

УДК 577.151.083:615.917

ФІБРИНО(ГЕНО)ЛІТИЧНИЙ ЕНЗИМ З ОТРУТИ ЩИТОМОРДНИКА ДАЛЕКОСХІДНОГО (*Agkistrodon blomhoffii ussuriensis*): ОТРИМАННЯ, ЧАСТКОВА ХАРАКТЕРИСТИКА ТА ВПЛИВ НА АГРЕГАЦІЮ ТРОМБОЦИТІВ

В. Л. Карбовський¹**Т. М. Платонова**²**О. В. Горницька**²**Г. Л. Волков**²¹ Київський національний університет імені Тараса Шевченка² Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ*E-mail: VKarbovskyy@gmail.com*

Описано метод отримання фібрино(гено)літичного ензиму з отрути *Agkistrodon blomhoffii ussuriensis* у три хроматографічні стадії. Одержаний ензим (блomuлізин) — типовий представник одноланцюгових металопротеїназ отрути змії з молекулярною масою 30 кДа, який високоефективно гідролізує А α - та В β -ланцюги фібриногену. γ -Ланцюг фібриногену при цьому залишається інтактним. Показано, що в різних модельних системах *in vitro* блomuлізин не впливає на агрегацію тромбоцитів, індуковану колагеном, але достовірно інгібує їх АДФ-та адреналінстимульовану агрегацію.

Ключові слова: фібрино(гено)літичний ензим, отрута змії, щитомордник, фібриноген, тромбоцити.

Отрута змії є складним комплексом біологічно активних глікопротеїнів та пептидів, значна частина яких впливає на ключові ланки системи гемостазу [1]. Серед великої кількості ензимів отрути особливий науковий і практичний інтерес становлять, зокрема, фібриногенолітичні ензими (фібриногенази), отримані з отрути різних видів змії. Такі протеїнази високоспецифічно гідролізують С-кінцеві ділянки молекули фібриногену, відщеплюючи від А α -, В β -ланцюгів останнього фрагменти різної величини. У більшості випадків у результаті такого впливу формуються 250 кДа X-фрагменти фібриногену, які не полімеризуються під дією тромбіну [2]. Антикоагуляційний ефект таких протеїназ підсилюється й тим, що значна частина цих ензимів впливає також на тромбоцитарну ланку системи гемостазу, інгібуючи агрегацію тромбоцитів [3–5]. Окрім того, деякі фібриногенолітичні ензими отрути змії, 80% з яких за своєю природою належать до класу металопротеїназ (інші 20% — серинові протеїнази), не чутливі до присутності фізіологічних інгібіторів серинових протеїназ — серпінів у плазмі крові [6].

Усе вищезазначене відкриває широкі можливості для використання таких ензимів не лише під час вивчення процесів полімеризації фібриногену/фібрину, а й для профілактики та лікування тромботичних ускладнень. Вдалим прикладом практичного використання фібрино(гено)літичних ензимів у клінічній практиці є Alfimeprase — рекомбінантна α -специфічна фібриногеназа, створена на основі металопротеїнази з отрути мокасинового щитомордника (*Agkistrodon contortrix contortrix*). Цей препарат, який успішно пройшов 2-гу фазу доклінічних досліджень, у разі інтраартеріального введення нормалізує кровотік у 40% пацієнтів з різними тромботичними ускладненнями [7–9].

Цільна отрута щитомордника далекосхідного (*Agkistrodon blomhoffii ussuriensis*), як типового представника родини *Crotalidae*, має сильний фібрино(гено)літичний потенціал, що свідчить про присутність у цій отруті фібриногеназ, які можна було б використовувати для профілактики різноманітних серцево-судинних патологій.

Метою даної роботи було розроблення ефективного методу отримання фібриногенолітичного ензиму з отрути щитомордника

далекосхідного, його часткова характеристика та дослідження впливу на тромбоцитарну ланку системи гемостазу.

Матеріали і методи

Кристалічну отруту щитомордника далекосхідного (*Agkistrodon blomhoffii ussuriensis*) отримували із серпентарію Трипільського біохімічного заводу.

Плазму крові одержували з крові донорів, які протягом кількох днів до проведення дослідження не приймали нестероїдних протизапальних препаратів, кофеїну та інших засобів, що порушують процеси агрегації тромбоцитів. Кров набирали з ліктьової вени натще в пластикову пробірку з 3,8% -м розчином лимоннокислого натрію у співвідношенні 9:1.

Плазму крові, збагачену тромбоцитами (ПЗТ), отримували центрифугуванням стабілізованої крові при 300 g упродовж 5 хв при 18–21 °С.

Концентрацію протеїнів у розчині визначали за методом Бредфорд [10].

Диск-електрофорез протеїнів у ПААГ з додаванням SDS проводили за методикою Laemli [11].

Фібриногенолітичну активність ензимів, виділених з отрути щитомордника далекосхідного, визначали якісно та кількісно. Якісну оцінку фібриногенолітичної активності ензимів визначали 30-хвилинною інкубацією останніх (100–200 мкг) з 200 мкг фібриногену бика та подальшим додаванням 2 NIH тромбіну. Активність оцінювали якісно за наявністю чи відсутністю фібринового згустка. Кількісне визначення активності фібрино(гено)літичного ензиму проводили шляхом його інкубації з фібриногеном (2 мг/мл) протягом 20 хв при кімнатній температурі в 50 mM Tris-HCl-буфері, pH 7,4, що містить 0,13 M NaCl. Співвідношення фібриноген : ензим = 250 : 1. Через 20 хв інкубації додавали 2 NIH тромбіну, що є значним надлишком відносно кількості фібриногену в пробі. Фібриновий згусток, що утворився протягом декількох секунд, видаляли центрифугуванням. Абсорбцію надосадової рідини вимірювали на спектрофотометрі СФ-26 за довжини хвилі 280 нм. За одиницю активності приймали кількість частково розщепленого за 1 хв фібриногену на 1 мг ензиму, враховуючи, що E_{280} 1%-го розчину фібриногену становить 15,067.

З метою вивчення дії на фібрино(гено)літичний ензим інгібіторів протеїназ в описаній модельній системі для кількісного ви-

значення активності фібриногенази до розчину ензиму додавали інгібітори в кінцевій концентрації 20 mM.

Фібринолітичну активність фібрино(гено)літичного ензиму оцінювали якісно за розщепленням попередньо утвореного фібринового згустка.

Специфічність дії фібрино(гено)літичного ензиму на фібриноген досліджували, аналізуючи продукти руйнування фібриногену після інкубації його (2 мг/мл) з ензимом у 0,05 M трис-HCl-буфері, pH 7,4, що містить 0,13 M NaCl, при кімнатній температурі. Аліквоти відбирали через 15, 60 хв та 2 год, реакцію зупиняли додаючи 0,2% SDS.

Агрегацію тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові досліджували впродовж перших трьох годин після забору крові на агрегометрі AP2110 фірми «Солар», Білорусь. Як індуктори агрегації використовували АДФ 2,5 мкМ, адреналін 5 мкМ та колаген 0,2% («Технологія-Стандарт», Росія) у кінцевих концентраціях згідно з рекомендаціями фірми-виробника. Спочатку проводили скринінгову оцінку агрегації тромбоцитів донорів і в разі виявлення гіпоагрегації плазму крові для подальших досліджень не використовували.

Для дослідження впливу фібрино(гено)літичного ензиму на індуковану агрегацію тромбоцитів було створено таку модельну систему:

Контроль: до 400 мкл ПЗТ додавали 50 мкл 0,15 M розчину NaCl, інкубували 5 хв при 37 °С. Потім вносили 50 мкл індуктора (АДФ або адреналін) і впродовж 10 хв реєстрували процес агрегації тромбоцитів.

Модель з преінкубацією: до 400 мкл ПЗТ додавали 50 мкл досліджуваного протеїну, ретельно перемішували та інкубували протягом 20 хв при 37 °С. Потім вносили 50 мкл індуктора і впродовж 10 хв реєстрували процес агрегації тромбоцитів.

Отримані результати обробляли статистично в пакетах програм ORIGIN 7.0 та MICROSOFT EXCEL.

Результати та обговорення

Однією з основних вимог при розробленні методів отримання біологічно активних продуктів з будь-якого природного джерела (плазма крові, молоко, зміїна отрута) є послідовність процесу. У такому випадку протеїнова фракція, одержана на певному етапі хроматографічного очищення як додаткова, на наступному етапі стає основною. Такий підхід дозволяє отримувати з вихідної сиро-

вини більшу кількість ензимних препаратів за набагато нижчих затрат виробництва. У раніше розробленому нами методі одержання тромбіноподібного ензиму з отрути *Agkistrodon blomhoffii ussuriensis* високий фібрино(гено)літичний потенціал мала фракція протеїнів, які не зв'язалися з афінним сорбентом Blue Sepharose CL-6B [12]. Отриману фракцію після розведення 50 мМ Tris-HCl-буфером з рН 8,0 було розфракціоновано ступінчастим градієнтом NaCl на слабкому аніонообміннику DEAE — Sepharose FF. Сильну фібриногенолітичну активність виявляв матеріал, який елюювався з аніонообмінника за іонної сили, що відповідала 0,2 М NaCl (рис. 1).

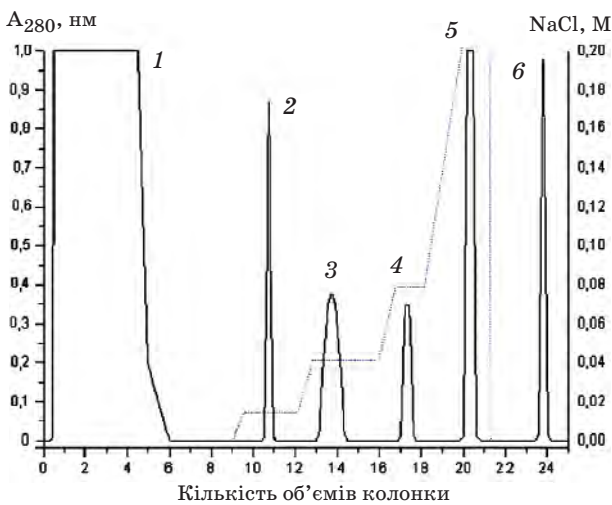


Рис. 1. Хроматограма, отримана під час фракціонування не зв'язаного з Blue Sepharose CL-6B матеріалу на DEAE-Sepharose FF:

- 1 — протеїновий матеріал, що не зв'язався з носієм;
- 2 — фракція інгібітора агрегації тромбоцитів;
- 3 — фракція фосфоліпази А2;
- 4 — високомолекулярні домішки;
- 5 — фракція фібринолітичного ензиму;
- 6 — неспецифічно зв'язані домішки

Електрофоретичний аналіз відповідної фракції показав, що основними в ній є два протеїни з молекулярними масами 30 та 40 кДа (рис. 3.; трек 3). Наступним етапом очищення фібрино(гено)літичного ензиму було обрано метод гідрофобної хроматографії. Вибір цього методу зумовлений тим, що сорбція протеїнового матеріалу в такому разі проводиться за високої концентрації солі, тому потреби у зміні буфера при нанесенні зразка нема. Щоб забезпечити зв'язування, потрібно лише додати достатню кількість солі.

Гідрофобну хроматографію протеїнової фракції, яка містила фібрино(гено)літичний ензим, проводили на Phenyl Sepharose CL-

6B. Зв'язування протеїнового матеріалу фракції із сорбентом здійснювали в 50 мМ Tris-HCl-буфері, рН 8,0, що містив 1,8 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ та 0,2 М NaCl. Усі протеїни даної фракції в наведених умовах повністю сорбувалися на зв'язаних з носієм гідрофобних групах. Елюцію матеріалу, що зв'язався, проводили ступінчастим градієнтом у тому самому буфері, знижуючи концентрацію солей. У результаті розділення було отримано три протеїнові фракції (рис. 2). Аналіз одержаних фракцій на здатність гідролізувати фібриноген показав, що така активність притаманна фракції, яка елюювалась із сорбенту за іонної сили, що відповідала 0,9 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Електрофорез відповідного матеріалу в ПААГ виявив присутність одноланцюгового протеїну з молекулярною масою 30 кДа, який у подальшому було названо блумулізином. Чистота отриманого ензиму становила 99% (рис. 3; трек 1). Вихід протеїну становив 10 мг з 1 г отрути. Питома активність одержаного ензиму дорівнювала 20 мкМ фібриногену/хв·мг протеїну й ефективно пригнічувалася ЕДТА, що дозволило нам віднести отриманий фібрино(гено)літичний ензим до групи металопротеїназ. Блумулізин виявляв також фібринолітичну активність і не втрачав її під час ліофілізації і подальшого зберігання при -20°C протягом 6 міс.

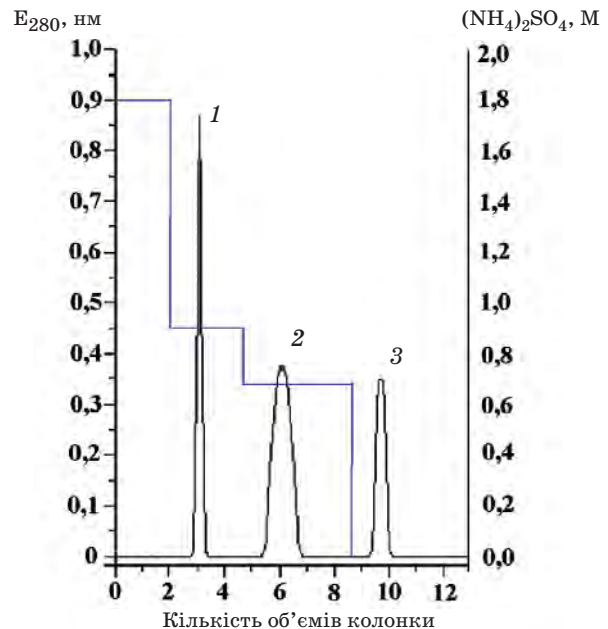


Рис. 2. Хроматограма, отримана під час фракціонування фракції фібрино(гено)літичного ензиму на Phenyl Sepharose CL-6B:

- 1 — фракція фібрино(гено)літичного ензиму;
- 2 — фракція активатора протеїну;
- 3 — неспецифічно зв'язані домішки

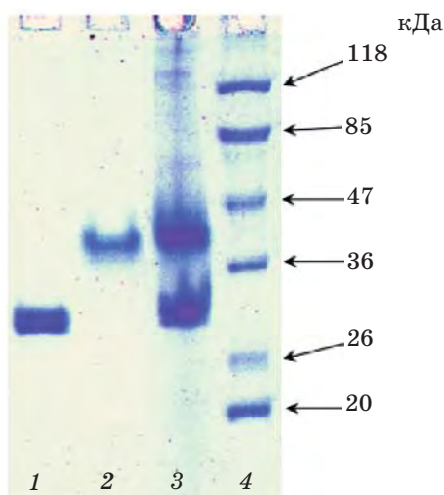


Рис. 3. Електрофореграма протеїнових фракцій, отриманих з *Phenyl Sepharose CL-6B*:

- 1 — фібрино(гено)літичний ензим;
- 2 — активатор протеїну С;
- 3 — вихідна протеїнова фракція отримана з *DEAE-Sephacel FF*;
- 4 — маркери молекулярної маси

Визначаючи специфічність фібрино(гено)літичного ензиму методом електрофоретичного аналізу продуктів гідролізу фібриногену, встановили, що під дією блумулізину в початковий період реакції руйнується А α -ланцюг фібриногену. За більш тривалої інкубації ензим також руйнує В β -ланцюг, залишаючи інтактним γ -ланцюг фібриногену (рис. 4).

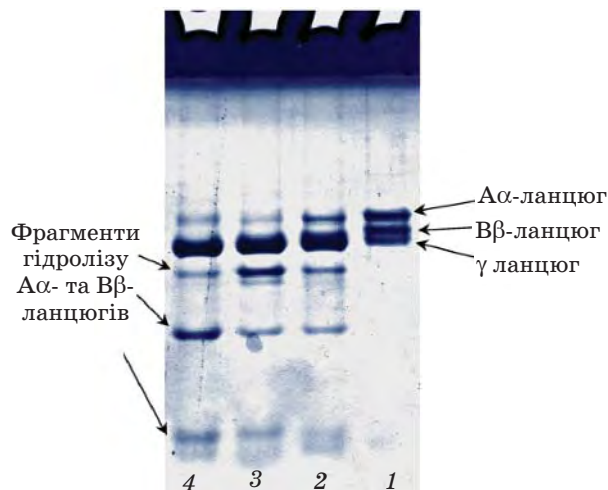


Рис. 4. Електрофореграма зразків фібриногену, інкубованих з блумулізином:

- 1 — нативний фібриноген;
- 2, 3, 4 — продукти, утворені під час інкубації фібриногену з блумулізином впродовж 15, 60 хв та 2 год відповідно

Дослідження впливу отриманого ензиму на тромбоцитарну ланку системи гемостазу показало, що блумулізин у кінцевій концентрації 250 нМ після 20 хв преінкубації з ПЗТ спричинював інгібування як первинної, так і вторинної агрегації тромбоцитів, індукованої АДФ та адреналіном, достовірно змінюючи всі параметри агрегаційного процесу (ступінь, швидкість та час агрегації) і жодним чином не впливав на аналогічний процес у разі використання як індуктора 0,2%-го розчину колагену (рис. 5, табл. 1). Такий ефект фібрино(гено)літичного ензиму передусім опосередкований впливом останнього на фібриноген, який, як відомо, відіграє ключову роль в АДФ- та адреналініндукованій тромбоцитарній агрегації. Розщеплюючи молекули фібриногену, блумулізин унеможливорює утворення тромбоцитарних агрегатів через формування фібриногенових містків між окремими тромбоцитами. Відсутність впливу фібрино(гено)літичного ензиму на агрегацію тромбоцитів у разі використання колагену як індуктора пояснюється тим, що в цьому процесі не бере участі фібриноген. Тромбоцити в даному випадку агрегують між собою за рахунок формування міжтромбоцитарних колагенових містків, опосередкованих $\alpha_2\beta_1$ -інтегриновим комплексом [13, 14].

Таким чином, одержаний з отрути щитоморника далекосхідного фібрино(гено)літичний ензим є типовим представником одноланцюгових металопротеїназ з молекулярною масою 30 кДа, який вискоєфективно гідролізує А α - та В β -ланцюги фібриногену та різноспрямовано впливає на індуковану агрегацію тромбоцитів. Отриманий ензим може бути задіяний у процесі розроблення нових препаратів для діагностики та профілактики патологічних станів системи гемостазу.

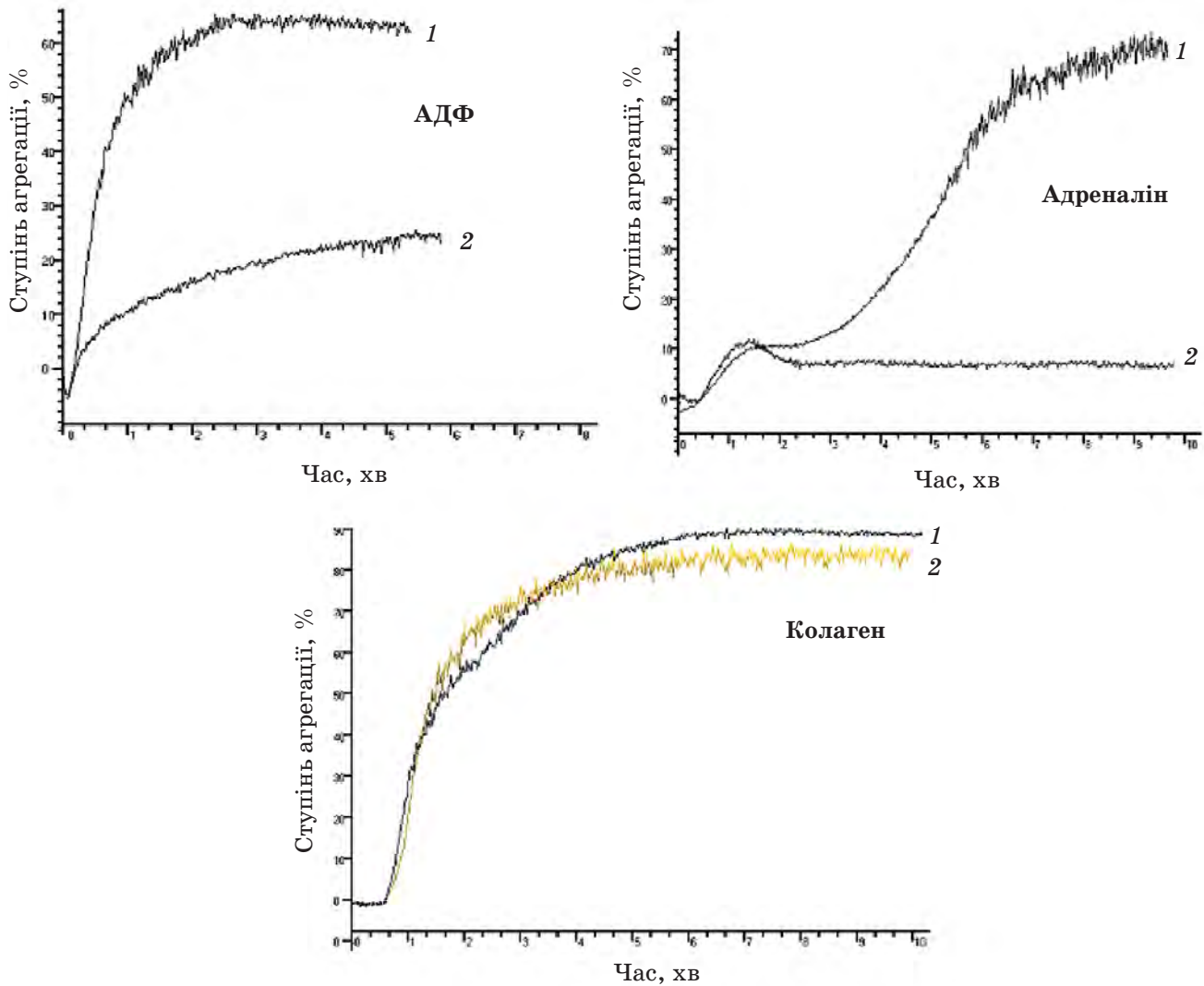


Рис. 5. Агрегаційні криві, що відображають вплив 250 нМ фібрино(гено)літичного ензиму на АДФ-, адреналін- та колагеніндуковану агрегацію тромбоцитів:

1 — агрегація тромбоцитів у нормі (контроль);
 2 — агрегація тромбоцитів після 20 хв преінкубації з фібрино(гено)літичним ензимом

Таблиця 1. Параметри процесу агрегації тромбоцитів у присутності 250 нМ блумулізину

Параметри агрегаційної кривої	Індуктор — 2,5 мкМ АДФ (n = 15)		Індуктор — 5 мкМ адреналін (n = 10)		Індуктор — 0,2% колаген (n = 5)	
	Контроль	Дослід	Контроль	Дослід	Контроль	Дослід
Ступінь агрегації, %	70,0 ± 4,56	22,6 ± 2,569*	64,0 ± 9,7	11,9 ± 3,23*	82,9 ± 4,53	77,1 ± 7,86
Час агрегації, с	407,3 ± 11,41	331,0 ± 22,58**	509,8 ± 51,5	279,0 ± 23,01**	388,3 ± 18,12	399,0 ± 47,5
Швидкість агрегації, % за хв	53,5 ± 4,34	22,4 ± 3,27*	10,6 ± 1,01	5,1 ± 1,86***	21,2 ± 3,75	19,6 ± 4,12
Характер кривої	Однофазна незворотна	Зворотна з дезагрегацією	Двофазна незворотна	Зворотна з дезагрегацією	Однофазна незворотна	Однофазна незворотна

Примітка. * — $p < 0,001$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,05$ щодо контролю.

ЛИТЕРАТУРА

1. Marsh N. A brief history of snake venoms affecting hemostasis // *Toxin Rev.* — 2006. — V. 25. — P. 201–216.
2. Swenson S., Markland F. S. Jr. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes // *Toxicon.* — 2005. — V. 45. — P. 1021–1039.
3. Bello C. A., Hermogenes A. L., Magalhaes A. Isolation and biochemical characterization of a fibrinolytic proteinase from *Bothrops leucurus* (white-tailed jararaca) snake venom // *Biochimie.* — 2005. — V. 88. — P. 189–200.
4. Siigur J., Samel M., Tonismagi K. Biochemical characterization of Lebetase, a direct-acting fibrinolytic enzyme from *Vipera lebetina* snake venom // *Thromb. Res.* — 1998. — V. 90. — P. 39–49.
5. Wang Q., Chen J., Liang X. et al. Hemorrhagic activity and mechanism of FII_a a fibrinolytic enzyme from *Agkistrodon acutus* venom // *Acta. Pharmacol. Sin.* — 2004. — V. 25, N 4. — P. 514–521.
6. Markland F. S. Jr. Snake Venom Fibrinogenolytic and Fibrinolytic Enzymes: An Updated Inventory // *Thromb. Haemost.* — 1998. — V. 79. — P. 668–674.
7. Swenson S., Toombs C. F., Pena L. et al. α -Fibrinogenases // *Cur. Drug Targ. — Cardiovasc. Haematol. Disord.* — 2004. — V. 4. — P. 417–435.
8. Toombs C. F., Deitcher S. R. Nonclinical and clinical characterization of a novel acting thrombolytic: Alifimeprase // *Toxin Rev.* — 2006. — V. 25. — P. 375–388.
9. Swenson S. and Markland F. S. Fibrinolase // *Ibid.* — 2006. — V. 25. — P. 347–374.
10. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* — 1976. — V. 78, N 2. — P. 248–254.
11. Laemli K. U. Cleavage of structure proteins during assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* — 1970. — V. 227. — P. 680–685.
12. International patent №: WO/2008/020739. Method for purification of α -specific thrombin like enzyme from *Agkistrodon blomhoffii ussuriensis* snake venom / Volkov G. L., Savchuk A. N., Karbovskyy V. L. — from 21 February 2008.
13. Eble J. A. Collagen-binding integrins as pharmaceutical targets // *Curr. Pharmaceut. Design.* — 2005. — V. 11. — P. 867–880.
14. Farndale R. W. Collagen-induced platelet activation // *Blood Cells, Mol. Dis.* — 2006. — V. 36. — P. 162–165.

ФИБРИНО(ГЕНО)ЛИТИЧЕСКИЙ ЭНЗИМ ИЗ ЯДА ЩИТОМОРДНИКА ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО (*Agkistrodon blomhoffii ussuriensis*): ПОЛУЧЕНИЕ, ЧАСТИЧНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ВЛИЯНИЕ НА АГРЕГАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ

V. L. Karbovskiy¹, T. N. Platonova²,
O. V. Gornitskaya², G. L. Volkov²

¹ Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко

² Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев

E-mail: VKarbovskyy@gmail.com

Описан метод получения фибрино(гено)литического энзима из яда *Agkistrodon blomhoffii ussuriensis* в три хроматографические стадии. Полученный энзим (блomuлизин) — типичный представитель одноцепочечных металлопротеиназ с молекулярной массой 30 кДа, который высокоэффективно расщепляет А α - и В β -цепи фибриногена. γ -Цепь фибриногена при этом остается интактной. Показано, что в различных модельных системах *in vitro* блomuлизин не влияет на агрегацию тромбоцитов, индуцированную коллагеном, но достоверно ингибирует их АДФ- и адреналинстимулирующую агрегацию.

Ключевые слова: фибрино(гено)литический энзим, змеиный яд, щитомордник, фибриноген, тромбоциты.

FIBRINO(GENO)LYTIC ENZYME FROM *Agkistrodon blomhoffii ussuriensis* SNAKE VENOM: ISOLATION, PARTIAL CHARACTERIZATION AND INFLUENCE ON PLATELETS AGGREGATION

V. L. Karbovskiy¹, T. M. Platonova²,
O. V. Gornitska², G. L. Volkov²

¹ National Taras Shevchenko University, Kyiv

² Palladin Institute of Biochemistry of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: VKarbovskyy@gmail.com

Fibrino(geno)lytic enzyme — «Blomulyse» from *Agkistrodon blomhoffii ussuriensis* venom has been isolated in three chromatography steps. The purified enzyme is a typical single-chain metalloproteinase with molecular weight of approximately 30 kDa. Obtained enzyme hydrolyzed with high-efficiency the A α -chain of fibrinogen followed by the B β -chain and showed no effect on the γ -chain.

Using different model systems *in vitro* we indicated that fibrinolyse has no effect on the platelets aggregation stimulated by collagen, but on the other hand it inhibited ADP- and adrenalin-induced platelet aggregation.

Key words: fibrino(geno)lytic enzyme, snake venom, *Agkistrodon*, fibrinogen, platelets.