв'язування плазміногену на стрептокіназі // Автореф дис. ... канд. біол. наук: 03.00.04. — К., 1999. — 37 с.
3. Flodin P. Metodological aspects of gel filtration with special reference to desalting operations // J. Chromatogr. — 1961. — V.5, № 2. — P.103-115.
4. Castellino F.J., Urano T., de Ceprano V. et al. Control of human plasminogen activation // Haemostasis. — 1988. — V. 18. — P. 15-23.
5. Weber K., Osborn M. The reability of molecular weight determinations by dodecyl sulphate — polyacrilamide gel electrophoresis // J. Biol.Chem. — 1969. — V. 244, № 16. — P. 4406-4412.
6. Lee B.R., Park S.K., Kim J.H., Byun S.M. Site-specific alteration of Gly-24 in streptokinase: its effect on plasminogen activation // Biochem. Bioph. Res. Comm. — 1989. — V. 165. — P. 1085-1090.
7. Brockway W.J., Castellino F.J. A characterization of native streptokinase and altered streptokinase isolated from a human plasminogen activator complex // Biochemistry. — 1974. — V. 13. — P.2063.
8. Cederholm-Williams S.A., De Cock F., Lijnen H.R., Collen D. Kinetics of the reactions between streptokinase, plasmin and a2-antiplasmin // Eur. J. Biochem. — 1979. — V. 100. — P.125-132.

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

МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА НЕТОКСИЧНОГО НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО ФРАГМЕНТА СТРЕПТОКИНАЗЫ

Разработан метод выделения и очистки низкомолекулярного нетоксичного фрагмента стрептокиназы из ее α -химотриптического гидролизата с использованием метода хроматографии. Фрагмент стрептокиназы с молекулярной массой 7 кДа получен в гомогенном виде по данным электрофореза в ДСН-ПААГ, подтверждено его происхождение методом вестерн-блоттинга.

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

METHOD OF OBTAINING AND DESCRIPTION OF NONTOXIC LOW MOLECULAR WEIGHT FRAGMENT OF STREPTOKINASE

This scientific investigation is devoted to development and optimization of the method of size exclusion chromatographic purification of low molecular weight fragment of streptokinase from its α -chymotripsine hydrolyzate. The fragment of streptokinase with MW 7 kDa was obtained in a homogeneous purity according to SDS-PAAG electrophoresis, its origin was confirmed by the method of Western-blotting.