

Роткина А.С.¹, Пронина И.В.¹, Лазарев В.Н.², Ахаев Д.Н.³, Баскова И.П.³

Дестабилаза-лизоцим-2, оригинальный рекомбинантный тромболитический препарат медицинской пиявки, ингибирует агрегацию тромбоцитов лошади

¹ — ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

² — ФГБУ «Научно-клинический центр физико-химической медицины» ФМБА России, 119435, Москва, Малая Пироговская, д. 1а

³ — ФГБНУ «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», 119991, Биологический факультет, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

Полученные результаты свидетельствуют о том, что оригинальный рекомбинантный тромболитический препарат Дестабилаза-Лизоцим-2 медицинской пиявки, gene *ds2*(mlDL-Ds2, более чем на 40% ингибирует АДФ-стимулированную PRP агрегацию тромбоцитов лошади. Отмечено ингибирование этим препаратом АДФ стимулированной агрегации отмытых тромбоцитов. **Цель исследования** — оценка способности нового оригинального рекомбинантного тромболитического препарата Дестабилаза-Лизоцим-2 медицинской пиявки ингибировать агрегацию тромбоцитов. **Методика.** Выделение рекомбинантного белка Дестабилазы-Лизоцима-2, ген которого (*ds2* (mlDL-Ds2)) клонировали в клетках *E.coli*, проводили в денатурирующих условиях с использованием металло-хелатной хроматографии с последующей ренатурацией полипептида путем быстрого разбавления в точном соответствии с методикой, описанной в работе Курдюмова А.С. и соавторов (Биоорган. химия (2016) Т.42, С.50—61). Кровь брали из яремной вены лошадей. Исследовали богатую тромбоцитами плазму (Platelet Rich Plasma, PRP) и суспензию отмытых тромбоцитов (Washed Platelets, WP) 18 лошадей. Функциональное состояние тромбоцитов оценивали по их агрегации в PRP и в суспензии WP с помощью двухканальных агрегометров Chrono-Log-700 и Chrono-Log 560, США. В качестве индукторов агрегации использовали АДФ, коллаген III типа и тромбин крови человека. **Результаты.** Впервые продемонстрирована способность вновь синтезированного (см. Курдюмов А.С. и др. (2016) Биоорган. химия, Т.42, С.50—61) тромболитического рекомбинантного фермента Дестабилазы-Лизоцима-2 ингибировать более чем на 40% АДФ-стимулированную PRP агрегацию тромбоцитов и АДФ-стимулированную агрегацию отмытых тромбоцитов крови лошадей. **Заключение.** Способность Дестабилазы-Лизоцима-2 ингибировать агрегацию тромбоцитов расширяет биологические свойства рекомбинантного тромболитического фермента, доклинические испытания которого завершились в конце 2015 г.

Ключевые слова: Дестабилаза-Лизоцим; агрегация тромбоцитов

Для корреспонденции: Баскова Изольда Парфирьевна, доктор биол. наук, проф., вед. науч. сотр. каф. физиологии человека и животных биологического факультета МГУ, e-mail: salival1@yandex.ru

Для цитирования: Роткина А.С., Пронина И.В., Лазарев В.Н., Ахаев Д.Н., Баскова И.П. Дестабилаза-лизоцим-2, оригинальный рекомбинантный тромболитический препарат медицинской пиявки ингибирует агрегацию тромбоцитов лошади. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60 (3): 47—51.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарность. Выражаем благодарность академику Кубатиеву А.А. за предоставленную возможность проведения настоящей работы на базе НИИ общей патологии и патофизиологии.

Поступила 24.08.2015

Rotkina A.S.¹, Pronina I.V.¹, Lazarev V.N.², Akhaev D.N.³, Baskova I.P.³

Destabilase-lysozyme-2 — original recombinant thrombolytic preparation of medicinal leech inhibits horse platelets aggregation

¹ — Federal state budgetary scientific institute «Scientific institute of General Pathology and Pathophysiology», 125315, Moscow, ul. Baltiiskaya, 8

² — FGBU Russia Scientific — Clinical Centrum of Physical-Chemical Medicine FMBA 119435, Moscow, Malaya Pirogovskaya ul., 1a

³ — FGBNU M.V. Lomonosov Moscow state university, 119991, Biological Faculty, Moscow, Leninskie gori, 1, building 12

The purpose. Identifying the capacity of the medicinal leech novel original recombinant thrombolytic preparation Destabilase-Lysozyme-2 to inhibit the blood platelet aggregation. **Methods.** Gene of destabilase-lysozyme. *ds2* (mlDL-Ds2), was cloned in *E.coli* cells. Recombinant protein was isolated in denaturing conditions using metal-chelate

chromatography followed by denaturation of the polypeptide by rapid dilution in exact accordance with the procedure described by Kurdyumov A.S. et al. (2016, Russian Journal of Bioorganic Chemistry, v.42, s. 42—52). Blood was collected from the jugular vein of 18 horses. The functional status of platelets in the presence of different destabilase-lysozyme concentrations were evaluated for their aggregation in Platelet Rich Plasma (PRP) and in Washed Platelet suspension (WP) using aggregometers Chrono-Log-700 and Chrono-Log-560, USA560, CIIA. As used aggregation inducers of ADP, collagen type III and human thrombin. **Results.** First demonstrated the ability of newly synthesized (Kurdyumov A.S. et al. 2016, Russian Journal of Bioorganic Chemistry, v42, s. 42—52) thrombolytic recombinant enzyme destabilase-lysozyme to inhibit more than 40% of ADP-stimulated PRP aggregation and ADP-stimulated aggregation of horse blood washed platelets. **Conclusion.** The ability of destabilase-lysozyme -2 to inhibit platelets aggregation extends biological properties of recombinant thrombolytic enzyme, pre-clinical trials which resulted in the end of 2015.

Keywords: Destabilase-lysozyme, platelets aggregation

For citation: Rotkina A.S., Pronina I.V., Lazarev V.N., Akhaev D.N., Baskova I.P. Destabilase-lysozyme-2 — original recombinant thrombolytic preparation of medicinal leech inhibits horse platelets aggregation. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (3): 47—51. (in Russ).

For correspondence: *Isolda P. Baskova*, Doctor of Biological Sciences, Professor, Leading Researcher. Biological Faculty of M.V.Lomonosov Moscow state university, Leninskie Gory, 1, Building 12, Moscow 119991, Russian Federation, e-mail: Saliva1@yandex.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

Acknowledgments. We express our deep gratitude to Academician A.A. Kubatiev for the opportunity to conduct this work on the basis of Institute of General Pathology and Pathophysiology, and for his attention to this work.

Received 24.08.2015

Введение

Дестабилаза-Лизоцим-2 медицинской пиявки (mlDL-Ds2) — изопептидаза, единственный известный тромболитический препарат, действие которого направлено на разрушение ϵ -(γ -Glu)-Lys изопептидных связей в стабилизированном фактором XIIIa фибрине, составляющем основу тромба [1]. Фибринолитический механизм действия нативного фермента в составе секрета слюнных клеток медицинской пиявки, впервые был описан в 1985 г. [2]. Позднее была продемонстрирована способность рекомбинантной изопептидазы проявлять лизоцимную активность [3] и ингибировать индуцированную и спонтанную агрегацию тромбоцитов крови человека [4]. Однако используемые в перечисленных выше экспериментах способы получения рекомбинантной дестабилазы, отличались низким выходом целевого белка (около 5 мг на 1 л культуральной жидкости) и несовершенной ренатурацией, что ограничивало исследование ферментативных свойств дестабилазы и препятствовало началу доклинических исследований этого перспективного тромболитического агента. В связи с этим был разработан более эффективный способ наработки, выделения и ренатурации рекомбинантной формы дестабилазы [5]. В результате удалось достичь выхода белка не менее 30 мг в пересчете на литр исходной бактериальной культуры. Получение значительных количеств рекомбинантной дестабилазы позволило более полно охарактеризовать не только фибринолитические свойства

препарата в программе доклинических исследований (Государственный контракт от «01» ноября 2013 г. № 14.N08.11.0016), но и оценить ее способность блокировать агрегацию тромбоцитов плазмы крови млекопитающих. Известно, что именно тромбоциты участвуют в образовании артериальных тромбов, на борьбу с которыми направлено действие изучаемого нами тромболитического фермента. Эту задачу мы предполагали выполнить на тромбоцитах крови лошадей, как наиболее доступный для нас источник тромбоцитов. К тому же их используют в некоторых зарубежных лабораториях именно для изучения механизмов ингибирования агрегации тромбоцитов [6].

Цель исследования — оценка способности нового оригинального рекомбинантного тромболитического препарата Дестабилаза-Лизоцим-2 медицинской пиявки ингибировать агрегацию тромбоцитов.

Методика

Исследования были выполнены на богатой тромбоцитами плазме (Platelet-Rich Plasma, PRP) и суспензии отмытых тромбоцитов (Washed Platelets, WP) крови 18 лошадей. Все манипуляции с животными проводились в соответствии с требованиями Всемирного Общества Защиты Животных (WSPA) и европейской конвенции по защите экспериментальных животных.

Кровь от лошадей различных пород, содержащихся в стандартных условиях Центрального Московского Ипподрома (ЦМИ), брали из ярёмной вены

с помощью двусторонней иглы 18Gx1 1/2' («Vacuette», Австрия) в вакуумные стерильные пробирки («Vacuette», Австрия). PRP получали по стандартной методике, для получения PRP использовали метод последовательных отмывок [7].

Рекомбинантную дестабилазу получали, как описано в [5]. Рабочие растворы фермента и буфера готовили из лиофильно высушенных препаратов путем добавления бидистиллированной воды. Концентрацию белка в рабочих растворах определяли по оптической плотности при длине волны 280 нм с помощью спектрофотометра NanoDrop1000 (Thermo Scientific, США). Функциональное состояние тромбоцитов оценивали по их агрегации в PRP и в суспензии тромбоцитов с помощью двухканальных агрегометров (Chrono-Log 700 и Chrono-Log 560, США), используя традиционный турбодиметрический метод Борна [8]. Степень агрегации определяли как максимальное приращение светопропускания после добавления индуктора агрегации, и измеряли в процентах светопропускания. Тестированный рекомбинантный препарат дестабилазы — лизоцима-2 (Дест-Лиз-2), обладающий изопептидазной и лизоцимной активностью [9], использовали в конечных концентрациях — 0,00025 мг/мл, 0,0025 мг/мл, 0,025 мг/мл. В качестве индукторов агрегации тромбоцитов использовали АДФ (Chrono-Par, США) в конечных концентрациях 0,625—2,5 мкмоль/л, коллаген III типа (Sigma, США) в конечных концентрациях 10—30 мг/мл, тромбин (Chrono-Par, США) активностью 0,04—0,125 Ед/мл.

Статистическая обработка результатов исследований проводилась методом Стьюдента и по U-критерию Манна—Уитни [10].

Результаты и обсуждение

1. Источник тромбоцитов — PRP

Степень ингибирования рассчитывали, определяя максимальное светопропускание в контроле (буфер) и в опыте. Принимали за 100% светопропускание в контроле и по отношению к нему рассчитывали процент светопропускания в опыте (рис. 1, А). Разница между контролем (100%) и опытом соответствует проценту ингибирования агрегации тромбоцитов, который обеспечивается обозначенной концентрацией Дест-Лиз-2.

На рис. 1 Б демонстрируется способность Дест-Лиз-2 при концентрации белка 0,0025 мг/мл подавлять АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов. При увеличении концентрации белка в 10 раз степень ингибирования повышается незначительно (таблица). Однако при использовании коллагена III типа в качестве индуктора агрегации практически отсутствуют различия в эффективности действия тех же самых концентраций Дест-Лиз-2 (рис. 1 В).

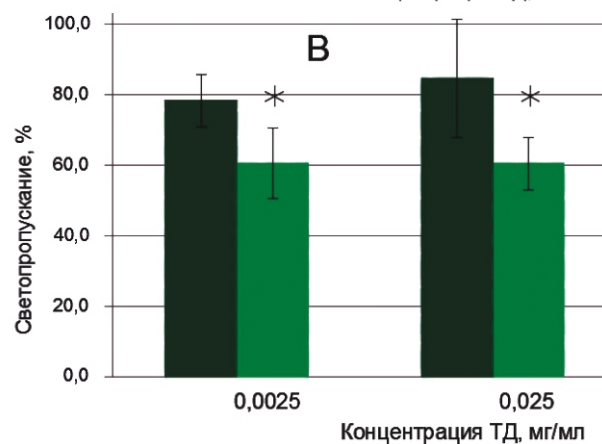
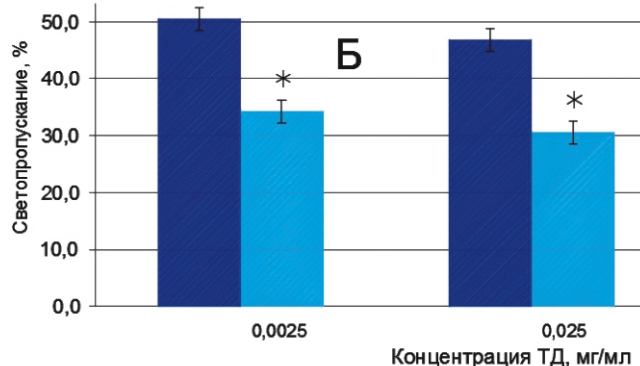
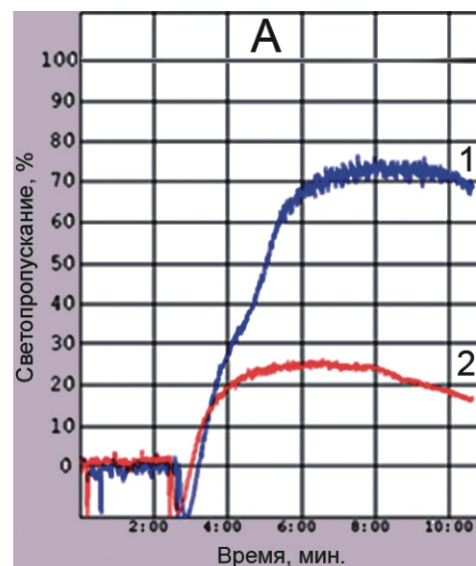


Рис. 1. А — кривые светопропускания, стимулированные АДФ, в зависимости от времени агрегации тромбоцитов в PRP в присутствии Дест-Лиз-2 (0,025 мг/мл) (2) по сравнению с буфером (1); Б — средние значения максимальных значений светопропускания при АДФ-индуцированной PRP агрегации тромбоцитов в присутствии Дест-Лиз-2 (правые столбики) по сравнению с буфером (левые столбики), $n = 14$ для каждой концентрации Дест-Лиз-2; В — то же самое для коллаген-индуцированной PRP агрегации тромбоцитов в присутствии Дест-Лиз-2.

Ингибирование агрегации тромбоцитов различными концентрациями Дест-Лиз-2 (% по отношению к буферу) в условиях PRP и WP при различных агонистах

Индуктор активации / источник тромбоцитов	Концентрация Дест-Лиз-2 (мг/мл)		
	0,00025	0,0025	0,025
ADP / PRP	—	32,4%	36%
Коллаген / PRP	—	23%	29,2%
ADP / WP	29,8%	48%	49,7%
Тромбин / WP	26,8%	15,3%	21,8%

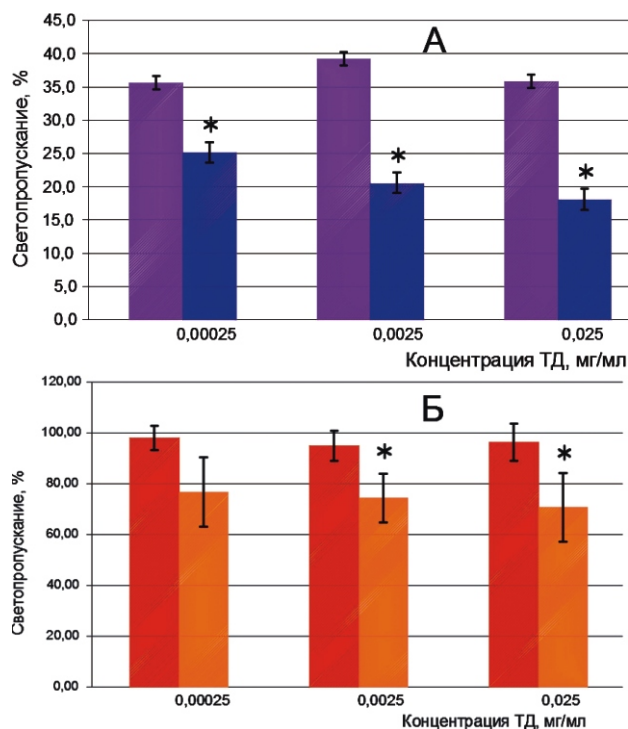


Рис. 2. А — средние значения светопропускания при АДФ-индуцированной агрегации отмытых тромбоцитов в присутствии Дест-Лиз-2 (правые столбики) по сравнению с буфером (левые столбики), $n = 4$, $n = 6$, $n = 7$ для каждой концентрации Дест-Лиз-2 соответственно от меньшей к большей; Б — то же самое для тромбин-индуцированной агрегации WP.

2. Отмытые тромбоциты (WP)

Степень ингибирования агрегации отмытых тромбоцитов мало отличается от таковой при использовании PRP. На рис. 2 представлены средние значения светопропускания при АДФ(А)- и тромбин (Б)-индуцированной агрегации WP в присутствии различных концентраций Дест-Лиз-2.

Полученные результаты представлены в таблице. Максимальное ингибирование агрегации тромбоцитов достигается при использовании АДФ в качестве индуктора, особенно в суспензии отмытых тромбоцитов.

Что касается механизма ингибирования агрегации тромбоцитов Дест-Лиз-2, мы склонны придерживаться мнения, высказанного нами ранее [4] в отношении ингибирования агрегации тромбоцитов нативной дестабилазой. Рекombинантный препарат, как и нативный, проявляет высокую адгезивную способность по отношению к различным поверхностям. Весьма вероятно, что рекombинантный препарат Дест-Лиз-2 защищает рецепторы, расположенные на поверхности клеточной мембраны тромбоцитов от воздействия индукторов различной степени аффинности по отношению к мембране тромбоцитов, ингибируя, таким образом, агрегацию тромбоцитов. Эта способность рекombинантного препарата Дест-Лиз-2, предназначенного для доклинических и клинических испытаний тромболитического фермента, получила подтверждение в экспериментах на тромбоцитах крови лошади.

Список литературы

1. Баскова И.П., Голубых В.Л., Левицкий С.А., Лазарев В.Н., Афанасьева Е.Ю., Завалова Л.Л., Арзамасцев Е.В. Тромболитическое действие бифункционального рекombинантного фермента дестабилазы-лизоцима из медицинской пиявки. *Всероссийская конференция «Тромбозы, кровоточивость, ДИС-синдром: современные подходы к диагностике и лечению»*. Москва; 2010; Прил.8: 5-6.
2. Баскова И.П., Никонов Г.И. Дестабилаза — фермент секрета слюнных желез медицинских пиявок гидролизует изопептидные связи в стабилизированном фибрине. *Биохимия*.1985; 50: 424-431.
3. Zavalova LL., Baskova IP., Lukyanov A.V. et al. Destabilase from the medicinal leech is a representative of a novel family of lysozymes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2000; 1478: 69-67.
4. Baskova I., Zavalova L., Berezhnoy S. et al. Inhibition of induced and spontaneous platelet aggregation by destabilase from medicinal leech. *Platelets*. 2000; 11: 83-86.
5. Курдюмов А.С., Манувер В.А., Ахаев Д.Н., Баскова И.П., Лазарев В.Н. Рекombинантная дестабилаза-лизоцим-2 медицинской пиявки, получение и свойства. *Биоорганическая химия*. 2016, 42, 50-61.
6. Roscher K.A, Failing K., Moritz A. Inhibition of platelet function with clopidogrel, as measured with a novel whole blood impedance aggregometer in horses *Vet J*. 2015 , 203, 332-336.

7. Роткина А. С., Романова Е. П., Московцев А. А., Кубатиев А. А. Динамика изменений АДФ — и тромбин — индуцированной агрегационной активности тромбоцитов в присутствии избытка гомоцистеина *in vitro*. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2012; 4: 80-87.

8. Born G.V.R. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*. 1962; 194: 927-929.

9. Завалова Л.Л., Лазарев В.Н., Левицкий С.А. и др. Полифункциональность рекомбинантного белка. *Биохимия*. 2010; 75: 1313-1324.

10. Сидоренко Е. В. *Методы математической обработки в психологии*. СПб.: ООО «Речь», 2007. Available at: <http://www.psychol-ok.ru/statistics/mann-whitney/>

References

1. Baskova I.P., Golubih V.L., Levickii S.A., Lazarev V.N. et al. *Thrombolytic action of bi-funktional enzyme destabilase — lysozyme from medicinal leech*. Russian conference «Thrombosis, Thrombophilias, DIC-syndrom: modern approaches for diagnostic and treatment.» Moscow; 2010; Pri-lozeniye. 8: 5-6.

2. Baskova I.P., Nikonov G.I. Destabilase — enzyme of the medicinal leech salivary gland secretion — hydrolysis isopeptide bonds in stabilyzed fibrin. *Biokhimiya*. 1985; 50: 424-31. (in Russian)

3. Zavalova L.L., Baskova I.P., Lukyanov V.N., et al. Destabilase from the medicinal leech is a representative of a novel family of lysozymes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2000; 1478; 69-77.

4. Baskova I.P., Zavalova L.L., Berezhnoy S.A. et al. Inhibition of induced and spontaneous platelet aggregation by destabilase from medicinal leech. *Platelets*. 2000; 11; 83-6.

5. Kurdiymov A.C., Manuvera V.A., Akhaev D.N. et al. Recombinant destabilase — lysozyme-2 of the medicinal leech. Preparations anproperties. *Bioorganicheskaya khimiya*. 2016; 42; 50-61. (in Russian)

6. Roscher K.A., Failing K.N., Moritz A.B. Inhibition of platelet function with clopidogel, as measured with a novel whole blood impedance aggregometer in horses. *Vet. J*. 2015; 203; 332-6.

7. Rotkina A.S., Romanova E.P., Moskovcev A.A., Kubatiev A.A. Dynamic of change ADP and thrombin induced aggregation activity of thrombocytes in the presence of homocistein excess in vitro. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2012; 4; 80-7. (in Russian)

8. Born G.V.R. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*. 1962; 194; 927-9.

9. Zavalova L.L., Lazarev V.N., Levickii S.A. et al. Poly-funktionality of recombinant protein. *Biokhimiya*. 2010; 75; 1313-24. (in Russian)

10. Sidorenko E.V. *The mathematical processing methods in psychology*. St. Petersburg: Piter; ООО «Rech», 2003. (in Russian)

Сведения об авторах:

Роткина Анна Сергеевна, науч. сотр. ФГБНУ НИИОПП, e-mail: annanum@mail.ru

Пронина И.В., мл. науч. сотр. ФГБНУ НИИОПП

Лазарев Василий Николаевич, доктор биол. наук, проф., зав. лаб. генной инженерии Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины ФМБА России, e-mail: lazar0@mail.ru

Ахаев Дмитрий Николаевич, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. прототипирования и испытаний биотехнологических разработок биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, e-mail: ahaeff@mail.ru