

## ВПЛИВ СТРЕПТОКІНАЗИ НА ВМІСТ ІНГІБІТОРА АКТИВАТОРІВ ПЛАЗМІНОГЕНУ І ТИПУ

Н. К. БУРЛОВА-ВАСИЛЬЄВА, Є. М. КРАСНОБРИЖА, О. М. САВЧУК, Г. Л. ВОЛКОВ

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;  
e-mail: jane\_kras@mail.ru

У роботі на модельних системах *in vitro* та *in vivo* досліджували вплив тромболітичного препарату – стрептокінази – на параметри інгібітора активатора плазміногену І типу (ПАІ-І). Показано, що введення стрептокінази у кровотік зумовлює підвищення вмісту ПАІ-І у плазмі крові ссавців. У проведених *in vitro* експериментах виявлено, що збільшення вмісту ПАІ-І унаслідок дії стрептокінази відбувається через активацію тромбоцитів із подальшим вивільненням інгібітора з їхніх  $\alpha$ -гранул. Встановлено, що цей інгібітор секретується тромбоцитами як у вільній, так і в комплексній формі.

Дані, одержані в роботі, дозволяють припустити, що значне підвищення вмісту ПАІ-І на фоні активації тромбоцитів після введення у кровотік стрептокінази, може бути чинником виникнення ризику нових тромботичних ускладнень.

**Ключові слова:** система гемостазу, тромбоцити, стрептокіназа, інгібітор активаторів плазміногену І типу.

Інгібітор активаторів плазміногену І типу (ПАІ-І) – важливий компонент системи фібринолізу, який забезпечує швидке інгібування тканинного активатора плазміногену (t-РА) і урокінази (u-РА) у кровотоці [1–3]. ПАІ-І синтезується в ендотеліальних клітинах судин та мегакаріоцитах. Після фрагментації останніх цей інгібітор потрапляє у тромбоцити, де акумулюється до 90% від загального його пулу у крові. ПАІ-І належить до типу інгібіторів серинових протеїназ (серпінів) і є найефективнішим з інгібіторів активаторів плазміногену у плазмі крові [1, 3]. Це одноступіньовий глікопротеїн з молекулярною масою 52 кДа, період напівжиття якого в руслі крові становить від 5 до 15 хв [1]. У разі активації тромбоцитів під час тромбоутворення ПАІ-І секретується  $\alpha$ -гранулами. Це призводить до його високої локальної концентрації, що відіграє важливу роль у стабілізації фібринової матриці тромбу. Припускають, що негативно заряджені фосфоліпіди, які експонуються на поверхні активованих тромбоцитів, можуть активувати латентну форму ПАІ-І у зоні тромбоутворення [1].

У проведених нами попередніх дослідженнях *in vivo* виявлено значне зменшення активності ПАІ-І у плазмі крові ссавців після внутрішньовенного введення їм стрептокінази [4]. Стрептокіназа – це білок бактеріального походження, який продукується різними серологічними групами (С, G та А)  $\beta$ -гемолітичних

стрептококів [5]. Вона є непрямим активатором плазміногену – ключового проферменту системи фібринолізу – і одним із найпоширеніших у медичній практиці тромболітичних препаратом [6–8]. Відомо, що застосування стрептокінази для лікування інфаркту міокарда, легневих емболій, глибоких тромбозів судин та інших порушень кровообігу, пов'язаних із тромбоутворенням, у 15–30% випадків призводить до активації тромбоцитів та виникнення реоклюзії [9–11]. Внутрішньовенне введення стрептокінази сприяє утворенню плазміну в руслі крові, який здатен, як і тромбін, розщеплювати в позаклітинному домені рецептора тромбоцитів PAR-1 такий самий зв'язок – Arg41-Ser42 [2]. Можна припустити, що це, ймовірно, є можливим механізмом активації тромбоцитів унаслідок дії стрептокінази на систему гемостазу. У зв'язку із вищезазначеним підвищення ефективності застосування препаратів, одержаних на основі стрептокінази, потребує глибшого вивчення її дії на компоненти системи гемостазу. Метою нашої роботи було дослідження параметрів ПАІ-І за впливу стрептокінази *in vitro* та *in vivo* на тромбоцити.

### Матеріали і методи

Для досліджень використовували плазму крові кроля ( $n = 5$ ), збагачену тромбоцитами. З цією метою кров після додавання лимоннокислого натрію (38 г/л) у співвідношенні

9 : 1 центрифугували 20 хв при 150 g і температурі 20 °С. Надосадову рідину, яка містила тромбоцити, відбирали і використовували в експериментах [12]. Вміст ПАІ-1 визначали методом ELISA, використовуючи поліклональні до нього антитіла вівці, які було одержано співробітниками відділу структури та функції білка [13]. Плазму крові, збагачену тромбоцитами, після додавання стрептокінази аналізували методами диск-електрофорезу [14] та вестерн-блотингу [15].

У дослідах *in vivo* на кролях ( $n = 7$ ) та свинях ( $n = 3$ ) вивчали вплив стрептокінази на концентрацію ПАІ-1 у кровотоці. Препарат білка вводили тваринам у дозі відповідно до схеми лікування людей при захворюванні на гострий інфаркт міокарда, враховуючи при цьому масу тварин: 100 та 750 тис. од. кролям та свиням відповідно. Кров брали пункцією з вушної вени з подальшим додаванням до неї лимоннокислого натрію (3,8%) у кінцевому співвідношенні 9 : 1. Дослідження здійснювали через 1 і 4 год та на 1-у, 3-ю і 7-у доби після введення стрептокінази (АТ «Белмедпрепарати», Білорусь).

### Результати та обговорення

У проведених нами попередніх дослідженнях *in vivo* виявлено значні зміни активності ПАІ-1 у плазмі крові ссавців після внутрішньовенного введення стрептокінази [4]. Для з'ясування можливих механізмів, які б пояснювали цей процес одержували плазму крові, збагачену тромбоцитами. Вплив стрептокінази на клітини вивчали *in vitro*. Методом імуноферментного аналізу виявлено підвищення вмісту інгібітора внаслідок дії стрептокінази у плазмі крові, збагаченій тромбоцитами. Зразки зі стрептокіназою та контрольні (без неї) інкубували протягом однієї години при 37 °С. Як показано на рис. 1, концентрація ПАІ-1 у плазмі крові, збагаченій тромбоцитами, в контролі становить 10 нг/мл. Після додавання до зразків стрептокінази спостерігається залежне від концентрації збільшення вмісту ПАІ-1. Так, 5 од. цього білка індукують підвищення концентрації інгібітора в 1,3 раза порівняно з контролем. Додавання стрептокінази в кількості 50 од. і подальша інкубація зразків за тих самих умов підвищує вивільнення ПАІ-1 до кінцевої концентрації 14 нг/мл. Доза у 200 од. зумовлює зростання вмісту ПАІ-1 у середовищі інкубації в 1,6 раза, досягаючи 16 нг/мл.

Методом вестерн-блотингу з використанням антитіл до ПАІ-1 встановлено, що після інкубації фракції плазми крові, збагаченої

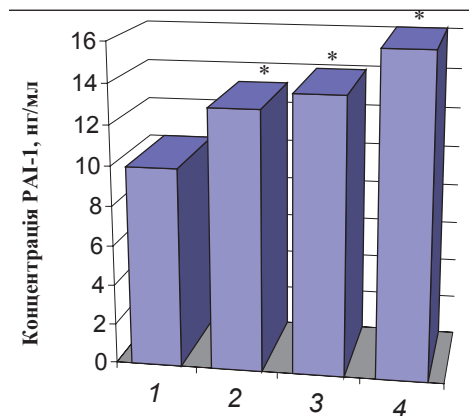


Рис. 1. Концентрація інгібітора тканинного активатора плазміногена (ПАІ-1) у плазмі крові кроля, збагаченої тромбоцитами: 1 – норма (до активації тромбоцитів стрептокіназою); 2–4 – після внесення 5, 50 та 200 од. стрептокінази відповідно. \* Різниця з контролем вірогідна,  $p < 0,05$ .

тромбоцитами, із стрептокіназою секретується ПАІ-1 із  $\alpha$ -гранул тромбоцитів як у вільній, так і в комплексній формі.

На рис. 2 вільній формі ПАІ-1 відповідає смуга з молекулярною масою 45–55 кДа. Внаслідок активації тромбоцитів стрептокіназою помітно зростає вивільнення із  $\alpha$ -гранул вільної форми ПАІ-1 (трек 3) порівняно з нормою (трек 2). Стрептокіназа зумовлює появу комплексів ПАІ-1 з молекулярною масою близько 70 і 100 кДа. Помітно збільшується вивільнення фрагмента ПАІ-1 з меншою молекулярною масою 25–15 кДа. Фрагментацію молекул ПАІ-1 можна пояснити активацією кислих гідролаз  $\alpha$ -гранул тромбоцитів за дії стрептокінази, що, у свою чергу, розщеплюють інгібітор до фрагментів, які ідентифіковано на блотограмі.

Методом вестерн-блотингу встановлено (рис. 2), що з  $\alpha$ -гранул тромбоцитів інгібітор вивільнюється як у вільній формі, так і в комплексі з певними білками. Молекулярна маса цих комплексів не дає змоги їх ідентифікувати, однак можна припустити, що смуги, розташовані в зоні 100 кДа, відповідають комплексу ПАІ-1 із тканинним активатором плазміногену або урокіназою.

Таким чином, проведені нами дослідження свідчать, що зміна концентрації ПАІ-1 *in vitro* під впливом стрептокінази зумовлюється активацією тромбоцитів унаслідок дії стрептокінази на систему гемостазу з наступним вивільненням інгібітора з їхніх  $\alpha$ -гранул. ПАІ-1 секретується як у комплексній, так і у віль-

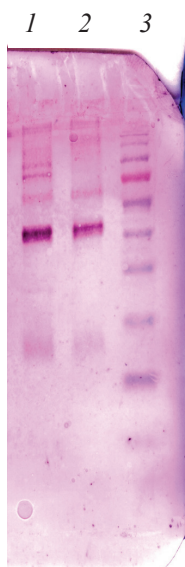


Рис. 2. Вестерн-блотинг плазми крові кроля, збагаченої тромбоцитами: 1 – після внесення 200 од./мл стрептокінази; 2 – до внесення стрептокінази; 3 – маркерна суміш (білки з молекулярною масою 180, 130, 100, 70, 55, 45, 35, 25, 15, 10 кДа).

ній неактивній формі. У подальших дослідках ми плануємо дослідити структуру виявлених комплексів та з'ясувати їхню роль у регуляції функціонування фібринолітичної системи.

З огляду на одержані результати, перед нами постало питання встановити, чи буде змінюватись концентрація ПАІ-1 у разі введення стрептокінази в русло крові тварин. На першому етапі досліджень *in vivo* ми вивчали вплив цього бактеріального білка на систему гемостазу кролів. Результати нашої ро-

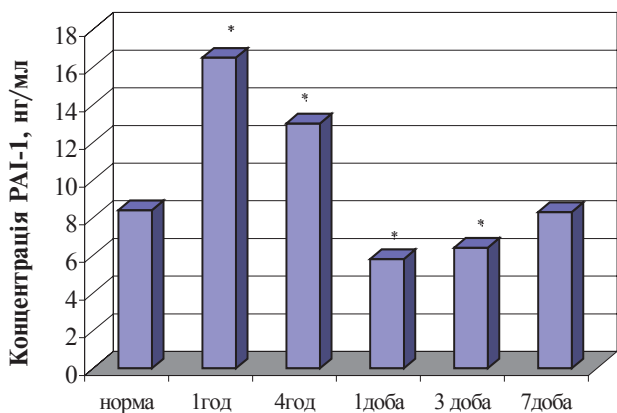


Рис. 3. Концентрація ПАІ-1 у плазмі крові кролів після введення стрептокінази *in vivo*. \* Дані з контролем вірогідні,  $p < 0,05$ .

боти показують, що загальна концентрація ПАІ-1 (можливо як у вільній, так і в комплексній формах) через 1 год після введення стрептокінази в русло крові зростає і досягає  $16,5 \pm 1,3$  нг/мл, тоді як до її введення становить лише  $8,4 \pm 2,3$  нг/мл (рис. 3). Далі концентрація ПАІ-1 протягом дослідження знижується і на першу та третю доби експерименту становить  $5,8 \pm 1,7$  нг/мл і  $6,4 \pm 1,3$  нг/мл відповідно, а на 7-у досягає  $8,3 \pm 1,9$  нг/мл. Одержані дані свідчать про підвищення вмісту ПАІ-1 у 1,9 раза після введення стрептокінази в русло крові, що узгоджується із проведеними нами раніше дослідженнями *in vitro*.

На наступному етапі експериментів *in vivo* ми вивчали вплив стрептокінази на концентрацію ПАІ-1 у кровотоку свиней (рис. 4). Цю модельну систему було обрано тому, що плазміноген свині не активується стрептокіназою і, отже, можна виключити в експериментах опосередкований вплив плазміну на тромбоцити [16]. Результати дослідів свідчать, що через 1 год після введення стрептокінази у кров активація плазміногену не спостерігається [4], в той час як загальний вміст ПАІ-1, значно підвищується, досягаючи через 1 год  $46,5 \pm 5,3$  нг/мл. До введення стрептокінази вміст ПАІ-1 становив  $28,7 \pm 2,3$  нг/мл. Через 4 год цей показник збільшувався до  $39,8 \pm 6,3$  нг/мл, а на 1-у добу – знижувався до 18 нг/мл. На 7-у добу рівень ПАІ-1 наближався до норми –  $21 \pm 3,5$  нг/мл.

Зважаючи на дані літератури та результати, одержані нами *in vitro*, можна припустити, що підвищення концентрації ПАІ-1 за дії стрептокінази пов'язано з активацією тромбоцитів і секрецією інгібітора з їхніх  $\alpha$ -гранул. Варто відзначити також, що вплив стрептокінази в такому випадку не опосередковується дією плазміну.

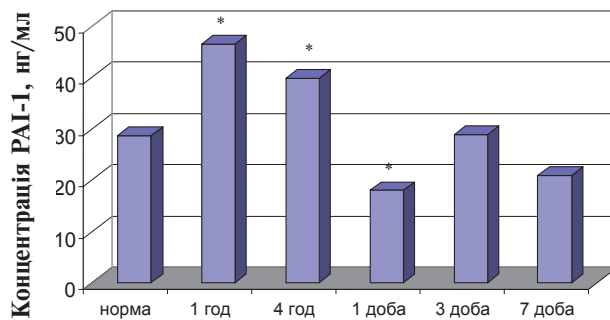


Рис. 4. Концентрація ПАІ-1 у плазмі крові свиней після введення стрептокінази *in vivo*. \* Дані з контролем вірогідні,  $p < 0,05$ .

Таким чином, у роботі встановлено, що введення стрептокінази у кровотік зумовлює підвищення вмісту ПАІ-1 у плазмі крові ссавців. Проведення серії експериментів *in vitro* виявило, що збільшення рівня цього інгібітора пов'язано з активацією тромбоцитів унаслідок дії стрептокінази на систему гемостазу. Це, у свою чергу, спричинює вивільнення інгібітора із тромбоцитарних  $\alpha$ -гранул. Застосовуючи метод вестерн-блотингу, ми показали, що дія стрептокінази *in vitro* індукуює секрецію тромбоцитами ПАІ-1 як у вільній, так і в комплексній формі. Можна припустити, що значне підвищення його вмісту на фоні активації тромбоцитів після введення стрептокінази у кровотік може призводити до виникнення ризику нових тромботичних ускладнень.

Вивільнення ПАІ-1 із тромбоцитів під впливом стрептокінази за своєю природою не є фізіологічним процесом, оскільки індукується екзогенним білком, який потрапляє в організм тільки при патологічному процесі (стрептококовій інфекції чи тромболітичній терапії). Зважаючи на це, можна припустити, що такий нефізіологічний процес надалі може призводити до порушення регуляторних механізмів функціонування системи гемостазу в цілому.

#### **ВЛИЯНИЕ СТРЕПТОКИНАЗЫ НА СОДЕРЖАНИЕ ИНГИБИТОРА АКТИВАТОРОВ ПЛАЗМИНОГЕНА I ТИПА**

*Н. К. Бурлова-Васильева,  
Е. М. Краснобрижая, А. Н. Савчук,  
Г. Л. Волков*

Институт биохимии им. А. В. Палладина  
НАН Украины, Киев;  
e-mail: jane\_kras@mail.ru

В работе на модельных системах *in vitro* и *in vivo* исследовали влияние стрептокиназы на параметры ингибитора активатора плазминогена I типа (ПАИ-1). Определили, что введение стрептокиназы в кровотоки вызывает увеличение содержания исследуемого ингибитора в плазме крови млекопитающих. Проведенные *in vitro* эксперименты показали, что увеличение концентрации этого ингибитора при действии стрептокиназы происходит вследствие активации тромбоцитов с последующим высвобождением его из их  $\alpha$ -гранул. Установлено, что ПАИ-1 секретируется тромбоцитами как в свободной, так и в комплексной форме.

Полученные нами данные позволяют предположить, что значительное повышение содержания ПАИ-1 на фоне активации тромбоцитов вследствие влияния стрептокиназы может привести к возникновению риска новых тромботических осложнений.

Ключевые слова: система гемостазу, тромбоциты, стрептокиназа, ингибитор активаторов плазминогена I типа.

#### **STREPTOKINASE INFLUENCE ON THE CONTENT OF PLASMINOGEN ACTIVATOR INHIBITOR OF TYPE I**

*N. K. Burlova-Vasyl'eva,  
Ye. M. Krasnobryzha, O. M. Savchuk,  
G. L. Volkov*

Palladin Institute of Biochemistry, National  
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;  
e-mail: jane\_kras@mail.ru

#### **S u m m a r y**

The influence of streptokinase on plasminogen activators inhibitor of type I (PAI-1) was investigated with the use of model systems *in vitro* and *in vivo*.

It was defined, that intravenous streptokinase injection causes an increase in PAI-1 content in mammals' blood plasma. Experiments *in vitro* have shown that the increase in PAI-1 concentration takes place as a result of streptokinase action. It occurs due to platelets activation with subsequent PAI-1 secretion from their  $\alpha$ -granules. It is established, that PAI-1 is secreted by platelets both in free and in complex forms.

The data obtained in the work, allow to assume, that the simultaneous substantial increase in PAI-1 content with platelets activation, as a result of streptokinase influence, can lead to new thrombotic complications risk.

Key words: hemostasis system, platelets, streptokinase, plasminogen activators inhibitor type I (PAI-1).

1. Добровольский А. Б., Тутаева Е. В. // Биохимия. — 2002. — 67. — С. 116–127.
2. Зубаилов Д. М. Молекулярные основы свертывания крови и тромбообразования. — Казань: ФЭН, 2000. — 364 с.
3. Lijnen H. R. // Int. J. Clin. Lab. Res. — 1996. — 26. — P. 1–6.
4. Краснобрижа Е. М., Савчук О. М., Волков Г. Л. // Укр. біохім. журн. — 2004. — 76, № 3. — С. 56–61.

5. Ben N. A., Wistedt A., Ringdahl U., Sjobring U. // Eur. J Biochem. – 1994. – **222**. – P. 267–276.
6. Дикун Я. В. // Укр. мед. часопис. – 1998. – **5**, № 7. – P. 49–53.
7. Collen D. C., Gold H. K. // Tromb. Res. – 1990. – **10**. – Suppl. X. – P. 105–131.
8. Lottenberg R., DesJardin L. E., Wang H., Boyle M. D. // J. Infect. Dis. – 1992. – **166**. – P. 436–440.
9. Chesebro J. H., Knatterud G., Roberts R. // Circulation. – 1987. – **76**. – P. 142–151.
10. Ohlin A. K., Morser J., Ohlin H. // Thromb. Res. – 1996. – **82**. – P. 313–322.
11. Lip G. Y., Lydakis C., Nuttall S. L. // J. Intern. Med. – 2000. – **248**. – P. 316–318.
12. Момот А. П. // Лаб. діагностика. – 2004. – **2**. – С. 52–70.
13. *Selected methods for antibody and nucleic acid probes*. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993. – 680 p.
14. Weber K., Osborn M. // J. Biol.Chem. – 1969. – **244**, N 16. – P. 4406–4412.
15. Harlow Ed., Lane D. *Antibodies* // Cold Spring Harbor Laboratory. – New York. – 1988. – P. 726.
16. Marcum J. A., Kline D. L. // Comp. Biochem. Physiol. – 1983. – **75**, N 3. – P. 389–394.

Отримано 16.05.2006