

В. М. ШКУМАТОВ¹, С. Л. ОВСЯНКО¹, Ю. А. ЛЕСНИКОВИЧ¹, Е. А. ЧЕРНЯВСКИЙ¹,
И. Э. АДЗЕРИХО², А. П. МРОЧЕК²

**АКУСТО-ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ТРОМБОЛИЗИС:
ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАЗВУКОВОЙ ОБРАБОТКИ
НА МОЛЕКУЛЯРНЫЕ СВОЙСТВА СТРЕПТОКИНАЗЫ
И АВТОАКТИВАЦИЮ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ
СЕРИНОВЫХ ПРОТЕИНАЗ**

ВВЕДЕНИЕ

Развитие атеросклероза и атеротромбоза (острый тромбоз на фоне атеросклероза) является основной причиной таких грозных заболеваний, как острый инфаркт миокарда, ишемический инсульт, заболевания периферических сосудов. По данным ВОЗ, эти заболевания занимают до 45% в общей структуре смертности наиболее развитых стран мира [1, 2]. В соответствии с этим разработка методов лечения сердечно-сосудистых заболеваний является действительно актуальной.

В последнее время для лечения острых тромботических окклюзий активно разрабатывается метод акусто-ферментативного тромболизиса, т. е. воздействие на тромб низкочастотного ультразвука (УЗ) на фоне опосредованного действия различных активаторов пламиногена [3–7]. Многочисленные данные экспериментальных исследований *in vitro* и *in vivo* свидетельствуют о высокой эффективности акусто-ферментативного тромболизиса. Более того, сочетание УЗ с тромболитическими препаратами позволяет снизить терапевтические дозы белковых активаторов без проигрыша во времени и эффективности лечения [8]. Вместе с тем было установлено, что совместное действие УЗ и стрептокиназы сопровождается активацией не только плазминовой, но и тромбиновой системы с последующим дефибринованием плазмы по механизму, близкому к развитию синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания [9]. Роль данных изменений в развитии ретромбоза и рестеноза после успешной реперфузии известна [10, 11].

Следует отметить, что общепринятые в настоящий момент подходы в оценке состояния гемостаза не дают ответа на вопрос о молекулярных механизмах ультразвуковой активации ферментативного тромболизиса. Систематических исследований эффекта действия УЗ-обработки на отдельные, изолированные белки-ферменты коагуляции и фибринолиза не проводилось. Это в свою очередь делает

¹ Учреждение Белорусского государственного университета «Научно-исследовательский институт физико-химических проблем» (Минск).

² Белорусская медицинская академия последипломного образования (Минск).

эмпирическим и ограничивает выбор терапевтических препаратов до и после ферментативно-ультразвукового разрушения тромбов и стратегию их применения для предотвращения тромботических осложнений.

Поскольку процессы активации систем свертывания крови и фибринолиза осуществляются по механизму ограниченной протеолитической модификации белков-предшественников, мы исследовали влияние ультразвуковой обработки с использованием структурно-функциональных моделей активации перехода плазминогена в плазмин под действием УЗ-модифицированной стрептокиназы и автоактивации предшественников сериновых протеиназ – химотрипсиногена и трипсиногена на фоне действия УЗ-обработки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе была использована стрептокиназа (750 000 МЕ) производства ОАО «Белмедпрепараты» (Беларусь) по лицензии «Behringwerke AG» (Германия).

Источник ультразвука – генератор с регулируемой интенсивностью от 0 до 26,4 Вт/см². В тех случаях, когда это дополнительно не оговаривается, озвучивание проводилось при интенсивности УЗ 26,4 Вт/см². Кювета, содержащая озвучиваемые растворы белков в 0,05М калий-фосфатном буфере (рН 7,4), термостатировалась при 37 °С (при озвучивании температура повышалась не более чем на 0,5 °С).

Получение и активация смеси химотрипсиногена и трипсиногена. Гомогенат поджелудочной железы экстрагировали 0,125 М серной кислотой в течение 24 ч и центрифугировали при 15 000 · g 30 мин. Полученный супернатант подвергали фракционированию сухим сульфатом аммония и собирали фракцию, высаженную в диапазоне 40–70 % от насыщения. Осадок отделяли центрифугированием, растворяли в дистиллированной воде, диализовали против 0,001 М соляной кислоты в течение 24 ч и лиофильно высушивали. Содержание отдельных проферментов и минорных количеств активных протеаз в смеси проферментов оценивали по данным высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и титрованием фенилметилсульфонилфторидом, поскольку низкое содержание химотрипсина маскируется при ВЭЖХ высоким содержанием трипсиногена. Активацию проферментов проводили при 37 °С в 0,01 М калий-фосфатном буфере (рН 7,4) в течение 5 ч (контроль) и на фоне непрерывной ультразвуковой обработки продолжительностью 5, 20 и 40 мин.

Ферментативную активность определяли при 37 °С с использованием белкового субстрата казеина, активность трипсина анализировали с хромогенным субстратом *N*- α -бензоил-DL-аргинин-*p*-анилидом [12].

Протеолиз стрептокиназы плазмином. Растворы стрептокиназы (16 мкМ) и плазминогена (8 мкМ) готовили в 0,1 М калий-фосфатном буфере (рН 7,4) в присутствии 0,15 М NaCl при 4 °С. 2 мл стрептокиназы подвергали воздействию ультразвука мощностью 26,4 Вт/см² в течение 45 мин при 37 °С, контрольные 2 мл стрептокиназы инкубировали 40 мин при 37 °С, затем к каждой порции стрептокиназы добавляли раствор плазминогена до соотношения плазминоген/стрептокиназа 1:40 и инкубировали при 37 °С, отбирая аликвоты для электрофоретического анализа через 1, 5, 15, 45, 90 и 180 мин.

Высокоэффективную жидкостную хроматографию высокого давления проводили на хроматографе фирмы «Shimadzu» (Япония). В состав хроматографической системы входит: дегазирующее устройство GT-154; градиентный смеситель FCV-10A1; хроматографический насос IC-10AT; UV/VIS фотодиодный детектор SPD-M10A; системный контроллер SCI-10A («Shimadzu», Япония); инжектор («Rheodyne», США) с объемом петли 20 мкл. Использовали колонку (7,5 · 75 мм), содержащую силикагель с привитыми фенильными остатками, «TSK Phenyl-5PW» («IKB-Produkt AB», Швеция). Хроматография проводилась при следующих условиях: раствор А – 0,02 М калий-фосфатный буфер (рН 6,0) и 1,75 М (NH₄)₂SO₄ и раствор Б – 0,02 М калий-фосфатный буфер (рН 6,0). Обратный, экспоненциальный градиент раствора Б – в течение 23 мин, скорость протока 1 мл/мин, объем пробы – 20 мкл, λ – 280 нм. Условия хроматографии (форма градиента, интегрирование площадей пиков, скорость подачи элюента) задавали программным обеспечением Shimadzu – CLASS VP (Япония).

Гель-электрофорез в денатурирующих условиях проводили по методу, изложенному в работе [13], в 10 %-ном полиакриламидном геле. После проведения электрофореза гели помещали на 30 мин в 10 %-ную трихлоруксусную кислоту, затем отмывали следующей смесью: изопропанол, уксусная кислота, вода (1:2,5:7,5) и окрашивали 0,1 %-ным раствором кумасси голубого G-250 в 3,5 %-ном растворе HClO₄. Стандарты для электрофореза (фосфорилаза b 94 000 Да, альбумин из бычьей сыворотки 67 000 Да, овальбумин 43 000 Да, карбоангидраза 30 000 Да, соевый ингибитор трипсина 20 000 Да, α-лактальбумин 14 400 Да) – «Pharmacia Biotech», Швеция.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАЗВУКА НА ИЗОЛИРОВАННУЮ СТРЕПТОКИНАЗУ

Бактериальная стрептокиназа (КФ 3.4.99.0) – белок, синтезируемый различными штаммами β-гемолитических бактерий *Streptococcus* [14–16]. Это одноцепочечный полипептид с молекулярной массой 47 кДа, лишенный цистеина и цистина, который образует с плазминогеном эквимольный комплекс, катализирующий превращение плазминогена в плазмин [17–20]. Стрептокиназа или плазминоген по отдельности не обладают ферментативной активностью. Однако при их взаимодействии активный центр экспонируется в молекуле плазминогена без протеолитического расщепления. Образовавшийся комплекс плазминоген-стрептокиназа превращается в комплекс плазмин-стрептокиназа [21]. Оба комплекса могут действовать как активаторы плазминогена, катализируя гидролиз активирующей пептидной связи Arg⁵⁶⁰-Val⁵⁶¹ в других молекулах плазминогена [22]. Фибрин связывается с комплексом стрептокиназа-плазминоген или стрептокиназа-плазмин через Lys-связывающие участки этих комплексов.

Была исследована устойчивость препарата стрептокиназы к терапевтическим дозам ультразвуковых волн низкой частоты. Время УЗ-воздействия было выбрано в диапазоне от 5 до 60 мин. Контрольный образец подвергался тем же воздействиям, что и опытный, кроме УЗ-обработки.

В ходе ультразвуковой обработки через определенные промежутки времени отбирались пробы для анализа методом высокоэффективной гидрофобной жидко-

стной хроматографии в нативных условиях (рис. 1, *а*). Анализ полученных хроматограмм показал, что уменьшение содержания нативной стрептокиназы происходит прежде всего в результате необратимой денатурации белка. На это указывает появление дополнительных диффузных пиков незначительной интенсивности со временем удержания в пределах 15 и 26 мин и постепенное уменьшение площади основного пика (20,5 мин). Не исключена также деградация нативной молекулы стрептокиназы по механизму исчерпывающего протеолиза, на что указывает резкое возрастание содержания низкомолекулярных пептидов, фиксируемых в пределах 3–5 мин. По результатам хроматографического анализа была построена зависимость концентрации белка от времени непрерывного УЗ-воздействия (рис. 1, *б*). Установлено, что концентрация нативной стрептокиназы в течение первых 5–10 мин УЗ-обработки практически не изменялась. Время непрерывной УЗ-обработки для полуинактивации стрептокиназы составляет около 20 мин. Агрегация стрептокиназы может быть связана с дестабилизацией нативной конформации белка. Необратимое разворачивание этого белка наблюдается в диапазоне температур 53–63 °С и при значениях рН среды ниже 4,4 и выше 10,4 [23]. Депротонирование остатков His, Lys и Trp при высоких значениях рН и протонирование Asp и Glu в области низких рН ведет к повышению гидрофобности молекулы стрептокиназы и необратимой агрегации.

С помощью гель-электрофореза была исследована динамика изменения полипептидных фрагментов при автоактивации каталитического количества плазминогена в плазмин и протеолизе им нативной стрептокиназы и стрептокиназы, подвергнутой непрерывной обработке УЗ в течение 45 мин.

Через 15 мин после смешения плазминогена и нативной стрептокиназы обнаруживаются полосы тяжелой (60 кДа) и легкой цепей плазмина (25 кДа), образующихся в результате расщепления активационной связи Arg⁵⁶⁰-Val⁵⁶¹ (рис. 2, *а*). Одновременно с этим нативная стрептокиназа (47 кДа) превращается в форму с

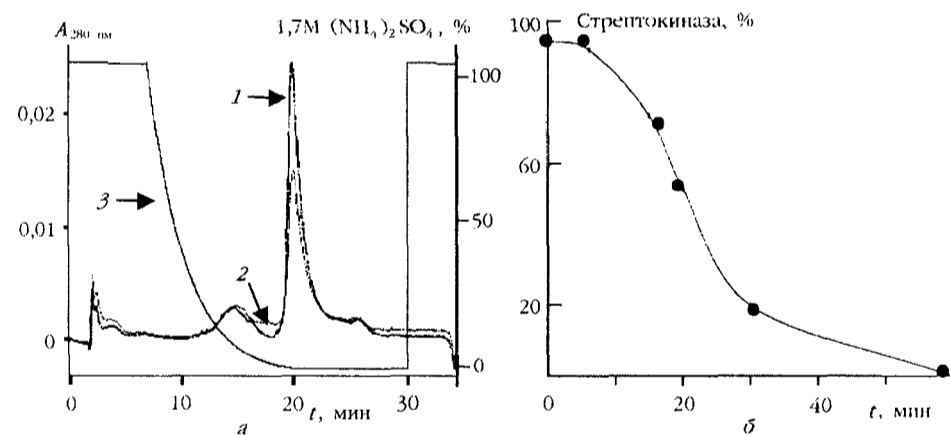


Рис. 1. Данные о влиянии низкочастотного ультразвука на раствор препарата стрептокиназы, полученные методом высокоэффективной жидкостной хроматографии гидрофобных взаимодействий: *а* – профиль элюции стрептокиназы обратным градиентом сульфата аммония (1 – нативная стрептокиназа; 2 – стрептокиназа, подвергнутая действию ультразвука в течение 20 мин; 3 – градиент сульфата аммония); *б* – график зависимости содержания стрептокиназы от времени воздействия ультразвука

молекулярной массой 40 кДа. Эти полипептидные фрагменты остаются практически без изменений в процессе инкубации при 37 °С в течение 3 ч. Характер процесса активации плазминогена стрептокиназой, модифицированной действием УЗ (рис. 2, б), отличался от приведенного выше. На первых этапах (до 15 мин) происходила активация плазмина. При этом две формы стрептокиназы (47 и 43 кДа, см. рис. 2, а) превращались в полипептид с молекулярной массой 40 кДа. Сумма молярных количеств фрагмента 47 кДа (нативная стрептокиназа) и 43 кДа после 15 мин протеолиза была меньше 1,0, что также говорит о частичной деградации этих форм стрептокиназы до более мелких фрагментов (38, 30, 26, 21, 18, 16 и 14 кДа). В контрольном опыте таких низкомолекулярных фрагментов не наблюдалось. Это может свидетельствовать о том, что ультразвук: 1) дестабилизирует нативную конформацию фермента с последующей необратимой агрегацией; 2) модифицирует аминокислотные остатки кислородсодержащими радикалами, образующимися при пробое кавитационной полости; 3) локальное повышение температуры при захлопывании кавитационных полостей приводит к термической денатурации молекулы, при этом плазмин может протеолитически модифицировать стрептокиназу в развернутой конформации не только в обычных точках гидролиза, но и в некоторых других точках, ставших доступными участками полипептидной цепи.

Возможность агрегации стрептокиназы показана в экспериментах по ВЭЖХ образцов белка, подвергнутого УЗ-обработке. Факторы 2) и 3) приводят к ковалентной модификации стрептокиназы, что выражается в образовании формы с молекулярной массой 43 кДа по данным гель-электрофореза в денатурирующих условиях. Локальное повышение температуры может также приводить к разворачиванию нативной конформации, агрегации и протеолитической модификации плазмином. Вместе с тем известно, что каталитических количеств стрептокиназы (соотношение стрептокиназа/плазминоген 1: 500) достаточно для эффективного образования плазмина. Протеолитически модифицированные образцы стрептокиназы также обладают потенциальной плазминоген-активаторной функцией. Поэтому в результате

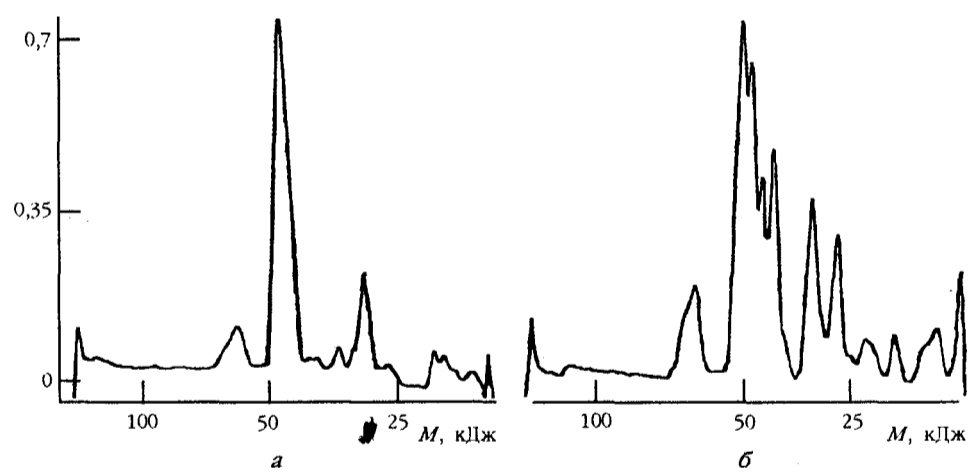


Рис. 2. Электрофореграммы, иллюстрирующие эффект ультразвуковой обработки стрептокиназы при ее протеолизе плазмином (37 °С в течение 15 мин): а – нативная стрептокиназа с плазмином; б – протеолиз стрептокиназы, обработанной ультразвуком 45 мин

УЗ-обработки стрептокиназы мы не обнаружили принципиальных отличий в кинетике образования пламина.

Ранее установлено, что протеолитически модифицированные формы стрептокиназы (36 и 25,7 кДа), полученные в результате протеолиза плазмином, могут активировать пламиноген человека [24, 25]. Фрагмент стрептокиназы с молекулярной массой 17 кДа (Val¹⁴⁴-Arg²⁸⁹), полученный в результате реакции с иммобилизованным на сефарозе пламиногеном (плазмином), является наименьшим фрагментом стрептокиназы, способным связываться с пламиногеном [26]. Фрагмент стрептокиназы (Ser⁶⁰-Lys³³⁴) существен для проявления минимальной активаторной активности, а NH₂-концевой 59-членный пептид важен для придания молекуле белка конформации, необходимой для проявления полной активаторной функции [27]. Генно-инженерными методами были получены различные полипептидные фрагменты стрептокиназы, структурно-функциональный анализ которых позволил определить функции пяти участков (областей) молекулы нативной стрептокиназы при взаимодействии с пламиногеном: 1) Ile¹-Lys⁵⁹; 2) Ser⁶⁰-Asn⁹⁰; 3) Val¹⁵⁸-Arg²¹⁹; 4) Tyr²⁵²-Ala³¹⁶; 5) Ser³¹⁷-Ala³⁷⁸. Участок 1 важен для стабилизации конформации молекулы стрептокиназы, а участок 2 существен для активации пламиногена. Участок 3 необходим для индукции конформационных переходов пламиногена с экспонированием каталитического центра без расщепления активационной пептидной связи. Области 3 и 4 обеспечивают превращение пламиногена в пламин в составе эквимольного комплекса пламиногена со стрептокиназой. Координация областей 2, 3, 4 и 5 существенна для наиболее эффективного выполнения активаторной функции стрептокиназы [28, 29].

ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАЗВУКА НА ПРОЦЕСС АКТИВАЦИИ ХИМОТРИПСИНОГЕНА И ТРИПСИНОГЕНА

В качестве объекта исследования использовали смесь неактивированных сериновых протеаз – химотрипсиногена и трипсиногена, полученную в лаборатории Научно-исследовательского института физико-химических проблем сульфатаммонийным фракционированием экстракта из поджелудочной железы крупного рогатого скота [30]. Активация этих проферментов может служить моделью для исследования влияния УЗ на процесс активации пламиногена под действием стрептокиназы или на процесс автоактивации компонентов тромбиновой системы свертывания крови. Влияние УЗ-обработки оценивали по общей протеолитической активности и молярным выходам соответствующих полипептидных и низкомолекулярных продуктов методом ВЭЖХ. В опытах применяли время непрерывного УЗ-воздействия – 5, 20 и 40 мин. Контроль – смесь проферментов без предварительной УЗ-обработки. Концентрация проферментов – 22,3 мкМ химотрипсиноген, 20,4 мкМ трипсиноген. Температура УЗ-обработки и активации проферментов 37 °С. На рис. 3 представлено изменение протеолитической активности во времени в процессе активации проферментов.

На данной кривой можно выделить три участка: экспоненциальный (0– τ_1), участок прямо пропорционального повышения активности (τ_1 – τ_2), участок стационарной активности и ингибирования ($> \tau_2$). Анализ кривых зависимостей протеолитической активности от времени показал, что УЗ-обработка независимо от ее продолжительности приводит в выраженному увеличению экспоненциальной фазы: для контроля – 90 мин, для опытных образцов – 120 мин.

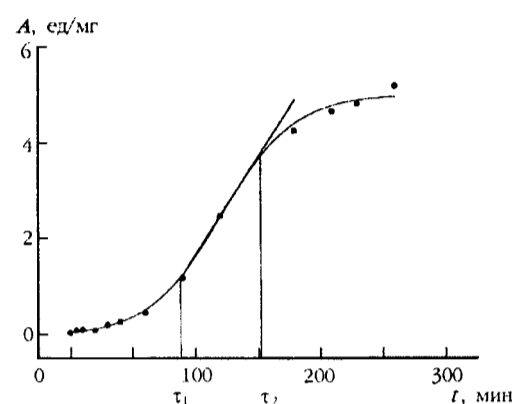


Рис. 3. Зависимость протеолитической активности от времени в процессе автоактивации смеси проферментов. $0-\tau_1$ — экспоненциальный участок; $\tau_1-\tau_2$ — прямо пропорциональный участок

деградации части активированных ферментов. Увеличение экспоненциального участка, уменьшение значений k_1 и k_2 при УЗ-воздействии позволяет предположить, что в системе автоактивации проферментов имеется одна из форм ферментов, чувствительная к действию ультразвука. Протеолитическая активность соответствует скорости гидролиза казеина и при экспериментальных условиях, когда $[S]_0 \gg [E]_0$, начальная скорость реакции $v = k_{кат} \cdot [E]_0$. Для того чтобы выяснить, какой из параметров, $[E]_0$ или k меняется при воздействии УЗ, нами параллельно с относительной ферментативной активностью озвученных растворов проферментов была определена динамика изменения содержания всех белков методом ВЭЖХ, позволяющим контролировать изменение концентрации химотрипсиногена, трипсиногена, химотрипсина, трипсина и низкомолекулярных продуктов активации и автолиза в процессе активации [30]. На рис. 4 приведены хроматограммы исходной смеси проферментов; через 60 мин активации для контроля (без УЗ-обработки) и предварительной 5- и 20-минутной обработки УЗ. В отличие от контрольного эксперимента (данные не приведены), на хроматограммах (рис. 4, б-г) отсутствует трипсин. Интегрирование пиков на хроматограммах позволило определить относительное молярное содержание различных белков в процессе активации. Экспоненциальные участки кинетики активации проферментов обусловлены прежде всего накоплением химотрипсина. Максимальные выходы химотрипсина дос-

В таблице приведены данные по величине и значениям констант скорости для экспоненциальной фазы и линейного участка. Из этих данных следует, что экспоненциальный участок для образцов, подвергнутых действию УЗ, увеличивается независимо от времени его непрерывного воздействия и составляет 120 мин, а значения τ_2 возрастают от 150 мин (контроль) до 210–230 мин. Значения констант скорости для обеих фаз уменьшались примерно в 2 раза независимо от продолжительности УЗ-воздействия. Все кривые имеют сигмоидальный характер, свидетельствующий об автокаталитическом характере процесса активации, хотя не полностью описываются этой моделью вследствие глубокой

Кинетические параметры процесса автоактивации смеси проферментов

УЗ-воздействие, мин	A_{max} , ед/мг	τ_1 , мин	k_1^* , Е.д/(мг·мин)	τ_2 , мин	k_2^{**} , мин ⁻¹
0	5,3	90	0,029	150	0,044
5	3,8	120	0,015	230	0,017
20	4,9	120	0,018	210	0,022
40	3,9	120	0,015	210	0,020

* k_1 — константа скорости для экспоненциального участка кинетической кривой.

** k_2 — константа скорости для прямо пропорционального участка кинетической кривой.

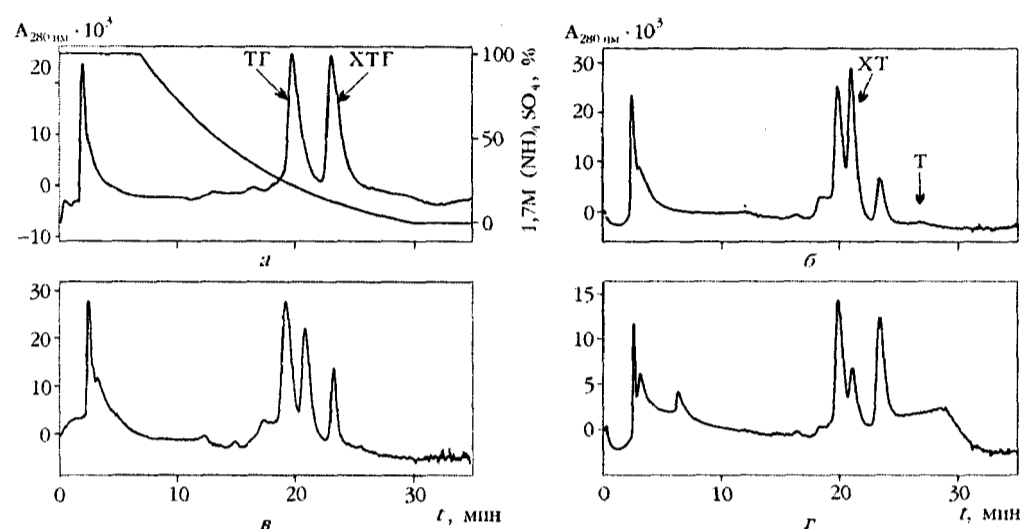


Рис. 4. ВЭЖХ хроматограммы исходной смеси проферментов (а) и через 60 мин активации без УЗ-воздействия (б), непрерывного УЗ-воздействия в течение 5 мин (в) и 20 мин (г). ТГ – трипсиноген, ХТГ – химотрипсиноген, ХТ – химотрипсин, Т – трипсин

тигали 70–80 % через 300 мин активации. Воздействие УЗ приводило к замедлению скорости перехода химотрипсиногена в химотрипсин: эквимоллярность этих белков наблюдалась при 80 мин активации для контроля и при 110–120 мин активации на фоне 5- и 40-минутной непрерывной УЗ-обработки. В ходе активации наблюдалось уменьшение концентрации трипсиногена без стехиометрического образования трипсина.

Учитывая, что в препарате проферментов обычно содержится 0,5–1,0 % трипсина и химотрипсина (за счет чего и возможна активация химотрипсиногена путем трипсинолиза и автокатализа с выщеплением двух дипептидов из молекулы профермента, а активация трипсиногена с отщеплением N-концевого гексапептида – автокатализом), отсутствие выраженных пиков трипсина свидетельствует, что этот белок является наиболее чувствительным к УЗ-обработке и его инактивация обуславливает увеличение продолжительности экспоненциальной фазы. Отклонение сигмоидальных кривых на рис. 3 от теоретического процесса автоактивации обусловлено, прежде всего, протеолитической атакой химотрипсина на инактивированный УЗ трипсин и автолизом самого химотрипсина, о чем свидетельствует возрастание доли низкомолекулярных продуктов.

Учитывая большое структурное сходство активных центров и механизмов действия трипсина и пламина, можно предположить, что при локальном воздействии ультразвука происходит инактивация присутствующего в районе тромба пламина и для последующего успешного тромболиза необходимо время для активации стрептокиназой перехода новых молекул пламиногена в пламин.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Непрерывное воздействие УЗ в течение 10 мин не вызывает изменения структурно-функциональных свойств молекулы стрептокиназы. Увеличение времени

непрерывной УЗ-обработки (10–60 мин) сопровождается нарушением структурной организации стрептокиназы и необратимой агрегацией части белка. Модифицированная ультразвуком стрептокиназа способствует автоактивации плазминогена. Одновременно в молекуле стрептокиназы появляются дополнительные участки, доступные для протеолитического щепления плазмином. При автоактивации эквимольной смеси химотрипсиногена и трипсиногена на фоне УЗ-обработки обнаружено увеличение экспоненциальной фазы и снижение скорости процесса активации зимогенов. Из четырех белков (химотрипсиногена, трипсиногена, химотрипсина и трипсина), участвующих в протеолитической автоактивации, наиболее чувствительным к действию УЗ является трипсин.

ЛИТЕРАТУРА

1. World Health Organization. World Health Statistics Annual. 1995. Geneva, 1996. B800–B818.
2. World Health Organization. The World Health Report: conquering, suffering, enriching humanity. Geneva, 1997.
3. Mrochek A. G., Adzerikho I. E., Tarakanov Y. P., Kozmidiadi O. A. // Eur. Heart J. 1999. № 20. P. 134.
4. Suchkova V. N., Baggs R. B., Francis C. W. // Circulation. 2000. V. 101, № 19. P. 2296.
5. Адзерихо И. Э., Мрочек А. Г., Дмитриев В. В., Кулак А. И. // Докл. НАН Беларуси. 1999. Т. 43, № 3. С. 14.
6. Behrens S., Daffershofer M., Spiegel D., Hennerici M. // Ultrasound Med. Biol. 1999. V. 25, № 2. P. 269.
7. Nilsson A. M., Odselius R., Roijer A., Olsson S. B. // Ultrasound Med. Biol. 1995. V. 21, № 6. P. 833.
8. Lauer C. G., Burge R., Tang D. B. et al. // Circulation. 1992. Oct. V. 86, № 4. P. 1257.
9. Mrochek A. G., Adzerikho I. E., Dmitriev V. V. // Hospitalis. 1997. № 67. P. 7.
10. Lee P. C., Gibbons G. H., Dzau V. J. Coron. // Arter. Dis. 1993. № 4. P. 254.
11. Nikol S., Huehns T. Y., Hoffling B. // Atherosclerosis. 1996. V. 123. P. 17.
12. Guyonnet V., Tluscik F., Long P. L. et al. // J. Chrom. 1999. V. 852. P. 217.
13. Weber K., Osborn N. // J. Biol. Chem. 1969. V. 244. P. 4406.
14. Tillet W. S., Garner R. L. // J. Exp. Med. 1933. № 58. P. 485.
15. Jackson K. W., Tang J. // Biochemistry. 1982. № 21. P. 6620.
16. Wulf R. J., Mertz E. T. // Can. J. Biochem. 1969. № 47. P. 927.
17. Ling C. M., Summaria L., Robbins K. C. // J. Biol. Chem. 1965. V. 240. P. 4213.
18. Reddy K. N. N., Markus G. // J. Biol. Chem. 1972. V. 247. P. 1683.
19. Schick L. A., Castellino F. J. // Biochemistry. 1973. № 12. P. 4315.
20. Bajaj S. P., Castellino F. J. // J. Biol. Chem. 1977. V. 252. P. 492.
21. Summaria L., Wohl R. C., Boreisha I. G., Robbins K. C. // Biochemistry. 1982. № 21. P. 2056.
22. Reddy K. N. N. // Enzyme. 1988. № 40. P. 79.
23. Radek J. T., Castellino F. J. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 9915.
24. Sieftring C. E. Jr., Castellino F. J. // J. Biol. Chem. 1976. V. 251. P. 3913.
25. Reddy K. N. N., Kline D. L. // Thromb. Res. 1976. № 9. P. 407.
26. Rodrigues P., Fuentes D., Munoz E. et al. // Fibrinolysis. 1994. № 8. P. 276.
27. Shi G. Y., Chang B. I., Chen S. M. et al. // Biochem. J. 1994. V. 304. P. 235.
28. Young K. C., Shi G. Y., Chang Y. F. et al. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 29601.
29. Young K. C., Shi G. Y., Wu D. H. et al. // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. P. 3110.
30. Шкуматов В. М., Овсянко С. Л., Рудой А. Л. и др. // Изв. НАН Беларуси. 2000. № 2. С. 30.