

# Stafylokinaza — nowy środek w leczeniu chorób układu krążenia

Tadeusz Pietrucha<sup>1</sup>

Cezary Watała<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Biochemii I

<sup>2</sup>Samodzielna Pracownia Zaburzeń Krzepnięcia Krwi

Katedra Diagnostyki Laboratoryjnej

Akademia Medyczna

Łódź

## 1. Wprowadzenie

Otrzymywanie preparatów białkowych, będących wartościowymi lekami lub składnikami testów diagnostycznych rozwija się bardzo dynamicznie. Dzięki biotechnologii dokonał się zauważalny postęp w zwalczaniu chorób układu krążenia. Stało się to m.in. za sprawą znanej amerykańskiej firmy biotechnologicznej „Genetech” z Kalifornii, która wprowadziła na rynek rekombinowany tkankowy aktywator plazminogenu (rt-PA). Zalicza się on do tzw. czynników fibrynolitycznych, powodujących rozpuszczenie wewnątrz-naczyniowych zakrzepów i przywrócenie normalnych warunków krążenia. Do tej grupy leków należy także streptokinaza — białko pochodzenia bakteryjnego. Zastosowanie ich w leczeniu m.in. ostrego zawału mięśnia sercowego przyczyniło się do istotnego polepszenia wyników terapeutycznych w tych chorobach. W najbardziej optymistycznych doniesieniach mówi się o 30% redukcji liczby zgonów (1).

Sukcesy te zachęcają zarówno naukowców jak i firmy biotechnologiczne do poszukiwania nowych, jakościowo lepszych, a jednocześnie tanich preparatów powodujących rozpuszczanie wewnątrz-naczyniowych zakrzepów. W ostatnim czasie zwrócono uwagę na stafylokinazę, znane już wcześniej białko pochodzenia bakteryjnego, o właściwościach fibrynolitycznych.

## 2. Stafylokinaza

Stafylokinaza jest białkiem wytwarzanym przez niektóre szczepy *Staphylococcus aureus* (2-6), a także *S. epidermidis*, *S. lentus*, *S. sciuri*, *S. lugdunensis*, *S. xylosus*, *S. hominis* (7). Od ponad czterdziestu lat znane są jej właściwości



fibrynolityczne (2,8). Pierwsze, przeprowadzone na zwierzętach, próby wykorzystania stafylokinazy jako leku nie były pomyślne. Lewis i wsp. (9,10) uzyskali co prawda rozpuszczenie wewnątrznaczyniowego zakrzepu u czterech z sześciu poddanych eksperymentowi psów, ale połączone to było z silnym krwawieniem i wysoką toksycznością podanego preparatu. Równie rozległe skutki uboczne obserwował Kanae (11). Podanie psom dotętniczo dawki stafylokinazy w celu rozpuszczenia eksperymentalnego zakrzepu spowodowało skrajne wydłużenie czasu protrombinowego i tromboplastynowego oraz wysoki poziom degradacji fibrynogenu. Wyniki te przedyskutowali krytycznie Collen i Lijnen (12) z Center for Molecular and Vascular Biology, University of Leuven (Belgia), ośrodka przodującego zarówno w badaniach układu fibrynolitycznego, jak i samej stafylokinazy. Ich zdaniem, zasadniczym błędem było wybranie psów jako zwierząt eksperymentalnych. Układ fibrynolityczny tych zwierząt wykazuje skrajną wrażliwość na aktywację przez stafylokinazę (13). Modelem bardziej odpowiednim do przeprowadzenia tego typu badań są zwierzęta takie jak pawiany, króliki czy chomiki (14).

### 3. Charakterystyka białka

Stafylokinaza zawiera 136 aminokwasów tworzących jeden łańcuch polipeptydowy nie zawierający mostków disiarczkowych (15-18). W zależności od sposobu jej otrzymywania, występuje w kilku postaciach różniących się nieznacznie między sobą masą cząsteczkową (od 16 500 do 18 000 D), oraz punktami izoelektrycznymi (19-21). Różnice te wynikają z braku 6 lub 10 N-końcowych aminokwasów. Ich nieobecność nie wpływa na aktywność fibrynolityczną białka (19,21,22). Podczas rozpuszczania skrzepu prawdopodobnie zachodzi również konwersja stafylokinazy będącej w kompleksie z plazminą/plazminogেনem do jej niskocząsteczkowych postaci (23).

Struktura białka była analizowana za pomocą techniki rozpraszania promieni rentgenowskich (*X-ray scattering*), metody kinetycznego rozpraszania światła (*dynamic light scattering*), ultrawiwiania oraz dichroizmu kołowego w zakresie promieni ultrafioletowych (24). Stafylokinaza posiada promień bezwładności  $R_G$  (*radius of gyration*) ok. 2.3 nm, promień Stokesa (*Stokes' radius*) 2.12 nm i dłuższą oś eliptyczną cząsteczki (*maximum intraparticle distance*)  $L$  około 10 nm. Współczynnik sedymentacji wynosi 1.71 S. Dane te wskazują, że kształt cząsteczki jest bardzo wydłużony. Posiada ona dwa pofałdowane regiony o podobnych rozmiarach. Około 18% aminokwasów jest zaangażowanych w struktury  $\alpha$ -helikalne, 30% tworzy struktury beta, zaś ok. 20% zakrety  $\beta$  ( $\beta$  turns) (24).

W procesie aktywacji plazminogenu, podstawową rolę odgrywa metionina w pozycji 26 (25). Podstawienie w tym miejscu argininy lub waliny powoduje utratę aktywności. Z kolei cysteina lub leucyna wywierają niewielki wpływ na właściwości fibrynolityczne stafylokinazy, prawdopodobnie, dlatego że ich wbudowanie do łańcucha polipeptydowego nie wpływa na strukturę zmutowanego białka (25).



#### 4. Struktura genu stafylokinazy

Gen kodujący stafylokinazę jest prawdopodobnie profagową wstawką do strukturalnego genu (h1b) *Staphylococcus aureus* kodującego  $\beta$ -toksynę (BT) (26). Znajduje się on we fragmencie genomu o długości ok. 2.9 kbp, uzyskanym na drodze trawienia enzymem restrykcyjnym Hind III (17). Fragment ten zawiera otwartą ramkę odczytu o długości 489 par zasad (996-1484) kodujących 163 aminokwasy, wśród których znajduje się także 28 aminokwasów odpowiadających reszcie fragmentu N-końcowego, będącego częścią składową dojrzałego białka.

Sekwencje DNA kodujące stafylokinazę zawierają niektóre bakteriofagi, np. S $\phi$ C (18) i P $\phi$ 2 (27), czy grupa bakteriofagów o serotypie F *Staphylococcus aureus* (28).

Sekwencja kodująca poprzedzona jest sekwencją Shine-Dalgarno oraz charakterystycznymi sekwencjami -10 i -35 prokariotycznego promotora. Stafylokinaza nie wykazuje homologii struktury pierwszorzędowej ze streptokinazą (29). Znalaziono różnice tylko w zawartości 4 nukleotydów na obszarach kodujących białko, pochodzących z różnego materiału genetycznego (sac $\phi$ C, sak42D, sakSTAR) (17,18,30). Niektóre z tych naturalnie występujących mutantów stafylokinazy różnią się jedynie wrażliwością na inaktywację cieplną (31).

#### 5. Charakterystyka właściwości funkcjonalnych stafylokinazy

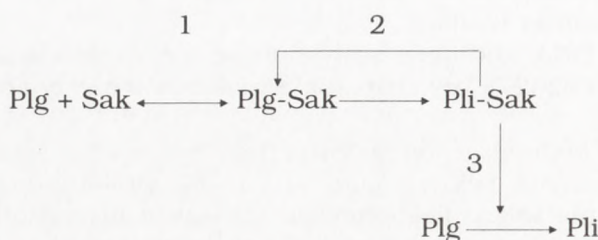
Istotą działania czynników fibrynolitycznych, zwanych także aktywatorami plazminogenu, jest przekształcenie zymogenu, jakim jest plazminogen, do jego enzymatycznie aktywnej postaci — plazminy (32). Plazmina, trawiąc złogi włóknika, powoduje tym samym rozpuszczenie zakrzepu (zatoru) i w konsekwencji udroźnienie naczynia. Dzięki temu następuje przywrócenie normalnych warunków przepływu krwi. Mechanizm działania poszczególnych aktywatorów plazminogenu jest różny. Stafylokinaza, podobnie jak streptokinaza, nie jest enzymem, w przeciwieństwie do urokinazy czy t-PA (33). Tworzy ona kompleksy w stosunku 1:1 z plazminą/plazminogenem, które aktywują następne cząsteczki plazminogenu (34,35). Acylacja kompleksu stafylokinaza-plazminogen nie wpływa na aktywację plazminogenu (36), co odróżnia ją od streptokinazy. Acylowanie kompleksu utworzonego przez streptokinazę (APSAC) powoduje utratę jego aktywności fibrynolitycznej. Zjawisko to zostało wykorzystane w praktyce klinicznej. Podanie APSAC do krążenia nie powoduje uogólnionej aktywacji systemu fibrynolitycznego. Dopiero na powierzchni skrzepu następuje jego powolna deacylacja i odblokowanie aktywności streptokinazy.

Powinowactwo stafylokinazy zarówno do formy Glu-plazminogenu jak i do Lys-plazminogenu jest porównywalne. Stała asocjacji ( $K_a$ ) stafylokinazy i Glu-plazminogenu wynosi  $0.93 \times 10^8 \text{ mol}^{-1}$  (37). Wydajność katalityczna reakcji  $K_{cat}/K_m$  aktywacji Lys-plazminogenu przez kompleks stafylokinaza-



plazmina jest 10-krotnie wyższa niż Glu-plazminogenu (38). W oddziaływaniu ze stafylokinazą nie biorą udziału domeny kringlowe (K1-K4) plazminogenu (39). O ile jednak wytworzenie kompleksu streptokinaza-plazminogen powoduje ekspozycję centrum aktywnego plazminogenu, to w przypadku stafylokinazy udostępnienie centrum aktywnego w kompleksie stafylokinaza-plazminogen wymaga wstępnego wytworzenia plazminy (Pli) (13,40).

Collen i Lijnen proponują następujący model aktywacji plazminogenu (Plg) przez stafylokinazę (Sak) (12):



W wyniku połączenia plazminogenu ze stafylokinazą wytwarza się początkowo nieaktywny kompleks (Plg-Sak){1}, który następnie bierze udział w generowaniu aktywnej plazminy w kompleksie ze stafylokinazą. Stała równowagi reakcji {3} decyduje o szybkim wytwarzaniu aktywnej plazminy. Reakcja ta może być przyśpieszana przez aktywatory plazminogenu (m.in. przez sam kompleks Pli-Sak {2}) lub opóźniana przez inhibitory plazminy (np.  $\alpha_2$ -antyplazminę).

Jedną z najbardziej pożądaných cech aktywatora plazminogenu, mającego zastosowanie w terapii fibrynolitycznej, jest jego zwiększona aktywność jedynie w obecności włókniaka, przy całkowitym braku tej aktywności w krążącej krwi. Mimo że stafylokinaza jest wciąż daleka od ideału, to jednak prędkość początkowa aktywacji plazminogenu przez stafylokinazę jest 4-krotnie większa w obecności włókniaka (dla porównania, w przypadku streptokinazy jest ona większa tylko 2-krotnie) (35). Pomiarы przeprowadzone przez Matsuo i wsp. (41) wskazują na blisko 20-krotny wzrost aktywności stafylokinazy w obecności włókniaka lub fibrynogenu.

W warunkach *in vitro* 50% lizę 0.12 ml skrzepu w 0.5 ml ludzkiego osocza uzyskano w ciągu 2 godzin przy stężeniu stafylokinazy 17 nmol/l. Towarzyszyła temu hydroliza osocznego fibrynogenu sięgająca 5% (35). W przypadku streptokinazy odpowiednia wartość wynosiła 68 nmol/l. Streptokinaza powodowała przy tym hydrolizę osocznego fibrynogenu sięgającą prawie 90% (35). Warto podkreślić, że hydroliza osocznego fibrynogenu jest zjawiskiem szczególnie niepożądanym w terapii fibrynolitycznej, gdyż zwiększa ona ryzyko wystąpienia krwawień wewnątrzustrojowych. Jedną z zalet stosowania stafylokinazy w terapii fibrynolitycznej jest to, że nie powoduje ona znacznego ubytku ilości osocznego fibrynogenu (41,42). Sądzi się, że przyczyną tego może być gwałtowne hamowanie aktywności kompleksu stafylokinaza/plazminogen(plazmina) przez  $\alpha_2$ -antyplazminę, która nie blokuje



kompleksu streptokinaza/plazminogen (35,42). Co istotne, włóknik znacznie zmniejsza inhibicję kompleksu Sta-Pli przez  $\alpha_2$ -antyplazminę, ponieważ w reakcji z inhibitorem biorą udział miejsca wiążące lizynę znajdujące się w cząsteczce plazminogenu, które z kolei mogą oddziaływać z włóknikiem (43). Umożliwia to wydajną aktywację plazminogenu do plazminy na powierzchni zakrzepu, którego głównym elementem strukturalnym jest włóknik.

Zablokowanie aktywności kompleksu stafylokinaza-plazmina przez  $\alpha_2$ -antyplazminę powoduje oddysocjowanie stafylokinazy, która może ponownie wiązać się z inną cząsteczką plazminogenu (44).

Zjawisko hamowania aktywności kompleksu Sta-Pli przez  $\alpha_2$ -antyplazminę oraz brak tego efektu lub jego znaczne osłabienie na powierzchni włóknika leży u podstaw selektywnej aktywacji układu fibrynolitycznego w przypadku leczenia fibrynolitycznego z zastosowaniem stafylokinazy. Aktywacja plazminogenu zachodzi przede wszystkim na powierzchni zakrzepu, natomiast na znacznie mniejszą skalę w krążeniu ogólnoustrojowym. Fakt ten sprzyja ograniczeniu występowania rozległych skutków ubocznych, takich jak nadmierna hydroliza fibrynogenu i innych czynników biorących aktywny udział w utrzymaniu homeostazy procesu krzepnięcia i fibrynolizy. W ludzkim osoczu ilość  $\alpha_2$ -antyplazminy jest wystarczająca, by nie dopuścić do aktywacji plazminogenu przez stafylokinazę przy stosowanym w warunkach klinicznych zakresie stężeń tego preparatu. Hamujący efekt wywierają także inne inhibitory proteaz serynowych, takie jak:  $\alpha_2$ -makroglobulina, inhibitor C-1,  $\alpha_1$ -antytrypsyna (45). Dopiero obecność włóknika w osoczu umożliwia przebieg tego procesu (46).

Interesujące wyniki uzyskano badając zdolność stafylokinazy do rozpuszczania zakrzepu w środowisku bogato- i ubogopłytkowego osocza. Występowanie 50% lizy zakrzepu w ciągu 2 godzin zaobserwowano już przy zastosowaniu 40 i 23 nmol/l stafylokinazy odpowiednio dla osocza bogato- i ubogopłytkowego. Analogiczne wartości dla streptokinazy wynoszą odpowiednio 440 nmol/l i 47 nmol/l dla osocza bogato- i ubogopłytkowego (22). Dane te sugerują, że stafylokinaza posiada znacznie lepsze właściwości lityczne zakrzepu bogatopłytkowego, czyli takiego jaki występuje w przypadku reokluzji (47), niż streptokinaza. W badaniach tych nie wykazano, by w jakiś znaczący sposób stafylokinaza wpływała na funkcję krwinek płytkowych znajdujących się w krążeniu ustrojowym, zarówno u osób zdrowych jak i u pacjentów z ostrym zawałem mięśnia sercowego (48). Wykazano, co prawda, nieznaczny, hamujący wpływ stafylokinazy na agregację przemytych krwinek płytkowych w warunkach *in vitro*, ale może to wynikać z przypadkowego powstawania plazminy (brak  $\alpha_2$ -antyplazminy) powodującej degradację fibrynogenu i innych białek biorących udział w procesie agregacji. Nie zaobserwowano tego zjawiska w osoczu bogatopłytkowym (49).

Jednym z ubocznych skutków terapii fibrynolitycznej, stosowanej np. w zawałe mięśnia sercowego jest ryzyko pojawienia się wewnątrzustrojowych krwawień. By temu zapobiegać dąży się zwykle do szybkiej blokady układu fibrynolitycznego przez tzw. czynniki antyfibrynolityczne, do których należą m.in. aprotynina (Trasylol®), kwas 6-aminoheksanowy (6-AHA) i jego pochod-



na — Exacyl. Okazało się, że ten ostatni jest szczególnie efektywny w hamowaniu układu fibrynolitycznego aktywowanego przez stafylokinazę (50).

## 6. Badania trombolitycznych właściwości stafylokinazy *in vivo* przeprowadzone na modelach zwierzęcych

Stwierdzono, że dożylnie podanie stafylokinazy królikowi z wywołanym w warunkach eksperymentalnych zakrzepem żylnym, powodowało rozpuszczenie zakrzepu bez uogólnionej aktywacji układu fibrynolitycznego (51). Skuteczność działania stafylokinazy była porównywalna ze skutecznością streptokinazy. Podobne efekty uzyskano w doświadczeniach przeprowadzonych na pawianach (52). Stafylokinaza z powodzeniem rozpuszcza zakrzep bogatopłytkowy tworzący zator płucny u chomika (53). W doświadczeniach przeprowadzonych *in vivo* stafylokinaza wykazała większą zdolność rozpuszczenia bogatopłytkowych zakrzepów, czyli takich jakie występują w naczyniach wieńcowych u pacjentów z ostrym zawałem mięśnia sercowego, niż streptokinaza (52,53). Mniej optymistyczne rezultaty uzyskał Hirata i wsp. (54). Badając efektywność lizy zakrzepu w tętnicy udowej świnki morskiej przez tkankowy aktywator plazminogenu (t-PA), jednołańcuchowy aktywator plazminogenu typu urokinazowego (scu-PA) oraz stafylokinazę stwierdzili, że wszystkie te czynniki fibrynolityczne umożliwiały udrożnienie naczynia, jednak stafylokinaza powodowała stosunkowo największą hydrolizę fibrynogenu oraz  $\alpha_2$ -antyplazminy.

W badaniach przeprowadzonych na królikach i chomikach z użyciem stafylokinazy znakowanej  $^{125}\text{I}$ , wykazano, że jej okres półtrwania w krążeniu ( $t_{1/2}$ ) wynosi 1,8 min (55). Podobny wynik (2 min) uzyskano stosując metodę opartą na teście ELISA (56). Co ciekawe, stafylokinaza usuwana jest głównie przez nerki i mięśnie, a nie przez wątrobę, która eliminuje z krążenia większość czynników biorących udział w procesie hemostazy (55).

Jednym z poważniejszych problemów towarzyszących leczeniu streptokinazą jest jej immunogenność. Stwierdzono, że stafylokinaza cechuje się znacznie niższą immunogennością w organizmach psa (53) i pawiana (52) w porównaniu ze streptokinazą.

## 7. Pierwsze kliniczne próby zastosowania stafylokinazy u ludzi

Wstępne, kliniczne próby zastosowania stafylokinazy u pacjentów z ostrym zawałem mięśnia sercowego wypadły pomyślnie (57,58). Pięciu pacjentom podano dożylnie w 30-minutowym wlewie 10 mg rekombinowanej stafylokinazy. Po 40 minutach nastąpiło udrożnienie naczyń wieńcowych. Nie zaobserwowano reakcji alergicznych ani degradacji osoczowego fibrynogenu i  $\alpha_2$ -antyplazminy (57). Podobnie pomyślny przebieg miało leczenie drugiej pięcioosobowej grupy pacjentów z ostrym zawałem mięśnia sercowego. W tym przypadku udrożnienie naczyń nastąpiło już po ok. 20 min (58).



Stafylokinaza, chociaż w mniejszym stopniu niż streptokinaza, w organizmie ludzkim jest czynnikiem immunogennym. Poziom przeciwciał dla tego białka podnosi się znacznie pomiędzy 2 a 9 tygodniem od momentu dokonania pierwszej infuzji u chorych z zawałem mięśnia sercowego (59). U większości pacjentów w wyniku podania stafylokinazy mamy do czynienia z pierwotną odpowiedzią immunologiczną. Obecność przeciwciał przeciwko stafylokinazie jest wykrywana przez ponad 18 miesięcy (60).

## 8. Otrzymywanie rekombinowanej stafylokinazy

Początkowo stafylokinazę otrzymywano z naturalnego materiału biologicznego (3,61,62). Obecnie w licznych ośrodkach naukowych uzyskano ekspresję rekombinowanego białka, posługując się różnymi systemami ekspresyjnymi oraz różnymi metodami uzyskiwania genu (19,21,27,30,58,63-72). Na podstawie dotychczasowych doświadczeń wydaje się, że optymalnym układem ekspresyjnym jest plazmid zawierający sekwencję kodującą dla stafylokinazy określaną jako *sak42D*, kodon inicjujący ATG oraz promotor *tac* i dwie tandemowe sekwencje Shine-Dalgarno (58). Nadanie dodatniego ładunku peptydowi sygnałnemu ułatwia proces sekrecji stafylokinazy (73). Jako komórek gospodarza używa się bakterii *E. coli*. Rekombinowana stafylokinaza stanowi w tym układzie 10-15% ilości całkowitego białka komórek bakteryjnych. Stafylokinazę uzyskuje się z frakcji cytozolowej i oczyszcza na kolumnach z Sefarozą SP i Sefarozą modyfikowaną resztami fenyłowymi. Z 1 litra hodowli zawiesiny komórek bakteryjnych w fermentorze uzyskuje się ok 200 mg czystego białka (58).

## Literatura

1. Parise P., Hauert J., Iorio A., Callegari P., Agnelli G., (1995), *J. Lab. Clin. Med.*, 125, 212-221.
2. Lack C. H., (1948), *Nature*, 161, 559-561.
3. Arvidson S., Erikson R., Holme T., Mollby R., Wadstrom T., Vesterberg O., (1973), *Contrib. Microbiol. Immunol.*, 1, 406-412.
4. Młynarczyk A., Młynarczyk G., Żabicka D., Sawicka-Grzelak A., (1993), *Med. Dośw. Mikrobiol.*, 45, 15-18.
5. Młynarczyk G., Garliński P., Młynarczyk A., Zabuska K., Sawicka-Grzelak A., Machowska G., Osowiecki H., Roszkowski W., (1989), *Med. Dośw. Mikrobiol.*, 41, 86-91.
6. Żabicka D., Młynarczyk A., Windyga B., Młynarczyk G., (1993), *Acta Microbiol. Pol.*, 42, 235-241.
7. Sawicka-Grzelak A., Szymanowska A., Młynarczyk A., Młynarczyk G., (1993), *Med. Dośw. Mikrobiol.*, 45, 7-10.
8. Lewis J. H., Ferguson J. H., (1951), *Am. J. Physiol.*, 166, 594.
9. Lewis J. H., Kerber C. W., Wilson J. H., (1964), *Am. J. Physiol.*, 207, 1044.
10. Lewis J. H., Shirakawa M., (1964), *Am. J. Physiol.*, 207, 1049.
11. Kanae, K., (1986), *Biol. Abstr.* 81: AB748, abstr. 65436.
12. Collen D., Lijnen H. R., (1994), *Blood*, 84, 680-686.
13. Collen D., van Hoef B., Schlott B., Hartmann M., Guhrs K. H., Lijnen H. R., (1993), *Eur. J. Biochem.*, 216, 307-314.



14. Lijnen H. R., de Cock F., Matsuo O., Collen D., (1992), *Fibrinolysis*, 6, 33-38.
15. Makino T., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, 522, 267-269.
16. Breitling R., Wagner B., Wagner M., Gase K., Behnke D., (1991), *Journal of Basics Microbiology.*, 31, 329-473.
17. Collen D., Zhao Z. A., Holvoet P., Marynen P., (1992), *Fibrinolysis*, 6, 226-231.
18. Sako T., Tsuchida N., (1983), *Nucleic. Acids. Res.*, 11, 7679-7693.
19. Sako T., (1985), *Eur. J. Biochem.*, 149, 557-563.
20. Gerlach D., Kraft R., Behnke D., (1988), *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. A.*, 269, 314-322.
21. Collen D., Silence K., Demarsin E., de Mol M., Lijnen H. R., (1992) *Fibrynolysis*, 6, 203-213
22. Lijnen H. R., van Hoef B., Vandenbossche L., Collen D., (1992), *Fibrinolysis*, 6, 214-225.
23. Ueshima S., Silence K., Collen D., Lijnen H. R., (1993), *Thromb. Haemost.*, 70, 495-499.
24. Damaschun G., Damaschun H., Gast K., Misselwitz R., Zirwer D., Guhrs K. H., Hartmann M., Schlott B., Triebel H., Behnke D., (1993), *Biochim. Biophys. Acta*, 1161, 244-248.
25. Schlott B., Hartmann M., Guhrs K. H., Birch Hirschfeld E., Gase A., Vettermann S., Collen D., Lijnen H. R., (1994), *Biochim. Biophys. Acta*, 1204, 235-242.
26. Smeltzer M. S., Hart M. E., Iandolo J. J., (1994), *Gene*, 138, 51-57.
27. Sako T., Sawaki S., Sakurai T., Ito S., Yoshizawa Y., Kondo I., (1983), *Mol. Gen. Genet.*, 190, 271-277.
28. Coleman D. C., Sullivan D. J., Russell R. J., Arbuthnott J. P., Carey B. F., Pomeroy H. M., (1989), *J. Gen. Microbiol.*, 135, 1679-1697.
29. Malke H., Ferretti J. J., (1986), *Folia Haematol. Int. Mag. Klin. Morphol. Blutforsch.*, 113, 88-98.
30. Behnke D., Gerlach D., (1987), *Mol. Gen. Genet.*, 210, 528-534.
31. Gase A., Birch Hirschfeld E., Guhrs K. H., Hartmann M., Vetterman S., Damaschun G., Damaschun H., Gast K., Misselwitz R., Zirwer D., (1994), *Eur. J. Biochem.*, 223, 303-308.
32. Collen D., Lijnen H. R., (1991), *Blood*, 78, 3114-3124.
33. Pietrucha T., Cierniewski C. S., (1992), *Acta Haematologica Polonica*, 23, 157-164.
34. Kowalska-Loth B., Zakrzewski K., (1975), *Acta Biochim. Pol.*, 22, 327-339.
35. Lijnen H. R., van Hoef B., de Cock F., Okada K., Ueshima S., Matsuo O., Collen D., (1991), *J. Biol. Chem.*, 266, 11826-11832.
36. Lijnen H. R., van Hoef B., Smith R. A., Collen D., (1993), *Thromb. Haemost.*, 70, 326-331.
37. Lijnen H. R., de Cock F., van Hoef B., Schlott B., Collen D., (1994), *Eur. J. Biochem.*, 224, 143-149.
38. Shibata H., Nagaoka M., Sakai M., Sawada H., Watanabe T., Yokokura T., (1994), *J. Biochem. Tokyo.*, 115, 738-742.
39. Lijnen H. R., van Hoef B., Collen D., (1993), *Eur. J. Biochem.*, 211, 91-97.
40. Collen D., Schlott B., Engelborghs Y., van Hoef B., Hartmann M., Lijnen H. R., Behnke D., (1993), *J. Biol. Chem.*, 268, 8284-8289.
41. Matsuo O., Okada K., Fukao H., Tomioka Y., Ueshima S., Watanuki M., Sakai M., (1990), *Blood*, 76, 925-929.
42. Sakai M., Watanuki M., Matsuo O., (1989), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 162, 830-837.
43. Lijnen H. R., van Hoef B., Matsuo O., Collen D., (1992), *Biochim. Biophys. Acta*, 1118, 144-148.
44. Silence K., Collen D., Lijnen H. R., (1993), *J. Biol. Chem.*, 268, 9811-9816.
45. Shishido Y., Sakai M., Kaneda N., Sansawa H., Shimura K., Hashimoto S., Yokokura T., (1994), *Biol Pharm Bull*, 17, 1595-1598.
46. Silence K., Collen D., Lijnen H. R., (1993), *Blood*, 82, 1175-1183.
47. Puri R. N., Colman R. W., (1993), *Blood Coagul. Fibrinolysis*, 4, 465-478.
48. Lijnen H. R., van Hoef B., Collen D., (1995), *Thromb. Haemost.*, 73, 472-477.
49. Suehiro A., Oura Y., Ueda M., Kakishita E., (1993), *Thromb. Haemost.*, 70, 834-837.
50. Lijnen H. R., Stassen J. M., Collen D., (1995), *Thromb. Haemost.*, 73, 845-849.



51. Reilly C. F., Hutzelmann J. E., (1992), *J. Biol. Chem.*, 267, 17128-17135.
52. Collen D., de Cock F., Stassen J.M., (1993), *Circulation*, 87, 996-1006.
53. Collen D., de Cock F., Vanlinthout I., Declerck P. J., Lijnen H. R., Stassen J. M., (1992), *Fibrinolysis*, 6, 232-242.
54. Hirata Y., Umemura K., Takiguchi Y., Uematsu T., Nakashima M., (1993), *Blood Coagul. Fibrinolysis*, 4, 569-575.
55. Lijnen H. R., Stassen J. M., Vanlinthout I., Fukao H., Okada K., Matsuo O., Collen D., (1991), *Thromb. Haemost.*, 66, 468-473.
56. Lijnen H. R., Beelen V., Declerck P. J., Collen D., (1993), *Thromb. Haemost.*, 70, 491-494.
57. Collen D., van de Werf F., (1993), *Circulation*, 87, 1850-1853.
58. Schlott B., Hartmann M., Guhrs K., Birch-Hischfeld E., Pohl H., Vanderschueren S., van de Werf F., Michael A., Collen D., Behnke D., (1994), *Bio/Technology*, 12, 185-189.
59. Declerck P. J., Vanderschueren S., Billiet J., Moreau H., Collen D., (1994), *Thromb. Haemost.*, 71, 129-133.
60. Vanderschueren S. M. F., Stassen J. M., Collen D., (1994), *Thromb. Haemost.*, 72, 297-301.
61. Vesterberg K., Vesterberg O., (1972), *J. Med. Microbiol.*, 5, 441-450.
62. Jackson K. W., Esmon N., Tang J., (1981), *Methods Enzymol.*, 80 Pt C, 387-394.
63. Sorokin A. V., Breitling R., Behnke D., (1988), *Mol. Biol. Mosk.*, 22, 1658-1666.
64. Breitling R., Gase K., Behnke D., (1990), *J. Basic. Microbiol.*, 30, 655-662.
65. Breitling R., Sorokin A. V., Behnke D., (1990), *Gene*, 93, 35-40.
66. Breitling R., Gerlach D., Hartmann M., Behnke D., (1989), *Mol. Gen. Genet.*, 217, 384-391.
67. Collen D., de-Mol M., Demarsin E., de Cock F., Stassen-J-M., (1993), *Fibrinolysis*, 7, 242-247.
68. Iino T., Sako T., (1988), *J. Biol. Chem.*, 263, 19077-19082.
69. Sako T., (1991), *J. Bacteriol.*, 173, 2289-2296.
70. Sako T., Iino T., (1988), *J. Bacteriol.*, 170, 5389-5391.
71. Sako T., (1986), *J. Bacteriol.*, 167, 850-854.
72. Ellinger T., Behnke D., (1990), *Nucleic. Acids. Res.*, 18, 383.
73. Iino T., Takahashi M., Sako T., (1987), *J. Biol. Chem.*, 262, 7412-7417.

## Stafylokinaza — a new approach in the treatment of vascular disease

### Summary

Stafylokinaza is a new promising therapeutic agent with an expanding clinical application in the treatment of vascular disease. In the present paper the authors discuss the biochemical and physiological properties of the recombinant protein. The methods and techniques of protein synthesis, isolation and purification, including the genetic engineering approaches are critically summarized. The emphasis is put onto the critical review of the experiments concerning the use of stafylokinaza in thrombotic models in experimental animals. Moreover, we discuss the potential role and advantages of stafylokinaza over the other thrombolytic agents in the treatment of cardiovascular disease in humans.

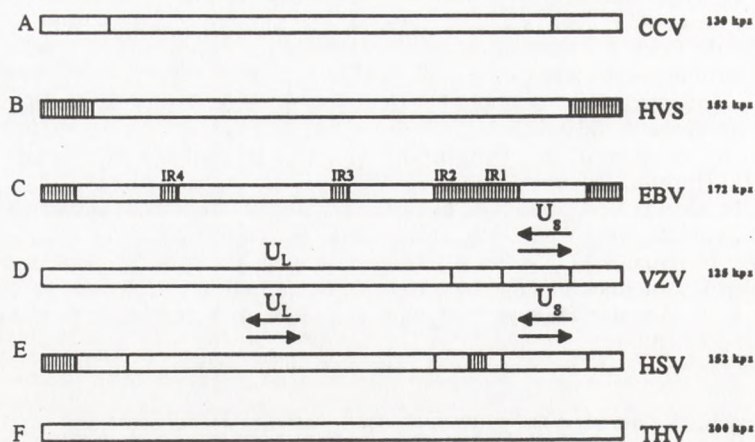
### Key words:

stafylokinaza, fibrinolysis, thrombolytic agents, plasminogen activators, thrombolytic therapy, vascular disease, myocardial infarction.

### Adres do korespondencji:

Tadeusz Pietrucha, Zakład Biochemii I, Akademia Medyczna w Łodzi,  
ul. Lindleya 6, 90-131 Łódź.





Rys. 1. Klasyfikacja herpeswirusów człowieka i zwierząt na podstawie organizacji genomu (Roizman, 1992).

**CCV** — Channel Catfish herpes Virus; **HVS** — Herpes Virus Saimiri; **EBV** — Epstein-Barr Virus; **VZV** — Varicella-Zoster Virus; **HSV** — Herpes Simplex Virus; **THV** — Tupaiid Herpes Virus; **UL** — unique long region; **US** — unique short region; **IR** — inverted repeat; k.p.z. — liczba par zasad w tysiącach. Pionowe zakreskowania oznaczają wielkość i liczbę poszczególnych fragmentów w końcowym (TR) lub wewnętrznym (IR) powtórzeniu sekwencji nukleotydów.

Analiza białek wirusa BHV 1 dostarczyła wielu cennych informacji odnośnie do ich liczby i funkcji. Początkowo stwierdzono istnienie 18 białek strukturalnych, z których 8 to glikoproteiny (35). Pastoret (30) w oczyszczonym szczepie Los Angeles wirusa BHV 1 zidentyfikował 21 białek w tym 10 glikoprotein. Według Misry i wsp. (28) BHV 1 zawiera 25-33 podjednostek białkowych o masie cząsteczkowej od 12 do 330 kDa. 8 do 11 spośród nich to glikoproteiny. Ponadto autorzy ci stwierdzili w komórkach zakażonych wirusem BHV 1 obecność co najmniej 15 białek niestrukturalnych. Podobne wyniki uzyskali Bolton i wsp. (6). Wykazali oni istnienie 33 białek o masie cząsteczkowej od 13 do 275 kDa. Obecnie przyjmuje się, że genom wirusa BHV 1 koduje w przybliżeniu 70 białek. Około 25 białek z tej liczby to białka strukturalne wirionu, z których kilka to glikoproteiny. Dotychczas zidentyfikowano 7 genów kodujących następujące glikoproteiny wirusa BHV 1: gB, gC, gD, gE, gG, gH i gI (2,3,15,19,22,23,27,32,37,47). Glikoproteiny gB, gD i najprawdopodobniej gH są niezbędne do replikacji wirusa (36).

Gen kodujący glikoproteinę gB znajduje się w odcinku długim L genomu BHV 1 (pozycja mapowa 0,405 do 0,432) (rys. 2). Białko to składa się z 932 aminokwasów i jest odpowiednikiem glikoproteiny gB wirusa Herpes simplex typ 1 (HSV 1) człowieka i gII wirusa choroby Aujeszky'ego (22). W pracy Misry i wsp. jest ono określane jako GVP 6/11/16. Homologia między glikoproteinami gB BHV 1 a gB HSV 1 wynosi 56,3% w sekwencji nukleotydów oraz 45,9% w sekwencji aminokwasów. Dojrzała glikoproteina gB wywodzi